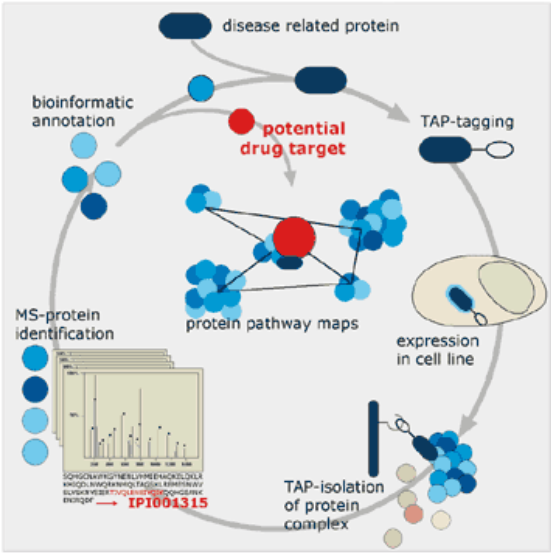
Softwarewerkzeuge der Bioinformatik

Inhalt dieser Veranstaltung: Softwarewerkzeuge kennenlernen für

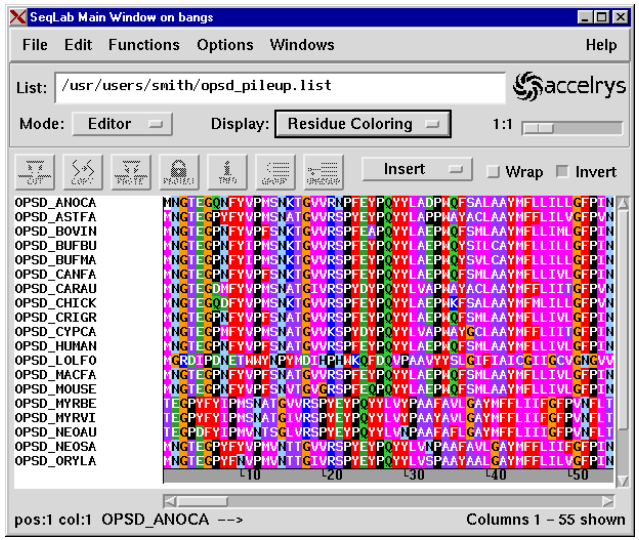
I Sequenzanalyse

II Analyse von Proteinstruktur und Ligandenbindung

III Analyse von Omics-Daten, 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
(15 minütige Pause)

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 19.10:

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.

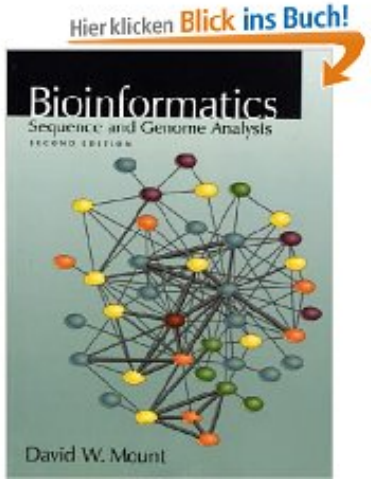
Die Veranstaltung gilt als bestanden, wenn in der abschließenden 120-minütigen Klausur über die Inhalte der Vorlesung, der Übungen und der Minipraktika mindestens die Note 4 erreicht wurde.

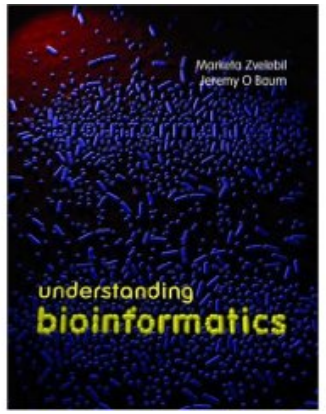
Für die Note des Scheins zählt das bessere Ergebnis entweder ausschließlich aus der abschließenden Klausur oder der Kombination des Durchschnitts der benoteten Praktika und der Note der Abschlussklausur, die jeweils zu 50 % gewichtet werden.

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

1 Einführung, Datenbanken

2 Paarweises Sequenzalignment

3 Multiples Sequenzalignments; Phylogenie

4 Genvorhersage, Motivsuche

II Proteinstruktur

5. Proteinstruktur; Sekundärstruktur

6. Homologie-Modellierung

7. Biomolekulare Interaktionen

III Zellsimulationen/Netzwerke

8. Genexpression – Microarrays

9. Funktionsannotation (Gene Ontology)

10. Systembiologie: metabolische Pfade; Protein-Interaktion, Genregulationsnetzwerke

11. Enzymkinetik – einfache Differentialgleichungen

12. Diffusionssysteme - Virtual Cell

13. 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**

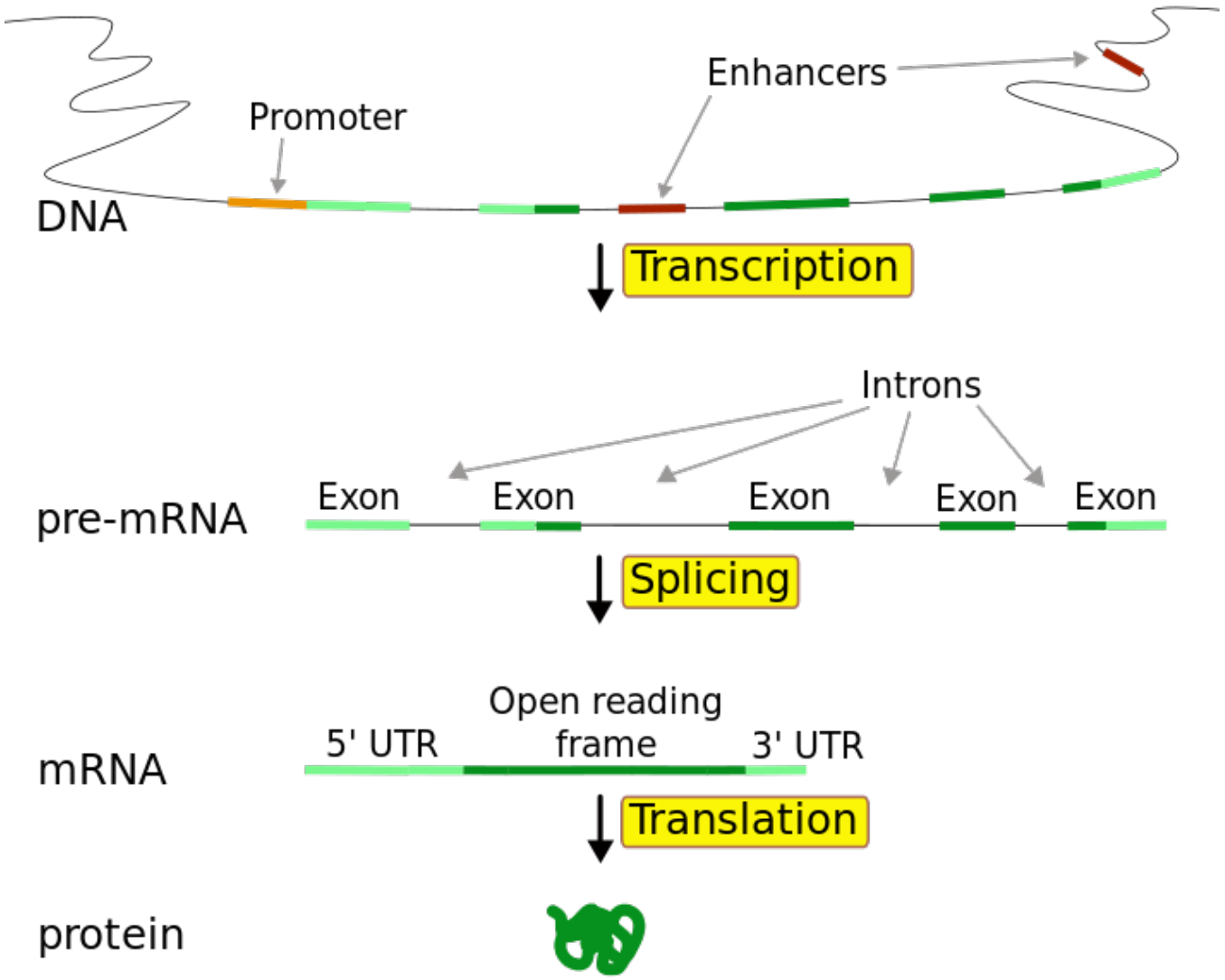
1992: Sekundärstrukturvorhersage mit Neuronalen Netzwerken (PHD)
machine learning

1996: Vergleich von Proteinstrukturen mit DALI

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

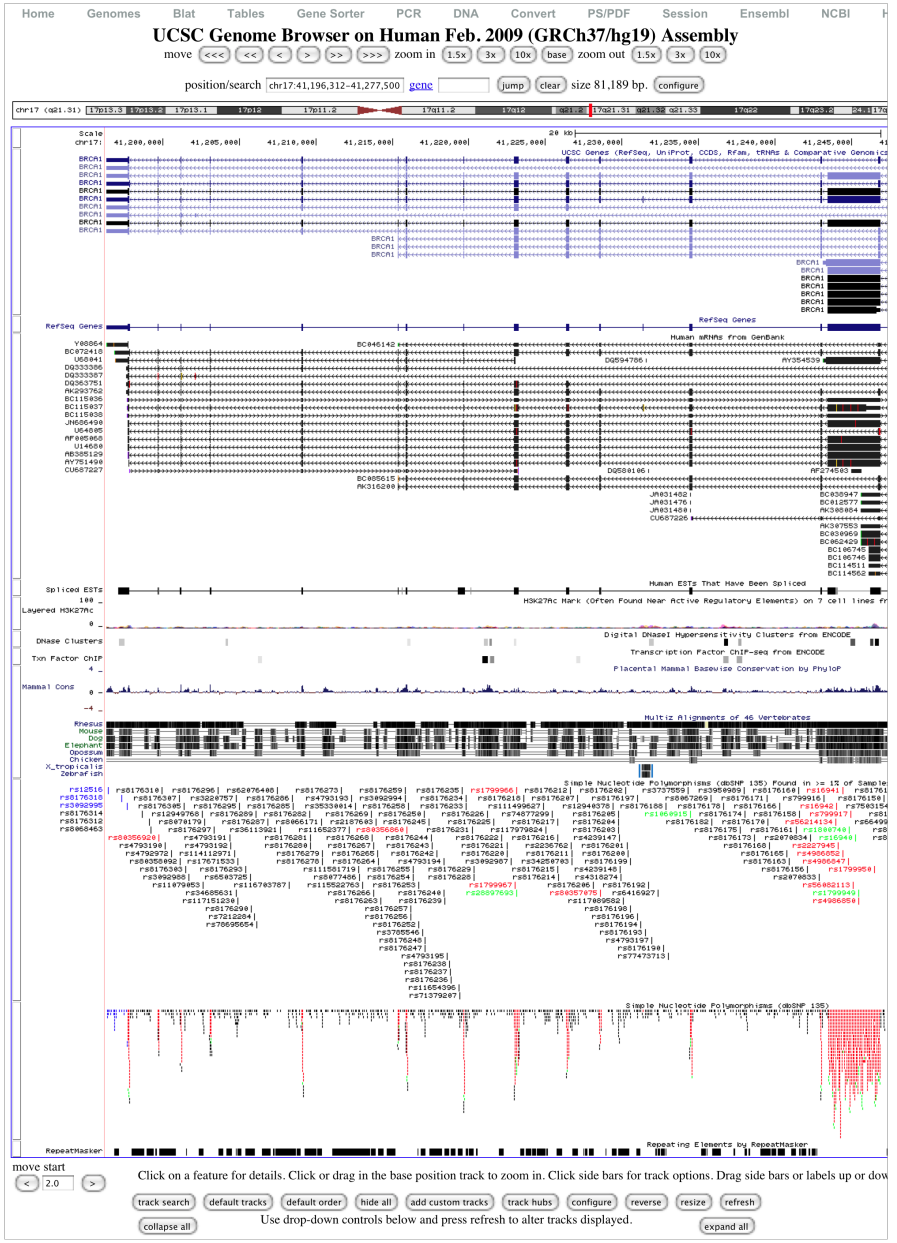
2012: ENCODE-Projekt

Die Struktur von Genen



www.wikipedia.org

UCSC Genome Browser

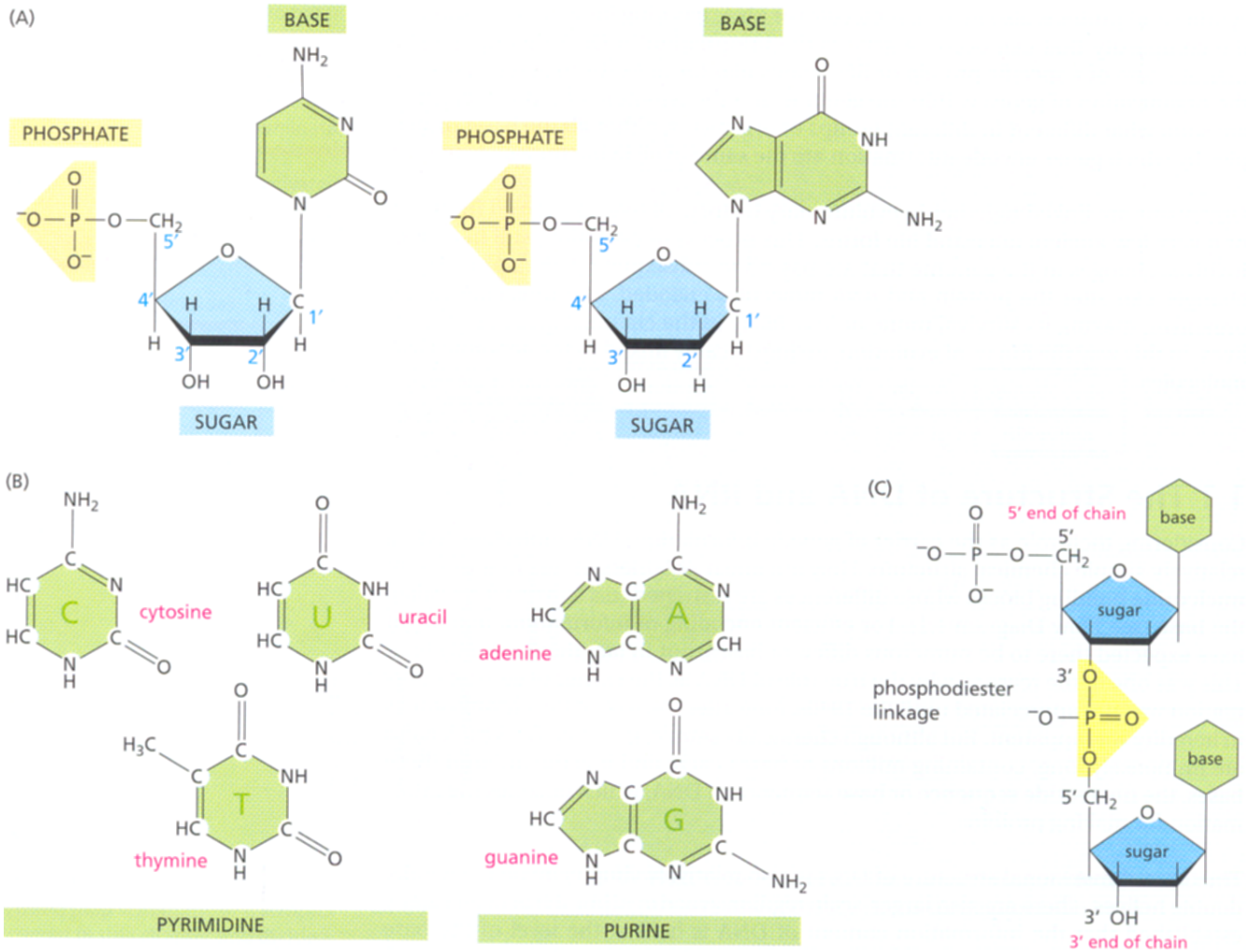


Es gibt verschiedene Assemblies

hg17, hg18, hg19 für das *humane Genom*

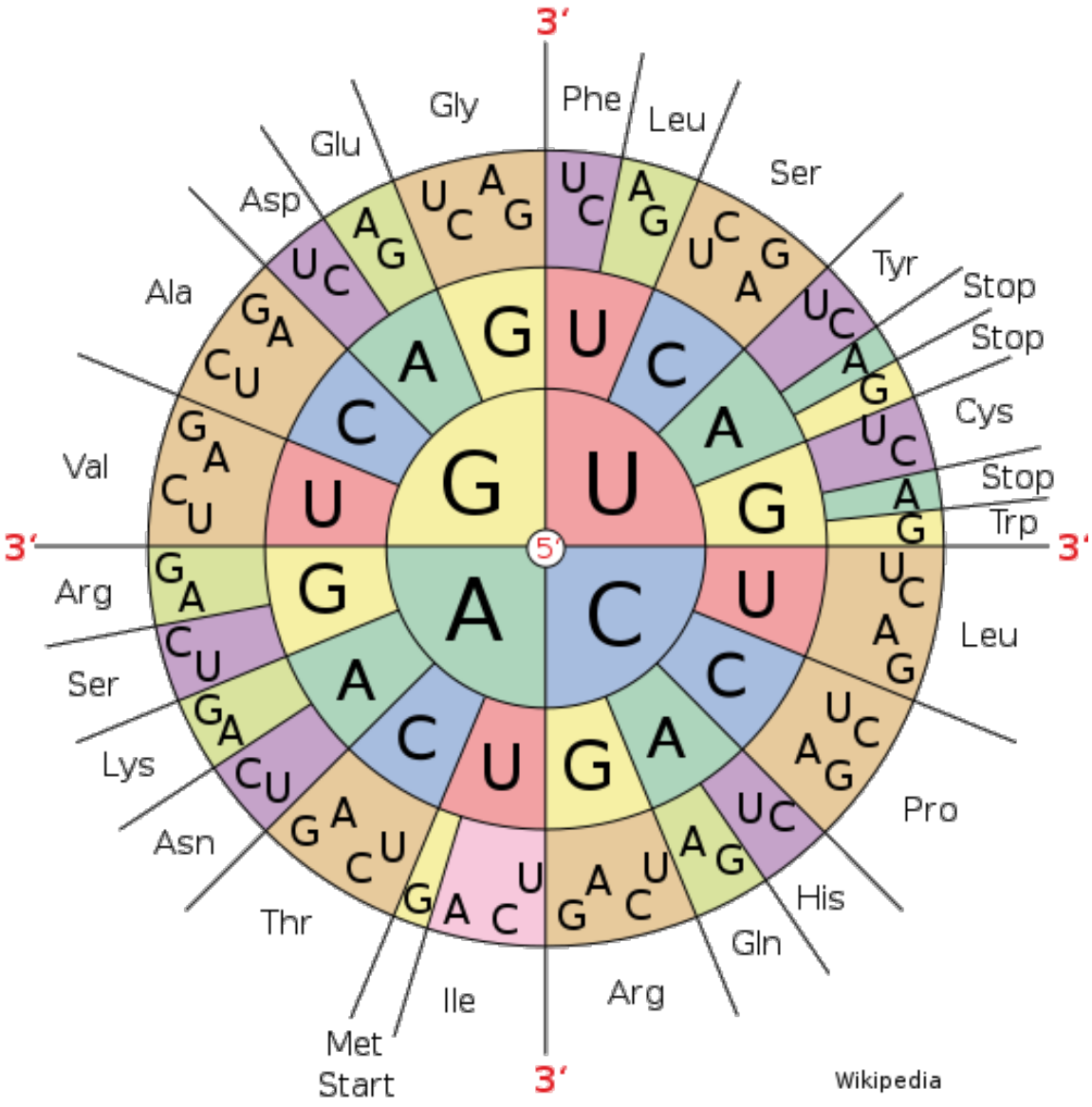
http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway

Die vier Nukleotidbasen



Zvelebil (2008)

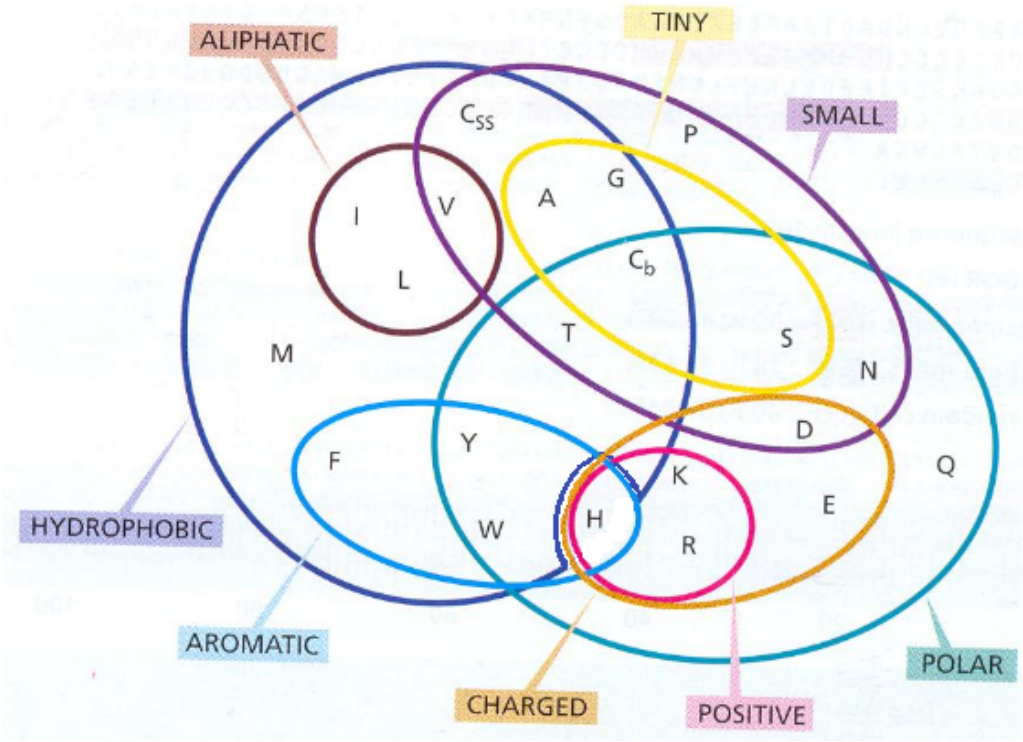
Codonsonne



Zvelebil (2008)

Eigenschaften der Aminosäuren

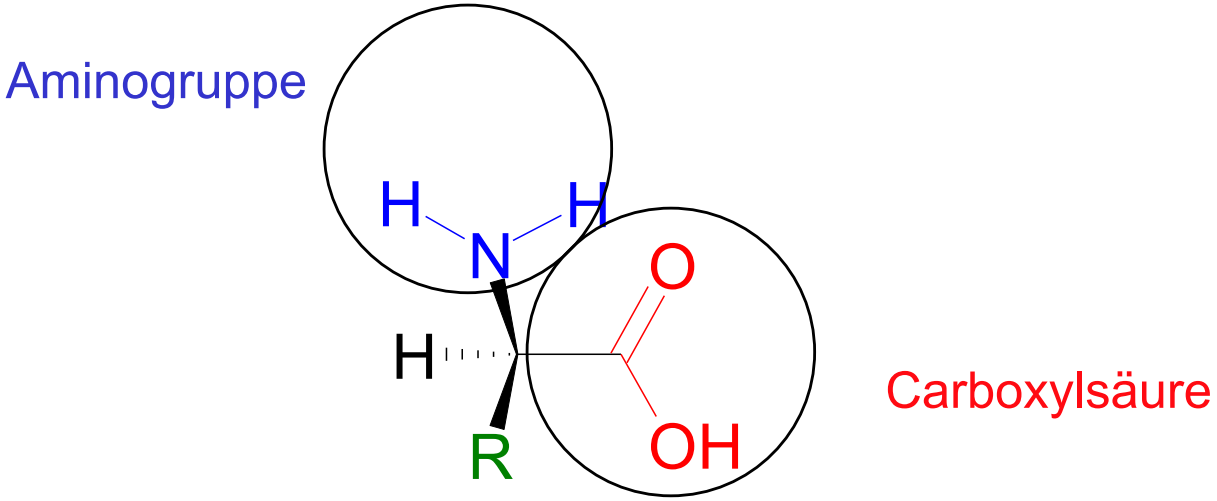
Aminosäuren unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften.



Q: müssen Bioinformatiker die Eigenschaften von Aminosäuren kennen?

Einleitung: Aminosäuren

Aminosäuren sind die **Bausteine** von Proteinen:



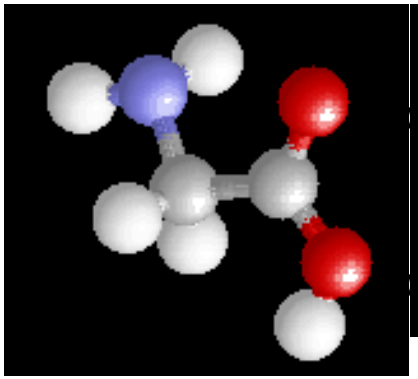
Aminosäuren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer

- Größe
- elektrischen Ladung
- Polarität
- Form und Steifigkeit

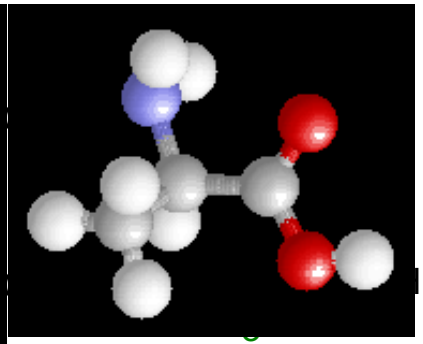
Einleitung: hydrophobe Aminosäuren

Proteine sind aus 20 verschiedenen natürlichen Aminosäuren aufgebaut

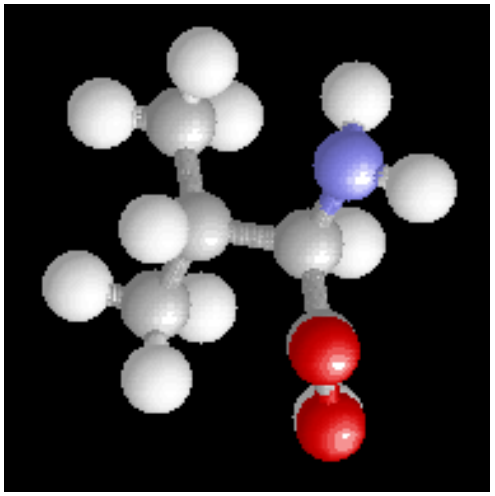
5 sind hydrophob.
Sie sind vor allem
Im Proteininneren.



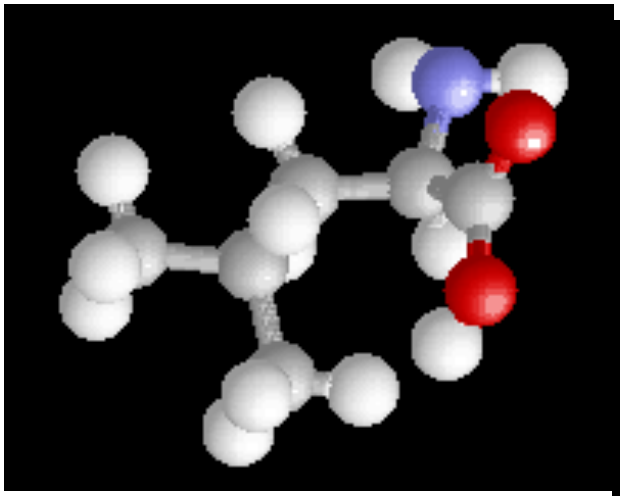
Glycine



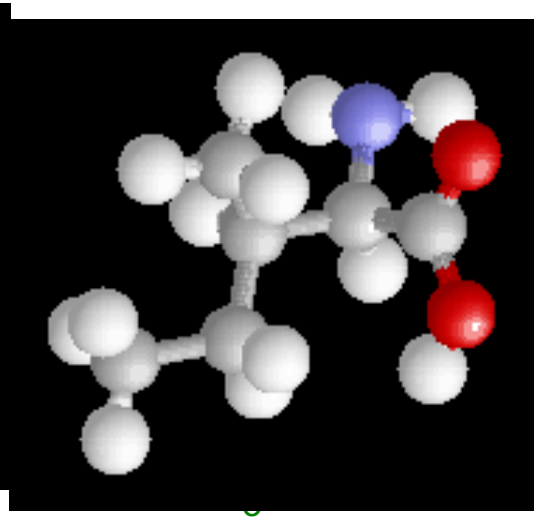
Alanine



Valine



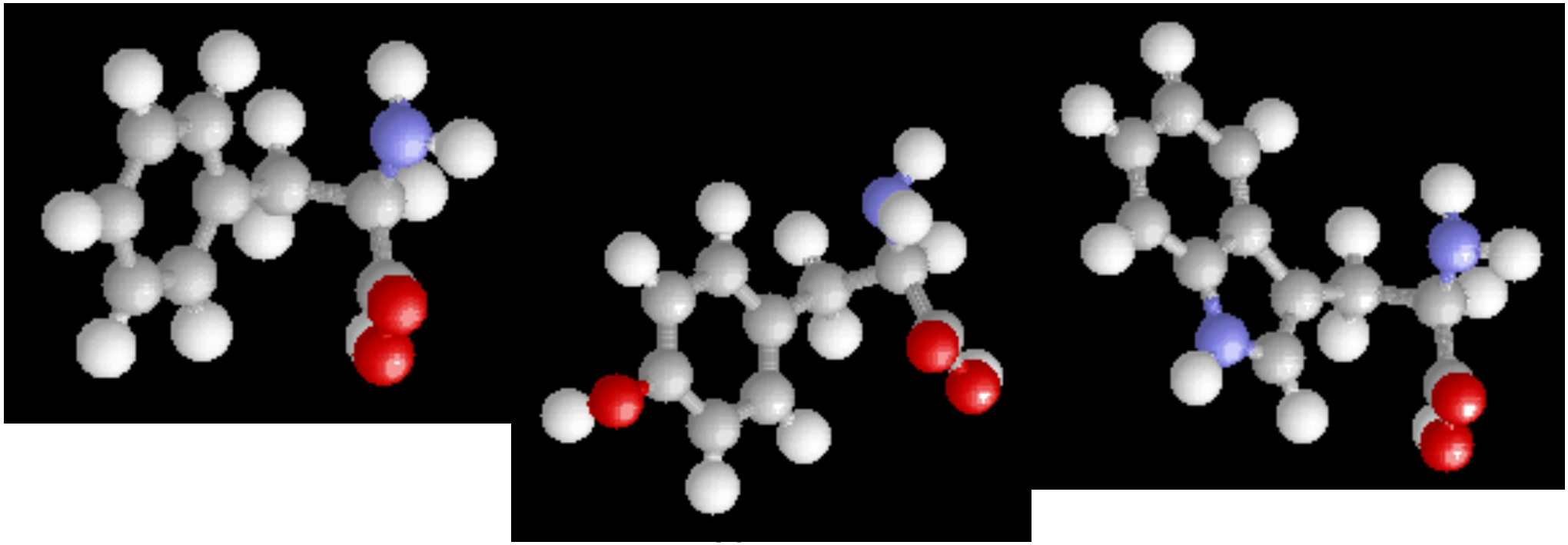
Leucine



Isoleucine

Einleitung: aromatische Aminosäuren

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



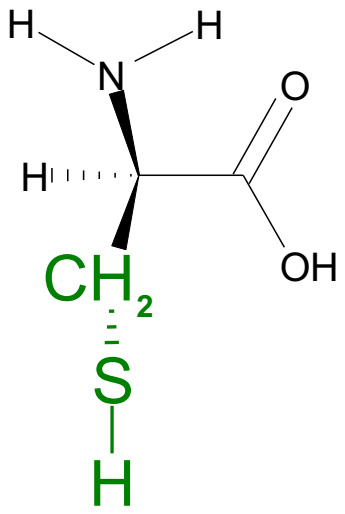
Phenylalanin Tyrosin Tryptophan

Einleitung: Aminosäuren

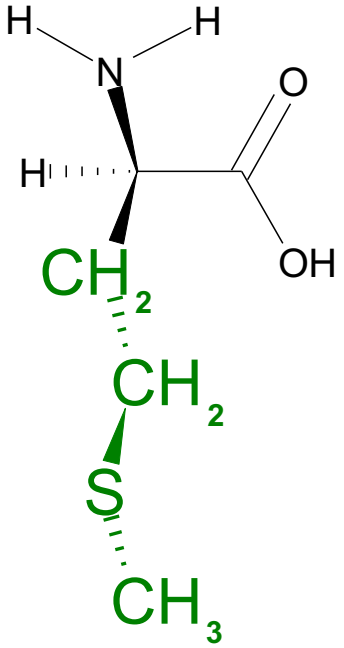
Es gibt 2 Schwefel enthaltende Aminosäuren und das ungewöhnliche Prolin.

Cysteine können Disulfidbrücken bilden.

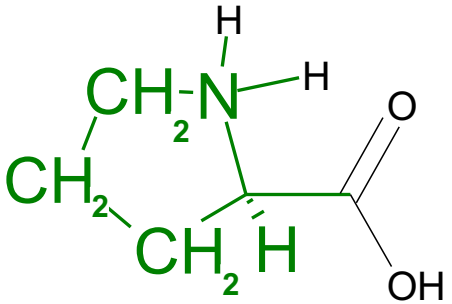
Prolin ist ein “Helixbrecher”.



Cystein



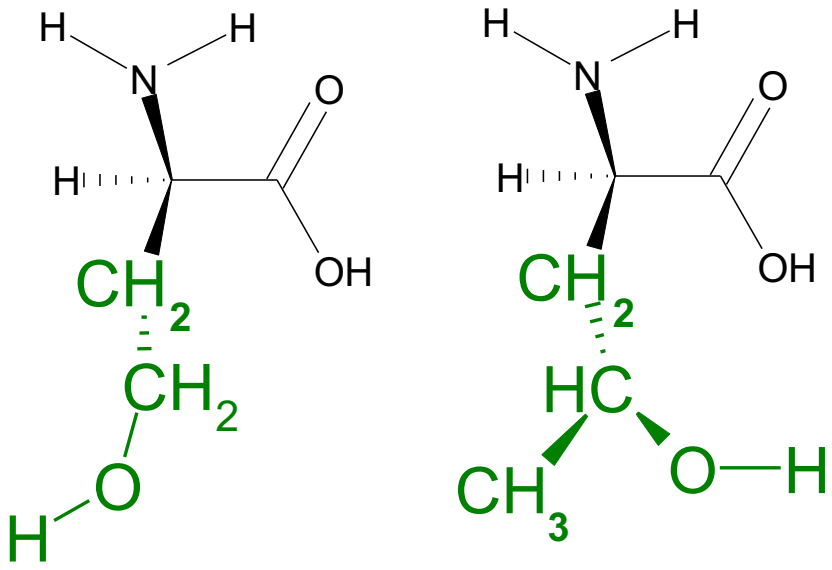
Methionin



Prolin

Einleitung: Aminosäuren

Es gibt zwei Aminosäuren mit terminalen polaren Hydroxlgruppen:

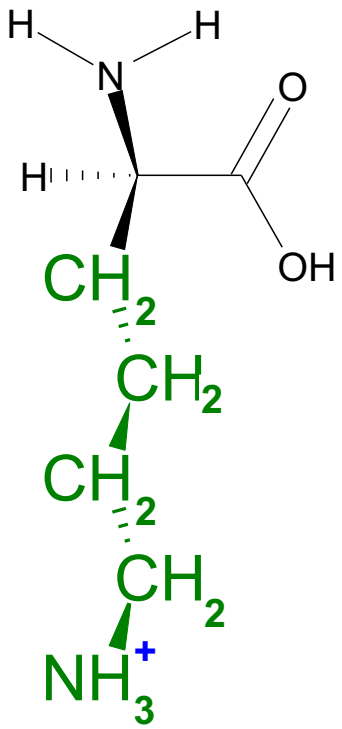


Serin Threonin

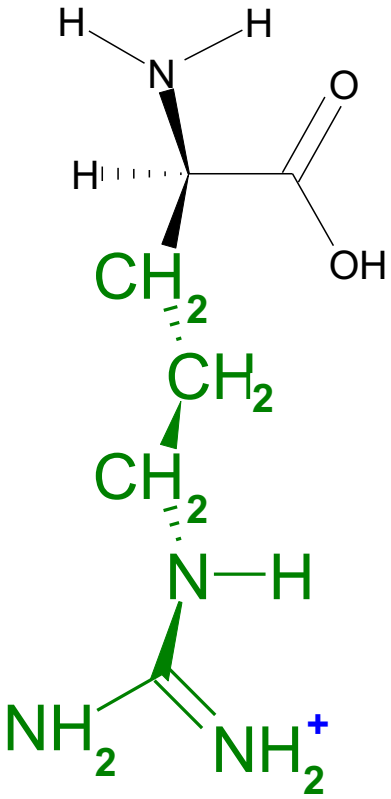
Einleitung: Aminosäuren

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

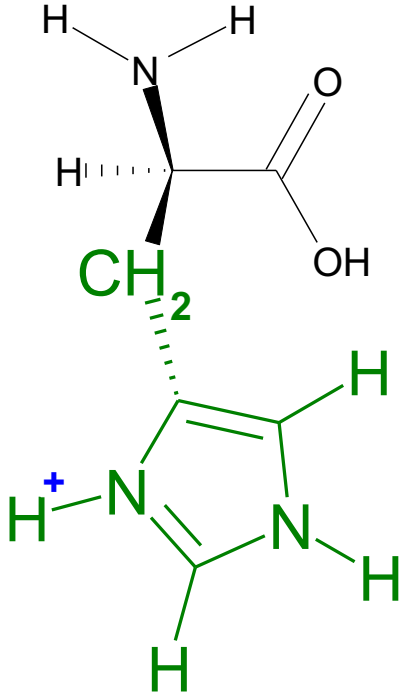
Thermophile Organismen besitzen besonders viele Ionenpaare auf den Protein-oberflächen.



Lysin



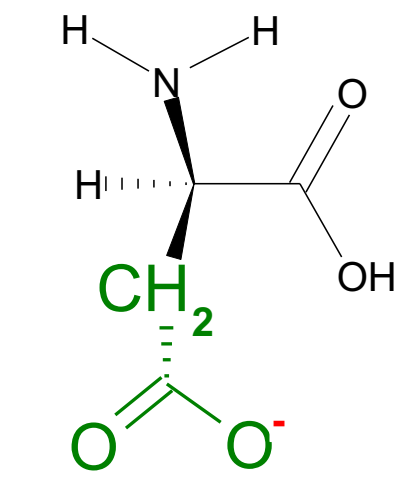
Arginin



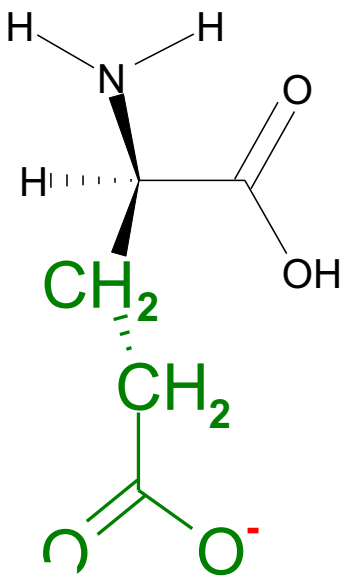
Histidin

Einleitung: Aminosäuren

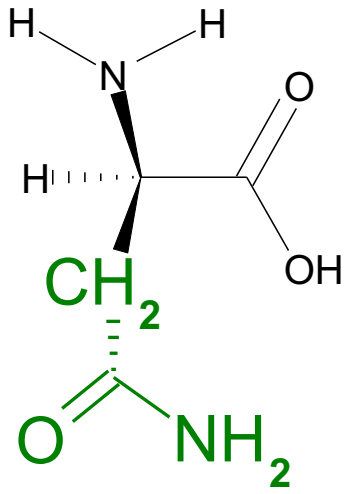
Es gibt 2 negativ geladene Aminosäuren und ihre zwei neutralen Analoga.
Asp und Glu haben pK_a Werte von 2.8. Das heisst, erst unterhalb von pH=2.8 werden ihre Carboxylgruppe protoniert.



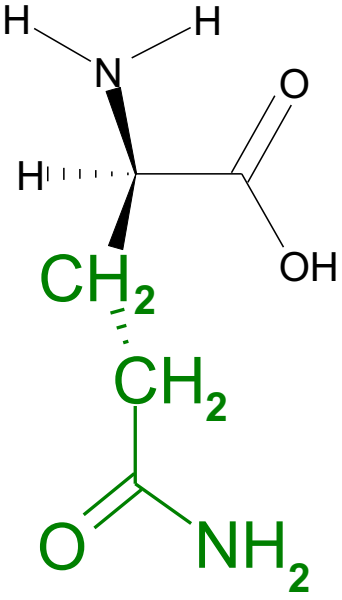
Asparaginsäure



Glutaminsäure



Asparagin



Glutamin

Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

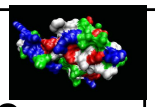
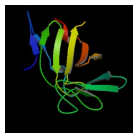
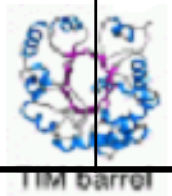
G	Glycin	**Gly**	**P**	Prolin	**Pro**
A	Alanin	**Ala**	**V**	Valin	**Val**
L	Leucin	**Leu**	**I**	Isoleucin	**Ile**
M	Methionin	**Met**	**C**	Cystein	**Cys**
F	Phenylalanin	**Phe**	**Y**	Tyrosin	**Tyr**
W	Tryptophan	**Trp**	**H**	Histidin	**His**
K	Lysin	**Lys**	**R**	Arginin	**Arg**
Q	Glutamin	**Gln**	**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

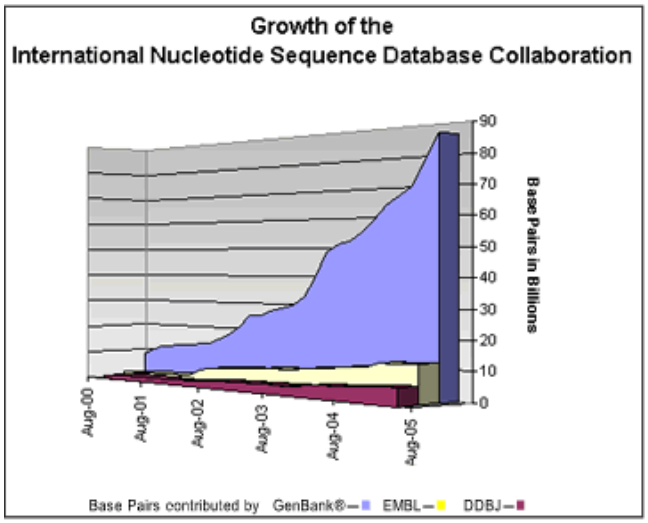
- Analysen auf Basis der primären Datenbanken
- Klassifizierungen nach Ähnlichkeit

Sequenzdaten

• in Okt. 2016 ~197 Mio. **Nukleotidsequenzen**
(Quelle: GenBank *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/*

genbank/index.html)

~363 Mio. WGS-Nukleotidsequenzen



• 114.767 **3D-Strukturen** von biologischen

Makromolekülen (Proteine, DNA, RNA, …)
(Quelle: RCSB-PDB *http://www.rcsb.org*, Okt. 2016)

RCSB PDB
PROTEIN DATA BANK

Einträge sind teilweise **redundant**,

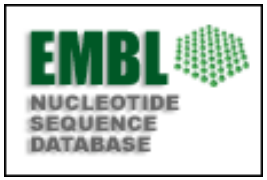
d.h. es gibt mehrere Versionen derselben Sequenz/Struktur

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
- ~197 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/)

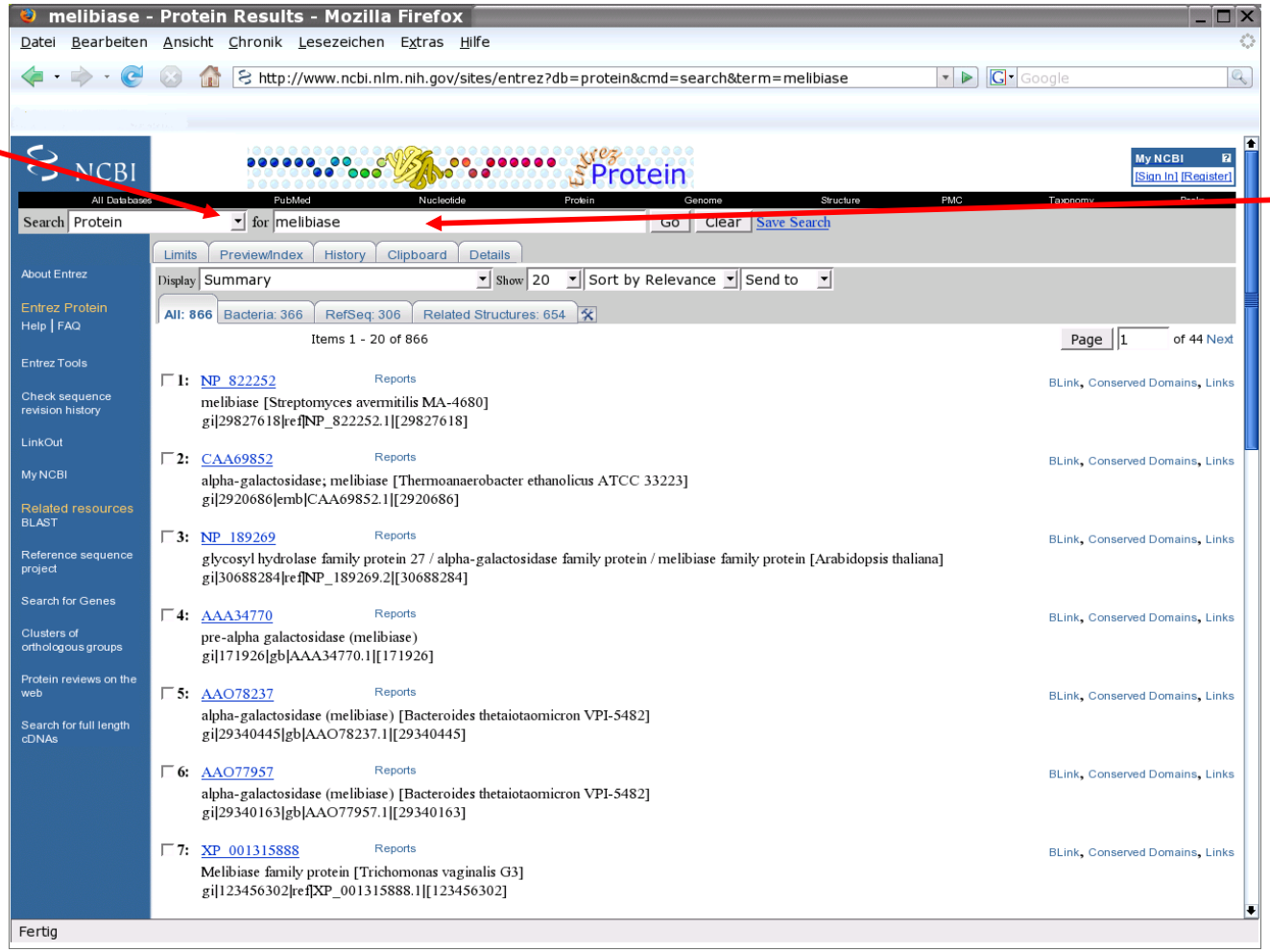
- *Universal Protein Resource Knowledge Base*
- öffentliche, primäre Proteinsequenz-Datenbank
- “nur” 552.000 Einträge (Okt 2016)
- wichtigste Sammlung von Proteinsequenzen:
  - Daten stammen aus der Datenbank TrEMBL (*translated* EMBL)
  - manuell überpüft; manuelle Annotationen von Experten
  - nicht redundant
  - Querverweise zu Funktionsbeschreibung, Domänenstruktur, posttranslationalen Modifikationen und ~60 anderen Datenba

- UniProtKB/TrEMBL enthält Einträge, die noch nicht in UniProtKB/Swiss-Prot aufgenommen wurden

Webinterface: Entrez

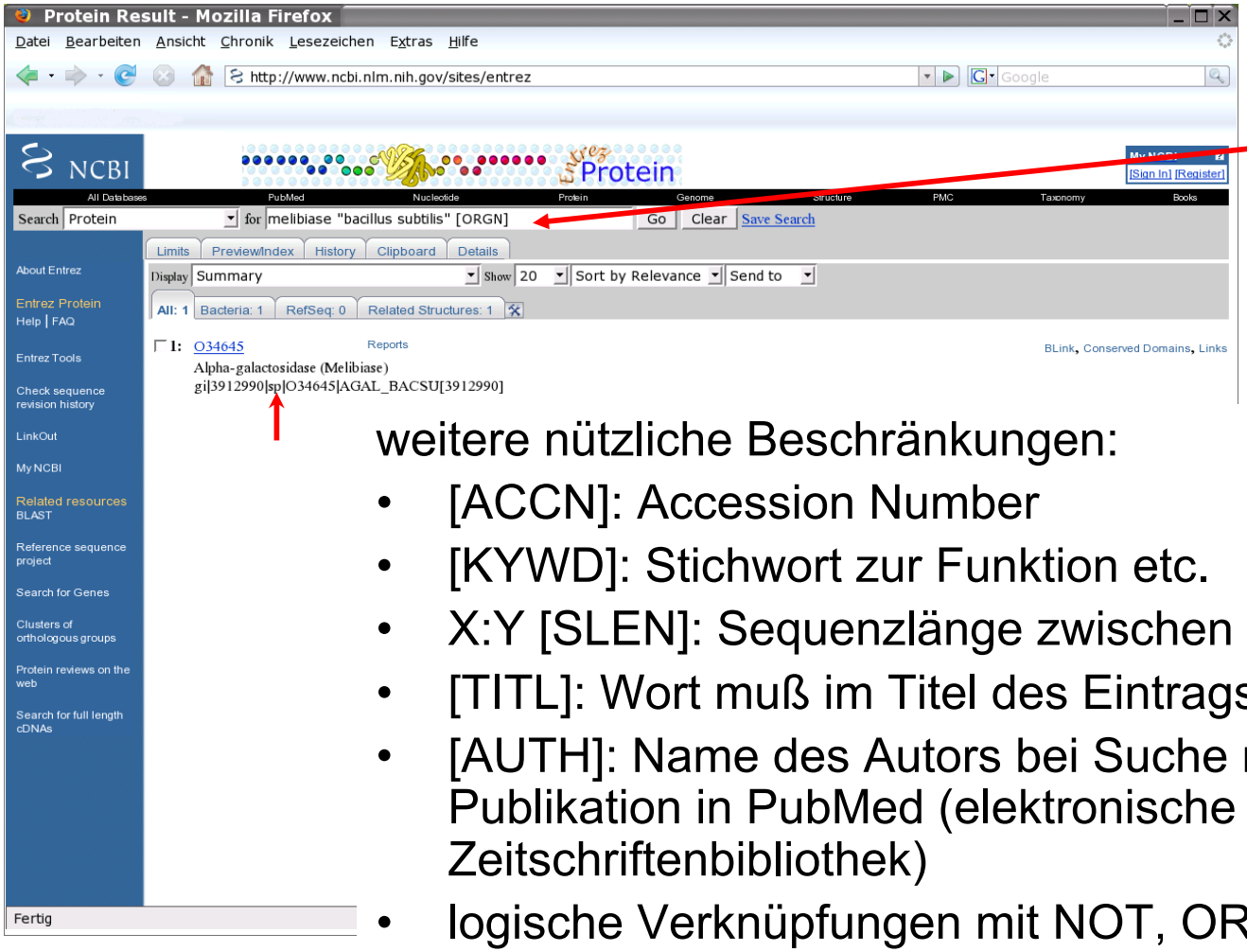
Entrez, The Life Sciences Search Engine

Datenbank wählen



Stichwort, hier Name des Proteins

Detaillierte Suche bei Entrez

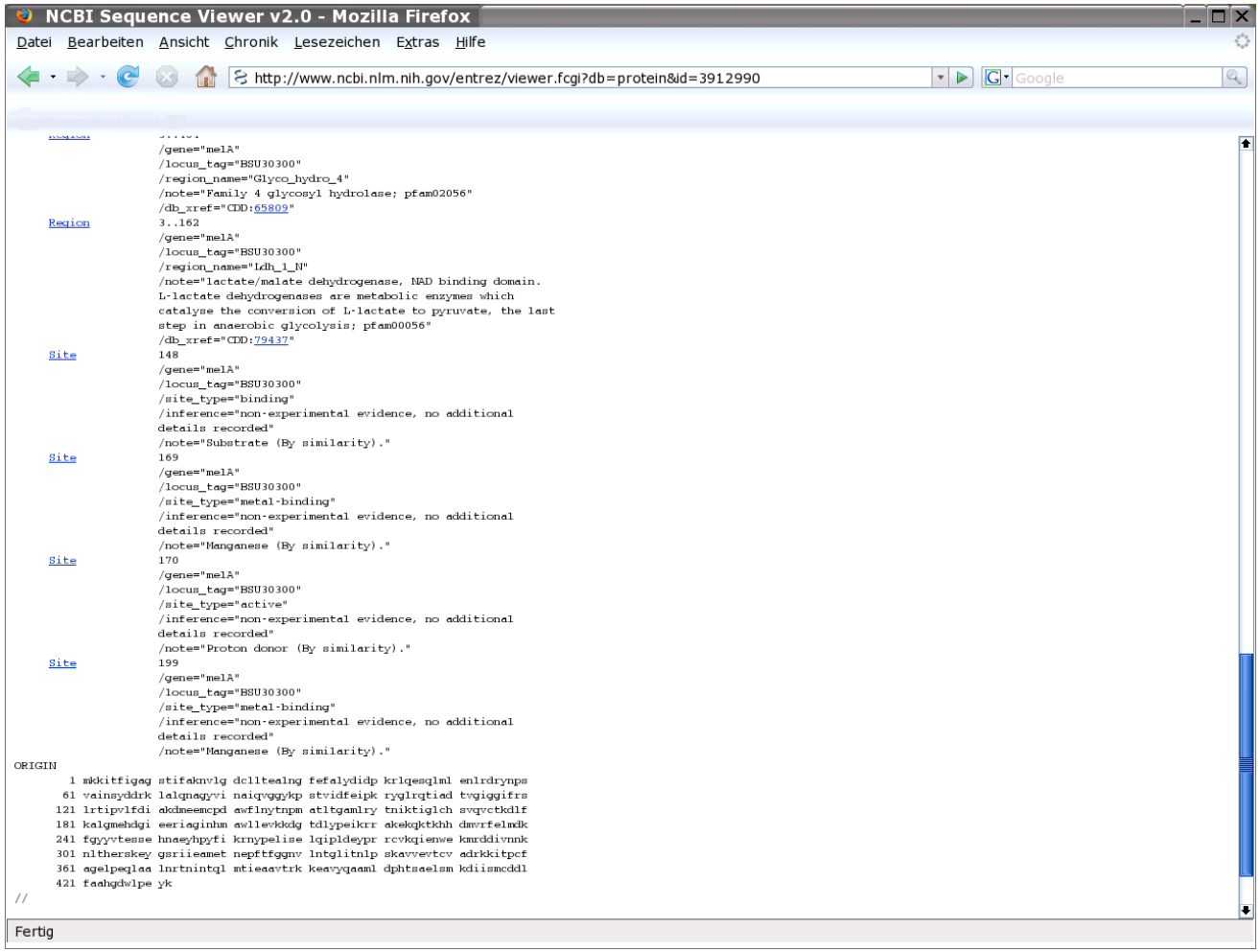


Suche nach dem Protein Melibiase in genau diesem Organismus

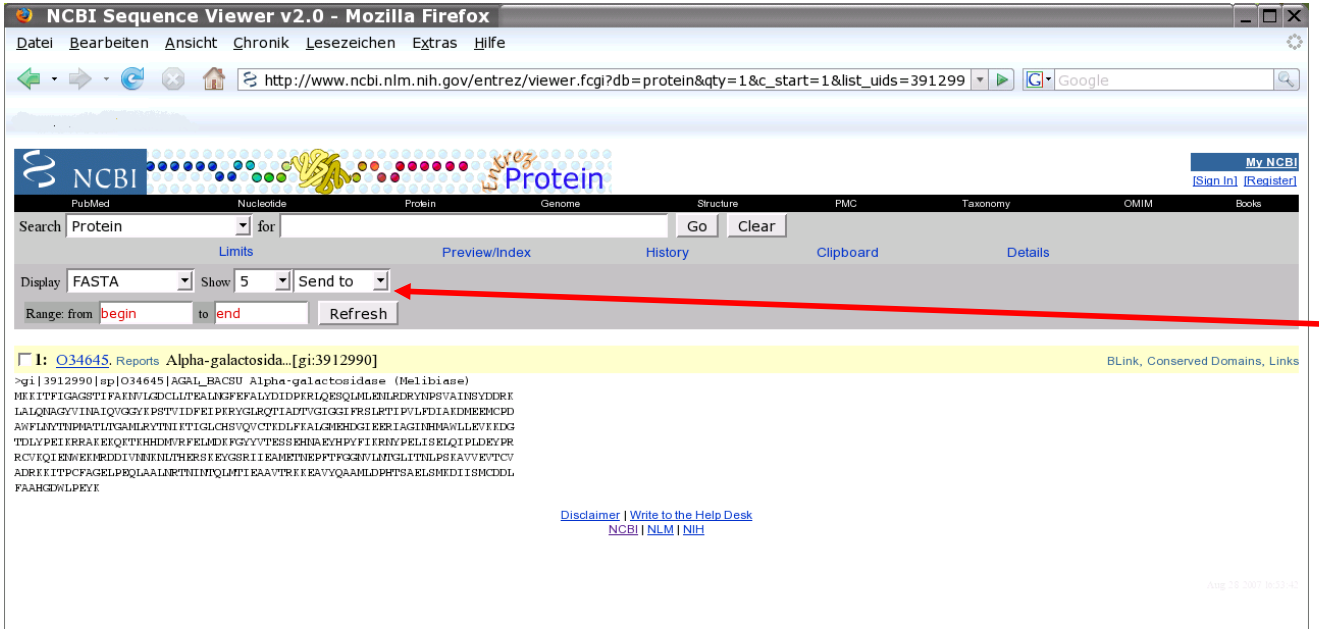
weitere nützliche Beschränkungen:

- [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, ...

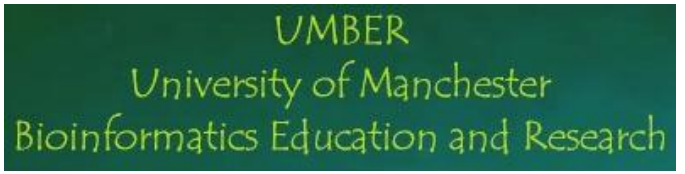
>DNA-Sequenz-Bezeichnung
ACGT

....

>Protein-Sequenz-Bezeichnung
ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY

....

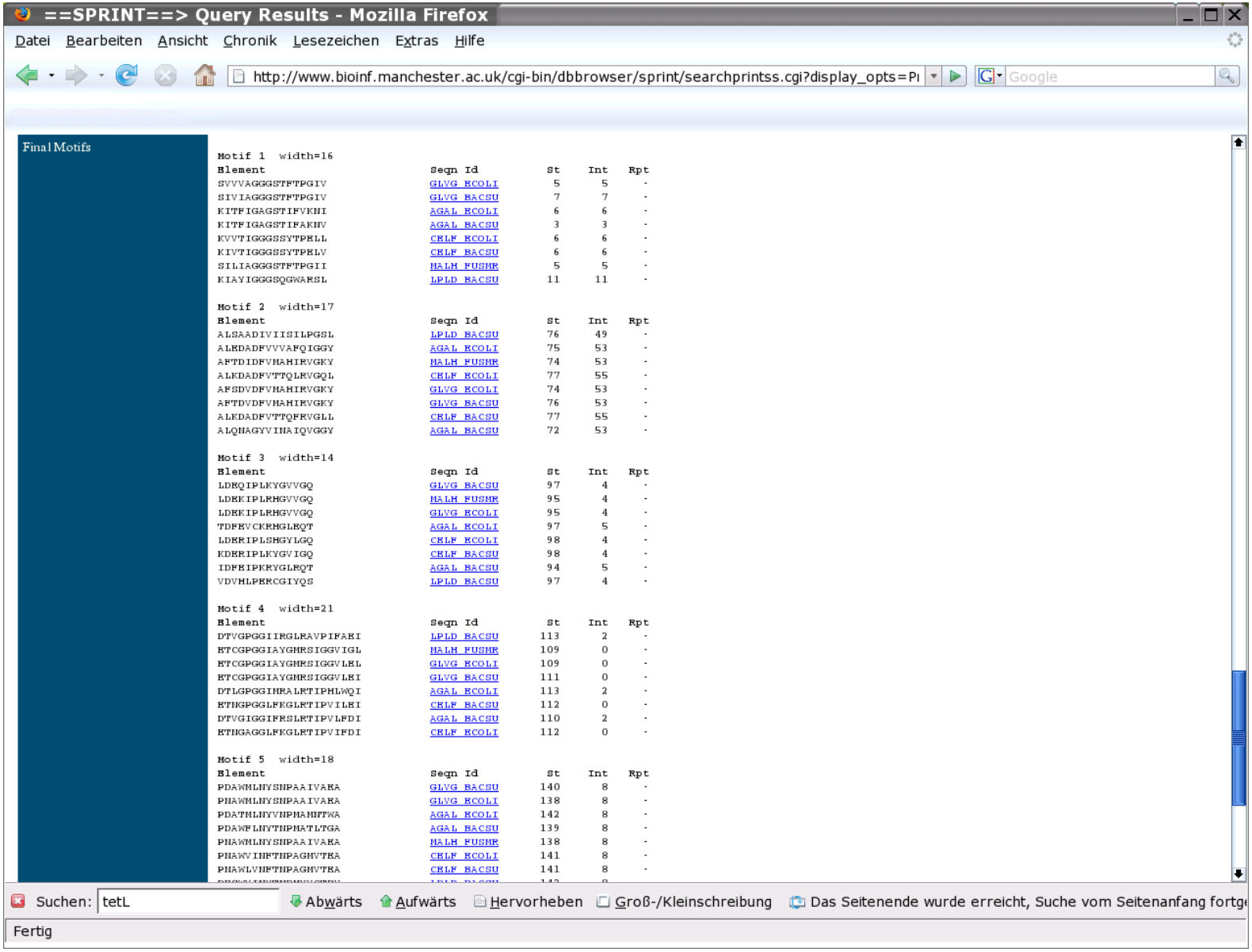
PRINTS



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

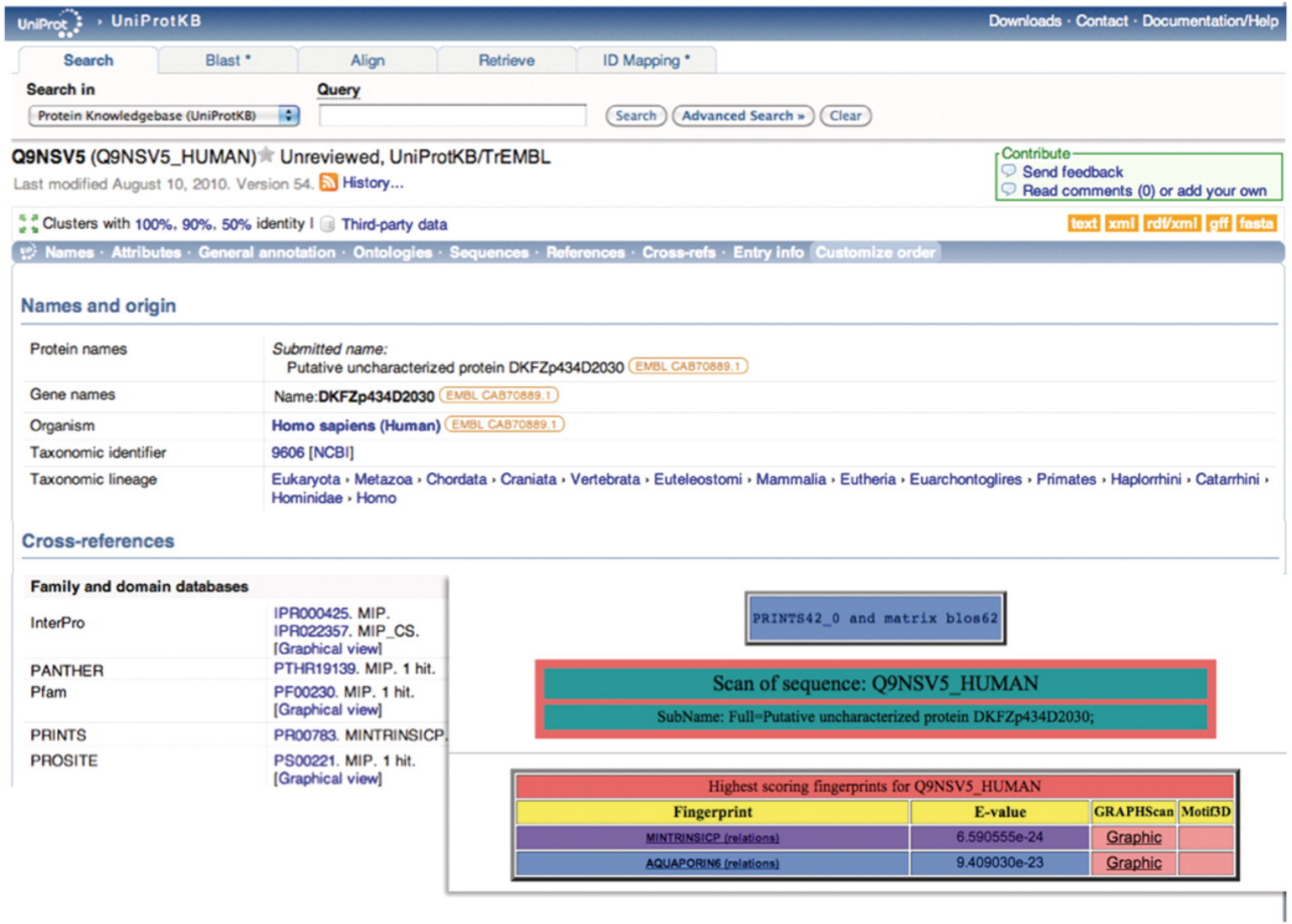
- sekundäre Protein-Datenbank
- 2.156 Einträge und 12.444 Motive (in 2012)
- Fingerabdruck (*fingerprint*): Gruppe von konservierten Motiven
- mehrere funktionelle Bereiche (Faltung, Ligandenbindung, Komplexbildung, …) -> mehrere Sequenzmotive für ein Protein
- Motive aus kurzen lokalen Alignments
  - 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

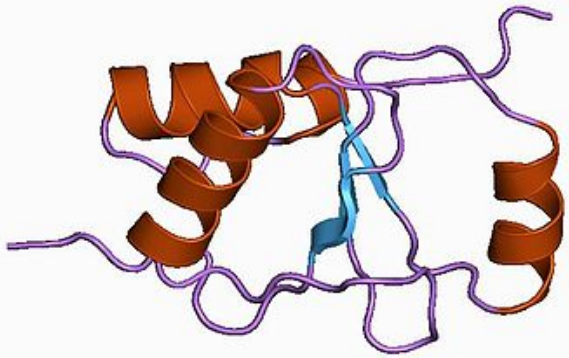
(http://pfam.xfam.org)

- 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**: genau untersuchte Profile aus multiplen Alignments und Hidden Markov Modellen (HMM), teilweise manuelle Alignments,

  >16.3000 Protein-Familien (Okt 2016, Pfam v30.0)

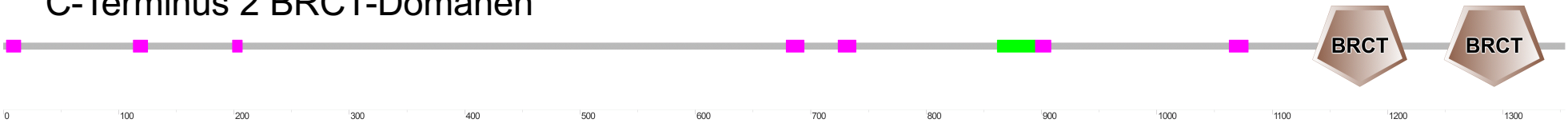
Pfam – Profil für BRCA1

Hollywoodstar Angelina Jolie hat sich aus Angst vor Krebs vorsorglich beide Brüste abnehmen lassen. Sie habe sich für den Eingriff entschieden, weil sie ein defektes Gen namens BRCA1 in sich trage, das ihr Risiko für Brust- und Eierstockkrebs erheblich erhöhe, schrieb die 37-Jährige in der „New York Times“.

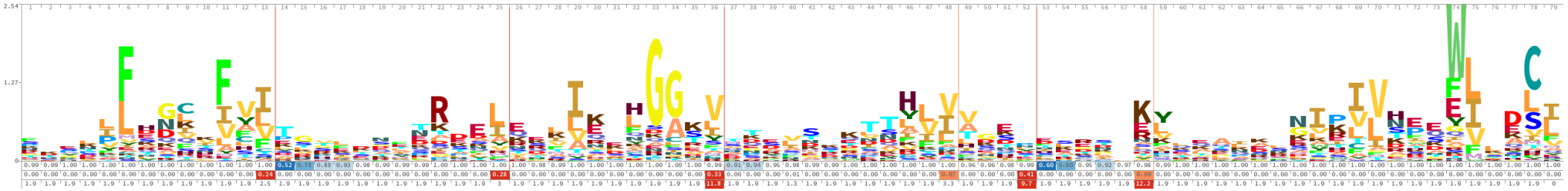


Kristallstruktur der BRCT-Domäne

http://smart.embl-heidelberg.de -> Domänenstruktur,
BRCA1 enthält mehrere low complexity Regionen (lila), 1 coiled coil Region (grün) und am C-Terminus 2 BRCT-Domänen



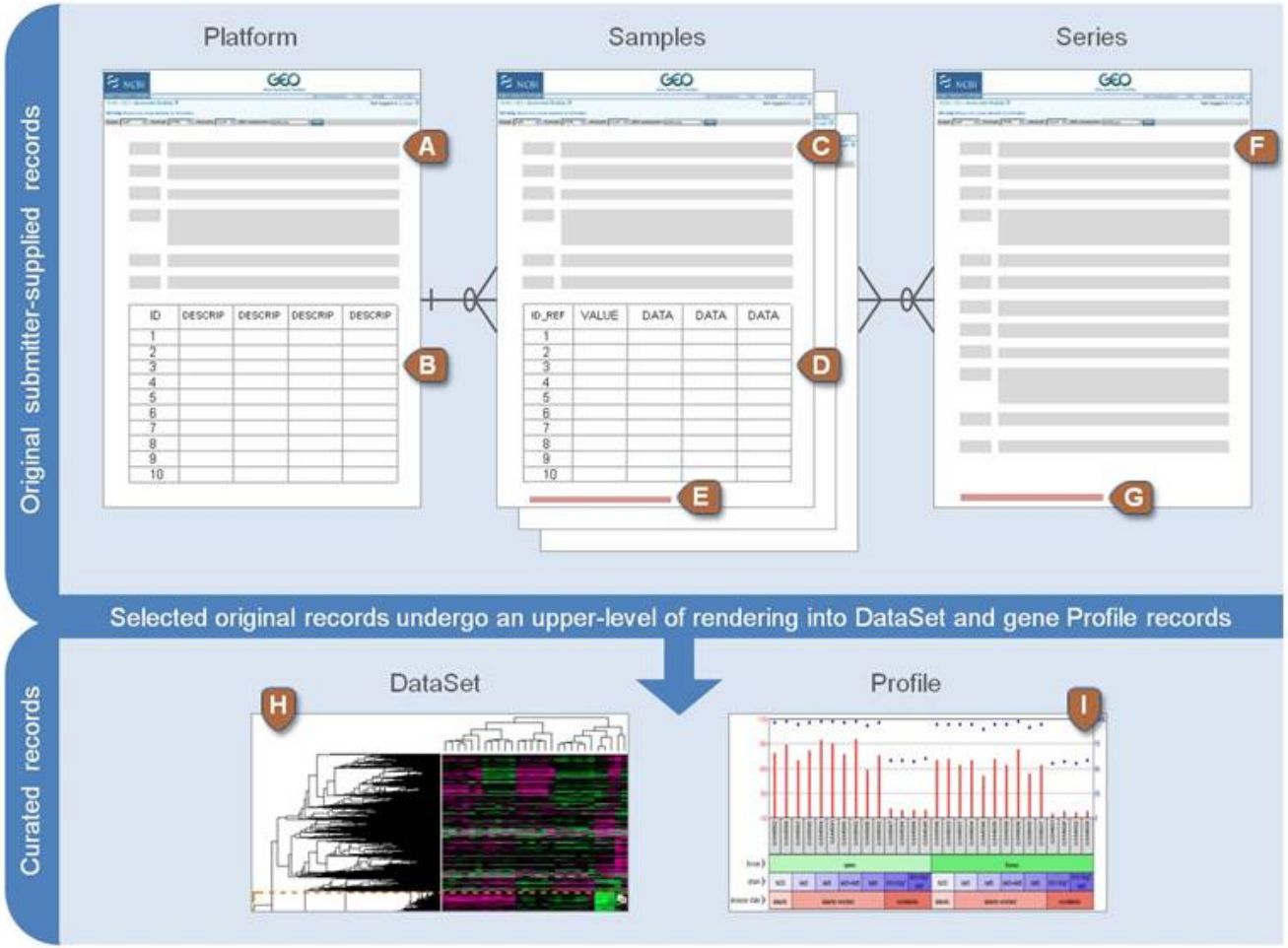
HMM-Logo von PFAM für die BRCT-Domäne



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.

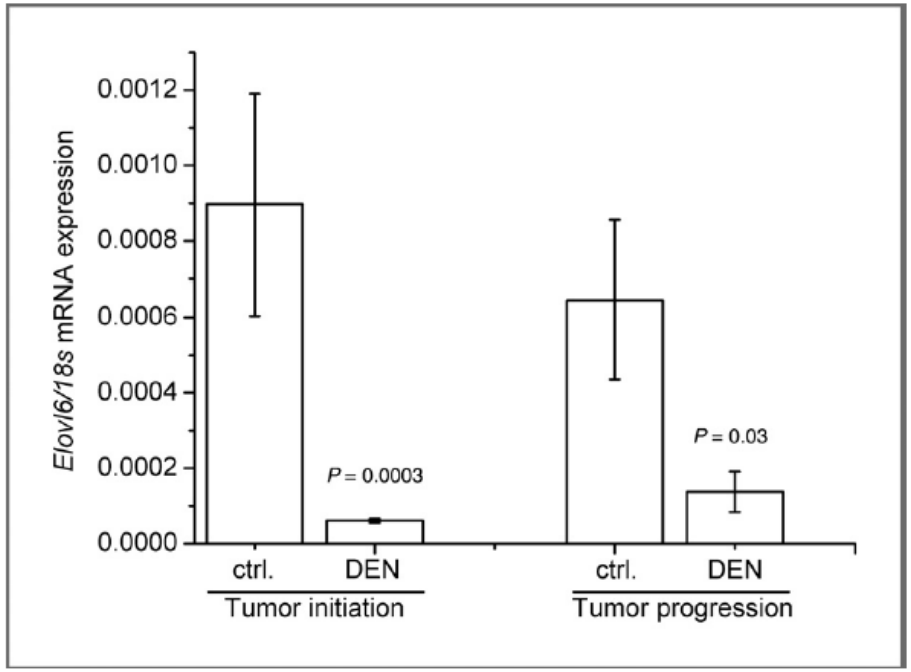


Figure 2. Wild-type mice were treated with the carcinogen DEN at the age of 2 weeks. Livers were analyzed after 24 weeks to assess the tumor initiation state. Analyses in the tumor progression stadium were done after 36 weeks. *Elovl6* mRNA expression as determined by real-time reverse transcriptase 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.

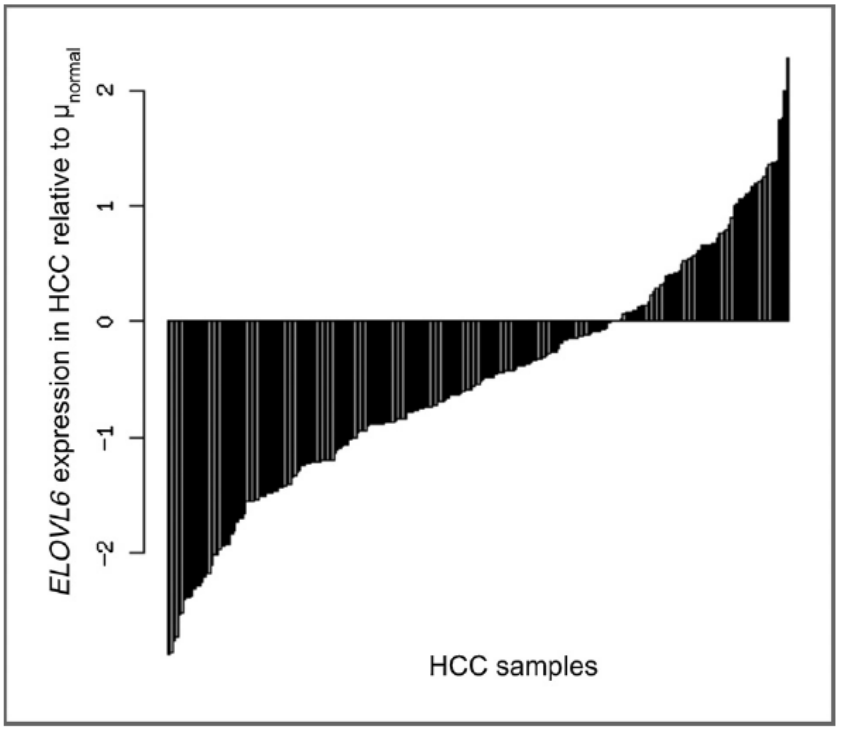


Figure 1. mRNA levels of *ELOVL6* in 247 human HCC samples relative to the mean of 239 nontumor liver tissue (μ_{normal}). Samples of dataset GSE14520 [$\log_2$ (expression) values from GEO after Robust Multi-array Average normalization] were mapped to hgu133a.db using bioconductor. Significance values: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

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.