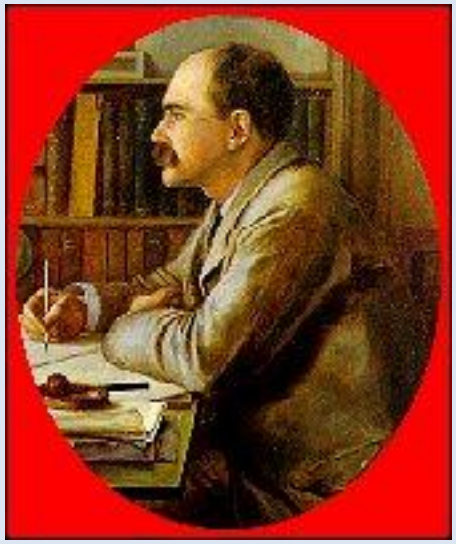
Функции белков и генов

I keep six honest serving-men
(They taught me all I knew);
*Their names are **What** , and **Why**, and **When**,*
*And **How**, and **Where**, and **Who**.*



Rudyard Kipling

План

- Что важно знать функции данного белка и где это найти?
- Как найти все белки с определенной функцией?
- Как бороться с синонимами?
- База данных GO: структура; использование
- Что такое “Protein evidence”?

Задача I: узнать функцию белка

Пример: что за белок Q71SG9_KLEPN

- Название (кто?)
  - Uniprot:
    - Cytosine-specific methyltransferase
    - ген kpn2kIM
- Откуда?
    - Klebsiella pneumoniae
    - плазмида

Q71SG9_KLEPN

- Что делает?
  - Pubmed:
    - статей нет
    - ссылка на Gene DB (NCBI) (часть проекта RefSeq):
      - type II DNA-methyltransferase
- Кто – ближайший изученный гомолог?
  - BLAST
    - MTS2_SHISO, Identity 100% по всей длине (!?)
      - M.SsoII, *Shigella sonnei* , плазмида

M.SsoII

Description and origin of the Protein

Description	Recommended	Full=Modification methylase SsoII; Short=M.SsoII; EC=2.1.1.37;
	Synonym	Full=Cytosine-specific methyltransferase SsoII;
Gene name(s)	ssoIIM	
Organism source	Shigella sonnei.	
Taxonomy	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Shigell	
Organelle	Plasmid P4.	

Database cross-references

EMBL	M86545; AAA98279.1; -; Genomic_DNA.
PIR	JT0744; JT0744.
ProteinModelPortal	P34879; -.
SMR	**P34879**; 7-53.
REBASE	3509; M.SsoII.
BRENDA	**2.1.1.37**; 74546.
GO	**GO:0003886**; F:DNA (cytosine-5-)-methyltransferase activity; IEA:EC. **GO:0043565**; F:sequence-specific DNA binding; IEA:InterPro. **GO:0009307**; P:DNA restriction-modification system; IEA:UniProtKB-KW. **GO:0045449**; P:regulation of transcription; IEA:UniProtKB-KW. **GO:0006350**; P:transcription; IEA:UniProtKB-KW.

InterPro	IPR018117; C5_DNA_meth_AS. IPR001525; C5_MeTfrase. IPR001387; HTH_3. IPR010982; Lambda_DNA-bd.
PANTHER	**PTHR10629**; C5_DNA_meth; 1.
Pfam	**PF00145**; DNA_methylase; 1. **PF01381**; HTH_3; 1.
PRINTS	PR00105; C5METTRFRASE.
SMART	**SM00530**; HTH_XRE; 1.
SUPFAM	**SSF47413**; Lambda_like_DNA; 1.
TIGRFAMs	**TIGR00675**; dcm; 1.
PROSITE	PS00094; C5_MTASE_1; 1. PS00095; C5_MTASE_2; 1. PS50943; HTH_CROC1; 1.

Protein Existence

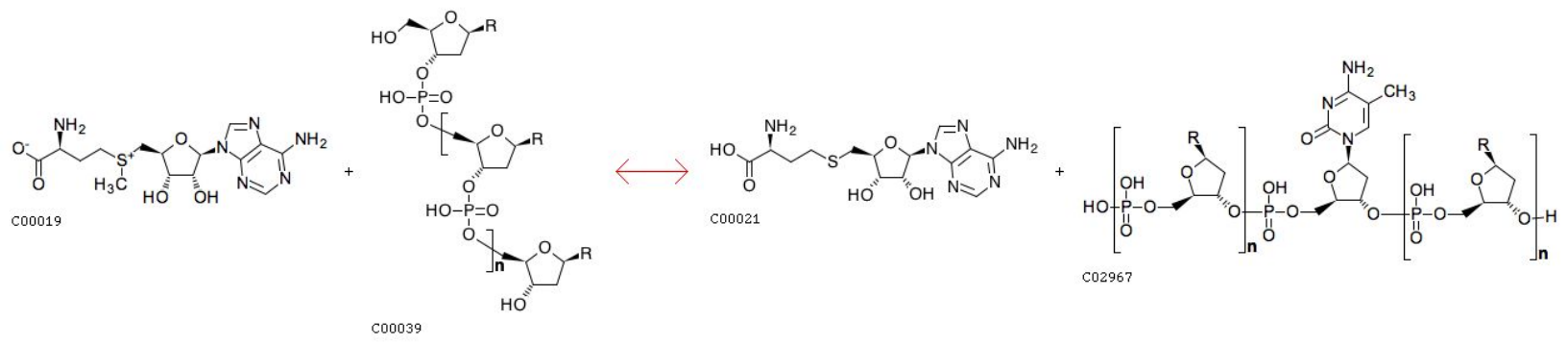
3: Inferred from homology;

M.SsoII

- Что делает?
  - Pubmed:
    - есть статьи; нет обзоров

Uniprot ссылается на разные БД

  - GO:0003886 (F)
    - Molecular Function:
      Catalysis of the reaction: S-adenosyl-L-methionine + DNA containing cytosine = S-adenosyl-L-homocysteine + DNA containing 5-methylcytosine
    - Переносит метильную группу с кофактора на цитозин ДНК
    - приведен список из 20 синонимов



M.SsoII

Uniprot ссылается на разные БД (продолжение)

- GO:0043565: (F)
  - Name: sequence-specific DNA binding
  - Molecular Function: Interacting selectively and non-covalently with DNA of a specific nucleotide composition, e.g. GC-rich DNA binding, or with a specific sequence motif or type of DNA e.g. promotor binding or rDNA binding.

- EC 2.1.1.37
  - Catalysis of the reaction: S-adenosyl-L-methionine + DNA containing cytosine = S-adenosyl-L-homocysteine + DNA containing 5-methylcytosine
  - **COMMENT** * See the REBASE database for a complete list of these enzymes: http://rebase.neb.com/rebase/
  - приведен список из 20 синонимов

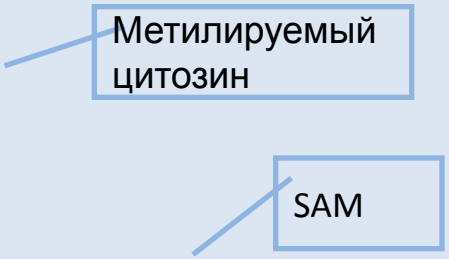
Мы описали
МОЛЕКУЛЯРНУЮ ФУНКЦИЮ
белка M.SsoII (и гомолога из
K.pn.)

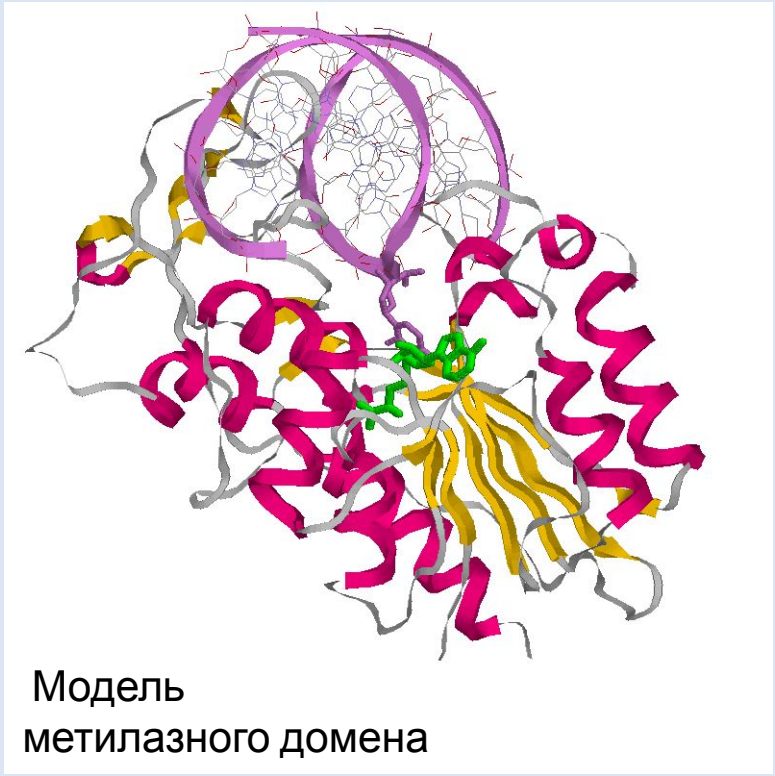
M.SsoII

- Каков механизм работы?
  - кофактор SAM (S-adenosyl-L-methionine)
  - на какой атом ДНК переносится – углерод в 5-м положении цитозина
  - как фермент, кофактор и субстрат расположены в пространстве? 3D структуры нет; есть модель, построенная по гомологам доменов с известной структурой. Цитозин выворачивается, см. рис.
  - как устроен активный центр? – известны консервативные мотивы и остатки
  - как происходит узнавание последовательности ДНК? – известна узнаваемая последовательность – CCNGG - и домен, отвечающий за узнавание (TRD)
  - ….

Методы:

- Пришивка (cross-linking)
- Мутагенез
- …..
- моделирование структуры
- консервативность последовательностей ….
- ….. множество всего





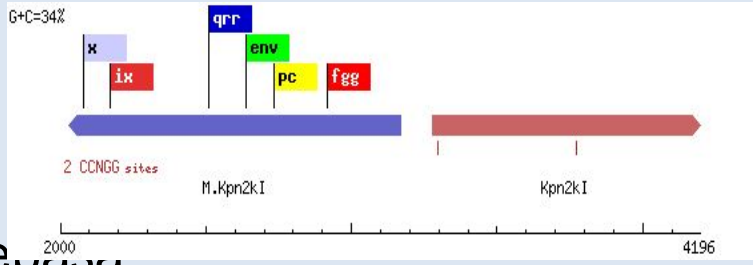
Модель метилазного домена M.SsoII

Описали
МЕХАНИЗМ
действия M.SsoII

M.SsoII: зачем нужно метилировать ДНК?

- Зачем?
  - GO:0009307: (P)
    - Name: DNA restriction-modification system
    - Biological Process: Any process that protect an organism from invading foreign DNA by methylation of self DNA at specific sequences and nucleolytic cleavage of unmethylated foreign DNA.
    - Система рестрикции-модификации: любой процесс, защищающий организм от вторжения чужеродной ДНК посредством метилирования специфических последовательностей и гидролиза неметилированной чужеродной ДНК Чужеродная ДНК – ДНК бактериофагов, плазмид и др.
- Какие гены включает система РМ?
  - Rebase:
    - M.SsoII:
      - » M.SsoII – ДНК метилтрансфераза
      - » SsoII – эндонуклеаза рестрикции
        SsoII - вносит двухцепочечный разрыв ДНК в неметилированных сайтах CCNGG

        M.SsoII метилирует цитозин только в сайтах той же последовательности CCNGG; метилируя хозяйскую ДНК M.SsoII предотвращает фрагментацию собственного генома



Мы описали
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС
и
систему генов
его осуществляющих

M.Kpn2kI и M.SsoII

- В каком организме?
  - Klebsiella pneumoniae
    - плазмида
  - Shigella sonnei, бактерия из семейства Enterobacteriaceae; патоген
    - плазмида
  - Сходство 100%; как объяснить?

M.SsoII

- Какие еще функции известны?
  - Pfam:
    - два домена

Source	Domain	Start	End
Pfam A	HTH_3	9	65
Pfam A	DNA_methylase	72	375

  - GO:0045449: (P)
    - regulation of transcription; IEA:UniProtKB-KW.
    - регулятор транскрипции:
    - связывается с сайтами NNNNNN;
    - такие сайты расположены между генами M.SsoII и SsoII
    - репрессор гена M.SsoII и активатор SsoII
  - для чего?
    - для “размножения” плазмиды: проникновения в нового хозяина
  - механизм регуляции?
    - имеет N-концевой HTH домен, гомологичный известным доменам транскрипционных факторов
    - димеризуется при связывании с ДНК – еще одна функция: *способность димеризации*

M.SsoII

- Где локализуется?
  - в цитоплазме хозяйской бактериальной клетки
    - а точнее? …..
- Когда экспрессируется?
  - небольшая поддерживается постоянно; авторегуляция
  - при проникновении в нового хозяина увеличивается

ЛОКАЛИЗАЦИЯ и ЭКСПРЕССИЯ

Итог: M.SsoII (и M.Kpn2kI)

- Функции:
  - метилирование цитозина в сайтах CCNGG
  - связывание с ДНК в сайтах определенной последовательности
  - гомодимеризация при связывании с ДНК
- Механизм:
  - узнавание последовательности – TRD домен
  - кофактор SAM
  - мотивы I - X
  - выворачивание основания
  - ход реакции
- Биологический процесс:
  - защита от чужеродной ДНК
  - регуляция транскрипции системы РМ SsoII
- Система рестрикции-модификации II типа; состоит из двух генов на трансмиссивной плазмиде
- Локализация:
  - цитоплазма хозяйской клетки
- Экспрессия
  - негативная авторегуляция

Базы данных

- Uniprot
- Pubmed
- GO – gene onthology
- EC - enzyme classification
- Pfam, Interpro, а также Prosite, Panther, Prints, TIGERFam, SMART, Supfam – семейства белков/доменов
- Brenda - The Comprehensive Enzyme Information System

- Rebase – специализированная БД

Где искать описание функции

- Краткое описание функций одного белка и ссылки на другие ресурсы см. UniProt the universal protein resource
- Краткое описание функций семейств белков и доменов см. в Pfam InterPro
- Подробное описание функций генов и их продуктов см в энциклопедиях, таких как BioCyc KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- Подробное описание отдельных классов функций и соответствующих белков см. в специализированных БД, таких как ENZYME, Rebase BRENDA TCDB ...

Как нам узнать функцию интересующего нас и б.м. известного науке белка или гена?

- +/+++ Читайте оригинальные статьи хороших авторов в хороших журналах!
  Ищите в PubMed
- -/++ Читайте аннотации записи Uniprot
  Используйте SRS
- -/+ Читайте аннотации записей Pfam и InterPro, содержащие описания семейств доменов, к которым принадлежат домены белка
- -/+ Ищите ваш белок в специализированных БД (БД и энциклопедии, в которых подробно описаны функции генов и их продуктов : KEGG, BIOCYC, ENZYME, TC-DB, REACTOME….)
- Ищите, предположительно, гомологичные белки самостоятельно. Используйте BLAST, psiBLAST, профили и

Задача II: найти белки с той же функцией

- Та же молекулярная функция?
  - в аннотации записи Uniprot
    - нужные термины GO, помеченные F (molecular function)
    - нужные коды EC
- Тот же механизм?
    - ….. функция + гомология
- Тот же биологический процесс?
    - нужные термины GO, помеченные P (biological process)
- Та же система генов?
    - БД систем: KEGG, SEED, …
- Та же локализация?
    - нужные термины GO, помеченные C (cellular component)

Что бывает

- Верно ли, что у белки всегда есть “главная” функция?
  - нет; цитохром с: окислительное фосфорилирование
    индукция апоптоза
- Верно ли, что гомологичные белки имеют ту же основную функцию?
  - часто, но не всегда!
- Верно ли, что белки с той же функцией гомологичны?
  - часто, но не всегда! (карбоангидраза)
- Верно ли, что белки с одинаковой функцией участвуют в тех же биологических процессах?
  - не обязательно! (ДНК-метилтрансферазы)
- Верно ли, что один и тот же биологический процесс реализуется сходными системами генов?
  - не обязательно! (лекарственная устойчивость)

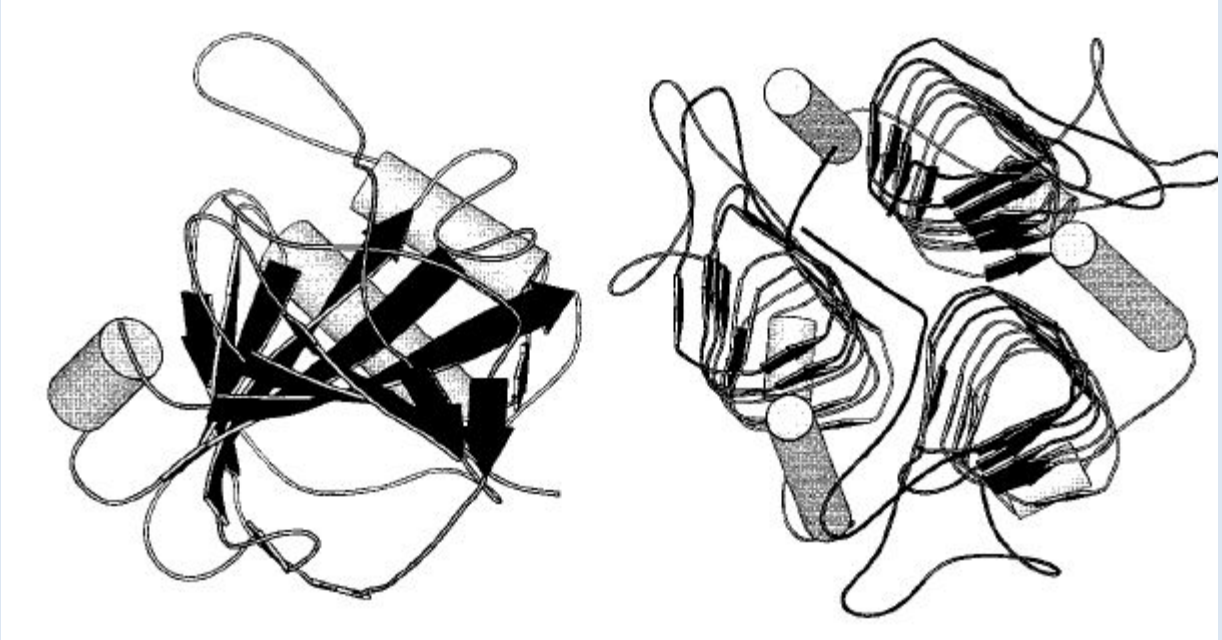


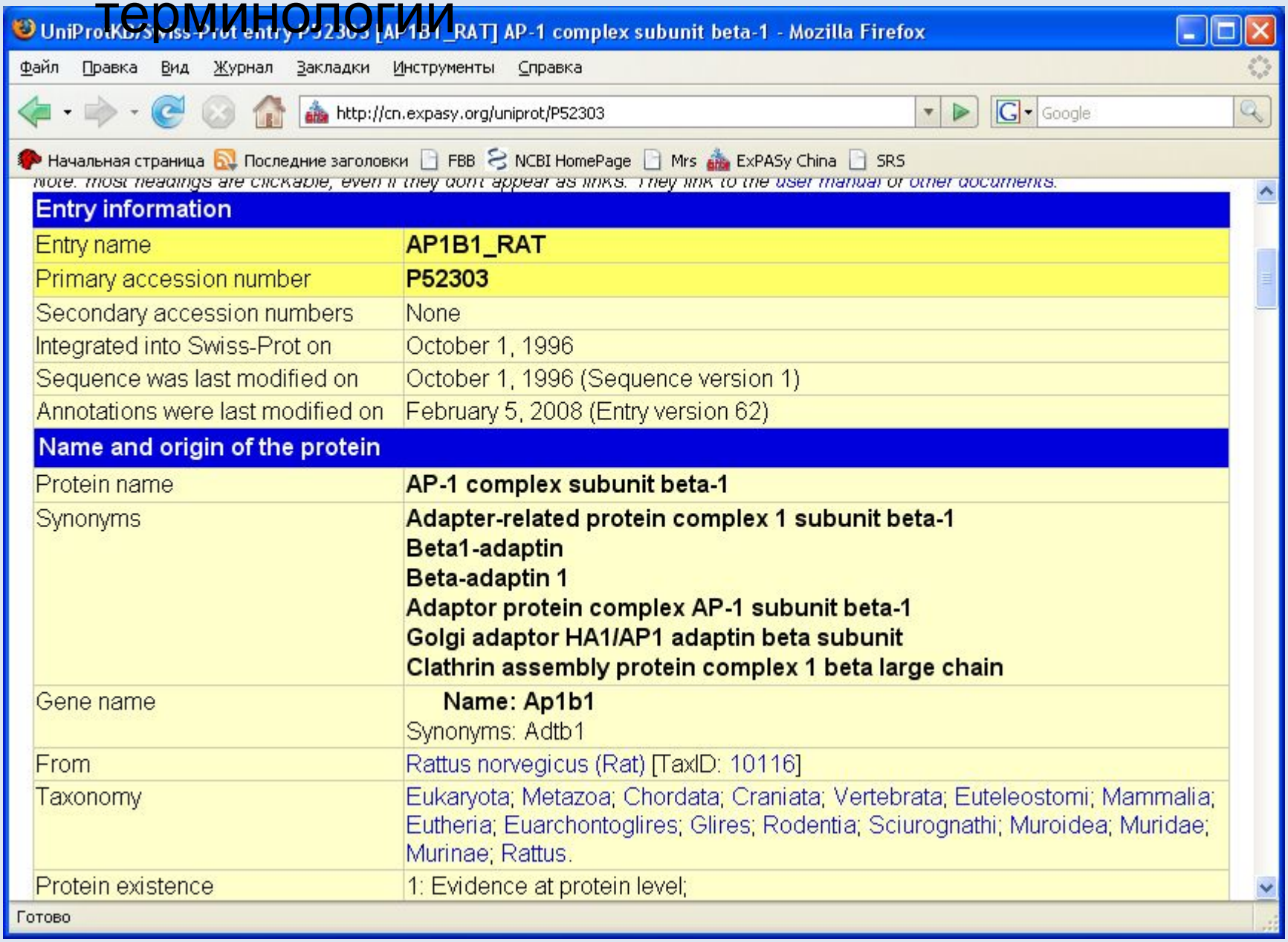
Figure 1. Specific example of convergent and divergent evolution. Top, an example of convergent evolution, showing structures of two carbonic anhydrases with the same enzymatic function (EC number 4.2.1.1), but with different folds. The Figure was drawn with Molscript (Kraulis, 1991) from 1THJ (left-handed beta helix) and 1DMX (¯at beta sheet).

Hedi Hegyi and Mark Gerstein
J. Mol. Biol. (1999) 288, 147±164

Пробуем выделить классы белков по функции

- Молекулярные машины – рибосома [&&&]
- Ферменты - РНК-зависимая РНК полимераза [рабочие на производстве]
- Регуляторные белки – регулируют биологические процессы, например, активность ферментов – TetR [бюрократия]
- Хранение и транспорт (ионов, маленьких молекул) – гемоглобин [складские рабочие]
- Транспорт через мембраны – TetA [таможенники]
- Секреторные, взаимодействие с другими клетками – инсулин [командировочные?]
- Структурные [атланты ☺]
- Сигнальные [ ]
- Рецепторы []
- Мотор []

Проблема неоднозначности терминологии



Entry information	
Entry name	**AP1B1_RAT**
Primary accession number	**P52303**
Secondary accession numbers	None
Integrated into Swiss-Prot on	October 1, 1996
Sequence was last modified on	October 1, 1996 (Sequence version 1)
Annotations were last modified on	February 5, 2008 (Entry version 62)
Name and origin of the protein	
Protein name	**AP-1 complex subunit beta-1**
Synonyms	**Adapter-related protein complex 1 subunit beta-1** **Beta1-adaptin** **Beta-adaptin 1** **Adaptor protein complex AP-1 subunit beta-1** **Golgi adaptor HA1/AP1 adaptin beta subunit** **Clathrin assembly protein complex 1 beta large chain**
Gene name	**Name: Ap1b1** Synonyms: Adtb1
From	Rattus norvegicus (Rat) [TaxID: 10116]
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus.
Protein existence	1: Evidence at protein level;

Питер Брейгель старший
"Вавилонская башня" 1563
Музей истории искусств, Вена

Проект GO (Gene Ontology)

- Цель: **Создание унифицированной терминологии для аннотации генов**
- БД GO Включает три независимых словаря
  - **Молекулярные функциии (molecular Function)**
    (Как? С чем?) *Например,* ***carbohydrate binding*** или ***ATPase activity***
  - **Биологические процессы (biological Process)**
    (Зачем?) *Например,* ***митоз*** или ***биосинтез пуринов***
  - **Клеточные компоненты (cellular Component)**
    (Где?) *Например,* ***ядро*** или ***холофермент РНК-полимераза II***
- В консорциум GO входит EBI (БД Uniprot, Interpro) и много других организаций
  - GOA – проект описания записей Uniprot терминами GO
    - **94%** записей Swissprot и **65%** Trembl имеют хотя бы один термин GO

Запись GO называется “термин GO”

- **Термины имеют определение и перечень синонимов.**
- **Термины в пределах одной онтологии (словаря) связаны отношениями ”is_a", “is_part_of”**
- **Термины имеют стандартные идентификаторы:**
  GO:0000093 (пример)

tricarboxylic acid cycle

Accession: GO:0006099

Ontology: biological_process

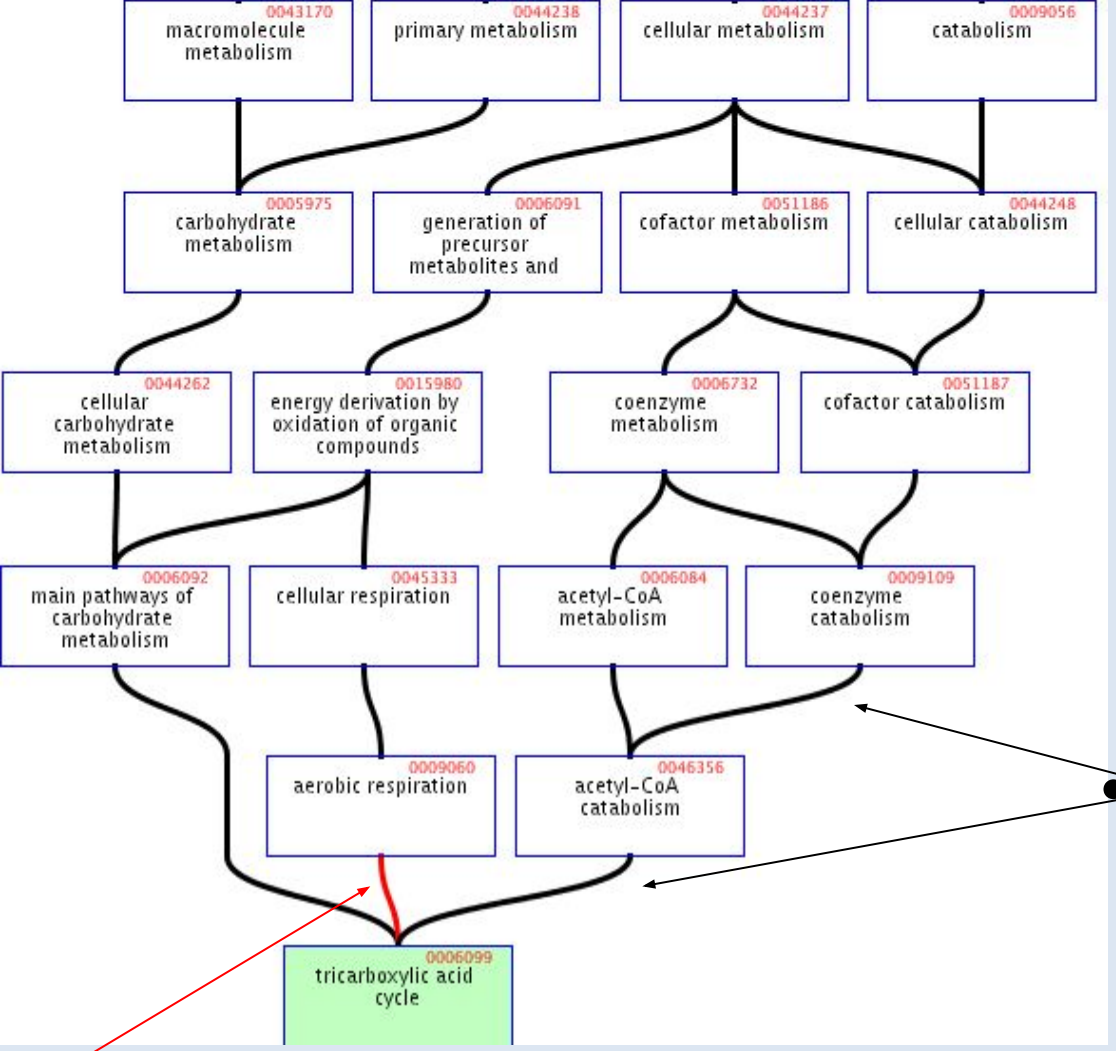
Synonyms:

exact: citric acid cycle

exact: Krebs cycle

exact: TCA cycle

Definition: A nearly universal metabolic pathway in which the acetyl group of acetyl coenzyme A is effectively oxidized to two C02 and four pairs of electrons are transferred to coenzymes. The acetyl group combines with oxaloacetate to form citrate, which undergoes successive transformations to isocitrate, 2-oxoglutarate, succinyl-CoA, succinate, fumarate, malate, and oxaloacetate again, thus completing the cycle. In eukaryotes the tricarboxylic acid is confined to the mitochondria. See also glyoxylate cycle.

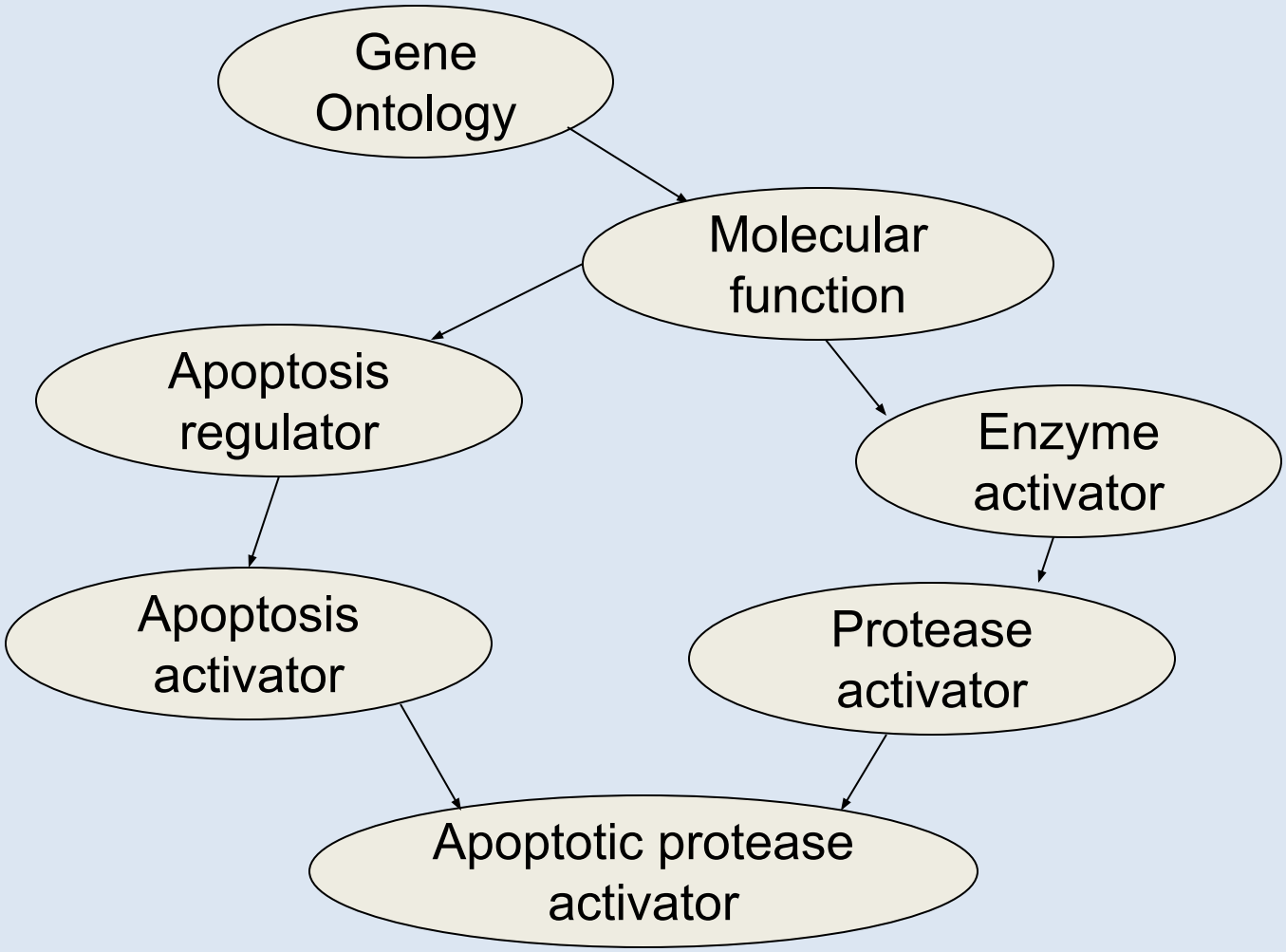


Directed acyclic graph DAG — ориентированный ациклический граф

- отношение "_is_a":
  "A is B" означает, что A — частный случай B;

- отношение "is_part_of":
  "A is part of B" означает, что A — часть B, но B не обязательно содержит A.

The Gene Ontology database



Аннотация GO записей Uniprot

- Два принципа:
  - каждая аннотация должна ссылаться на источник:
    - литературная ссылка
    - другая база данных
    - компьютерное предсказание
    - …….
  - аннотация должна указывать на достоверность применимости термина GO к данному белку в источнике (kind of evidence)

Аннотация GO для MTS2_SHISO (UniProt)

GO	GO:0003886; F:DNA (cytosine-5-)-methyltransferase activity; IEA:EC. GO:0043565; F:sequence-specific DNA binding; IEA:InterPro. GO:0009307; P:DNA restriction-modification system; IEA:UniProtKB-KW. GO:0045449; P:regulation of transcription; IEA:UniProtKB-KW. GO:0006350; P:transcription; IEA:UniProtKB-KW.

Evidence Codes

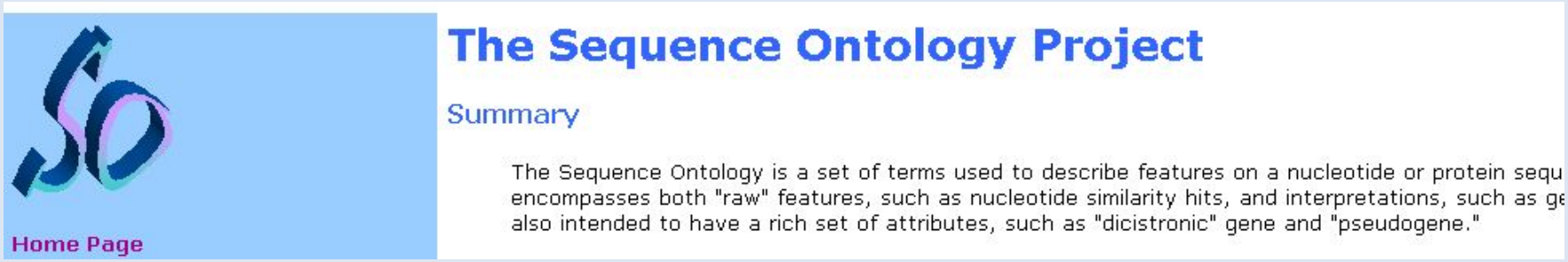
- **IDA** **Inferred from Direct Assay**
- **TAS** **Traceable Author Statement**
- **IMP** **Inferred from Mutant Phenotype**
- **IGI** **Inferred from Genetic Interaction**
- **IPI** **Inferred from Physical Interaction**
- **RCA** **Inferred from Reviewed Computational Analysis**
- **ISS** Inferred from Sequence Similarity
- IEP Inferred from Expression Pattern
- NAS Non-traceable Author Statement
- IEA Inferred from Electronic Annotation
- IC Inferred by Curator

- **ND** **No biological Data available**

Предостережение:

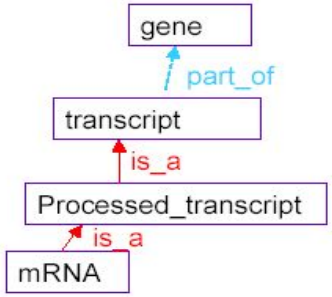
- GO *не является* номенклатурой генов или их продуктов (белков). Словари описывают биологические феномены (например, программируемую клеточную смерть), а не конкретные биологические объекты

Есть и другие онтологии, например,



The is_a relationship

- The is_a relation is like inheritance.
- Children terms inherit the properties and relationships of the parent term.



mRNA inherits the attributes of *transcript*

Therefore *mRNA* sequence is part of the *gene* sequence

exon,
promoter, *binding_site*,
non_canonical_splice_site,
stop_codon. *pseudogene*

Резюме

- Функциональная аннотация геномов — задача биоинформатики
- Существуют энциклопедии, где можно узнать о функциях генов и их продуктов, например, **BioCyc**.
- Полное описание функции — это ответы на вопросы "где?", "зачем?", "как?“, "с чем?“.
- **GO** — перспективный подход к
  - разработке общего языка (решение проблема синонимов),
  - разработке формализованного описания функций, общего для всех организмов.

The End