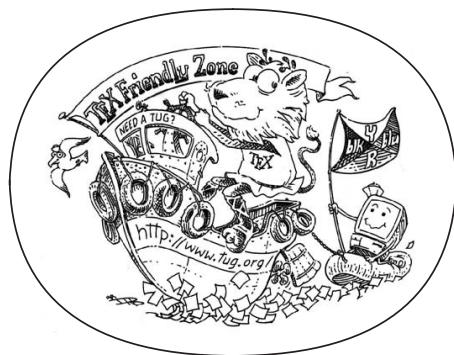


JOSÉ GERALDO DE CARVALHO PEREIRA
AUTÔMATOS CELULARES E PROTEÍNAS

AUTÔMATOS CELULARES E PROTEÍNAS

JOSÉ GERALDO DE CARVALHO PEREIRA



Exploração de um novo modelo para a predição de estruturas secundárias

Agosto de 2016 – version 4.2

José Geraldo de Carvalho Pereira: *Autômatos celulares e proteínas, Exploração de um novo modelo para a predição de estruturas secundárias*, © Agosto de 2016

RESUMO

Short summary of the contents in English...a great guide by Kent Beck how to write good abstracts can be found here:

<https://plg.uwaterloo.ca/~migod/research/beck00PSLA.html>

ABSTRACT

Resumo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTINGS

ACRONYMS

Parte I
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

INTRODUÇÃO

O problema do enovelamento de proteínas é a questão de como são formadas ou organizadas suas estruturas atômicas tridimensionais. Essa questão surgiu no final da década de 50, logo após a resolução atômica da primeira estrutura proteica por Kendrew e colaboradores [KENDREW:1953], trabalho no qual se observou experimentalmente, segundo o próprio autor, uma complexidade maior que as antecipadas pelas teorias da época sobre estruturas proteicas.

Posteriormente, Anfinsen [Anfinsen:1968] realizou experimentos que demonstraram que a ribonuclease poderia ser reversamente desnaturada/renaturada *in vitro*, e que em condições desnaturantes, tanto a estrutura quanto a função eram perdidas, no entanto, ambas eram recuperadas ao retornarem à condições fisiológicas. A conclusão foi que, apesar da grande complexidade observada, as proteínas se auto-organizavam estruturalmente, assim, apenas a informação contida em sua sequência de aminoácidos seria suficiente para definir sua estrutura e que esta determinaria a sua função. A explicação de Anfinsen para esta auto-organização estrutural foi dada através da hipótese termodinâmica, a qual postula que em condições fisiológicas a população proteica atinge um mínimo de energia livre de Gibbs no seu estado nativo [Rose:2001].

Dessa forma, devido ao princípio da relação estrutura ↔ função e a resultados experimentais que demonstraram que a estrutura é determinada pela sequência de aminoácidos, diversos trabalhos buscaram prever a estrutura de uma proteína a partir da sua sequência de resíduos. Alguns dos primeiros trabalhos a discutir uma forma de previsão foram publicados por Levinthal [Levinthal:1963, Levinthal:]. Nestes trabalhos o autor menciona que o número de configurações estruturais possíveis para uma cadeia polipeptídica é imenso, sendo impossível explorar todas as conformações para encontrar sua estrutura nativa. Apesar disso, as proteínas são capazes de se enovelarem espontaneamente e adotar a conformação nativa numa escala de segundos ou menos. Esta observação ficou popularmente conhecida como Paradoxo de Levinthal. Entretanto, Levinthal não considerou isso como um resultado absurdo, mas baseou-se nessa análise para concluir que um mecanismo aleatório para o enovelamento não seria válido [Ben-Naim:2007]. Segundo Levinthal [Levinthal:], uma possível explicação para a eficiência observada no processo seria a formação rápida de interações locais que acelerariam e guiariam o enovelamento:

We feel that protein folding is speeded and guided by the rapid formation of local interactions, which then determine the further folding of the peptide.

Apesar da sugestão de Levinthal para explicar um possível mecanismo de enovelamento ter sido publicado há 45 anos, o desafio de se prever as estruturas tridimensionais das proteínas a partir de suas sequências de aminoácidos, mesmo obtendo grande progresso no últimos anos, ainda permanece sem uma solução definitiva [Moult:2009]. Assim, métodos experimentais, mais especificamente, os métodos de cristalografia de proteínas por difração de raios-X e o de ressonância magnética nuclear, são as principais forma de se obter um modelo estrutural com resolução atômica.

Entretanto, métodos experimentais de resolução da estrutura proteica apresentam diversas dificuldades técnicas. Por exemplo, na cristalografia por difração de raios-X é necessária a obtenção de proteína em alto grau de pureza e a formação de monocrystalis, que muitas vezes são fatores limitantes do processo. Por outro lado, a ressonância magnética nuclear exige altas concentrações de proteína purificada em meios com diferentes isótopos e ainda além de possuir uma limitação quanto ao tamanho da proteína analisada. Essas limitações experimentais são evidenciadas pela disparidade entre o número de estruturas resolvidas experimentalmente (≈ 115 mil depositadas no PDB) e o número de proteínas com sequência de aminoácido conhecidas (≈ 67 milhões depositadas no UniProtKB/TrEMBL – dados de 09/2016).

Consequentemente, a busca por métodos computacionais capazes de prever estruturas proteicas continua uma área de grande interesse científico, tanto como uma forma de se conhecer melhor o mecanismo de enovelamento como também na utilização da informação estrutural para responder diversas questões biológicas com diversas aplicações práticas como o desenvolvimento de novos medicamentos [Baker:1996].

1.1 MÉTODOS COMPUTACIONAIS DE MODELAGEM ESTRUTURAL

Os métodos computacionais desenvolvidos e utilizados para construir modelos estruturais das proteínas podem ser classificados em dois tipos: (1) modelagem comparativa e (2) modelagem ab initio ou de novo, sendo considerados ab initio os métodos que não utilizam informações provenientes de proteínas com estruturas similares ao invés de apenas métodos que utilizem informação de caráter exclusivamente físico [Helle:2003]. Dentre os métodos de predição estrutural ab initio, os que tem apresentado melhor desempenho são os que utilizam uma técnica de montagem de fragmentos (*fragment assembly*) como o I-Tasser [Zhang:2003] e o Rosetta [Rohl:1999]. Esses métodos utilizam fragmentos extraídos de proteínas com estrutura

resolvida experimentalmente, os quais posteriormente são reunidos de acordo com a sequência de aminoácidos da proteína a qual se deseja construir um modelo. A utilização de fragmentos tem como objetivo acelerar a busca pelo modelo correto, entretanto, este ainda é um método caro computacionalmente e informações como a predição da estrutura secundária e de contatos não-locais entre resíduos são comumente utilizadas para restringir o número de fragmentos a serem testados, consequentemente reduzindo o espaço de busca e acelerando a modelagem da estrutura [Helle:2003].

A outra categoria de métodos de modelagem, a modelagem comparativa, necessita que estruturas similares à da proteína que se deseja modelar tenham sido previamente resolvidas experimentalmente. Os métodos de modelagem comparativa baseiam-se no princípio que, em proteínas homólogas, a estrutura é mais conservada do que a sequência de aminoácidos. Sendo assim, proteínas que tenham uma identidade entre as sequências maior que 30%, apresentando assim uma evidência de homologia, podem ser modeladas caso uma delas tenha estrutura resolvida [Marti-Renom:1995]. Isso não significa que proteínas com identidade sequencial menor que 30% não possam apresentar estruturas tridimensionais similares. Entretanto, a identificação dessas proteínas homólogas e o alinhamento entre as sequências, ambos passos essenciais durante a modelagem comparativa, tornam-se mais suscetíveis a erros [Marti-Renom:1995].

Na tentativa de contornar a deficiência da construção do alinhamento para a modelagem comparativa foram desenvolvidos métodos que buscam identificar proteínas com estruturas similares, mas baixa identidade sequencial (< 30%). Esse métodos, conhecidos como métodos de reconhecimento de enovelamento, englobam métodos de comparação sequência-estrutura e métodos de alinhavamento (*threading*) [Dunbrack:2001]. O diferencial desses métodos em relação ao simples alinhamento entre sequências primárias está na utilização de informações estruturais como por exemplo, estrutura secundária, exposição ao solvente, entre outros, para descrever o ambiente em que cada resíduo se encontra na proteína. Esses ambientes alteram os padrões de substituições de aminoácidos como demonstrado por Overington e colaboradores [Overington:1984]. Consequentemente, a utilização desses ambientes na construção de matrizes de substituição ou nos métodos de alinhavamento, permite uma estimativa da estrutura tridimensional que melhor acomoda a sequência de aminoácidos da proteína que se deseja modelar.

Outro argumento que justifica a aplicação do método de modelagem comparativa é a existência aparente de um número finito de enovelamentos adotados pelas proteínas, o qual alguns autores estimam ser entre 1.000 e 10.000 [Chothia:1987, Coulson:1997]. Portanto, com o aumento do número de estruturas resolvidas, acredita-se que futuramente esses enovelamentos estarão completamente representa-

dos nos bancos de dados, possibilitando a modelagem de um número cada vez maior de proteínas [Kolodny:2008].

Entretanto os métodos de modelagem comparativa não fornecem informações sobre o caminho, ou mesmo o mecanismo, de enovelamento da proteína, pois baseiam-se apenas na estrutura nativa para a construção do modelo [Helle:2003]. Essas informações sobre o caminho de enovelamento podem ser importantes para melhorar a previsão de estruturas terciárias como pode ser observado no trabalho de Giri e colaboradores [Giri:2007]. Neste trabalho os autores analisaram experimentalmente o enovelamento de proteínas com alta identidade entre as sequências (30%, 77% e 88%), mas que, mesmo com esta alta identidade, possuem topologias diferentes e notaram que as diferenças entre as topologias surgem logo no início do processo de enovelamento. Proteínas como essa, caso fossem modeladas comparativamente, provavelmente resultariam em modelos estruturais incorretos, o que a princípio poderia ser evitado com alguns métodos ab initio, como por exemplo os baseados em dinâmica molecular, ou por algum outro método capaz de obter informações sobre estágios intermediários do enovelamento a partir da sequência.

1.2 HIPÓTESES SOBRE O ENOVELAMENTO

A hipótese termodinâmica, apesar de explicar o enovelamento, não fornece informações sobre qual o mecanismo de enovelamento adotado pelas cadeias polipeptídicas na transição entre os estados desenovelado e nativo [Rose:2001]. Consequentemente, diversos mecanismos de enovelamento foram propostos [DilleChan:1997, Dill:2008; DilleMacallum:2012]. De maneira geral, esses mecanismos podem se distinguir em dois tipos: hierárquico e não-hierárquico. Num mecanismo hierárquico de enovelamento, acredita-se que o processo se inicia com estruturas que são formadas localmente na sequência e que comumente apresentam baixa estabilidade. A interação entre essas estruturas locais produziriam estruturas intermediárias, com complexidade crescente e maior estabilidade, até atingir a conformação nativa. Diferentemente, num mecanismo de enovelamento não-hierárquico, as interações não-locais não apenas estabilizariam as estruturas locais, mas seriam as responsáveis por determiná-las [BaldwinRose:1999].

Não há na literatura um consenso sobre qual tipo de mecanismo – hierárquico ou não hierárquico – descreve com maior fidelidade o enovelamento proteico, uma vez que há evidências experimentais e de simulação computacional que, ora sustentam um mecanismo, ora outro [BaldwinRose:1999, DaggetFersht:2003]. Devido a essas evidências, alguns autores propõem que, na realidade, ambos os mecanismos possam ocorrer, sendo portanto, não apenas a estrutura proteica, mas também o processo de enovelamento, determinados pela sequência de aminoácidos [DaggetFersht:2003].

Dentre as evidências que apontam para um mecanismo de enovelamento hierárquico estão estudos de proteínas como a α lactalbumina a apo-mioglobina, a RNase H, a barnase e o citocromo c, onde análises do processo de enovelamento indicam que ocorre uma rápida formação de estrutura secundária semelhante à observada na proteína nativa (native-like) e que a mesma é estabilizada em estruturas intermediárias (molten globules), ou seja, antes da proteína atingir sua conformação nativa [BaldwineRose:1999a]. Outras evidências que sugerem a existência de um mecanismo hierárquico são os padrões na sequência de aminoácidos que ocorrem imediatamente após as extremidades N e C terminal de hélices α [HarpereRose:1993, AuroraSrinivasaneRose:1994, Aurora:1997, BaldwineRose:1999a] e fitas β [ColloceCohen:1991], os quais acredita-se que atuem como sinal de término ou “parada” desses elementos de estrutura secundária. Outros trabalhos ainda demonstram que há preferência de algumas trincas de aminoácidos por determinadas conformações e estruturas secundárias [BetancourteSkolnick:2004, Otaki:2010], sendo que algumas trincas, interessantemente, não foram observadas uma única vez em alguns tipos de estruturas secundárias das proteínas analisadas [Otaki:2010].

Alguns trabalhos de simulação computacional [AbagyanTotrov:1994, PedersenMoult:1997] também identificaram que algumas sequências peptídicas, correspondentes a pequenas regiões de proteínas, apresentam maior propensão a adotar uma estrutura secundária, ou mesmo uma conformação, similar a observada na estrutura nativa da proteína original. Posteriormente, Srinivasan e Rose [SrinivasanRose:1999] realizaram simulações para demonstrar que essas propensões por estruturas secundárias surgiam de impedimentos estéricos entre os átomos de resíduos consecutivos na sequência e que essas estruturas correspondem a estrutura secundária de estados intermediários da proteína, sendo por vezes conservada na estrutura nativa e em outras, alterada devido a interações não locais.

Esses resultados observados na literatura sugerem ser possível um algoritmo para o reconhecimento de enovelamentos proteicos construído a partir de um método que recapitule a formação de estruturas locais durante o processo de enovelamento das proteínas. A princípio, um método com estas características permitiria não apenas identificar proteínas que tenham uma conformação nativa similar, mas uma identidade sequencial baixa, assim como os métodos atuais de reconhecimento de enovelamentos proteicos, mas possivelmente apresentar sensibilidade suficiente para evitar que proteínas com considerável identidade sequencial e entretanto baixa similaridade estrutural, como as observadas no trabalho de Giri e colaboradores [Giri:2012], sejam incorretamente modeladas por comparação [Helles:2008]. Acreditamos que um método com tais características possa ser desenvolvido utilizando autômatos celulares.

Os autômatos celulares foram inventados na década de 40 por John von Neumann baseando-se em sugestões de seu colega, o matemático Stanislaw Ulam [Mitchell:2009]. Autômatos celulares são modelos matemáticos para representar sistemas complexos e consistem num conjunto de células discretas espacialmente que apresentam um estado dentre um conjunto finito de estados possíveis. Os autômatos celulares evoluem paralelamente, ou seja, o estado de cada célula evolui de maneira síncrona em passos discretos de tempo e de acordo com regras simples e determinísticas gerando uma complexidade a partir do efeito cooperativo de elementos simples - as regras e as células - tratando-se portanto de uma complexidade emergente, que surge globalmente no sistema a partir de regras simples, locais e determinísticas [Wolfram:1984].

Autômatos celulares tem sido utilizados em diversos campos de pesquisa como por exemplo na modelagem de sistemas: (1) biológicos, desde eventos intracelulares, como redes de interação proteicas, até estudo de populações; (2) químicos, na modelagem cinética de sistemas moleculares e no crescimento de cristais; (3) físicos, para o estudos sistemas dinâmicos, desde a interação entre partículas até o agrupamento de galáxias (Ganguly et al., 2003). No entanto, não há na literatura artigos que mencionem a sua utilização na predição de enovelamentos proteicos. Apesar disso, acreditamos tratar-se de um modelo promissor.

2

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho será desenvolver um método de reconhecimento de enovelamento capaz de identificar, a partir da sequência de aminoácidos da proteína a qual se deseja modelar, estruturas proteicas resolvidas semelhantes a sua estrutura nativa. Tais estruturas podem ser tanto de proteínas que tenham evoluído divergentemente quanto convergentemente uma vez que não há uma comparação direta entre os resíduos das sequências, mas sim entre estruturas e padrões locais que emergem dessa estrutura primária. Este processo passa pela identificação correta da estrutura secundária da proteína a partir da sequência de aminoácidos. Para atingir tal objetivo, delineamos especificamente os objetivos a seguir.

Objetivos específicos

2. Aplicar este alfabeto a domínios proteicos obtidos do CATH e/ou SCOP para criar uma representação das estruturas em dimensões reduzidas – 1D;
2. Utilizar um conjunto de treinamento para ser usado na busca de regras de transição de estados para um autômato celular. Essas regras devem ser capazes de guiar a evolução do autômato celular de um estado inicial correspondente a sequência de aminoácidos da proteína até um estado que simbolize a estrutura secundária, mas representada em uma dimensão;
3. Testar as regras de transição selecionadas por apresentar melhor desempenho em proteínas não incluídas no conjunto de treinamento e assim, analisar a eficácia do autômato celular em obter informação estrutural a partir da sequência de aminoácidos das proteínas;
4. Utilizar o método de autômato celular com a melhor regra de transição para, quando aplicado em sequências de aminoácidos de proteínas sem estrutura conhecida, identificar os elementos de estrutura secundária bem como avaliar a dinâmica de sua formação.

3

JUSTIFICATIVA

A aplicação de autômatos celulares no desenvolvimento de um novo método de reconhecimento de enovelamentos não visa ser apenas uma alternativa aos métodos atuais, mas também tem como objetivo a criação de um modelo que seja capaz de fornecer informações sobre a dinâmica do enovelamento de proteínas, ao permitir a análise de padrões que indicam pontos de início do enovelamento, de formação de estruturas locais e da propagação global dessas estruturas locais ao longo da sequência. O método poderá auxiliar também no estudo de como mutações podem afetar o enovelamento proteico, assim como no design de proteínas e contribuir também para a predição ab initio de estruturas proteicas.

Parte II
DESENVOLVIMENTO

4

DADOS

Neste trabalho foram utilizados dois conjuntos de dados compostos da sequência de aminoácidos de proteínas com estruturas resolvidas experimentalmente e da estrutura secundária atribuída aos seus resíduos por quatro diferentes algoritmos: DSSP [Kabsch:1978], Stride [Frishman:1990], Kaksi [Martin:2000] e PROSS[Srinivasan:1994].

O primeiro conjunto selecionado é formado por um grande número de estruturas de alta qualidade e tem como finalidade ser utilizado na busca de regras gerais para o autômato celular. Essas regras gerais são um dos elementos mais importantes desse trabalho, pois permitem avaliar a generalização do autômato celular, isto é, qual o grau de sucesso da aplicação do autômato celular para o universo de proteínas existentes.

O segundo conjunto selecionado é composto de quatro proteínas com altíssima identidade sequencial e diferentes estruturas terciárias e secundárias. Esse conjunto foi selecionado por ser, possivelmente, o caso experimental mais desafiador para os métodos de predição de estrutura secundária. Como discutiremos ao longo do texto, todos os métodos de predição de estrutura secundária, assim como os de modelagem comparativa, tendem a falhar nesse conjunto devido à limitações teóricas dos métodos.

4.1 PROTEÍNAS COM ALTÍSSIMA IDENTIDADE SEQUÊNCIAL E DIFERENTES ESTRUTURAS TERCIÁRIAS E SECUNDÁRIAS

Em 2007, Alexander e colaboradores [17609385], desenhamaram um experimento onde obtiveram dois enovelamentos com topologias diferentes para sequências com mais de 88% de identidade sequencial. O ponto de partida do experimento foram dois domínios chamados G_A e G_B com 56 aminoácidos. O domínio G_A possui um feixe de 3 hélices α ($\beta\text{-}\alpha$ helix bundle) enquanto o domínio G_B apresenta a enovelamento $4\beta+\alpha$, ou seja, 4 fitas β mais uma hélice α (Figura ??).

Posteriormente, uma série de outros estudos sobre esses dois domínios demonstrou ser possível obter os dois enovelamentos com identidade sequencial ainda maiores [10.1073/pnas.0805857105, 10.1073/pnas.0906408106], até que em 2012, He e colaboradores [10.1016/j.str.2011.11.018], obtiveram mutações pontuais capazes de alterar a estrutura entre os dois enovelamentos (Figura ??). As estruturas resolvidas por RMN das quatro proteínas foram as utilizadas para compor esse conjunto de dados (PDB IDs: 2LHC, 2LHD, 2LHE, 2LHG) utilizando os 10

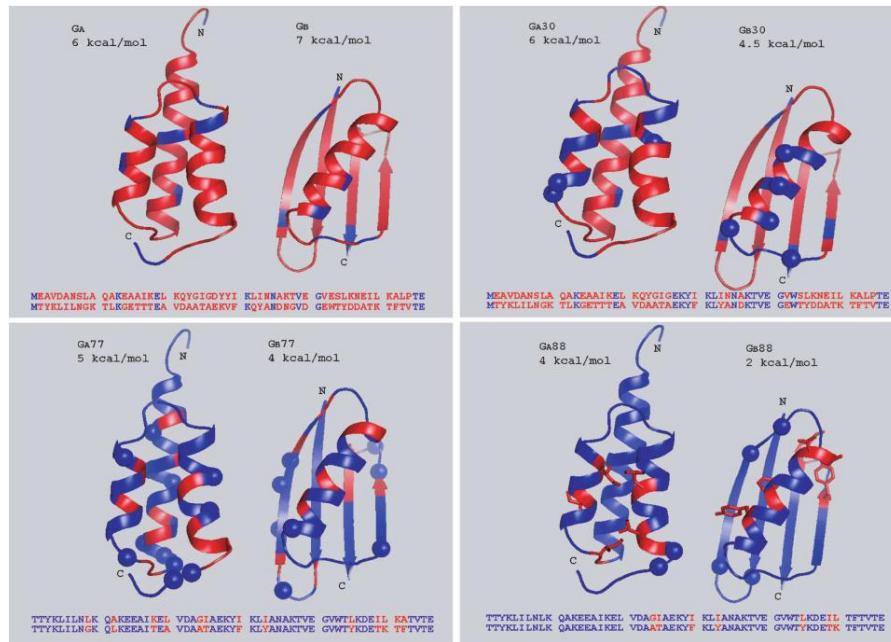


Figura 1: Figura da sequencia e das estruturas das camaleonicas

primeiros modelos de cada estruturas com o objetivo de manter os dados balanceados.

4.2 PROTEÍNAS DIVERSAS

O conjunto de proteínas diversas utilizado para o treinamento do autômato celular foi obtido do banco de dados “Top8000” (versão de 2015). Esse banco de dados é organizado pelo Richardson Lab da Universidade de Duke (disponível em github.com/rlabduke/reference_data). As cadeias selecionadas atendem aos seguintes critérios:

- Resolução < 2.0 Å
- MolProbit score < 2.0
- ≤ 5% dos resíduos apresentando comprimentos de ligação anormais (> 4σ)
- ≤ 5% dos resíduos apresentando ângulos de ligação anormais (> 4σ)
- ≤ 5% dos resíduos com desvios anormais do C_β (> 0.25 Å)

As cadeias selecionadas pelos critérios acima são subagrupadas de acordo com o grau de identidade sequencial (homologia): < 50%, < 70% e < 95%. Cadeias que apresentavam resíduos indeterminados na estrutura ou que apresentaram algum erro durante a atribuição da estrutura secundária por algum dos quatro métodos foram removidos do conjunto. A tabela ?? mostra o número de cadeias utilizadas.

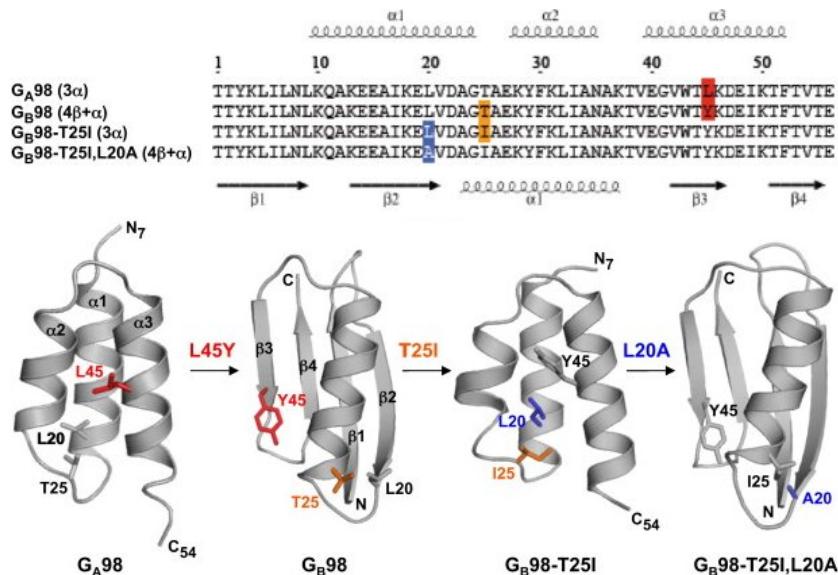


Figura 2: Figura da sequencia e das estruturas das camaleonicas

CONJUNTO	# ORIGINAL	# UTILIZADAS
Top8000-hom50	7233	6749
Top8000-hom70	7958	7435
Top8000-hom95	8826	8227

Tabela 1: Número de cadeias presentes no banco de dados Top8000 (Richardson Lab) e número de cadeias utilizadas neste trabalho após a exclusão de cadeias que apresentaram algum problema durante a atribuição da estrutura secundária ou que possuíam resíduos indeterminados.

5

IMPLEMENTAÇÃO

5.1 AUTÔMATO CELULAR

5.1.1 *Modelo inicial*

O autômato celular inicialmente proposto possui 24 estados discretos. Esses estados correspondem aos 20 aminoácidos, aos 3 elementos de estruturas secundárias (hélice, fita e random coil) e mais um estado que indica o início/fim da cadeia polipeptídica (*estado*=#). A vizinhança deste autômato celular é igual a 1 ($r=1$), o que indica que as regras de transição são dependentes dos dois vizinhos mais próximos, um a esquerda e um a direita. Cada transição pode ocorrer para apenas quatro estados, sendo 3 estados que representam os elementos de estrutura secundária e um que representa o resíduo presente naquela posição da cadeia polipeptídica.

Logo, temos que o total de elementos na regra desse autômato é 24^3 ou 13824, dos quais 24 são elementos estáticos, pois células no estado # sempre permanecerão nesse estado durante a evolução do autômato. Assim temos 4^{24^3-24} regras possíveis para esse autômato celular.

5.1.2 *Modelos extendidos*

Uma das limitações do modelo proposto inicialmente é a perda de informação que ocorre durante a evolução do autômato celular quando as células transitam de estados correspondentes aos aminoácidos para estados que representam elementos de estruturas secundárias. Por exemplo, quando uma lisina evolui para uma hélice, o estado de hélice não possui mais a informação de qual aminoácido havia naquela posição. Acreditamos que essa perda de informação possa ser um fator crítico para o modelo. Consequentemente, avaliamos modelos alternativos que pudessem manter essa informação.

Uma possibilidade seria manter a informação do resíduo juntamente com o elemento de estrutura secundária. Esse modelo teria 20 estados para os aminoácidos, 20 estados para hélices (um estado

$$\begin{array}{c} t_i \quad \boxed{\quad} \quad \boxed{\quad} \quad \boxed{\quad} \\ \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \quad \quad \boxed{\quad} \end{array} = 24 \times 24 \times 24 \\ 24 \rightarrow \{20 \text{ AAs}, H, E, C, \#\} \\ t_{i+1} \quad \quad \quad = 4 \\ \quad \quad \quad \quad \quad 4 \rightarrow \{H, E, C, ?\} \text{ onde ? representa o estado anterior} \end{array}$$

Figura 3: Esquema da regra simples

diferente para cada aminoácido), 20 estados para fitas e 20 estados para random coils, além do estado de início/fim da cadeia polipeptídica, totalizando 81 estados. Cada regra para esse autômato celular teria 81^3 ou 531441 elementos, o que seria aproximadamente 38 vezes maior que uma regra do modelo proposto inicialmente, resultando em um aumento significativo da complexidade e, consequentemente, da dificuldade na busca por regras que reproduzam o padrão desejado. Esse aumento de complexidade nos levou a descartar, pelo menos até o momento, este modelo.

Assim, a alternativa escolhida foi utilizar características dos aminoácidos que mantivessem parcialmente a informação do resíduo durante a evolução do autômato celular, mas sem resultar em um aumento tão elevado do número de regras em relação ao modelo inicial. O primeiro modelo concebido que atende esses requisitos utiliza as características de hidrofobicidade dos aminoácidos. Isso resulta em modelo com 27 estados, sendo 2 estados para cada um dos 3 elementos de estrutura secundária, mais os 20 aminoácidos e o início/fim da cadeia polipeptídica. No total, a regra deste autômato celular é formada por 27^3 , ou 19683, elementos, sendo aproximadamente 1,42 vezes maior que a regra do modelo inicial.

Além deste modelo extendido, dois outros modelos foram utilizados. Um deles adicionando estados para diferenciar glicinas e prolínas, e outro acrescentando estados para diferencia resíduos com cargas positivas e negativas assim como glicinas e prolínas. Ambos utilizam também a hidrofobicidade dos demais resíduos. As regras para esses modelos apresentam respectivamente 33^3 e 39^3 elementos, o que corresponde a um aumento aproximado de 2,6 e 4,3 vezes em relação ao modelo inicial.

A motivação para o uso da hidrofobicidade dos resíduos foi influenciada por trabalhos de Hecht e colaboradores [Xiong07, West1995] que examinaram a influência de padrões periódicos de hidrofobicidade nas sequências proteicas e sua relação com elementos de estruturas secundárias, concluindo que alguns padrões apresentam preferência por hélices α enquanto outros padrões apresentam preferência por fitas β [West1995].

Em todos os modelos extendidos cada elemento da regra continua com a possibilidade de transitar para apenas 4 estados, ou um dos 3 elementos de estrutura secundária ou o resíduo encontrado naquela posição da cadeia polipeptídica.

5.2 EDA

A busca por regras de um autômato celular que reproduzam um padrão específico, conhecido como problema inverso, é um problema de otimização. Na literatura, esse problema é normalmente abordado utilizando metaheurísticas como algoritmos genéticos ou anelamento

simulado (*simulated annealing*). Neste trabalho optamos por utilizar o Algoritmo de Estimação de Distribuição (EDA). Os fatores que determinaram a utilização desse algoritmo foram a facilidade de implementação do EDA de forma distribuída e o pequeno número de parâmetros em relação à algoritmos genéticos.

No EDA distribuído implementado neste trabalho cada elemento da regra do autômato celular, com excessão dos elementos onde a célula apresenta o estado início/fim da cadeia polipeptídica (*estado=#*), tem a mesma probabilidade inicial ($p = 0,25$) para cada um dos 4 estados de transição. A probabilidade é distribuída pelo nó mestre para os nós escravos. Os nós escravos utilizam a probabilidade recebida para gerar $c \geq 2$ regras candidatas. As regras candidatas são então utilizadas para evoluir o autômato celular por t passos. Após a evolução, um valor de fitness é atribuído a cada regra. Em seguida, um torneio entre as regras candidatas geradas no nó escravo e a regra com maior fitness é enviada ao nó mestre. Ao receber as n/c regras vencedoras, onde n é o tamanho da população do EDA, o nó mestre atualiza a probabilidade e começa a distribuí-la para os nós escravos, iniciando assim a geração $T + 1$ do EDA. A otimização termina após um número específicos de gerações ou quando as probabilidades convergem.

5.2.1 Função de fitness

A função de fitness utilizada pelo EDA baseia-se na porcentagem de estados corretos durante a evolução do autômato celular ($t_1 \rightarrow t_{final}$) onde os estados corretos são os elementos de estrutura secundária idênticos ao consenso obtido entre os quatro métodos de atribuição de estruturas secundária. Quando não há consenso entre os métodos de atribuição de estrutura secundária, a posição é descartada pela função de fitness. A função de fitness é, portanto, equivalente a acurácia.

$$ACC = \frac{TP + TN}{P + N} \quad (1)$$

$$\text{fitness} = \frac{TH + TE + TC}{H + E + C} \quad (2)$$

5.3 IMPLEMENTAÇÃO

Tanto o autômato celular quanto o EDA foram implementados na linguagem de programação Go. A estrada do nó mestre é um arquivo de configuração no formato TOML que contém os parâmetros para o autômato celular, o EDA e os dados a serem utilizados. Os dados,

ou seja as sequências de aminoácidos das proteínas e suas respectivas estruturas secundárias, são armazenados em um banco de dados chave/valor. A comunicação entre os nós escravo e o nó mestre é feita utilizando chamadas remotas de procedimento (RPC). O código fonte está acessível publicamente no GitHub (github.com/jgcarvalho/zeca-search, [zeca-search-master](https://github.com/jgcarvalho/zeca-search-master) e [zeca-search-slave](https://github.com/jgcarvalho/zeca-search-slave))

Parte III
RESULTADOS

6

ANÁLISE DOS DADOS

7

APRENDIZADO DE REGRAS

7.1 AUTÔMATO CELULAR

Os modelos de autômatos celulares foram testados primeiramente, e até o momento, apenas no conjunto de proteínas com alta identidade sequencial. A escolha desse conjunto para os testes dos autômatos celulares baseou-se na facilidade de observar e analisar a formação e propagação dos elementos de estruturas secundárias nessas proteínas.

O modelo idealizado para o autômato celular deveria ter a capacidade de propagar sinais locais ao longo da sequência, e assim, resultar na formação de padrões globais. Tal capacidade está relacionada aos estados que ocorrem durante a evolução do autômato celular, sendo dependentes do número de estados possíveis e também do tamanho da vizinhança utilizada. Como todos os autômatos celulares propostos tem vizinhança 1 por questões de complexidade (ver ref metodos), a capacidade de formar e propagar os sinais será dependente apenas dos estados possíveis do autômato celular.

Entre os quatro modelos testados, o número de estados para os elementos de estrutura secundária demonstrou relação com a acurácia do modelo. Assim, CAs com estados de elementos de estrutura secundária que mantém mais características dos resíduos mostraram-se mais promissores (Figura ??).

7.2 EDA

O aprendizado das regras realizado através de um algoritmo de EDA distribuído demonstrou-se eficiente dado a complexidade do problema. Utilizando ?? nós (??CPUs) no cluster multiusuário da FA-PESP localizado em ??? São Paulo foi possível evoluir o EDA por 1000 gerações com 10000 indivíduos em pouco mais de duas semanas (CONFIRMAR ISSO).

Cada nó de trabalho apresentou um uso de memória de XX% (MB), e manteve o processamento próximo a XX% por núcleo (1.6 GHz). O mecanismo de comunicação por RPC entre o nó mestre e os nós de trabalho não sobrecarregou a rede (1Gbs). Isso nos permite concluir que o algoritmo é escalável clusters com maior número de nós e processadores de maior desempenho.

A opção por realizar o torneio entre soluções candidatas nos nós de trabalho, permite apenas a opção de realizar o torneio entre as k últimas soluções geradas no próprio nó. Consequentemente, as k-1

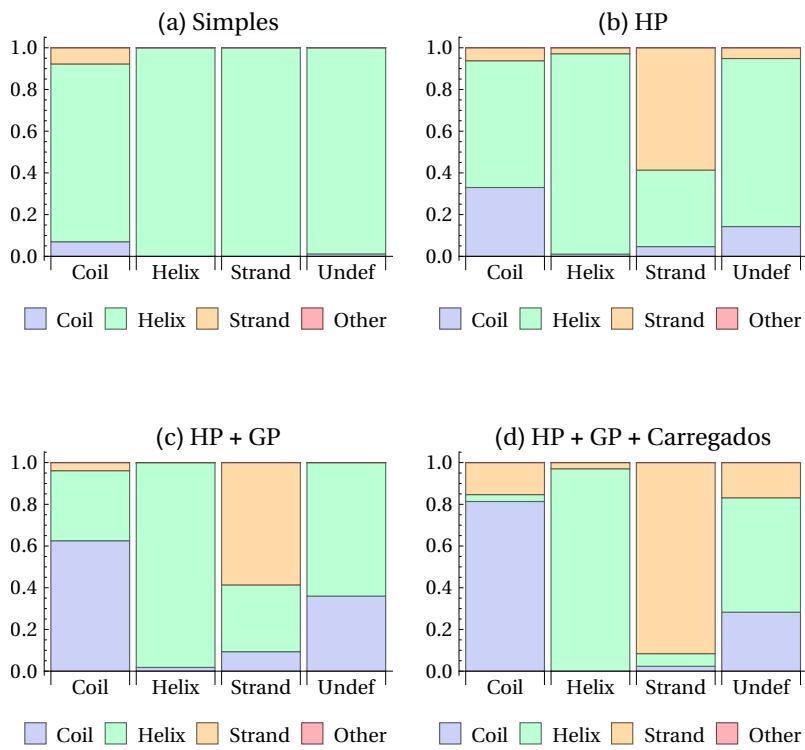


Figura 4: Figura da sequencia e das estruturas das camaleonicas

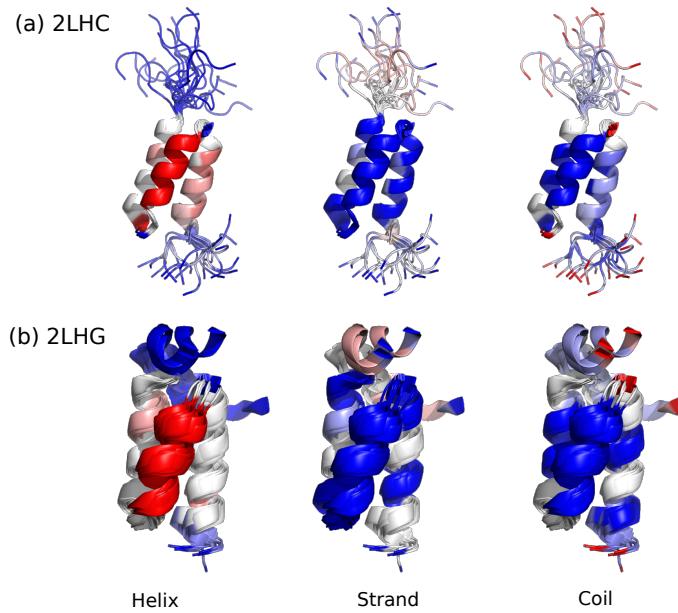


Figura 5: Figura da sequencia e das estruturas das camaleonicas

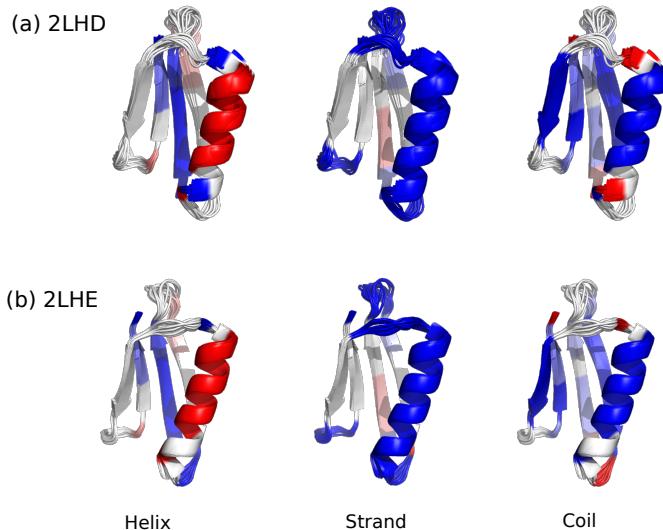


Figura 6: Figura da sequencia e das estruturas das camaleonicas

soluções perdedoras são descartadas, havendo portanto, a remoção das soluções perdedoras em cada torneio.

Usualmente, o método de seleção por torneio utilizado em algoritmos genéticos não distribuídos acumula as solução candidatas até atingir o tamanho máximo populacional, quando então, é realizado o torneio. Isso permite que o torneio seja feito sem a eliminação dos perdedores, possibilitando que a seleção destes ocorram em outros combates.

Entretanto, no EDA distribuído, para aplicarmos um torneio sem eliminação dos perdedores seria necessário:

1. o envio de todas as soluções candidatas para o nó mestre, o que resultaria em maior consumo de rede;
2. o acúmulo de todas as soluções candidatas até atingir o tamanho máximo da população, gerando uma limitação da memória disponível;
3. a espera até a realização do torneio para iniciar o cálculo das probabilidades, resultando no aumento do tempo ocioso nos nós de trabalho igual ao intervalo de tempo do envio da última solução até o cálculo das probabilidades.

A escolha em realizar o torneio nos nós de trabalho demonstrou ser escalável, manter a variabilidade das soluções candidatas ao longo da evolução e boa convergência (Figura de convergência e variabilidade).

inserir a figura de evolução do eda

7.2.1 *Deriva genética*

A evolução do EDA por 1000 gerações com torneio de dois ($k=2$) e população de 10000 indivíduos, demonstrou sinais de deriva genética a partir de 564 gerações. Tais sinais podem ser detectados observando-se as probabilidades dos 38 elementos de regra que não ocorrem no conjunto de proteínas. Esses elementos são do tipo $[#][x][#]$.

O elementos $[#][x][#]$, onde o x corresponde a qualquer estado exceto $[#]$, não apresentam probabilidade fixa, mas também, por estar ausente nas proteínas, não sofrem pressão seletiva. Logo, suas variações são aleatórias.

Na geração 564 um desses 38 elementos apresentou probabilidade zero ($p = 0$), de transitar para um dos quatro estados possíveis, indicando a eliminação de um gene da população por deriva genética. Ao final das 1000 gerações 11 dos 38 elementos apresentavam probabilidade zero para uma das transições (Figura).

inseri a figura da deriva genetica

correlacao freq regras x convergencia correlacao freq de ss regras x convergencia plot 3D freq regras x freq ss x convergencia

7.2.2 *Função de fitness*

A simplicidade da equação de fitness (referencia a equaçao) demonstrou problemas que acreditamos serem solucionáveis na continuação deste trabalho. Um desses problemas é ocasionado pelo desbalanceamento dos dados de treinamento (Figura distribuição).

Os resultados obtidos indicam uma maior acurácia para os elementos de estrutura secundária mais frequentes no conjunto de treinamento. Esse é um problema recorrente no aprendizado com classes desbalanceadas e costuma ser tratado na função de fitness (figura q3).

Avaliamos também se havia alguma relação aparente dos elementos preditos com os ângulos phi e psi do resíduos, o que poderia justificar parcialmente o erro nos elementos preditos. Entretanto, aparentemente não existe tal relação (figuras).

7.2.3 *Seleção*

As ocorrência de trincas no conjunto de proteínas apresentou grande variação (Figura ??). Para avaliar a influência do número de ocorrências das trincas na seleção do EDA nós procuramos por correlações entre fatores que poderiam influenciar na seleção.

A figura ?? representa a distribuição das probabilidades máximas e mínimas das dos elementos da regra em relação a frequência de ocorrência das trincas no conjunto. O gráfico e os valores de correlação entre as probabilidades e a frequência de ocorrência das trincas, indica não haver uma grande influência da frequência das trincas du-

Elementos da regra

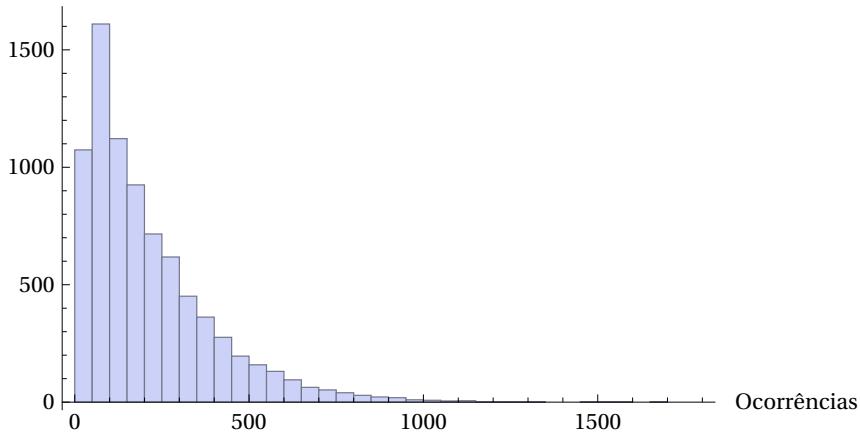


Figura 7: Histograma de ocorrência das trincas

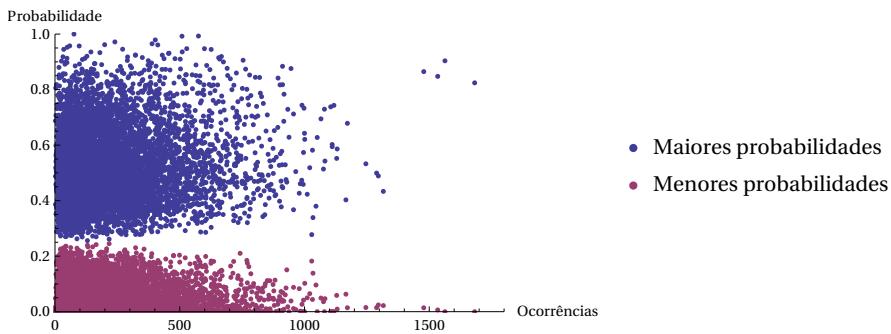


Figura 8: Probabilidades máximas e mínimas pelo número de ocorrência das trincas

rante na seleção. Essa influência também não foi encontrada durante a evolução do EDA (Anexo).

Outros fatores que poderiam influenciar a evolução do EDA seriam: (1) a probabilidade da trinca ser observada em uma determinada estrutura secundária; (2) o número de ocorrências da trinca em determinada estrutura secundária; (3) a taxa de acertos por trincas para determinada estrutura secundária.

As probabilidades de transição dos elementos da regra, não apresentam aparente relação com as proporções encontradas para cada estrutura secundária nas trincas (Figuras H E C). Assim como não apresentaram relação com a frequência de ocorrências de determinada estrutura para uma trinca e com a proporção de trincas corretamente classificadas por estrutura secundária. Essas duas últimas relações não eram mesmo esperadas (Anexo Figuras H E C e figuras H E C). Contudo, foi interessante observar a que a primeira relação aparentemente não ocorria.

A ausência da primeira relação pode indicar que as probabilidades de transição dos demais elementos da regra e sua aplicação ao longo da evolução do CA estão propagando as probabilidades e sofrendo

influência da vizinhança na tentativa de produzir estruturas secundárias mais próximas as reais.

Entretanto, observamos uma relação entre a proporção de elementos de estruturas secundárias para um trinca e a proporção de acertos da trinca para a mesma estrutura secundária. Acreditamos que isso seja um indício que o aprendizado, ou otimização da regra, precisa ser melhorado para que elementos de estruturas secundárias menos comuns a determinadas trincas possam ser corretamente preditos.

Há também uma relação menos influente entre o número de ocorrências de uma determinada estrutura secundária nas trincas e a proporção de acertos dessa trinca para a mesma estrutura secundária.

Ambas as relações encontradas eram esperadas pois indicam uma tendência do método a privilegiar o aprendizado, ou otimizaração, de elementos capazes de influenciar com maior intensidade a função de fitness. Isso mostra a importância de manter um variabilidade alta na população e reduzir efeitos de deriva genética para que a otimização escape de mínimos locais e consiga aprender, também, as probabilidades para trincas menos frequentes nas proteínas e/ou com proporções pequenas para determinadas estruturas secundárias.

A proteína Ga98 e seus mutantes, os quais sofrem alterações globais na estrutura secundária, são casos interessantes para o teste de novas metodologias de predição de estrutura secundária. Nas metodologias atuais, que comumente utilizam redes neurais, a predição é feita utilizando uma janela de resíduos, em geral com comprimentos de 9, 11 ou 13 resíduos, onde o resíduo central da janela é classificado pela rede neural. Como a predição nas demais janelas presentes na sequência polipeptídica não influencia na classificação da janela, o método apresenta a limitação de responder apenas localmente às variações dos dados de entrada.

Por outro lado, os autômatos celulares, apesar de evoluirem de acordo com regras locais, tem a capacidade de propagar as variações locais e influenciar o surgimento ou alteração de padrões globais, distantes do ponto de origem da variação.

Para avaliar a capacidade dos modelos propostos e da eficácia do método de otimização em encontrar regras capazes de reproduzir o padrão correspondente às estruturas secundárias, testamos a nossa metodologia nessas quatro proteínas.

8

APRENDIZADO DAS REGRAS GERAIS

8.1 CONTAGEM DE AA

CCW 2 CMW 2 WMC 2 WPC 3 WCW 3 CHW 4 MWC 4 CCC 4 CMC
4 WCC 4 CWW 4 WWM 5 MCW 5 CWC 5 MWM 6 CCM 6 MWH 6
CWH 6 FWC 6 QCC 6 QCW 6 WWW 6 WCH 7 CMM 7 YCW 7 WCM
7 CIW 7 HWC 7 CQW 7 CYW 8 ... AAE 1000 LKE 1001 AEA 1011
EAA 1021 AGA 1029 AGL 1032 AAV 1034 AEL 1046 ELA 1051 EEL
1066 ALG 1076 LGL 1080 LAG 1082 VAA 1105 ALE 1111 LEA 1111
AVA 1118 ELL 1129 LAL 1131 LLE 1166 LAE 1172 AAG 1246 ALL
1289 LLA 1296 EAL 1316 LAA 1478 AAL 1534 ALA 1563 AAA 1682
HHH 6143

9

ANÁLISE DAS REGRAS GERAIS

Parte IV
PERSPECTIVAS FUTURAS

10

PERSPECTIVAS FUTURAS

10.0.1 *Função de fitness*

melhoria na função de fitness

10.0.2 *CA probabilístico*

Utilizar um CA probabilistico durante a fase de otimização das regras através do EDA.

Para alterar as probabilidades, será necessário que probabilidades sofram variação durante a criação de um indivíduo. A variação não deverá ser busca (distribuição normal), para manter uma exploração local da região. Essa variação poderá ser dependente de outros fatores, por exemplo, da própria variação de probabilidades ao longo da evolução do EDA

10.0.3 *Ângulos torcionais*

Utilizar regiões de ângulos torcionais ao invés de estrutura secundária

Parte V
APPENDIX

DECLARATION

Put your declaration here.

Campinas, Agosto de 2016

José Geraldo de Carvalho
Pereira

COLOPHON

This document was typeset using the typographical look-and-feel `classicthesis` developed by André Miede. The style was inspired by Robert Bringhurst's seminal book on typography "*The Elements of Typographic Style*". `classicthesis` is available for both L^AT_EX and LyX:

<https://bitbucket.org/amiede/classicthesis/>

Happy users of `classicthesis` usually send a real postcard to the author, a collection of postcards received so far is featured here:

<http://postcards.miede.de/>