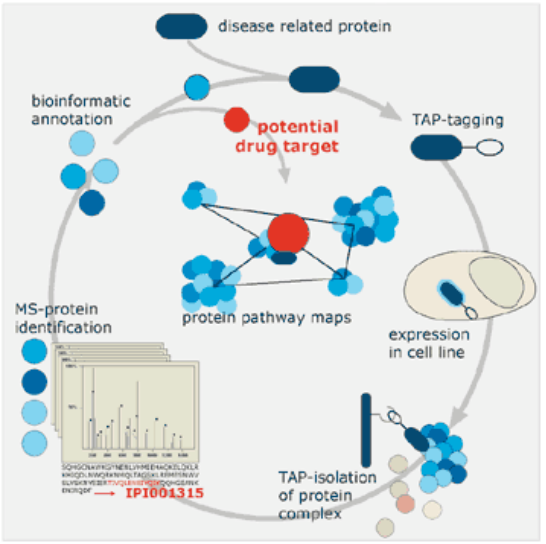
Softwarewerkzeuge der Bioinformatik

Inhalt dieser Veranstaltung: Softwarewerkzeuge kennenlernen für

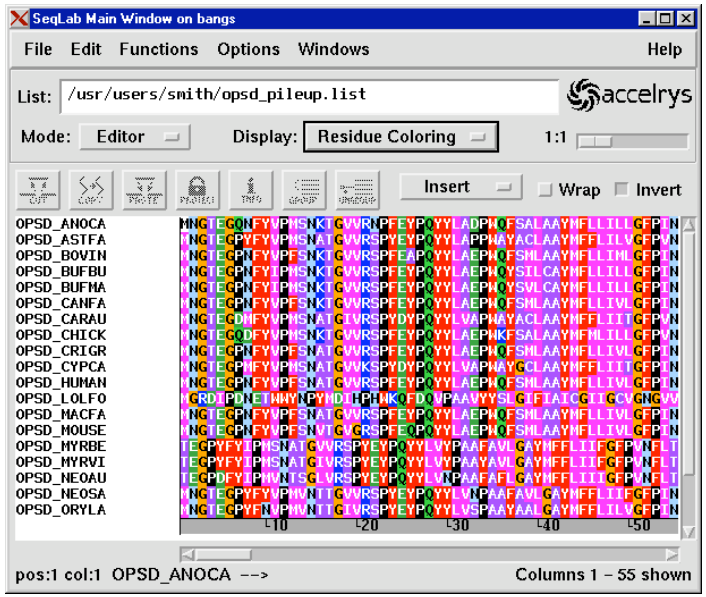
I Sequenzanalyse

II Analyse von Proteinstruktur und Ligandenbindung

III Zell- bzw. Netzwerksimulationen



www.cellzome.com



www.accelrys.com

„Lernziele“

Lerne **aktuelle** und **bewährte Programme** und **Datenbanken** der Bioinformatik kennen und erfolgreich einzusetzen um

- „Hands-On“ mit Web-Tools arbeiten, mit denen man bioinformatische Fragen bearbeiten kann

- zu wissen, was auf dem Markt ist („das Rad nicht zweimal erfinden“)

- ein Gefühl dafür zu bekommen, wie erfolgreiche Softwareprodukte aussehen (sollen)

- 3 Mini-Forschungsprojekte zu bearbeiten (Bioinformatiker/Biotechnologen)

Organisatorisches

Jede Woche Vorlesung — Donnerstag 10.15 – 12.00 Uhr

Seminarraum 007, Geb. E 2 1 — Dozent: Prof. Helms

Die Teilnahme an der Vorlesung ist nicht obligatorisch, jedoch die Teilnahme an der Übung.

Übungen „**hands-on**“ Beginn heute am 22.10:

Donnerstag, 14:00 Uhr – 16:00 Uhr, CIP-Pool E 2 1 CIP.

Verantwortliche Betreuer der Übungen

Sequenz-Analyse	Kerstin Reuter
Proteinstruktur	Dr. Michael Hutter
Zellsimulationen	Daria Gaidar

Organisatorisches

Jeder Teilnehmer an den Übungen benötigt einen Rechneraccount für den CIP-Pool.

Biotechnologen: bitte in Liste eintragen

4. Pflichten der Benutzer

Der Benutzer verpflichtet sich,
a) die bereitgestellten Betriebsmittel sorgfältig zu benutzen;
b) das Passwort des ihm zugeteilten Benutzerkennzeichens geheim zu halten ...;
...
d) alles zu unterlassen, was den ordnungsgemäßen Ablauf der Anlage stört;
e) in den Arbeitsräumen sich so zu verhalten, dass andere Benutzer nicht gestört werden;
f) Störungen ... zu melden und diese nicht auszunutzen;
g) in den Räumen ... sowie bei Inanspruchnahme seiner Geräte ... den Weisungen des Personals des Anlagenbetreibers Folge zu leisten;
...
l) lizensierte Software nur nach Absprache mit dem jeweiligen BfR einzuspielen und zu verwenden;
m) von der Fak6 oder der Universität des Saarlandes bereitgestellte Software, Dokumentationen oder Daten weder zu kopieren noch an Dritte weiterzugeben, sofern dies nicht ausdrücklich erlaubt ist, noch zu anderen als den erlaubten Zwecken zu verwenden,

Zugang zum CIP-Pool während der Übungsstunden.

Organisatorisches: Scheinvergabe
B.Sc. Bioinformatik und Biotechnologie M.Sc.

- Bewertung: Vorlesung zählt 2V + 2P = 9 Leistungspunkte

- Curriculum: Pflichtvorlesung für die Vertiefung „Bioinformatics“

- kann natürlich auch für CMB-Bachelor eingebracht werden

- Wahlfach Pharmazie/Diplom

- Pflichtvorlesung für bestimmte Studenten des M.Sc. Biotechnologie

Drei Mini-Projekte werden etwa alle 4 Wochen ausgegeben. Diese sind innerhalb von 2 Wochen in Teams mit 2-3 Studenten zu bearbeiten und durch einen mindestens 5-seitigen Praktikumsbericht zu dokumentieren.

Jeder Student muss mindestens zwei der drei Mini-Projekte mit einer Note von 4 und besser bestehen.

Organisatorisches: Scheinvergabe
B.Sc. Bioinformatik und Biotechnologie M.Sc.

Voraussetzung für die Teilnahme an der Abschlussklausur ist das Erreichen von mindestens 50 % der maximalen Punkte aus den drei Praktikumsberichten.

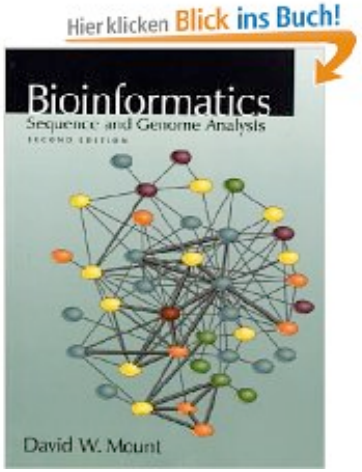
Die Veranstaltung gilt als bestanden, wenn in der abschließenden 120-minütigen Klausur über die Inhalte der Vorlesung, der Übungen und der Minipraktika mindestens die Note 4 erreicht wurde.

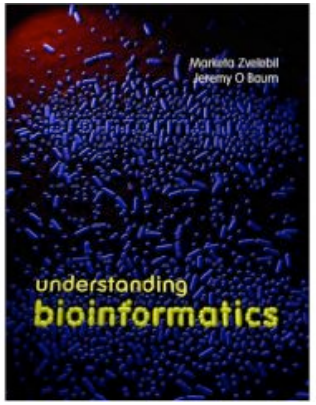
Für die Note des Scheins zählt das bessere Ergebnis entweder ausschließlich aus der abschließenden Klausur oder der Kombination des Durchschnitts der benoteten Praktika und der Note der Abschlussklausur, die jeweils zu 50 % gewichtet werden.

Bei Nichtbestehen der Klausur besteht die Möglichkeit einer schriftlichen oder mündlichen **Nachprüfung**. Diese findet im allgemeinen zu Beginn des darauffolgenden Semesters statt.

Literatur

David Mount
Bioinformatics
70€





Marketa Zvelebil & Jeremil O. Baum
Understanding bioinformatics, 96€

Zu empfehlen ist ebenfalls:
Vorlesungsskript aus 2010 (176 Seiten)
kann von http://gepard.bioinformatik.uni-saarland.de/teaching/ss-2011/sww-bioinformatik/script/SW10-Skript.pdf
heruntergeladen werden.

Vorlesungsfolien ebenfalls auf
http://gepard.bioinformatik.uni-saarland.de/teaching/ws-14-15/sww-bioinformatik-ws1415

Übersicht über Vorlesungsinhalt

I Sequenz

2 Einführung, Datenbanken

3 Paarweises Sequenzalignment

4 Multiples Sequenzalignments; Phylogenie

5 Genvorhersage, Motivsuche

II Proteinstruktur

5. Proteinstruktur; Sekundärstruktur

6. Homologie-Modellierung

III Zellsimulationen/Netzwerke

7 Genexpression – Microarrays

8 Funktionsannotation (Gene Ontology)

9 Systembiologie: metabolische Pfade; Protein-Interaktion, Genregulationsnetzwerke

10 Enzymkinetik – einfache Differentialgleichungen

11 Diffusionssysteme - Virtual Cell

12 Stochastische Effekte

Historische Entwicklung der Bioinformatik

1960‘er Jahre: Entwicklung phylogenetischer Methoden

1960‘er Jahre: Methoden zum Vergleich von DNA- und Proteinsequenzen

1976: erste MD-Simulation eines Proteins

1981: Smith-Waterman Algorithmus **dynamische Programmierung**

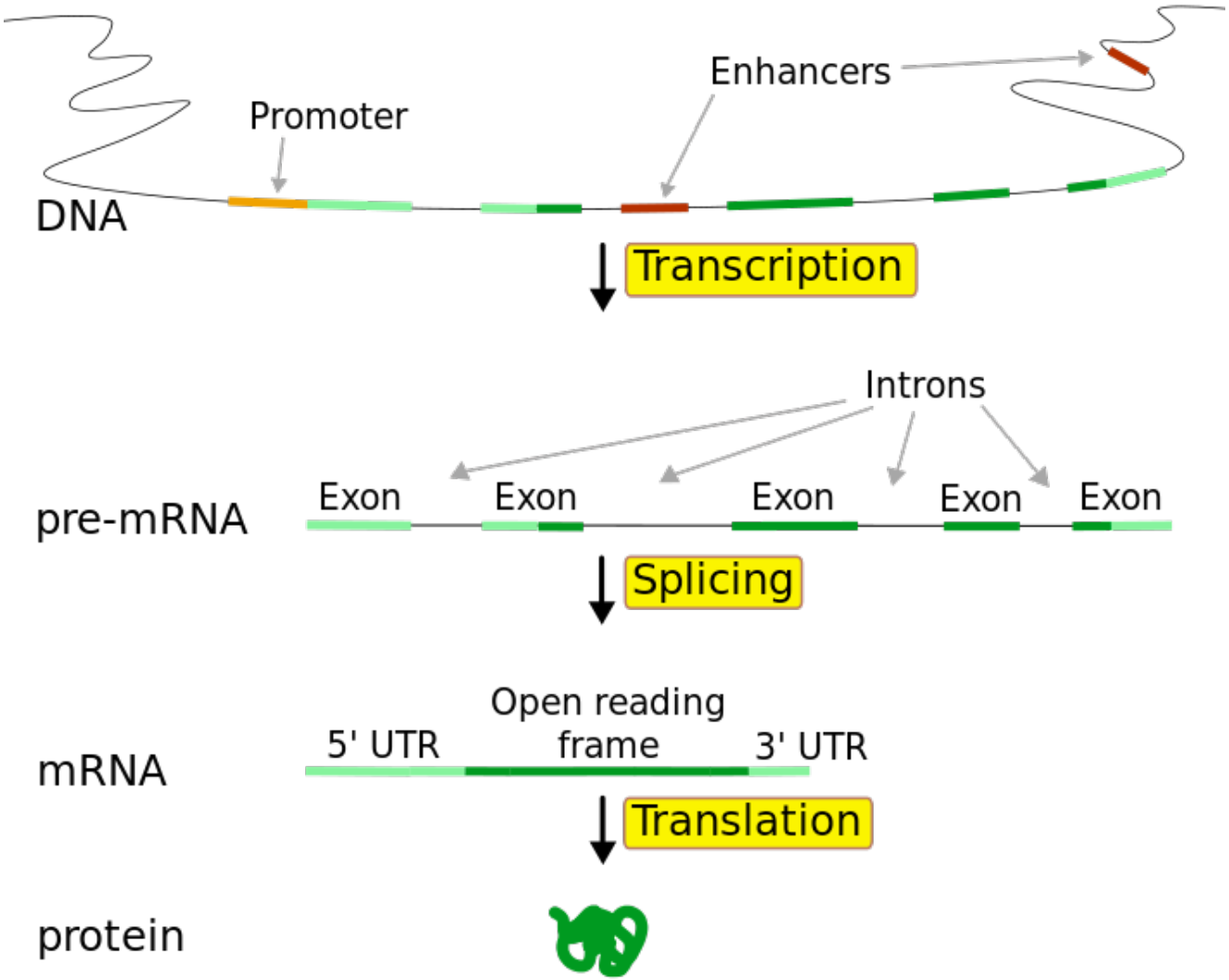
1992: Sekundärstrukturvorhersage mit Neuronalen Netzwerken (PHD)
machine learning

1996: Vergleich von Proteinstrukturen mit DALI

2000: Durchbruch bei Sequenz-Assemblierung aus Shotgun-Daten (E. Myers)

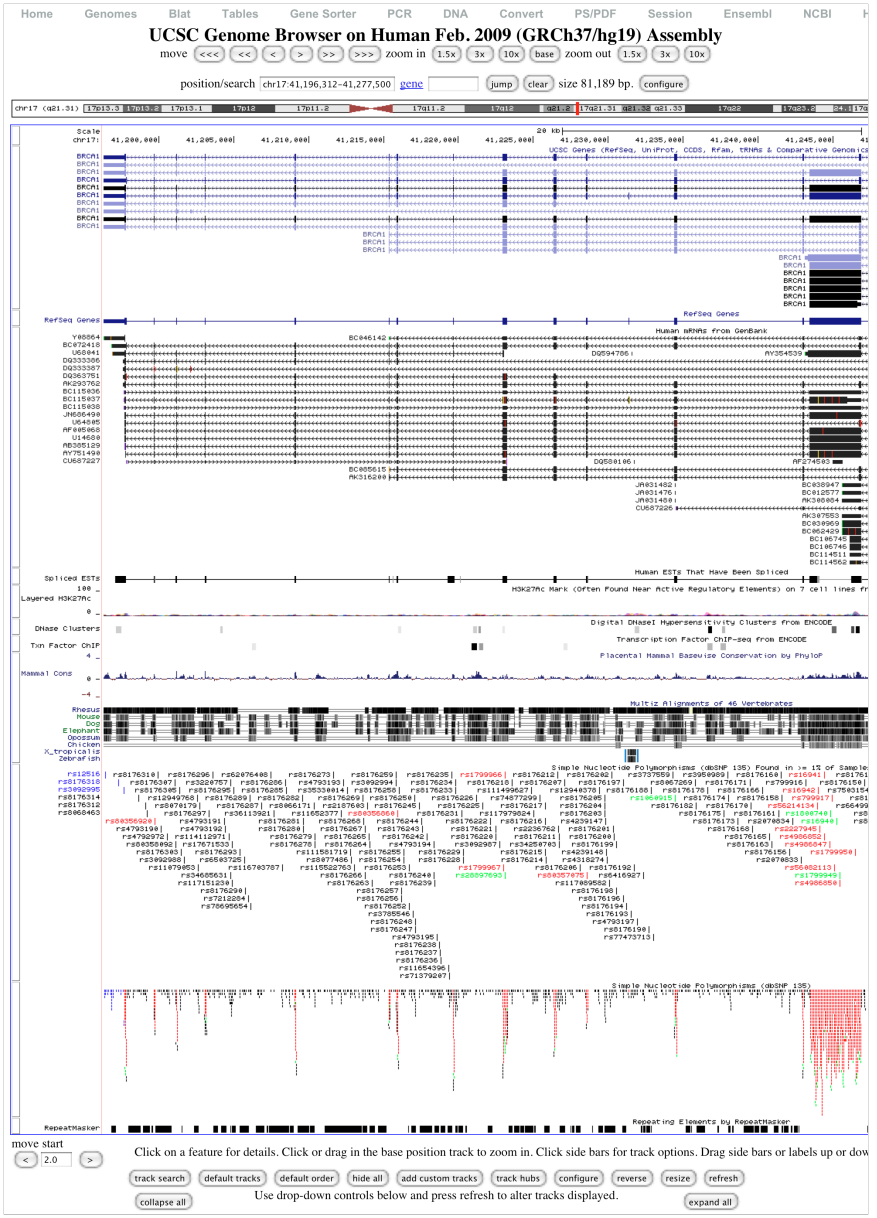
2012: ENCODE-Projekt

Die Struktur von Genen



www.wikipedia.org

UCSC Genome Browser

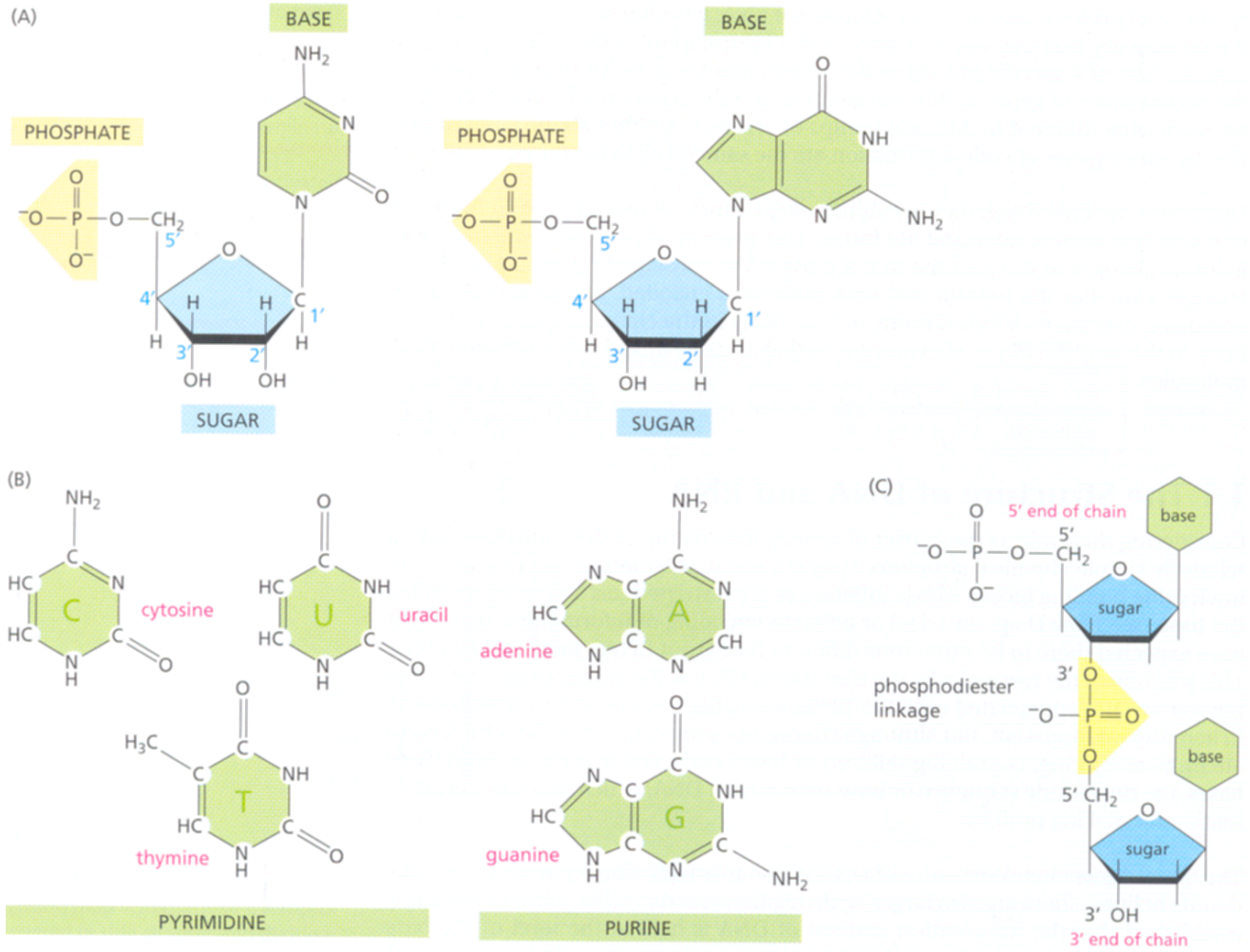


Es gibt verschiedene Assemblies

hg17, hg18, hg19 für das *humane Genom*

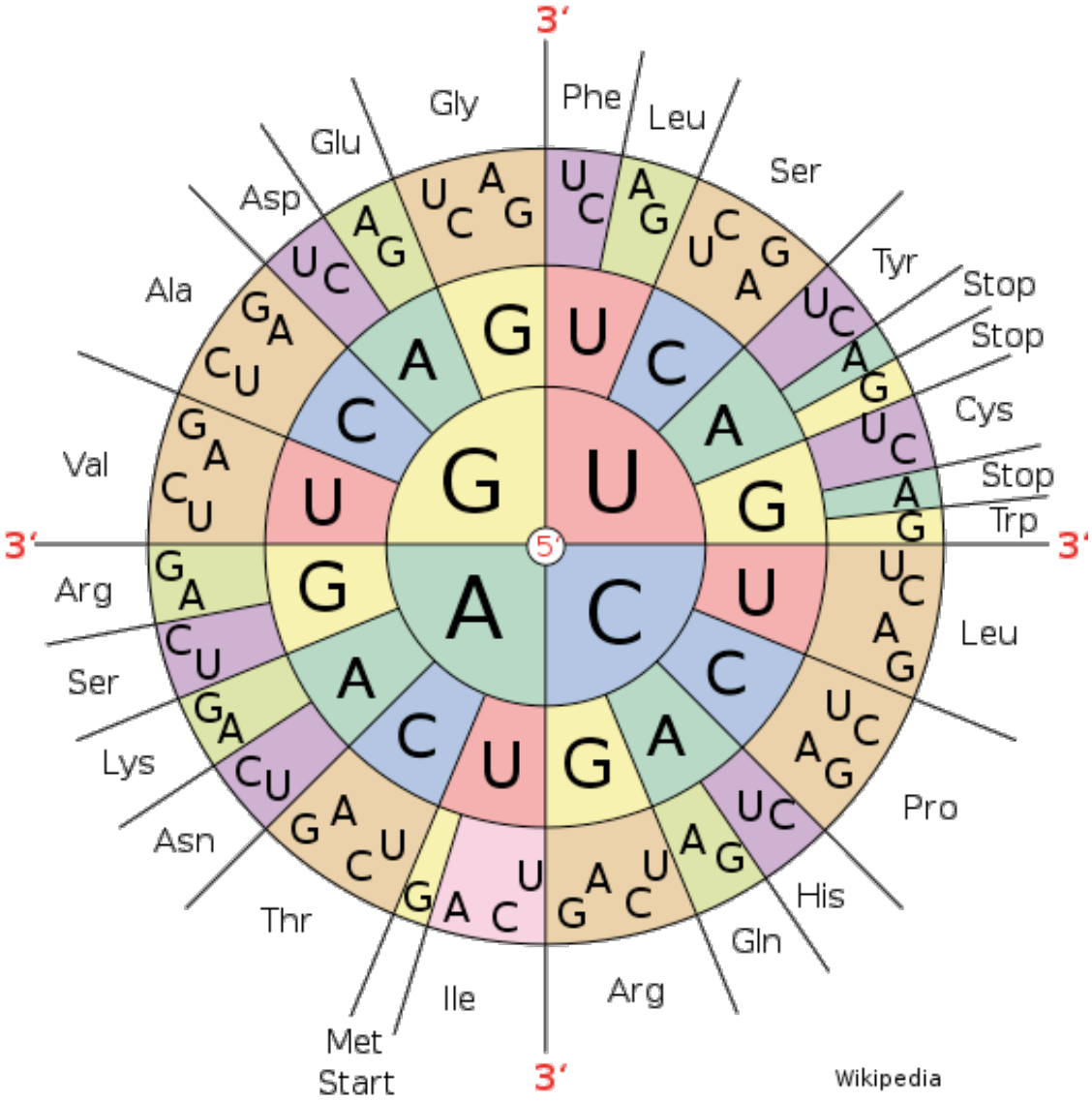
http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway

Die vier Nukleotidbasen



Zvelebil (2008)

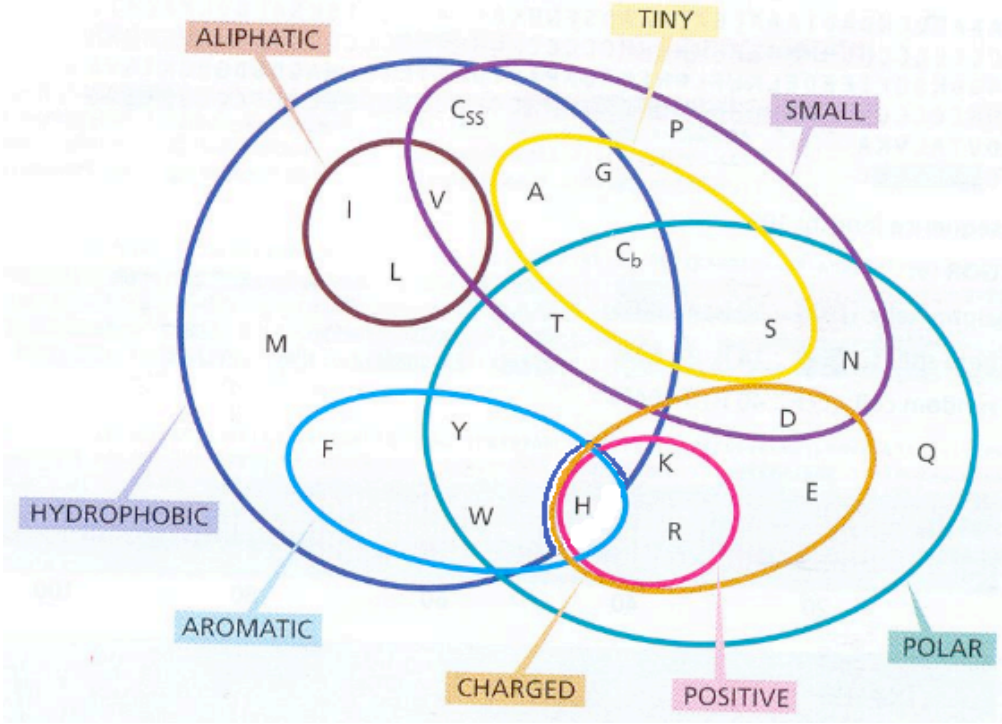
Codonsonne



Zvelebil (2008)

Eigenschaften der Aminosäuren

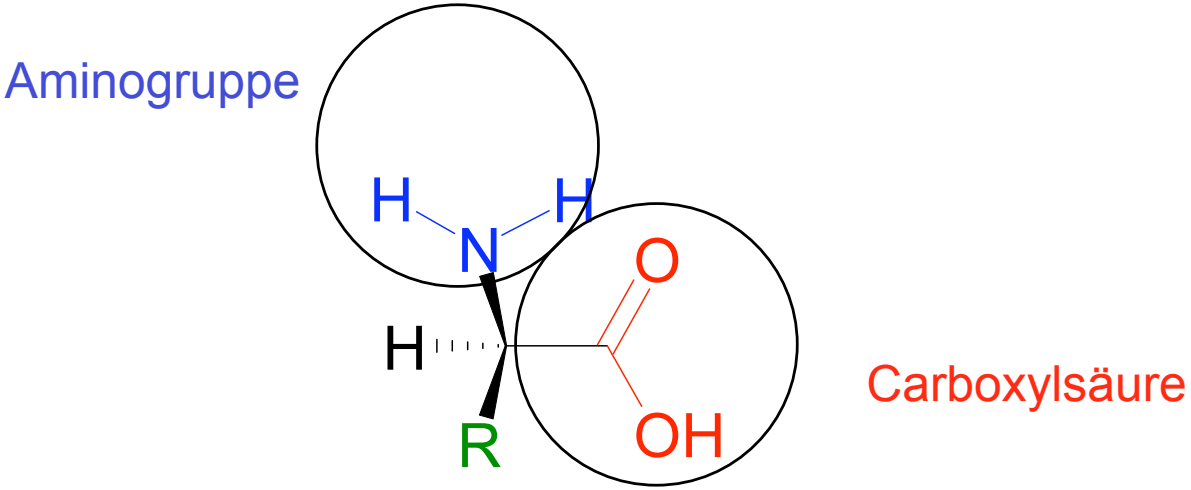
Aminosäuren unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften.



Q: müssen Bioinformatiker die Eigenschaften von Aminosäuren kennen?

Einleitung: Aminosäuren

Aminosäuren sind die **Bausteine** von Proteinen:



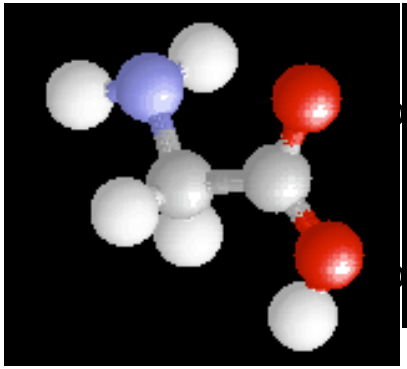
Aminosäuren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer

- Größe
- elektrischen Ladung
- Polarität
- Form und Steifigkeit

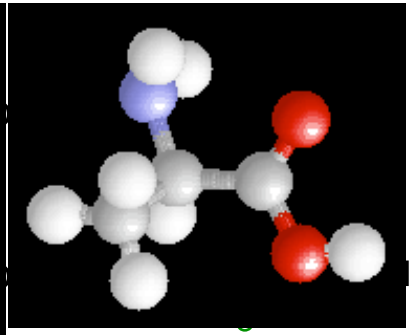
Einleitung: hydrophobe Aminosäuren

Proteine sind aus 20 verschiedenen natürlichen Aminosäuren aufgebaut

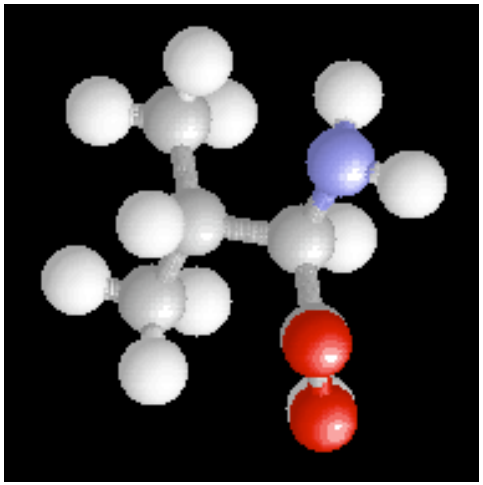
5 sind hydrophob.
Sie sind vor allem
Im Proteininneren.



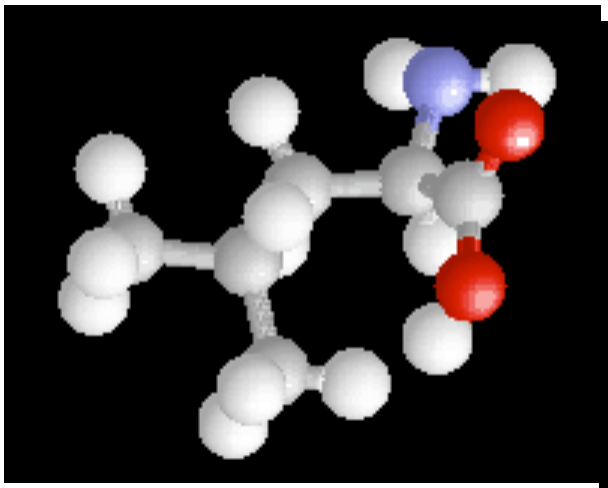
Glycine



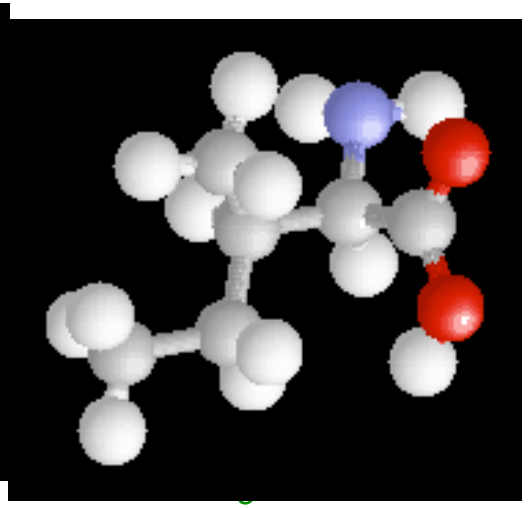
Alanine



Valine



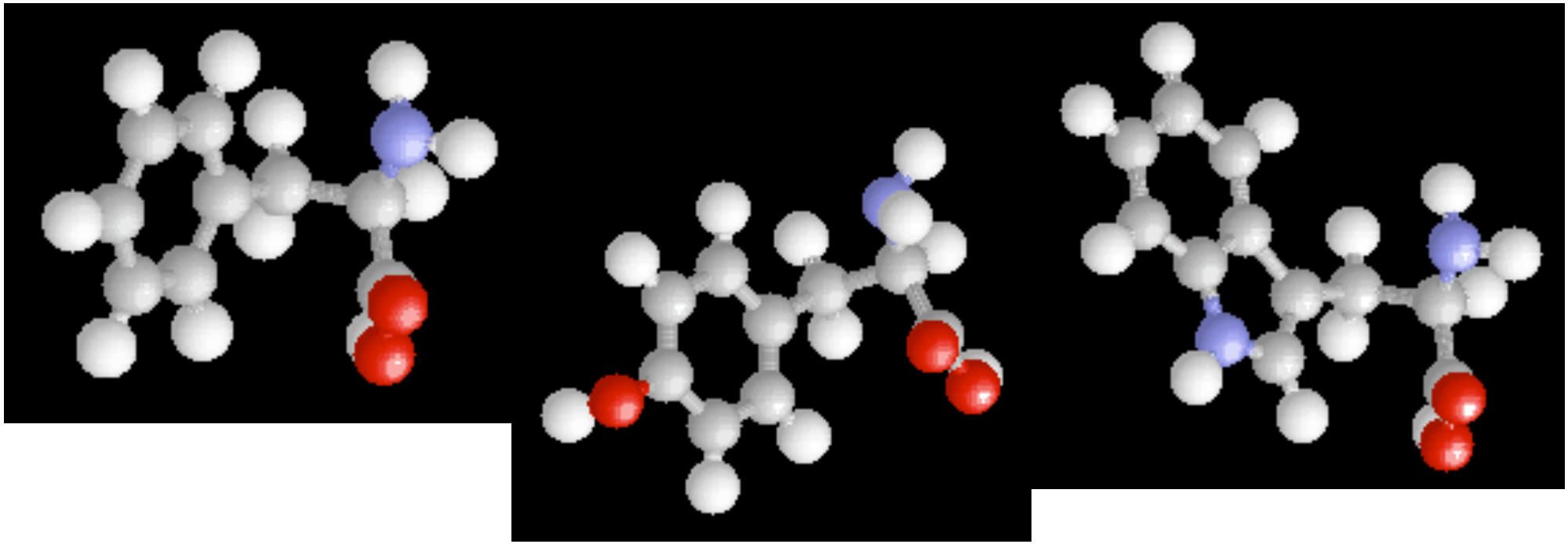
Leucine



Isoleucine

Einleitung: aromatische Aminosäuren

Es gibt drei voluminöse aromatische Aminosäuren. Tyrosin und Tryptophan liegen bei Membranproteinen vor allem in der Interface-region.



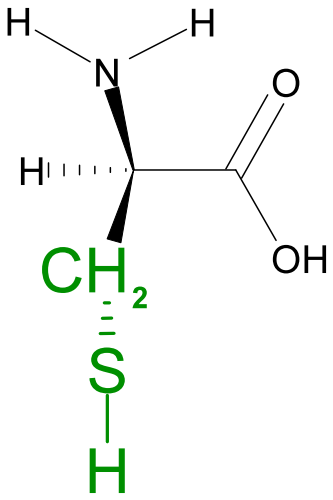
Phenylalanin Tyrosin Tryptophan

Einleitung: Aminosäuren

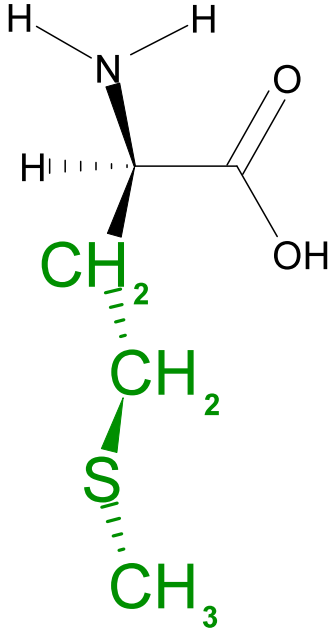
Es gibt 2 Schwefel enthaltende Aminosäuren und das ungewöhnliche Prolin.

Cysteine können Disulfidbrücken bilden.

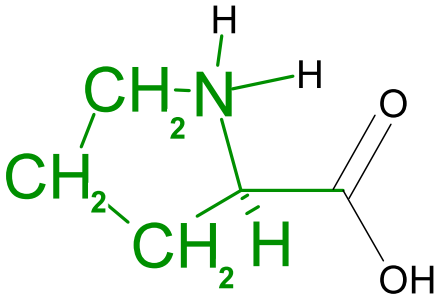
Prolin ist ein “Helixbrecher”.



Cystein



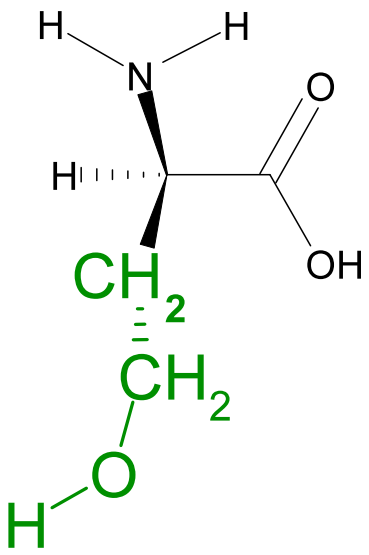
Methionin



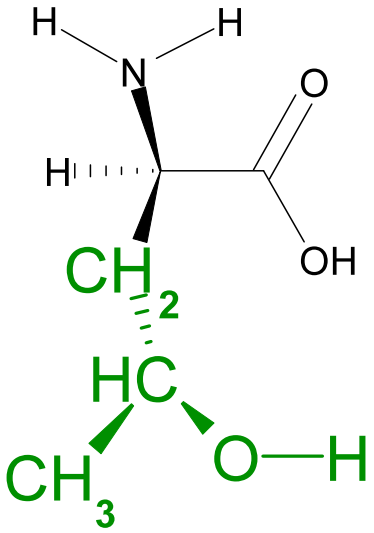
Prolin

Einleitung: Aminosäuren

Es gibt zwei Aminosäuren mit terminalen polaren Hydroxlgruppen:



Serin

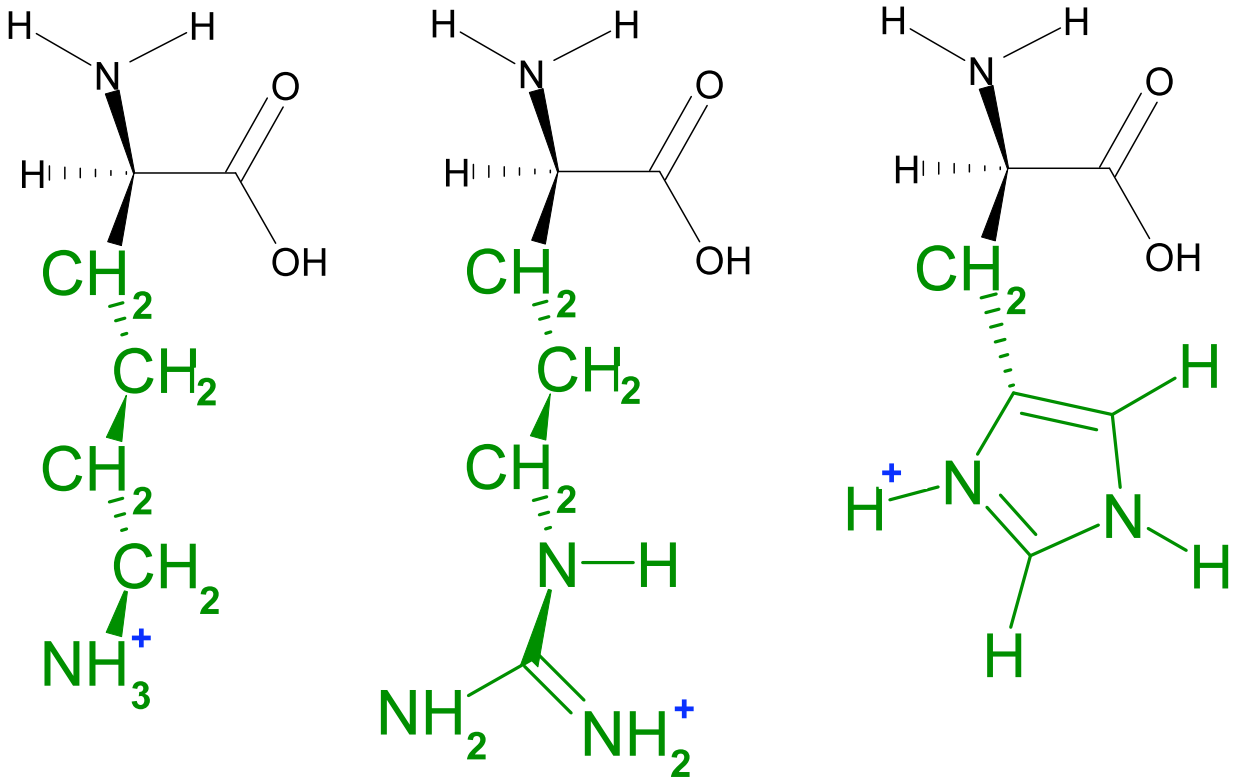


Threonin

Einleitung: Aminosäuren

Es gibt 3 positiv geladene Aminosäuren. Sie liegen vor allem auf der Proteinoberflächen und in aktiven Zentren.

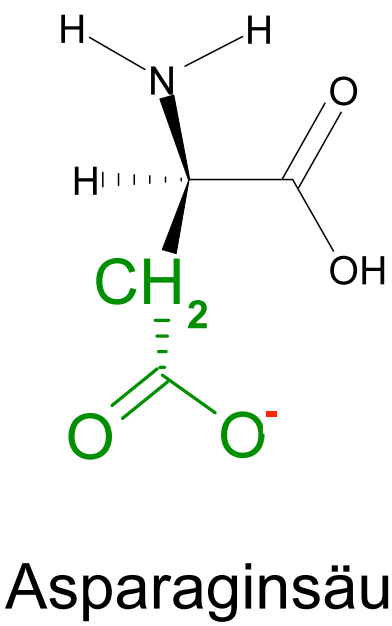
Thermophile Organismen besitzen besonders viele Ionenpaare auf den Protein-oberflächen.



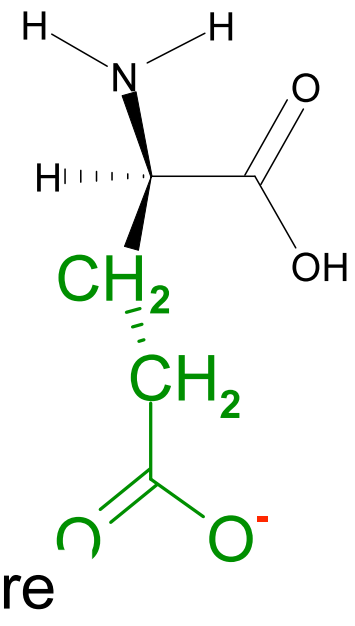
Lysin Arginin Histidin

Einleitung: Aminosäuren

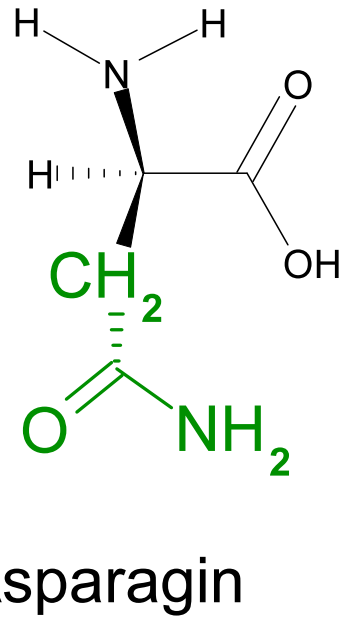
Es gibt 2 negativ geladene Aminosäuren und ihre zwei neutralen Analoga.
Asp und Glu haben pK_a Werte von 2.8. Das heisst, erst unterhalb von pH=2.8 werden ihre Carboxylgruppe protoniert.



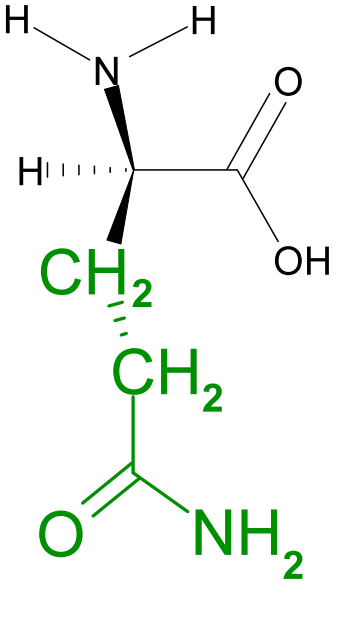
Asparaginsäure



Glutaminsäure



Asparagin



Glutamin

Buchstaben-Code der Aminosäuren

- **Ein**- und **Drei-Buchstaben-Codes** der Aminosäuren

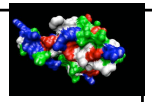
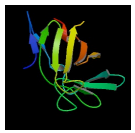
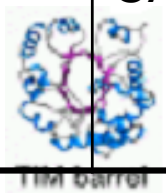
G	Glycin	**Gly**	**P**	Prolin	**Pro**
A	Alanin	**Ala**	**V**	Valin	**Val**
L	Leucin	**Leu**	**I**	Isoleucin	**Ile**
M	Methionin	**Met**	**C**	Cystein	**Cys**
F	Phenylalanin	**Phe**	**Y**	Tyrosin	**Tyr**
W	Tryptophan	**Trp**	**H**	Histidin	**His**
K	Lysin	**Lys**	**R**	Arginin	**Arg**
Q	Glutamin	**Gln**	**N**	Asparagin	**Asn**
E	Glutaminsäure	**Glu**	**D**	Asparaginsäure	**Asp**
S	Serin	**Ser**	**T**	Threonin	**Thr**

Zusätzliche Codes

B	**Asn/Asp**	**Z**	**Gln/Glu**	**X**	Irgendeine Aminosäure

Die Kenntnis dieser Abkürzungen ist essentiell für Sequenzalignments und für Proteinstrukturanalyse!

Datenbanktypen

primär				sekundär				
DNA-/ Nukleotid-Sequenzen 	Protein-/ Aminosäure-Sequenzen 		Protein-, DNA-Strukturen	Protein-/ Aminosäure-Sequenzen			Protein-Strukturen	
GenBank	NCBI Protein Database	Swiss Prot (Uniprot)	PDB 	PROSITE	Prints	Pfam	SCOP 	CATH

- Sequenzinformationen
- zugehörige Annotationen
- Kreuzreferenzen zu anderen Datenbanken

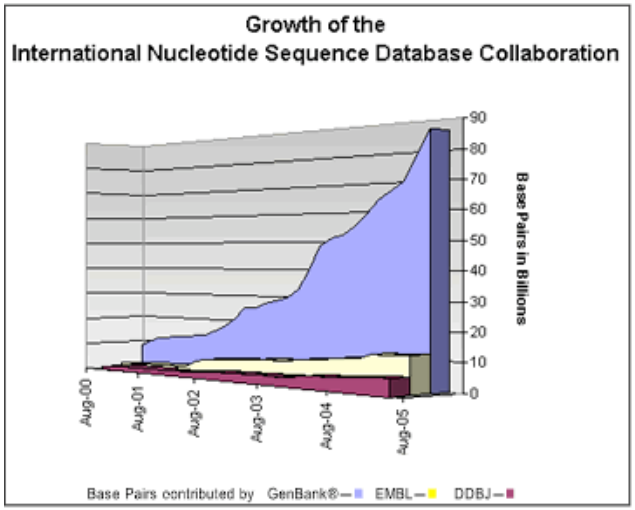
- Analysen auf Basis der primären Datenbanken
- Klassifizierungen nach Ähnlichkeit

Sequenzdaten

• ~174 Mio. **Nukleotidsequenzen**
(Quelle: GenBank *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/*

GenBank/index.html)

~189 Mio. WGS-Nukleotidsequenzen



• 102.720 **3D-Strukturen** von biologischen

Makromolekülen (Proteine, DNA, RNA, …)
(Quelle: RCSB-PDB *http://www.rcsb.org*, 25.08.2014)

RCSB PDB
PROTEIN DATA BANK

Einträge sind teilweise **redundant**,

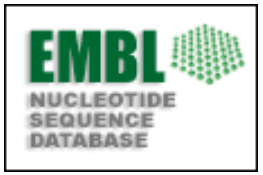
d.h. es gibt mehrere Versionen derselben Sequenz/Struktur

NCBI DNA-Datenbank

National Center for Biotechnology Information
National Library of Medicine National Institutes of Health

GenBank *(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)*

- öffentliche Nukleotid-Sequenzdatenbank
- ~174 Mio. Sequenzeinträge
- fast jeder kann Sequenzen einreichen
- Mindestlänge der eingereichten Sequenzen: 50 bp
- jeder Eintrag bekommt eine eindeutige *Accession Number*
- wird alle 24h gegen EMBL-Bank (EMBL Nucleotid Sequence Database, *http://www.ebi.ac.uk/*) und DDBJ (DNA DataBank of Japan, *http://www.ddbj.nig.ac.jp*) synchronisiert
- redundant



NCBI Protein-Datenbank

NCBI Protein Database *(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)*

- öffentliche, primäre Protein-Sequenzdatenbank
- Zusammenstellung aus den folgenden Protein-Sequenzdatenbanken:
  - UniProtKB
  - PIR (Protein Identification Resources)
  - PDB (Protein Data Bank, Strukturen)
  - Proteintranslationen der GenBank-Datenbank
  - und weiteren
- redundant
- Vorteil: Links zu Original-Datenbanken

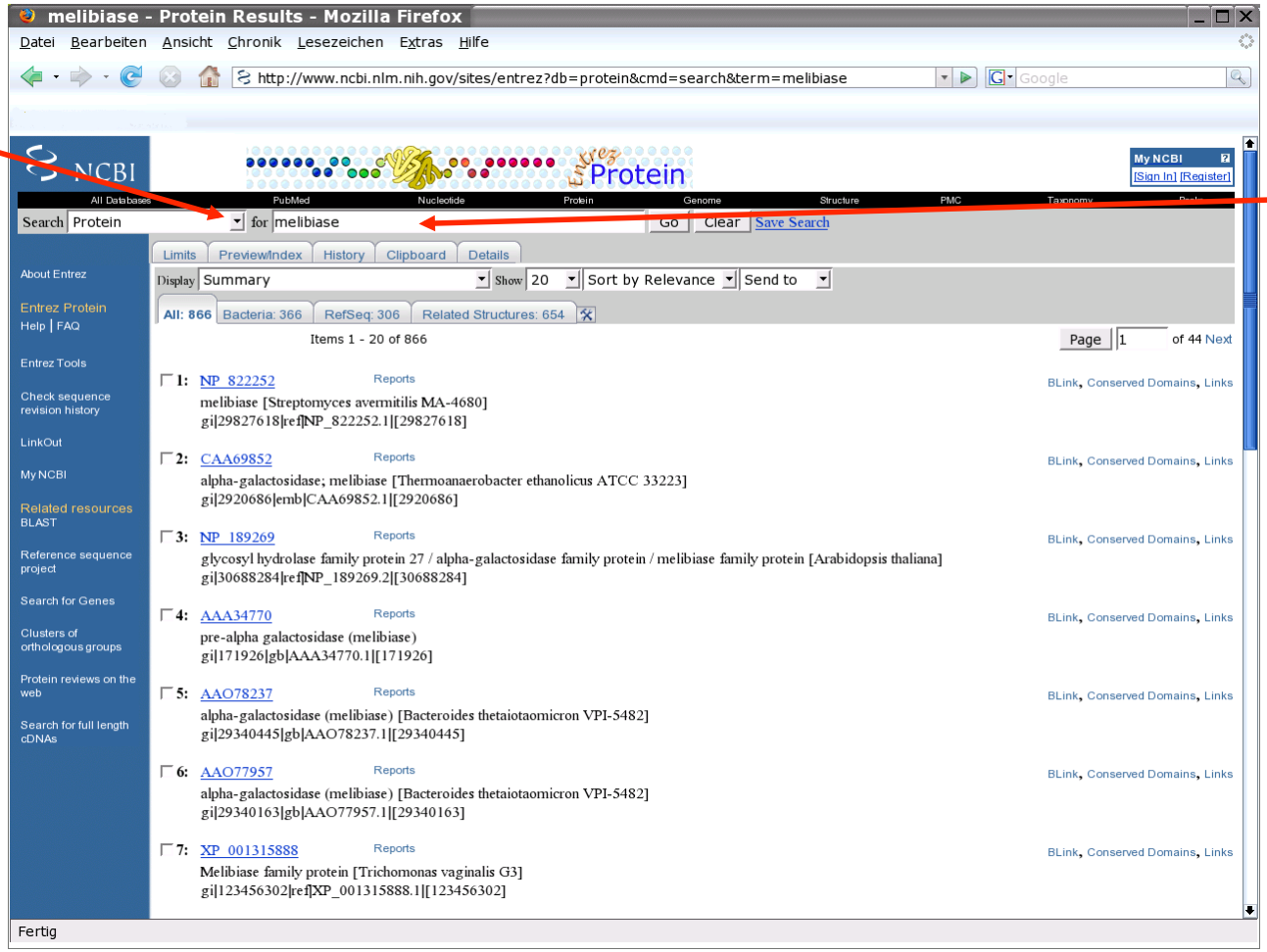
UniProtKB/Swiss-Prot

(http://www.expasy.org/sprot/)

- *Universal Protein Resource Knowledge Base*
- öffentliche, primäre Proteinsequenz-Datenbank
- “nur” 546.000 Einträge (Juli 2014)
- wichtigste Sammlung von Proteinsequenzen:
  - Daten stammen aus der Datenbank TrEMBL (*translated* EMBL)
  - manuell überpüft; manuelle Annotationen von Experten
  - nicht redundant
  - Querverweise zu Funktionsbeschreibung, Domänenstruktur, posttranslationalen Modifikationen und ~60 anderen Datenbanken
- UniProtKB/TrEMBL enthält Einträge, die noch nicht in UniProtKB/Swiss-Prot aufgenommen wurden

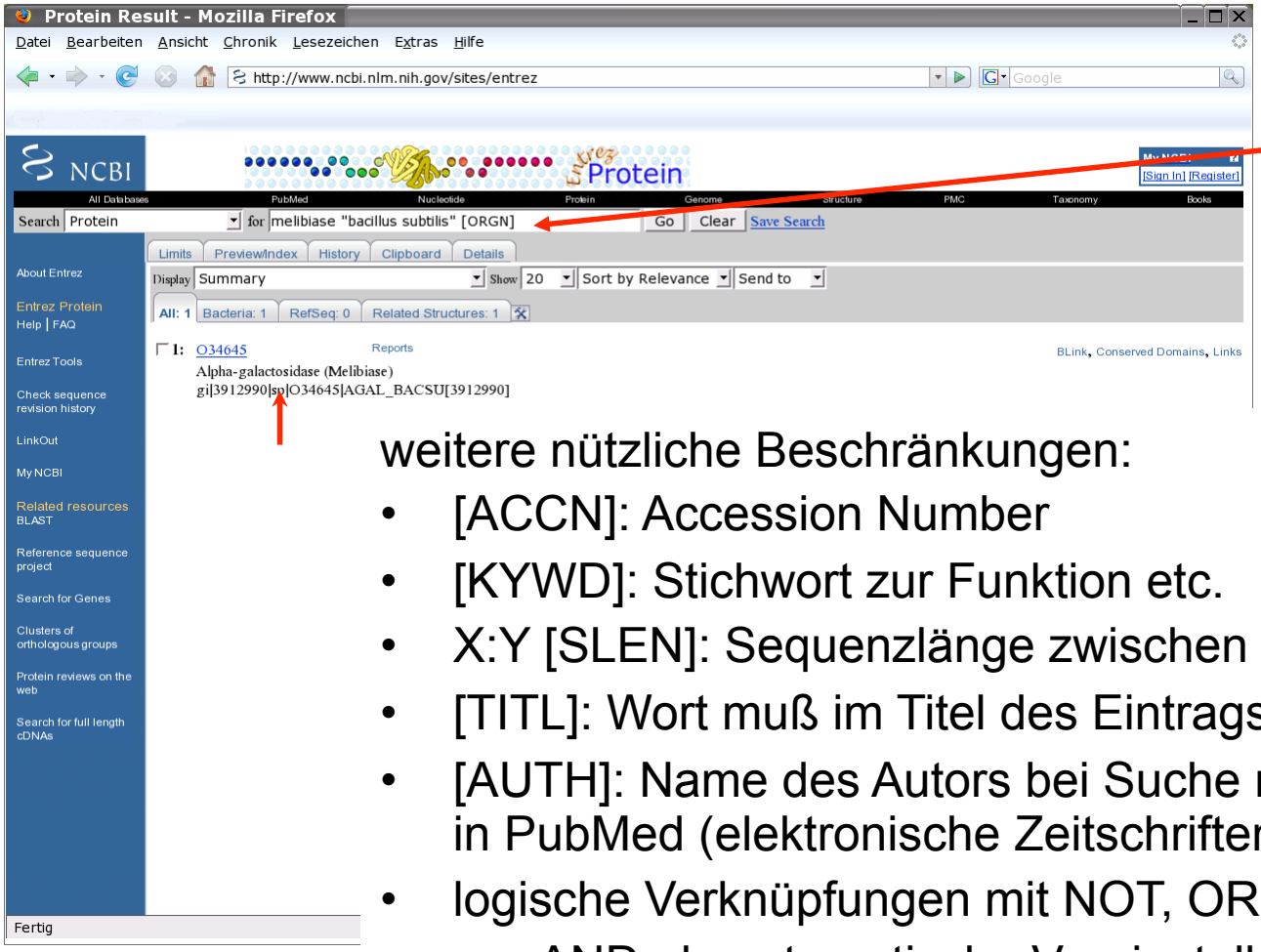
Webinterface: Entrez

Datenbank wählen



Stichwort, hier Name des Proteins

Detaillierte Suche bei Entrez

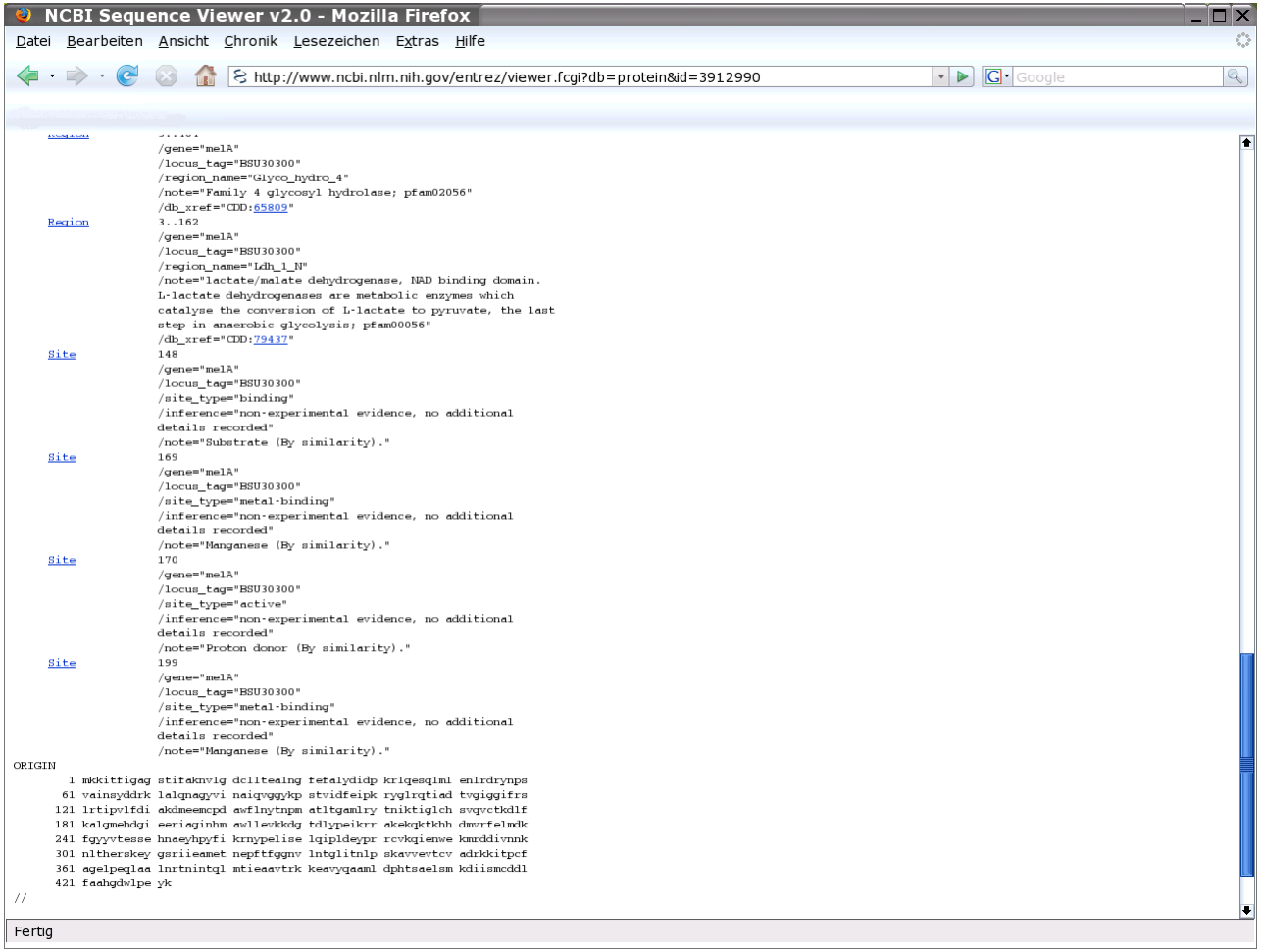


Suche nach dem Protein Melibiase in genau diesem Organismus

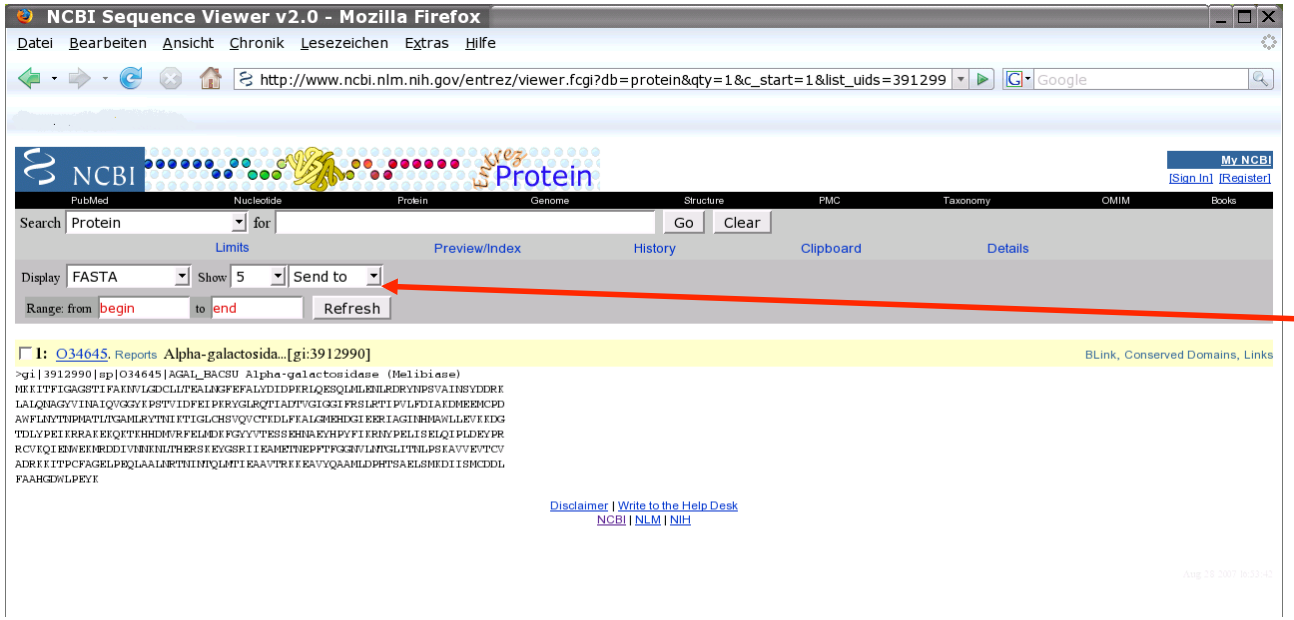
weitere nützliche Beschränkungen:

- [ACCN]: Accession Number
- [KYWD]: Stichwort zur Funktion etc.
- X:Y [SLEN]: Sequenzlänge zwischen X und Y
- [TITL]: Wort muß im Titel des Eintrags stehen
- [AUTH]: Name des Autors bei Suche nach einer Publikation in PubMed (elektronische Zeitschriftenbibliothek)
- logische Verknüpfungen mit NOT, OR
  - AND als automatische Voreinstellung

Eintrag bei NCBI Protein Database



Fasta-Format



Umstellung der Anzeige, Beschränkung auf bestimmten Abschnitt der Sequenz, ...

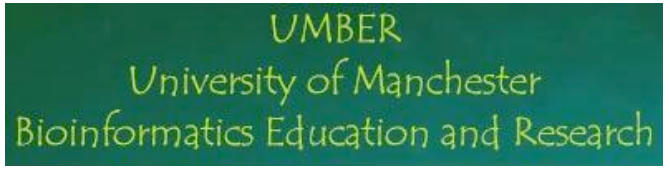
>DNA-Sequenz-Bezeichnung
ACGT

....

>Protein-Sequenz-Bezeichnung
ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY

....

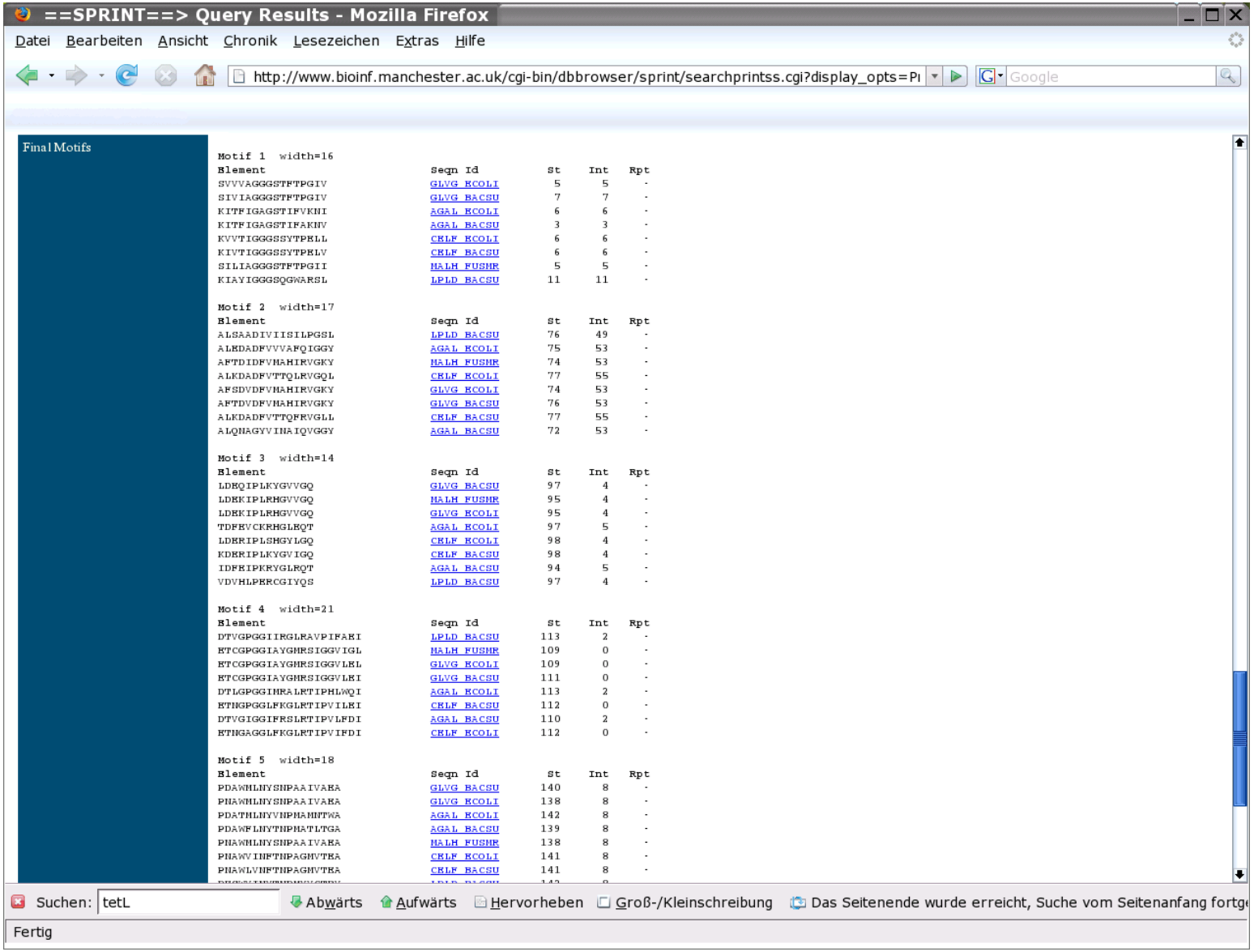
PRINTS



(http://bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/)

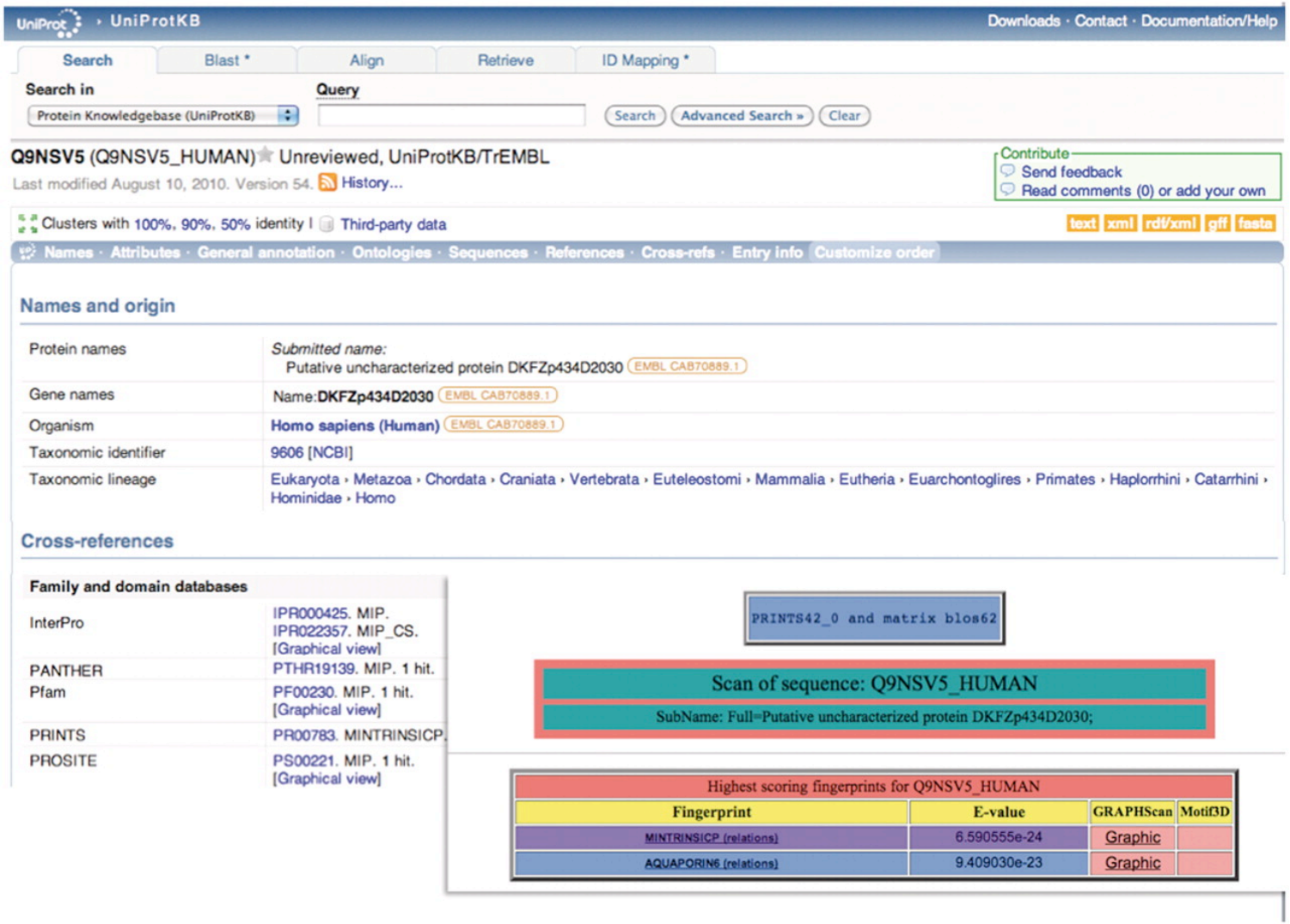
- sekundäre Protein-Datenbank
- 2.156 Einträge und 12.444 Motive (in 2012)
- Fingerabdruck (*fingerprint*): Gruppe von konservierten Motiven
- mehrere funktionelle Bereiche (Faltung, Ligandenbindung, Komplexbildung, …) -> mehrere Sequenzmotive für ein Protein
- Motive aus kurzen lokalen Alignments
  - Abstände zwischen Motiven und Reihenfolge spielen keine Rolle
  - spezifisch für individuelle Proteine
  - keine Zusammenfassung zu gemeinsamem Motiv

Finger-PRINTS



PRINTS - Example

Illustration of a hierarchical PRINTS diagnosis. The UniProtKB/TrEMBL entry Q9NSV5_HUMAN was annotated as putative uncharacterized protein DKFZp434D2030; the family- and domain-database cross-references suggested membership of the major intrinsic protein (MIP) superfamily, but provided no specific family affiliation. The FingerPRINTScan result (inset) diagnoses the sequence both as a member of the MIP superfamily and as an aquaporin 6 subtype.



Attwood et al. Database (2012) 2012 : bas019 doi: 10.1093/database/bas019

Pfam – Protein-Familien-Datenbank

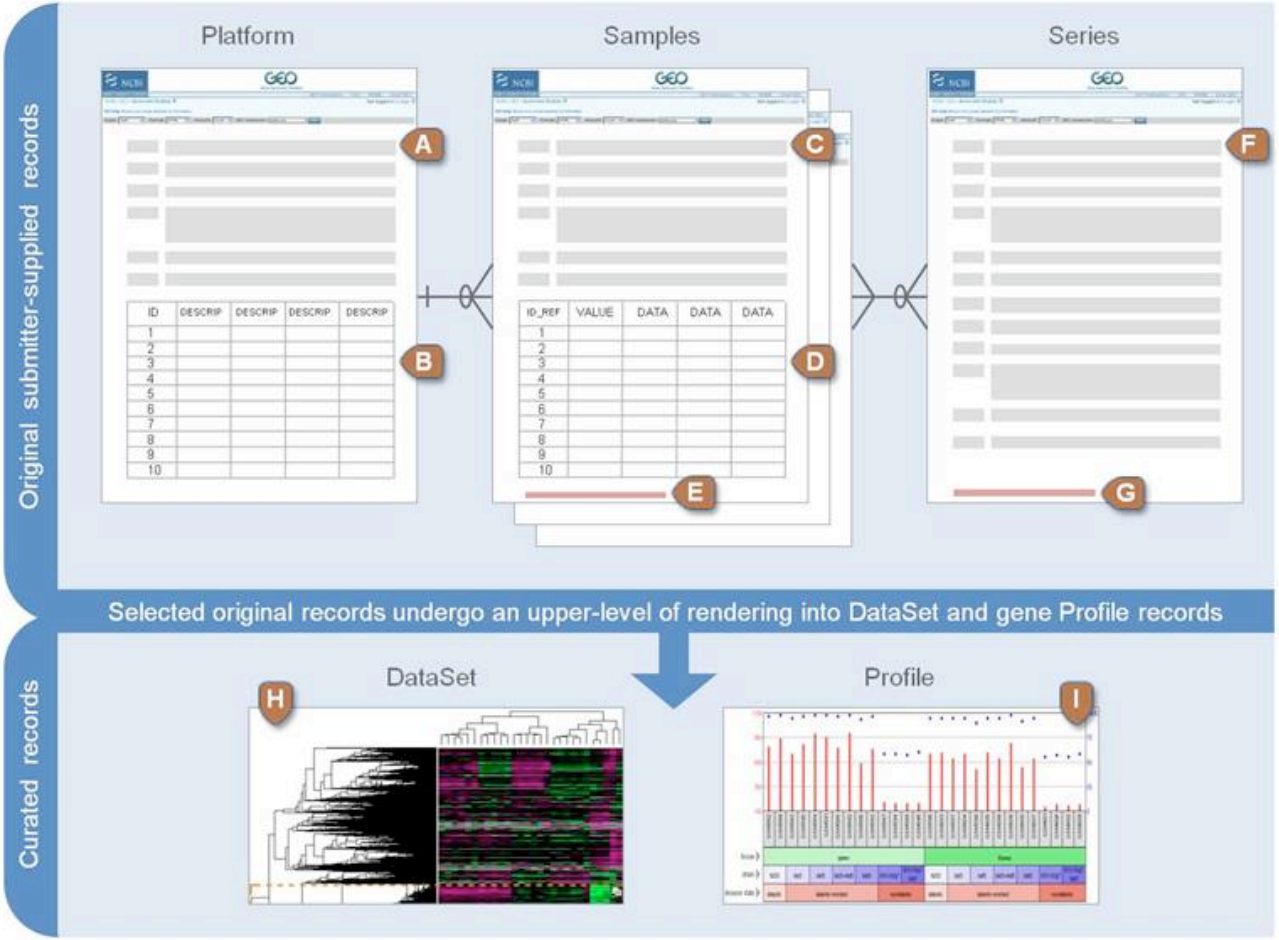
(http://pfam.sanger.ac.uk/)

- sekundäre Protein-Datenbank
- 74% aller Proteinsequenzen haben mindestens einen Pfam-Eintrag
- Profile = funktionell interessante Domänen
- Profil: Auftrittswahrscheinlichkeiten bestimmter Aminosäuren an bestimmten Positionen in Form einer Matrix
- Pfam-A: genau untersuchte Profile aus multiplen Alignments, teilweise manuelle Alignments, >8000 Familien
- Pfam-B: automatisch generierte Profile: mehr Sequenzen, aber weniger präzise

GEO – Gene Expression Omnibus

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)

- Genexpressions-Datensätze
- entweder mit Microarrays oder NGS gemessen



GEO – Gene Expression Omnibus

Cancer Research

Lipid Metabolism Signatures in NASH-Associated HCC—Letter

Sonja M. Kessler, Stephan Laggai, Ahmad Barghash, et al.

Cancer Res Published OnlineFirst April 28, 2014.

Ist die im Arbeitskreis Kiemer in Mäusen mit Leberkrebs (HCC) beobachtete Runterregulation von Elovl6 auch im Mensch relevant?
Ja, dies konnten wir anhand von öffentlich zugänglichen GEO-Daten zeigen.

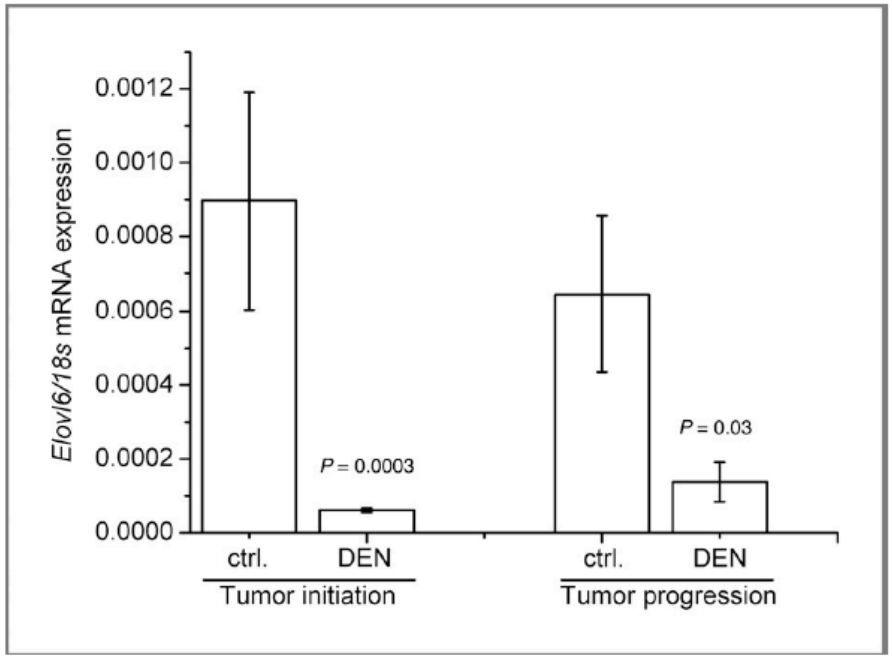


Figure 2. Wild-type mice were treated with the carcinogen DEN at the age of 2 weeks. Livers were analyzed after 24 weeks to assess the tumor initiation state. Analyses in the tumor progression stadium were done after 36 weeks. *Elovl6* mRNA expression as determined by real-time reverse transcriptase PCR with $n = 8–18$ per group. Data were normalized to *18S*. Statistical differences compared with untreated animals of the same age (ctrl.) were calculated by Mann–Whitney *U* test.

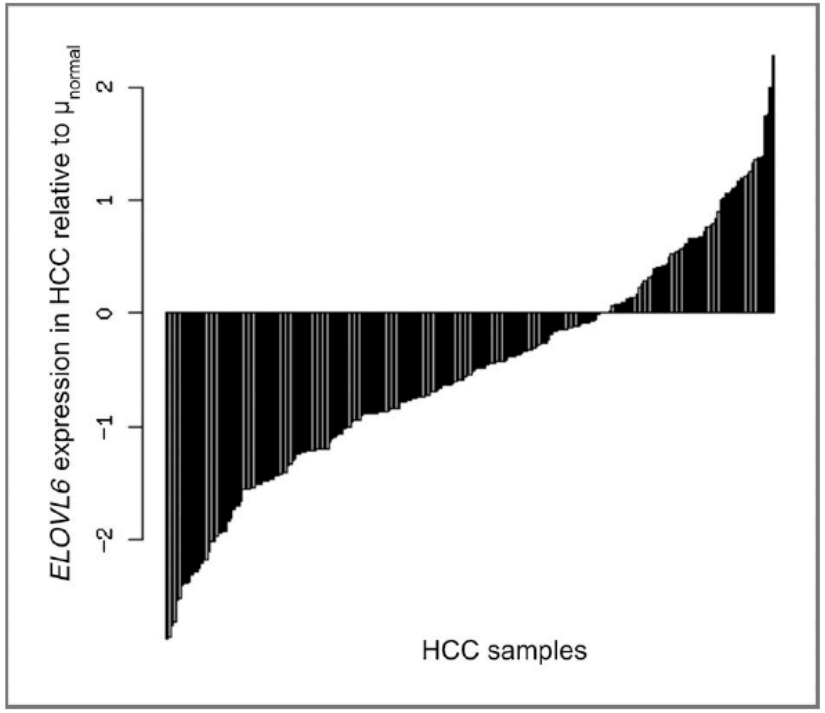


Figure 1. mRNA levels of *ELOVL6* in 247 human HCC samples relative to the mean of 239 nontumor liver tissue (μ_{normal}). Samples of dataset GSE14520 [$\log_2$ (expression) values from GEO after Robust Multi-array Average normalization] were mapped to hgu133a.db using bioconductor. Significance values: $P = 3.8E{-}11$, Kolmogorov–Smirnov test; $P = 6.7E{-}11$, *t* test; 5.1E−11, Mann–Whitney *U* test.

TCGA – The Cancer Genome Atlas

Human Molecular Genetics, 2013
doi:10.1093/hmg/ddt158

DNA co-methylation analysis suggests novel functional associations between gene pairs in breast cancer samples

Ruslan Akulenko and Volkhard Helms*

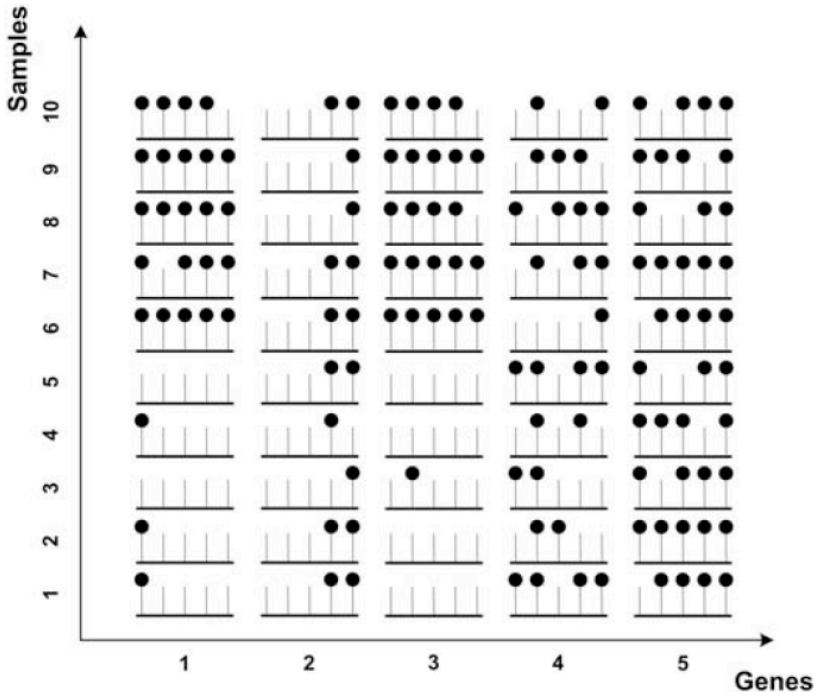


Figure 1. Schematic example of CpG methylation in five genes. The sticks indicate CpG sites. Filled circles indicate CpG methylation. The first and the third genes show highly correlated methylation levels across the 10 samples. Here, we term this behavior 'co-methylation'. The second gene is mostly unmethylated. Even though genes five and four are mostly methylated, they are not co-methylated.

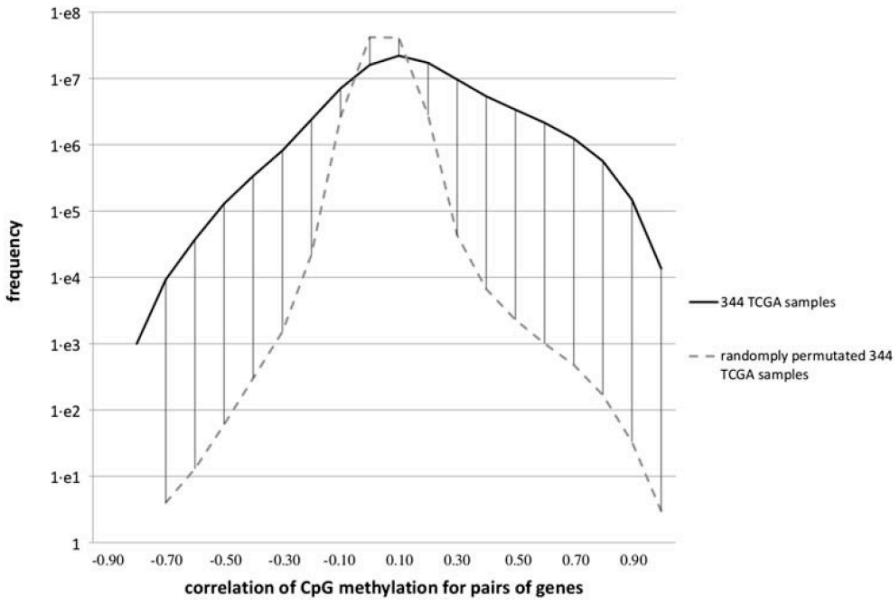
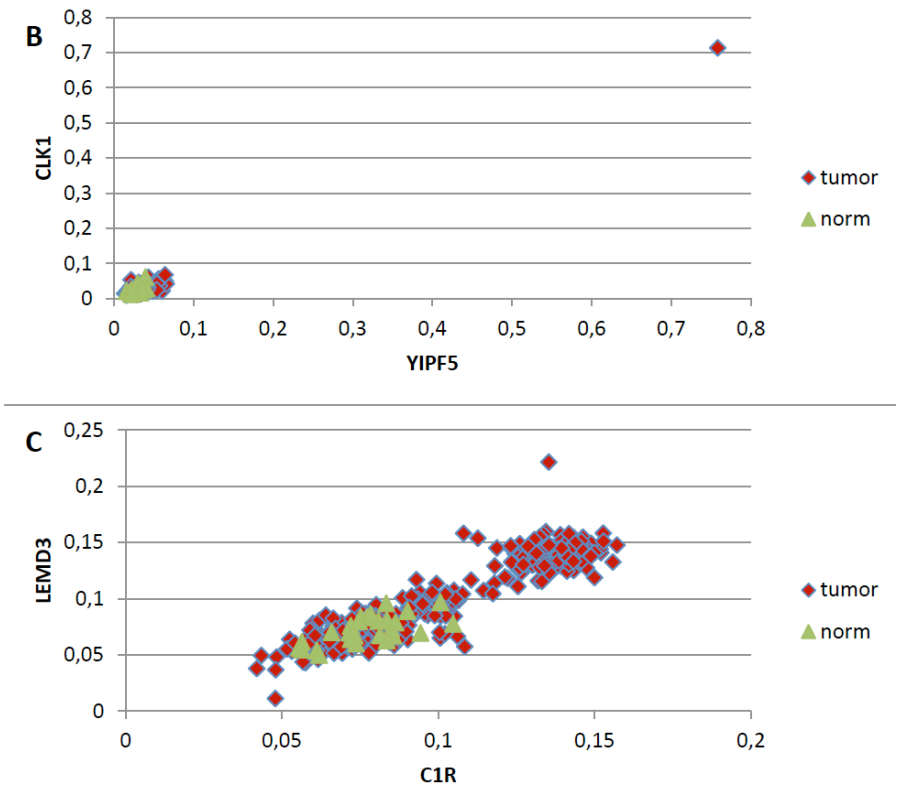


Table 1. The 10 strongest correlations for pairs of genes with respect to their β-values, obtained after three-stage filtering

First gene	Second gene	Pearson's correlation
SPRR1B	SPRR1A	0.872
FCN2	FCN1	0.870
CD244	CD48	0.866
SPRR1B	SPRR4	0.862
TAS2R13	PRB4	0.859
F7	TFF1	0.856
SH3TC2	SPARCL1	0.853
ABCE1	SC4MOL	0.849
REG1B	REG1P	0.846
SPRR3	SPRR4	0.843

TCGA – The Cancer Genome Atlas



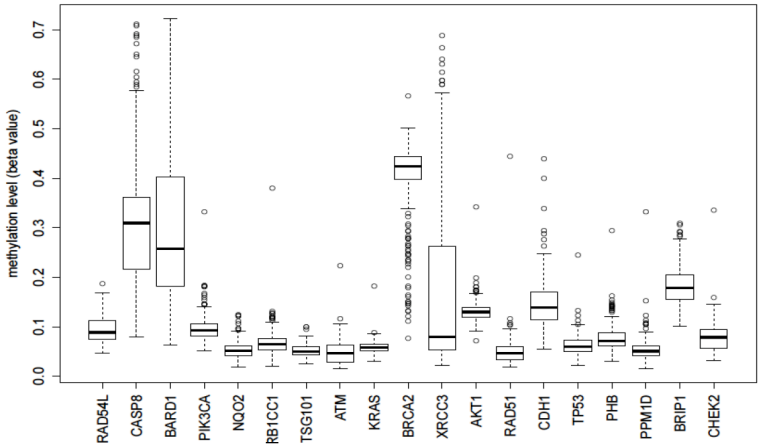


Fig S2. Methylation levels of 19 OMIM breast cancer genes found among the 344 TCGA data samples analyzed here.

Daten müssen bereinigt/gefiltert werden:
Oben – hohe Korrelation durch einen (zufälligen oder fehlerhaften) Ausreißer.

Unten – hohe Korrelation, aber insgesamt geringe Variabilität der Werte

Oben – bekannte Brustkrebsgene sind wenig methyliert.

Unten – statistisch signifikant angereicherte biochemische Pfade, die ko-methylierte Gene enthalten

Cluster ID	KEGG pathways	p-value	Genes involved in pathways	FDR
8	hsa04950:Maturity onset diabetes of the young	0.003	HNF1B, FOXA2, NEUROD1	2.622
9	hsa04640:Hematopoietic cell lineage	0.009	CD1A, CD1E, CD1D	6.229
15	hsa04730:Long-term depression	0.004	GRM5, C7ORF16, PRKG2	2.952
27	hsa04512:ECM-receptor interaction	0.005	COL5A2, COL11A1, SPP1	3.500

Ausblick

Übungen heute Nachmittag

Bioinformatik-Software muss man hands-on kennenlernen.

Im Tutorial zeigen wir Ihnen den Umgang mit weit verbreiteter Bioinformatik-Software.

Das Tutorial ist genauso wichtig wie die Vorlesung!

In wenigen Wochen sollen Sie mit diesen Tools in einer kleinen Gruppe ein Mini-Forschungsprojekt bearbeiten. Also passen Sie bitte gut auf ... ☺

Gute Statistik-Kenntnisse sind essentiell für das Design von Experimenten, für das Aufstellen von Arbeitshypothesen und für die Arbeit mit Datenmengen.

Wichtig ist zudem das Verständnis, wie die Daten gewonnen wurden und welche Fehlerquellen auftreten können.