Corso di

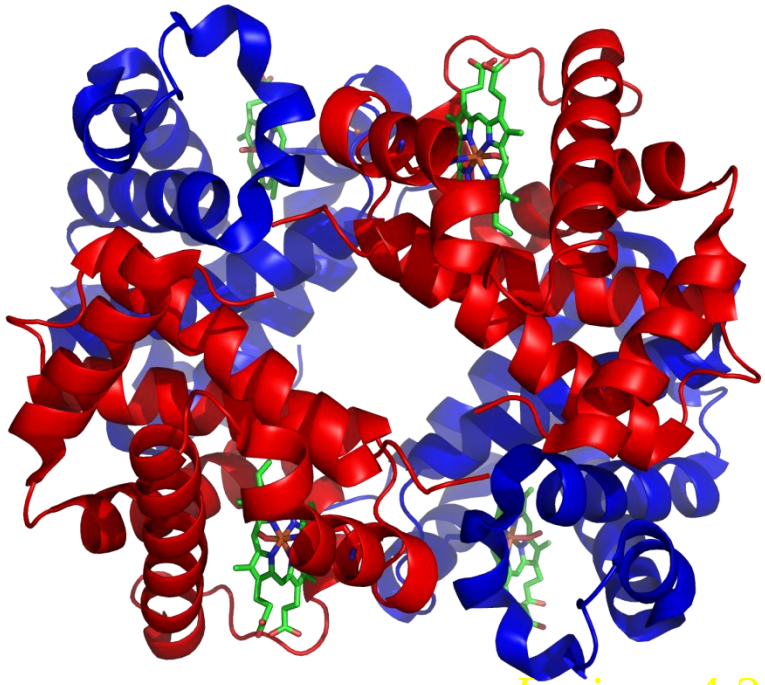
Proprietà di Biopolimeri

Prof. R. Urbani

Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche
Tel 040 558 3684
e-mail: rurbani@units.it

a.a. 2021-2022

Bioinformatica
Similitudine ed omologia

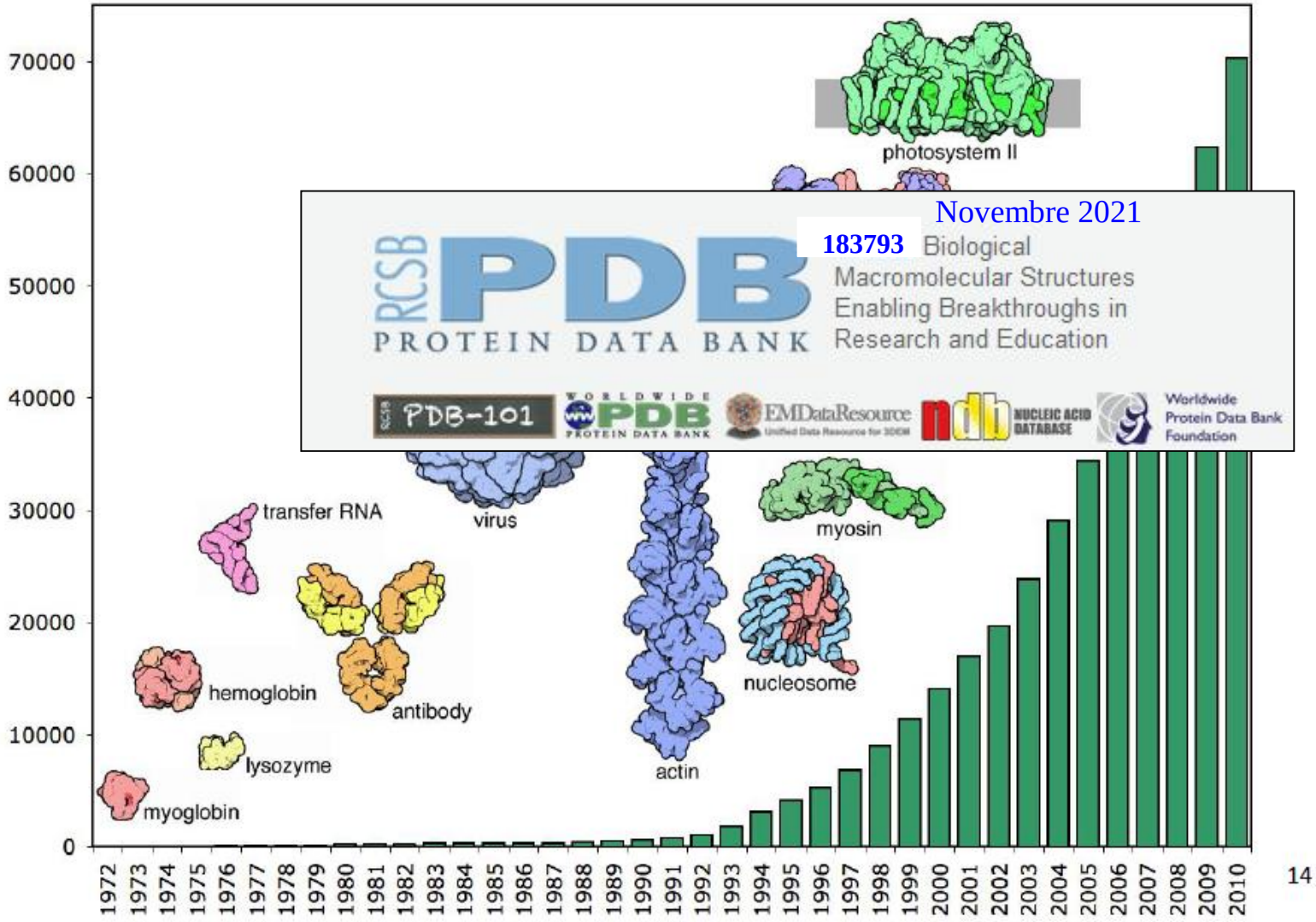


Lezione 4.2

Metodi per la predizione della struttura (e della funzione) dei biopolimeri

La struttura 3D di una proteina e' molto complessa (1958, John Kendrew, prima struttura della mioglobina)

strutture depositate nel Protein Data Bank

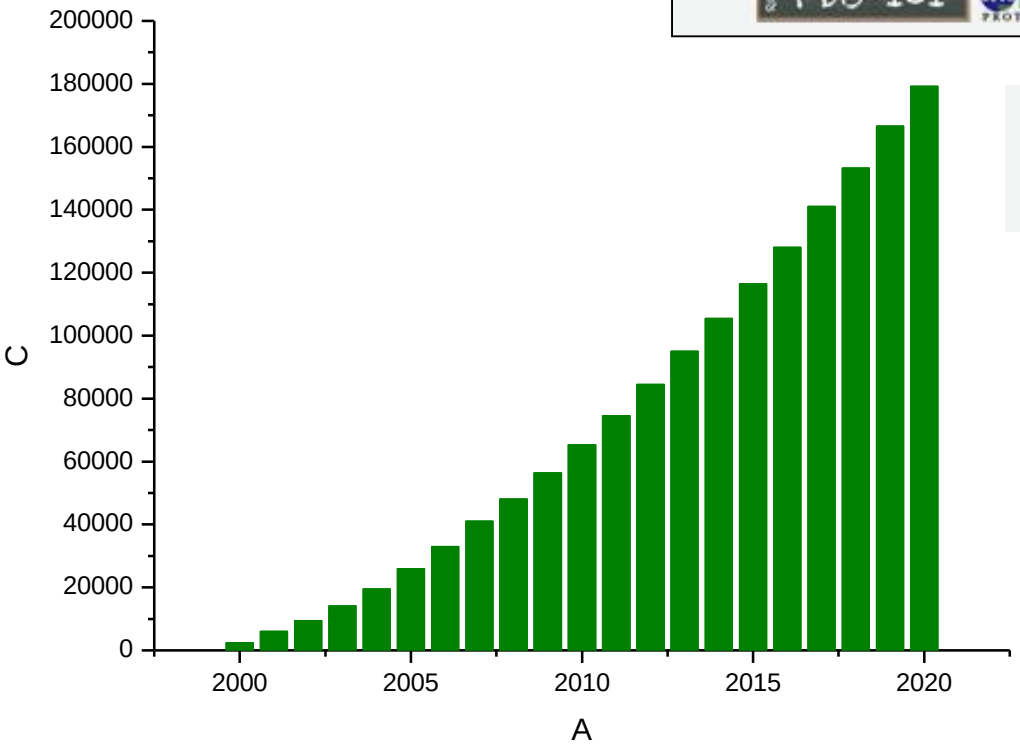


Novembre 2021

183793 Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education

RCSB PDB PROTEIN DATA BANK

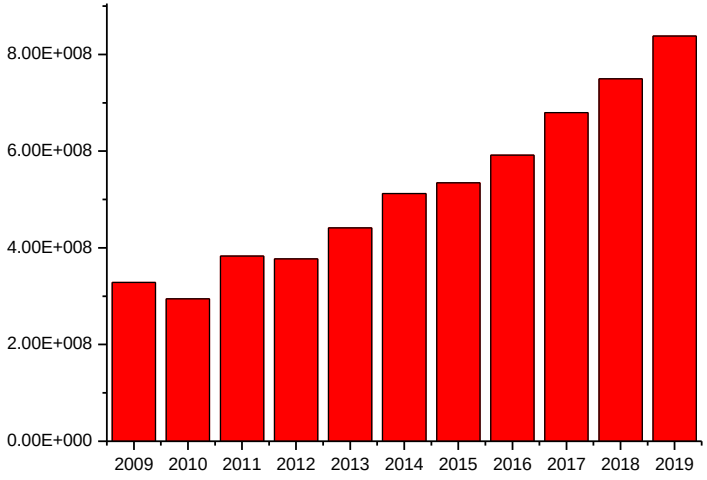
PDB-101 | Worldwide PDB | EMDataResource | NDB Nucleic Acid Database | Worldwide Protein Data Bank Foundation



Celebrating YEARS OF Protein Data Bank

1971-2021

Download annuale



Lo scopo della Bioinformatica e della Biochimica Computazionale è quello di offrire strumenti e metodologie capaci di gestire ed analizzare la grande quantità di informazioni prodotte nel campo della ricerca biochimica,

determinata soprattutto dall'enorme produzione di sequenze di acidi nucleici e di proteine, che è il risultato degli studi relativi alle due discipline *omiche*: genomica e proteomica

gli strumenti computazionali e bioinformatici sono di grande aiuto, anche se essi devono essere considerati naturalmente complementari e non alternativi alle normali tecniche sperimentali

Dalla sequenza alla struttura secondaria

Dall'analisi delle sequenze delle proteine è possibile predire la struttura secondaria che tali sequenze possono assumere.

Metodi per la predizione delle strutture secondarie:

- **Approcci statistici**: Chou and Fasman, Garnier-Osguthorpe-Robson (GOR)
- **Proprietà chimico fisiche**: Rose, Eisenberg et al., …
- **Riconoscimento di pattern**: Lim, Cohen et al., …
- **Reti Neurali**: PHD, PSIPRED, …

STRUMENTI DI PREVISIONE DELLE PROPRIETA' DI BIOPOLIMERI

METODI DI PRIMA GENERAZIONE

Scale di propensità

- Statistiche sulla presenza dei 20 amminoacidi nelle differenti strutture
- Considerazioni fisico-chimiche

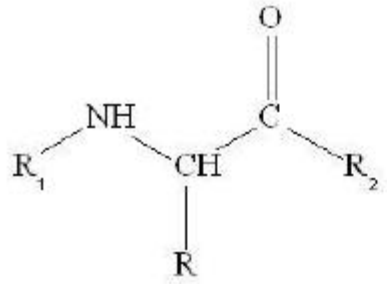
Ad ogni tipo di amminoacido viene attribuito un valore di propensità ad assumere una certa struttura

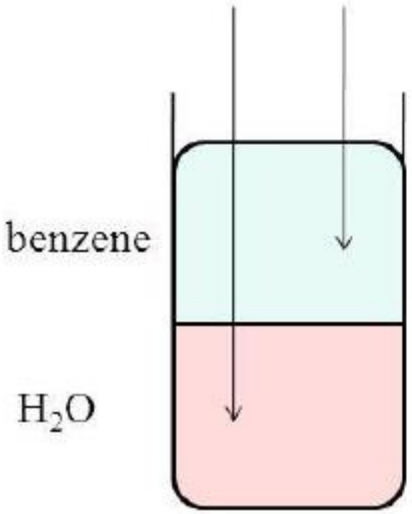
An amino acid scale is defined by a numerical value assigned to each type of amino acid. The most frequently used scales are the hydrophobicity or hydrophilicity scales and the secondary structure conformational parameters scales, but many other scales exist which are based on different chemical and physical properties of the amino acids.

Molecular weight
Bulkiness
Polarity / Grantham
Recognition factors
Hphob. OMH / Sweet et al.
Hphob. / Kyte & Doolittle
Hphob. / Abraham & Leo
Hphob. / Bull & Breese
Hphob. / Guy
Hphob. / Miyazawa et al.
Hphob. / Roseman
Hphob. / Wolfenden et al.
Hphob. HPLC / Wilson & al
Hphob. HPLC pH3.4 / Cowan
Hphob. / Rf mobility
HPLC / TFA retention
HPLC / retention pH 2.1
% buried residues
Hphob. / Chothia
Ratio hetero end/side
Average flexibility
beta-sheet / Chou & Fasman
alpha-helix / Deleage & Roux
beta-turn / Deleage & Roux
alpha-helix / Levitt
beta-turn / Levitt
Antiparallel beta-strand
A.A. composition
Relative mutability

Number of codon(s)
Polarity / Zimmerman
Refractivity
Hphob. / Eisenberg et al.
Hphob. / Hopp & Woods
Hphob. / Manavalan et al.
Hphob. / Black
Hphob. / Fauchere et al.
Hphob. / Janin
Hphob. / Rao & Argos
Hphob. / Tanford
Hphob. / Welling & al
Hphob. HPLC / Parker & al
Hphob. HPLC pH7.5 / Cowan
HPLC / HFBA retention
Transmembrane tendency
HPLC / retention pH 7.4
% accessible residues
Hphob. / Rose & al
Average area buried
alpha-helix / Chou & Fasman
beta-turn / Chou & Fasman
beta-sheet / Deleage & Roux
Coil / Deleage & Roux
beta-sheet / Levitt
Total beta-strand
Parallel beta-strand
A.A. comp. in Swiss-Prot

Le scale di idropatia





costante di ripartizione

$$K_R = \frac{[\text{amminoacido}]_{\text{benzene}}}{[\text{amminoacido}]_{H_2O}}$$

L'energia libera per il trasferimento dell'amminoacido dall'acqua al benzene è una misura della idrofobicità

$$\Delta G_{H_2O \rightarrow \text{benzene}} = RT \ln K_R$$

scala
Kyte & Doolittle (1982)

Ala	1.8
Arg	-4.5
Asn	-3.5
Asp	-3.5
Cys	2.5
Gln	-3.5
Glu	-3.5
Gly	-0.4
His	-3.2
Ile	4.5
Leu	3.8
Lys	-3.9
Met	1.9
Phe	2.8
Pro	-1.6
Ser	-0.8
Thr	-0.7
Trp	-0.9
Tyr	-1.3
Val	4.2

Kyte, J. and Doolittle, R.F. (**1982**) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol., 157, 105-132

www.expasy.org

Swiss Institute of Bioinformatics

Home About SIB News Contact

Expasy

Swiss Bioinformatics Resource Portal

e.g. BLAST, UniProt, MSH6, Albumin...

- Genes & Genomes
  - Genomics
  - Metagenomics
  - Transcriptomics
- Proteins & Proteomes
- Evolution & Phylogeny
  - Evolution biology
  - Population genetics
- Structural Biology
  - Drug design
  - Medicinal chemistry
  - Structural analysis
- Systems Biology
  - Glycomics
  - Lipidomics
  - Metabolomics
- Text mining & Machine learning

SIB Resources

Other Resources of SIB Groups

SwissParam
Topology and parameters for small molecules

SWISS-MODEL Workspace
Fully automated protein structure homology-modeling server

SwissBioIsostere
Database of molecular replacements for ligand design

OpenStructure
Molecular modelling and visualisation environment

Swiss-PdbViewer
Display, analyse and superimpose protein 3D structures

MARCOIL
Coiled-coil regions in protein sequences

SwissSidechain
Database of non-natural amino acid side chains

Click2Drug
Directory of computational drug design tools

QMEAN
Protein model quality estimation

rBAN
Mapping of non-ribosomal peptides in SMILES format

SwissTargetPrediction
Target prediction for bioactive small molecules

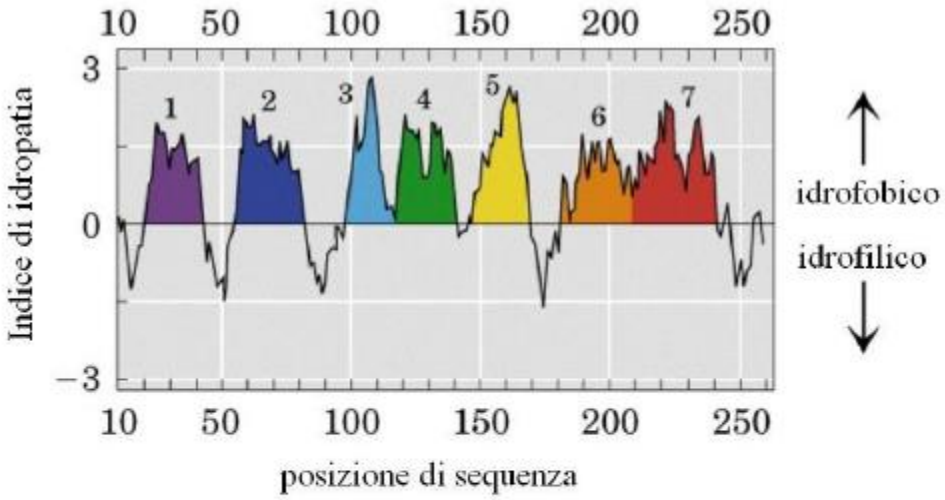
1.2 Analisi del profilo di idrofobicità

La conoscenza della struttura primaria di una proteina permette anche di prevederne il profilo di idrofobicità, vale a dire come cambiano le caratteristiche di idrofilicità e di idrofobicità lungo la sequenza. Questa informazione può essere utilizzata per prevedere la possibile interazione di una proteina con le membrane fosfolipidiche della cellula.

Amino Acid Hydropathy Scores [1]

Amino Acid	One Letter Code	Hydropathy Score
Isoleucine	I	4.5
Valine	V	4.2
Leucine	L	3.8
Phenylalanine	F	2.8
Cysteine	C	2.5
Methionine	M	1.9
Alanine	A	1.8
Glycine	G	-0.4
Threonine	T	-0.7
Serine	S	-0.8
Tryptophan	W	-0.9
Tyrosine	Y	-1.3
Proline	P	-1.6
Histidine	H	-3.2
Glutamic acid	E	-3.5
Glutamine	Q	-3.5
Aspartic acid	D	-3.5
Asparagine	N	-3.5
Lysine	K	-3.9
Arginine	R	-4.5

Kyte J, Doolittle RF (May 1982).
"A simple method for displaying the hydropathic character of a protein".
J. Mol. Biol. 157 (1): 105–32.

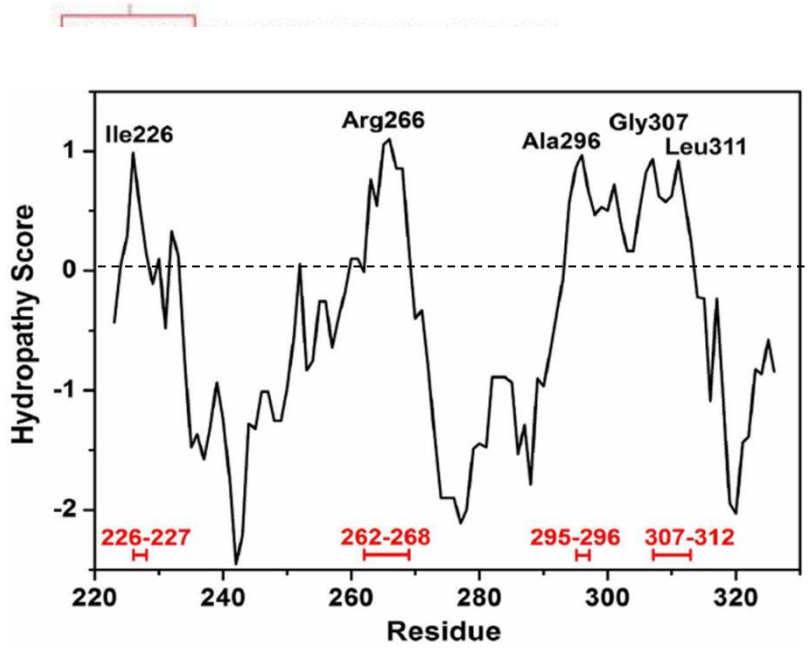


Nella parte alta della schermata che otterrete vengono indicati i valori di idrofobicità/idrofilicità attribuiti a ciascun residuo, valori più positivi indicano maggiore idrofobicità. I picchi del grafico sottostante rappresentano quindi le regioni di maggiore idrofobicità (vale a dire quelle in cui più residui idrofobici si susseguono in sequenza) e potrebbero corrispondere a regioni transmembrana.

Plot di idropatia

- Valori di idrofobicità di Kyte & Dolittle.

```
Ala:  1.800
Arg: -4.500
Asn: -3.500
Asp: -3.500
Cys:  2.500
Gln: -3.500
Glu: -3.500
Gly: -0.400
His: -3.200
Ile:  4.500
Leu:  3.800
Lys: -3.900
Met:  1.900
Phe:  2.800
Pro: -1.600
Ser: -0.800
Thr: -0.700
Trp: -0.900
Tyr: -1.300
Val:  4.200
```



Esempio: HELP (**H**uman **E**lastinic **L**ike **P**olymers)

Target Sequence:

```
        10         20         30         40         50         60         70
MRGSHHHHHH GSAAAAAAAA KAAAKAAQFG LVPGVGVAPG VGVAPGVGVA PGVGLAPGVG VAPGVGVAPG

        80         90        100        110        120        130        140
VGVAPGIAPA AAAAAKAAAK AAQFGLVPGV GVAPGVGVAP GVGVAPGVGL APGVGVAPGV GVAPGVGVAP

       150        160        170        180        190        200        210
GIAPAAAAAA KAAAKAAQFG LVPGVGVAPG VGVAPGVGVA PGVGLAPGVG VAPGVGVAPG VGVAPGIAPA

       220        230        240        250        260        270        280
AAAAAKAAAK AAQFGLVPGV GVAPGVGVAP GVGVAPGVGL APGVGVAPGV GVAPGVGVAP GIAPAAAAAA

       290        300        310        320        330        340        350
KAAAKAAQFG LVPGVGVAPG VGVAPGVGVA PGVGLAPGVG VAPGVGVAPG VGVAPGIAPA AAAAAKAAAK

       360        370        380        390        400        410        420
AAQFGLVPGV GVAPGVGVAP GVGVAPGVGL APGVGVAPGV GVAPGVGVAP GIAPAAAAAA KAAAKAAQFG

       430        440        450        460        470        480        490
LVPGVGVAPG VGVAPGVGVA PGVGLAPGVG VAPGVGVAPG VGVAPGIAPA AAAAAKAAAK AAQFGLVPGV

       500        510        520        530
GVAPGVGVAP GVGVAPGVGL APGVGVAPGV GVAPGVGVAP GIAP
```

-VAPGVG-

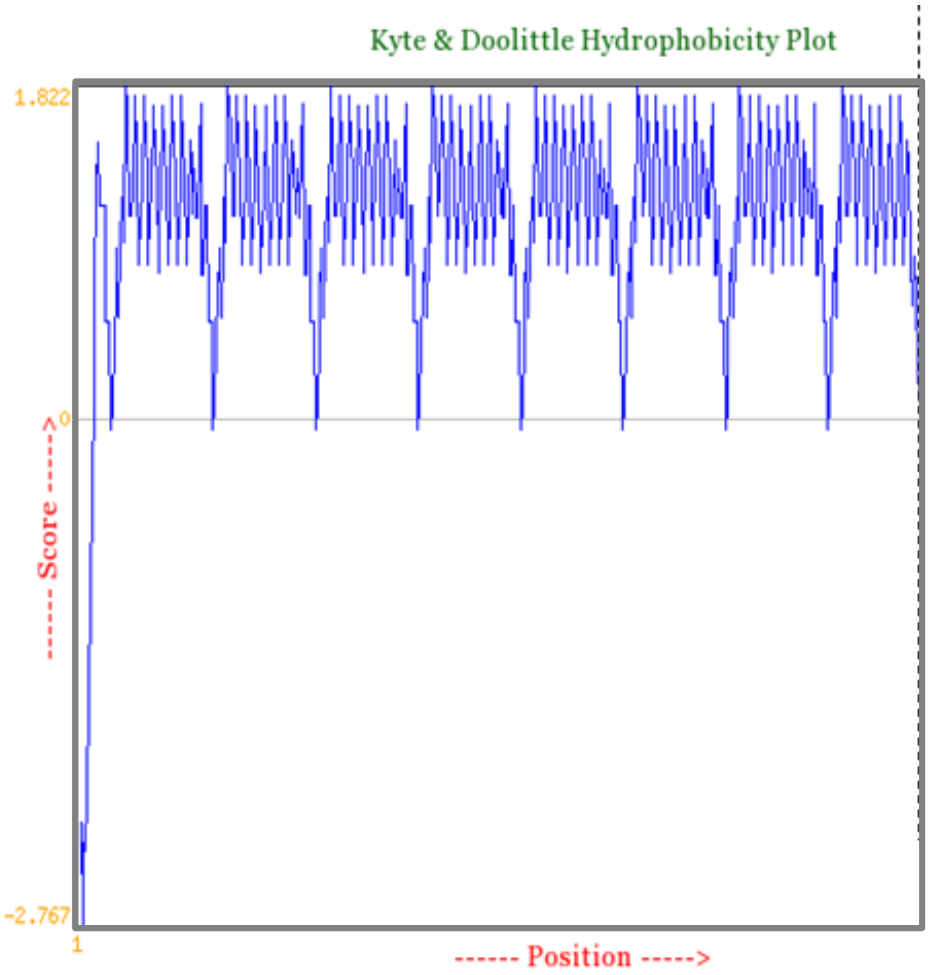

Kyte & Doolittle Hydrophobicity Plot
1.822
0
-2.767
------ Score ----->
1
------ Position ----->
Number of amino acids: 534
Molecular weight: 44729.60
Theoretical pI: 11.68
Amino acid composition:
Ala (A) 154 28.8%
Arg (R) 1 0.2%
Asn (N) 0 0.0%
Asp (D) 0 0.0%
Cys (C) 0 0.0%
Gln (Q) 8 1.5%
Glu (E) 0 0.0%
Gly (G) 130 24.3%
His (H) 6 1.1%
Ile (I) 8 1.5%
Leu (L) 16 3.0%
Lys (K) 16 3.0%
Met (M) 1 0.2%
Phe (F) 8 1.5%
Pro (P) 72 13.5%
Ser (S) 2 0.4%
Thr (T) 0 0.0%
Trp (W) 0 0.0%
Tyr (Y) 0 0.0%
Val (V) 112 21.0%
Pyl (O) 0 0.0%
Sec (U) 0 0.0%
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 17
Total number of atoms: 6505
Extinction coefficients:
As there are no **Trp, Tyr** or **Cys** in the region considered, your protein should not be visible by UV spectrophotometry.
Grand average of hydropathicity (GRAVY): 1.097

Table 1. Chemico-physical parameters obtained using Expasy Tools (ProtParam on-line software)

	MW	p.I.	Hydropathy Index (GRAVY)	% polar a.a.	% charged a.a.	% aromaticity
HUG	60,406	9.9	0.77	5.3	10.0	3.1
HELP	44,886	11.7	1.1	1.9	3.2	0
Human elastin	66,135	10.4	0.62	3.3	7.3	5.5
UnaG	15,581	6.61	-0.49	20.9	32.3	9.3

Metodo di Chou e Fassman

Una delle tecniche di predizione della struttura secondaria su base statistica più usate è quella elaborata da **Chou e Fassman (1974)**, che va a valutare la propensità di ciascun amminoacido a trovarsi in una particolare struttura secondaria (elica, β-strand e coil)

Questo metodo fornisce una tabella nella quale ciascun amminoacido viene classificato con un coefficiente, che riflette la frequenza con la quale esso forma, interrompe o è indifferente alla formazione di ciascun tipo di struttura secondaria ("former", "breaker" o "indifferent").

.

Si assegna quindi ad ogni residuo la conformazione avente maggiore probabilità media su una finestra di un certo numero di amminoacidi (da 5 a 7) che lo circondano.

Previsione della struttura secondaria secondo Chou e Fassman

Il principio della previsione e' il seguente:

- Analizzare le strutture tridimensionali di proteine di riferimento (erano 15 nell'articolo originale) a partire da dati di diffrazione dei raggi X.

- Identificare gli amminoacidi che fanno parte delle tre strutture secondarie principali: α-elica, foglietto β, ripiegamento β.

- Calcolare le frequenze con le quali ciascun residuo ricorre in un'elica

$\mathbf{f_\alpha = n_\alpha / n_T}$ con n_α: numero di volte che il residuo ricorre in un'elica; n_T numero totale delle volte che il residuo compare nella popolazione di proteine scelta),

$\mathbf{f_\beta = n_\beta / n_T}$ in un foglietto

$\mathbf{f_\tau = n_\tau / n_T}$ in un ripiegamento

•Calcolare il valor medio di $\mathbf{f_\alpha}$, $\mathbf{f_\beta}$ **e** $\mathbf{f_\tau}$ per i 20 residui, con la formula seguente: $\mathbf{<f_\alpha> = \Sigma f_\alpha/20}$.

•Calcolare la propensione a formare l'una o l'altra delle strutture secondarie:

$\mathbf{P_\alpha = f_\alpha/<f_\alpha>}$; $\mathbf{P_\beta = f_\beta/<f_\beta>}$; $\mathbf{P_\tau = f_\tau/<f_\tau>}$.

•I valori di P indicano la propensione del residuo ad essere in una delle strutture secondarie quando il valore è superiore alla media (cioè P>1).

Conformational Preferences of the Amino Acids

Amino acid	Preference α-helix	β-strand	Reverse turn
Glu	**1.59**	0.52	1.01
Ala	**1.41**	0.72	0.82
Leu	**1.34**	1.22	0.57
Met	**1.30**	1.14	0.52
Gln	**1.27**	0.98	0.84
Lys	**1.23**	0.69	1.07
Arg	**1.21**	0.84	0.90
His	**1.05**	0.80	0.81
Val	0.90	**1.87**	0.41
Ile	1.09	**1.67**	0.47
Tyr	0.74	**1.45**	0.76
Cys	0.66	**1.40**	0.54
Trp	1.02	**1.35**	0.65
Phe	1.16	**1.33**	0.59
Thr	0.76	**1.17**	0.90
Gly	0.43	0.58	**1.77**
Asn	0.76	0.48	**1.34**
Pro	0.34	0.31	**1.32**
Ser	0.57	0.96	**1.22**
Asp	0.99	0.39	**1.24**

Struttura secondaria: Metodo di Chou-Fasman

Dato un insieme di strutture note, si conta quante volte ognuno degli amminoacidi è presente in una data struttura e si determina il grado di indipendenza tra l'amminoacido e la struttura

Esempio:

AL**A**KSL**A**KPSDTL**A**KSDFREKWEWLKLLK**A**L**A**CCKLS**AA**L
hh**h**hhh**h**hccccc**c**ccccccchhhhhhhh**h**h**h**hhhhhh**hh**h

N(A,h) = 7, N(A,c) =1, N=40, N(A)=8, N(h)=27
P(A,h) = 7/40, P(A) = 8/40, P(h) = 27/40

Se amminoacido e struttura sono indipendenti:
P(A,h) = P(A)P(h)

1.29

Il rapporto P(A,h)/P(A)P(h) è detto propensione

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI
Chou,P,Y,, Fasman, G,D, 1973; J, Mol, Biol,, 74, 263-81,
Chou,P,Y,, Fasman, G,D, 1974; Biochemistry, 13, 211-22,
Chou,P,Y,, Fasman, G,D, 1974; Biochemistry, 13, 222-45

Calcolo dell'affidabilità delle predizioni:

Q3 score: la percentuale di residui di una proteina la cui struttura secondaria viene correttamente predetta dai vari metodi

Predizione strutture secondarie: accuratezza

La misura più usata per misurare il successo di un algoritmo di predizione di struttura secondaria è la misura di **accuratezza nei tre stati**: (eliche, beta, loop).

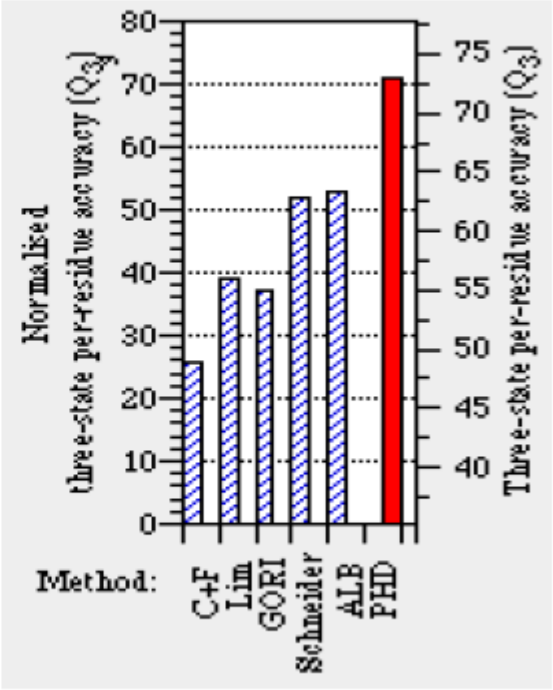
$$Q_3 = 100 \frac{\sum c_i}{N}$$

Sommatoria dei residui correttamente predetti in ciascun stato diviso i residui totali per 100.

Algoritmi di 1° generazione: <50% accuratezza

Algoritmi di 2° generazione: <60% accuratezza

Algoritmi di 3° generazione: >70% accuratezza



Algoritmi di 1° e 2° generazione: barre tratteggiate
Algoritmi di 3° generazione: barre rosse

I valori di P per in singoli amminoacidi e per le strutture secondarie sono riportati nella tabella seguente:

	P_α			P_β			P_τ
Glu	1,51	(HA)	Val	1,70	(HB)	Asn	1,56
Met	1,45	(HA)	Ile	1,60	(HB)	Gly	1,56
Ala	1,42	(HA)	Tyr	1,47	(HB)	Pro	1,52
Leu	1,21	(HA)	Phe	1,38	(hB)	Asp	1,46
Lys	1,16	(hA)	Trp	1,37	(hB)	Ser	1,43
Phe	1,13	(hA)	Leu	1,30	(hB)	Cys	1,19
Gln	1,11	(hA)	Cys	1,19	(hB)	Tyr	1,14
Trp	1,08	(hA)	Thr	1,19	(hB)	Lys	1,01
Ile	1,08	(hA)	Gln	1,10	(hB)	Gln	0,98
Val	1,06	(hA)	Met	1,05	(hB)	Thr	0,98
Asp	1,01	(IA)	Arg	0,93	(iB)	Trp	0,96
His	1,00	(IA)	Asn	0,89	(iB)	Arg	0,96
Arg	0,98	(iA)	His	0,87	(iB)	His	0,95
Thr	0,83	(iA)	Ala	0,83	(iB)	Glu	0,74
Ser	0,77	(iA)	Ser	0,75	(bB)	Ala	0,66
Cys	0,70	(iA)	Gly	0,75	(bB)	Met	0,60
Tyr	0,69	(bA)	Lys	0,74	(bB)	Phe	0,60
Asn	0,67	(bA)	Pro	0,55	(BB)	Leu	0,59
Pro	0,57	(BA)	Asp	0,54	(BB)	Val	0,50
Gly	0,57	(BA)	Glu	0,37	(BB)	Ile	0,47

HA, hA, IA, iA: induttori di α-eliche (forte, medio, debole, indifferente)

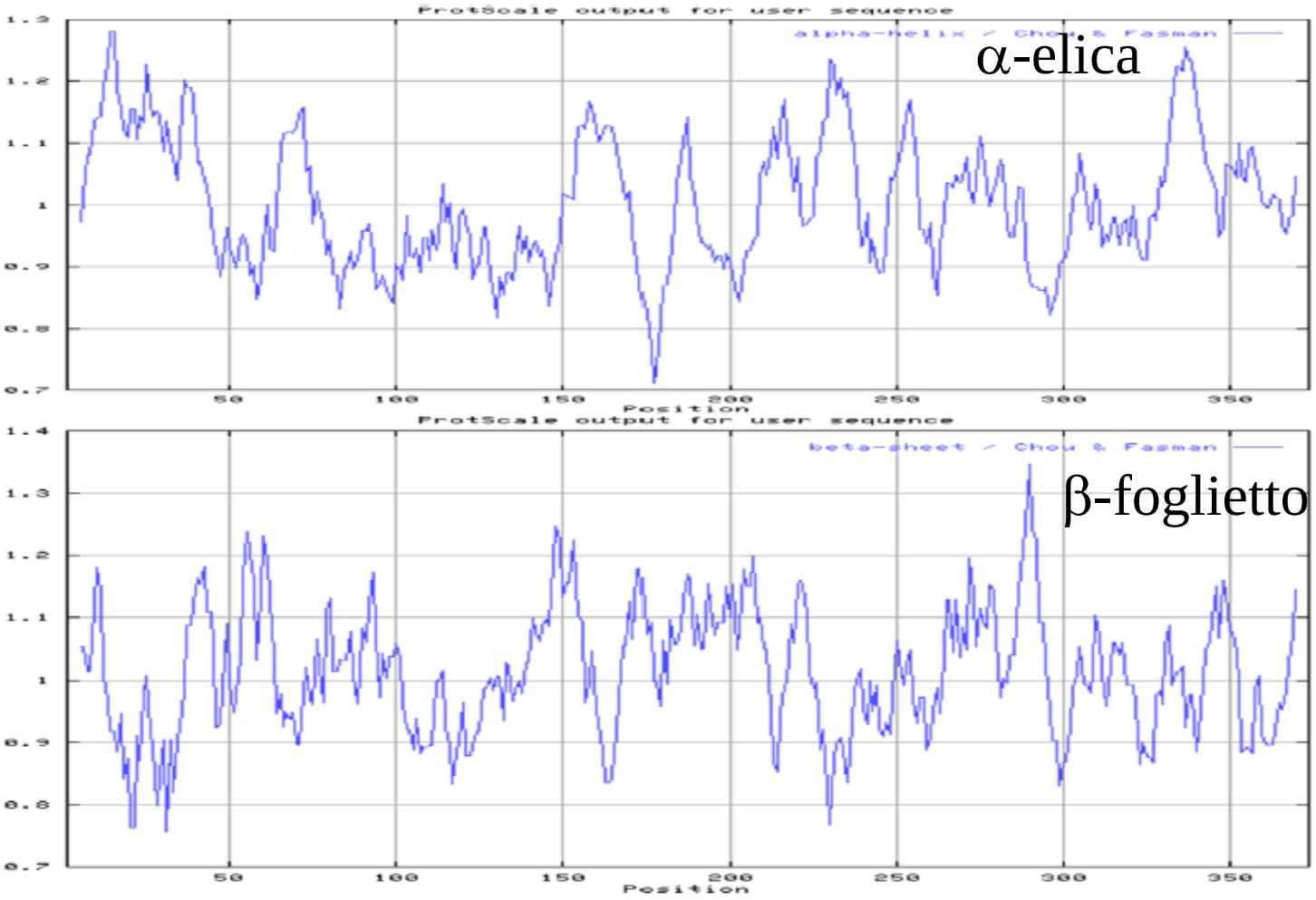
bA, BA: interruttori di α-eliche (deboli e forti)

HB, hB, IB, iB: induttori di foglietto β (forte, medio, debole, indifferente)

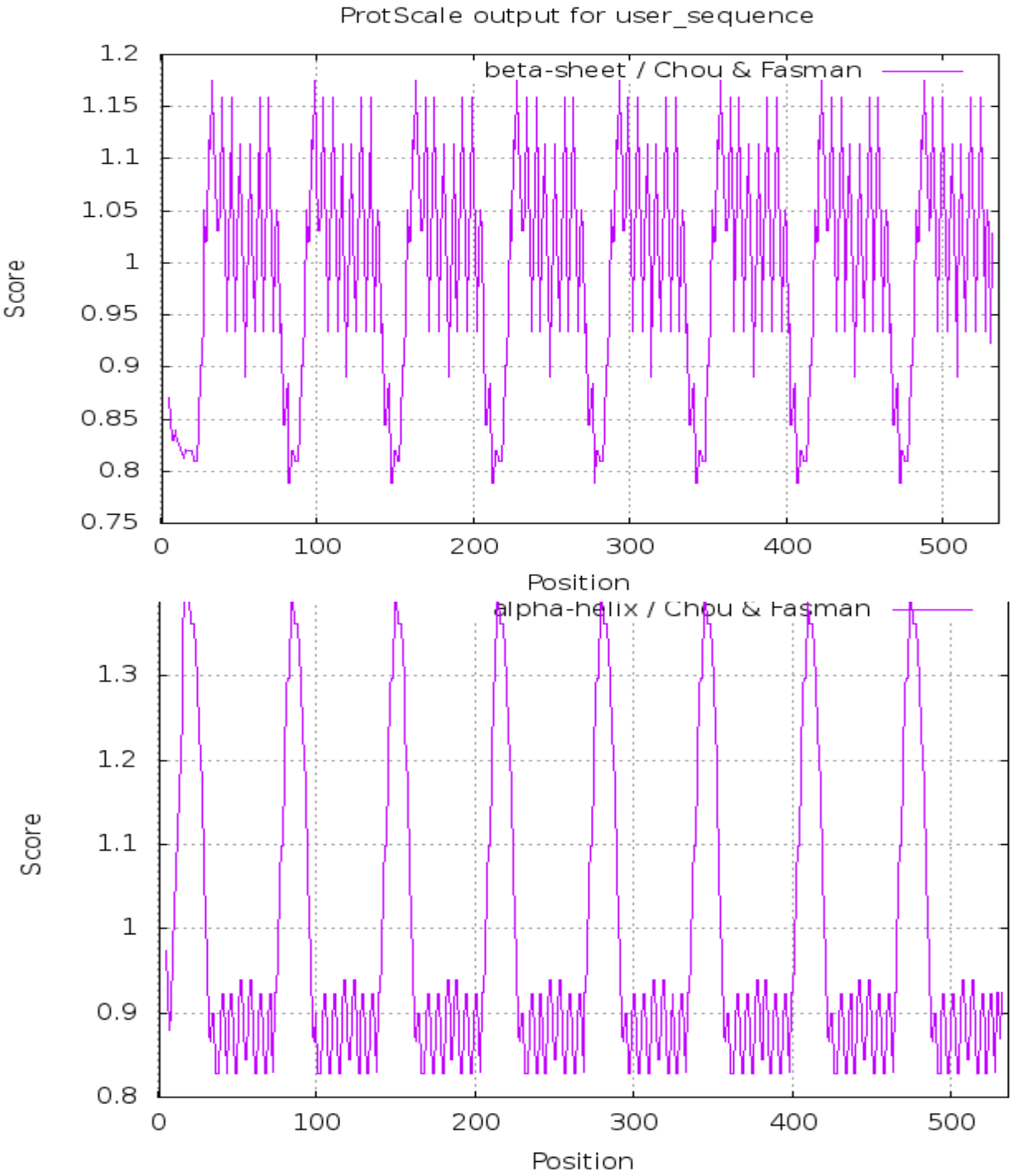
bB, BB: interruttori di foglietto β (debole e forte)

Il dataset originale comprendeva solo 15 proteine; in seguito venne ampliato fino a 144 proteine.
L'affidabilità del metodo è abbastanza bassa (circa **50**%), tuttavia il metodo Chou-Fasman è ancora molto utilizzato grazie soprattutto alla semplicità di approccio.

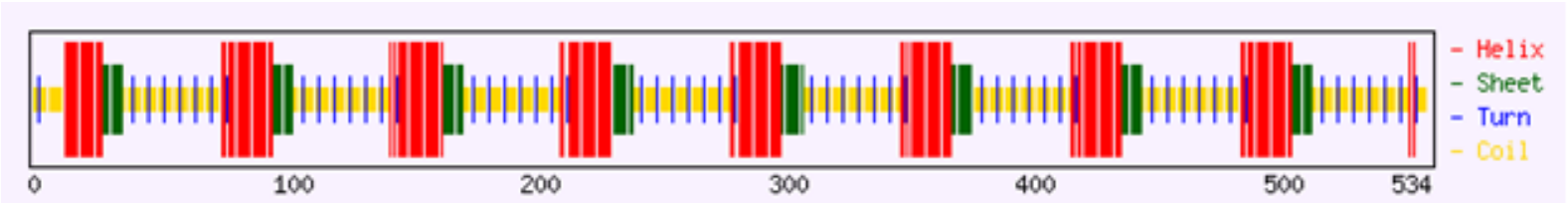
Data una nuova sequenza si mettono in grafico i valori di propensità, residuo per residuo e si ricava una predizione di struttura secondaria



HELP


ProtScale output for user_sequence
beta-sheet / Chou & Fasman
Score
Position
1.2
1.15
1.1
1.05
1
0.95
0.9
0.85
0.8
0.75
0
100
200
300
400
500
alpha-helix / Chou & Fasman
Score
Position
1.3
1.2
1.1
1
0.9
0.8
0
100
200
300
400
500

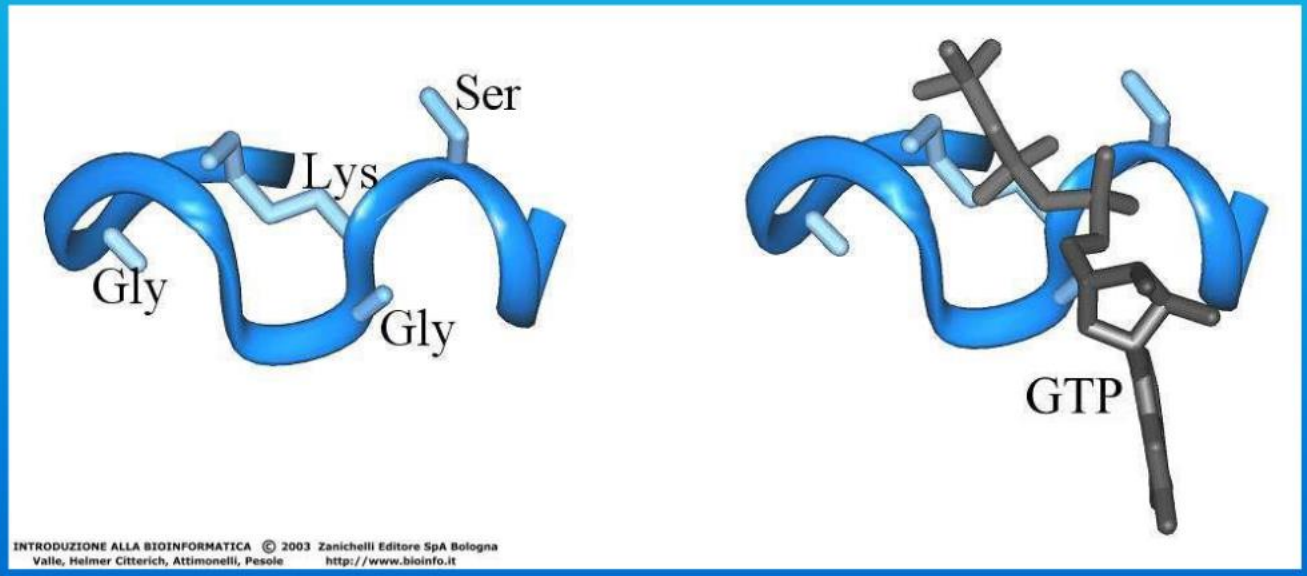
Struttura secondaria di HELP



	number of a.a.	α-helix %	β-strand %	random coil + β-turn, %
HUG	675	22	10	68
HELP	536	26	4	70
Human ELP	757	23	12	65
UnaG	141	8	35	57

Definizione di pattern

Un pattern è costituito da un insieme di caratteri (nucleotidi o amminoacidi) non necessariamente contigui nella sequenza ma che si trovano sempre o sono spesso associati ad una precisa struttura e funzione biologica (ad esempio: promotori o hanno la stessa capacità di legare nucleotidi)



Caratteristiche chimico-fisiche e riconoscimento di pattern:

Metodi di predizione che si avvalgono del riconoscimento di pattern strutturali specifici o di caratteristiche chimico-fisiche per identificare la presenza di elementi di struttura secondaria.

Possono usare allineamenti multipli di sequenze anziché sequenze singole, e tengono conto di:

- Posizioni di inserzioni e delezioni (di solito in corrispondenza di loop)
- Gly e Pro conservate (presenza di beta turn)
- Residui polari e idrofobici alternati (presenza di beta strand di superficie)
- Amminoacidi idrofobici e idrofili con periodicità 3.6 (alfa eliche anfifiliche)

La predittività con questi metodi migliora di circa 8-9% rispetto ai soli metodi statistici.

A cosa può servire il risultato della predizione della struttura secondaria ?

L'utilizzo dipende dall'affidabilità della predizione:

-definizione della classe strutturale e confronto con classificazione di proteine (db SCOP, CATH)

-confronto con organizzazione di struttura secondaria di proteine note

- confronto con risultati di altri metodi (anche metodi di predizione della struttura terziaria)

Metodi di predizione della struttura secondaria delle proteine:

Metodi di Chou-Fasman si basa sull'analisi statistica della composizione in residui delle strutture secondarie presenti nella PDB. (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1)

GOR si basa sull'analisi statistica della composizione in residui delle strutture secondarie presenti nella PDB.

(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)

AGADIR per predire la percentuale di residui in elica

(http://www.embl-heidelberg.de/Services/serrano/agadir/agadir-start.html)

PHD prende in input o una sequenza o un allineamento multiplo ed usa le reti neurali.

(http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html)

PSIPRED utilizza un sistema di due reti neurali. (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)

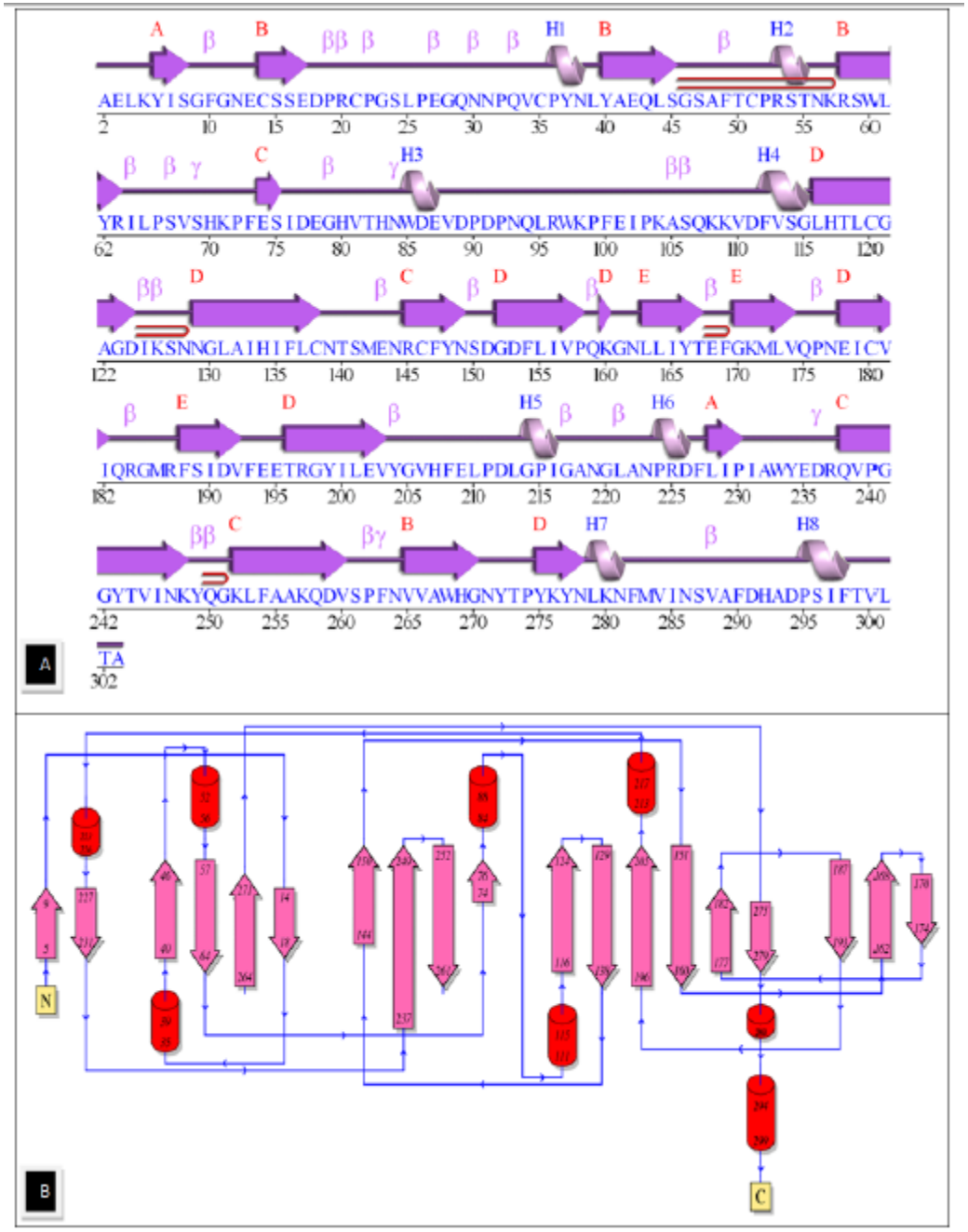
PREDATOR si basa sull'applicazione del metodo del k-esimo vicino che usa le reti neurali

(http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/predator-simple.html)

JPRED (http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/JPred/jpred.html) fa un consensus di vari metodi

Struttura secondaria

Struttura terziaria



METODI BASATI SULL'ANALISI DELLA SINGOLA SEQUENZA

Metodi di I° GENERAZIONE

- *Metodo Chou-Fasman* (1974, $Q_3 \approx 50\%$)

In realtà questi metodi calcolano la propensione alla struttura secondaria basandosi su singola sequenza e con un contesto locale molto ridotto

- *Il metodo GOR (Garnier-Osguthorpe-Robson, 1978) è una modificazione del metodo precedente e valuta finestre di contesto locale più ampie (Q_3 50-60%).*

Metodi di II° GENERAZIONE

In auge fino agli anni 90 questi metodi prendono in considerazione contesti locali più ampi (fino a 51 AA) ed anche allineamenti multipli sebbene anche questi metodi soffrono di alcuni inconvenienti e si attestano poco oltre il 60% di Q_3.

Il metodo GOR (Garnier-Osguthorpe-Robson, 1978)

GOR si basa sull'analisi statistica della composizione in residui delle strutture secondarie presenti in PDB.

Utilizza una finestra di **17 residui (8-1-8)** per determinare la probabilità del residuo centrale di far parte di una specifica struttura secondaria

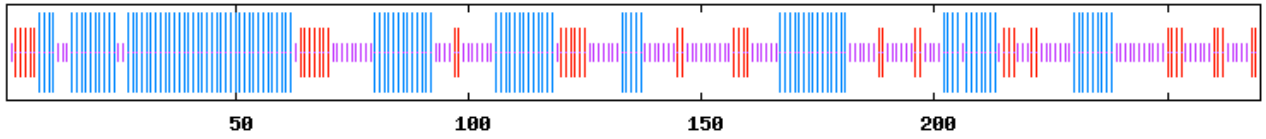
Utilizzando un set di proteine a struttura nota, vengono calcolate le frequenze con le quali un certo aminoacido, in presenza di altri aminoacidi vicini, si trovi ad assumere una certa conformazione (alpha, beta o loops) e fornisce una matrice di punteggio per ciascuna struttura.

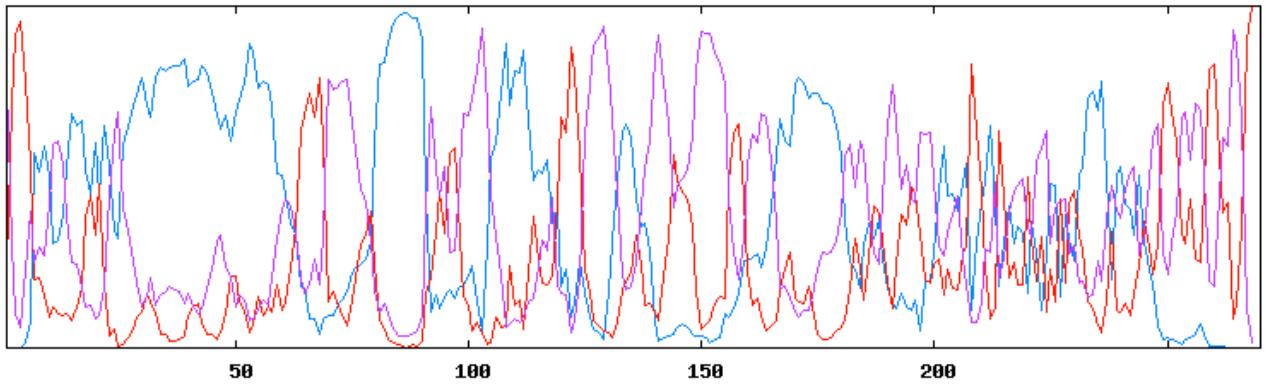
GOR4 result for : UNK_715000

Abstract GOR secondary structure prediction method version IV, J. Garnier, J.-F. Gibrat, B. Robson, Methods in Enzymology,R.F. Doolittle Ed., vol 2

View GOR4 in: [AnTheProt (PC) , Download...] [HELP]

```
         10        20        30        40        50        60        70
          |         |         |         |         |         |         |
MKKITIYDLAELSGVSASAVSAILNGNWKKRRISAKLAEKVTRIAEEQGYAINRQASMLRSKKSHVIGMI
ccceeeeehhhhcccchhhhhhhhhhcchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhceeeeeee
IPKYDNRYFGSIAERFEEMARERGLLPIITCTRRRPELEIEAVKAMLSWQVDWVVATGATNPDKISALCQ
ecccccccccchhhhhhhhhhhhhcccceecccccccchhhhhhhhhhhhhceeeeeeccccccchhhhhcc
QAGVPTVNLDLPGSLSPSVISDNYGGAKALTHKILANSARRRGELAPLTFIGGRRATITPASVYAASTMR
ccccceeccccccccccceeeeccccccchhhhhhhhhhhhhhhcccccceecccccceecccchhhhchhh
IASWGLACRRRIFWLPAIRKATLRTACRSGLAARRRCCRGYLLTRRYPWKGLCAGCRRWV
hhhhceeecccceecccccccchhhhhhhhhccccccccccceeeeccccccceeecccccee

Sequence length :   270

GOR4 :
   Alpha helix      (Hh) :   116 is  42.96%
   3_10  helix      (Gg) :     0 is   0.00%
   Pi helix         (Ii) :     0 is   0.00%
   Beta bridge      (Bb) :     0 is   0.00%
   Extended strand  (Ee) :    44 is  16.30%
   Beta turn        (Tt) :     0 is   0.00%
   Bend region      (Ss) :     0 is   0.00%
   Random coil      (Cc) :   110 is  40.74%
   Ambigous states  (?)  :     0 is   0.00%
   Other states          :     0 is   0.00%
```





Q_3 <60%

SOLUZIONE PROPOSTA
METODI DI III° GENERAZIONE

Le reti neurali sembrano essere la risposta migliore perché sono in grado di imparare da un set di dati composto da allineamenti multipli e ricercano relazioni tra posizioni distanti all'interno dell'allineamento multiplo che sono fondamentali per la formazione della struttura secondaria. Le informazioni "evolutive" dell'allineamento multiplo hanno dato uno dei maggiori contributi all'aumento della accuratezza di tali metodi.

$$Q_3 > 70\%$$

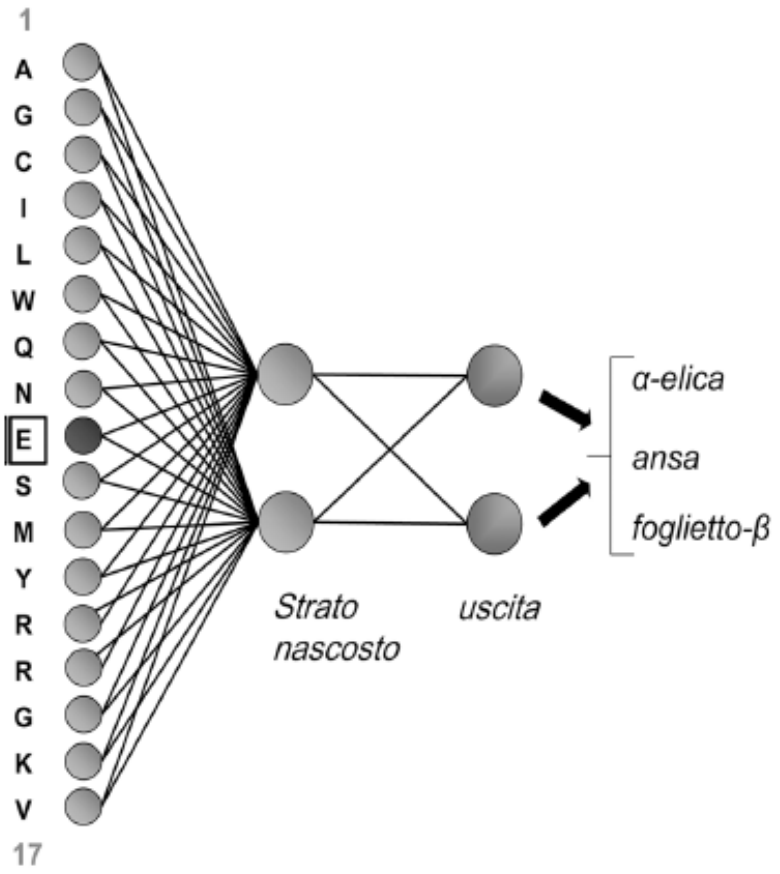
Predittori di 3° generazione: reti neurali

Sono su **reti neurali,** sistemi che simulano le operazioni dei neuroni del cervello.

Di solito vi sono 3 layer, ciascuno composto da unità elementari (neuroni) che formano connessioni (sinapsi) con ciascun neurone del layer successivi

I segnali passano da un **input layer** che raccoglie informazioni su una finestra di residui, sono inviati ad un **hidden layer** che elabora i segnali secondo una funzione matematica e li invia ad un **output layer** che predice la struttura secondaria dell'ammino acido centrale nella finestra.

I segnali sono pesati e tali pesi possono essere modificati durante l'operazione di **apprendimento** in cui vengono minimizzati gli errori di predizione in un **training set** di proteine a struttura nota



Cosa c'entra tutto ciò con le proteine?

le reti neurali possono **riconoscere** la presenza di ***particolari segnali di sequenza*** e prevedere proprietà strutturali e funzionali associate al segnale. Esempio: la **struttura secondaria**

Storicamente: approcci statistici basati sull'osservazione (frequenza di residui in particolari ss; "propensione"; Chou e Fasman, 1974)

Il problema però è molto adatto alle NN:
L'idea:
la rete può "leggere" una porzione di sequenza e decidere se il residuo centrale appartiene alle due principali ss periodiche (α-elica, β sheet) o a nessuno delle due.
Usando poi finestre scorrevoli si può estendere la ricerca a tutta la sequenza

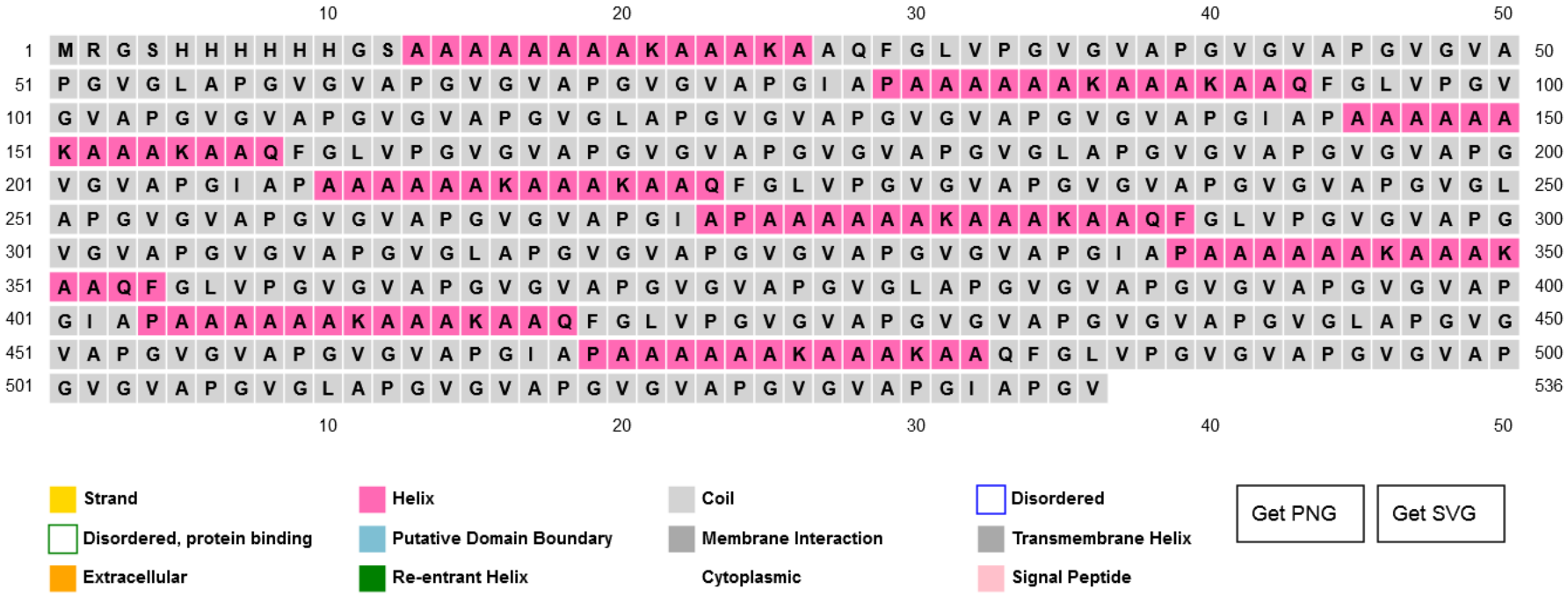
Quali metodi di predizione utilizzare?

Neural network method	Accuracy (Q3)	Seq info	Evo info
Qian &Sejnowski 1988 (Qian and Sejnowski, 1988)	64.3%	✓	
PHD 1994 (Rost et al., 1994)	71.4%	✓	✓
PSIPRED 1997 (Jones, 1999)	76.5%	✓	✓
JPRED3 2008 (Cole et al., 2007)	81.5%	✓	✓
SPIDER3 2017 (Heffernan et al., 2017)	84%	✓	✓

HELP

PSIPRED ≡ UCL Department of Computer Science: Bioinformatics Group

http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/



Metodi Comparativi

Con il procedere dei progetti di sequenziamento stiamo assistendo ad una crescita esponenziale nel numero delle sequenze ma con poca conoscenza circa la loro struttura e funzione.

La determinazione della struttura e funzione di una sequenza non è un compito facile quindi la via migliore per arrivare alla comprensione della funzione e struttura delle sequenze è quella di mettere in relazione queste sequenze con altre sequenze conosciute **utilizzando metodi comparativi**.

I metodi di confronto delle sequenze rappresentano quindi il primo passo verso la caratterizzazione funzionale delle sequenze il cui compito è determinare **la relazione esistente tra struttura e funzione.**

I metodi comparativi di analisi possono essere applicati a diversi livelli:

- sequenza primaria
- struttura 3D

Le metodologie più utilizzate nei metodi di analisi comparativi sono:

- allineamento
- ricerca in banca dati

ALLINEAMENTO TRA SEQUENZE

L'allineamento tra due sequenze è fondamentale per determinarne la similarità reciproca ed inferire rapporti di omologia, funzione e conformazione strutturale.

Per raggiungere tale obiettivo occorrono due cose fondamentali:

1) **Un algoritmo efficiente che sia in grado di rappresentare il più correttamente possibile la reale similarità tra le sequenze**
2) **Dei criteri di punteggio di similarità che siano in grado di definire la bontà dell'allineamento finale che si ottiene tra le sequenze e che supporti la creazione dell'allineamento stesso in fase di costruzione**

Algoritmi euristici di allineamento

Sono nati insieme alle banche dati, con lo scopo di permettere una ricerca rapida, anche se meno accurata, utilizzando la similarità a coppie (o "pairwise") sulle migliaia di sequenze depositate.

Attualmente i programmi più utilizzati sono:

FASTA: Lipman & Pearson (1985)

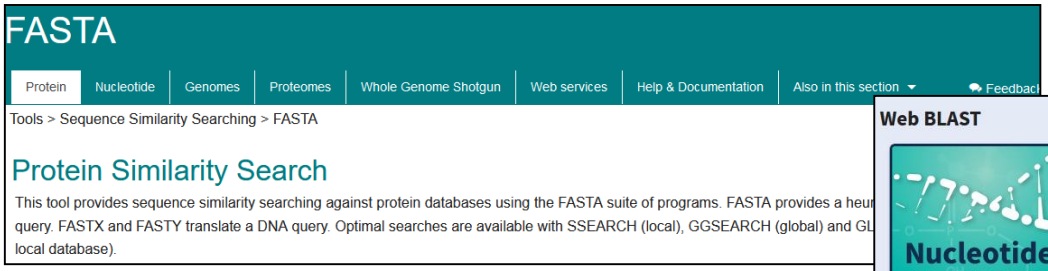
Nasce con il nome di FAST-P (ricerca veloce di proteine), ma poi viene adattato per gli acidi nucleici (FAST-N), quindi riunito in un FAST per tutti, FAST-A, o semplicemente FASTA.

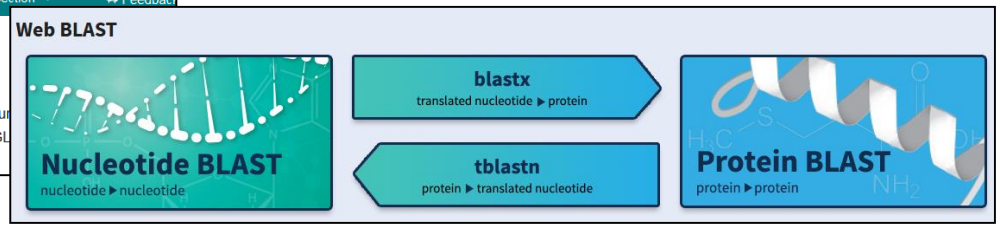
http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html

BLAST: Altshul (1990)

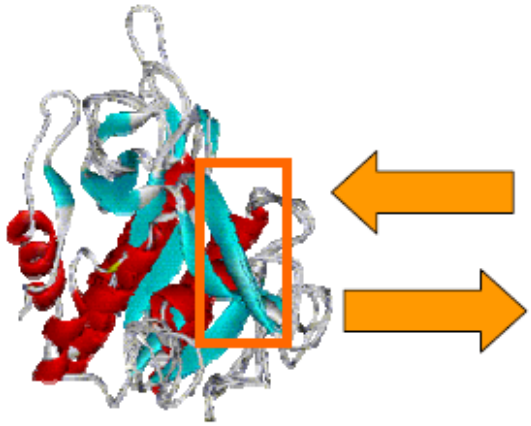
Il Basic Local Analysis Search Tool viene pensato

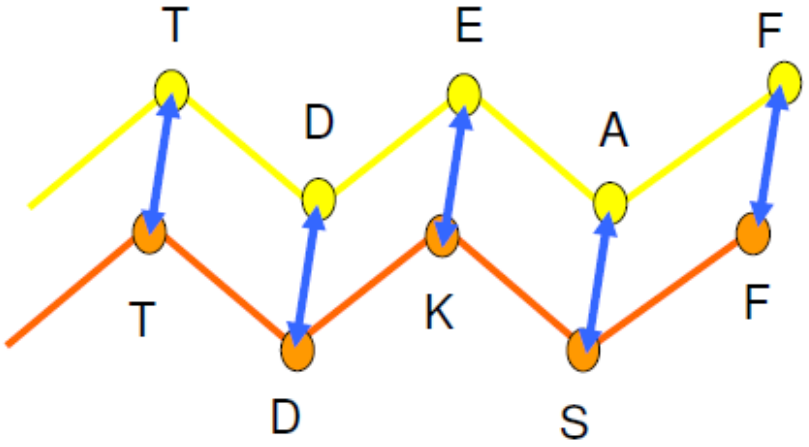
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi



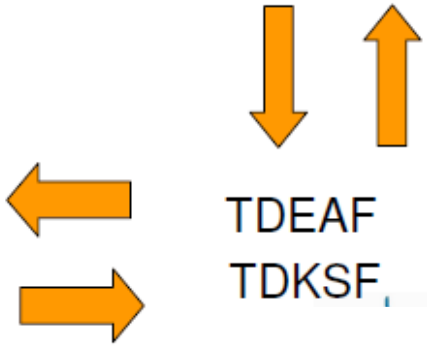


L'obiettivo finale: l'allineamento strutturale






```
MCDQTKHSKCCPAK---GNQCCPP--TDEAF---QQNQCCQSKGNQCCPPKQNQCCQPKG--
M D +K ++CCP        CCPP  TD  F    Q++ CC     + CCPPK + CC PK
MSDSSKTNQCCPTPCCPPKPCCPPKPTDKSFCCLQKSPCCPK--SPCCPPK-SPCCTPKVCP
```

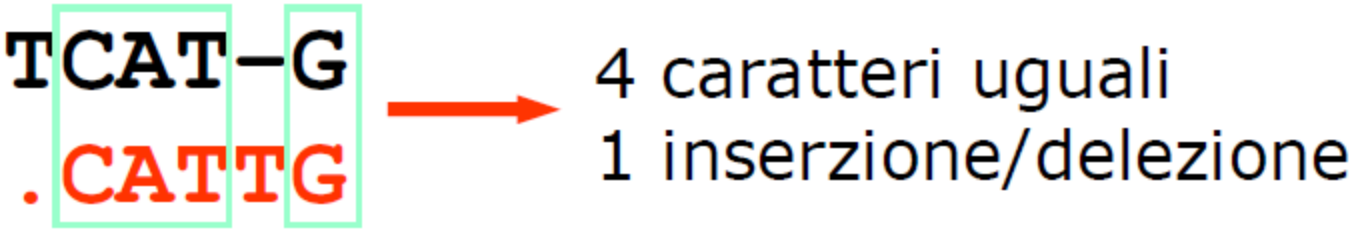


Allineare due sequenze (proteine o acidi nucleici)

- **Cosa vuol dire allineare due sequenze? scrivere due sequenze orizzontalmente in modo da avere il maggior numero di simboli identici o simili in registro verticale anche introducendo intervalli (gaps – inserzioni/delezioni – *indels*)**

seq1: TCATG

seq2: CATTG



Altro problema è il punteggio che si deve dare all'allineamento ovvero la significatività

In definitiva i problemi sono:

Biologici

Trovare un modo per confrontare e rappresentare la similarità o "dissimilarità" tra le biomolecole

Computazionali

Trovare un modo per ottenere un match tra le sequenze di caratteri che compongono le biomolecole

Statistici

Come valutare la validità del risultato

Tre tipi di allineamento

- globale: vengono allineate le intere sequenze dall'N- al C-terminale (o dal 5' al 3' per il DNA)
- locale: vengono allineate solo le zone con la più alta densità di somiglianza generando uno o più suballineamenti
- freeshift: Una via di mezzo tra globale e locale

GLOBALE

```
D L G P S S K Q T G K G S S M D I W D N G M
D - I - - T K S A G K G A I M R L - - E - M
```

LOCALE

```
- - - - - - - - - G K G - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - G K G - - - - - - - - - -
```

FREESHIFT

```
D L G P S S K Q T G K G S S M D I W D N G M
- - - D I T K S A G K G A I M R L E M - - -
```

Predire la struttura terziaria

E di gran lunga la predizione più complessa che si possa fare su una proteina.

Esistono 3 metodi principali di predizione:

1 - Homology modelling:

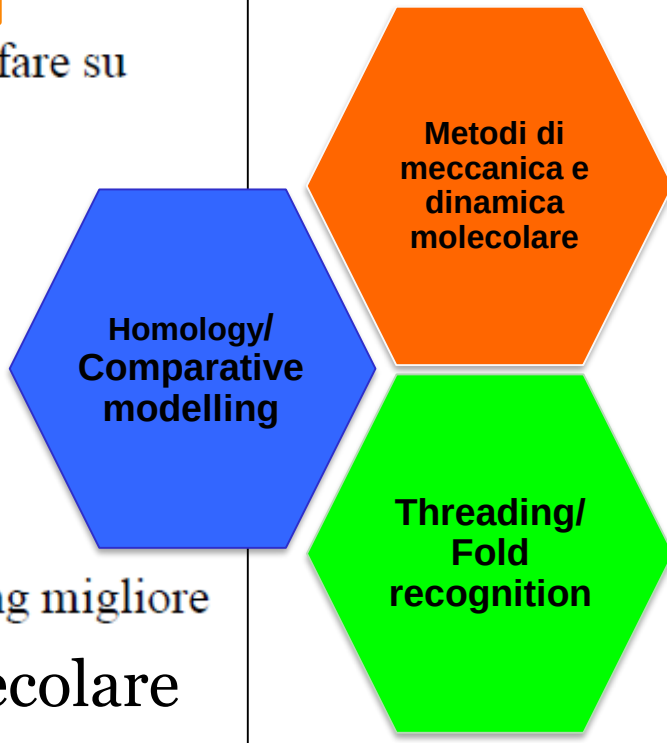
se si conoscono proteine simili con struttura nota

2 – Fold recognition:

se si va alla ricerca di strutture simili, cercando il folding migliore

3 - Metodi di meccanica e dinamica molecolare

simulazioni di ripiegamento *in silico* molto complesse dato che si valutano tutte le possibili interazioni di tutti gli atomi con il solvente



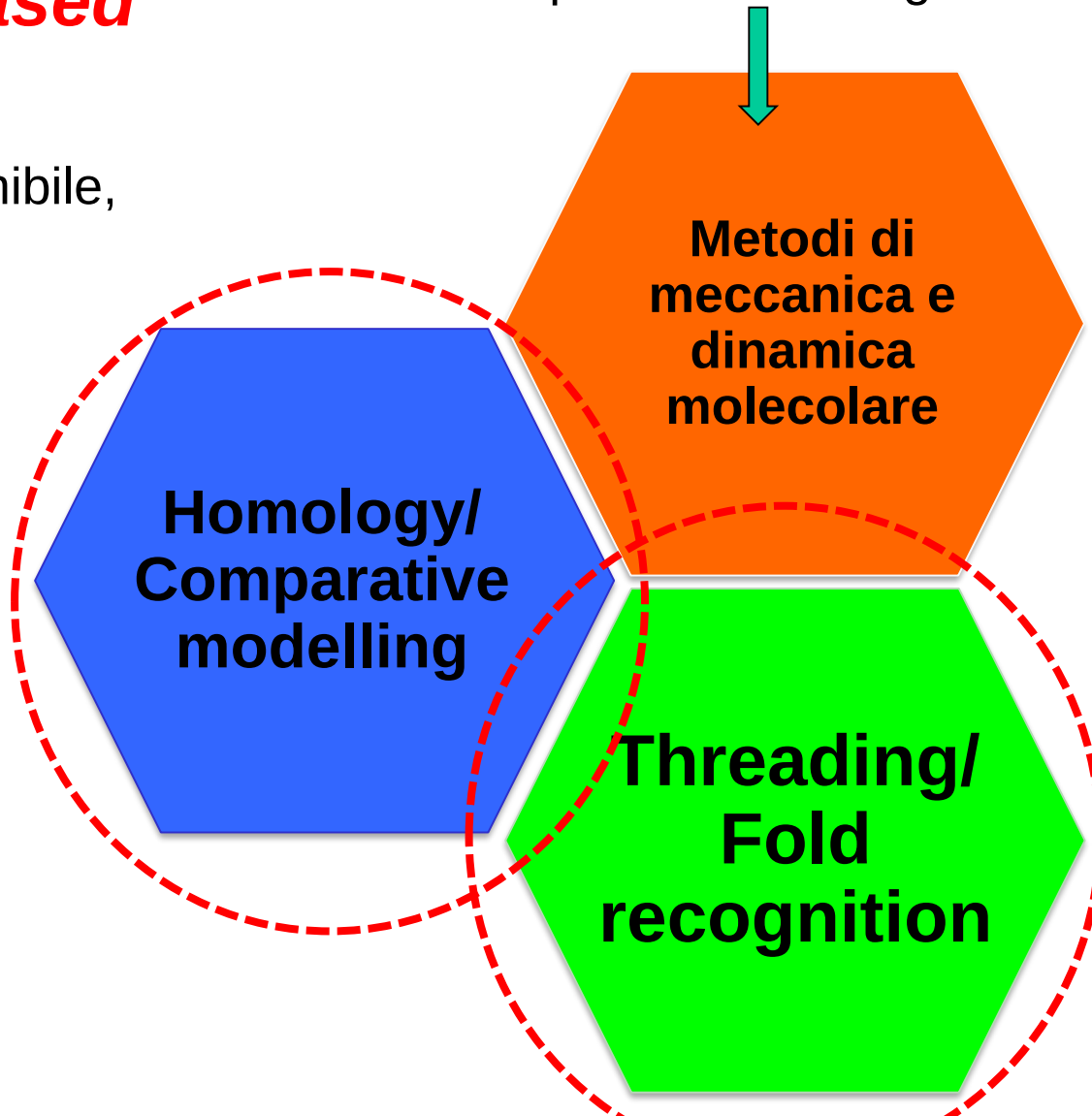
Metodi *knowledge based*

Si basano sull'informazione strutturale e di sequenza disponibile, utilizzando o meno informazioni evolutive.

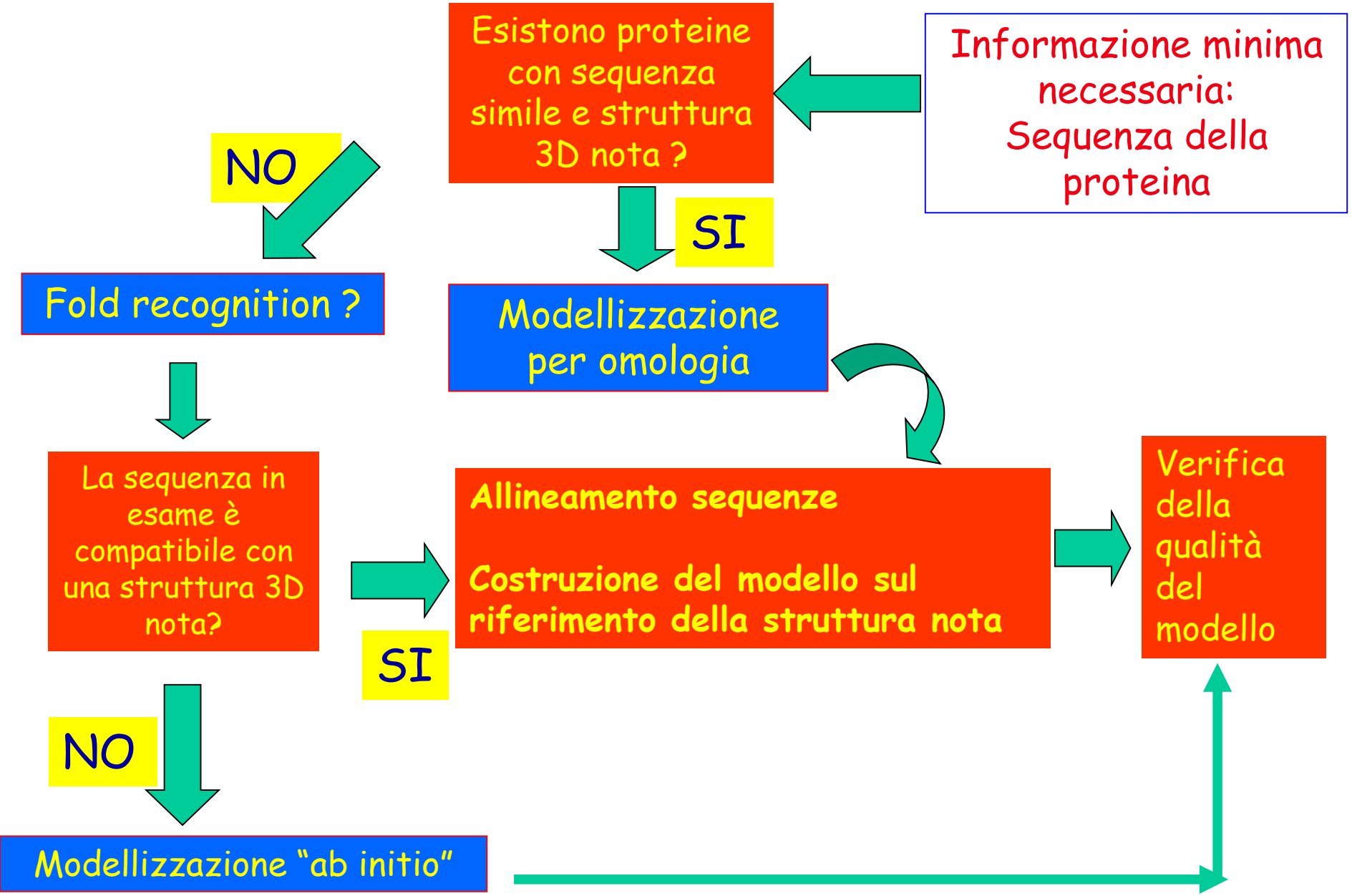
Possono dare ottimi risultati in tempo breve.

Si basano su principi teorici

tempi di calcolo lunghi !



Predizione della struttura tridimensionale delle proteine



FILOGENESI MOLECOLARE

Per filogenesi molecolare si intendono tutte quelle trasformazioni ed eventi di mutazione a livello del DNA che contribuiscono alla variabilità genetica e quindi ai suoi prodotti tra cui le proteine.

Il genoma subisce costantemente mutazioni ed i suoi meccanismi di riparo tengono sotto controllo la situazione affinchè il tutto non degeneri in un accumulo dannoso per l'organismo in questione e la sua progenie (malattie genetiche trasmissibili, tumori ecc.)

Alle volte tali mutazioni sono eventi positivi che portano ad un vantaggio evolutivo premiato dalla selezione naturale che "fissa" tali mutazione nel DNA che viene trasmesso alle generazioni successive (eventi misurabili in milioni di anni)

Il DNA è un laboratorio in continuo sviluppo in cui intervengono fattori di selezione, ambientali ecc. Il tutto si traduce, per quanto ci riguarda, in nuove proteine che si modificano, acquisiscono nuove funzioni.

Le variazioni genetiche sono il presupposto fondamentale per l'evoluzione biologica: hanno origine spontaneamente in seguito a errori nel processo della replicazione oppure a mutazioni accidentali, anche dovute a fattori ambientali, che in qualche modo alterano la sequenza del DNA.

Definizioni:
l'identità, la similitudine, la conservazione

Identità

La misura in cui due sequenze (di nucleotidi o aminoacidi) sono invarianti. (es. identità del 32% => 32 a.a. su 100 sono ***ordinatamente*** identici)

Conservazione

In una sequenza, modifiche in una specifica posizione di un amminoacido (o meno comunemente, DNA) che preservano le proprietà fisico-chimiche del residuo originale.

Similitudine

La misura in cui due sequenze (di nucleotidi o aminoacidi) sono correlate. Si basa su *identità + conservazione*.

Similarita' e omologia

- Due sequenze sono simili se possono essere allineate in modo che molti ammino acidi corrispondenti sono identici o simili
- Tecnicamente due o piu' sequenze possono essere definite omologhe se derivano da un progenitore comune
- L'omologia tra due sequenze si deduce dalla loro similarita in sequenza o funzione.

Definizione: omologia

Omologia

Similitudine attribuita a discendenti da un antenato comune.

NOTA BENE:

- ***OMOLOGIA*** indica che due entità (es. 2 sequenze) hanno una stessa origine filogenetica, cioè derivano da un antenato comune. È un carattere **QUALITATIVO**.

- ***SIMILITUDINE*** indica che due entità (es. 2 sequenze), in relazione ad *un certo criterio* comparativo, hanno *un certo grado* di similitudine. È un carattere **QUANTITATIVO**

Similarità e omologia

- Tra due o più sequenze può esserci un certo grado di similarità.

- A volte una similarità tra sequenze implica una similarità strutturale e, conseguentemente, una similarità funzionale.
- L'omologia tra sequenze indica invece una comune origine evolutiva tra di esse. Due sequenze si dicono omologhe quando discendono entrambe da una sequenza ancestrale comune (ancestore)

- Due o più sequenze simili tra loro possono quindi essere omologhe o meno.

Confrontare sequenze

- Il confronto fra sequenze, nucleotidiche o aminoacidiche, è uno dei compiti fondamentali della bioinformatica.

Perché è possibile confrontare sequenze?

Perché generalmente in natura le strutture molecolari non vengono create ex-novo ma per modificazione di modelli preesistenti.

Caratterizzazione di proteine con funzione ignota

- Il confronto di una proteina a funzione ignota con una famiglia di proteine a funzione nota può permettere di formulare ipotesi sulla funzione della prima.

Relazione sequenza-struttura-funzione

Evoluzione divergente

- proteine con elevata identità di sequenza discendono da un ancestore comune

- avranno strutture molto simili

casi limite

1) proteine con bassa similarità di sequenza ma struttura complessiva e di sito attivo simili sono probabilmente omologhe

⇒ conservazione selettiva di residui strutturalmente e funzionalmente importanti

2) strutture e sequenze simili ma funzioni biochimiche differenti

⇒ le strutture divergono più lentamente delle funzioni durante l'evoluzione

Evoluzione convergente

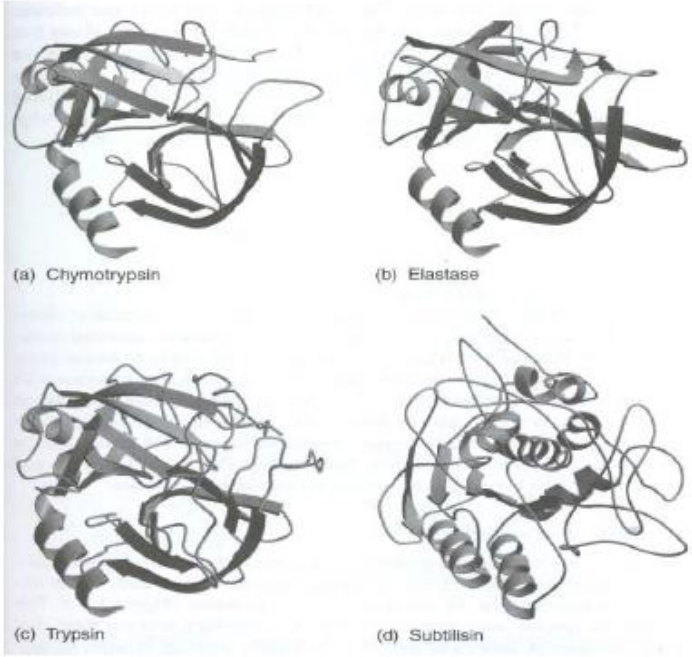
- proteine che differiscono in sequenza e struttura

- presentano però una configurazione del sito attivo che converge verso una medesima struttura, che ne determina la funzione biochimica

ESEMPIO:

Evoluzione divergente di famiglie di proteine

Le serino-proteasi sono una famiglia di enzimi che hanno una struttura 3D molto simile e un pressoché identico meccanismo di reazione.



La differenza fra questi enzimi è la **specificità di substrato:**

- La tripsina taglia i peptidi in corrispondenza di Lys e Arg
- La chimotripsina taglia i peptidi in corrispondenza di Trp, Phe, Tyr
- l'elastasi taglia i peptidi in corrispondenza di piccoli Aa idrofobici (Ala)

evoluzione convergente

la serino-proteasi del batterio è diversa come struttura 3D dalle serino-proteasi di mammifero ma ha la stessa **specificità di substrato** e lo stesso **meccanismo catalitico.**

Organismi diversi partendo da una differente struttura 3D hanno evoluto proteine con una stessa funzione.

Homology / Comparative modelling

Modelling per Omologia

(Homology (o Comparative) Modelling)

- In generale, a maggiore identità di sequenza tra due proteine, corrisponde maggiore similarità tra strutture

- La qualità del modello dipende dalla similarità tra le sequenze delle due proteine

Homology / Comparative modelling

Homology modelling

Assunzione di base: due proteine che presentano una identità del 30% circa, molto probabilmente avranno una struttura simile.

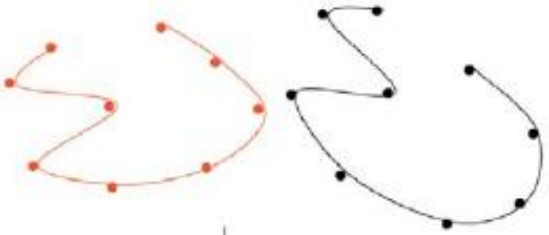
Si va a valutare la

r.m.s.d. **(root mean square deviation)**

cioè la distanza quadratica media tra gli atomi, generalmente i carboni alpha, ma si può calcolare anche su tutti gli atomi.

Minore è il r.m.s.d. maggiore è la similarità strutturale

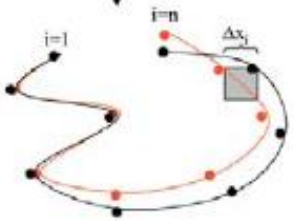
Root mean square deviation (rmsd)



$$rmsd = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\Delta x_i)^2}{n}}$$

for atom pairs i=1 to n
Δx_i distance between two compared atoms in space

find starting superposition

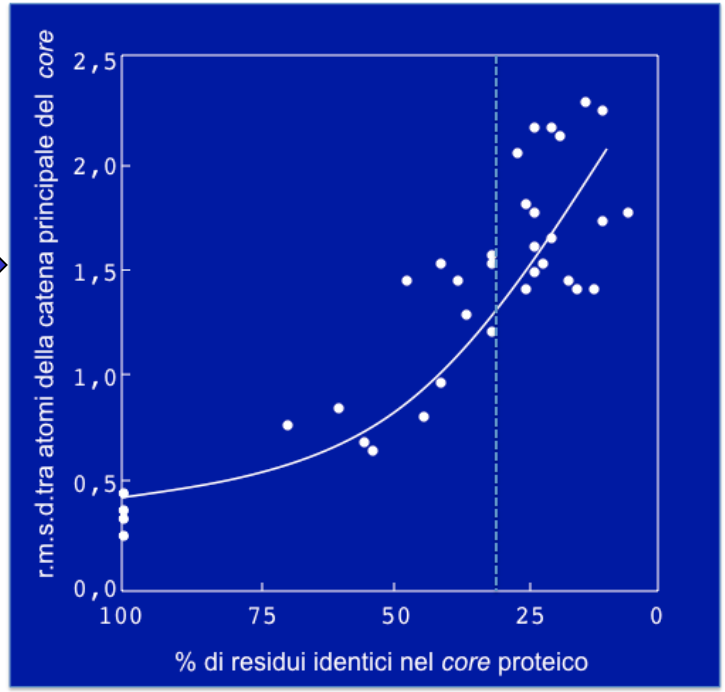


rmsd=1.6 Å

cyclic minimisation of rmsd

rmsd=1.2 Å

Se l'identità tra due sequenze proteiche è superiore al 30%, si può assumere che le loro strutture siano simili



Allineamento di Sequenze

- L'allineamento tra due o più sequenza può aiutare a trovare regioni simili per le quali si può supporre svolgano la stessa funzione;
- La similarità tra due o più sequenza può essere definita in base a una funzione distanza: Tanto più simili sono le sequenze, tanto meno distanti sono;
- Esistono diversi algoritmi di allineamento ciascuno dei quali definisce una funzione distanza;
- Dato un allineamento possiamo assegnare uno **Score** che indica il grado di similarità delle due sequenze.

Quindi...

- Proteine con sequenze simili hanno generalmente anche strutture tridimensionali simili
- Proteine simili da un punto di vista strutturale tendono ad avere anche funzioni simili (non sempre)
- Proteine con funzione simile potrebbero avere una sequenza completamente differente (il sito attivo ha una struttura simile derivante da evoluzione convergente)

Homology / Comparative modelling

L'approccio all'homology modeling è abbastanza intuitivo, ma è bene seguire delle considerazioni pratiche che possono essere definite

Linee guida per costruire un buon modello:

1- Analizzare la struttura secondaria prima di quella tridimensionale, dato che se ci sono regioni fortemente random-coil, è bene escluderle dalla modellazione (sono, per definizione, non modellabili).

2- Identificare in banca dati una proteina a struttura nota che abbia una alta identità (> 50%) con la propria, o identità globale o identità locale.

3- Allineare al meglio le due proteine. Rifinire l'allineamento a mano, se necessario. Questa tappa è critica, perchè la modellazione verrà fatta sulle proteine allineate.

Homology/ Comparative modelling

4 - Cercare in banca dati il più alto numero di proteine simili tra loro e identificare dopo il multiallineamento le regioni di struttura secondaria conservate (in genere se ci sono dal multiallineamento si vede). Si costruisce così un *pre-modello*.

5 - Modellare per prima cosa le regioni altamente variabili (in genere i loops) che connettono regioni a struttura secondaria definita. Esistono database anche dei loops (tutti i loops osservati), quindi non si modella a caso, ma si cerca la struttura di un loop già presente. Se non c'è, o se ce ne sono più di uno compatibile, osservare le regioni pre-loop e post-loop.

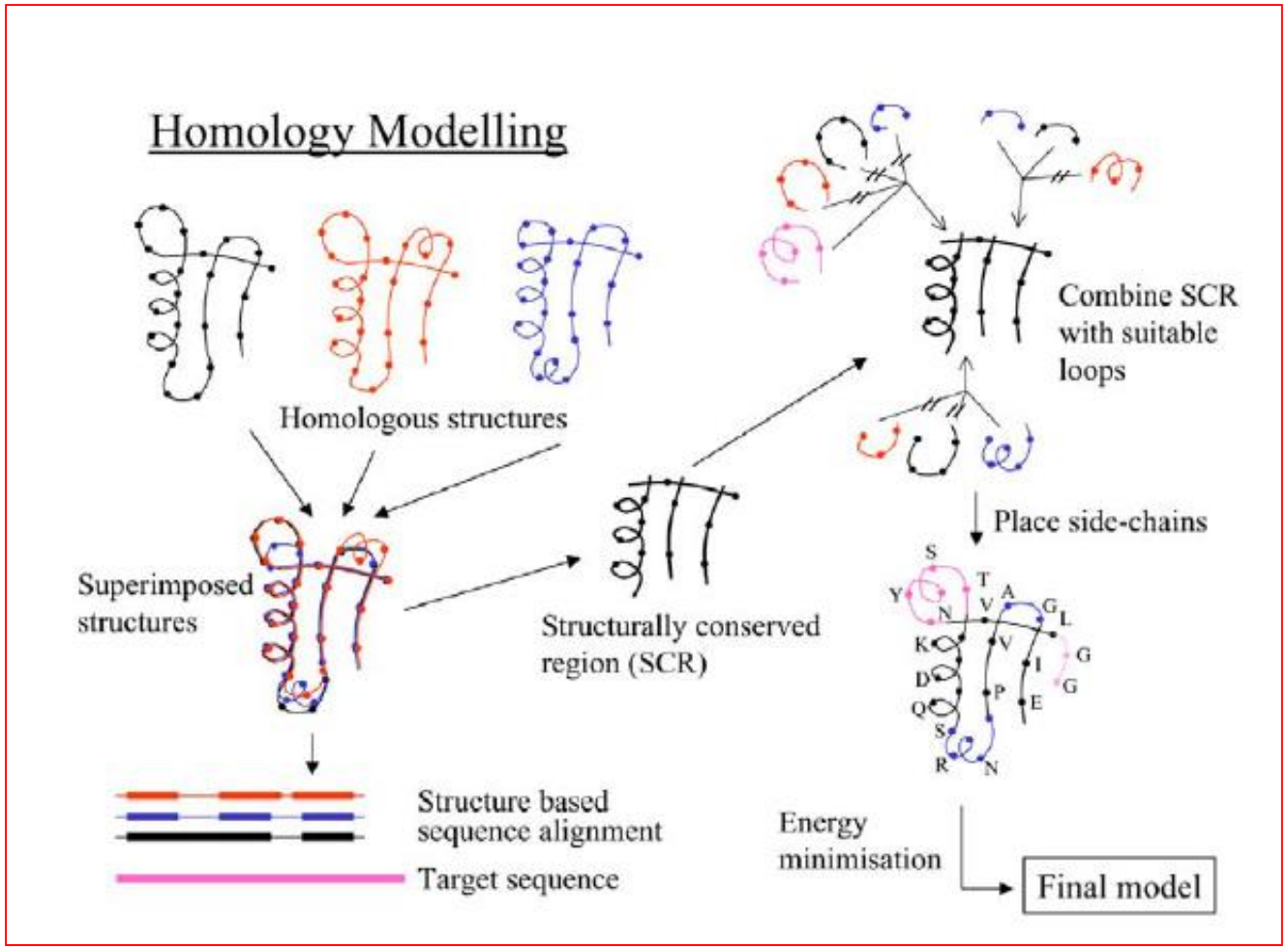
6 - Modellare le catene laterali sulla base delle catene della proteina nota. Esistono per questo delle librerie di ROTAMERI, cioè isomeri delle catene laterali con angoli di torsione adeguati alle torsioni del backbone.

Homology/ Comparative modelling

7 – Risolvere, se possibile, i problemi relativi alle collisioni dei vari atomi, o manualmente o con programmi che indicano l'energia minima delle strutture. Alla fine gli atomi di una proteina non dovranno collidere, e la proteina dovrà essere alla minor energia possibile.

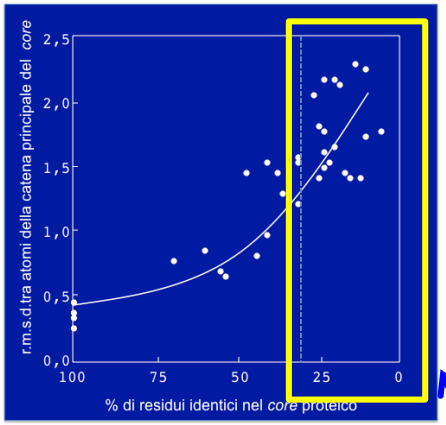
Nonostante ci siano delle regole abbastanza precise, l'homology modelling è molto complesso e richiede un grande lavoro e molto tempo.

schematizzando….



Protein threading = fold recognition

Threading / Fold recognition



Al di sotto del 20-25%% di identità tra *query* e *templato* (struttura risolta) ci troviamo nella cosiddetta "zona notturna" (*midnight zone*)
in cui non si riesce a distinguere una somiglianza di sequenza significativa, ed anzi le similarità possono derivare sia da evoluzione divergente (omologia) che convergente.

In questo caso si utilizza un approccio diverso, detto di **fold recognition**, per mezzo del **threading (**allineamento**)**.

Protein threading = fold recognition

Il *Protein threading* si basa su due osservazioni fondamentali:

1) le proteine presenti in natura hanno un numero finito di strutture possibili, o almeno un numero finito di topologie (<1000)

2) Il 90% delle strutture nuove archiviate nel data-base PDB negli ultimi 3 anni hanno struttura simile ad una già esistente nel PDB.

Threading / Fold recognition

Questo tipo di approccio parte dall'osservazione che la struttura tridimensionale è generalmente più conservata della sequenza: si stima che infatti possano esistere 10^4 tipi di *fold* base, a fronte di un numero virtualmente infinito di possibili sequenze diverse.

Il metodo è usato per predire la struttura di quei biopolimeri che hanno gli stessi ripiegamenti (*folds*) di biopolimeri di struttura nota ma non presentano omologia con tali strutture note.

La predizione viene effettuata per "*threading*" (cioè allineamento) di ogni aminoacido nella posizione della sequenza della struttura nota (templato) e valutando quanto buono risulta il fitting.

Un ottimo server per predizioni di questo tipo è **Phyre** (**http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/**).

Threading / Fold recognition

Tra i diversi sistemi di riconoscimento del *fold*, uno dei primi proposti è quello dei Profili-3D, in cui la struttura 3D viene "tradotta" in una sequenza che tiene conto delle caratteristiche strutturali di ogni residuo.

In particolare, i residui vengono divisi in diverse classi:

- esposto al solvente,
- parzialmente esposto,
- non esposto

queste classi sono poi suddivise in sottoclassi, per un totale di 6.

Il residuo può poi appartenere a strutture secondarie (eliche e foglietti) o *loop*.

In totale, esistono **6x3=18 classi**, che descrivono l'intera gamma dei possibili intorni chimici dei residui di una struttura.

J. Mol. Biol. (1997) 267, 1026–1038

JMB

A 3D-1D Substitution Matrix for Protein Fold Recognition that Includes Predicted Secondary Structure of the Sequence

Danny W. Rice and David Eisenberg*

Threading / Fold recognition

Per mezzo di matrici di punteggio 3D-1D,

The 1D-sequence/1D-string scoring matrix

ottenute analizzando strutture reali, è possibile confrontare questo alfabeto di 18 lettere con quello a 20 lettere degli aminoacidi: in pratica, queste matrici ci dicono con quale propensione ogni aminoacido si colloca in ognuna delle 18 classi.

Threading / Fold recognition

E' possibile così confrontare una sequenza proteica allineandola con tutti i possibili profili di tutti i fold conosciuti, ricavando un punteggio che valuti il ***best fitting*** della sequenza.

Facendo così si è in grado di identificare strutture di proteine anche molto divergenti tra loro, al punto di non essere riconosciute da nessun programma di allineamento o di similarity search.

Un esempio tipico è l'individuazione della struttura di proteine che hanno la stessa funzione a causa di una **evoluzione convergente**: originandosi da geni diversi non correlati, la sequenza (sia aminoacidica, sia nucleotidica) sarà molto diversa, ma la struttura terziaria, almeno nell'intorno del sito catalitico, deve essere costante per garantire una stessa funzionalità

Iterative Threading ASSEmbly Refinement

University of Michigan

Department of Computational Medicine and Bioinformatics

I-TASSER

Protein Structure & Function Predictions

(The server completed predictions for 579090 proteins submitted by 138555 users from 150 countries or regions)

(The template library was updated on 2020/11/01)

I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) is a hierarchical approach to protein structure prediction and structure-based function annotation. It first identifies structural templates from the PDB by multiple threading approach LOMETS, with full-length atomic models constructed by iterative template-based fragment assembly simulations. Function insights of the target are then derived by re-threading the 3D models through protein function database BioLiP. I-TASSER (as 'Zhang-Server') was ranked as the No 1 server for protein structure prediction in recent community-wide CASP7, CASP8, CASP9, CASP10, CASP11, CASP12, and CASP13 experiments. It was also ranked the best for function prediction in CASP9. The server is in active development with the goal to provide the most accurate protein structure and function predictions using state-of-the-art algorithms. Please report problems and questions at I-TASSER message board and our developers will study and answer the questions accordingly. (>> More about the server ...)

Top 10 threading templates used by I-TASSER

Proteina HELP

Rank	PDB Hit	Iden1	Iden2	Cov	Norm. Z-score	Download Align.
1	2pffB	0.24	0.23	1.00	3.94	Download
2	3hqvA	0.19	0.28	0.93	3.08	Download
3	1vt4I	0.23	0.25	0.95	14.25	Download
4	3zf7A	0.30	0.02	0.05	1.09	Download
5	3hr2	0.17	0.29	1.00	4.64	Download
6	1vt4I	0.27	0.25	0.89	7.51	Download
7	2nbiA	0.09	0.15	0.89	-0.00	Download
8	3hr2B	0.18	0.29	1.00	2.91	Download
9	2nbiA	0.05	0.15	0.92	5.44	Download
10	6mpxA	0.08	0.16	0.83	1.62	Download

(a) All the residues are colored in black; however, those residues in template which are identical to the residue in the query sequence are highlighted in color. Coloring scheme is based on the property of amino acids, where polar are brightly coloured while non-polar residues are colored in dark shade. (more about the colors used)

(b) Rank of templates represents the top ten threading templates used by I-TASSER.

(c) Ident1 is the percentage sequence identity of the templates in the threading aligned region with the query sequence.

(d) Ident2 is the percentage sequence identity of the whole template chains with query sequence.

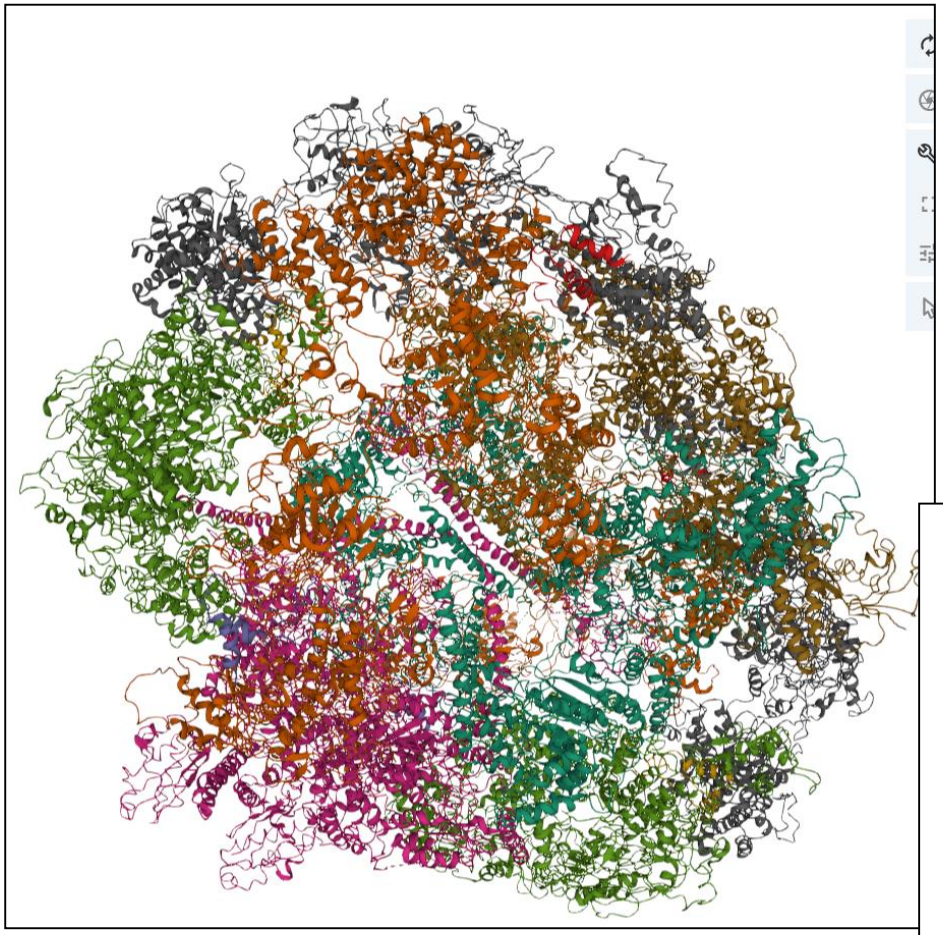
(e) Cov represents the coverage of the threading alignment and is equal to the number of aligned residues divided by the length of query protein.

(f) Norm. Z-score is the normalized Z-score of the threading alignments. Alignment with a Normalized Z-score >1 mean a good alignment and vice versa.

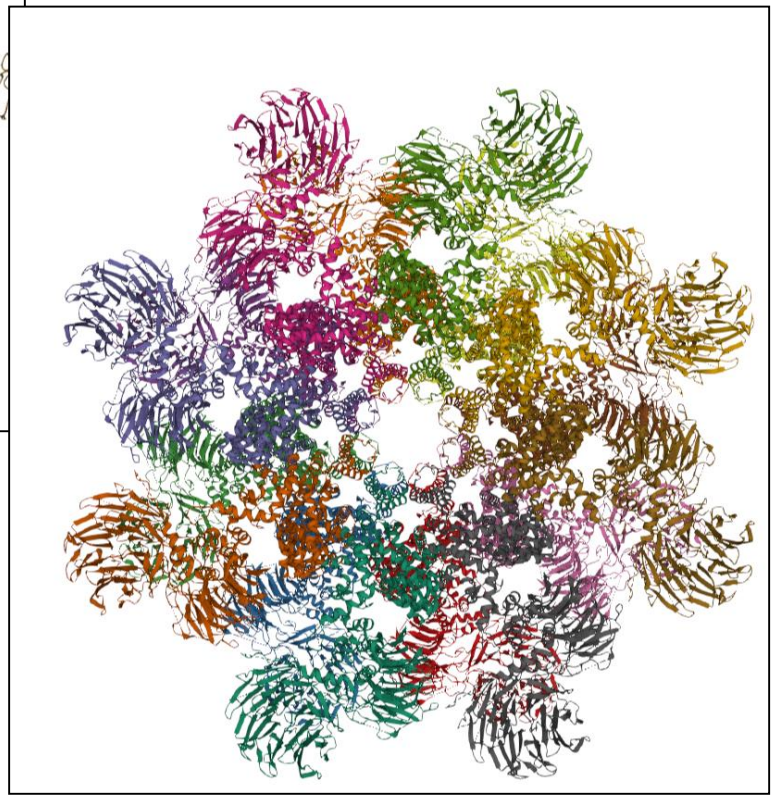
(g) Download Align. provides the 3D structure of the aligned regions of the threading templates.

(h) The top 10 alignments reported above (in order of their ranking) are from the following threading programs:

Proteina HELP



2PFF
Structural Insights of Yeast Fatty Acid Synthase
(rank=1)



4V4L (1VT4)
Structure of the Drosophila apoptosome (rank=3)

Protein threading VS. Homology

When the sequence identity in a sequence-sequence alignment is low (i.e. <25%), homology modeling may not produce a significant prediction. In this case, if there is distant homology found for the target, protein threading can generate a good prediction.

Homology modeling and protein threading are both template-based methods and there is no rigorous boundary between them in terms of prediction techniques. When there is no significant homology found, protein threading can make a prediction based on the structure information.

But the protein structures of their targets are different.
Homology modeling is for those targets which have homologous proteins with known structure (usually/maybe of same family),
while protein threading is for those targets with only fold-level homology found. In other words, homology modeling is for "easier" targets and protein threading is for "harder" targets.

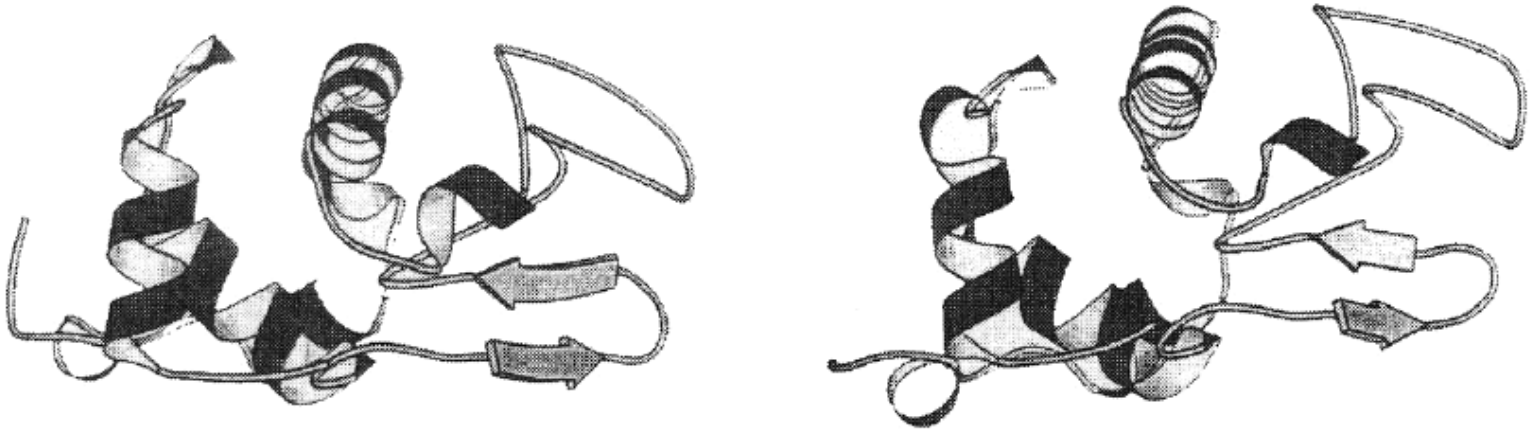
Homology modeling treats the template in an alignment as a sequence, and only sequence homology is used for prediction.
Protein threading treats the template in an alignment as a structure, and both sequence and structure information extracted from the alignment are used for prediction.

Homology modelling	Threading/Fold-recognition
Identifica prima gli omologhi	Prova tutte le possibili strutture
Si determina l'allineamento ottimale	Prova tutti i possibili allineamenti strutturali
Ottimizza un modello	Valuta molti modelli poco accurati nei dettagli

ESEMPIO:

OMOLOGIA E FUNZIONE

può non essere sufficiente a determinare la categoria funzionale anche nel caso di omologia di sequenza confermata ed appartenenza ad una stessa famiglia di proteine sebbene questo caso sia più raro.



(a) Lysozyme EC 3.2.1.17

(b) Alpha-lactalbumin (nonenzyme)

Lisozima e alpha-lactalbumina hanno il 40% di identità e struttura simile ma differente funzione. Il sugar-binding site delle due proteine è stato mantenuto ma nella lactalbumina ha cessato la sua funzione

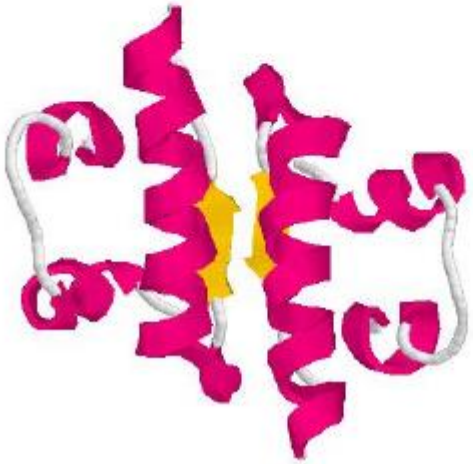
ESEMPIO:

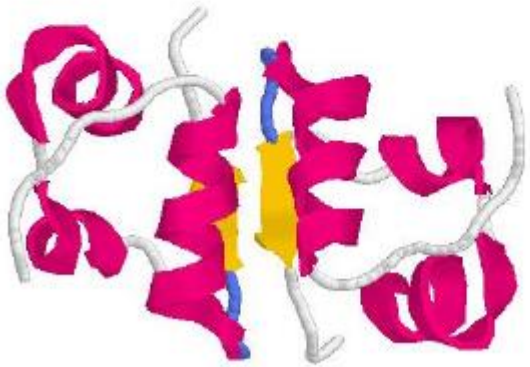
Fold uguali e alta similarità di sequenza

- Insulina umana (**1his**)
- Insulina di maiale (**3ins**)

- 91% identità di sequenza

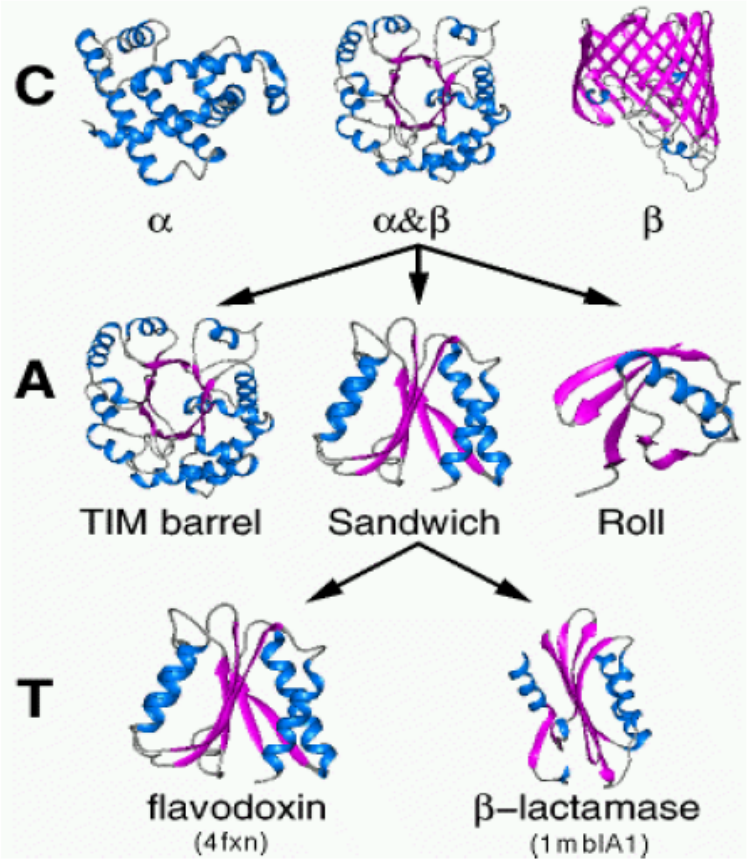
```
sp|P01308|INS_HUMAN
sp|P01315|INS_PIG

MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED 60
MALWTRLLPLLALLALWAPAPAQAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKARREAEN 60
**** ************.* ** ******************************:*****:

LQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN 110
PQAGAVELGGGLGG--LQALALEGPPQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN 108
 *.* ****** *.  **.*****. ************************
```





Banche dati – Proteine: CATH

- Database che definiscono ***famiglie <u>strutturali</u>***.
- Aiutano a predire le strutture e a caratterizzarle (secondo un'idea evoluzionistica della funzione).



CATH: a hierarchical domain classification of protein structures in the Protein Data Bank

Classificazione in modo curato sulla base di:

- **CLASSE** (contenuto e tipo di strutture secondarie)
- **ARCHITETTURA** (descrizione dell'orientamento delle strutture secondarie senza tener conto delle connessioni)
- **TOPOLOGIA** (tiene conto delle connessioni che caratterizzano le strutture secondarie)
- **(H)OMOLOGIA** (raggruppa proteine con strutture e funzioni simili)

https://www.cathdb.info/