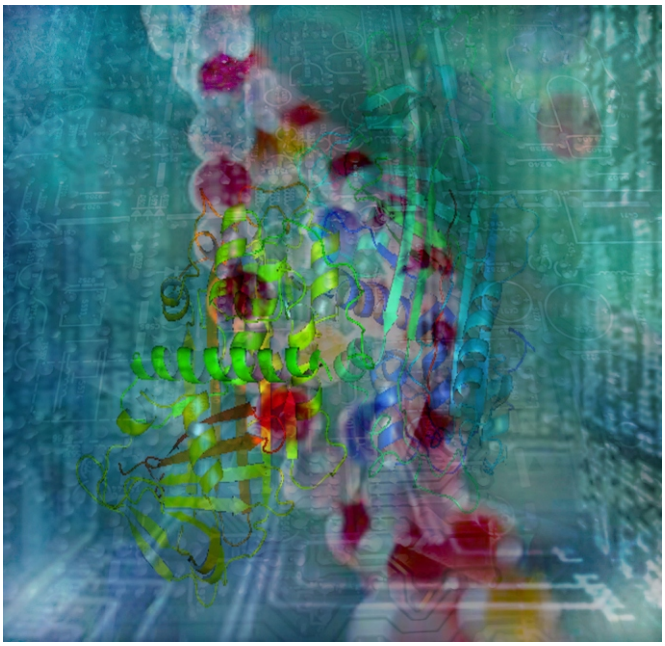
Comunicado Técnico 81
Julho, 2007
Campinas, SP



ISSN 1677-8464

VPRO - Um Identificador de Padrões de Seqüências

Edgard Henrique dos Santos[1]
Paula Regina Kuser Falcão[2]
Goran Neshich[3]

Quando se deseja identificar a função, homólogos ou a família de uma proteína é essencial o uso de informações contidas no banco de dados de padrões PROSITE (Hulo et al., 2006).

O banco de dados PROSITE consiste em uma grande coleção de padrões com significado biológico que são descritos como expressões regulares usados para a detecção de seqüências específicas e também genéricas, como uma matriz de distribuição de nucleotídeos para a busca de grandes domínios. Todos os padrões são construídos usando alinhamentos feitos manualmente e possuem uma extensiva documentação sobre funções, ocorrências taxonômicas entre outras informações. Os padrões do PROSITE fazem parte do processo de anotação de proteínas da UniProtKB/Swiss-Prot (Swiss Institute of Bioinformatics, 2006).

Para cada grupo de informação do PROSITE existe um template de regras chamado ProRule (de Castro et al., 2006). Essas regras são usadas internamente pelo grupo Swiss-Prot para automatizar a inclusão de domínios no PROSITE. As regras definem o significado biológico da informação específica dos resíduos com seus respectivos domínios. Essa informação, derivada do mapeamento de resíduos significativos dentro de uma seqüência, é encontrada na forma de blocos de dados que, em conjunto com o padrões na forma de expressões regulares, permitem a identificação de características de intra-domínios, como sítios ativos, locais de ligação ou pontes de dissulfeto.

Como forma de facilitar a análise de seqüências do banco de dados de estruturas PDB que possuam padrões identificados no banco de dados PROSITE, foi criado pelo grupo de Bioinformática, da Embrapa Informática Agropecuária (2006), o programa VPRO.

Programa VPRO

O VPRO foi desenvolvido em Java (Sun Microsystems, 2007) e faz parte do contexto das rotinas de cálculo de parâmetros estruturais de proteínas do Sting (Higa et al., 2003).

A necessidade de se obter ganho computacional e a iniciativa da transição das rotinas de controle de execução de cálculo, originalmente em Perl (Perl

[1] Bacharel em Ciência da Computação, Analista da Embrapa Informática Agropecuária, Caixa Postal 6041, Barão Geraldo - 13083-970 - Campinas, SP. (e-mail: edgard@cnptia.embrapa.br)
[2] Ph.D. em física Aplicada - Cristalografia de Proteínas, Pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária, Caixa Postal 6041, Barão Geraldo - 13083-970 - Campinas, SP. (e-mail: paula@cnptia.embrapa.br)
[3] Ph.D. em Biofísica, Pesquisador da Embrapa Informática Agropecuária, Caixa Postal 6041, Barão Geraldo - 13083-970 - Campinas, SP. (E-mail: neshich@cnptia.embrapa.br)

Embrapa

Foundation, 2006), para Java, foram os principais motivos para a criação do VPRO.

O programa transforma seqüências de aminoácidos encontradas nos arquivos PDB para o formato FASTA (Fasta..., 2006) e as analisa relativamente a cada padrão do PROSITE, gerando como saída os dados posicionais da seqüência correspondentes.

As seqüências de proteínas do arquivo PDB são transformadas para o formato FASTA para facilitar a comparação dos padrões com as expressões regulares do PROSITE.

Como exemplo mostra-se parte do arquivo PDB 1C30:

```
CISPEP  23 ARG G  998    PRO G  999         0       -0.35
CISPEP  24 SER H  357    PRO H  358         0        2.31
CRYST1  152.600   164.600  332.700  90.00  90.00  90.00 P 21 21 21    16
ORIGX1      1.000000  0.000000  0.000000        0.00000
ORIGX2      0.000000  1.000000  0.000000        0.00000
ORIGX3      0.000000  0.000000  1.000000        0.00000                                                          .
SCALE1      0.006553  0.000000  0.000000        0.00000
SCALE2      0.000000  0.006075  0.000000        0.00000
SCALE3      0.000000  0.000000  0.003006        0.00000
ATOM      1  N   MET A   1      28.271  23.163 102.440  1.00 85.67
ATOM      2  CA  MET A   1      29.110  21.961 102.260  1.00100.00
ATOM      3  C   MET A   1      30.268  22.085 101.213  1.00100.00
ATOM      4  O   MET A   1      30.124  22.736 100.163  1.00100.00
ATOM      5  CB  MET A   1      28.252  20.663 102.118  1.00100.00
ATOM      6  CG  MET A   1      28.553  19.553 103.150  1.00100.00
ATOM      7  SD  MET A   1      27.139  18.847 104.095  1.00100.00
ATOM      8  CE  MET A   1      26.012  18.235 102.790  1.00100.00
ATOM      9  N   PRO A   2      31.430  21.446 101.520  1.00100.00
ATOM     10  CA  PRO A   2      32.638  21.436 100.681  1.00 33.21
ATOM     11  C   PRO A   2      32.577  20.330  99.622  1.00 44.21
ATOM     12  O   PRO A   2      31.506  19.784  99.281  1.00 55.17
ATOM     13  CB  PRO A   2      33.795  21.158 101.642  1.00 50.30
ATOM     14  CG  PRO A   2      33.178  20.575 102.914  1.00 72.34
ATOM     15  CD  PRO A   2      31.682  20.842 102.860  1.00 65.46
ATOM     16  N   LYS A   3      33.732  19.943  99.100  1.00 32.46
ATOM     17  CA  LYS A   3      33.681  18.934  98.073  1.00 42.71
ATOM     18  C   LYS A   3      33.096  17.595  98.416  1.00 31.22
ATOM     19  O   LYS A   3      33.140  17.105  99.539  1.00 68.37
ATOM     20  CB  LYS A   3      34.955  18.759  97.300  1.00 57.99
ATOM     21  CG  LYS A   3      35.933  17.904  98.058  1.00 70.49
ATOM     22  CD  LYS A   3      37.360  18.029  97.539  1.00100.00
ATOM     23  CE  LYS A   3      37.907  16.738  96.925  1.00100.00
ATOM     24  NZ  LYS A   3      39.309  16.428  97.264  1.00100.00
ATOM     25  N   ARG A   4      32.564  17.016  97.352  1.00 62.09
ATOM     26  CA  ARG A   4      31.966  15.719  97.372  1.00 32.33
ATOM     27  C   ARG A   4      33.098  14.682  97.480  1.00100.00
ATOM     28  O   ARG A   4      34.191  14.775  96.889  1.00 41.30
ATOM     29  CB  ARG A   4      31.052  15.452  96.165  1.00 82.70
ATOM     30  CG  ARG A   4      29.559  15.660  96.450  1.00 37.99
ATOM     31  CD  ARG A   4      28.629  15.420  95.246  1.00 41.55
ATOM     32  NE  ARG A   4      27.981  14.099  95.194  1.00 29.84
...
```

A primeira coluna, cujos valores são ATOM, contém em cada linha informações sobre seqüências e cadeias da proteína 1C30. No formato FASTA esta informação se apresenta da seguinte forma:

>CHAIN A - (CRYSTAL STRUCTURE OF CARBAMOYL PHOSPHATE SYNTHETASE: SMALL 2 SUBUNIT MUTATION C269S)
MPKRTDIKSILILGAGPIVIGQACEFDYSGAQACKALREEGYRVILVNSNPATIMTDPEMADATYIEPIHWEVVRKIIEKERPDAVLPTM
GGQTALNCALELERQGVLEEFGVTMIGATADAIDKAEDRRRFDVAMKKIGLETARSGIAHTMEEALAVAADVGFPCIIRPSFTMGGS
GGGIAYNREEFEEICARGLDLSPTKELLIDESLIGWKEYEMEVVRDKNDNCIIVCSIENFDAMGIHTGDSITVAPAQTLTDKEYQIMRN
ASMAVLREIGVETGGSNVQFAVNPKNGRLIVIEMNPRVSRSSALASKATGFPIAKVAAKLAVGYTLDELMNDITGGRTPASFEPSIDYV
VTKIPRFNFEKFAGANDRLTTQMKSVGEVMAIGRTQQESLQKALRGLEVGATGFDPKVSLDDPEALTKIRRELKDAGADRIWYIADA
FRAGLSVDGVFNLTNIDRWFLVQIEELVRLEEKVAEVGITGLNADFLRQLKRKGFADARL
...

Após comparação com os dados do PROSITE, explicada mais detalhadamente adiante, tem-se a saída apresentada a seguir:

```
1C30
A     014   024   PS00013
A     164   178   PS00866
A     297   304   PS00867
A     839   846   PS00867
C     014   024   PS00013
C     164   178   PS00866
C     297   304   PS00867
C     839   846   PS00867
E     014   024   PS00013
E     164   178   PS00866
E     297   304   PS00867
E     839   846   PS00867
G     014   024   PS00013
G     164   178   PS00866
G     297   304   PS00867
G     839   846   PS0086
```

A primeira linha mostra a cadeia e em seguida as posições inicial e final e o código descritivo do PROSITE. Este código faz parte do início do grupo de informações sobre família e domínio de proteínas dentro do arquivo prosite.dat. Os grupos são separados por linhas contendo duas barras. A primeira coluna contém para cada linha dois caracteres que identificam as informações descritas na segunda coluna de dados:

```
//
ID   PROKAR_NTER_METHYL; PATTERN.
AC   PS50075;
DT   NOV-1997 (CREATED); NOV-1997 (DATA UPDATE); DEC-2005 (INFO UPDATE).
DE   Acyl carrier protein phosphopantetheine domain profile.
MA   /GENERAL_SPEC: ALPHABET='ABCDEFGHIKLMNPQRSTVWYZ'; LENGTH=71;
MA   /DISJOINT: DEFINITION=PROTECT; N1=6; N2=66;
MA   /NORMALIZATION: MODE=1; FUNCTION=LINEAR; R1=2.3; R2=.02281121; TEXT='-LogE';
MA   /CUT_OFF: LEVEL=0; SCORE=271; N_SCORE=8.5; MODE=1; TEXT='!';
MA   /CUT_OFF: LEVEL=-1; SCORE=184; N_SCORE=6.5; MODE=1; TEXT='?';
MA   /DEFAULT: D=-20; I=-20; B1=-80; E1=-80; MI=-105; MD=-105; IM=-105; DM=-105; MM=1; M0=-1;
MA   /I: B1=0; BI=-105; BD=-105;
MA   /M: SY='T'; M=-5,-15,-20,-17,-12,-10,-22,-18,2,-13,-1,0,-13,-6,-10,-13,-5,4,1,-23,-9,-12;
MA   /M: SY='E'; M=-6,-6,-22,-6,9,-13,-21,-9,-11,0,-8,-7,-7,-13,1,1,-4,-3,-8,-24,-10,4;
MA   /M: SY='E'; M=-5,9,-24,11,15,-24,-12,-3,-23,3,-20,-15,6,-9,5,1,4,-2,-19,-29,-16,9;
MA   /M: SY='E'; M=-5,2,-26,4,8,-22,-13,-7,-21,7,-17,-12,0,-13,3,7,-2,-6,-16,-22,-12,5;
MA   /M: SY='L'; M=-6,-27,-19,-30,-23,4,-30,-23,26,-25,28,17,-25,-27,-21,-20,-19,-5,23,-23,-3,-23;
MA   /M: SY='R'; M=-3,-10,-10,-11,2,-16,-19,-11,-13,-1,-8,-7,-8,-17,-1,3,-5,-6,-9,-26,-13,-1;
MA   /M: SY='E'; M=-1,3,-23,4,9,-24,-11,-7,-22,8,-19,-13,2,-11,5,6,2,-2,-17,-26,-15,7;
...
DR   Q12397, STCA_EMENI , T; P09095, TYCA_BREPA , T; O30408, TYCB_BREPA , T;
DR   O30409, TYCC_BREPA , T; P74965, VENB_VIBVU , T; O07900, VIBB_VIBCH , T;
DR   Q03149, WA_EMENI   , T;
DR   P80916, ACP_ACICA  , P; P80917, ACP_ALCFA  , P; P80919, ACP_ERYLO  , P;
DR   Q8GR69, DLTC_ABIDE , N; Q81T99, DLTC_BACAN , N; P61398, DLTC_BACC1 , N;
DR   Q81G41, DLTC_BACCR , N; Q63E04, DLTC_BACCZ , N; Q6HLH9, DLTC_BACHK , N;
DR   P39579, DLTC_BACSU , N; P61399, DLTC_LACJO , N; Q9CG51, DLTC_LACLA , N;
DR   Q92D49, DLTC_LISIN , N; Q5HHF0, DLTC_STAAC , N; P0A018, DLTC_STAAM , N;
DR   P0A019, DLTC_STAAN , N; Q6GIF4, DLTC_STAAR , N; Q6GAZ2, DLTC_STAAS , N;
DR   P0A021, DLTC_STAAU , N; P0A020, DLTC_STAAW , N; Q5HQM8, DLTC_STAEQ , N;
DR   Q8CPW0, DLTC_STAES , N; Q4L4U7, DLTC_STAHJ , N; Q49W73, DLTC_STAS1 , N;
DR   Q9X2N6, DLTC_STAXY , N;
DR   Q9CIS9, CBIO1_LACLA, F;
3D   1ACP; 1AF8; 1DNY; 1DV5; 1F80; 1HQB; 1HY8; 1KLP; 1L0H; 1L0I; 1N8L; 1NNZ;
3D   1NQ4; 1OP7; 1T8K; 2AF8;
DO   PDOC00012;
//
ID   PROKAR_LIPOPROTEIN; RULE.

AC   PS00013;

DT   APR-1990 (CREATED); JUL-2003 (DATA UPDATE); DEC-2005 (INFO UPDATE).
DE   Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site.

PA   {DERK}(6)-[LIVMFWSTAG](2)-[LIVMFYSTAGCQ]-[AGS]-C.


RU   Additional rules:
RU   (1) The sequence must start with Met.
RU   (2) The cysteine must be between positions 15 and 35 of the sequence in
RU       consideration.
RU   (3) There must be at least one charged residue (Lys or Arg) in the first
RU       seven residues of the sequence.
```

```
NR   /RELEASE=48.8,205780;
NR   /TOTAL=1344(1332); /POSITIVE=945(937); /UNKNOWN=119(117);
NR   /FALSE_POS=280(278); /FALSE_NEG=49; /PARTIAL=4;
CC   /TAXO-RANGE=AB?P?; /MAX-REPEAT=2;
CC   /SITE=5,lipid;
CC   /VERSION=1;
DR   P50927, 17KD_RICAM , T; P50928, 17KD_RICAU , T; P0A3N4, 17KD_RICCN , T;
DR   Q52764, 17KD_RICJA , T; P50929, 17KD_RICMO , T; P50930, 17KD_RICPA , T;
DR   P16624, 17KD_RICPR , T; P50931, 17KD_RICRH , T; P0A3N5, 17KD_RICRI , T;
DR   P22882, 17KD_RICTY , T; O83142, 5NTD_TREPA , T; Q9KQ30, 5NTD_VIBCH , T;
DR   P22848, 5NTD_VIBPA , T; Q8DFG4, 5NTD_VIBVU , T; Q46837, ACFD_ECOLI , T;
DR   Q9KTQ4, ACFD_VIBCH , T; P0AE07, ACRA_ECO57 , T; P0AE06, ACRA_ECOLI , T;
DR   P24180, ACRE_ECOLI , T; O05703, ADCA_STRPN , T; Q8CWN2, ADCA_STRR6 , T;
DR   P94202, ALGK_AZOVI , T; P96956, ALGK_PSEAE , T; Q88NC7, ALGK_PSEPK , T;
...
```

A linha AC (ACcession number) mostra o número de inserção associado a cada grupo, ou código descritivo. O formato é sempre:

AC Psnnnnn;

Onde 'PS' se refere a PROSITE e 'nnnnn' um número com cinco dígitos.

A linha PA (PAttern) contém a definição de um padrão PROSITE. Os padrões são descritos usando as convenções do Swiss-Prot group (http://ca.expasy.org/prosite/prosuser.hAla-any-[Ser or Thr]-[Ser or Thr]-(any or none)-Vatml#convent32)

Um exemplo de padrão:

PA <A-x-[ST](2)-x(0,1)-V.

Este padrão, que precisa estar em um N-terminal (a extremidade de uma proteína ou polipetídeo terminada por um aminoácido com um grupo amino livre) de uma seqüência (representado pelo sinal '<'), é traduzido como: Ala-qualquer-[Ser or Thr]-[Ser or Thr]-(qualquer ou nenhuma) -Val

A linha RU (Rules) contém regras adicionais que não são possíveis de descrever apenas com expressões regulares, mas que devem ser observadas quando os padrões são comparados.

O trecho de código a seguir mostra um exemplo de regra:

```
1: String ps13rule =”[^DERK]{6}[LIVMFWSTAG]{2}[LIVMFYSTAGCQ][AGS]C";
2: String part;

3:  regex = Pattern.compile(ps13rule);

4:  matcher = regex.matcher(seq);

5:          if (matcher.find()) {

6:                      part = seq.substring(0, matcher.start());

7:                      if ((matcher.end() >= 15) && (matcher.end() <= 35)) {

8:                                  regex = Pattern.compile("^[M][A-Z]*[KR][A-Z]*");
```

Na linha 1, a regra obtida do PROSITE é uma expressão regular. Caso essa expressão seja encontrada na seqüência (linha 5), a análise passa a um próximo nível de verificação (linha 7) e assim por diante.

O VPRO usa as linhas PA e RU do PROSITE como base para a análise das seqüências, juntamente com os aminoácidos no formato FASTA.

As regras e as expressões regulares são traduzidas para a sintaxe do Java. Essas informações são previamente inseridas na memória pelo programa para reduzir o tempo de processamento. Em seguida é feita a comparação das seqüências por cadeia de cada um dos 41.000 arquivos PDB com as regras do PROSITE (PA e RU).

A forma simplificada do algorítmo:

```
abre o PROSITE;
carrega-o na memória;

   para cada arquivo pdb {

            para cada cadeia {

                        transforma sequencia para formato FASTA;

                        verifica_regras- >compara_sequencia_PROSITE(sequencia fasta,prosite hash);


                              }

                              gera saida em arquivo text
                        }
```

Posteriormente essa informação pode ser obtida pelo STING no módulo JavaProteinDossier (Neshich et al., 2004) (Fig. 1 e 2).

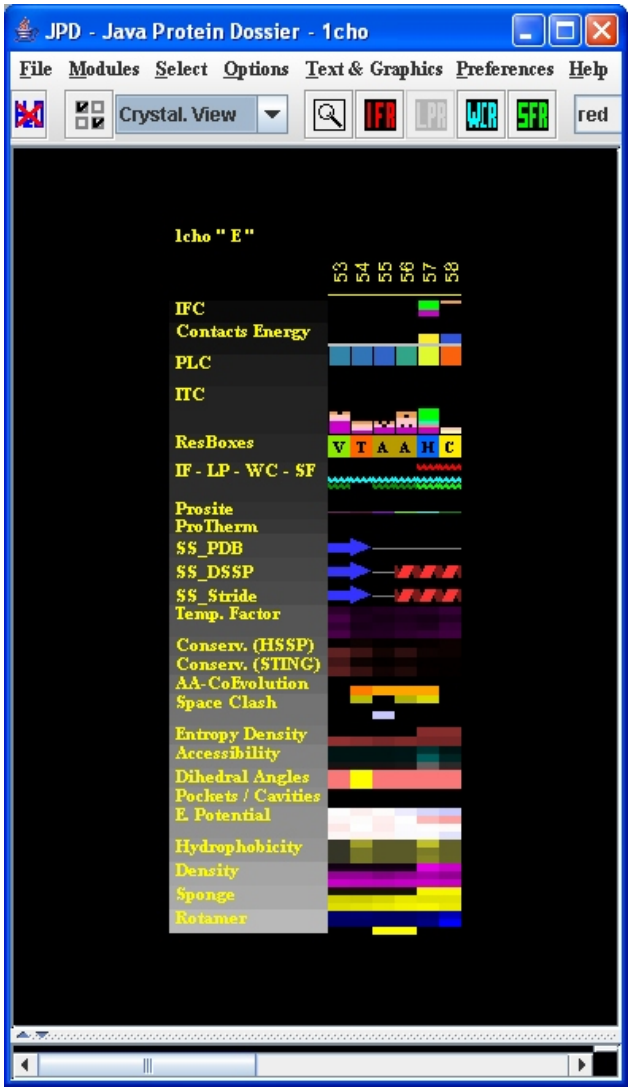


Fig.1. Parte da seqüencia de aminoácios da proteína 1cho representados no JPD.

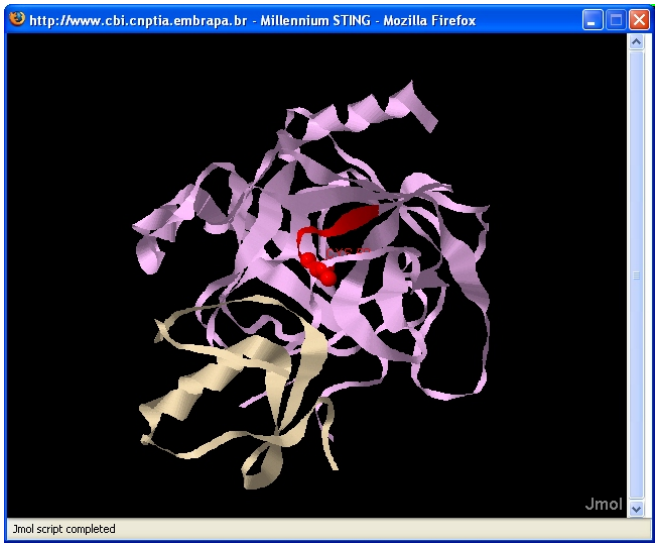


Fig. 2. Representação das seqüências de aminoácidos correspondentes ao PROSITE em 3D.

O programa pode ser acionado por linha de comando, passando como parâmetros o banco PROSITE, o caminho dos arquivos PDB e o local de armazenamento dos arquivos de saída; exemplo: "$ java vpro /db/prosite /db/pdb /db/pro".

Pode ser também usado como API (Application Programming Interface) por outros programas Java.

Conclusões

A busca de padrões de seqüências do PROSITE é simples e permite concluir informações importantes sobre a estrutura das proteínas. Mas para isso a escolha e o uso de ferramentas computacionais é fundamental.

O VPRO é uma alternativa para tornar mais eficiente a análise de seqüências no contexto de gerenciamento de cálculos do Sting usando Java.

Outras vantagens são a facilidade de uso, a opção de interagir com os aquivos PDB sem a necessidade de programas auxiliares e poder ser instanciado por outros programas Java.

Referências Bibliográficas

DE CASTRO, E.; SIGRIST, C. J. A.; GATTIKER, A.; BULLIARD, V.; PETRA, S.; LANGENDIJK-GENEVAUX, P. S.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; HULO, N. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*., v. 34, (Web Server issue), p. W362-W365, July 2006.

EMBRAPA INFORMÁTICA AGROPECUÁRIA. *Embrapa Informática Agropecuária [home page]*. Disponível em: <http://www.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 06 nov. 2006.

FASTA format description. Disponível em: <http://compbio.mcs.anl.gov/blast/docs/fasta.html>. Acesso em: 06 nov. 2006.

HIGA, R. H.; TOGAWA, R. C.; MANCINI, A.; FALCÃO, P. R. K.; YAMAGISHI, M. E. B.; PAPPAR JUNIOR, G.; TORRES, V. W.; CAMOS, T. F. E.; BAUDET, C.; NESHICH, G. STING Millennium: a web-based suite of programms for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. *Nucleic Acids Res.,* v. 31, n. 13, p. 3386-3392, 2003.

HULO, N.; BAIROCH, A.; BULLIARD, V.; CERUTTI, L., DE CASTRO, E.; LANGENDIJK-GENEVAUX, P. S.; PAGNI, M.; SIGRIST, C. J. A. The PROSITE database. *Nucleic Acids Res*., v. 34, (Database issue), p. D227-D230, Jan. 2006.

NESHICH, G.; MANCINI, A; BAUDET, C.; YAMAGISHI, M. E. B.; FALCÃO, P. R. K.; FILETO, R.; ROCCHIA, W.; PINTO, I.; MONTANER, A.; PALANDRANI, J.; KRAUCHENKO, J.; TORRES, R. C.; SOZA, S.; TOGAWA, R. C.; HIA, R. H. Java Protein Dossier: a novel web based data visualization tool for comprehensive analysis of protein structure. *Nucleic Acids Res.,* v. 32, p. W595-W601, 2004.

THE PERL FOUNDATION. *The Perl Directory - perl.org*. Disponível em: <http://www.perl.org/>. Acesso em: 06 nov. 2006.

SUN MICROSYSTEMS. *Java SE - overview - at a glance*. Disponível em: <http://java.sun.com/javase/>. Acesso em: 06 maio 2007.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. *UniProtKB/Swiss-Prot*. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>. Acesso em: 06 nov. 2006.

Comunicado Técnico, 81

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

BRASIL UM PAÍS DE TODOS GOVERNO FEDERAL

Embrapa Informática Agropecuária
Área de Comunicação e Negócios (ACN)
Endereço: Caixa Postal 6041 - Barão Geraldo
13083-970 - Campinas, SP
Fone: (19) 3789-5743
Fax: (19) 3289-9594
e-mail: sac@cnptia.embrapa.com.br

1ª edição on-line - 2007