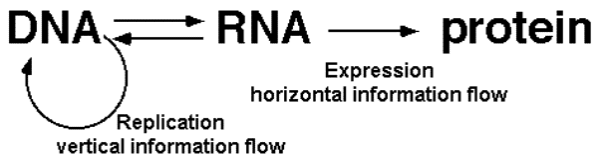
Kapitel 5: Protein-Datendanken

- Motivation und historische Entwicklung
- Proteomics
  - Datengewinnung
  - PEDRo-Projekt
- Protein-Datenbanken
  - Anforderungen
  - Sequenz-Datenbanken
  - Domain/Familien-Datenbanken
  - Struktur-Datenbanken

Vom Gen zum Protein



	U		C		A		G	
U	UUU Phenyl-alanine UUC		UCU Serine UCC UCA UCG		UAU Tyrosine UAC		UGU Cysteine UGC	U
	UUA Leucine UUG				UAA Stop codon UAG Stop codon		UGA Stop codon UGG Tryptophan	C
C	CUU Leucine CUC CUA CUG		CCU Proline CCC CCA CCG		CAU Histidine CAC		CGU Arginine CGC CGA CGG	A
					CAA Glutamine CAG			G
A	AUU Isoleucine AUC AUA		ACU Threonine ACC ACA ACG		AAU Asparagine AAC		AGU Serine AGC	U
	AUG Methionine; initiation codon				AAA Lysine AAG		AGA Arginine AGG	C
G	GUU Valine GUC GUA GUG		GCU Alanine GCC GCA GCG		GAU Aspartic acid GAC		GGU Glycine GGC GGA GGG	A
					GAA Glutamic acid GAG			G

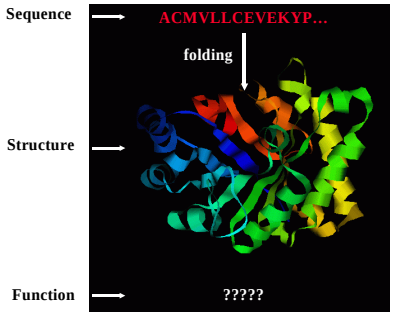
Alanin	Ala	A
Valin	Val	V
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Methionin	Met	M
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Lysin	Lys	K
Arginin	Arg	R

Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tyrosin	Tyr	Y
Histidin	His	H
Cystein	Cys	C
Asparagin	Asn	N
Glutamin	Gln	Q
Tryptophan	Trp	W
Glycin	Gly	G

hydrophob
geladen
polar

Proteine

- Proteinfunktionen
  - Genregulation
  - Verdauung / Metabolismus, enzymatische Steuerung
  - Signalverarbeitung
  - Zellstruktur und Organellen, Zellteilung, Vermehrung
- Proteine im Menschen
  - Durchschnittlich 447 Aminosäuren lang
  - Kürzestes [Swiss-Prot]: ~ 40-50 Aminosäuren
  - Längstes [SP]: ~ 8.700 Nesprin (Cytoplasma), [Swiss-Prot]: ~ 6.669 Nebulin (Muskel), [EMBL]: 34.350 Titin (Muskel)
- Die Funktion von 40-50% der Proteine ist unbekannt!
- Wissen über Proteine u.a. wichtig für
  - Krankheitsverständnis
  - Medikamenten-Design

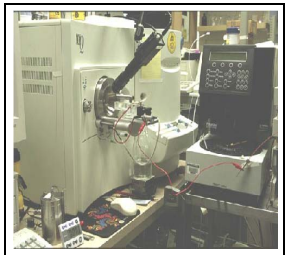


Protein-Sequenzen

- Länger bekannt und untersucht als DNA-Sequenzen, da labortechnisch einfacher zugänglich
- Erste Proteinsequenz 1951 (Sanger & Tuppy): Seitenkette von Insulin
- Systematische Sammlung ab Anfang der 1960er (Dayhoff et al. 1965)
  - Protein Sequence Atlas: Buchform, 1968-1978
  - Motivation: Evolutionäre Untersuchungen
  - 1980: Protein Information Resource (seit 1988: PIR-International)
  - 1986: Swiss-Prot (Genf)

Proteomics

- Ausgangsproblematik: Gensequenzen (und damit AS-Sequenzen) informieren nicht über
  - Proteinfunktionen
  - Protein-Protein-Interaktionen, Multiprotein-Komplexe
  - Post-translationale Modifikationen (z.B. bei Prionen)
- Ziel von Proteomics: Bestimmung aller Proteine(komplexe) und ihrer Funktionen*
- Wichtigstes Verfahren: Massenspektroskopie
- Problematik
  - Noch keine öffentlichen Repositories für Spektren
  - Noch keine Standards zur Beschreibung von Experimenten und Protokollen
- Derzeitige (noch nicht abgeschlossene) Standardisierungsbemühungen
  - HUPO: Human Proteome Organisation (mit wichtiger Unterorganisation JHUPO: Japan HUPO; Entwicklung von HUP-ML: Human Proteome Markup Language)
  - PSI: Proteomics Standard Initiative
  - PEDRo



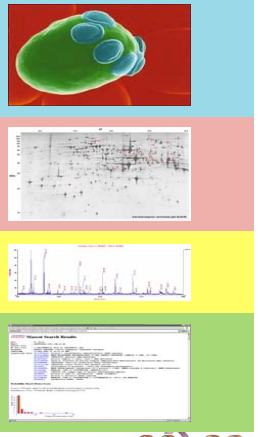
Massenspektrometer

* siehe auch: http://us.expasy.org/ (ExPASy Molecular Biology Server)

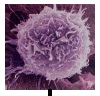
Proteomics: Datengewinnung

The nature of proteomics experiment data

- *Sample generation*
  - *Origin of sample*
    - *hypothesis, organism, environment, preparation, paper citations*
- *Sample processing*
  - *Gels (1D/2D), columns, other methods*
    - *images, gel type and ranges, band/spot coordinates*
    - *stationary and mobile phases, flow rate, temperature, fraction details*
- *Mass Spectrometry*
  - *machine type, ion source, voltages*
- *In Silico analysis*
  - *peak lists, database name + version, partial sequence, search parameters, search hits, accession numbers*



Proteomics: Workflow

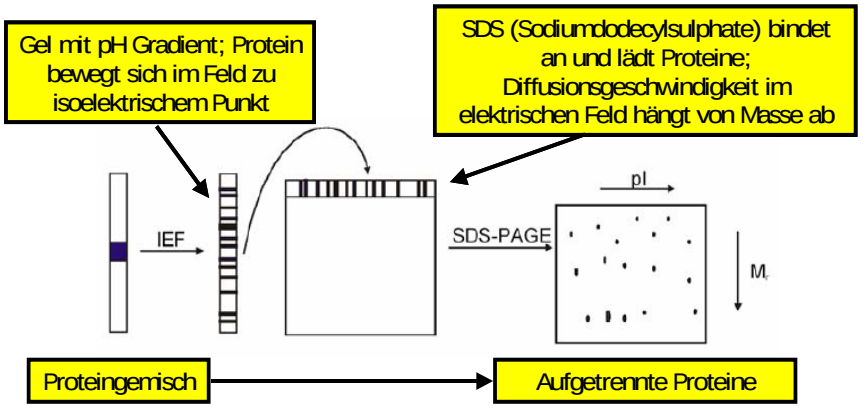


Proteomics Workflow

Proteinextraktion	Aufbereitung aller Proteine einer Zelle
Proteintrennung	2D Gel-Elektrophorese
Proteinisolierung	Ausschneiden
Proteinidentifikation	Massenspektroskopie Sequenzierung
Analyse	Funktion, Struktur, Interaktion, ...

2D Gel-Elektrophorese

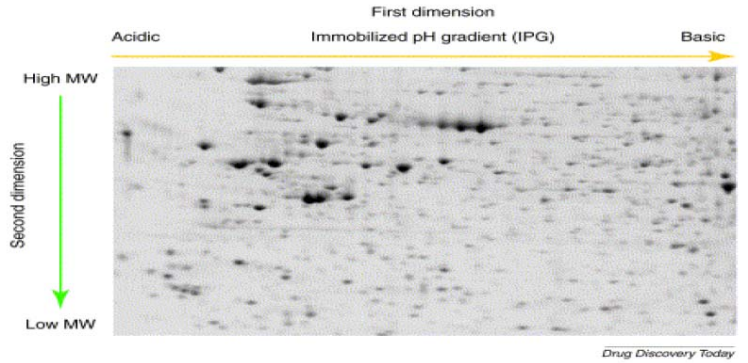
- Zweidimensionale Trennung von Proteinen
  - 1. Dimension: Ladung
  - 2. Dimension: Masse



Isoelektrischer Punkt

- pH Wert einer Lösung = Anzahl freier H^+
  - Sauer = niedriger pH Wert = viele H^+ und wenige OH^-
  - Basisch = hoher pH Wert = wenig H^+ und viele OH^-
  - Neutral = pH=7 = H^+ und OH^- Gruppen ausgeglichen
- Proteine können an vielen Stellen H^+ verlieren (deprotonated) oder gewinnen (protonated)
- Protein in Lösung (mit bestimmten pH-Wert) verliert oder gewinnt Protonen
- Der pKA Wert eines Proteins gibt an, bei welchem pH Wert 50% des Proteins protonated sind
- Isoelektrische Punkt: pH-Wert, an dem das Protein Netto (im Vergleich zur Lösung) keine Ladung mehr hat - und sich damit auch nicht mehr bewegt

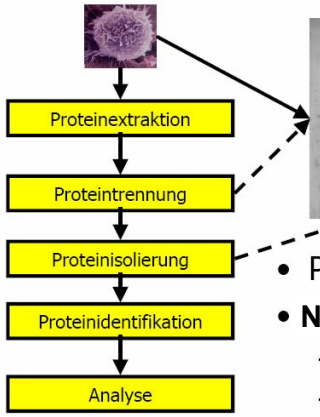
2D Gel-Ergebnisse

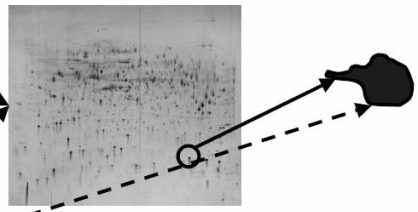


2D Gel Methode

- Einfache und billige Methode, sehr weit verbreitet
- Trennung bis zu 10.000 Proteine möglich
- Vergleich von Bildern begrenzt möglich (Gesund–krank)
- Nachteile
  - Ausschneiden aufwändig (manuell)
  - Einschränkungen
    - Keine Proteine <20KD oder >200KD
    - Keine extrem geladenen Proteine (sehr sauer / sehr basisch)
    - Schwierig bei geringen Konzentrationen (Low abundance)
    - Keine Membranproteine (Anderes Gel-Verhalten)
  - Keine Identifikation von Proteinen

Nächste Schritte





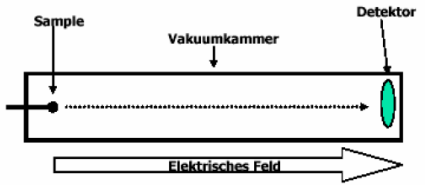
- Proteine sind isoliert
- **Noch** keine Kenntnis über Sequenz
  - Möglichkeit 1: Sequenzieren
  - Möglichkeit 2: Identifizieren
- Problem: Keine Hybridisierung

1. Sequenzierung, Edman Degradation

- Verfahren seit ca. 1980 bekannt
- Prinzip
  - Protein in hochreiner Konzentration vorhanden
  - Enzymatische Trennung einer Aminosäure vom N-Terminus
  - Identifikation durch chromatographische Verfahren
  - Zyklische Wiederholung
- Nachteile
  - Lange Dauer – ca. 30-60 Minuten pro Zyklus
  - Für Hochdurchsatz nicht verwendbar
  - Aber: wichtig zur Qualitätskontrolle

2. Identifikation: Massenspektroskopie

- Prinzipielle Idee
  - Beschleunigung von Proteinen in elektrischem Feld
  - Dektor misst Auftreffen der geladenen Teilchen (Ionen)
  - Flugzeit proportional zu Verhältnis Masse / Ladung (m/z)



Probleme
- Proteine empfindlich
  - Verdau
- Zu geringe Ladung
  - Ionisierung

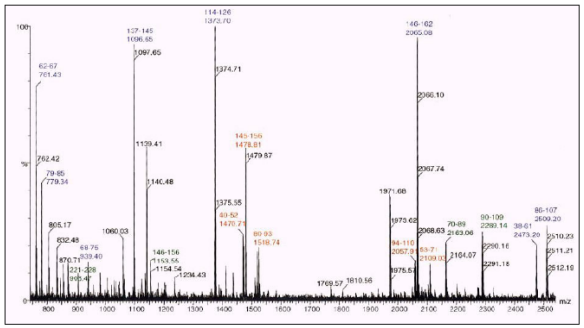
Schritt 1: Verdau

- Problem: Proteine zu zerbrechlich für MS
- Lösung
  - Proteine vorab enzymatisch in Peptide zerbrechen
  - Enzymatischer Verdau
  - Peptide mit Massenspektroskop messen
  - Originalprotein aus Kombination der gemessenen Peptide bestimmen
- Annahme
  - Jedes Protein hat eindeutige Peptidsignatur (Fingerprint)
- Viele Peptidasen bekannt

2. Ionisierung

- Problem: Peptide oft ohne Ladung – keine Beschleunigung
- Lösung
  - MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
  - Peptide in „Matrix" einbetten –Kristallisierung mit lichtempfindlichen, geladenen Molekülen
  - Kristall mit Laser beschießen
  - Lichtempfindliche Moleküle verdampfen und reißen ionisierte Peptide in Gasphase mit
  - Beschleunigen in MS

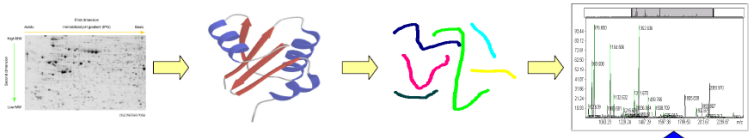
Ergebnis der MS



- Jedes Peptid ist ein Peak
- Peakhöhe mit heutiger Technik nicht relevant
- Algorithmisches Problem: Protein aufgrund des Peak-Fingerprints bestimmen

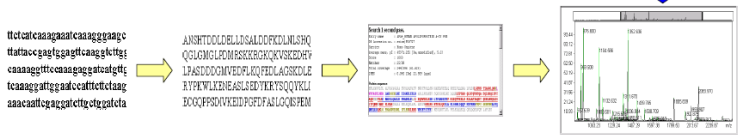
Proteinidentifikation

Experimentelle Messung



Theoretische Vorhersage

Vergleich



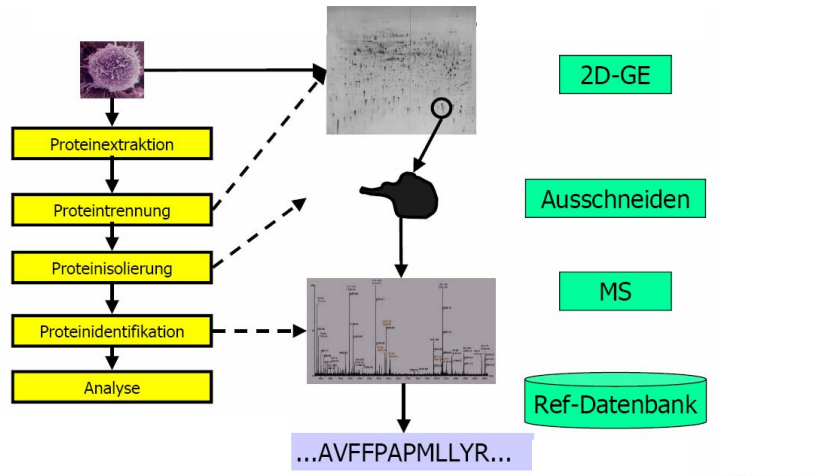
Probleme

- Geringe Gewichtsänderungen
  - Isotope – Peptidmassen sind nicht fest
  - Modifikationen: Phosporylierung, Glycosylierung, ...
  - Messfehler, ungenaue MS-Kalibrierung
- Probleme/Fehler in Datenbanken
  - Frameshifts in DNA – Protein Übersetzung
  - SWISS-PROT speichert Consensussequenzen – ohne Variationen. Besser: Non-Redundant Datasets NLR-3D, OWL, ...
- Statistischer Bias
  - Proteinlänge nicht berücksichtigt
  - Lange Proteine haben höhere Grundwahrschein-lichkeit, ein bestimmtes Peptid zu enthalten
  - Relative Häufigkeit von Peptiden nicht beachtet
- Keine Einschätzung der Güte des Ergebnis
  - Keine Garantie, das Spektrum in DB enthalten

Praktische Algorithmen

- Heuristische Korrekturfaktoren
  - MOWSE
  - Matches mit Score
  - Beachtung Peptidhäufigkeit und Proteinmasse
- Wahrscheinlichkeitsbasierte Verfahren
  - ProFound
  - Bayes-basiert
  - Beachtung Messfehler, Proteingröße und Peptidhäufigkeiten
- Diverse weitere Algorithmen: MASCOT, PeptIdent, ProteinProspector, ...

Kompletter Workflow

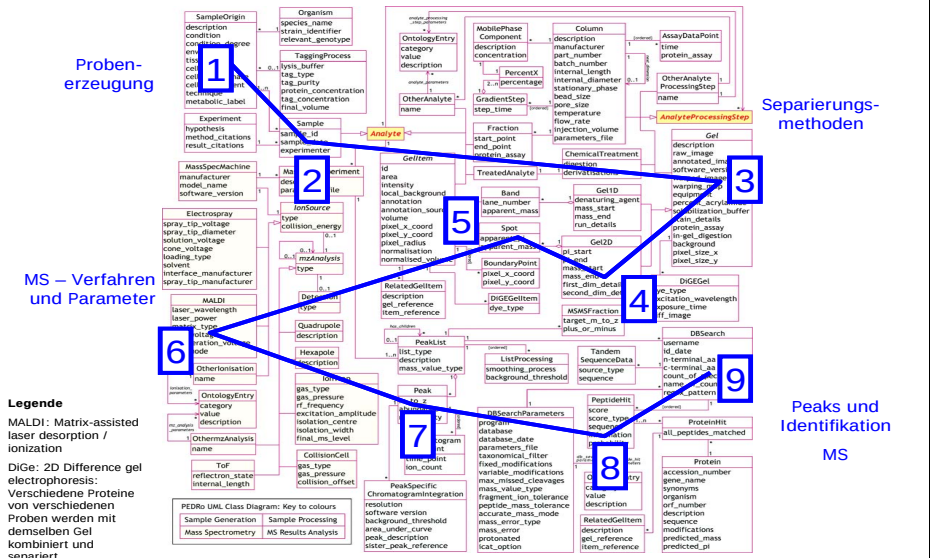


PEDRo

- Proteomics Experiment Data Repository
- Systematischer Ansatz zur
  - Modellierung
  - Speicherung und
  - Distribution

  von Proteomics-Experimentaldaten und deren Interpretation
- University Manchester (Taylor, Paton & Goble)
- http://pedro.man.ac.uk/home.shtml

PEDRo-Schema



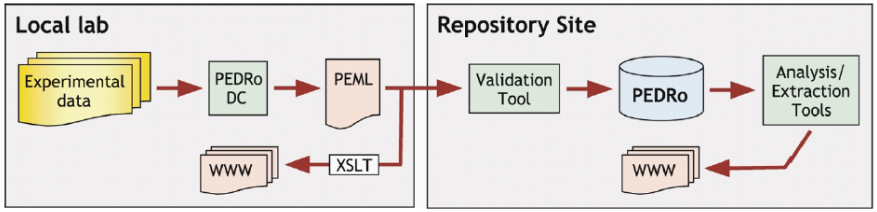
PEML: Proteomics Markup Language

```
<xs:element name="Protein">
        <xs:complexType>
                <xs:sequence>
                        <xs:element name="accession_number" type="xs:string"/>
                        <xs:element name="gene_name" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="synonyms" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="organism" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="orf_number" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="description" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="sequence" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="modifications" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="predicted_mass" type="xs:decimal" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="predicted_pi" type="xs:decimal" minOccurs="0"/>
                </xs:sequence>
        </xs:complexType>
</xs:element>
<xs:element name="ProteinHit">
        <xs:complexType>
                <xs:sequence>
                        <xs:element name="all_peptides_matched" type="xs:boolean" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="component_peptides" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="masses_matched" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="score" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element name="score_type" type="xs:string" minOccurs="0"/>
                        <xs:element ref="Protein"/>
                        <xs:element ref="RelatedGelItem" minOccurs="0" maxOccurs="unbounded"/>
                </xs:sequence>
        </xs:complexType>
</xs:element>
```

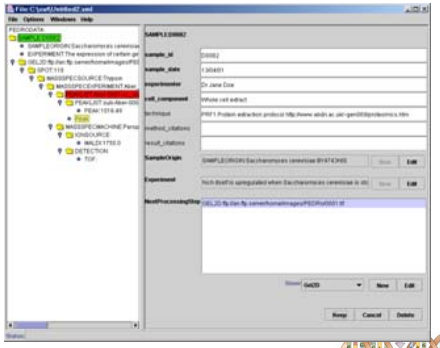
PEDRo: SQL-Schema (Ausschnitt)

```
CREATE TABLE Experiment /* Describes the overall motivation for the proteomics experiment */
        (
        id      integer PRIMARY KEY     ,
        hypothesis      varchar(500)    NOT NULL        ,       /* Summary of the motivation for the work */
        method_citations        varchar(200)    ,       /* References to method paper(s) */
        result_citations        varchar(200)    /* References to results paper(s) */
        );

CREATE TABLE Sample     /* Identifiers for the sample to be analysed */
        (
        sample_id       varchar(50)     PRIMARY KEY     ,       /* Unique (lab assigned) identifier */
        sample_date     date    NOT NULL        ,       /* Date on which sample was obtained */
        experimenter    varchar(200)    NOT NULL        ,       /* Name of experimenter who produced the sample */
        experiment      integer REFERENCES Experiment ON DELETE CASCADE
        );

CREATE TABLE Organism   /* Identifiers for the organism used */
        (
        id      integer PRIMARY KEY     ,
        species_name    varchar(100)    NOT NULL        ,       /* Full systematic name of species */
        strain_identifier       varchar(100)    NOT NULL        ,       /* Identification string for particular strain */
        relevant_genotype       varchar(200)    /* List of relevant gene names */
        );
```

PEDRo: Datenfluss



- PedroDC: Pedro Graphical User Interface
- XSLT: eXtensible Stylesheet Language for Transformation



PEDRo: Bewertung

- Noch keine Vergleiche / Erfahrungsberichte verfügbar
- Keine Modellierung der Dynamik der Prozesse
  - Constraints
  - Zustandsübergange
  - Workflow
- Kein Standard (PEDRo ist ein Versuch)
- Unklarer Nutzen vieler Metadaten
  - Experimente sind oft nicht vergleichbar
  - Und werden auch bei genauerer Beschreibung nicht vergleichbar