5. Másodlagos adatbázisok

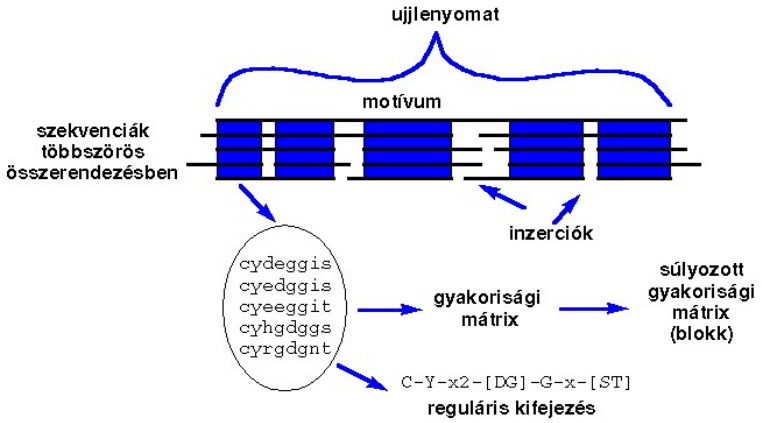
1. Alapfogalmak
2. Reguláris kifejezések, "aláírások" (PROSITE)
3. "Ujjlenyomatok" (PRINTS)
4. "Blokkok" (BLOCKS)
5. "Profilok": Prosite, Pfam
6. "Fuzzy" reguláris kifejezések: eMOTIF
7. Integrált másodlagos adatbázis: INTERPRO
8. A másodlagos adatbázisok használata

Az egyes adatbázisokról:

- Mit tartalmaz
- Hogyan készítették
- Példaállományok
- Hogyan kereshetünk benne
- A keresés eredménye

Alapfogalmak

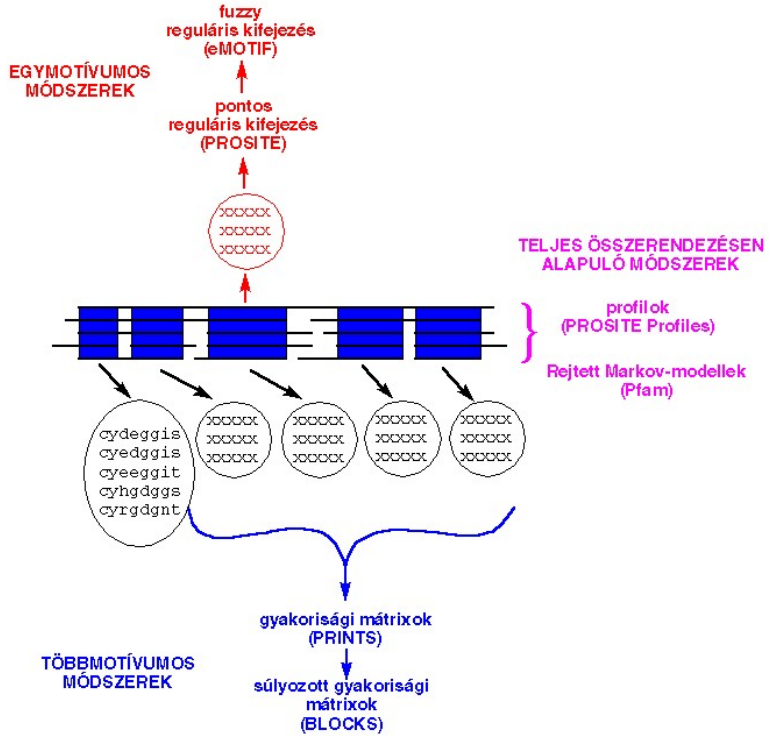
- A másodlagos adatbázisok lényegében **szekvenciamintázat−adatbázisok**. Az elsõdleges adatbázisokból (azaz a szekvenciaadatbázisokból) származtatják õket.
- Az elsõdleges adatbázisokban lévõ szekvenciák alapján többszörös szekvenciaösszerendezéseket készítünk. Ekkor láthatóvá válnak a konzerválódott régiók, a **motívumok**. A motívumok összességét nevezzük **ujjlenyomat**nak. Egy motívum alapján konstruálhatunk **reguláris kifejezést**, vagy **gyakorisági mátrixot** (ebbõl pedig súlyozott gyakorisági mátrixot).



Másodlagos vagy harmadlagos adatbázis	Elsõdleges vagy másodlagos forrása	Mit tartalmaz
PROSITE	SWISSPROT	Reguláris kifejezések (mintázatok)
Profiles (PROSITE része)	SWISSPROT	Súlyozott mátrixok (profilok)
PRINTS	SWISSPROT+TrEMBL	Összerendezett motívumok (ujjlenyomatok)
Pfam	SWISSPROT	Rejtett Markov modellek (HMM−ek)
BLOCKS	PROSITE, ill. PRINTS	Összerendezett motívumok (blokkok)
eMOTIF	BLOCKS, ill. PRINTS	"Fuzzy" reguláris kifejezések (mintázatok)

- A BLOCKS és az eMOTIF már harmadlagos adatbázisnak tekinthetõ, mert másodlagosból van származtatva.

Csoportosításuk



- Egy motívummal dolgozó adatbázisok: PROSITE (pontos reguláris kifejezésekkel dolgozik), eMOTIF (fuzzy reg. kif.)
- Több motívummal dolgozó adatbázisok: PRINTS (gyakorisági mátrixokkal készült) és BLOCKS (súlyozott gyakorisági mátrixokkal készült)
- Teljes összerendezésekkel dolgozó adatbázisok: Pfam (rejtett Markov−modellekkel), Profiles (a PROSITE másik része)

Mire jók?

- Bioinformatika alapfeladata: új szekvenciánál megállapítani a fehérje funkcióját, melyik fehérjecsaládba tartozik, stb.
- Keresõprogramok (FASTA, BLAST, PSI−BLAST, stb.) *homológia* felismerésére jók, de sokkal fontosabb az *ortológia* felismerése (a homológ lehet az ortológ paralógja is, ez kevésbé hasznosítható)
- Másodlagos adatbázisok az *ortológia* felismerését segítik: többnyire azonos funkciójú fehérjék szekvenciáiból származtatják õket.

Reguláris kifejezések: "aláírások" és "szabályok": PROSITE adatbázis

A PROSITE adatbázis tartalma: Reguláris kifejezések

Összerendezésbõl származtatható a reguláris kifejezés:

Összerendezés	Reguláris kifejezés
ADLGAVFALCDRYFQ SDVGPRSCFCERFYQ ADLGRTQNRCDRYYQ ADIGQPHSLCERYFQ	[AS]−D−[IVL]−G−x4−{PG}−C−[DE]−R−[FY]2−Q

Jelölések

- A pozíciók között kötõjelek
- Egy aminosav−betûjel: teljesen konzerválódott pozíció (pl. −R−)
- Szögletes zárójelben: a megadott aminosavak valamelyike (pl. [IVL])
- Kapcsos zárójelben: Bármelyik aminosav, kivéve a megadottakat (pl. {PG})
- x: Bármelyik aminosav
- Szám: ismétlõdés. (Pl. [FY]2, x4, x(2,4), stb.) x(2,4): x 2−ször, 3−szor vagy 4−szer.

PROSITE tartalma:

- Fehérjecsaládokra jellemzõ, azokat leíró reguláris kifejezések: **"aláírások"** (signatures)
- Egyéb, ismert funkciójú, gyakori mintázatokat megadó reguláris kifejezések: **"szabályok"** (rules). Pl.

Hely	Szabály
N−glikozilációs hely	`N−{P}−[ST]−{P}`
Protein kináz C foszforilációs hely	`[ST]−x−[RK]`
Kazein kináz II foszforilációs hely	`[ST]−x(2)−[DE]`
Asp és Asn hidroxilációs hely	`C−x−[DN]−x(4)−[FY]−x−C−x−C`

- Profilok (ld. késõbb)

A PROSITE készítése

- Manuálisan, szakértõk által összeállított adatbázis
- Szakirodalomból összegyûjtik az egyes fehérjecsaládokra vonatkozó adatokat (funkció, aktív hely, kötõhelyek, fontos aminosavak, stb.)
- Kigyûjtik a fehérjecsalád tagjainak szekvenciáit a SWISSPROT−ból, többszörös összerendezést készítenek (automatikus + manuális igazítás)
- Szerkesztenek egy olyan reguláris kifejezést, amely nagy specificitással jellemzi a család tagjait (ált. aktív helyet vagy fontos szerkezeti elemet magában fogjaló szakasz). Ez általában egy, kiválasztott motívum alapján történik (egymotívumos módszer!)
- A SWISSPROT−on ellenõrzik a kifejezés jóságát (pozitív, téves pozitív, téves negatív, ill. részleges találatok számai)
- Részletes, alapos dokumentáció
- Kb. 1500 fehérjecsaládot foglal magába (2001 október), a növekedés lassú (munkaigényes)

PROSITE állományok

Háromféle:

- **PROSITE mintázatállomány (példa)**
  Tartalmazza a reguláris kifejezést, a család tagjainak felsorolását, a kifejezés jóságára vonatkozó adatokat (hány jó, hány fals találatot ad, stb.)
- **PROSITE dokumentációs állomány (példa)**
  Részletes leírást tartalmaz és megadja a reguláris kifejezést
- PROSITE profilállomány (ld. késõbb)

Keresés a PROSITE−ban

- Kulcsszó, megnevezés, stb. szerint
- Új szekvenciában megtalálható−e valamely PROSITE reguláris kifejezés: ScanProsite. Opció: gyakori mintázatok (szabályok) kiszûrése. Példa
  Egyéb programok, szerverek is (pfscan, stb.)
- Adott reguláris kifejezés mit talál a SWISSPROT−ban: ScanProsite.

"Ujjlenyomatok": PRINTS

A PRINTS tartalma

Fehérjecsaládokra jellemzõ **"ujjlenyomatok"**: összerendezések hézagmentes, konzerválódott szakaszainak (**"motívumok"**) halmazai

A PRINTS készítése

- Kiinduló adatbázis: SWISSPROT+TrEMBL
- Egy fehérjecsalád néhány szekvenciáját kigyûjtik, manuálisan többszörös összerendezést készítenek
- Megállapítják a konzerválódott régiók helyét (leginkább vizuálisan), ezek a *motívumok* (kezdeti motívumhalmaz)
- Mindegyik motívumból gyakorisági mátrixot származtatnak. Pl.:

Motívum:

```
YVTVQHKKLRTPL
YVTVQHKKLRTPL
YVTVQHKKLRTPL
AATMKFKKLRHPL
AATMKFKKLRHPL
YIFATTKSLRTPA
VATLRYKKLRQPL
YIFGGTKSLRTPA
WVFSAAKSLRTPS
WIFSTSKSLRTPS
YLFSKTKSLQTPA
YLFTKTKSLQTPA
   ^   ^  ^
```

Gyakorisági mátrix:

T	C	A	G	N	S	P	F	L	Y	H	Q	V	K	D	E	I	W	R	M
0	0	2	0	0	0	0	0	0	7	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	3	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	0	3	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2
2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	4	0	0	0	0	1	0
4	0	1	0	0	1	0	2	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	10	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	4	0	0	2	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(A táblázat sorai az összerendezés oszlopainak felelnek meg.)

- A gyakorisági mátrix segítségével keresést végeznek a SWISSPROT+TrEMBL adatbázison.
    - ♦ Bármely szekvencia illeszkedése a motívumhoz pontozható a gyakorisági mátrix segítségével: a szekvencián végigmenve összeadjuk a mátrix megfelelõ oszlopában (ami az adott aminosavnak megfelel) lévõ gyakoriságokat
- A legjobb találatokat hozzáveszik és hozzárendezik a kezdeti motívumhoz, újabb gyakorisági mátrixot számítanak
- Az eljárást iteratívan ismétlik, amíg már nem lehet több szekvenciát hozzávenni a motívumhoz. Pl. a fenti mátrix 4 iteráció után:

T	C	A	G	N	S	P	F	L	Y	H	Q	V	K	D	E	I	W	R	M
0	0	4	0	0	0	0	8	4	34	0	0	15	0	0	0	1	7	0	0
0	4	15	0	0	0	0	0	7	0	0	0	37	0	0	0	10	0	0	0
50	0	0	0	0	3	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
3	0	12	2	1	8	0	3	6	0	0	0	14	0	0	0	15	2	0	7
9	2	2	2	1	1	0	0	0	0	1	25	0	20	0	6	0	0	4	0
14	0	2	0	0	4	0	14	0	8	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	0	2	0
0	0	2	1	0	17	0	0	0	0	0	0	0	52	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	68	0
44	0	0	0	0	6	0	0	0	0	12	11	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	69	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	11	0	0	7	0	0	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- Az iterációk utáni motívumhalmaz diagnosztikus ereje nagyobb (jobban "diagnosztizálható" vele egy új szekvenciának az adott fehérjecsaláddal való homológiája).
- Kb. 1550 ujjlenyomatban kb. 9500 motívumot tartalmaz a PRINTS (2001 október)

PRINTS állományok

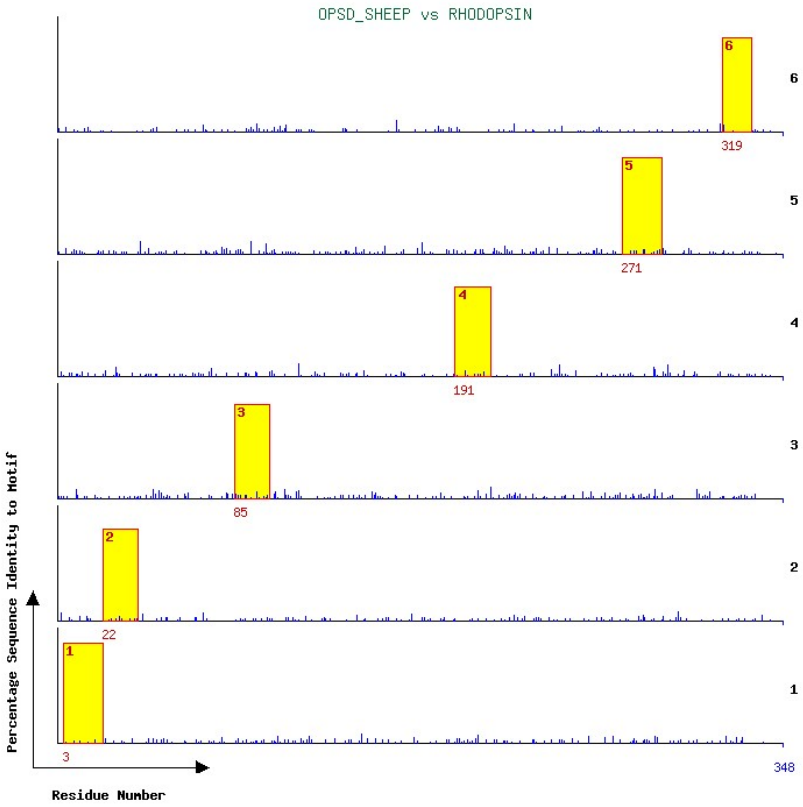
Példa

- Keresztreferenciák

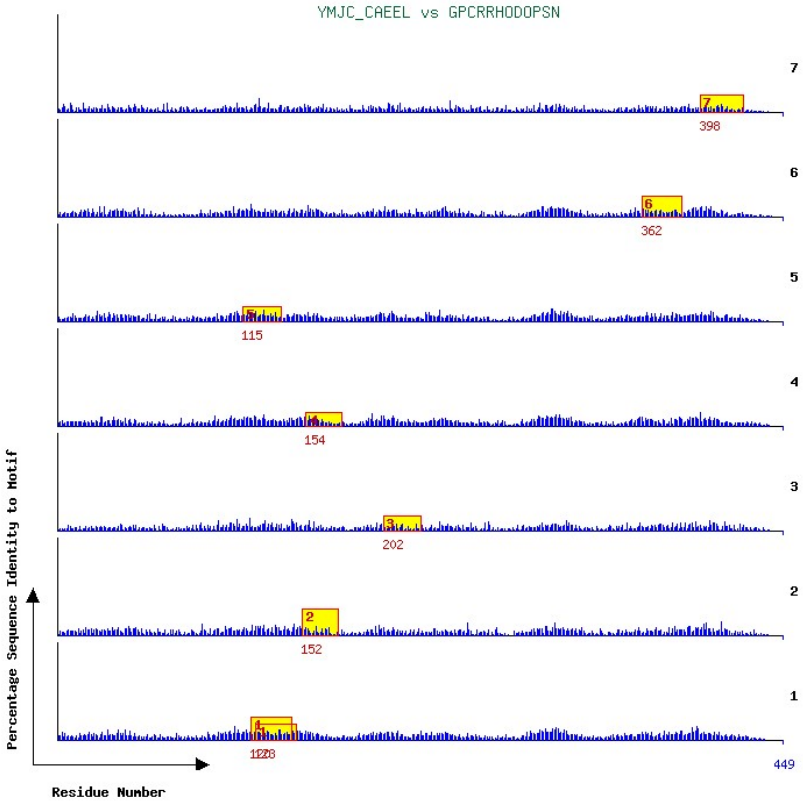
- Irodalmi hivatkozások
- Dokumentáció (bõséges)
- Az ujjlenyomat diagnosztikus erejét mutató statisztikai adatok
- A valódi pozitív találatot adó fehérjék felsorolása
- Kezdeti (iteráció elõtti) motívumkészletek (pozícióval és az elõzõ motívumtól mért távolsággal)
- Végsõ (iterációk utáni) motívumkészletek

Keresés a PRINTS−ben

- Direkt hozzáférés: kulcsszó, leírás, stb. alapján
- Keresés szekvenciával: FingerPRINTScan: a motívumokból levezetett gyakorisági mátrixok segítségével
    - ♦ Az egyes motívumokra külön−külön keres, E értéket számol. Példakimenet Grafikus ábrázolást is ad, pl.



- ♦ A grafikon vízszintes tengelyén a vizsgált szekvencia van, ezen mindegyik motívumot végigcsúsztatjuk, és kiszámítjuk a hasonlóságot a motívum és a szekvencia adott szakasza között, ezt tüntetjük fel. Mindegyik motívumra külön grafikon, a vizsgált szekvenciával való szignifikáns egyezések színezve vannak
- ♦ Legbiztosabb: mindegyik motívummal szignifikáns egyezés, megfelelõ sorrendben a szekvencia mentén
- ♦ Nem szükséges mindegyik motívummal egyezés, részleges egyezés is informatív lehet, pl.:



"Blokkok": BLOCKS

A BLOCKS tartalma

Fehérjecsaládokra jellemzõ **"blokkok"** halmazai: összerendezések hézagmentes, konzerválódott szakaszainak halmazai (mint a PRINTS, de más az elõállítási mód és az eredmény)

A BLOCKS készítése

- Kiindulás: a PROSITE−ban lévõ fehérjecsaládok, azaz ezek szekvenciái
- Egy speciális algoritmus olyan régiókat keres, melyekben 3 konzerválódott aminosav található, pl.:

```
SxxxxTxxxP
SxxxxTxxxP
...
```

- Az így talált régiókat mindkét irányba kiterjeszti, amíg a hasonlóság megmarad, az esetleges átfedõ régiókat összeolvasztja, stb. Bonyolult mûveletek után végül marad egy hézagmentes, nem átfedõ blokkokból álló halmaz, mely az összes szekvenciára jellemzõ
- A blokkokból **súlyozott gyakorisági mátrixokat** vezetnek le: a gyakorisági mátrix egy aminosavhasonlósági mátrixszal van súlyozva. Pl. a fenti PRINTS kezdeti mátrix a PAM250−nel súlyozva:

T	C	A	G	N	S	P	F	L	Y	H	Q	V	K	D	E	I	W	R	M
−29	−22	−29	−48	−24	−24	−46	40	−13	62	−10	−40	−22	−38	−44	−44	−15	16	−30	−22
−1	−32	−1	−18	−20	−10	−13	−9	20	−22	−21	−18	32	−23	−22	−20	32	−61	−26	19
0	−36	−18	−30	−24	−12	−30	36	0	24	−18	−36	−6	−30	−36	−30	6	−30	−18	−6
3	−29	3	−4	−10	−1	−7	−22	3	−31	−19	−15	14	−8	−15	−13	11	−52	−13	11
5	−48	−1	8	7	1	−4	−54	−31	−46	6	14	−17	27	6	5	−20	−48	18	−9
2	−27	−7	−19	−3	−5	−13	0	−16	6	8	−10	−11	−15	−13	−11	−7	−37	−4	−15
0	−60	−12	24	12	0	−12	−60	−36	−48	0	12	−24	60	0	0	−24	−36	36	0
6	−30	0	18	12	12	0	−48	−36	−42	−6	0	−18	30	0	0	−18	−30	18	−12
−24	−72	−24	−48	−36	−36	−36	24	72	−12	−24	−24	24	−36	−48	−36	24	−24	−36	48
8	−50	−20	−32	2	−2	0	−50	−34	−48	26	18	−24	32	−6	−6	−24	10	62	−2
24	−29	7	−5	5	6	0	−36	−24	−31	6	1	−6	1	4	4	−6	−56	14	−14
0	−36	12	−12	−12	12	72	−60	−36	−60	0	0	−12	−12	−12	−12	−24	−72	0	−24
−6	−44	−2	−18	−16	−10	−12	−10	22	−24	−18	−14	10	−22	−24	−18	6	−40	−26	16

Bármely sorban az A aminosav súlyozott pontszáma:

$$W_A = \sum_X G_X D_{XA}$$

ahol G_X az X aminosav gyakorisága (a gyakorisági mátrix megfelelõ sorából véve), D_{XA} az aminosavhasonlósági mátrixban az X és az A aminosavak hasonlóságának pontszáma, az összegzés során X mind a 20 lehetséges értéket felveszi. (Az A itt bármelyik aminosavat jelölheti.)

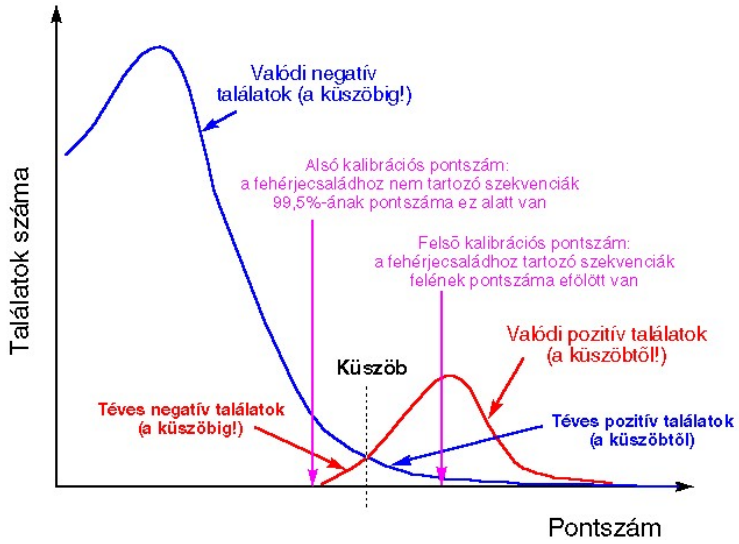
A súlyozott mátrix engedékenyebb a súlyozatlan gyakorisági mátrixoknál: kevesebb azonosságot tartalmazó szekvenciákat is magasan pontoz.

A gyakoriságok számításánál az egymással 80%−nál nagyobb azonosságot mutató szekvenciákat egy csoportba veszik és egy szekvenciaként veszik figyelembe, megfelelõ súlyozó faktorokkal

- **Kalibrálás:** A súlyozott gyakorisági mátrix segítségével pontozzák a SWISSPROT−ban lévõ összes szekvenciát. A találatok csoportosítása:
  - **Pozitív találatok**: amelyek pontszáma egy meghatározott küszöbérték fölött van. Ezen belül:
    - *Valódi pozitív találatok*: tényleg az adott fehérjecsaládhoz tartoznak
    - *Téves pozitív találatok*: annak ellenére, hogy pontszámuk a küszöbérték fölött van, mégsem tartoznak az adott fehérjecsaládhoz.
  - **Negatív találatok**: amelyek pontszáma az említett küszöbérték alatt van. Ezen belül:
    - *Valódi negatív találatok*: tényleg nem tartoznak az adott fehérjecsaládhoz
    - *Téves negatív találatok*: annak ellenére, hogy pontszámuk a küszöbérték alatt van, mégiscsak az adott fehérjecsaládhoz tartoznak.

  (A fehérjecsaládhoz tartozónak azokat a szekvenciákat tekintik, amelyek a blokkok levezetéséhez felhasznált (PROSITE−ból vett) szekvenciák között vannak.)

- **A blokk diagnosztikus erejét három pontszámmal jellemzik:**
  - *Alsó kalibrációs pontszám:* Az a pontszám, aminél a fehérjecsaládhoz nem tartozó szekvenciák (valódi negatívok + téves pozitívok) 99,5%−a kisebb pontszámot ad
  - *Felsõ kalibrációs pontszám:* A fehérjecsaládhoz tartozó szekvenciák (valódi pozitívok + téves negatívok) pontszámainak mediánja (a pontszámok fele fölötte van, fele alatta).
  - *A blokk **erõssége**:* A felsõ kalibrációs pontszám osztva az alsó kalibrációs pontszámmal és szorozva 1000−rel. Ez a blokk **erõssége** (strength): annak mértéke, mennyire képes a blokk (tkp. a mátrixszal számított pontszám) szétválasztani a fehérjecsaládhoz tartozó és az ahhoz nem tartozó szekvenciákat. Minél nagyobb ez, annál nagyobb a blokk diagnosztikus ereje.



- Egy új szekvenciát a következõképpen bírálhatunk el: a számított pontszámát elosztjuk az alsó kalibrációs pontszámmal és megszorozzuk 1000−rel, s az eredményt összevetjük a blokk erõsségével.

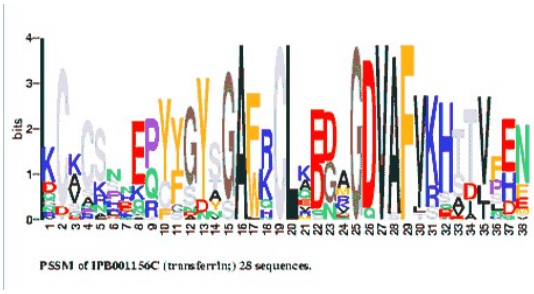
BLOCKS állományok

Példa

- Bevezetõ információk
- Maguk a blokkok, megadva két pontszámot (99,5% [alsó kalibrációs pontszám] és strength [a blokk erõssége])
- Az egyes szekvenciák, kezdõ pozícióval, üres sorral elválasztva a 80%−nál nagyobb azonosságú csoportok
- Mindegyik szekvencia után egy pontszám, amely a szekvenciának a többitõl való távolságát mutatja (max. 100)

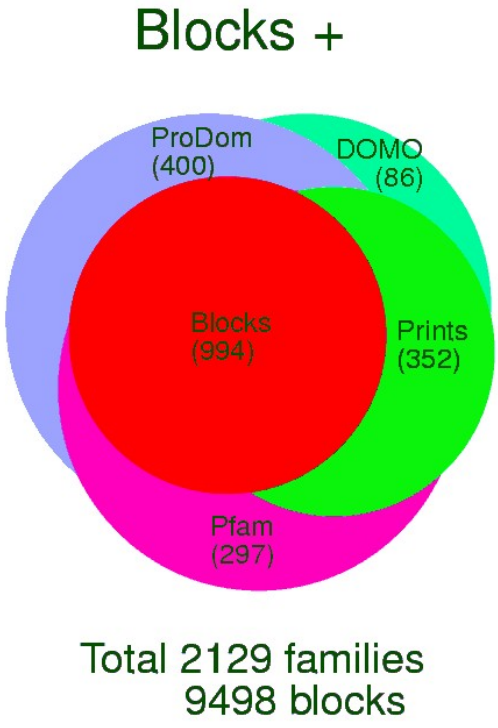
Keresés a BLOCKS−ban

- Kulcsszó, leírás, stb. szerint
- Egy szekvencia összehasonlítása a BLOCKS−szal (a súlyozott gyakorisági mátrix segítségével): Blocks Searcher. Kimenet: Példa. Egyezõ blokkokat mutatja, E értékkel.
- A talált blokkok ún. **logó**−ja (aminosavgyakoriságok betûméretre konvertálva) megjeleníthetõ, pl.:



A BLOCKS bõvítései

Több más adatbázist konvertáltak BLOCKS formátumra, így ezekben együttesen lehet keresést végezni.



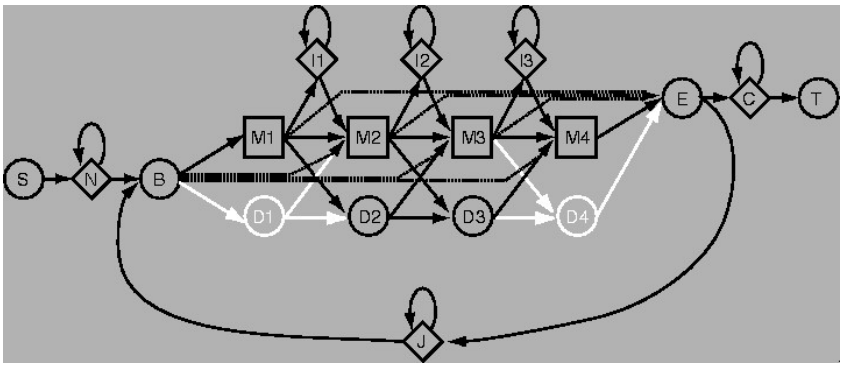
(Az ábrán szereplõ számok régebbiek!)

Profilok: PROSITE, Pfam

Tartalmuk

A **profilok** összerendezett szekvenciákból származtatott, a teljes szekvenciát leíró matematikai objektumok. Két fajtájuk:

- **Súlymátrixok**: súlyozott gyakorisági mátrixok (mint a BLOCKS−nál), kiegészítve pozíciófüggõ gap opening és gap extension penalty−kkel (azaz a mátrix soraiban 22 szám van: 20 aminosav és 2 gap penalty). A PROSITE−ban ilyennel írják le azokat a fehérjecsaládokat, amelyekre nem találnak jó reguláris kifejezést.
- **Rejtett Markov−modellek** (Hidden Markov Model, HMM): Olyan valószínûségi modell, amely szekvenciákat "generál": tkp. lineáris lánc, amely egyezés (Match, M), inszerció (I) és deléció (D) állapotokból áll, az ezek átmeneteit jellemzõ számadatokkal. Pl.:



A **rejtett Markov−modell** (angolul *hidden Markov model*, röviden HMM) egy képzeletbeli gép, amely szekvenciákat generál. A gépnek véges sok állapota van, és ezek között lépked. Minden egyes állapotában vagy minden egyes állapotváltáskor kibocsáthat egy szekvenciaelemet (tehát aminosavat vagy nukleotidot), ezekbõl áll össze a gép által generált szekvencia. A biológiai szekvenciák analíziséhez használt HMM−eknek alapvetõen háromféle állapota van: M (match, azaz egyezés), I (insert, azaz inzerció) és D (delete, azaz deléció); ezeken kívül szokás még kiinduló− és végállapotokat és egyéb speciális állapotokat is definiálni. A fenti ábra egy HMM állapotdiagramját mutatja.

A körök és a négyzetek a gép állapotait, az összekötõ nyilak az egyes állapotok között lehetséges átmeneteket reprezentálják. Az M és az I állapotok ún. "kibocsátó" állapotok, tehát amikor a gép ezekben az állapotokban van, akkor kibocsát magából egy szekvenciaelemet (aminosavat vagy nukleotidot). A D állapotok nem kibocsátó állapotok. Mindegyik M és I állapothoz tartozik egy táblázat, amely megmondja, hogy az adott állapotban a 20 aminosav, ill. a 4 nukleotid közül melyiket milyen valószínûséggel bocsátja ki a gép (tehát a táblázat 20 vagy 4 számot tartalmaz). A HMM−nek további paraméterei az egyes állapotok közötti átmenetek valószínûségei, tehát az állapotdiagramon lévõ, az egyes állapotokat összekötõ nyilak mindegyikéhez tartozik egy valószínûségérték. A HMM rendszerint annyi M, I és D állapotot tartalmaz, amilyen hosszú szekvenciát tipikusan generál. A fenti ábrán látható HMM például 4 M állapotot tartalmaz, tehát amennyiben mûködése során nem megy át sem I, sem D állapoton és nem is kanyarodik vissza a J állapoton keresztül, akkor 4 aminosavból vagy nukleotidból álló szekvenciát generál.

Ha van egy szekvenciahalmazunk, amely egymással rokon szekvenciákat tartalmaz, akkor ennek a szekvenciahalmaznak az elemzésével, az egyes pozíciókban lévõ aminosavak gyakorisága és más mennyiségek alapján definiálni lehet egy olyan HMM−et, amely olyan szekvenciákat generál, mint amilyenek a kiinduló szekvenciahalmazban vannak. A HMM felépítése, az állapotdiagram általában már eleve adott, a szekvenciahalmaz elemzésével pedig meghatározhatjuk az M és az I állapotokban az egyes aminosavak, ill. nukleotidok kibocsátásának valószínûségeit, valamint a gép egyes állapotai közötti átmenetek valószínûségeit. A Pfam adatbázis ezeket a paramétereket (pontosabban a számítások megkönnyítése végett a valószínûségek logaritmusát) tartalmazza minden egyes fehérjecsaládra.

Ha tehát a rokon szekvenciákat tartalmazó halmaz alapján definiáltunk egy HMM−et, akkor egy olyan modellünk van, amely ezt a bizonyos szekvenciacsaládot jól leírja, és képes további olyan szekvenciákat generálni, amelyek hasonlóak a kiinduló szekvenciahalmazban lévõ szekvenciákhoz. A szekvenciaanalízisnél azonban a HMM−nek nem ez a képessége fontos, hanem egy másik tulajdonsága. Nevezetesen: a HMM segítségével meg lehet határozni egy új szekvenciáról, hogy azt milyen valószínûséggel generálhatja az adott HMM. Ha ez egy nagy valószínûségértéknek adódik, akkor állíthatjuk, hogy a vizsgált, új szekvencia is beletartozik abba a szekvenciacsaládba, amelyikbõl a HMM megkonstruálása során kiindultunk.

Hogyan határozható meg egy új szekvenciáról, hogy mekkora valószínûséggel generálhatja azt egy bizonyos HMM? Egyszerû: meg kell nézni, hogy a HMM−nek mely állapotok egymásutánján kell végigmennie (vagyis az állapotdiagramban milyen útvonalat kell bejárnia) és mely állapotokban milyen szekvenciaelemet kell kibocsátania ahhoz, hogy éppen a vizsgált (új) szekvencia jöjjön ki. Ezután az állapotdiagramban bejárt útvonal mentén vett átmeneti valószínûségeket és a kibocsátó állapotokban a megfelelõ szekvenciaelem kibocsátásának valószínûségeit összeszorozva adódik a vizsgált szekvencia generálásának teljes valószínûsége. (Általában több útvonal is vezethet ugyanahhoz a szekvenciához, ilyenkor vagy az összes lehetséges útvonal összegét, vagy a legvalószínûbb útvonalat szokás figyelembe venni.)

A HMM−ek tehát olyan matematikai objektumok, amelyek szekvenciamintázatokat képesek leírni (legyenek azok akár nagyméretû fehérjeszekvenciák, akár néhány nukleotidból álló funkcionális helyek a DNS−ben). Új szekvenciák esetében segítségükkel egzakt valószínûségérték adható arra nézve, tartozhat−e az új szekvencia az adott HMM által leírt mintázatú szekvenciák csoportjába.

A HMM−eket azért kedvelik, mert egzakt matematikai alapjuk van. Ugyanakkor vannak hátrányaik is. Szerkezetükből adódóan nem képesek megragadni például a szekvenciákban távolabb lévõ aminosavak közötti korrelációkat (pl. korrelált mutációk esetében). További hátrány, hogy egy HMM által generált szekvencia egymástól független események egymásutánjának az eredményeként áll elõ, ami a valóságban nincs így: a szomszédos szekvenciaelemekhez tartozó valószínûségértékek között a valóságban általában összefüggés van. A fehérjeszekvenciákban például a hidrofób aminosavak általában egymás mellé csoportosulnak, vagyis ha egy pozícióban hidrofób aminosav generálódott, akkor a következõ pozícióban nagyobb valószínûséggel kellene szintén hidrofób aminosavnak generálódnia, mint egyébként, de ezt a HMM nem képes figyelembe venni. E tökéletlenségek ellenére a HMM−ek nagyon sikeresnek bizonyultak a szekvenciaanalízisben.

A "rejtett Markov−modell" kifejezésben a "rejtett" jelzõ egyébként arra utal, hogy mi csak a modell mûködésének az eredményét, a kimenetet (azaz a generált szekvenciát) ismerjük, maga a modell és a paraméterei számunkra rejtettek. Tehát nekünk a kimenetbõl kell következtetnünk a modell felépítésére és a mûködését leíró paraméterekre (az átmeneti és a kibocsátási valószínûségekre).

PROSITE−ban és Pfam−ban.

Elkészítésük

A többszörös összerendezésekbõl matematikai úton

PROSITE profilállomány

Példa

- Default paraméterek: különbözõ átmenetek (pl. MI: Match−Insertion) pontszámai
- M: Match (egyezés) állapotok, paraméterekkel (súlymátrix elemei)
- I: Inszerció állapotok, paraméterekkel

Pfam állományok

- Leíró állomány: Családok leírásai (szekvenciák felsorolása)
- HMM állomány: A HMM−et adja meg. Példa
- Pfam−A: Jól dokumentált családok, Pfam−B: rosszul dokumentált, automatikusan generált családok.

Keresés profiladatbázisokban

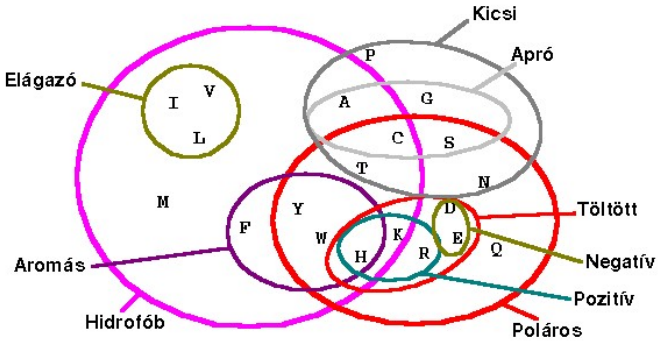
- Szekvencia összehasonlítása a profilokkal (különféle programok, szerverek)

"Fuzzy" reguláris kifejezések: eMOTIF

Az eMOTIF tartalma

Fuzzy reguláris kifejezések, különféle szignifikanciaszintekre optimalizálva.

Fuzzy: többféle aminosavat is megenged a konzerválódott pozíciókban, hasonlóság szerinti csoportokban:



Összerendezés	Fuzzy reguláris kifejezés
ADLGAVFALCDRYFQ SDVGPRSCFCERFYQ ADLGRTQNRCDRYYQ ADIGQPHSLCERYFQ	[ASGPT]-D-[IVLM]-G-x5-C-[DENQ]-R-[FYW]2-Q

Az engedékenység és a találatok számának viszonya:

Reguláris kifejezés	Találatok száma az OWL 29.6-on
D-A-V-I-D	71
D-A-V-I-[DENQ]	252
[DENQ]-A-V-I-[DENQ]	925
[DENQ]-A-[VLI]-I-[DENQ]	2739
[DENQ]-[AG]-[VLI]2-[DENQ]	51506
D-A-V-E	1088

Az eMOTIF készítése

- BLOCKS és PRINTS alapján kb. 270 000 fuzzy reguláris kifejezést kreáltak, különféle "engedékenységi" szintek mellett.

Keresés az eMOTIF-ban

- Csak szekvencia szerinti keresés végezhetõ, az eMOTIF programmal. Kimenet: Példa (BLOCKS és PRINTS találatok)

Integrált másodlagos adatbázis: INTERPRO

- A legjobban dokumentált másodlagos adatbázisok (PROSITE, PRINTS) integrálása egyéb másodlagos adatbázisokkal (Pfam, PRODOM, tervben a BLOCKS).
- Kb. 2850 fehérjecsalád (2001 október)

A másodlagos adatbázisok használata

Ld. példák
