

7. Fehérjeszekvenciák és –tér szerkezetek analízise.

1. Egyszerű elemzések
2. Tér szerkezet – predikció
 - 2.1. A probléma bonyolultsága
 - 2.2. A predikció szintjei
- 2.3. 1D predikciók (másodlagos szerkezet, hozzáférhetőség, transzmembrán hélixek)
3. Tér szerkezetek elemzése:
 - 3.1. Minőségellenőrzés
 - 3.2. Másodlagos szerkezet
 - 3.3. Szerkezeti motívumok
 - 3.4. Kölcsönhatás ligandumokkal
 - 3.5. Töltésviszonyok
 - 3.6. Felszínek, üregek

Egyszerű elemzések (lásd Expasy Tools)

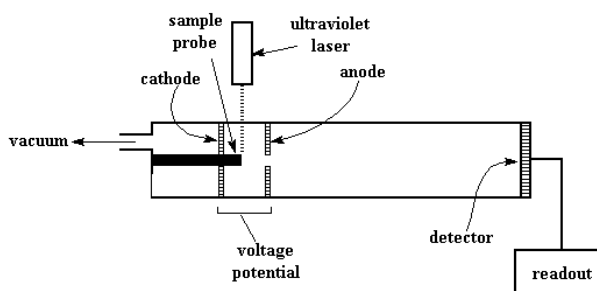
Fehérjeazonosítás

- **AACompIdent:** fehérje azonosítása aminosav-összetétel alapján. Megadható még az izoelektromos pont (pI) és a molekulatömeg (Mw). Eredmény: rangsorolt lista a SWISSPROT-ban lévő, a megadott adatokhoz közeli paraméterekkel rendelkező fehérjéről. *Távoli homológiák detektálhatók ezen a módon!*
- **PROPSEARCH:** A megadott szekvenciából (csak az aminosav-összetételből) 144 tulajdonságot számít ki (pl. nagy és kis oldalláncok részaránya, átlagos hidrofobicitás, átlagos töltés, bizonyos dipeptidok gyakorisága, stb.) Ezek alapján keres hasonlót a szekvenciaadattárakban. *Távoli homológiák detektálhatóak vele!*

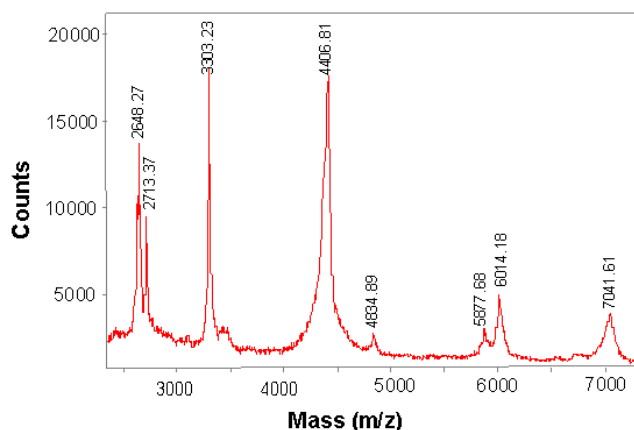
Fehérjeazonosítás tömegspektrometriai eredmények alapján

Tömegspektrometria: valamilyen specifikus proteázzal (pl. tripszin) való emésztés után megadja a kapott peptidok pontos molekulatömegét. Ennek alapján a fehérje azonosítható.

Leggyakrabban használt módszer: **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry)



A fehérjét (annak fragmentumait) UV-elnyelő anyagba ágyazzák (mátrix), ezt a réteget UV lézerrel lövik, mire a molekulák ionizálódnak és leválnak a mátrixról. Elektromos térben felgyorsulnak, detektor méri a becsapódást. A becsapódásig eltelt időből számítható a tömeg. Spektrum:



1D predikciók

Másodlagos szerkezet jóslása a szekvenciából

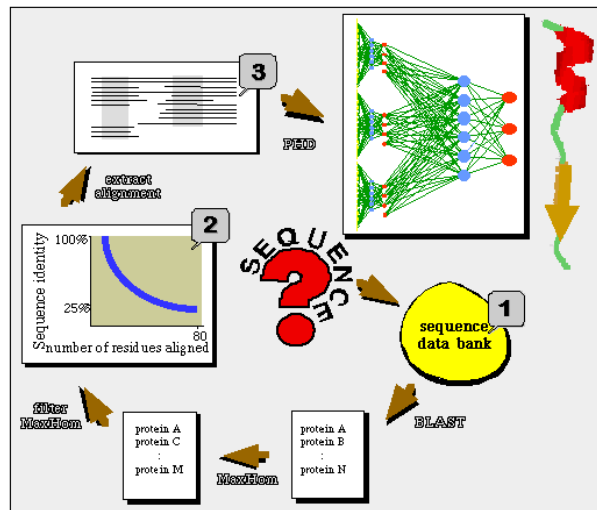
A fontosabb módszerek az [Expasy – Tools](#) oldalról elérhetőek.

Módszerek (rengeteg van, ez csak néhány példa):

	Módszer	Működés elve	Kb. pontosság (%)
1. generációs	Chou–Fasman (CF)	Az egyes aminosavtípusok előfordulásának valószínűsége a különböző másodlagos szerkezeti elemekben	55
	Garnier–Osguthorpe–Robson (GOR I, GOR II)		56
	Lim		57
2. generációs	Nagano	Statisztikai adatok (aminosavpárok, ill. triplettek)	61
	GOR III		62
	Ptitsyn–Finkelstein	Fizikai–kémiai tul.	61
	Qian–Sejnowski	Neuronhálózat	60
	GOR IV	Szegmensstatisztika	63
	Schneider		63
3. generációs	NSSP	Többszörös összerendezések, neuronhálózat	70
	LPAG		68
	PHD		73
Konszenzus	JPRED	Több más módszer alapján konszenzus	73–75
	SOPMA		
	CNRS		

- **1. és 2. generációs módszerek:** az egyes aminosavaknak a különböző másodlagos szerkezetekben való előfordulásának gyakoriságai alapján dolgoznak. Pontosság <70%, béta-szerkezetre csak 28–48%, túl rövid hélixek és béta-szálak
 - ♦ *Chou–Fasman:* Alfa-hélixet indít ott, ahol 6 egymás melletti aminosav közül 4-nek 1,03 a hélixben levési valószínűsége, béta szálát ott, ahol 5 egymás melletti aminosav közül 3-nak legalább 1,0 a bétában levési valószínűsége. Ezután a hélixeket és béta-szálakat kiterjeszti mindkét irányba addig, amíg 4 egymás melletti aminosav átlagos hélix-, ill. béta-képzési valószínűsége 1,0 alá nem esik. Béta-kanyar jóslása hasonló módon.
 - ♦ *GOR (Garnier–Osguthorpe–Robson):* 17 aminosav szélességű ablakban vizsgálja az aminosavak előfordulását, ezek alapján jósolja az ablak középső pozíciójában lévő aminosavhoz tartozó másodlagos szerkezetet
- **3. generációs módszerek:** a vizsgált szekvenciákhoz hasonlóakat keresnek és ezekből többszörös összerendezést készítenek, majd a többszörös összerendezésekben rejlő információt használják fel. A többszörös összerendezések információt tartalmaznak az együtt mutálódó aminosavakról (korrelált mutációk), ezek többnyire a térszerkezetben egymáshoz közel vannak, tehát a többszörös összerendezés információt tartalmaz a fehérje harmadlagos szerkezetéről, így módon segíti a másodlagos szerkezet jóslását.
- Konszenzusos módszerek: több más módszert (2. és 3. generációs módszereket) alkalmaznak, az eredmények konszenzusát veszik. Pl. JPRED: [Példa](#)

PHD módszer (ma a legjobb, akár 77% pontosság) [Burkhard Rost]



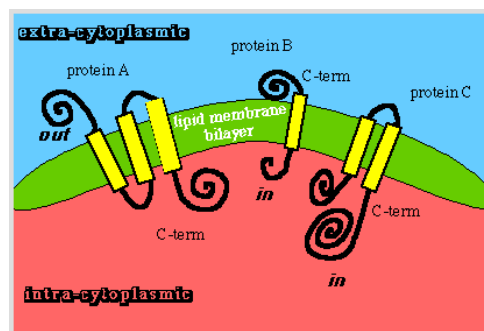
1. adatbázisból kikeressük a rokon szekvenciákat (BLAST program)
2. Elkészítjük ezek többszörös összerendezését (MaxHom program)
3. Az összerendezés szűrése, jó homológok megtartása, újból összerendezés
4. A végső összerendezés alapján mindegyik pozícióra elkészítjük az előforduló aminosavcserék profilját
5. Ez szolgál bemenetként a neuronhálózatnak

Bár a PHD módszer a legjobbnak látszik, mégsem *mindig* az, ezért helyes, ha konszenzus módszert alkalmazunk, ill. több módszert együtt.

Oldószer általi hozzáférhetőség predikciója

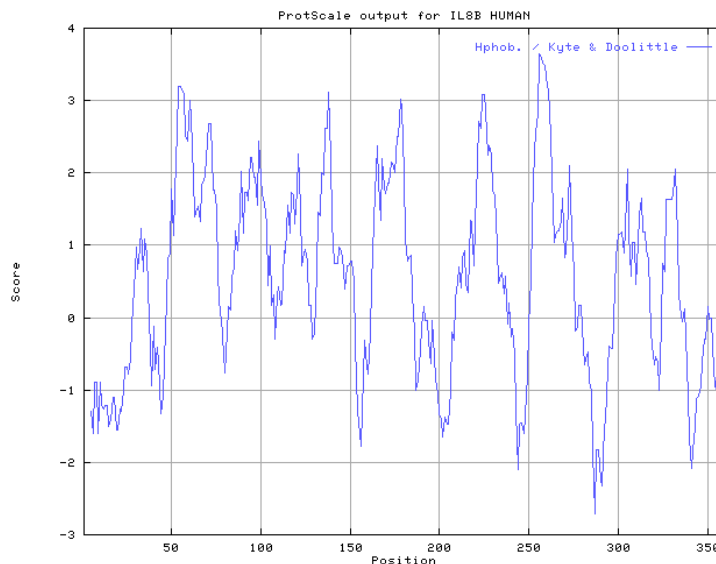
- Felszíni vagy eltemetett az oldallánc
- Kezdetleges predikció: az oldallánc hidrofobicitása alapján --> gyenge eredmény
- Jobb predikció: evolúciós információ bevitele többszörös összerendezések útján --> 75% pontosságú jóslás (PHDacc)

Transzmembrán hélixek predikciója



Transzmembrán fehérjék topológiája

- Három állapot: bent, kint, membránban
- Hidrofobicitási plot: valamilyen hidrofobicitási skála (itt: Kyte–Doolittle) alapján, simítással. Pl. egy transzmembrán fehérjére a ProtScale programmal:



Jó, de durva becslést ad a transzmembrán régiókra.

- Kifinomultabb módszerek; a többszörös összerendezést használók itt is eredményesek (>95% pontosság) Pl. TMPRED, HMMTOP.
- Legpontosabbnak tűnik: rejtett Markov-modell (HMMTOP by Tusnády Gábor): közel 100%. De: kevés az ismert szerkezet, így kevésbé ismert a megbízhatóság.

2D predikciók

Oldallánc-kontaktusok predikciója

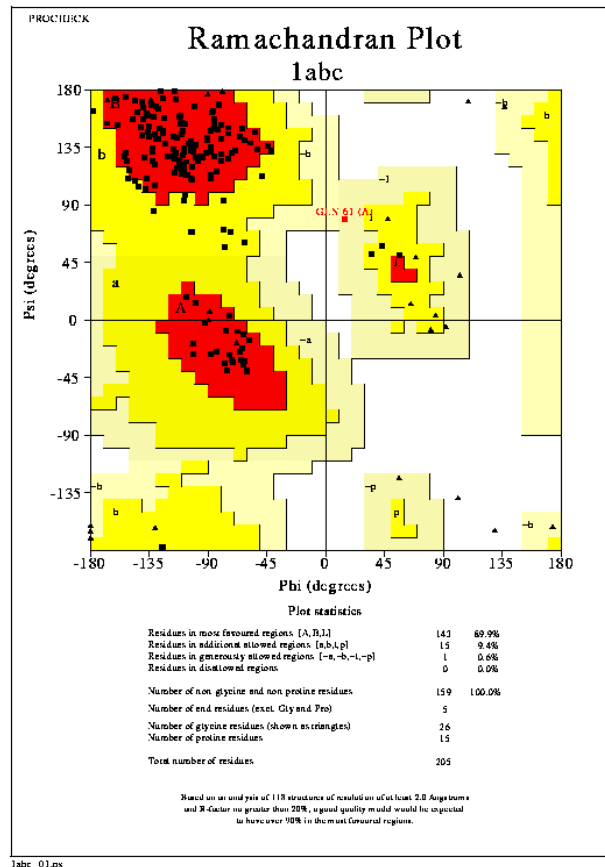
- Az összes kontaktusból elvben felépíthető a 3D szerkezet
- Próbálkoztak kontaktusokat jósolni a következők alapján:
 - ♦ szekvenciában távoli aminosavak együtt előforduló (korrelált) mutációi
 - ♦ statisztika
 - ♦ átlagtér-potenciálok
 - ♦ neuronhálózatok
- Az eddigi eredmények nem kielégítőek

Fehérjeszerkezetek elemzése

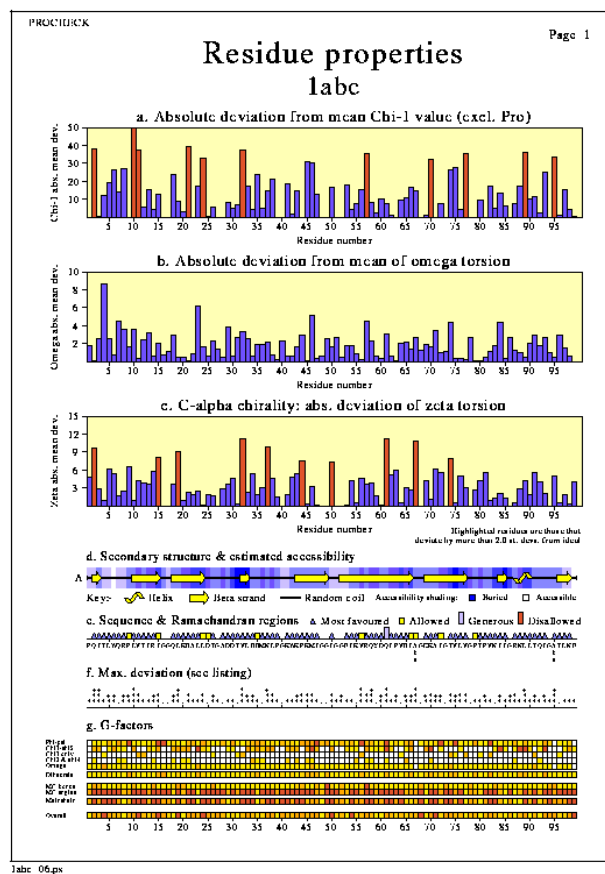
Célja: a működés mechanizmusának részletes megértése, az egyes szerkezeti motívumok felismerése, jelentőségük feltárása, stb.

Minőségellenőrzés

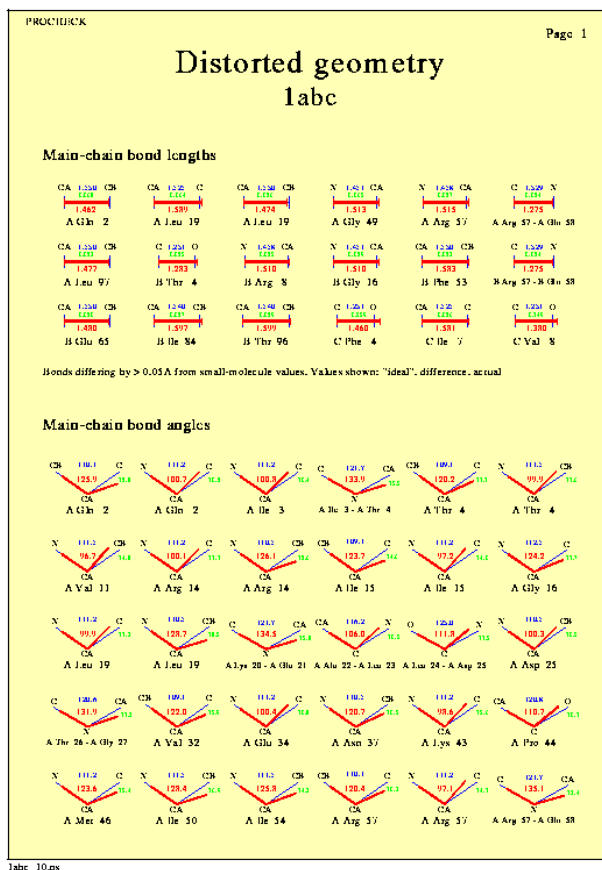
- PDB-ben lévő szerkezetek nagy része tökéletlen, hibákat tartalmaz. A modellezéssel nyert szerkezetek még inkább.
- Minőségellenőrzés elvei:
 - ♦ Kémiai felépítés: megvan-e minden atom, nem szakadt-e a lánc, stb.
 - ♦ Sztereokémia: Kötéshosszak, kötésszögek, torziós szögek megfelelnek-e az elvárható (a jó szerkezetek átlagából számított) értékeknek? Nincsenek-e túl közel eső atomok?
 - ♦ Fehérjetulajdonságok: Ramachandran-térképen a ϕ és ψ szögek eloszlása (nincs-e valami a tiltott zónában, stb.); oldalláncok jó környezetben vannak-e, megfelelően szoros-e a hidrofób mag pakoltsága, stb.
- Többféle program: [PROCHECK](#), WHAT_CHECK
- PROCHECK kimenetek pl.:



Ramachandran-plot



Oldallanc-paraméterek



Geometriai torzulások

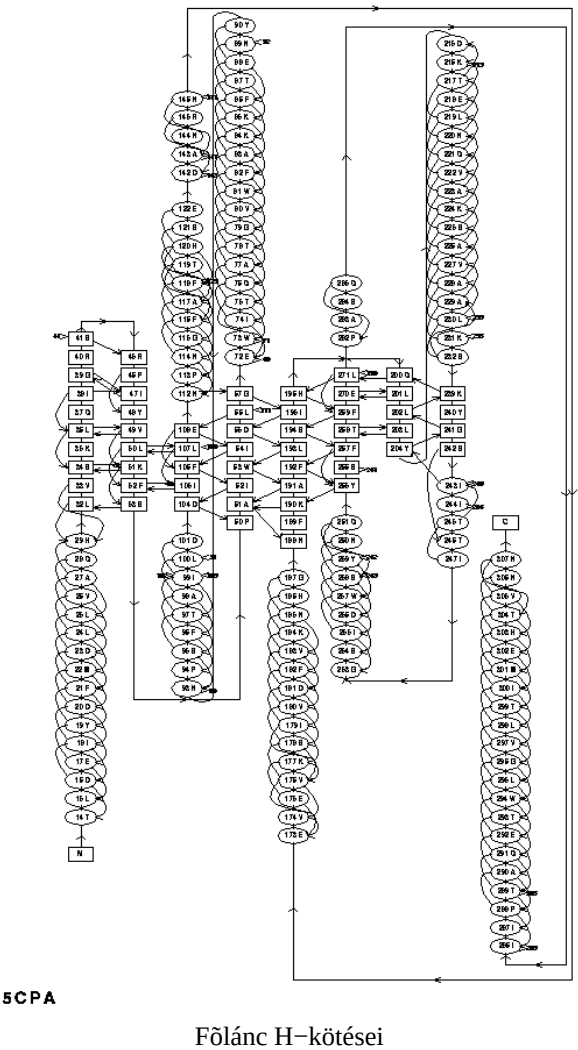
Másodlagos szerkezet

A meglévő atomi térszerkezet alapján hogyan definiáljuk a benne lévő másodlagos szerkezeti elemeket?

- Másodlagos szerk. definiálható a fi, pszi szögek alapján is, de ez nem megbízható
- Bevált: a hidrogénkötési mintázat alapján (pl. hélixek: $i \rightarrow i+4$ H-kötések, stb.)
- Standard módszer: **DSSP** program (és adatbázis). [Példa](#)
- Kódok: H: Hélix, E: Béta-szál, B: izolált H-kötés, S: görbület, G: 3–10 hélix, stb.

Szerkezeti motívumok

[PROMOTIF](#) program és adatbázis.



5cpa_helix_tab1.ps

Helices: 5cpa

Page 1

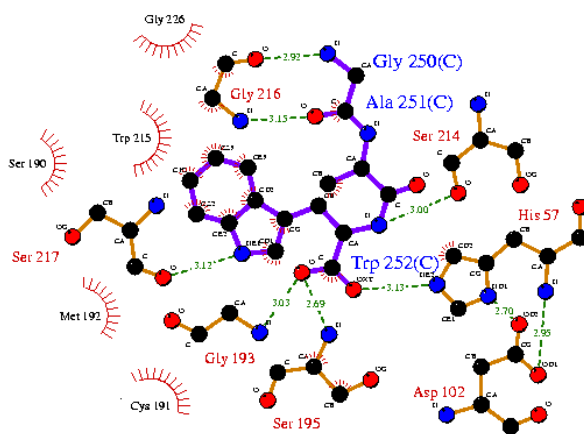
Helix Number	Start Residue	End Residue	Helix Type	No. of Residues	Sequence
1	15	28	α	14	LDEYDFMELLVAQ
2	73	89	α	17	WITQATGVWFANKFTEN
3	94	100	α	7	PSPTAIL
4	113	121	α	9	FNGFAPTHS
5	143	145	3_{10}	3	AND
6	174	186	α	13	VIYKSYDFYKXKH
7	216	231	α	16	KTELNQVAKSAVAALK
8	243	246	α	4	IHT
9	254	260	α	7	SIDWSYN
10	283	285	3_{10}	3	ASQ
11	286	306	α	21	IPTAQETWLGVLTDMEITVN

Hélixek

Residue numbers	Sequence	Turn Type	$\langle i+1 \rangle$		$\langle i+2 \rangle$		$\phi \psi$ Region	i to i+3 Distance
			ϕ	ψ	ϕ	ψ		
3 - 6	STNT	I	-68.9	-14.2	-88.1	-16.0	AA	5.1
4 - 7	TNTF	I	-88.1	-16.0	-97.7	-23.3	AA	5.1
8 - 11	NYAT	I	-78.4	-4.2	-99.3	19.7	AA	6.1
29 - 32	HPEL	I	-67.0	-25.9	-77.0	-10.9	AA	5.5
30 - 33	PELV	IV	-77.0	-10.9	-121.1	-35.0	Aa	5.5
41 - 44	SYEG	I	-53.1	-40.4	-97.8	16.0	AA	4.8
56 - 59	GSNR	IV	-66.4	-105.3	-131.1	79.7	aB	5.9
67 - 70	GIHS	VIII	-59.1	-34.5	-98.8	117.3	AP	5.3
69 - 72	HSRE	I	-66.6	-31.1	-74.1	-12.8	AA	5.9
70 - 73	SREW	IV	-74.1	-12.8	-82.7	65.4	AP	6.8
89 - 92	NYGQ	II	-72.9	122.4	75.4	-1.8	PL	5.0
90 - 93	YGQN	IV	75.4	-1.8	-101.8	-44.6	La	6.5
91 - 94	GQNP	IV	-101.8	-44.6	-103.4	118.0	aB	6.7
108 - 111	EIVT	VIII	-77.6	-38.8	-123.9	91.9	AB	5.9
110 - 113	VTNP	VIII	-67.1	-32.2	-128.9	81.0	AB	5.5
123 - 126	NRLW	I	-59.2	-32.5	-96.0	20.1	Aa	5.6
133 - 136	TSSS	IV	129.2	-126.5	-111.3	42.2	a	6.6
148 - 151	DAGF	IV	-150.0	85.4	64.1	34.3	BL	5.2
150 - 153	GFGK	II	-51.9	133.4	77.7	-3.3	PL	5.6
153 - 156	KAGA	II	-60.3	147.2	108.2	16.8	PG	6.7
159 - 162	SPCS	I	-54.5	-38.4	-72.0	-14.6	AA	5.4
162 - 165	SETY	I	-67.2	-21.0	-112.3	28.8	Aa	5.0
169 - 172	YANS	II	-58.4	131.3	65.0	21.7	PL	5.4
206 - 209	YGYT	I	-92.5	-35.1	-90.8	-20.7	AA	5.8
213 - 216	IPDK	I	-59.5	-23.2	-100.7	21.2	AA	5.4
232 - 235	SLYG	IV	-88.2	-49.6	-130.0	0.9	Aa	5.9
263 - 266	IKYS	IV	-68.5	-40.6	-91.4	75.1	AB	6.4
273 - 276	DTGR	IV	-104.4	7.8	136.1	-13.6	A	6.7
275 - 278	GRYG	I	-54.0	-50.2	-113.0	-25.8	AA	4.5
277 - 280	YGFL	II'	70.1	-133.3	-69.0	-21.5	EA	5.4

Béta turnök

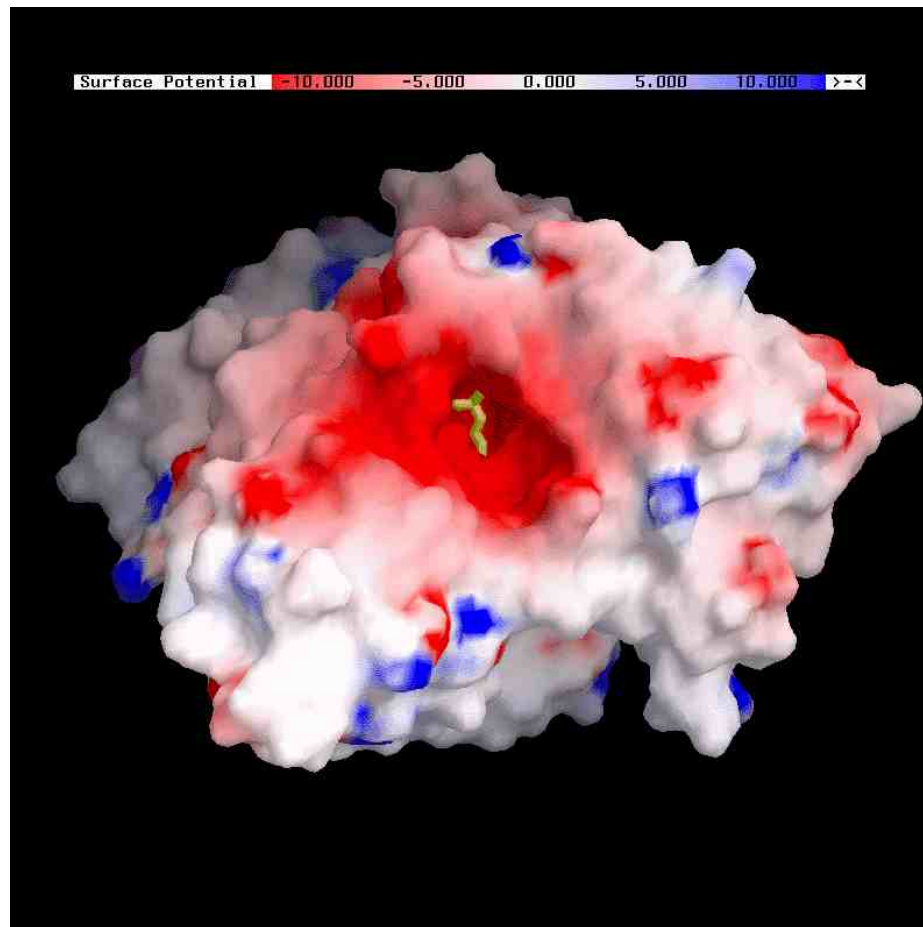
Kölcsönhatás ligandumokkal

Vizualizálható: [LIGPLOT](#)

H-kötéseket és hidrofób felszíneket mutatja

Töltésviszonyok

- Poisson–Boltzmann módszerrel számítható az elektrosztatikus potenciál a fehérje felszínén és környezetében: [DELPHI](#) program. Megjelenítés: GRASP program (nem ingyenesek).

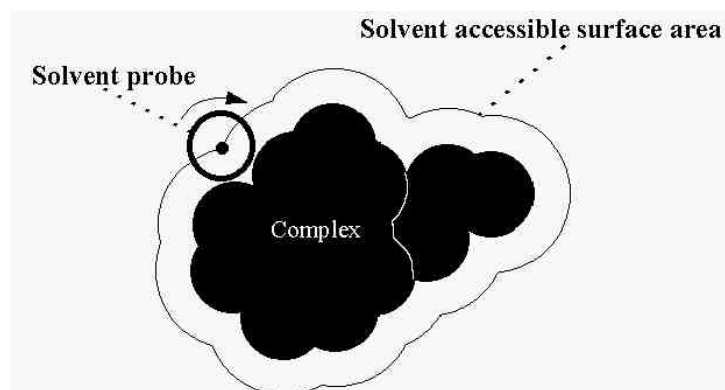


acetilkolin-észteráz

Szubsztrát közelében a fókuszáló hatás, stb. leírható.

Felszínek, üregek

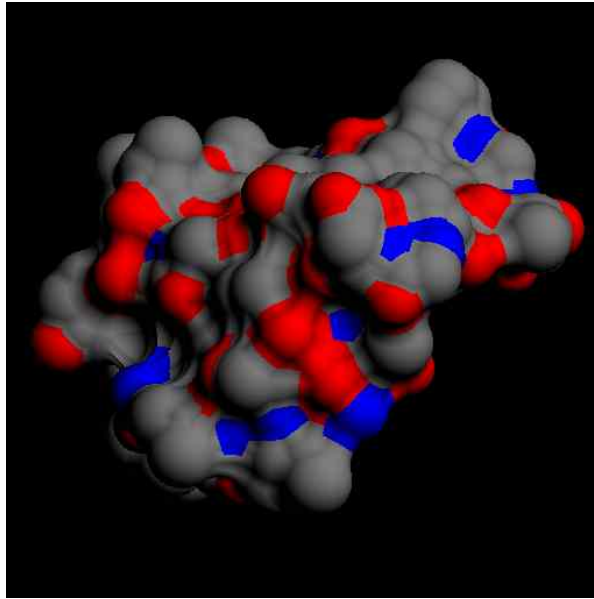
- A felszín meghatározása: Víz molekula (1,4 angström sugarú gömbbel modellezve) végiggördítése a felszínen



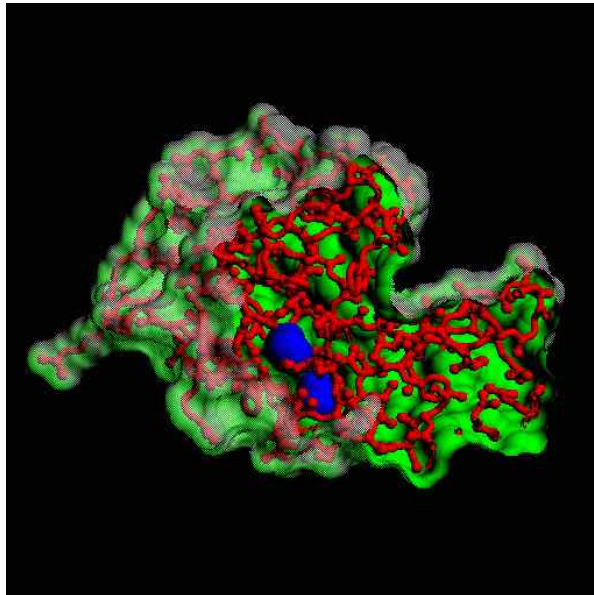
Hozzáférhető felszín: a vízmolekula közepe által leírt felszín

Molekuláris felszín: a vízmolekula felülete által leírt felszín

- Standard program: [Molecular Surface Package](#) (Connolly) (nem ingyenes; számos ingyenes program van, amelyek rosszabbak)



Az apoláros, pozitív, és negatív töltésű felszínrészek más-más színnel jelölve



Kék színnel jelöltük a fehérje belsejében lévő üregeket.
