1. Mi a bioinformatika?

Vázlat: *Ez a kurzus. Mi a bioinformatika? Bioinformatika a szakirodalomban. A bioinformatika céljai. A biológiai információ típusai és elemzési módszerei. Az adatok csoportosítása hasonlóságok alapján. A bioinformatikai "spektrum". A szekvencia/szerkezet deficit. Genomprojektek. Miért fontos a bioinformatika? Szekvenciaanalízis. Az ördög a részletekben lakozik. Pár jótanács. Bioinformatikai webhelyek.*

Ez a kurzus

- Anyag a weben: http://www.enzim.hu/~szia/bioinformatika
- Felépítés (kb.):
  - Mi a bioinformatika?
  - Adatbázisok
  - Páronkénti szekvencia−összerendezés
  - Többszörös szekvencia−összerendezés, filogenetikai analízis
  - Másodlagos adatbázisok
  - Nukleotidszekvenciák analízise
  - Fehérjeszekvenciák analízise
  - Fehérjeszerkezetek elemzése
  - Fehérjék térszerkezetének jóslása
  - Genomika
  - Bioinformatikai stratégiák. Bioinformatikai programcsomagok.
- Fontos fogalmak bemutatása, nem a konkrét eszközökre koncentrálunk (ezek változnak)
- Elõadás utolsó része: gyakorlati példák
- Irodalom:
  - Attwood TK Parry−Smith DJ: Introduction to bioinformatics. Addison−Wesley Longman 1999. Az alapfogalmakat mutatja be.
  - Baxevanis AD Oulette BFF (eds.): Bioinformatics. A practical guide to the analysis of genes and proteins. John Wiley Sons 1998. (Újabb kiadása is van már!) Fõleg a szoftverek használatára koncentrál.
  - Legújabb kézikönyv: Mount D: Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
  - cikkek

Mi a bioinformatika?

Bioinformatika: számítógépes módszerek kidolgozása és alkalmazása a biológiai információ kezelésére és elemzésére.

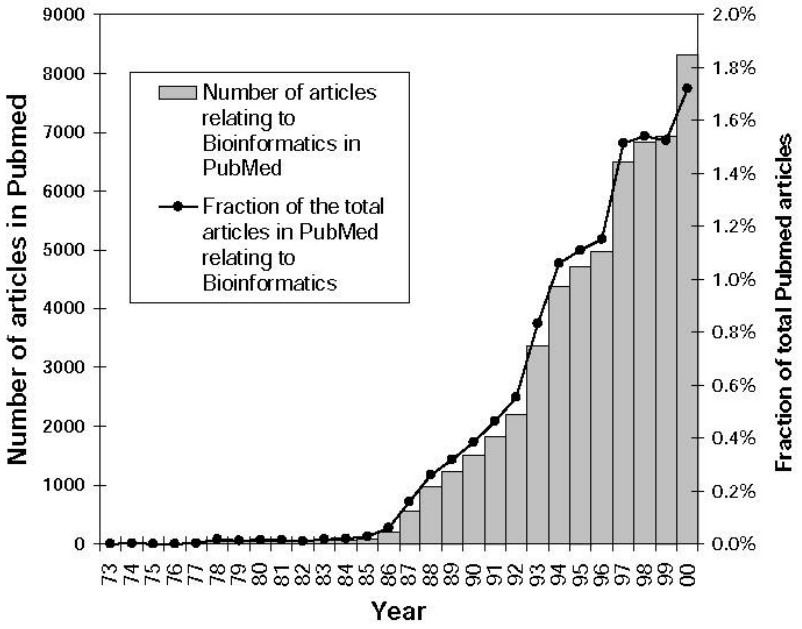
- A szót az 1980−as évek közepén találták ki, legtágabb értelemben: minden, amit számítógéppel csinálnak, és köze van a biológiához.
- Szûkebb értelemben: a biológiai **szekvenciaadatok** kezelése és elemzése, ill. a 3D szerkezeti információ kezelése és elemzése.

Egy újabb definíció az Oxford English Dictionaryból:

Bioinformatics is conceptualizing biology in terms of molecules (in the sense of physical−chemistry) and applying **"informatics techniques"** (derived from disciplines such as applied maths, computer science and statistics) to **understand** and **organise** the information associated with these molecules, on a **large scale**. In short, bioinformatics is a management information system for molecular biology and has many **practical applications**.

(Hevenyészett fordításban) A bioinformatika a biológia fogalmi megragadása a (fizikai−kémiai értelemben vett) molekulák segítségével, és (az alkalmazott matematikából, a számítógéptudományból, a statisztikából és más tudományágakból származó) **"informatikai módszerek"** alkalmazása az ezekkel a molekulákkal kapcsolatos információ **megértésére** és **megszervezésére**, **nagy léptékben**. Röviden, a bioinformatika egy információmenedzselési rendszer a molekuláris biológia számára, és sok **gyakorlati alkalmazása** van.

Bioinformatika a szakirodalomban



A bioinformatikai témájú cikkek aránya nõ, mára kb. 2%. Egyes vélemények szerint lassan már nem lesz szükség kísérletekre, mindent szimulálni fogunk.

A bioinformatika céljai

1. **Adatbázisok létrehozása és karbantartása**. Az adatok megszervezése, rendezése oly módon, hogy a kutatók könnyedén hozzáférhessenek a meglévõ információhoz, és hozzátehessenek újat.
2. **Eszközök, módszerek kifejlesztése az adatok elemzésére**. Az adatok haszontalanok, amíg nem elemeztük õket.
3. **Az eszközök és módszerek alkalmazása az adatok elemzésére, és az eredmények értelmezése a biológia szempontjából**.

A biológiai információ típusai és elemzési módszerei

Az adatok forrása	Az adathalmaz mérete	Bioinformatikai témák
Nyers DNS−szekvenciák	12 millió szekvencia, 13 milliárd bázis	• A kódoló és nem−kódoló régiók elkülönítése • Az intronok és exonok azonosítása • A géntermékek predikciója • Igazságügyi elemzések
Fehérjeszekvenciák	400 000 szekvencia (egyenként kb. 300 aminosav)	• Szekvenciaösszehasonlítási algoritmusok • Többszörös szekvenciaillesztõ algoritmusok • Konzerválódott szekvenciamotívumok azonosítása
Makromolekuláris szerkezetek	15 000 szerkezet (egyenként kb. 1000 atom koordinátái)	• Másodlagos és harmadlagos szerkezet jóslása • 3D szerkezeteket illesztõ algoritmusok • Fehérjegeometriai mérések • Felszín, térfogat és alak számítása

		• Intermolekuláris kölcsönhatások • Molekulaszimulációk (energiafüggvény, molekuláris mozgások, dokkolás)
Genomok	300 teljes genom (egyenként 1,6 millió−−3 milliárd bázis)	• Az ismétlõdések jellemzése • Szerkezetek hozzárendelése génekhez • Filogenetikai analízis • Genomi méretû felmérések (fehérjetartalom jellemzése, anyagcsere−útvonalak) • Kapcsoltság elemzése egyes betegségek és gének összefüggésének vizsgálatához
Génexpressziós adatok	legnagyobb: kb. 20 idõpont az élesztõ kb. 6000 génjénél	• Az expressziós mintázatok korrelációjának vizsgálata • Az expressziós adatok összekapcsolása a szekvencia−, szerkezeti és biokémiai adatokkal
Egyéb: Szakirodalom	11 millió szakcikk	• Elektronikus könyvtárak az automatizált irodalomkutatáshoz • Tudásadatbázisok irodalmi adatokból
Egyéb: Anyagcsere−útvonalak		• Reakcióútvonal−szimulációk

Az adatok csoportosítása hasonlóságok alapján

Fontos: Az információ nagy része csoportokba rendezhetõ, értelmes biológiai hasonlóságok alapján. Ez számos bioinformatikai módszer alapja. Pl.:

- a genomban sok ismétlõdõ szekvenciarészlet van
- a gének csoportosíthatóak funkciójuk (pl. enzimhatás) szerint vagy az anyagcsere−útvonalak szerint
- különbözõ fehérjéknek gyakran hasonló a szekvenciájuk
- véges számú különbözõ alapvetõ fehérjeszerkezet létezik (becslések 1000 és 10 000 közé teszik)

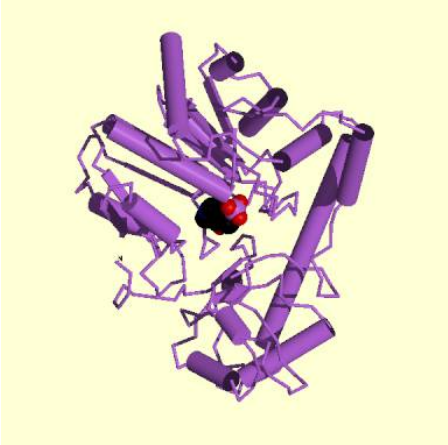
−−> "véges alkatrészlista" (az élõlények véges számú alkatrészbõl épülnek fel)

Mintázatfelismerés és predikció

Két alapvetõ mûvelet a bioinformatikában

- **Mintázatfelismerés**: a hasonlóságok megtalálása
  - ♦ A már ismert, hasonló funkciójú/szerkezetû fehérjéket megvizsgálva megkeresünk valamely, a funkcióra/szerkezetre jellemzõ, konzerválódott sajátosságot
  - ♦ Ezt használjuk fel új szekvenciák funkciójának/szerkezetének azonosítására
  - ♦ Feltétel: az új szekvencia olyan fehérjéhez tartozzon, amihez hasonlót már "láttunk"
- **Predikció**:
  - ♦ A funkció vagy a térszerkezet megjóslása, hasonlóság alapján vagy másképpen
  - ♦ A bioinformatika "Szent Grálja": a szekvenciából megjósolni a térszerkezetet

```
MFENITAAPADPILGLADLFRADERPGKINLGIGVYKDETGKTPVLTSVKKAEQYLLENETTKNYLGIDGIPEFG
RCTQELLFGKGSALINDKRARTAQTPGGTGALRVAADFLAKNTSVKRVWVSNPSWPNHKSVFNSAGLEVREYAYY
DAENHTLDFDALINSLNEAQAGDVVLFHGCCHNPTGIDPTLEQWQTLAQLSVEKGWLPLFDFAYQGFARGLEEDA
EGLRAFAAMHKELIVASSYSKNFGLYNERVGACTLVAADSETVDRAFSQMKAAIRANYSNPPAHGASVVATILSN
DALRAIWEQELTDMRQRIQRMRQLFVNTLQEKGANRDFSFIIKQNGMFSFSGLTKEQVLRLREEFGVYAVASGRV
                                    NVAGMTPDNMAPLCEAIVAVL
```

==> 

- A felgombolyodás problémája: az aminosavsorrend meghatározza a térszerkezetet (Anfinsen−kísérlet óta tudjuk), de még ma sem értjük, hogyan [chaperonok nem számítanak]
- Csak másodlagosszerkezet−jóslás megy, korlátozott megbízhatósággal
- Várhatóan így marad még pár évtizedig

Homológia és analógia

Homológia = ***közös evolúciós eredet*** (szekvenciák esetében). Nincs mértéke (nem fejezhetõ ki %−ban!!!), két szekvencia vagy homológ, vagy nem.

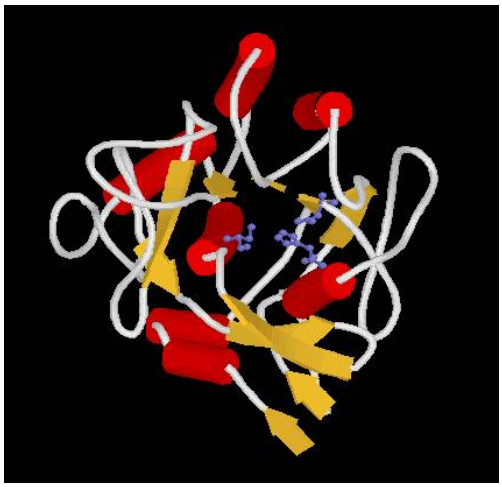
Analógia: hasonlóság, közös evolúciós eredet nélkül

Két fehérje analóg lehet, ha:

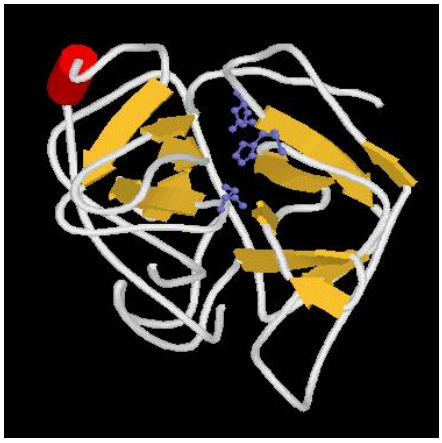
- szerkezetük hasonló, de nincs közöttük szekvenciális hasonlóság, vagy
- azonosak a katalitikus csoportjaik, de térszerkezetük különbözõ

Ilyenkor közös evolúciós eredetre nem lehet következtetni. Inkább *konvergens evolúció* állhat a háttérben.

Pl. szubtilizin és kimotripszin: mindkettõ szerin proteáz, a His/Asp/Ser katalitikus triáddal, de térszerkezetük teljesen eltérõ:



Szubtilizin



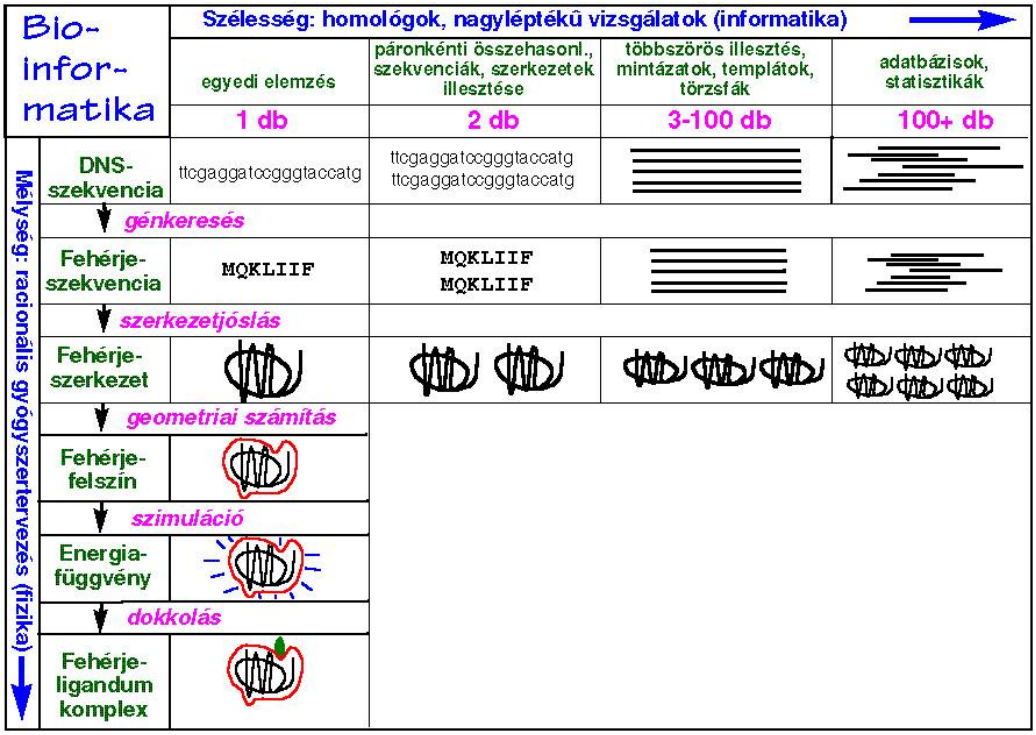
Kimotripszin

Ortológia és paralógia

A homológia két típusa

- **Ortológia**: két gén ortológ, ha két különbözõ fajban találhatóak, és egy közös õs−génbõl származnak, mely a két faj közös õsében volt jelen. Ugyanazt a funkciót szolgálják, a két fajban. Példa: laktát dehidrogenáz (ill. génje) az emberben és az egérben.
- **Paralógia**: két gén paralóg, ha ugyanabban az organizmusban találhatóak, és egy közös õs−génbõl génduplikáció és azt követõ divergens evolúció útján alakultak ki. Többnyire különbözõ, de egymással összefüggésben lévõ funkciójuk van. Példa: a hisztidin−bioszintézis enzimei (ill. ezek génjei) emberben (nagyon hasonló szerkezetûek, de más−más reakciót katalizálnak).

A bioinformatikai "spektrum"



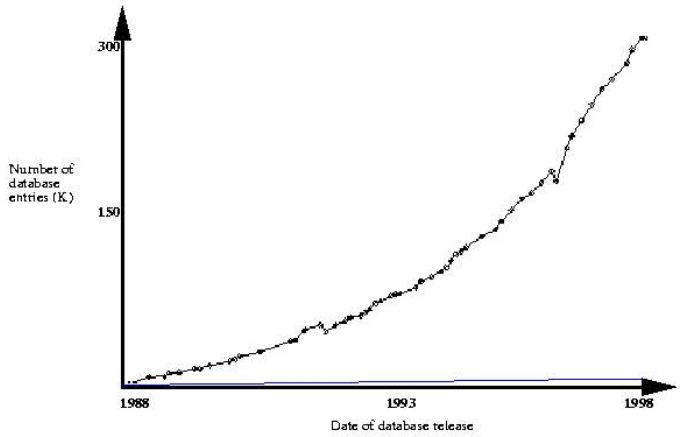
Bioinformatikai módszerek két dimenziója:

- **mélység**: (függõleges tengely): fizika
  veszünk egy fehérjét, és azt igyekszünk minél mélyebben megérteni.
  Génszekvencia−fehérjeszekvencia−térszerkezet−geometria−kötõhelyek−gyógyszertervezés
- **szélesség**: (vízszintes tengely) informatika
  a gén összehasonlítása más génekkel. Páronkénti, majd többszörös szekvenciaillesztés, szekvenciamintázatok

azonosítása, filogenetikai elemzés, teljes genom elemzése, stb.

A szekvencia/szerkezet deficit

Az ismert fehérjeszekvenciák és az ismert térszerkezetek számának növekedése az utóbbi években:



- Mintegy 200−szor több a szekvencia, évente megduplázódik.
- 1998: kb. 300 000 ismert szekvencia (sõt, az ún. EST adatbázisokat is figyelembe véve milliók), kb. 1500 egyedi térszerkezet
- A helyzet a genomprogramokkal csak rosszabbodik
- Percenként egy új szekvencia. A késõbbi nagy szerkezetmeghatározó projektek is max. napi 5 új szerkezetet szolgáltatnak majd.
- Nagy információs deficit, itt van szerepe a bioinformatikának.

Genomprojektek

Már megszekvenált genomok (ld. http://www.ebi.ac.uk/genomes/):

- *Eukarioták:*
  - Élesztõ
  - Caenorhabditis elegans (féreg)
  - Drosophila melanogaster (muslica)
  - Arabidopsis thaliana (lúdfû)
  - Ember
- *Egyéb:*
  - kb. 50 baktérium
  - 11 archeon
  - >100 organellum
  - több száz vírus és fág

Folyamatban lévõ fontos genomszekvenálási projektek (ld. http://www.ebi.ac.uk/~sterk/genome−MOT/):

- ember
- egér
- kutya
- patkány
- stb.

A humán genom projekt

- Hivatalosan 1990−ben indult, az USA Dept. of Energy és National Institutes of Health irányításával
- Tervezett befejezés: 2003
- Célok:
  - azonosítani az emberi DNS mintegy 100 000 (újabb infók szerint csak 30 000) génjét
  - meghatározni a kb. 3 milliárd bázis pontos sorrendjét

    - ezt adatbázisokban tárolni
    - fizikai géntérképet készíteni
    - meghatározni a szekvencia variációit (polimorfizmusok)
    - modellorganizmusok genomját szekvenálni (muslica, egér)
    - gyorsabb, hatékonyabb szekvenáló módszereket kifejleszteni
    - új adatelemzõ módszereket kifejleszteni
    - a projekt etikai, jogi és társadalmi vonatkozásaival foglalkozni
- 1996−ig: térképezés, ezután szekvenálás
- Állami projekt: a kromoszómákat egyre kisebb szakaszokra darabolva, a darabokat vektorokba klónozva úgy szekvenálnak, hogy mindig tudják, melyik darabot vizsgálják.
- 1998: Craig Venter céget alapít: teljes genom shotgun szekvenálását alkalmazva gyorsabban és olcsóbban akar elkészülni, mint az állami projekt
- **Shotgun** módszer: a genomot átfedõ módon apró darabokra tördelve a darabokat megszekvenáljuk, majd az átfedések alapján számítógéppel összerakjuk. Teljes genom esetén (térkép nélkül) kétséges a repetitív szekvenciák miatt.
- 1999. december: 22. kromoszóma készen van
- 2000. május: 21. kromoszóma
- 2000. június: durva vázlat (90% lefedve, töredékesen)
- 2001. február: a durva vázlat (draft) teljesen kész
- Ma: a genomszekvencia kb. 60%−a véglegesített, a többi csak vázlat (darabkák orientációja és sorrendje bizonytalan, hibaarány nagy)

Miért fontos a bioinformatika?

- Genomprojektek −−> Óriási tömegû szekvenciaadat: megfejtetlen kód
- Bioinformatika feladata: a szekvenciákban kódolt információ megfejtése:
    - térszerkezetek
    - funkciók
    - evolúciós összefüggések
- funkció és evolúciós összefüggések térszerkezetbõl is

Szekvenciaanalízis

- Legfontosabb eljárás a bioinformatikában: egy új (ismeretlen szerkezetû/funkciójú fehérjéhez tartozó) szekvenciához próbálunk hasonlót találni a már ismert szerkezetû/funkciójú fehérjék szekvenciái között.
- Szekvenciák összerendezése (vagy −illesztése) (alignment):

```
 _aln.pos         10        20        30        40        50        60
1frf      KHRPSVVWLHNAECTGCTEAAIRTIKPYIDALILDTISLDYQETIMAAAGETSEAALHEA
2frv      KKRPSVVYLHNAECTGCSESVLRTVDPYVDELILDVISMDYHETLMAGAGHAVEEALHEA


 _aln.pos         70        80        90       100       110       120
1frf      LEGKDGYYLVVEGGLPTIDGGQWGMVAGHPMIETCKKAAAKAKGIICIGTCSAYGGVQKA
2frv      IKG--DFVCVIEGGIPMGDGGYWGKVGGRNMYDICAEVAPKAKAVIAIGTCATYGGVQAA


 _aln.pos        130       140       150       160       170       180
1frf      KPNPSQAKGVSEALG---VKTINIPGCPPNPINFVGAVVHVLTKGIPDLDENGRPKLFYG
2frv      KPNPTGTVGVNEALGKLGVKAINIAGCPPNPMNFVGTVVHLLTKGMPELDKQGRPVMFFG


 _aln.pos        190       200       210       220       230       240
1frf      ELVHDNCPRLPHFEASEFAPSFDSEEAKKGFCLYELGCKGPVTYNNCPKVLFNQVNWPVQ
2frv      ETVHDNCPRLKHFEAGEFATSFGSPEAKKGYCLYELGCKGPDTYNNCPKQLFNQVNWPVQ


 _aln.pos        250       260
1frf      AGHPCLGCSEPDFWDTMTPFYEQG
2frv      AGHPCIACSEPNFWDLYSPFYSA-
```

- **Szekvenciaazonosság:** az összerendezésben az azonos aminosavpárok százalékos aránya
- A szekvenciaazonosság csökkenésével a funkció/szerkezet átvihetõsége csökken

Szekvenciaazonosság	Megjegyzés

50–100%	Biztosra vehetõ a homológia és a nagyfokú szerkezeti hasonlóság. Erõsen valószínûsíthetõ az azonos vagy rokon funkció.
20–50%	Biztosra vehetõ a homológia és a jelentõs szerkezeti hasonlóság. A funkció feltételezhetõen azonos vagy rokon.
20% körül	**Alkonyzóna (twilight zone)**: kétségessé válik a homológia és a szerkezeti hasonlóság. Ekkora hasonlóság véletlenül is kialakulhat, egymással nem rokon fehérjék között is. Kifinomult módszerek szükségesek a homológia detektálásához. A szekvencia sokszor nem elég, térszerkezeti információ is szükségessé válik a rokonság mértékének eldöntéséhez.
0–10%	**Éjfélzóna (midnight zone)**: Esetleg fennállhat funkcionális és szerkezeti hasonlóság a két fehérje között, de ezt a szekvencia alapján nem lehet eldönteni. Az esetleges rokonságot csak más információk alapján (elsõsorban térszerkezet) lehet megállapítani.

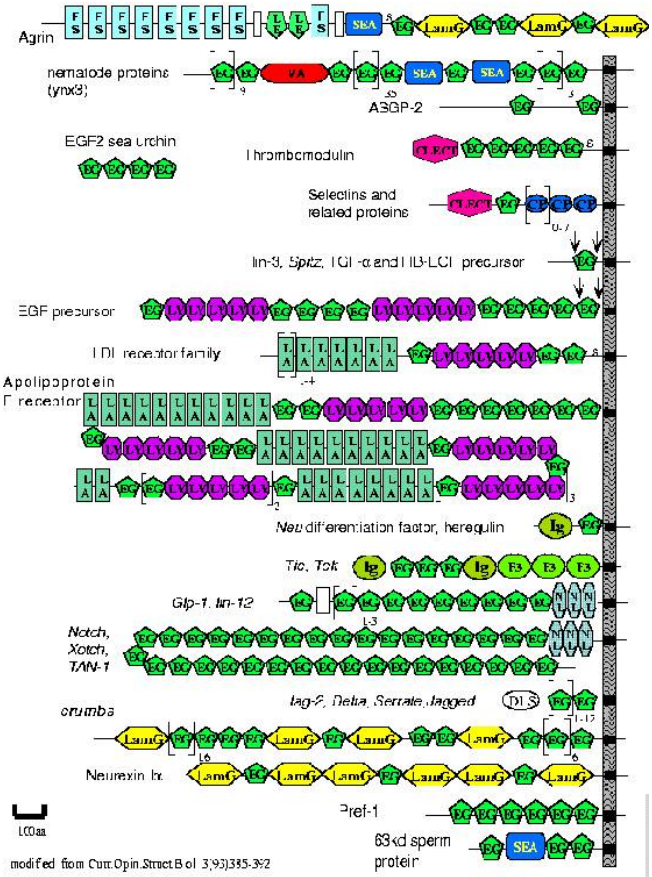
Az ördög a részletekben lakozik

A szekvenciaanalízis során számos csapdát kell elkerülni:

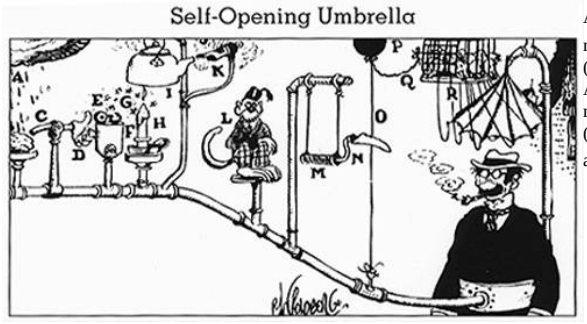
- Az ortológia és a paralógia bonyolult viszonyai új szekvenciák vizsgálatánál megnehezítik annak eldöntését, hogy a funkcionális információ mennyire vihetõ át az új fehérjére (a talált hasonló szekvencia lehet az ortológ paralógja egy másik organizmusban). Emiatt az automatikus funkcióhozzárendelés sok esetben hibás (és ezt adatbázisokban is megtalálni)!
- A szekvenciahasonlóság sokszor csak a szekvencia egy részére vonatkozik, pl. **moduláris fehérjék** esetében.

Moduláris fehérjék

- Modulok: olyan fehérjedomének, amelyek cserélhetõ építõkövekként szerepelnek
- Nem (csak) génduplikációval, hanem *shuffling* révén is terjednek
- Pl.:



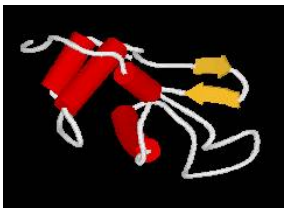
- funkciójuk változhat attól függõen, milyen fehérje részét képezik
- Az evolúció "bütyköl", változatosan használja fel a modulokat. Hasonlat: Rube Goldberg rajzai (a biológia metaforája):



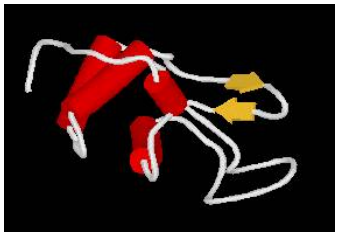
Az esõcseppek (A) ráhullanak az aszalt szilvára (B), mely megduzzad és meglöki a kart (D), melynek másik végén a mûkéz (D) megforgatja a kiürült öngyújtó (F) dörzskerekét. A tûzkõbõl (E) kirepülõ szikrák (G) meggyújtják a gyertyát (H), mely felforralja a kannában (I) lévõ vizet. A kilépõ gõz (J) megfújja a sípot (K). A cirkuszi majom (L) azt hiszi, hogy ez a jel az attrakció megkezdésére, és átugrik a trapézra (M), mely lengés közben a kés (N) élével elvágja a zsinórt (O), ezzel elengedve a léggömböt (P). A léggömb felszáll, a hozzá kötözött madzag (Q) kinyitja a kalitka ajtaját, s a madarak (R) kirepülnek, zsinórokkal felemelve az esernyõ pálcáit.

- ♦ Sok ilyen rajzon szerepel majom, ha csak azt látjuk, nem tudunk a többi elemre, sem az egész rendszer funkciójára következtetni.
- ♦ Ha a majom hiányzik, nehezen tudjuk megjósolni, mi lehet a helyén, túl sok lehetõség van
- ♦ A biológiai rendszerek is így épülnek fel részekbõl.

- Az új szekvenciák kb. egyharmadának egyáltalán nem lehet a funkciójára következtetni az ismert funkciójú fehérjék szekvenciái alapján, mert a funkcionális jellemzés nem képes lépést tartani a szekvenciaadatbázisok növekedésével
- Még a nagy szekvencia− és szerkezeti hasonlóság sem jelent mindig funkcionális azonosságot vagy rokonságot. Példa: alfa−laktalbumin és lizozim: 50% szekvenciaazonosság, lényegében azonos térszerkezet, teljesen más funkció (lizozim baktérium sejtfalát emészti, alfa−laktalbumin a laktóz szintáz szabályozófehérjéje)



Alfa−laktalbumin



Lizozim

A szekvencia és a szerkezet szerepe a funkció meghatározásában

- A szerkezet a váz, amelyre a szekvencia fel van fûzve. A funkció megállapításához szükséges a szekvencia részleteinek ismerete. Analógia: szoba és berendezése (csak a berendezés részleteibõl tudhatjuk meg, mire való a szoba).
- A funkció megállapításához a **biológiai kontextust** is ismerni kell (milyen épületben van a szoba)

A bioinformatikai programok, eljárások, algoritmusok nem végleges, biztos válaszokat adnak, csak segítenek leszûkíteni a lehetõségek körét és kísérleteket tervezni a kérdések eldöntésére. A valódi válaszokat a biológiai háttérismeretek fényében találhatjuk meg.

Pár jótanács

Ne higgyük el mindig:

- ami az adatbázisokban van (félrevezetõ vagy hibás lehet a szekvencia vagy a funkcióhozzárendelés)
- amit a programok mondanak (a programban hiba lehet, az eredmény félrevezetõ lehet)
- amit a webszerverek mondanak (dettó)
- amit a szakirodalomban olvasunk (a tévedések nem ritkák)

Továbbá:

- Ne ragadjunk le egy "legjobbnak vélt" módszernél, adatbázisnál. Ne ragadjunk le a részleteknél. Sokféle megközelítést alkalmazva keressünk konszenzusos képet.

Bioinformatikai webhelyek

EMBL, SRS

NCBI (Medline, Genbank, stb.)

Expasy, Swissprot, Amos

CCP11 projekt