PSI-BLAST. Множественное выравнивание. Профили. Домены

Многие слайды и материалы используемые в презентации взяты из книги Bioinformatics and Functional Genomics by Jonathan Pevsner Copyright © 2009 by John Wiley & Sons, Inc. и соответствующего курса по биоинформатики Johns Hopkins School of Medicine

BLAST не может решить две проблемы

[1] При использовании человеческого бета-глобина в виде запроса для белков RefSeq, BLASTP не "найдет" миоглобин человека. Потому что эти два белка имеют слишком отдаленное родство. PSI-BLAST в NCBI, а также скрытые Марковские модели легко решают эту проблему.

[2] Нельзя задавать запрос для поиска в виде 10 000 пар оснований или миллионов пар оснований. Многие BLAST подобные инструменты для геномной ДНК имеют такие возможности: PatternHunter, Megablast, BLAT и BLASTZ.

Position specific iterated BLAST: PSI-BLAST

Цель PSI-BLAST - посмотреть глубже в базу данных в поисках совпадений с вашей последовательностью белка путем использования оценочной матрицы, которая настроена на ваш запрос.

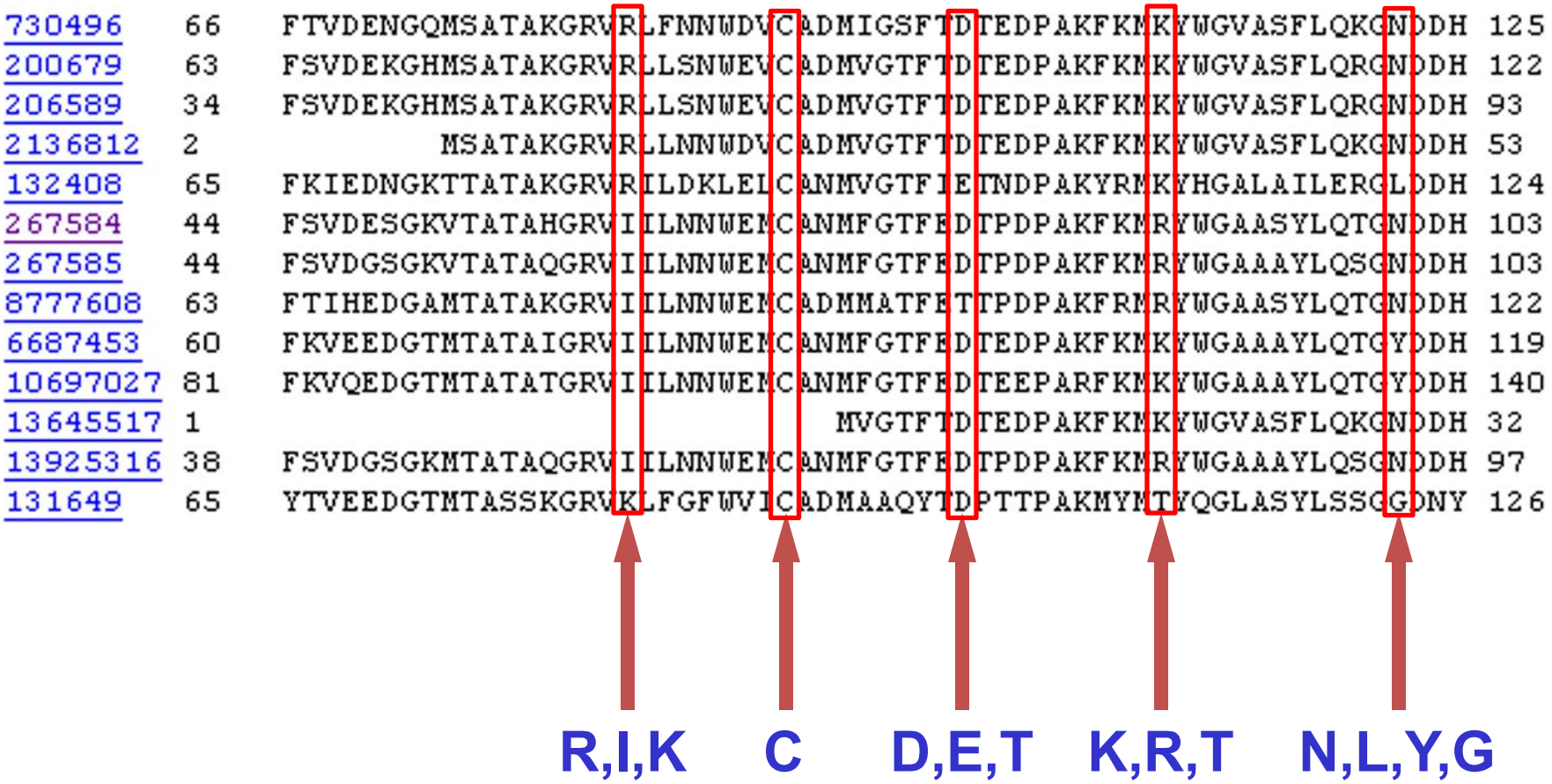
Общая идея : заменяем сиквенс белка вероятностной моделью семейства белков

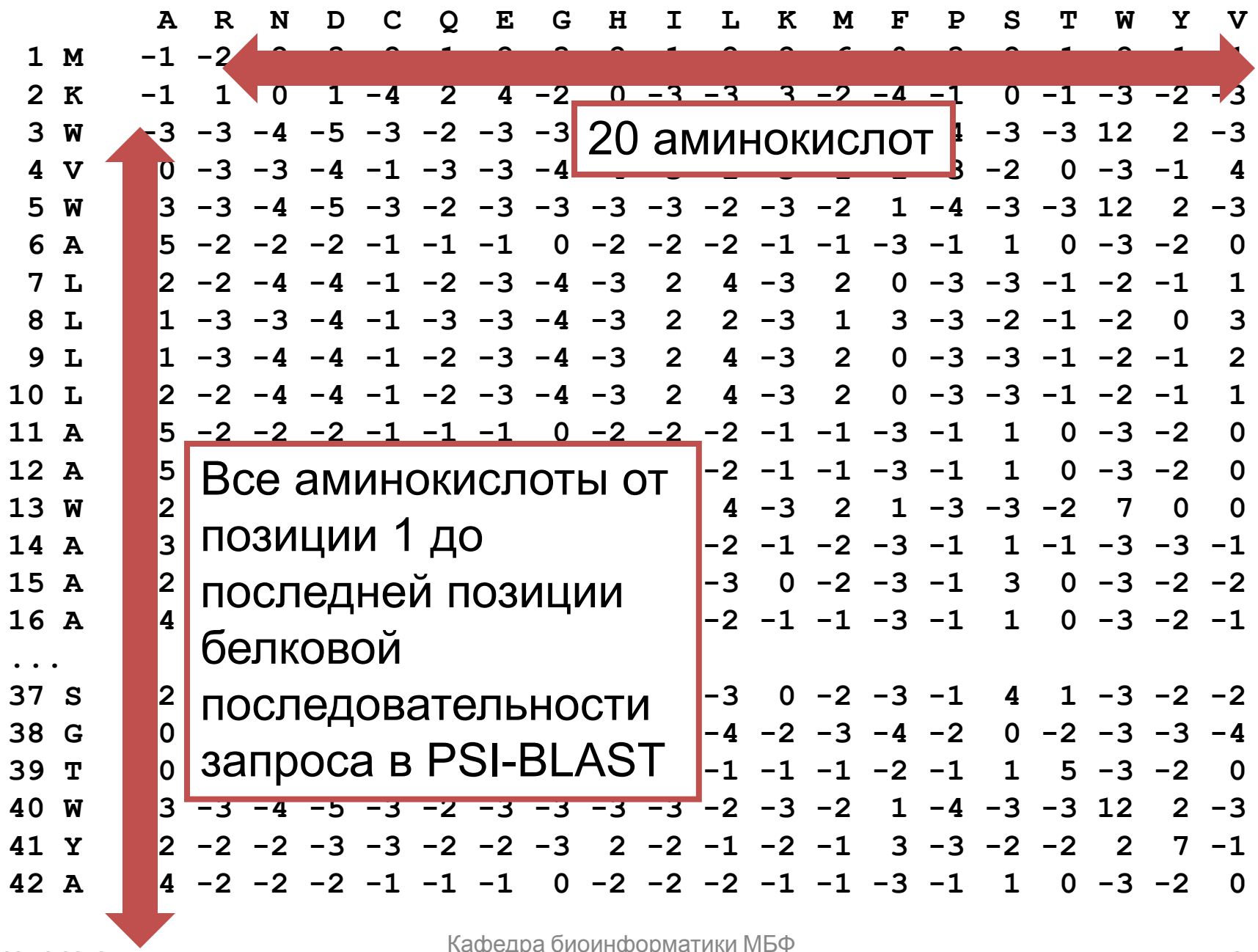
Поиск в PSI-BLAST выполняется в пять шагов

[1] Выберите последовательность и запустите поиск в базе данных последовательностей белков

[2] PSI-BLAST строит множественное выравнивание последовательностей затем создает «профиль» или специализированную позиционно-специфическую оценочную матрицу (PSSM - position-specific scoring matrix).

Проверка вывода BLASTP для выявления эмпирических "правил" в отношении изменчивости аминокислот в каждой позиции




A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V
1 M -1 -2
2 K -1 1 0 1 -4 2 4 -2 0 -3 -3 3 -2 -4 -1 0 -1 -3 -2 -3
3 W -3 -3 -4 -5 -3 -2 -3 -3 -3 -3 -2 -3 -2 1 -4 -3 -3 12 2 -3
4 V 0 -3 -3 -4 -1 -3 -3 -4 -2 0 -3 -2 0 -3 -1 4
5 W 3 -3 -4 -5 -3 -2 -3 -3 -3 -3 -2 -3 -2 1 -4 -3 -3 12 2 -3
6 A 5 -2 -2 -2 -1 -1 -1 0 -2 -2 -2 -1 -1 -3 -1 1 0 -3 -2 0
7 L 2 -2 -4 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4 -3 2 0 -3 -3 -1 -2 -1 1
8 L 1 -3 -3 -4 -1 -3 -3 -4 -3 2 2 -3 1 3 -3 -2 -1 -2 0 3
9 L 1 -3 -4 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4 -3 2 0 -3 -3 -1 -2 -1 2
10 L 2 -2 -4 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4 -3 2 0 -3 -3 -1 -2 -1 1
11 A 5 -2 -2 -2 -1 -1 -1 0 -2 -2 -2 -1 -1 -3 -1 1 0 -3 -2 0
12 A 5 -2 -1 -1 -3 -1 1 0 -3 -2 0
13 W 2 4 -3 2 1 -3 -3 -2 7 0 0
14 A 3 -2 -1 -2 -3 -1 1 -1 -3 -3 -1
15 A 2 -3 0 -2 -3 -1 3 0 -3 -2 -2
16 A 4 -2 -1 -1 -3 -1 1 0 -3 -2 -1
...
37 S 2 -3 0 -2 -3 -1 4 1 -3 -2 -2
38 G 0 -4 -2 -3 -4 -2 0 -2 -3 -3 -4
39 T 0 -1 -1 -1 -2 -1 1 5 -3 -2 0
40 W 3 -3 -4 -5 -3 -2 -3 -3 -3 -3 -2 -3 -2 1 -4 -3 -3 12 2 -3
41 Y 2 -2 -2 -3 -3 -2 -2 -3 2 -2 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7 -1
42 A 4 -2 -2 -2 -1 -1 -1 0 -2 -2 -2 -1 -1 -3 -1 1 0 -3 -2 0
20 аминокислот
Все аминокислоты от позиции 1 до последней позиции белковой последовательности запроса в PSI-BLAST

		A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
1	M	-1	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	-2	1	2	-2	6	0	-3	-2	-1	-2	-1	1
2	K	-1	1	0	1	-4	2	4	-2	0	-3	-3	3	-2	-4	-1	0	-1	-3	-2	-3
3	W	-3	-3	-4	-5	-3	-2	-3	-3	-3	-3	-2	-3	-2	1	-4	-3	-3	12	2	-3
4	V	0	-3	-3	-4	-1	-3	-3	-4	-4	3	1	-3	1	-1	-3	-2	0	-3	-1	4
5	W	-3	-3	-4	-5	-3	-2	-3	-3	-3	-3	-2	-3	-2	1	-4	-3	-3	12	2	-3
6	A	5	-2	-2	-2	-1	-1	-1	0	-2	-2	-2	-1	-1	-3	-1	1	0	-3	-2	0
7	L	-2	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-4	-3	2	4	-3	2	0	-3	-3	-1	-2	-1	1
8	L	-1	-3	-3	-4	-2	-2	-3	-4	-3	2	4	-2	2	0	-3	-2	-1	-2	0	3
9	L	-1	-3	-4	-4	-2	-3	-3	-4	-3	2	4	-3	2	0	-3	-3	-1	-2	-1	2
10	L	-2	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-4	-3	2	4	-3	2	0	-3	-3	-1	-2	-1	1
11	A	5	-2	-2	-2	-1	-1	-1	0	-2	-2	-2	-1	-1	-3	-1	1	0	-3	-2	0
12	A	5	-2	-2	-2	-1	-1	-1	0	-2	-2	-2	-1	-1	-3	-1	1	0	-3	-2	0
13	W	-2	-3	-4	-4	-2	-3	-3	-4	-3	2	4	-3	2	0	-3	-3	-2	7	0	0
14	A	3	-2	-1	-2	-1	-1	-1	0	-2	-2	-2	-1	-1	-3	-1	1	-1	-3	-3	-1
15	A	2	-1	0	-2	-1	-1	-1	0	-2	-2	-2	-1	-1	-3	-1	3	0	-3	-2	-2
16	A	4	-2	-1	-2	-1	-1	-1	0	-2	-2	-2	-1	-1	-3	-1	1	0	-3	-2	-1
...																					
37	S	2	-1	0	-1	-1	-1	-1	0	-2	-2	-2	-1	-1	-3	-1	4	1	-3	-2	-2
38	G	0	-3	-1	-2	-3	-2	-2	6	-3	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-3	-3	-4
39	T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5	-3	-2	0
40	W	-3	-3	-4	-5	-3	-2	-3	-3	-3	-3	-2	-3	-2	1	-4	-3	-3	12	2	-3
41	Y	-2	-2	-2	-3	-3	-2	-2	-3	2	-2	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	-1
42	A	4	-2	-2	-2	-1	-1	-1	0	-2	-2	-2	-1	-1	-3	-1	1	0	-3	-2	0

обратите внимание, что данная аминокислота (например, аланин) в последовательности запроса может по разному оцениваться при совпадении с аланином - в зависимости от положения в белке

Поиск в PSI-BLAST выполняется в пять шагов

[1] Выберите последовательность и запустите поиск в базе данных последовательностей белков

[2] PSI-BLAST строит множественное выравнивание последовательностей затем создает «профиль» или специализированную позиционно-специфическую оценочную матрицу (PSSM - position-specific scoring matrix).

[3] PSSM используется при запросе для дальнейшего поиска в базе данных

[4] PSI-BLAST оценивает статистическую значимость (E values)

	gi|6978523|ref|NP_036909.1|	apolipoprotein D [Rattus norvegicus]...	147	4e-35
	gi|1542847|dbj|BAA13453.1|	(D87752) alpha1-microglobulin/bikunin...	144	6e-34
	gi|619383|gb|AAB32200.1|	apolipoprotein D, apoD [human, plasma, ...	143	8e-34
	gi|5419892|emb|CAB46489.1|	(X02824) RBP (aa 101-172) [Homo sapiens]	139	1e-32
	gi|4502163|ref|NP_001638.1|	apolipoprotein D precursor [Homo sap...	138	4e-32
	gi|584763|sp|P37153|APD_RABIT	APOLIPOPROTEIN D PRECURSOR >gi|482...	134	4e-31
	gi|1703341|sp|P51909|APD_CAVPO	APOLIPOPROTEIN D PRECURSOR >gi|11...	133	7e-31
	gi|2895204|gb|AAC02945.1|	(AF025334) mutant retinol binding prot...	80	9e-15
	gi|1246096|gb|AAB35919.1|	(S80440) apolipoprotein D, apoD (C-ter...	77	8e-14
	gi|2895206|gb|AAC02946.1|	(AF025335) mutant retinol binding prot...	67	8e-11
NEW	gi|1346419|sp|P49291|LAZA_SCHAM	LAZARILLO PROTEIN PRECURSOR >gi|...	63	1e-09
NEW	gi|2506821|sp|P00978|AMBP_BOVIN	AMBP PROTEIN PRECURSOR [CONTAINS...	63	2e-09
NEW	gi|2497696|sp|Q07456|AMBP_MOUSE	AMBP PROTEIN PRECURSOR [CONTAINS...	63	2e-09
NEW	gi|6680684|ref|NP_031469.1|	alpha 1 microglobulin/bikunin [Mus m...	62	2e-09
NEW	gi|12836446|dbj|BAB23659.1|	(AK004907) putative [Mus musculus]	62	3e-09
NEW	gi|6978497|ref|NP_037033.1|	alpha-1 microglobulin/bikunin [Rattu...	62	3e-09
NEW	gi|2507586|sp|P04366|AMBP_PIG	AMBP PROTEIN PRECURSOR [CONTAINS: ...	61	8e-09
NEW	gi|1085207|pir||JC2556	alpha-1-microglobulin/inter-alpha-trypsin...	60	1e-08
NEW	gi|2988354|dbj|BAA25305.1|	(AB006444) alpha-1-microglobulin/biku...	59	2e-08
NEW	gi|108233|pir||S13493	alpha-1-microglobulin - pig	59	2e-08
NEW	gi|1882|emb|CAA36306.1|	(X52087) precursor codes for two protein...	59	2e-08
NEW	gi|9181923|gb|AAF85707.1|AF276505_1	(AF276505) neural Lazarillo ...	59	3e-08
NEW	gi|7296083|gb|AAF51378.1|	(AE003586) NLaz gene product [Drosophi...	58	3e-08
NEW	gi|117330|sp|P80007|CRA2_HOMGA	CRUSTACYANIN A2 SUBUNIT >gi|10275...	57	8e-08
NEW	gi|2497695|sp|Q60559|AMBP_MESAU	AMBP PROTEIN PRECURSOR [CONTAINS...	57	1e-07
NEW	gi|102968|pir||S22400	insecticyanin A - tobacco hornworm >gi|971...	56	1e-07
NEW	gi|4502067|ref|NP_001624.1|	alpha-1-microglobulin/bikunin precur...	56	2e-07
NEW	gi|1146408|gb|AAA85089.1|	(L41641) gallerin [Galleria mellonella]	56	2e-07
NEW	gi|2497694|sp|Q62577|AMBP_MERUN	AMBP PROTEIN PRECURSOR [CONTAINS...	55	3e-07
NEW	gi|1213589|dbj|BAA12075.1|	(D83712) Prostaglandin D Synthase [Xe...	54	5e-07
	gi|539717|pir||A61233	retinol-binding protein - cat (fragment)	54	8e-07
NEW	gi|266472|sp|Q01584|LIPO_BUFMA	LIPOCALIN PRECURSOR >gi|104284|pi...	53	1e-06
	gi|265042|gb|AAB25283.1|	retinol-binding protein, RBP (N-termina...	52	3e-06
NEW	gi|1079295|pir||S52354	gene cpl-1 protein - African clawed frog ...	52	3e-06
NEW	gi|732003|sp|P39281|BLC_ECOLI	OUTER MEMBRANE LIPOPROTEIN BLC PRE...	51	9e-06

Поиск в PSI-BLAST выполняется в пять шагов

[1] Выберите последовательность и запустите поиск в базе данных последовательностей белков

[2] PSI-BLAST строит множественное выравнивание последовательностей затем создает «профиль» или специализированную позиционно-специфическую оценочную матрицу (PSSM - position-specific scoring matrix).

[3] PSSM используется как запрос для поиска в базе данных

[4] PSI-BLAST оценивает статистическую значимость (E values)

[5] Итеративное повторение шагов [3] и [4], обычно 5 раз.

При каждом новом поиске, новый профиль используется в качестве запроса.

Результаты поиска PSI-BLAST

Итерация	Кол. посл.	Кол. посл. > threshold
1	104	49
2	173	96
3	236	178
4	301	240
5	344	283
6	342	298
7	378	310
8	382	320

Поиск PSI-BLAST: RBP4 человека по RefSeq БД, итерация 1

Sequences with E-value BETTER than threshold

		Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
NEW	☑	ref|NP_006735.2| retinol-binding protein 4, plasma precursor [Ho	398	1e-111	UG
NEW	☑	ref|NP_001638.1| apolipoprotein D precursor [Homo sapiens]	57.4	7e-09	UG
NEW	☑	ref|NP_001018059.1| glycodelin precursor [Homo sapiens] >ref|...	36.2	0.019	UG
NEW	☑	ref|NP_001624.1| alpha-1-microglobulin/bikunin precursor [Homo s	35.8	0.021	UG

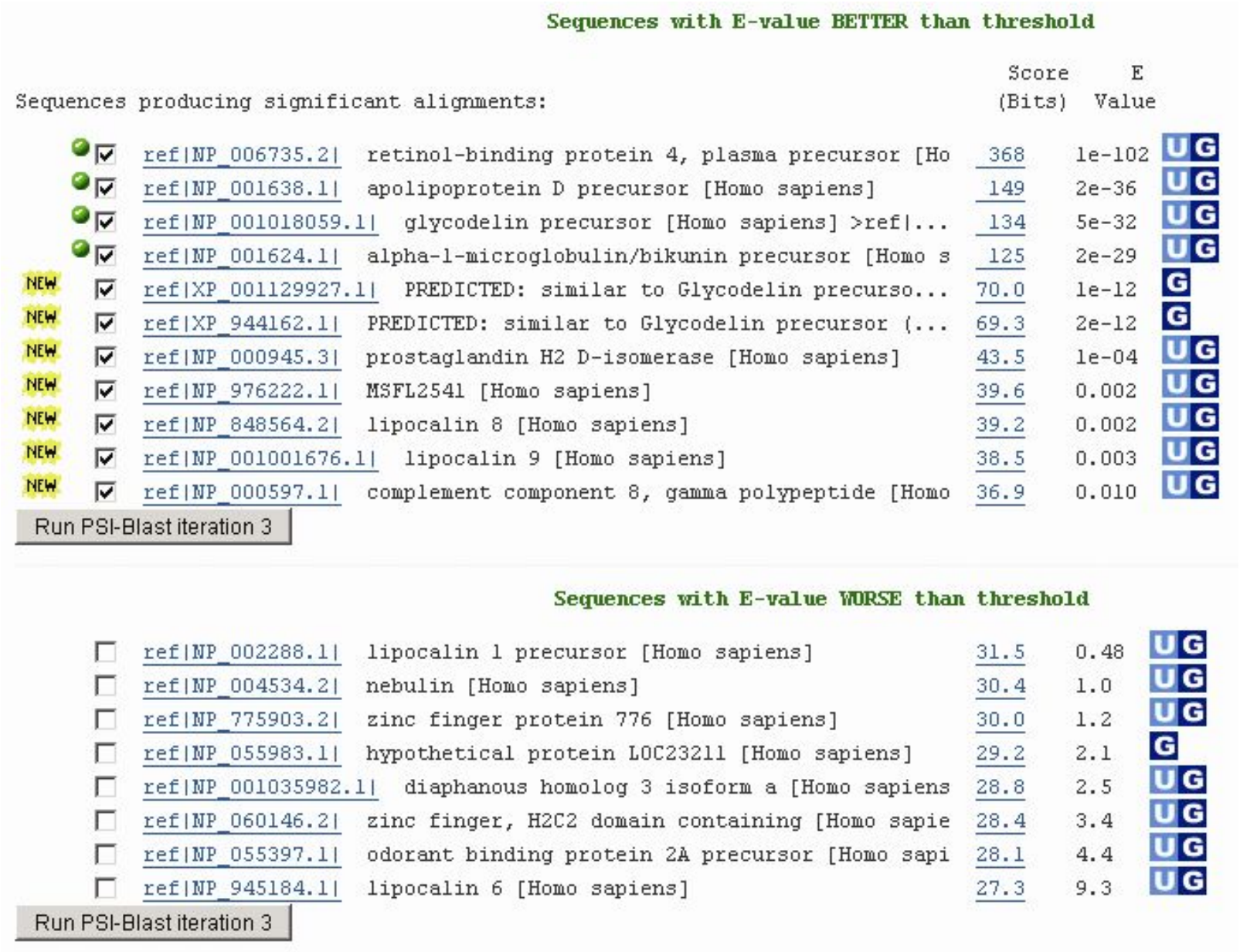
Run PSI-Blast iteration 2

Sequences with E-value WORSE than threshold

	☐	ref|NP_000597.1| complement component 8, gamma polypeptide [Homo	33.9	0.077	UG
	☐	ref|NP_976222.1| MSFL2541 [Homo sapiens]	28.5	3.8	UG
	☐	ref|NP_066015.2| hypothetical protein LOC57724 [Homo sapiens]	27.3	7.5	UG

Run PSI-Blast iteration 2

Поиск PSI-BLAST: RBP4 человека по RefSeq БД, итерация 2



Sequences with E-value BETTER than threshold

		Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
	ref|NP_006735.2|	retinol-binding protein 4, plasma precursor [Ho	368	1e-102	UG
	ref|NP_001638.1|	apolipoprotein D precursor [Homo sapiens]	149	2e-36	UG
	ref|NP_001018059.1|	glycodelin precursor [Homo sapiens] >ref|...	134	5e-32	UG
	ref|NP_001624.1|	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor [Homo s	125	2e-29	UG
NEW	ref|XP_001129927.1|	PREDICTED: similar to Glycodelin precurso...	70.0	1e-12	G
NEW	ref|XP_944162.1|	PREDICTED: similar to Glycodelin precursor (...	69.3	2e-12	G
NEW	ref|NP_000945.3|	prostaglandin H2 D-isomerase [Homo sapiens]	43.5	1e-04	UG
NEW	ref|NP_976222.1|	MSFL2541 [Homo sapiens]	39.6	0.002	UG
NEW	ref|NP_848564.2|	lipocalin 8 [Homo sapiens]	39.2	0.002	UG
NEW	ref|NP_001001676.1|	lipocalin 9 [Homo sapiens]	38.5	0.003	UG
NEW	ref|NP_000597.1|	complement component 8, gamma polypeptide [Homo	36.9	0.010	UG

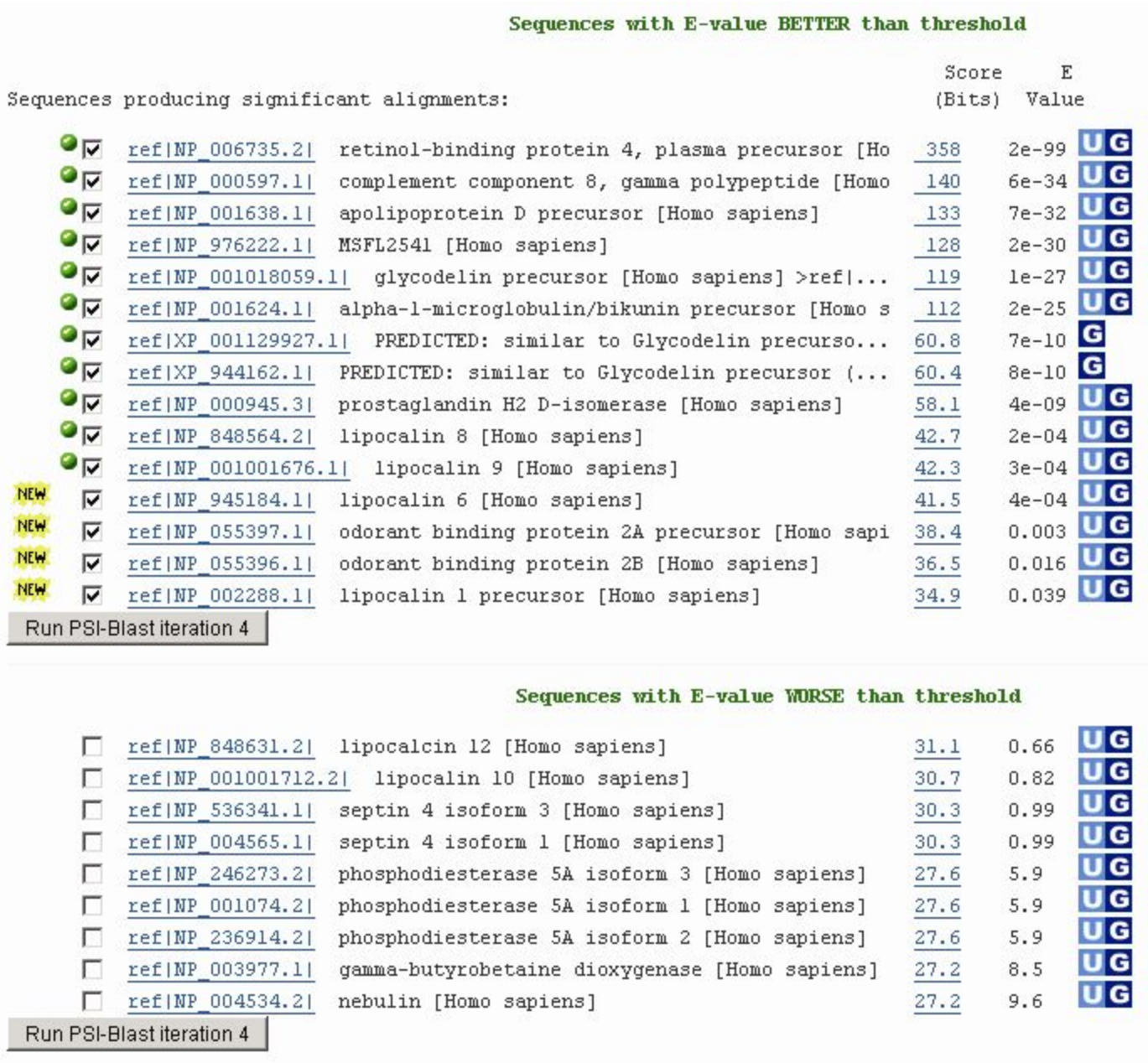
Run PSI-Blast iteration 3

Sequences with E-value WORSE than threshold

	ref|NP_002288.1|	lipocalin 1 precursor [Homo sapiens]	31.5	0.48	UG
	ref|NP_004534.2|	nebulin [Homo sapiens]	30.4	1.0	UG
	ref|NP_775903.2|	zinc finger protein 776 [Homo sapiens]	30.0	1.2	UG
	ref|NP_055983.1|	hypothetical protein LOC23211 [Homo sapiens]	29.2	2.1	G
	ref|NP_001035982.1|	diaphanous homolog 3 isoform a [Homo sapiens	28.8	2.5	UG
	ref|NP_060146.2|	zinc finger, H2C2 domain containing [Homo sapie	28.4	3.4	UG
	ref|NP_055397.1|	odorant binding protein 2A precursor [Homo sapi	28.1	4.4	UG
	ref|NP_945184.1|	lipocalin 6 [Homo sapiens]	27.3	9.3	UG

Run PSI-Blast iteration 3

Поиск PSI-BLAST: RBP4 человека по RefSeq БД, итерация 3



Sequences with E-value BETTER than threshold

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value	
ref|NP_006735.2|	retinol-binding protein 4, plasma precursor [Ho	358	2e-99	UG
ref|NP_000597.1|	complement component 8, gamma polypeptide [Homo	140	6e-34	UG
ref|NP_001638.1|	apolipoprotein D precursor [Homo sapiens]	133	7e-32	UG
ref|NP_976222.1|	MSFL2541 [Homo sapiens]	128	2e-30	UG
ref|NP_001018059.1|	glycodelin precursor [Homo sapiens] >ref|...	119	1e-27	UG
ref|NP_001624.1|	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor [Homo s	112	2e-25	UG
ref|XP_001129927.1|	PREDICTED: similar to Glycodelin precurso...	60.8	7e-10	G
ref|XP_944162.1|	PREDICTED: similar to Glycodelin precursor (...	60.4	8e-10	G
ref|NP_000945.3|	prostaglandin H2 D-isomerase [Homo sapiens]	58.1	4e-09	UG
ref|NP_848564.2|	lipocalin 8 [Homo sapiens]	42.7	2e-04	UG
ref|NP_001001676.1|	lipocalin 9 [Homo sapiens]	42.3	3e-04	UG
NEW ref|NP_945184.1|	lipocalin 6 [Homo sapiens]	41.5	4e-04	UG
NEW ref|NP_055397.1|	odorant binding protein 2A precursor [Homo sapi	38.4	0.003	UG
NEW ref|NP_055396.1|	odorant binding protein 2B [Homo sapiens]	36.5	0.016	UG
NEW ref|NP_002288.1|	lipocalin 1 precursor [Homo sapiens]	34.9	0.039	UG

Run PSI-Blast iteration 4

Sequences with E-value WORSE than threshold

ref|NP_848631.2|	lipocalcin 12 [Homo sapiens]	31.1	0.66	UG
ref|NP_001001712.2|	lipocalin 10 [Homo sapiens]	30.7	0.82	UG
ref|NP_536341.1|	septin 4 isoform 3 [Homo sapiens]	30.3	0.99	UG
ref|NP_004565.1|	septin 4 isoform 1 [Homo sapiens]	30.3	0.99	UG
ref|NP_246273.2|	phosphodiesterase 5A isoform 3 [Homo sapiens]	27.6	5.9	UG
ref|NP_001074.2|	phosphodiesterase 5A isoform 1 [Homo sapiens]	27.6	5.9	UG
ref|NP_236914.2|	phosphodiesterase 5A isoform 2 [Homo sapiens]	27.6	5.9	UG
ref|NP_003977.1|	gamma-butyrobetaine dioxygenase [Homo sapiens]	27.2	8.5	UG
ref|NP_004534.2|	nebulin [Homo sapiens]	27.2	9.6	UG

Run PSI-Blast iteration 4

Парное выравнивание RBP4 с ApoD, PSI-BLAST итерация 1,
E value 3e-07

```
>ref|NP_001638.1|  apolipoprotein D precursor [Homo sapiens]
Length=189

 Score = 57.4 bits (137),  Expect = 3e-07, Method: Composition-based stats.
 Identities = 47/151 (31%), Positives = 78/151 (51%), Gaps = 39/151 (25%)

Query  29   VKENFDKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSATAKGRVRLLNNWDVC  88
            V+ENFD  ++ G WY + +K P         I A +S+ E G        ++++LN  ++
Sbjct  33   VQENFDVNKYLGRWYEI-EKIPTTFENGRCIQANYSLMENG--------KIKVLNQ-ELR  82

Query  89   ADMVGTFTDTE---------DPAKFKMKY-WGVASFLQKGNDDHWIVDTDYDTYAVQYSC  138
            AD  GT    E          +PAK ++K+ W + S        +WI+ TDY+ YA+ YSC
Sbjct  83   AD--GTVNQIEGEATPVNLTEPAKLEVKFSWFMPS------APYWILATDYENYALVYSC  134

Query  139  ----RLLNLDGTCADSYSFVFSRDPNGLPPE  165
                +L ++D      ++++ +R+PN LPPE
Sbjct  135  TCIIQLFHVD------FAWILARNPN-LPPE  158
```

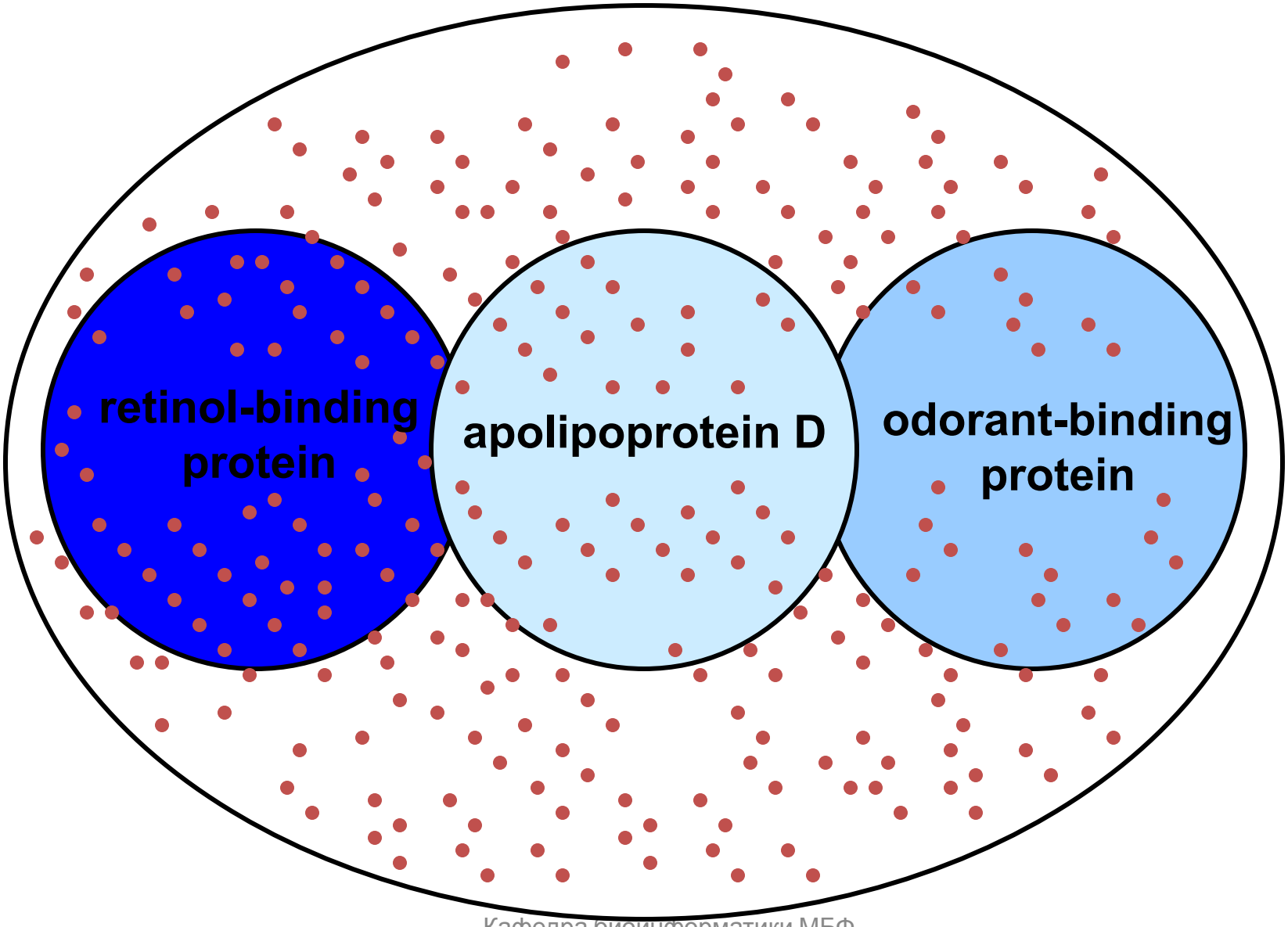
Парное выравнивание RBP4 с ApoD, PSI-BLAST итерация 2,
E value 1e-42!!!

```
>ref|NP_001638.1|  apolipoprotein D precursor [Homo sapiens]
Length=189

 Score =  175 bits (443),  Expect = 1e-42, Method: Composition-based stats.
 Identities = 45/163 (27%), Positives = 77/163 (47%), Gaps = 31/163 (19%)

Query  14   GSGRAERDCRVSSFRVKENFDKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSA  73
            G+A    +  +  V+ENFD  ++ G WY + +K P        I A +S+ E G++
Sbjct  18   AEGQAFHLGKCPNPPVQENFDVNKYLGRWYEI-EKIPTTFENGRCIQANYSLMENGKIKV  76

Query  74   TAK-----GRVRLLNNWDVCADMVGTFTDTEDPAKFKMKY-WGVASFLQKGNDDHWIVDT  127
              +     G V  +           T  +  +PAK ++K+ W + S        +WI+ T
Sbjct  77   LNQELRADGTVNQIEG-------EATPVNLTEPAKLEVKFSWFMPS------APYWILAT  123

Query  128  DYDTYAVQYSCR----LLNLDGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEA  166
            DY+ YA+ YSC     L ++D      ++++ +R+PN LPPE
Sbjct  124  DYENYALVYSCTCIIQLFHVD------FAWILARNPN-LPPET  159
```

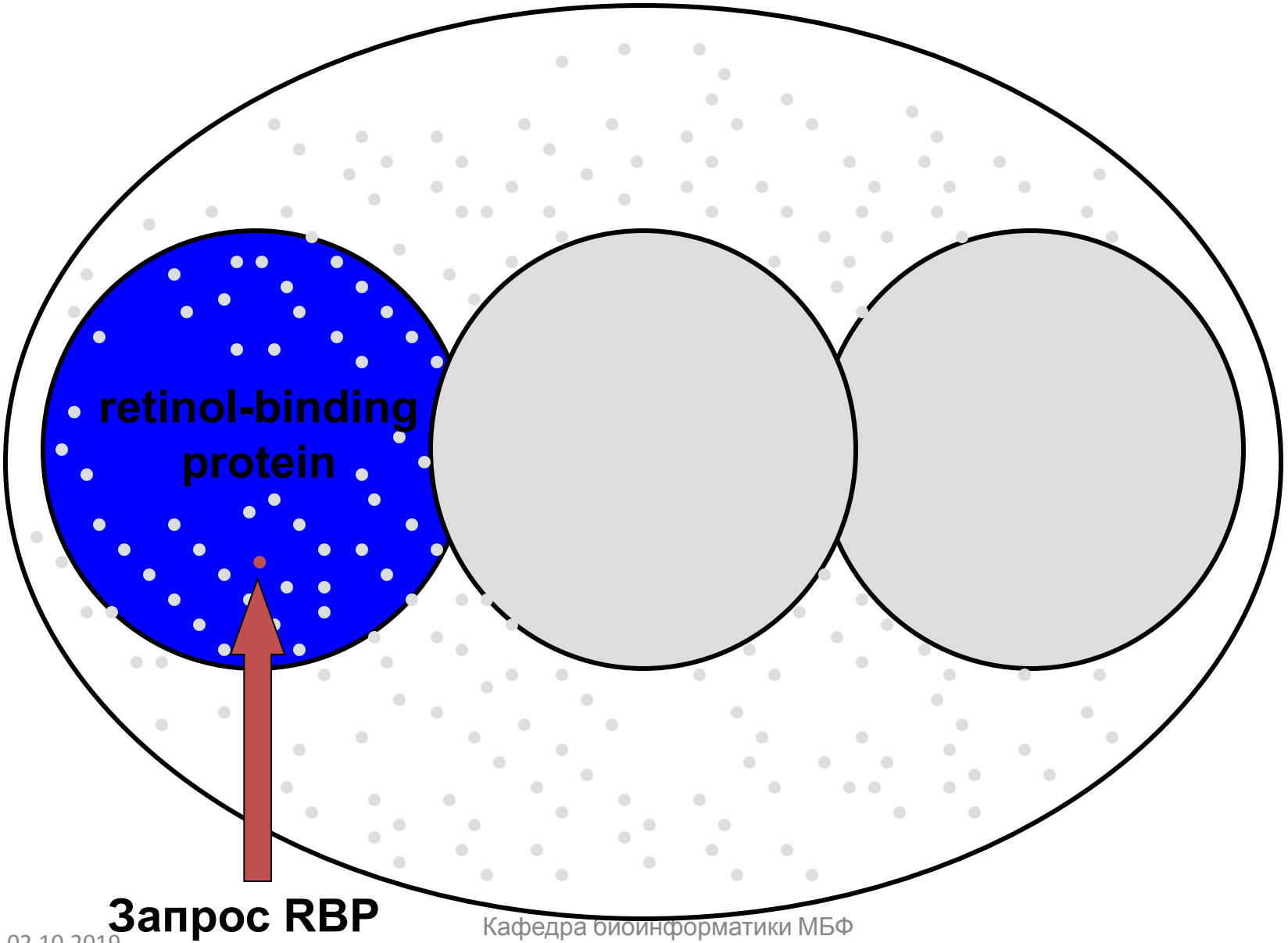
Парное выравнивание RBP4 с ApoD, PSI-BLAST итерация 3,
E value 6e-34

```
>ref|NP_001638.1|  apolipoprotein D precursor [Homo sapiens]
Length=189

 Score =  146 bits (368),  Expect = 6e-34, Method: Composition-based stats.
 Identities = 41/163 (25%), Positives = 76/163 (46%), Gaps = 20/163 (12%)

Query  14   GSGRAERDCRVSSFRVKENFDKARFSGTWYAMAKKDPEGLFLQDNIVAEFSVDETGQMSA  73
            G+A    +  +  V+ENFD  ++ G WY + +K P         I A +S+ E G++
Sbjct  18   AEGQAFHLGKCPNPPVQENFDVNKYLGRWYEI-EKIPTTFENGRCIQANYSLMENGKIKV  76

Query  74   TAKGRVRLLNNWDVCADMVGTFTDTEDPAKFKMKY-WGVASFLQKGNDDHWIVDTDYDTY  132
              +  +R     +   +   T  +  +PAK ++K+ W + S         +WI+ TDY+ Y
Sbjct  77   LNQ-ELRADGTVNQI-EGEATPVNLTEPAKLEVKFSWFMPS------APYWILATDYENY  128

Query  133  AVQYSCR----LLNLDGTCADSYSFVFSRDPNGLPPEAQKIVR  171
            A+ YSC     L ++D      ++++ +R+PN  P     +
Sbjct  129  ALVYSCTCIIQLFHVD------FAWILARNPNLPPETVDSLKN  165
```

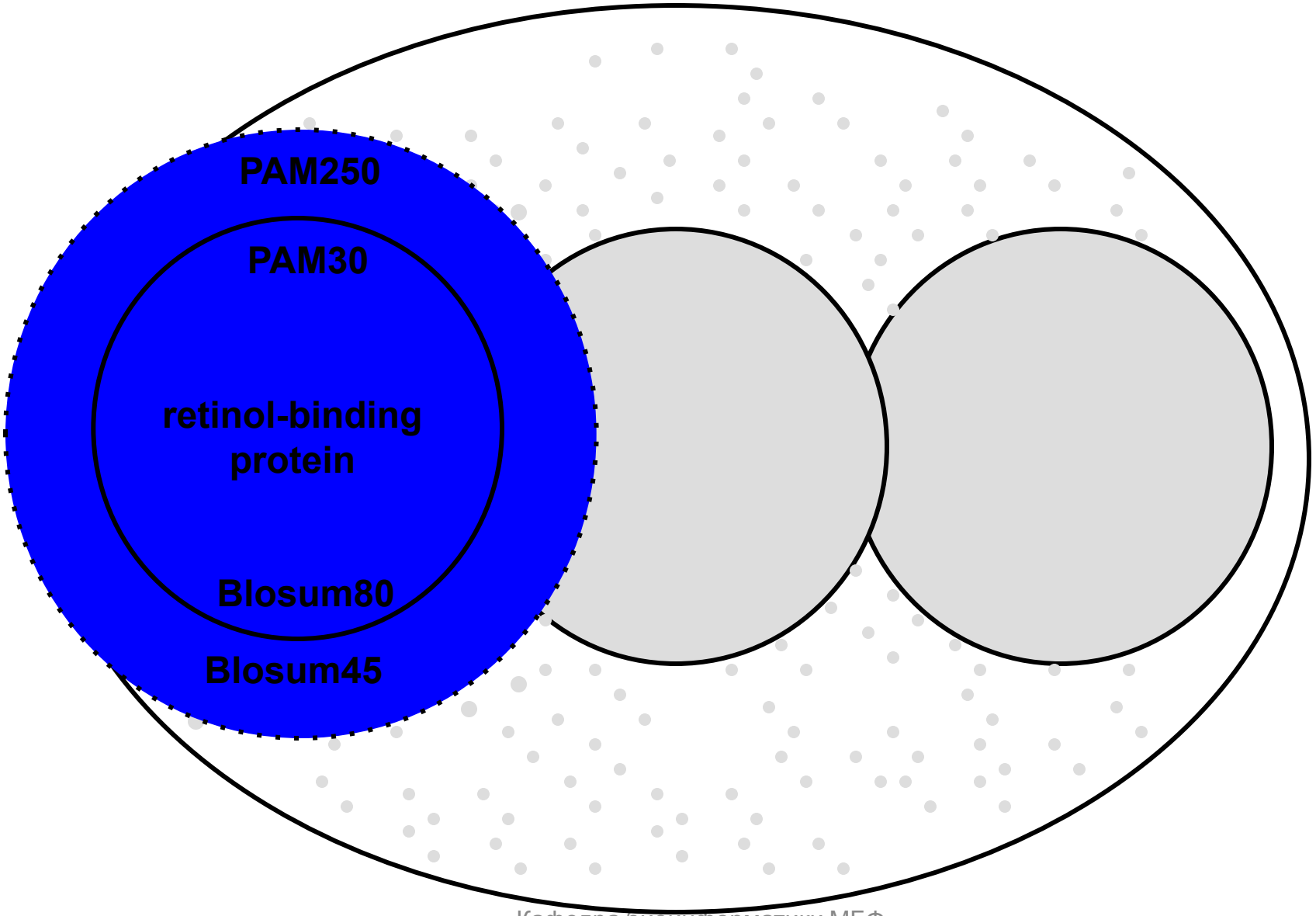
Вселенная липокалинов (каждая точка - белок)



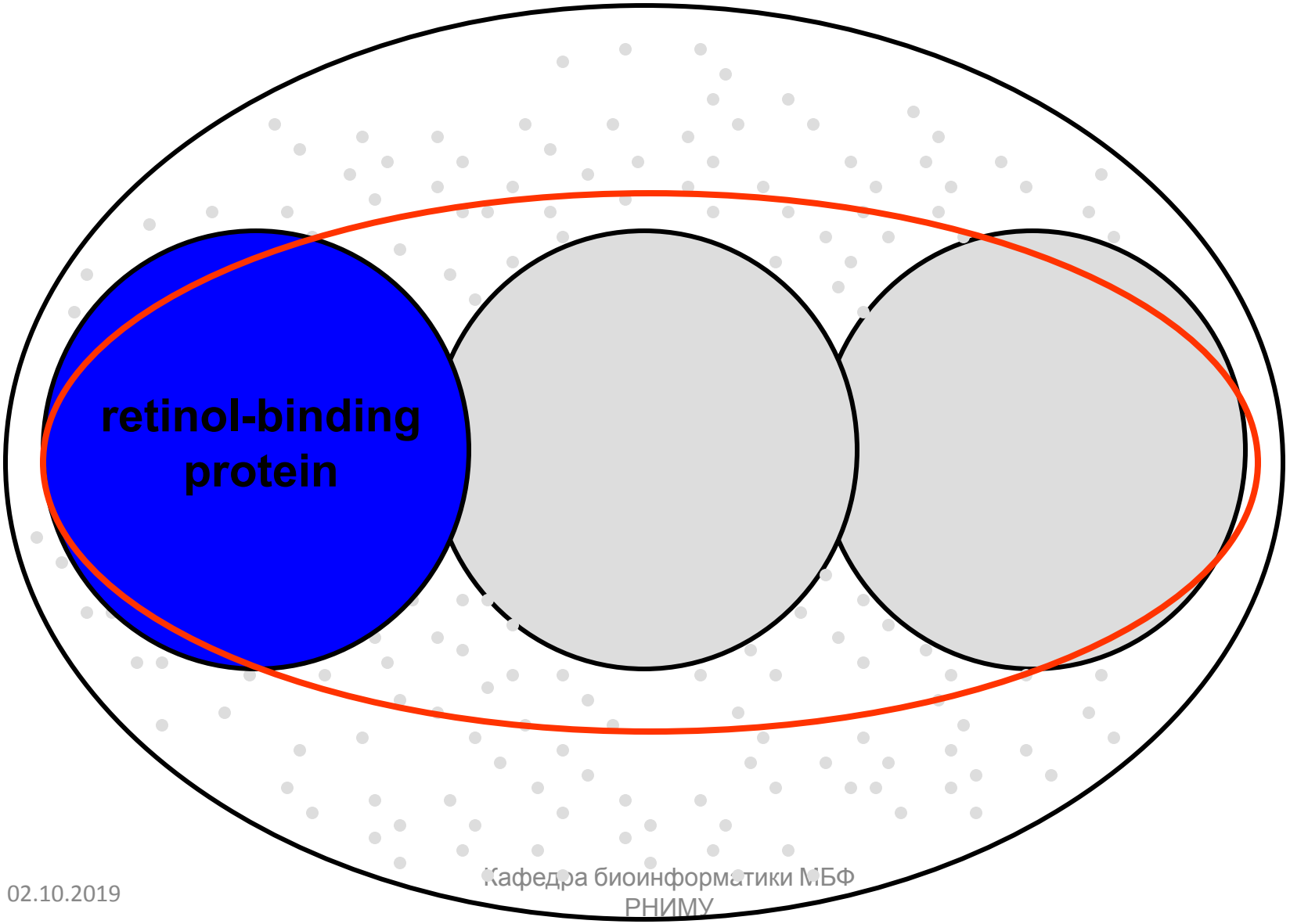
Скоринг матрицы позволяют сосредоточиться на большой (или маленькой) картине



Скоринг матрицы позволяют сосредоточиться на большой (или маленькой) картине



PSI-BLAST создает скоринг матрицы более мощные чем PAM или BLOSUM



PSI-BLAST: оценка эффективности

PSI-BLAST полезен для обнаружения слабых, но биологически значимых связей между белками (<40% идентичность аминокислот)

Основным источником ложно-положительных оценок является ложное усиление последовательностей, не связанных с запросом. Например, запрос с биспиральным (coiled-coil) мотивом может выявить тысячи других негомологичных белков с этим мотивом.

Даже однажды вошедший выше порога в результат поиска PSI-BLAST ложный белок останется при последующих итерациях – **проблема искажения** (corruption)

PSI-BLAST: проблема искажения

Искажение определяется как присутствие, по меньшей мере, одного ложно-положительного выравнивания со значением E <10-4 после пяти итераций.

Три подхода к борьбе с искажением:

[1] Применить фильтрацию искажающих участков профиля сгенерированного PSI-BLAST (например, программа SEG: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/Seg.html

[2] Настроить порог E значения ниже 0,001 (по умолчанию), например E = 0,0001.

[3] Просмотреть результаты каждой из итерации.
Удалить подозрительные хиты, сняв флажок.

Множественное выравнивание последовательностей

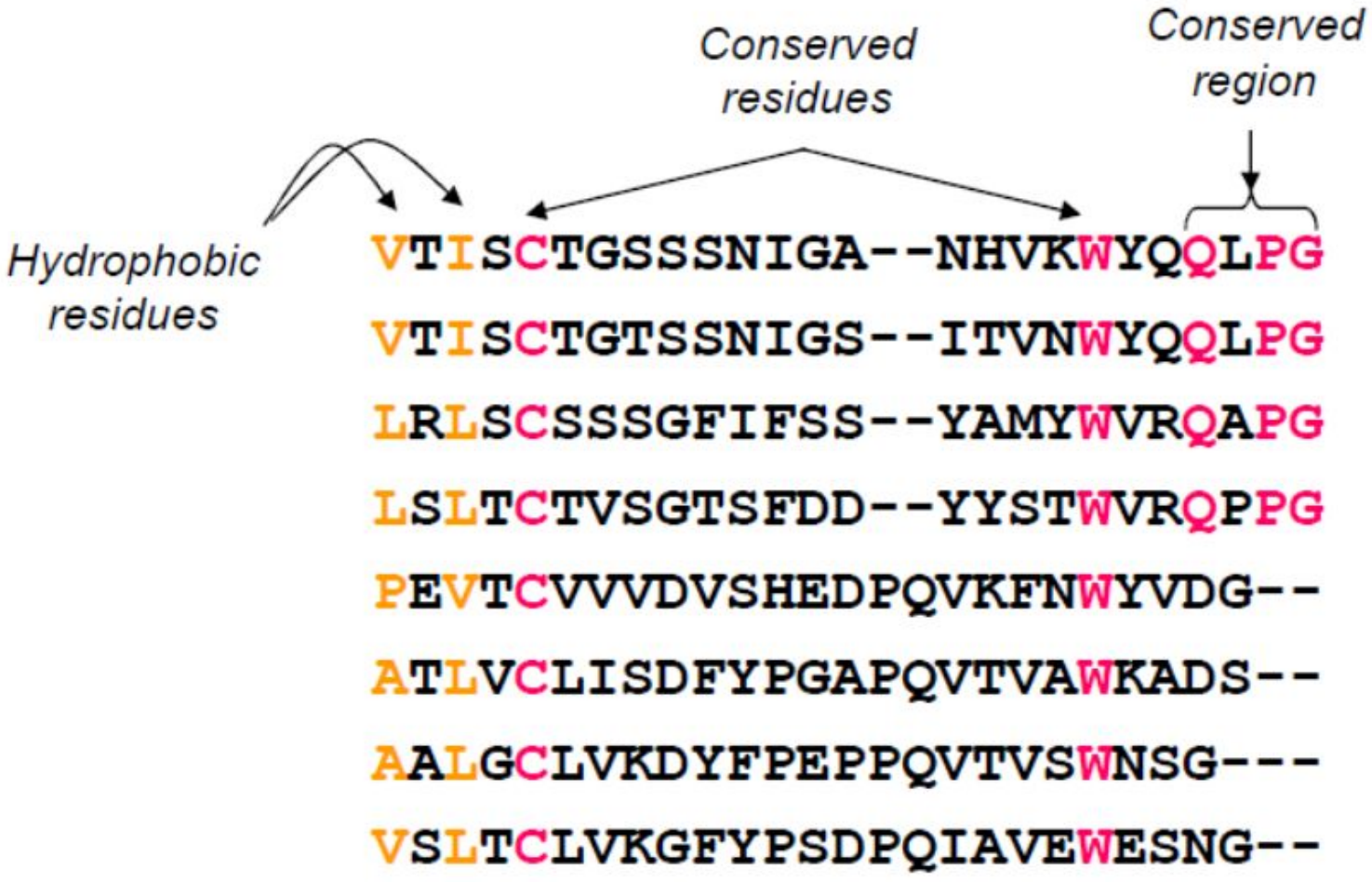
- **Эволюционный анализ**
  - определение гомологии
  - филогенетические построения
  - эволюционные тестовые модели
- **Функциональный анализ**
  - определить консервативные участки
  - идентификация белковых семейств
- **Структурный анализ**
  - определить последовательность ковариация
  - моделирование гомологии
- **Практическое применение**
  - определить консервативные сайты связывания праймеров
  - конструирование мутагенетических экспериментов
  - анализ мутантов

В 1990-х исследователи начали понимать, что выравнивание нескольких последовательностей (профилей) дает гораздо больше информации, чем парные выравнивания.

Множественное выравнивание последовательностей

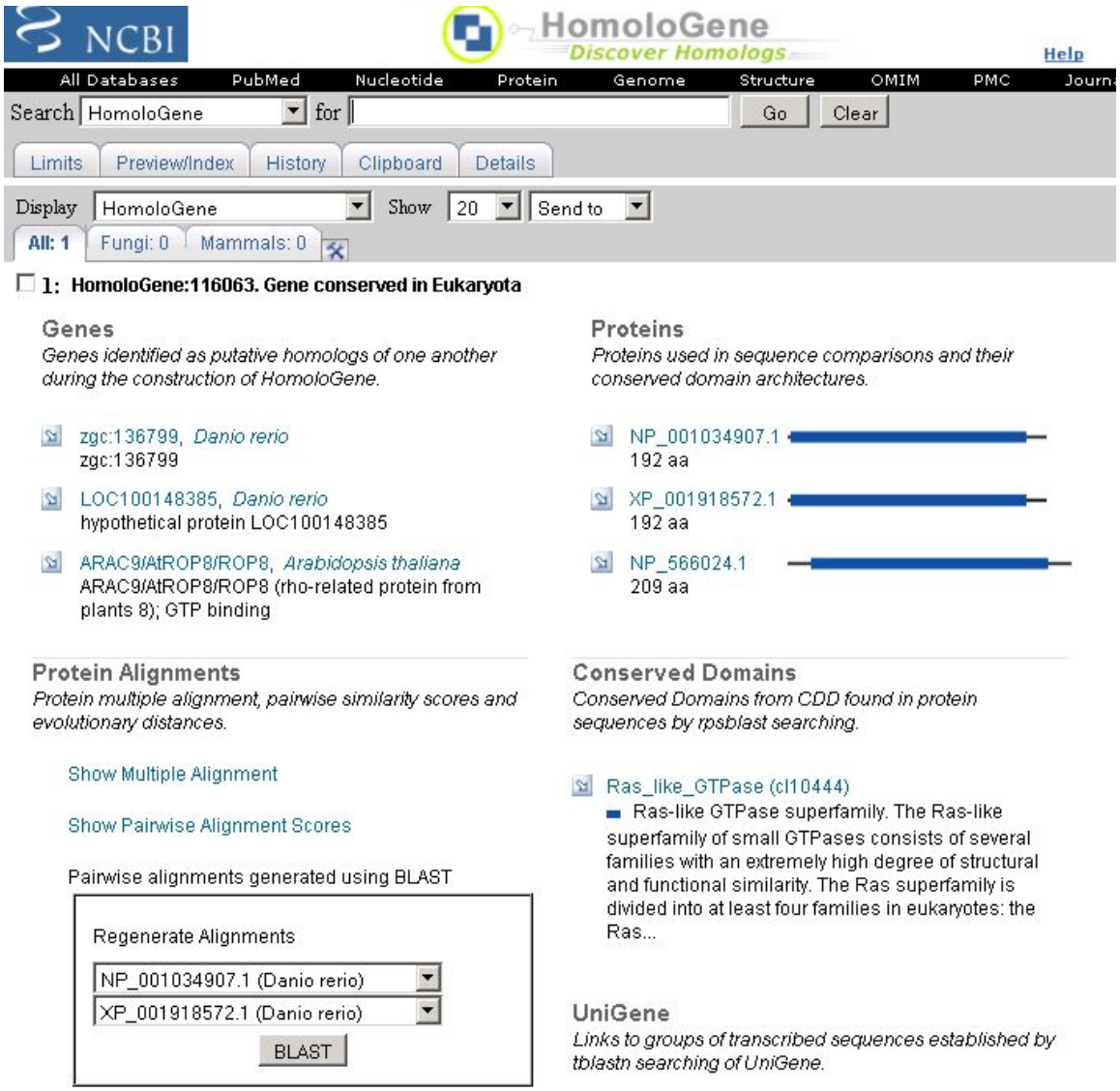
- Набор из трех или более белковых (или нуклеотидных) последовательностей, которые частично или полностью выровнены
- Гомологичные остатки выровнены в столбцах по всей длине последовательностей
- Остатки гомологичны в эволюционном смысле
- Остатки гомологичны в структурном смысле

Множественное выравнивание последовательностей

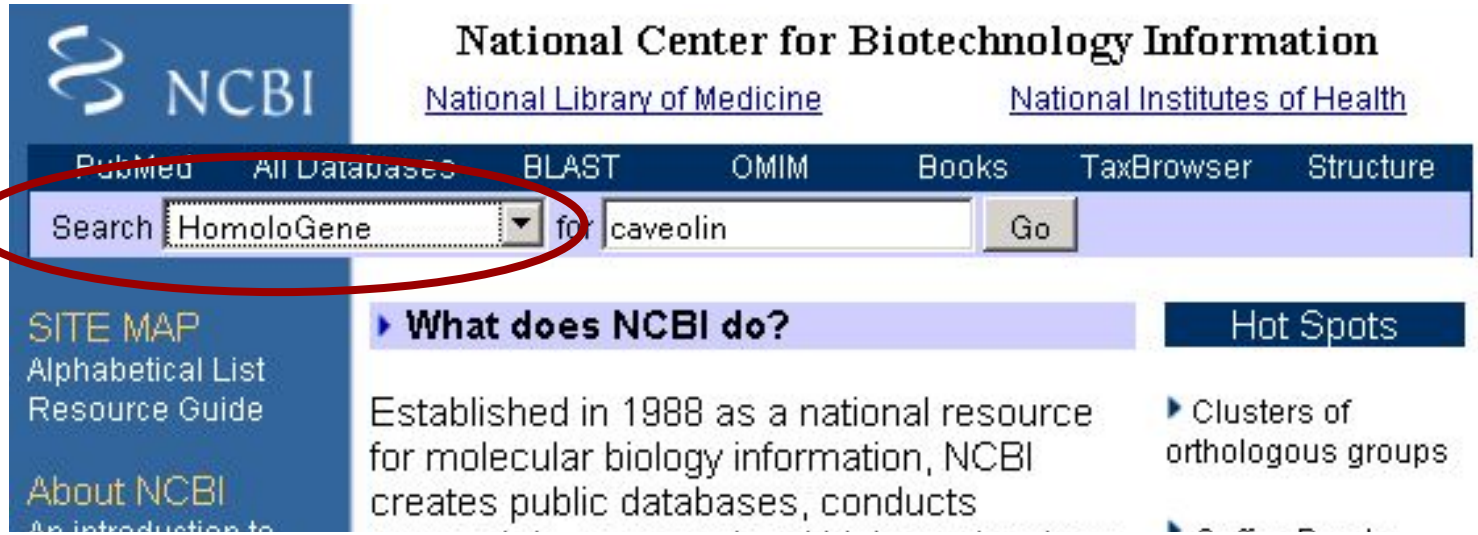


N. Provart & D. Guttman. Bioinformatic Methods I. Coursera

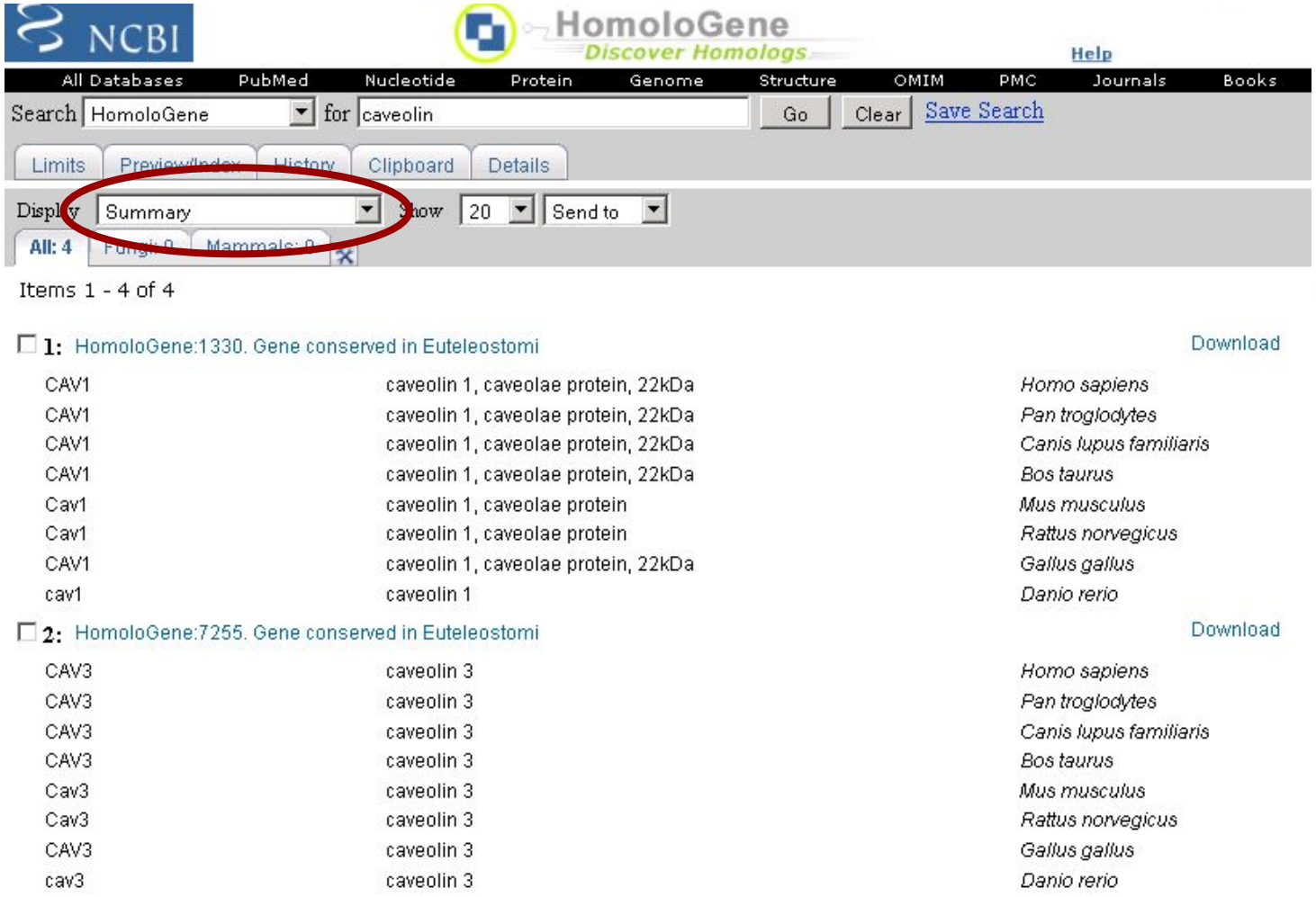
HomoloGene включает группы эукариотических белков, парные и множественные выравнивания, и много другое



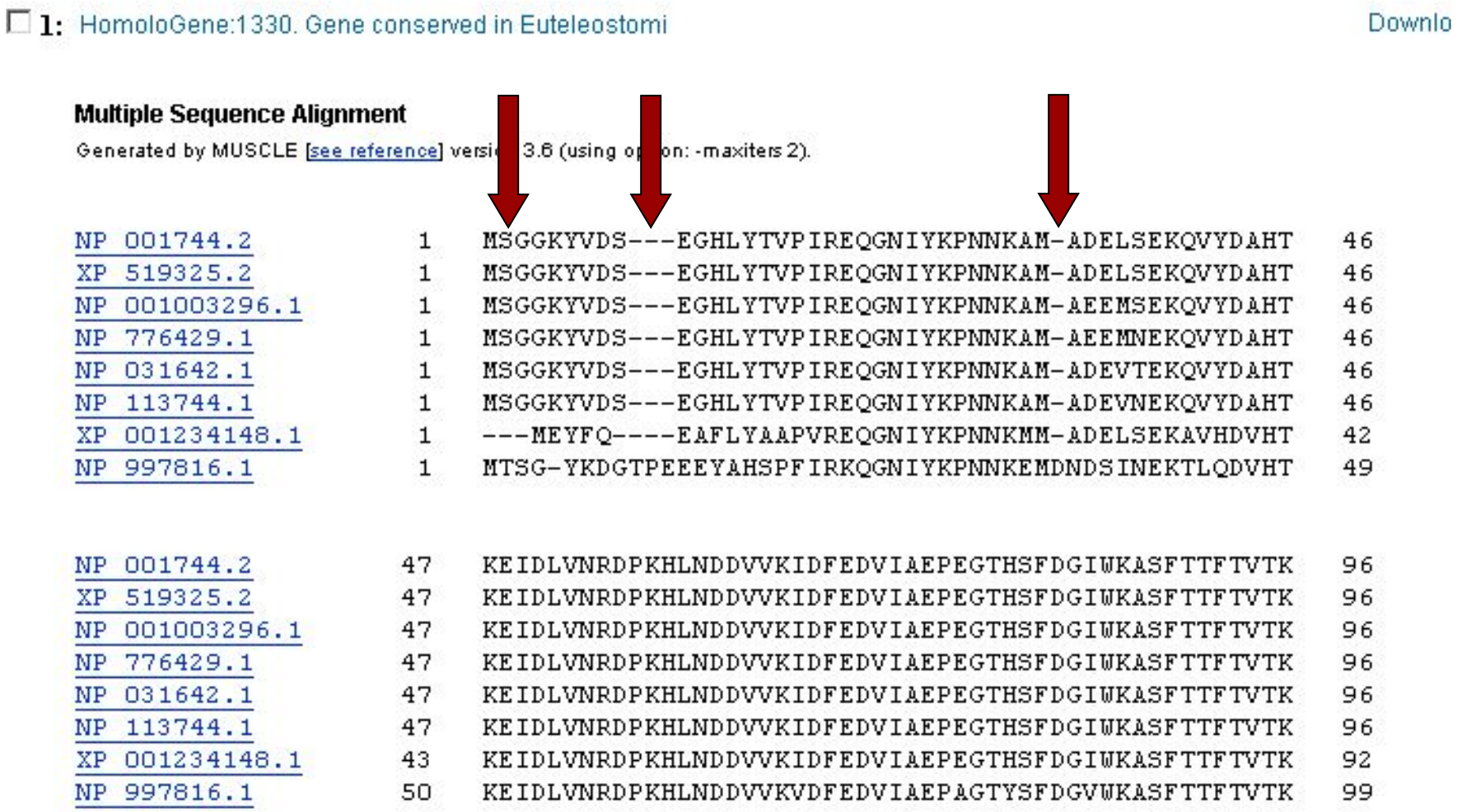
Пример. Шаг 1: в NCBI выберете меню HomoloGene и введите caveolin в поле поиска



Пример. Шаг 2: проверить результаты. Возьмем первый набор кавеолинов. Изменить Display на Multiple alignment.

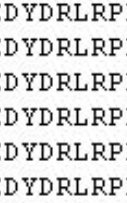


Пример. Шаг 3: проверим множественное выравнивание. Восемь белков хорошо выравнены, хотя пробелы также включены.



Другое множественное выравнивание, Rac:

```
NP_061485.1          1   -----MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVM   45
XP_855587.1          1   -----MQAIKCVVVEDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVM   45
NP_776588.1          1   -----MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVM   45
NP_033033.1          1   -----MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVM   45
NP_599193.1          1   -----MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVM   45
NP_990348.1          1   -----MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVM   45
NP_956065.1          1   -----MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVM   45
NP_648121.1          1   -----MQAIKCVVVGDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVM   45
XP_366655.1          1   MAAPGVQSLKCVVTGDGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSASVM   50
XP_329350.1          1   MLTGEMLTLDFLLL-------TCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSASVM   43
NP_195320.1          1   --MSASRFIKCVTVGDGAVGKTCLLISYTSNTFPTDYVPTVFDNFSANVV   48
NP_179371.1          1   --MSASRFIKCVTVGDGAVGKTCLLISYTSNTFPTDYVPTVFDNFSANVV   48
NP_190698.1          1   --MSASRFVKCVTVGDGAVGKTCLLISYTSNTFPTDYVPTVFDNFSANVV   48
NP_195228.1          1   --MSASRFIKCVTVGDGAVGKTCLLISYTSNTFPTDYVPTVFDNFSANVI   48
NP_001048639.1       1   --MSASRFIKCVTVGDGAVGKTCMLISYTSNTFPTDYVPTVFDNFSANVV   48

NP_061485.1         46   VDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQTVGETYGKDITSRGKDKPIAD   95
XP_855587.1         46   VDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQT----------------D   76
NP_776588.1         46   VDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQT----------------D   76
NP_033033.1         46   VDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQT----------------D   76
NP_599193.1         46   VDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQT----------------D   76
NP_990348.1         46   VDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQT----------------D   76
NP_956065.1         46   VDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPQT----------------D   76
NP_648121.1         46   VDAKPINLGLWDTAGQEI
XP_366655.1         51   VDGKPISLGLWDTAGQEI
XP_329350.1         44   VDGKPVSLGLWDTAGQEI
NP_195320.1         49   VNGATVNLGLWDTAGQEI
NP_179371.1         49   VNGATVNLGLWDTAGQEI
NP_190698.1         49   VNGSTVNLGLWDTAGQEI
NP_195228.1         49   VDGNTINLGLWDTAGQEI
NP_001048639.1      49   VDGSTVNLGLWDTA--ED                  D   77
```



Эта вставка может быть альтернативным сплайсингом

Пример: 5 выравниваний 5 глобинов

- Давайте посмотрим на множественное выравнивание последовательности (MSA) пяти глобинов белков. Мы будем использовать пять известных программ MSA: ClustalW, Praline, MUSCLE (используется в HomoloGene), ProbCons и TCoffee. Каждая программа имеет уникальные особенности.

- Мы сосредоточимся на остатках гистидина (H), который имеет важную роль в связывании кислорода в глобинах, и должны быть выровнены. Но часто выравнивание не совпадает, и все пять программ дают разные ответы.

- **Вывод**: не существует единственно верного подхода к MSA. Десятки новых программ были разработаны в последние годы.

ClustalW

Обратите внимание как участок консервативного гистидина (▼) изменяется в зависимости от используемого алгоритма

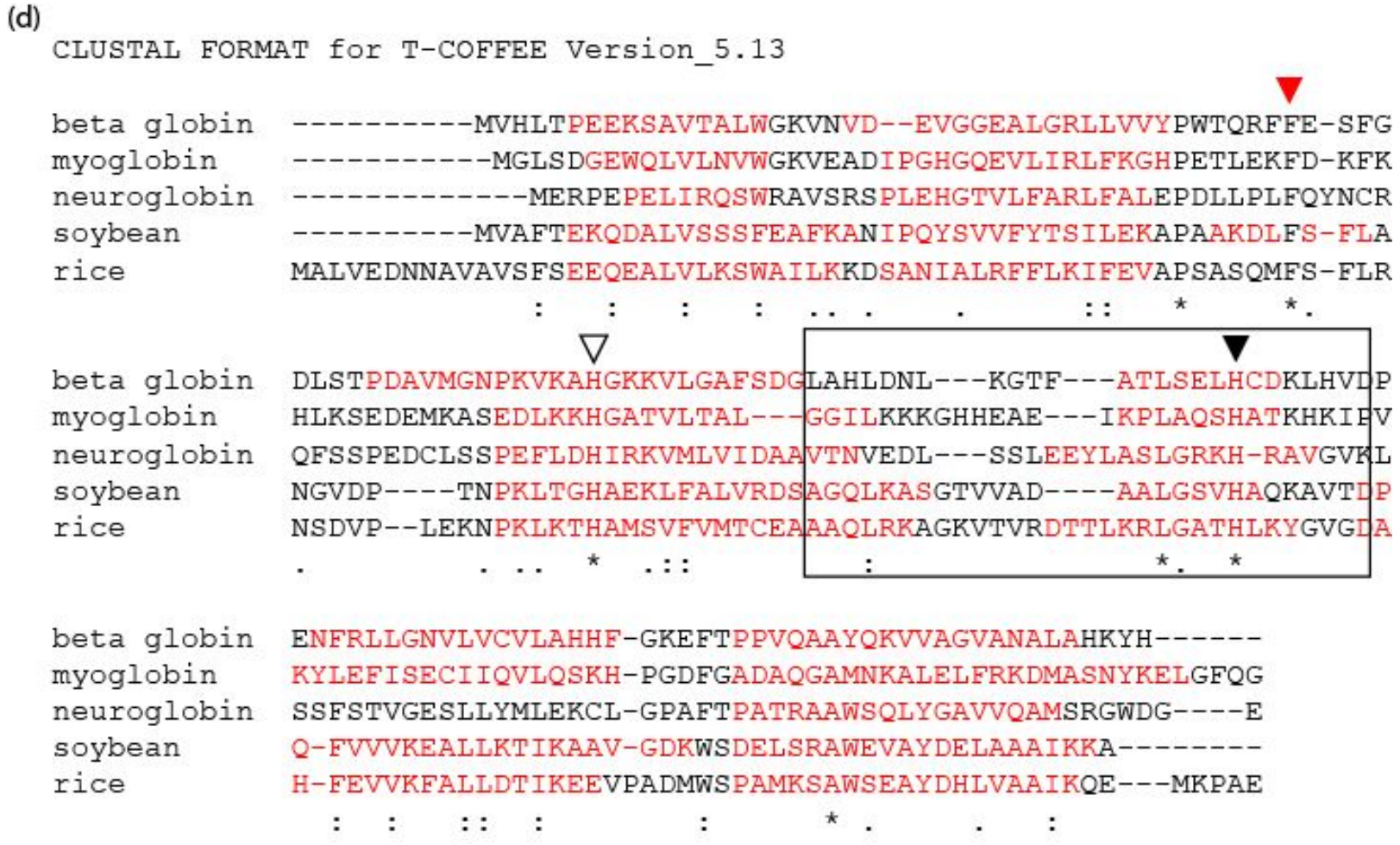
Praline


(a)
Praline multiple sequence alignment
beta globin .....MVHLTPEEKSAVTALWGKV..NVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFES.FG
myoglobin .....MGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLIRLFKGHPETLEKFDK.FK
neuroglobin .....MERPEPELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFARLFALEPDLLPLFQYNCR
soybean .....MVAFTEKQDALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPAAKDLFS..FL
rice MALVEDNNAVAVSFSEEQEALVLKSWAILKKDSANIALRFFLKIFEVAPSASQMFS..FL
Consistency 000000000014265438257934573463364343624453686433*35344*50063
beta globin DLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLDNLKGTFATLSEL..HCDKLH....VDP
myoglobin HLKSEDEMKASEDLKKHGATVLTALGGILKKKGHHEAEIKPLAQS..HATKHK....IPV
neuroglobin QFSSPEDCLSSPEFLDHIRKVMLVIDAAVTNVEDLSSLEEYLASLGRKHRAVG....VKL
soybean A.NGVDP..TNPKLTGHAEKLFALVRDSAGQL.KASGTVVADAA....LGSVHAQKAVTD
rice R.NSDVPLEKNPKLKTHAMSVFVMTCEAAAQL.RKAGKVTVRDTTLKRLGATHLKYGVGD
Consistency 3166354224776653*436863542445445133563433354200333544 0000922
beta globin ENFRLLGNVLVCVLAHHF.GKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH......
myoglobin KYLEFISECIIQVLQSKH.PGDFGADAQGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG
neuroglobin SSFSTVGESLLYMLEKCL.GPAFTPATRAAWSQLYGAVVQAMSRGWD..GE..
soybean PQFVVVKEALLKTIKAAV.GDKWSDELSRAWEVAYDELAAAIKKA........
rice AHFEVVKFALLDTIKEEVPADMWSPAMKSAWSEAYDHLVAAIKQEMKPAE...
Consistency 437448444982585423053365544 54*5546542644675432200 1000

Probcons


(c)
PROBCONS
beta globin M----------VHLTPEEKSAVTALWGKVNVD--EVGGEALGRLLVVYPWTQRFFES-FG
myoglobin M----------GLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLIRLFKGHPETLEKFDK-FK
neuroglobin M-------------ERPEPELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFARLFALEPDLLPLFQYNCR
soybean M----------VAFTEKQDALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPAAKDLFSF-LA
rice MALVEDNNAVAVSFSEEQEALVLKSWAILKKDSANIALRFFLKIFEVAPSASQMFSF-LR
beta globin DLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLD---NLK---GTFATLSELHCDKLHVDP
myoglobin HLKSEDEMKASEDLKKHGATVLTALGGI---LKKKGHHE---AEIKPLAQSHATKHKIPV
neuroglobin QFSSPEDCLSSPEFLDHIRKVMLVIDAAVTNVEDLSSLE---EYLASLGRKHRAV-GVKL
soybean NGVDP----TNPKLTGHAEKLFALVRDSAGQLKASGTVV----ADAALGSVHAQK-AVTD
rice NSDVP--LEKNPKLKTHAMSVFVMTCEAAAQLRKAGKVTVRDTTLKRLGATHLKY-GVGD
beta globin ENFRLLGNVLVCVLAHHF-GKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHK------YH
myoglobin KYLEFISECIIQVLQSKH-PGDFGADAQGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG
neuroglobin SSFSTVGESLLYMLEKCL-GPAFTPATRAAWSQLYGAVVQAMSRG---W-DGE
soybean PQFVVVKEALLKTIKAAV-GDKWSDELSRAWEVAYDELAAAIK--------KA
rice AHFEVVKFALLDTIKEEVPADMWSPAMKSAWSEAYDHLVAAIKQE---MKPAE

TCoffee


(d)
CLUSTAL FORMAT for T-COFFEE Version_5.13
beta globin ----------MVHLTPEEKSAVTALWGKVNVD--EVGGEALGRLLVVYPWTQRFFE-SFG
myoglobin ----------MGLSDGEWQLVLNVWGKVEADIPGHGQEVLIRLFKGHPETLEKFD-KFK
neuroglobin ----------MERPEPELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFARLFALEPDLLPLFQYNCR
soybean ----------MVAFTEKQDALVSSSFEAFKANIPQYSVVFYTSILEKAPAAKDLFS-FLA
rice MALVEDNNAVAVSFSEEQEALVLKSWAILKKDSANIALRFFLKIFEVAPSASQMFS-FLR
beta globin DLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLDNL---KGTF---ATLSELHCDKLHVDP
myoglobin HLKSEDEMKASEDLKKHGATVLTAL---GGILKKKGHHEAE---IKPLAQSHATKHKIP
neuroglobin QFSSPEDCLSSPEFLDHIRKVMLVIDAAVTNVEDL---SSLEEYLASLGRKH-RAVGVKL
soybean NGVDP----TNPKLTGHAEKLFALVRDSAGQLKASGTVVAD----AALGSVHAQKAVTDP
rice NSDVP--LEKNPKLKTHAMSVFVMTCEAAAQLRKAGKVTVRDTTLKRLGATHLKYGVGDA
beta globin ENFRLLGNVLVCVLAHHF-GKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH------
myoglobin KYLEFISECIIQVLQSKH-PGDFGADAQGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG
neuroglobin SSFSTVGESLLYMLEKCL-GPAFTPATRAAWSQLYGAVVQAMSRGWDG----E
soybean Q-FVVVKEALLKTIKAAV-GDKWSDELSRAWEVAYDELAAAIKKA--------
rice H-FEVVKFALLDTIKEEVPADMWSPAMKSAWSEAYDHLVAAIKQE---MKPAE

Свойства множественного выравнивания последовательностей

- Не обязательно, что существует одно "правильное" выравнивание семейства белков
- Эволюционируют белковые последовательности …
- Соответствующие трехмерные структуры белков также эволюционируют…
- может оказаться невозможным идентификации аминокислотных остатков, которые выравниваются должным образом (структурно) в течение множественного выравнивания последовательностей
- Для двух белков, с 30% идентичностью аминокислотной последовательности, совмещается около 50% отдельных аминокислот в двух структурах

Особенности множественного выравнивания последовательностей

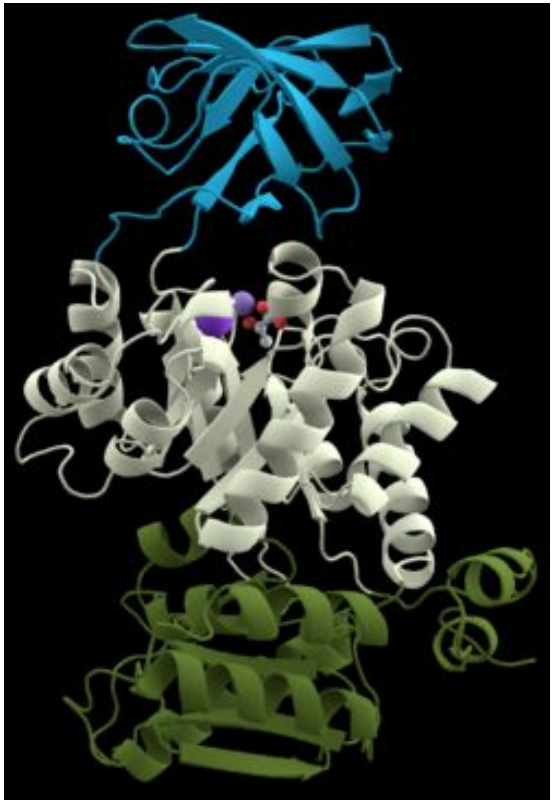
- некоторые выровненные остатки, такие как цистеина, образующие дисульфидные мостики, могут быть высоко консервативны
- может быть консервативные домены, такие как трансмембранный домен
- может быть консервативны особенности вторичной структуры
- может быть участки в последовательностях являются паттернами вставок или делеций

Домены

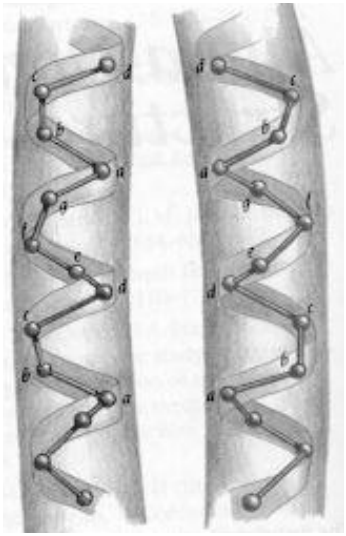
- Домен белка — элемент третичной структуры белка, представляющий собой достаточно стабильную и независимую подструктуру белка, фолдинг которой проходит независимо от остальных частей [wikipedia].

- Домен – это часть полипептидной цепи (или вся цепочка), которая сворачивается независимо в стабильную третичную структуру [C.Brenden & John Tooze]

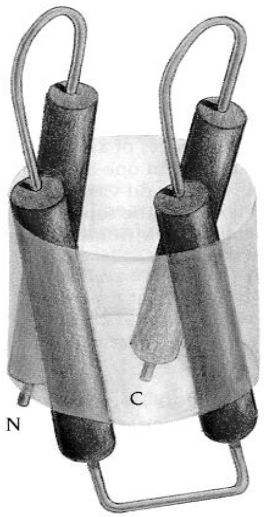
- Доменами в белках называют области в третичной структуре, которым свойственна определенная автономия структурной организации [Степанов В.М.]



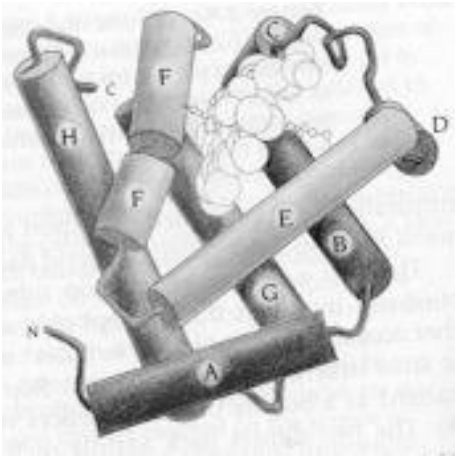
α-ДОМЕНЫ



Лейциновая молния

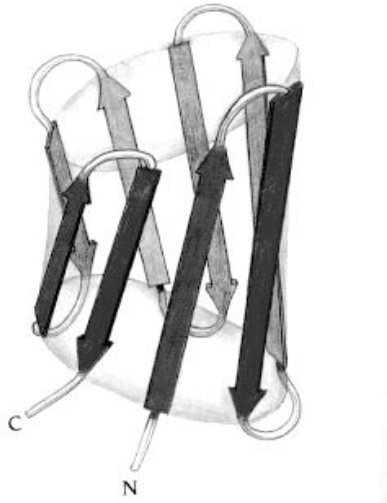


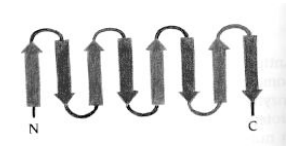
Связка из 4 спиралей



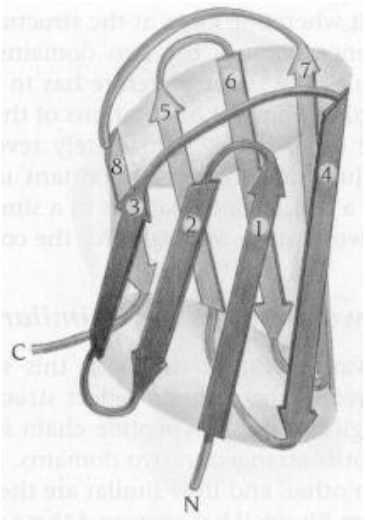
Глобиновая укладка

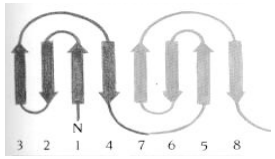
β-ДОМЕНЫ



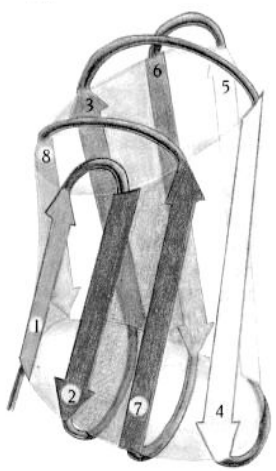


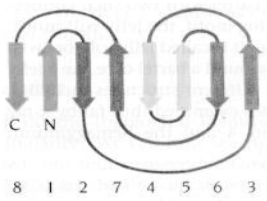
Up and down barrel





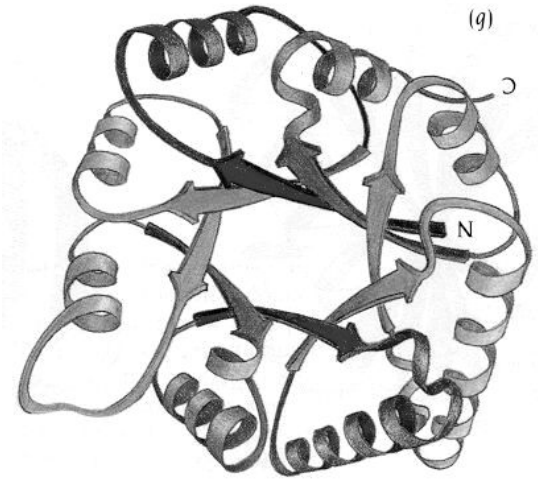
Баррел на основе греческих ключей



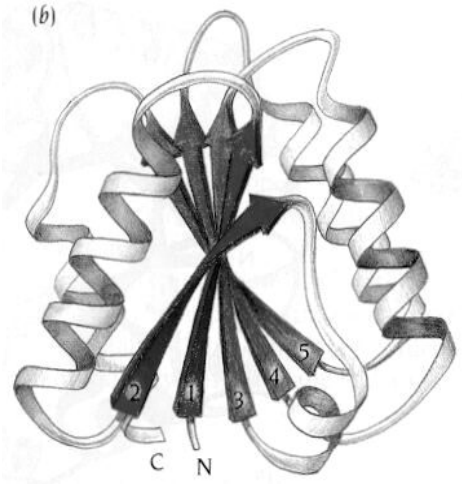


Jelly roll barrel

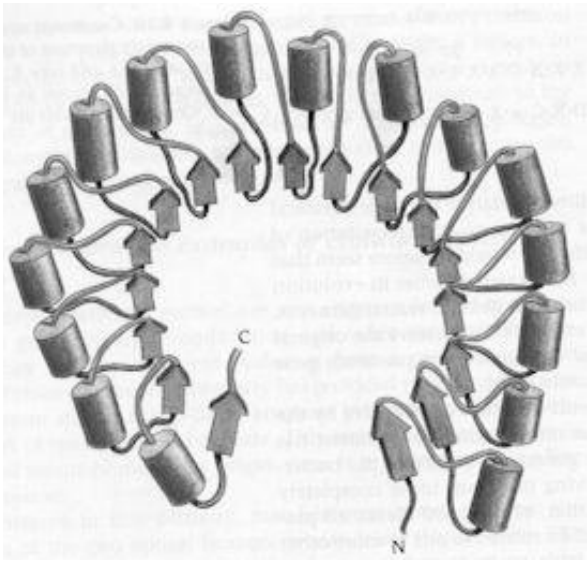
α/β-ДОМЕНЫ



TIM-укладка



α/β-пропеллер
Укладка Россмана



Подкова

Метилмалонил-коА-мутаза

Использование множественного выравнивания

- Более чувствительно, чем попарное выравнивания для выявления гомологов
- Результат BLAST может принять форму множественного выравнивания, и может раскрыть консервативные остатки или мотивы
- Демографические данные могут быть проанализированы в множественном выравнивании (PopSet)
- Отдельный запрос может быть использован для поиска в базе данных множественных выравниваний (например, PFAM)
- Регуляторные области генов могут быть консенсусными последовательностями идентифицируемыми множественным выравниванием

Методы множественного выравнивания

- Точные методы
- Прогрессивный (ClustalW)
- Итеративный (MUSCLE)
- Согласованный (ProbCons)
- Основанный на структуре (Expresso)

Прогрессивный метод (ClustalW)

Прогрессивные методы: используют направляющей дерево (связанное с филогенетическим деревом), чтобы определить, как объединить попарные выравнивания по одному для создания множественного выравнивания.

[1] Сделать ряд глобальных попарных выравниваний (Needleman и Wunsch динамический алгоритм программирования)

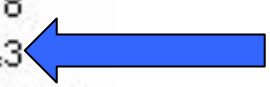
[2] Создать направляющее дерево

[3] Постепенно выровнять последовательности

Шаг 1. Построение попарных выравниваний

(% идентичности)

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
1	beta_globin	147	2	myoglobin	154	25
1	beta_globin	147	3	neuroglobin	151	15
1	beta_globin	147	4	soybean	144	13
1	beta_globin	147	5	rice	166	21
2	myoglobin	154	3	neuroglobin	151	16
2	myoglobin	154	4	soybean	144	8
2	myoglobin	154	5	rice	166	12
3	neuroglobin	151	4	soybean	144	17
3	neuroglobin	151	5	rice	166	18
4	soybean	144	5	rice	166	43



best Score

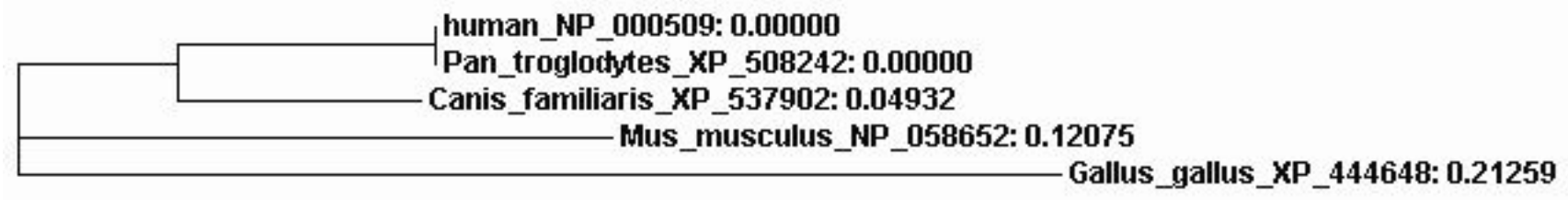
Для *n* последовательностей, (*n*-1)(*n*) / 2
Для 5 последовательностей, (4)(5) / 2 = 10
Для 200 последовательностей, (199)(200) / 2 = 19,900

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
1	human_NP_000509	147	2	Pan_troglodytes_XP_508242	147	100
1	human_NP_000509	147	3	Canis_familiaris_XP_537902	147	89
1	human_NP_000509	147	4	Mus_musculus_NP_058652	147	80
1	human_NP_000509	147	5	Gallus_gallus_XP_444648	147	69
2	Pan_troglodytes_XP_508242	147	3	Canis_familiaris_XP_537902	147	89
2	Pan_troglodytes_XP_508242	147	4	Mus_musculus_NP_058652	147	80
2	Pan_troglodytes_XP_508242	147	5	Gallus_gallus_XP_444648	147	69
3	Canis_familiaris_XP_537902	147	4	Mus_musculus_NP_058652	147	78
3	Canis_familiaris_XP_537902	147	5	Gallus_gallus_XP_444648	147	71
4	Mus_musculus_NP_058652	147	5	Gallus_gallus_XP_444648	147	66

Конвертация баллов сходства в баллы расстояния

```
(
(
(
human_NP_000509:0.00000,
Pan_troglodytes_XP_508242:0.00000)
:0.05272,
Canis_familiaris_XP_537902:0.04932)
:0.03231,
Mus_musculus_NP_058652:0.12075,
Gallus_gallus_XP_444648:0.21259);
```

5 близко родственных глобинов



Множественное выравнивание для профилей скрытых Марковских моделей (HMMs - Hidden Markov models)

- Скрытые Марковские модели (HMMs) являются "состояниями", которые описывают вероятность наличия конкретного аминокислотного остатка расположенного в колонке множественного выравнивания последовательностей

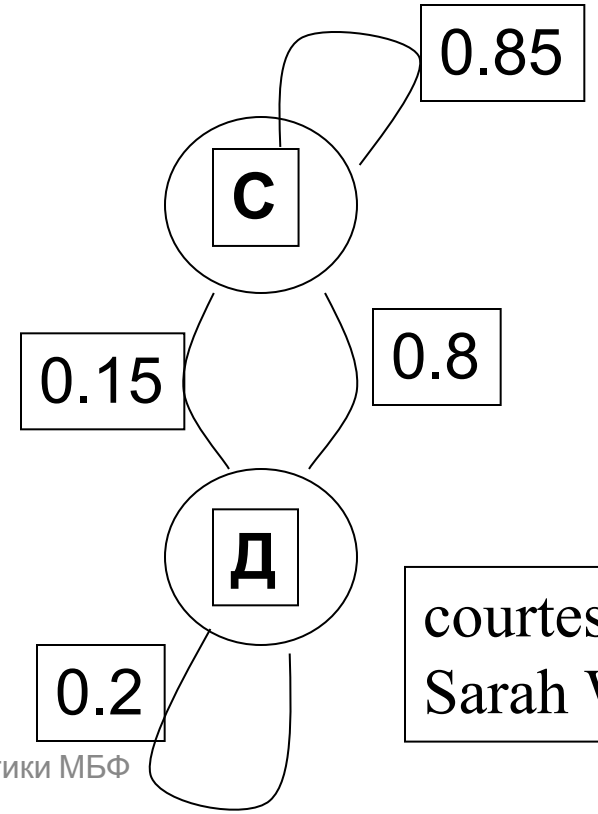
- HMMs являются вероятностными моделями

- HMMs может дать более чувствительные выравнивания, чем традиционные методы, такие как прогрессивное выравнивание

Простая Марковская модель

Дождь = собака может не захотеть выйти на улицу

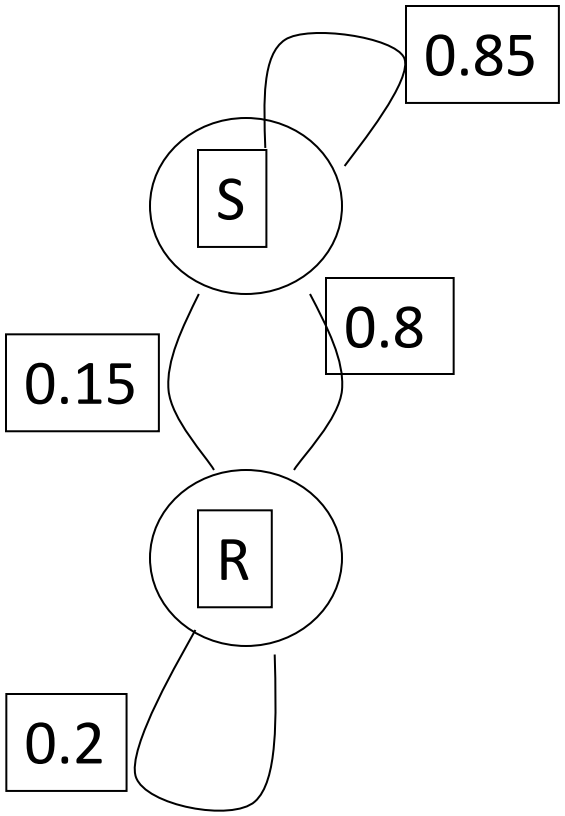
Солнце = собака, вероятно, выйдет на улицу



Марковское состояние = не зависимость от ближайшего предыдущего состояния ("Без памяти")

courtesy of Sarah Wheelan

Простая скрытая Марковская модель



P(собака идет в дождь) = 0.2

P(собака идет на солнце) = 0.85

Наблюдение: YNNNYYNNNYN

(Y=идет, N=не идет)

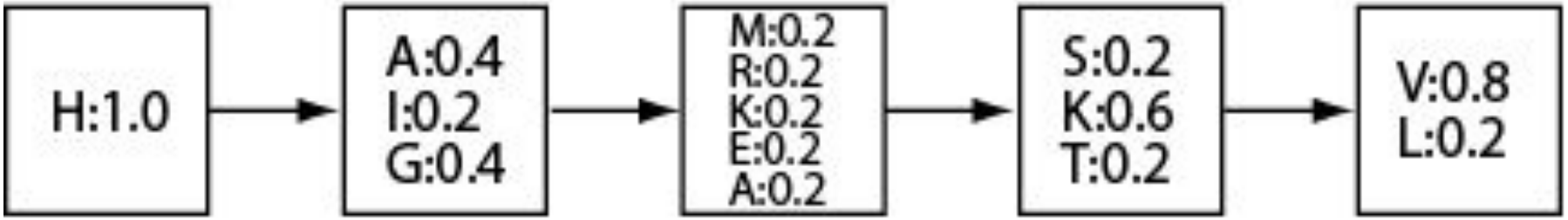
Что лежит в основе реальности (скрытом состоянием цепи)?

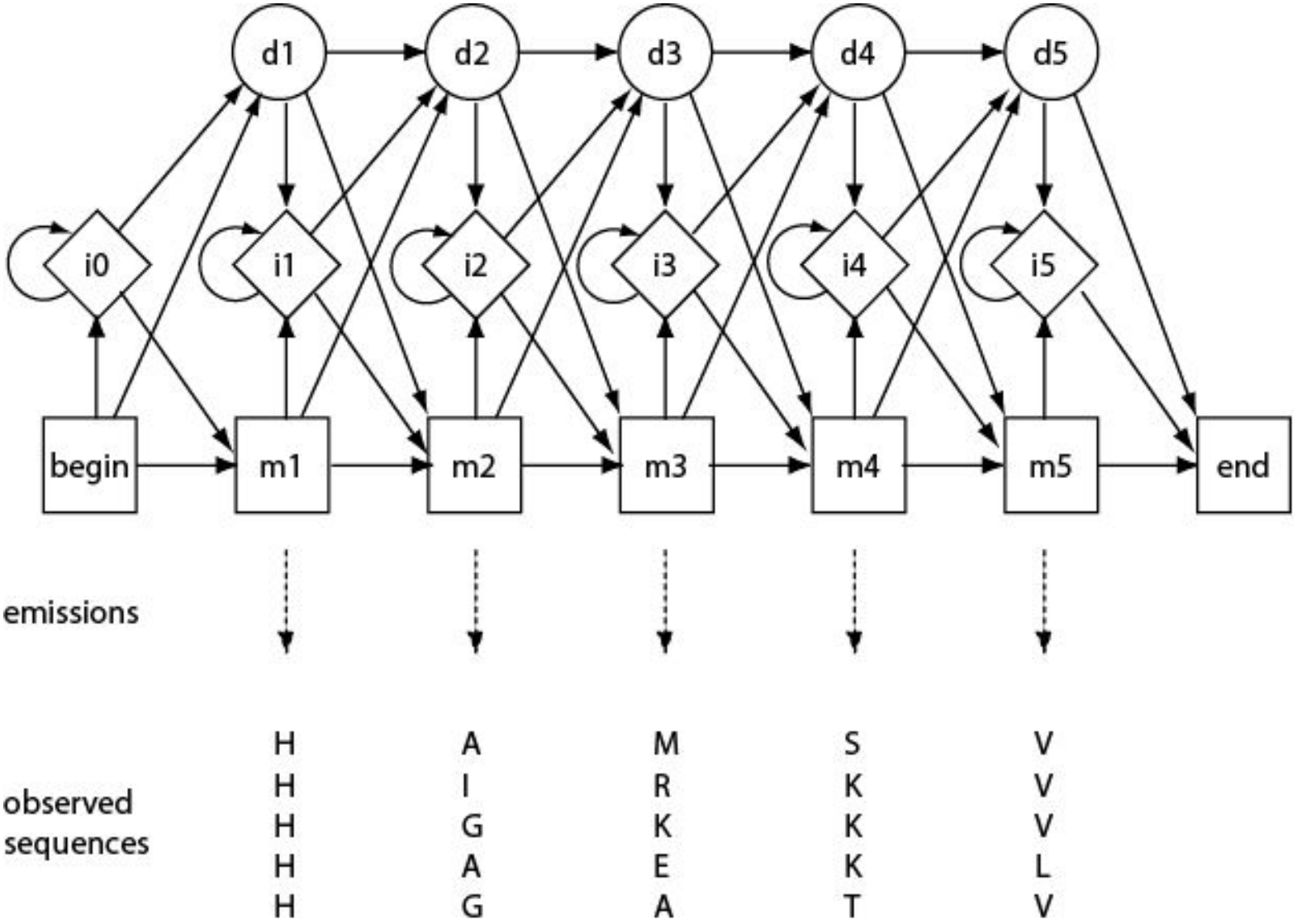
1D8U	HAMSV
1OJ6A	HIRKV
2hhbB	HGKKV
1FSL	HAEKL
2MM1	HGATV

	position				
Probability	1	2	3	4	5
p(H)	1.0				
p(A)		0.4			
p(I)		0.2			
p(G)		0.4			
p(M)			0.2		
p(R)			0.2		
p(K)			0.2		
p(E)			0.2		
p(A)			0.2		
p(S)				0.2	
p(K)				0.6	
p(T)				0.2	
p(V)					0.8
p(L)					0.2

$$p(HARTV) = (1.0)(0.4)(0.2)(0.2)(0.8) = 0.0128$$

$$\text{Log odds score} = \ln(1.0) + \ln(0.4) + \ln(0.2) + \ln(0.2) + \ln(0.8) =$$




d1
d2
d3
d4
d5
i0
i1
i2
i3
i4
i5
begin
m1
m2
m3
m4
m5
end
emissions
observed sequences
H H H H H
A I G A G
M R K E A
S K K K T
V V V L V

Мотивы

- Мотив в молекулярной биологии — это характерная последовательность нуклеотидов (в ДНК, РНК) или аминокислот (в белках), которые имеют существенное биологическое значение. Мотивы в белках позволяют найти участки белков, отвечающие за определённые свойства.

- Для обозначения мотива используют стандартные обозначения регулярных выражений

Регулярные выражения

- Алфавит — совокупность отдельных символов, обозначающих определенную аминокислоту или набор аминокислот.
- Строка из символов алфавита — обозначающая последовательность соответствующих аминокислот.
- [ABC] — любая строка символов, взятых из алфавита в квадратных скобках соответствует любому из соответствующих аминокислот; например [ABC] соответствует любому из аминокислот, из представленных: или a или b или c.
- {ABC} — любая строка символов, взятых из алфавита соответствует любой аминокислоте кроме тех, что находятся в фигурных скобках; например {ABC} соответствует любой аминокислоте, кроме: a, b и c.
- Главная идея, лежащая в этих обозначениях — принцип соответствия: последовательность элементов паттерна совпадает с последовательностью аминокислот, если и только если последнюю последовательность можно разбить на подпоследовательности таким образом, что каждый элемент массива соответствует соответствующий подпоследовательности в свою очередь.
- Например, модель [AB] [CDE] F соответствует шести последовательности аминокислот: ACF, ADF, AEF, BCF, BDF и BEF.

PROSITE – база данных для поиска мотивов в белках (prosite.expasy.org)

PROSITE дополняет список выражений, описанных выше:

1. «x» — шаблон элемента обозначают любую аминокислоту.

2. '<' — шаблон ограничивается N-концом последовательности.

3. '>' — шаблон ограничивается C-концом последовательности.

Также символ ' >' может находиться внутри квадратных скобок, например: S [T>] соответствует как " ST " и « S >».

4. Если e — шаблон элемента, и m и n два целых десятичных числа и m < = n, то:

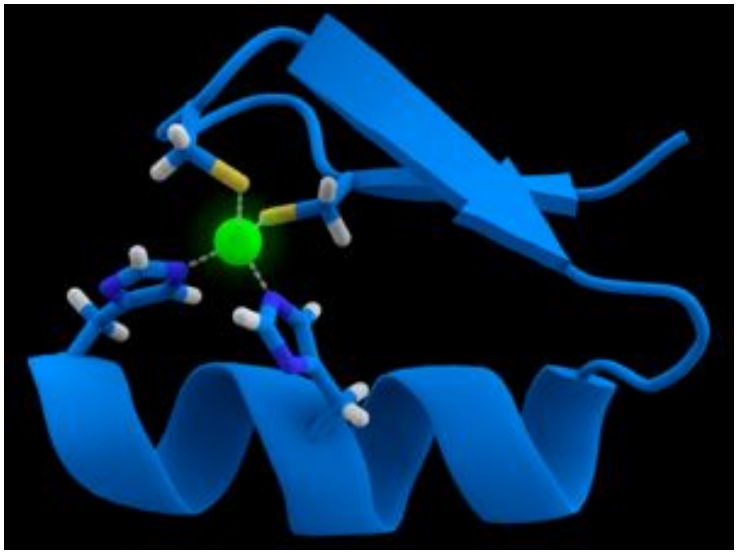
- e (m) эквивалентно повторению e ровно m раз - e (m, n) эквивалентно повторению e ровно k раз для любого целого k удовлетворяющей : m < = k < = n Например:

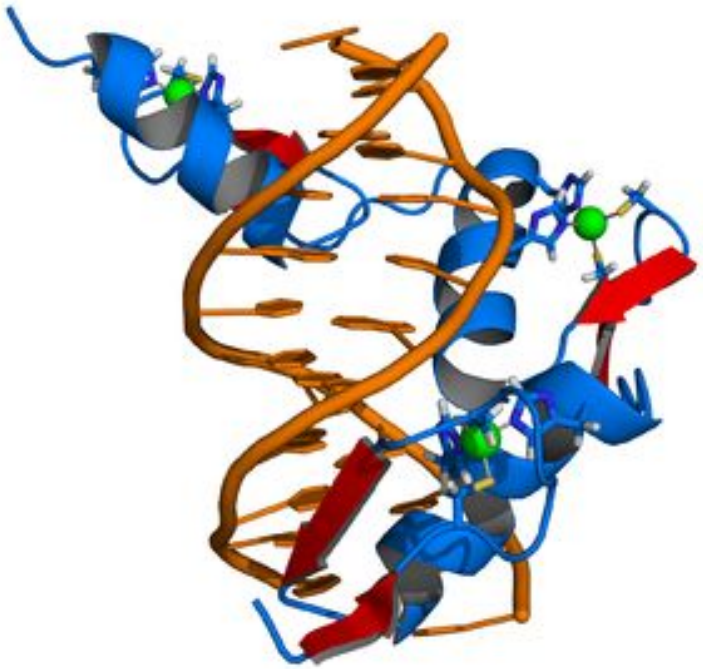
x (3) эквивалентно X-X-X.

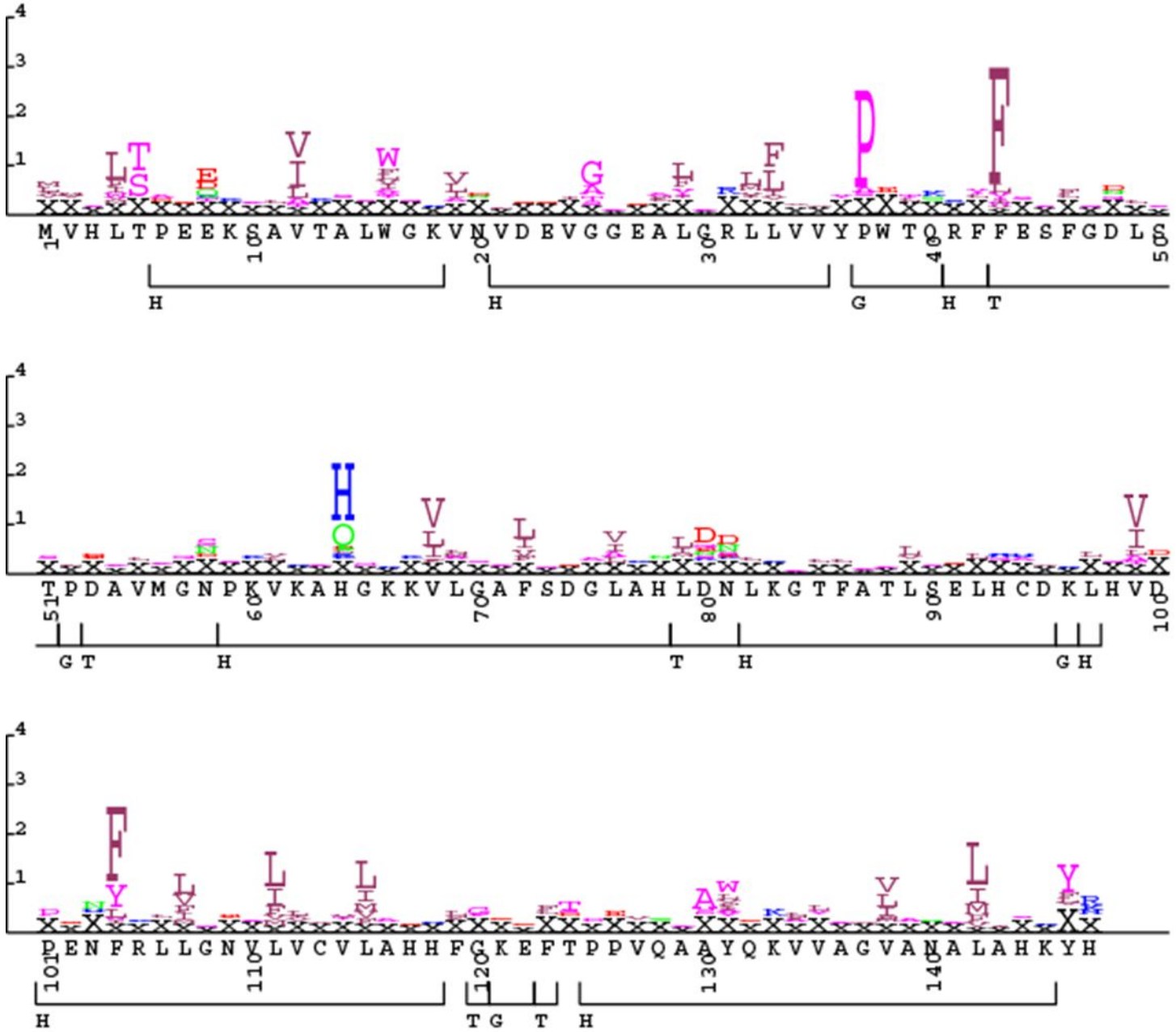
x (2,4) соответствует любой последовательности, которая соответствует xx или xxx или xxxx.

Мотив домена цинковый палец:

C-x (2,4)-C-x (3)-[LIVMFYWC]- x(8)-H-x(3,5)-H

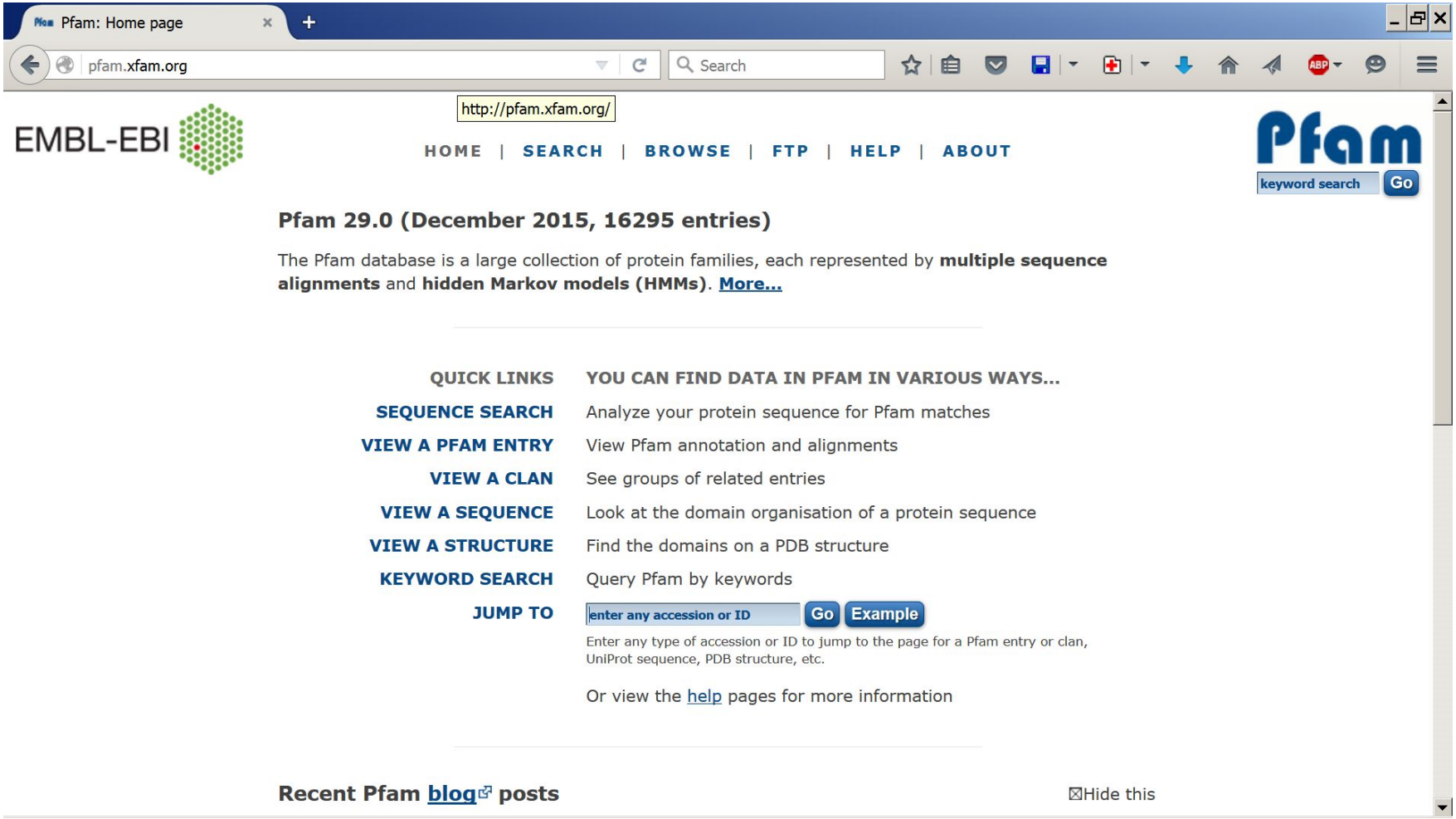





M V H L T P E E K S A V T A L W G K V N V D E V G G E A L G R L L V V Y P W T Q R F F E S F G D L S
T P D A V M G N P K V K A H G K K V L G A F S D G L A H L D N L K G T F A T L S E L H C D K L H V D
P E N F R L L G N V L V C V L A H H F G K E F T P P V Q A A Y Q K V V A G V A N A L A H K Y H

PFAM (protein family) БД – наиболее известный ресурс по анализу белковых семейств

http://pfam.xfam.org//



База данных PFAM (protein family)