Базы данных последовательностей белков

UniProt

Иван Русинов

Откуда берутся последовательности белков?

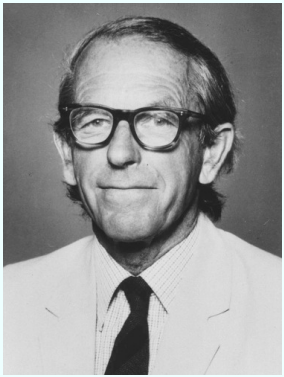
Прошлое: белковое секвенирование

- 1950 — N-концевая деградация пептидов:
  ди- и трипептиды

Pehr Edman

Прошлое: белковое секвенирование

- 1950 — N-концевая деградация пептидов:
  ди- и трипептиды
- 1951 и 1952 — Первая последовательность белка:
  цепи B и A бычего инсулина, 30 и 21 а.о.



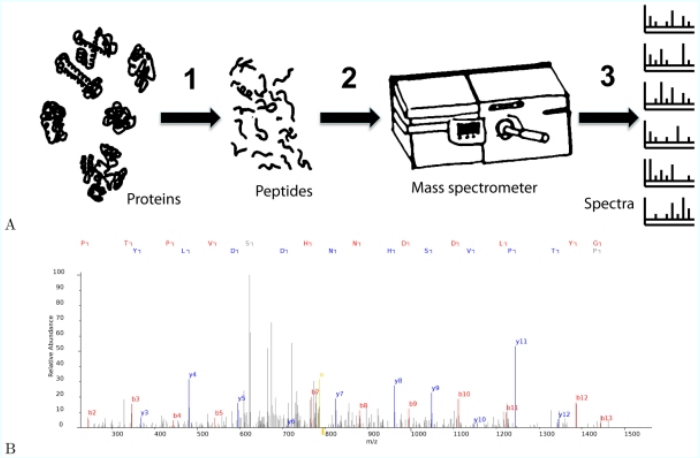
Frederick Sanger

Прошлое: белковое секвенирование

- 1950 — N-концевая деградация пептидов:
  ди- и трипептиды
- 1951 и 1952 — Первая последовательность белка:
  цепи B и A бычего инсулина, 30 и 21 а.о.
- 1967 — Автоматизация метода Эдмана:
  60 а.о. миоглобина кита

Pehr Edman

Настоящее: белковая масс-спектрометрия



Noble WS, MacCoss MJ. Computational and statistical analysis of protein mass spectrometry data. PLoS Comput Biol. 2012;8(1):e1002296.

Настоящее: автоматическая трансляция

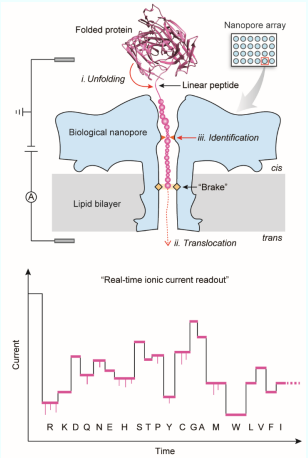
- Получение нуклеотидной последовательности (геном, экзом, транскриптом, метагеном).
- Предсказание открытых рамок считывания.
- Аннотация (в основном автоматическая) последовательностей по сходству с известными белками.

Так получено подавляющее большинство последовательностей белков.

Будущее: белковое секвенирование?

Активно развиваются новые подходы к массовому секвенированию белков:

- одномолекулярное нанопоровое секвенирование
- деградация иммобилизованных пептидов по Эдману с флуоресцентной детекцией продуктов
- протеолиз с помощью ClpX
- детекция на основе электронного туннелирования



Hu ZL, Huo MZ, Ying YL, Long YT. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2020;10.1002/anie.202013462.

Как хранят последовательности белков?

Последовательность белка

Последовательность аминокислотных остатков

- записанная от N-конца к C-концу,
- с использованием однобуквенных (реже трехбуквенных) обозначений аминокислот по IUPAC
- в виде текста (кодировка ASCII);
- остатки нумеруются, начиная с 1.

База данных

[Реляционную] **базу данных** можно представить в виде набора ссылающихся друг на друга **плоских таблиц**, при условии, что строчки в каждой таблице уникальны, а порядок строк и столбцов не имеет значения.

Единица хранения называется **записью (entry)** и соответствует строке таблицы. Столбцы называют **полями (field)** или аттрибутами. В ячейках записаны значения соответствующих полей.

Типы баз данных

На основании того, кто отвечает за достоверность информации, выделяют 3 типа баз данных.

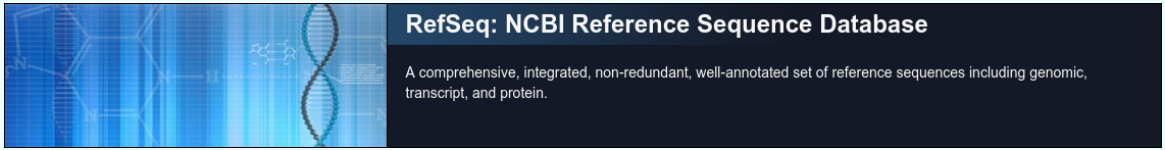
Архивные	записи создают сами экспериментаторы, они же отвечают за достоверность информации (например, GenBank, ENA, PDB)
Курируемые	за создание и редактирование записей отвечают специальные люди, кураторы (например, Swiss-Prot, отчасти RefSeq)
Автоматические	записи создаются автоматически компьютерными программами (например, TrEMBL, основная часть RefSeq)

Потоки данных: INSDC

International Nucleotide Sequence Database Collaboration:

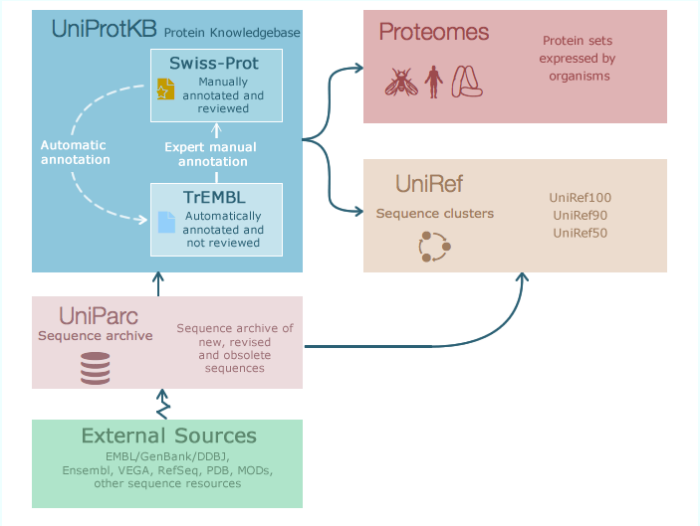
- Объединяет 3 крупнейших нуклеотидных архива: GenBank, ENA, DDBJ
- Ежедневный обмен данными
- Единый формат таблицы локальных особенностей
- Рекомендации по использованию терминов и ключевых слов в аннотациях
- И некоторые прочие унификации (например, таблицы генетического кода)

Потоки данных: RefSeq



- Автоматическая (по большей части) база данных на основе GenBank.
- Главная цель – уменьшение избыточности данных и унификация аннотаций.
- Часть записей курируется сотрудниками NCBI и не только (коллаборации со специализированными базами данных).
- Изначально нуклеотидная база, но создаются отдельные записи для закодированных белков (как и в GenBank).

Потоки данных: UniProt



UniParc

UniProt Archive

Архив уникальных последовательностей белков.

- Содержит все последовательности белков, которые когда-либо были в UniProtKB, и даже те, которые не были включены в UniProtKB по каким-либо причинам.
- Каждой уникальной последовательности присвоен идентификатор UPI, который никогда не изменяется и не удаляется.
- Запись UniParc содержит только последовательность, её хеш-сумму для проверки, ссылки на базы, в которых в какой-то момент времени хранилась такая же белковая последовательность и чуть-чуть вспомогательной информации.
- Последовательности (почти) неаннотированные.

Например, UPI0000000004

Database	Identifier	Version	Organism	First seen	Last seen	Active
UniProtKB/Swiss-Prot	P04195	1	Vaccinia virus (strain Western Reserve) (VACV) (Vaccinia virus (strain WR))	1988-11-01	2021-04-07	Yes
UniProtKB/TrEMBL	A0A2I2MC48	1	Vaccinia virus (strain Western Reserve) (VACV) (Vaccinia virus (strain WR))	2018-02-28	2021-04-07	Yes
UniProtKB/TrEMBL	Q6LDV9	1	Vaccinia virus	2006-04-18	2021-04-07	Yes
UniProtKB/TrEMBL	V5R1H0	1	Vaccinia virus WAU86/88-1	2015-07-22	2021-04-07	Yes
UniProtKB/TrEMBL	Q76ZR9	1		2004-07-05	2011-10-19	No
RefSeq	YP_232995	1	Vaccinia virus	2005-10-06	2021-01-04	Yes
EMBL CDS	AAA48264	1	Vaccinia virus	2003-03-12	2021-01-25	Yes
EMBL CDS	AAO89392	1	Vaccinia virus (strain Western Reserve) (VACV) (Vaccinia virus (strain WR))	2003-06-16	2021-01-25	Yes
EMBL CDS	ABD52586	1	Vaccinia virus	2007-03-31	2021-01-25	Yes
EMBL CDS	AHB23552	1	Vaccinia virus WAU86/88-1	2014-01-06	2021-01-25	Yes
EMBL CDS	AQY54886	1	Vaccinia virus	2017-04-08	2021-01-25	Yes
EMBL CDS	SOU90125	1	Vaccinia virus (strain Western Reserve) (VACV) (Vaccinia virus (strain WR))	2018-01-26	2021-01-25	Yes
USPTO	ADS58156	1		2011-03-07	2020-11-27	Yes
PRF	3315290DX		Vaccinia virus	2007-12-07	2009-09-01	Yes
TREMBLNEW	AAA48264			2003-03-29	2004-06-11	No
TREMBLNEW	AAO89392			2003-04-18	2004-06-11	No
PIRARC	A01146			2003-03-31	2003-04-04	No
PIRARC	A35014			2003-03-31	2003-04-04	No
PIR	CRVZW			2003-04-11	2005-01-04	No

UniProt Knowledgebase

UniProtKB – две базы аннотированных белковых последовательностей с общим форматом записей.

TrEMBL (от **Tr**anslated **EMBL**) – автоматическая база данных, содержащая, в основном, формальные трансляции открытых рамок считывания, предсказанных в нуклеотидных последовательностях.

Swiss-Prot (раньше была отдельным банком) – курируемая база данных. Кураторы выбирают записи из TrEMBL, проверяют и дополняют их, переносят в Swiss-Prot.

UniRef

UniProt Reference Clusters

Кластеры записей по сходству последовательностей.
UniProtKB + UniParc без ссылок на UniProtKB

UniRef100	идентичные на 100% последовательности и их фрагменты.
UniRef90	кластеры самых длинных представителей из кластеров UniRef100, идентичных на 90% и похожих по длине (не короче 80% самой длинной последовательности в кластере). Принадлежность кластеру UniRef90 распространяется на все остальные записи из кластера UniRef100 без проверок.
UniRef50	аналогично UniRef90.

Последовательности длины 10 и более короткие включены только в UniRef100, и кластеризуются только при совпадении длины.

Сид и репрезентативная последовательность

Seed – самая длинная последовательность в кластере, с которой сравниваются остальные последовательности для проверки принадлежности кластеру.

Representative – наиболее хорошо аннотированная последовательность, используется для аннотации кластера (название и длина последовательности).

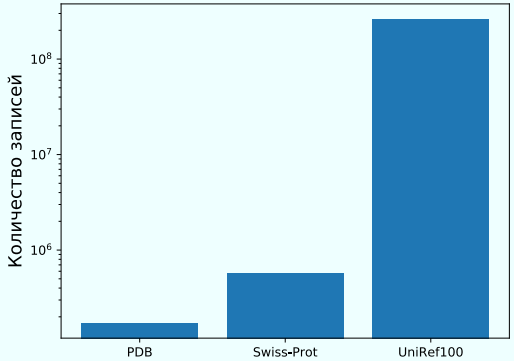
Случаются приколы ☺

Например, кластер UniRef90_P81108

Cluster members	Entry name		Protein names	Organisms	Organism IDs	Related clusters	Length	Role
P81108	**THIO_CLOSG**		**Thioredoxin (Fragment)**	**Clostridium sporogenes**	1509	UniRef100_P81108	**40**	**Representative**
A0A1V9IK41	A0A1V9IK41_CLOSG		Thioredoxin	Clostridium sporogenes	1509	UniRef100_P81108	106	
A0A0B4W3E0	A0A0B4W3E0_CLOBO		Thioredoxin	Clostridium botulinum Prevot_594	1408284	UniRef100_P81108	106	
A0A1J1CWE3	A0A1J1CWE3_CLOBO		Thioredoxin	Clostridium botulinum	1491	UniRef100_A0A1J1CWE3	106	Seed
J7T6P1	J7T6P1_CLOS1		Thioredoxin	Clostridium sporogenes (strain ATCC 15579)	471871	UniRef100_A0A1J1CWE3	106	
A0A0D0ZXA6	A0A0D0ZXA6_CLOBO		Thioredoxin	Clostridium botulinum B2 450	1379739	UniRef100_A0A1J1CWE3	106	
A0A6M0YC23	A0A6M0YC23_CLOSG		Thioredoxin	Clostridium sporogenes	1509	UniRef100_A0A6M0YC23	106	
A0A1S9I145	A0A1S9I145_9CLOT		Thioredoxin	Clostridium tepidum	1962263	UniRef100_A0A1S9I145	106	
A0A6M0T4F3	A0A6M0T4F3_CLOBO		Thioredoxin	Clostridium botulinum	1491	UniRef100_A0A6M0T4F3	106	
A0A6M0XX80	A0A6M0XX80_CLOSG		Thioredoxin	Clostridium sporogenes	1509	UniRef100_A0A6M0T4F3	106	
A0A0M1IUU5	A0A0M1IUU5_9CLOT		Thioredoxin	Clostridium sp. L74	1560217	UniRef100_A0A0M1IUU5	106	
UPI000666DA61			thiol reductase thioredoxin	Clostridium sporogenes	1509	UniRef100_UPI000666DA61	106	
UPI000D0CC3E6			thiol reductase thioredoxin	Clostridium botulinum	1491	UniRef100_UPI000D0CC3E6	106	
UPI001748E097			thioredoxin	Clostridium botulinum	1491	UniRef100_UPI001748E097	106	
UPI0005F06029			thiol reductase thioredoxin	Clostridium sporogenes	1509	UniRef100_UPI0005F06029	106	

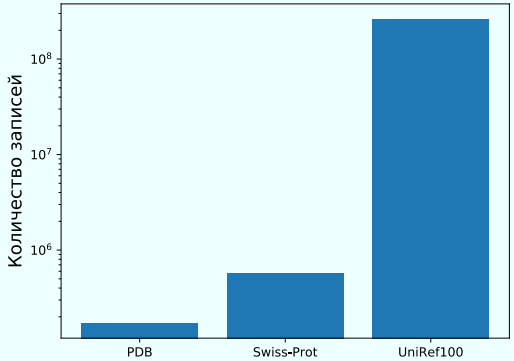
Масштаб проблемы

Число записей про белки в разных базах данных.



Масштаб проблемы

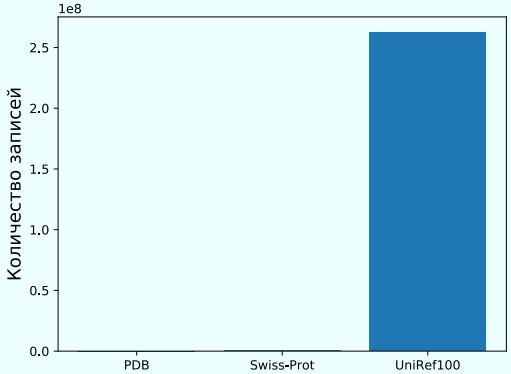
Число записей про белки в разных базах данных.



Логарифмическая шкала!

Масштаб проблемы

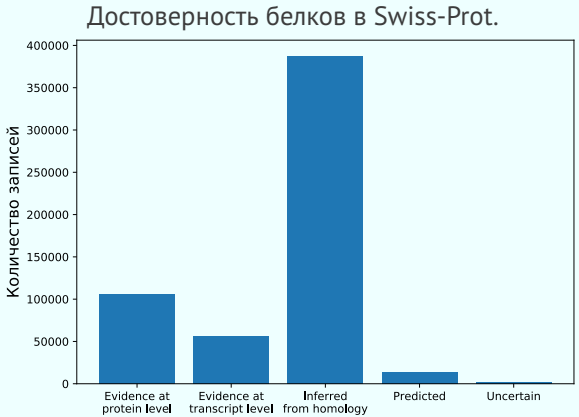
Число записей про белки в разных базах данных.



Известных структур во много раз меньше, чем последовательностей.

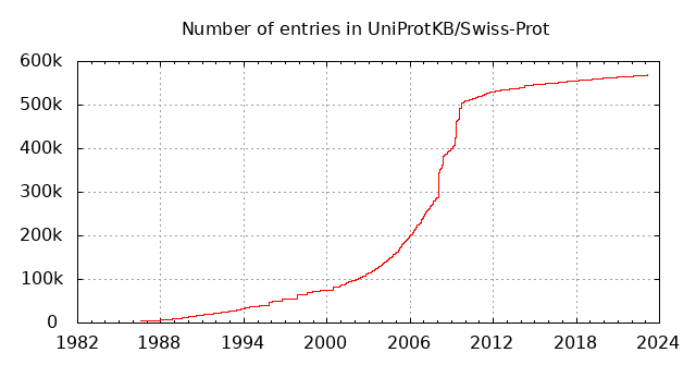
Большинство последовательностей предсказано и аннотировано лишь автоматически.

Масштаб проблемы

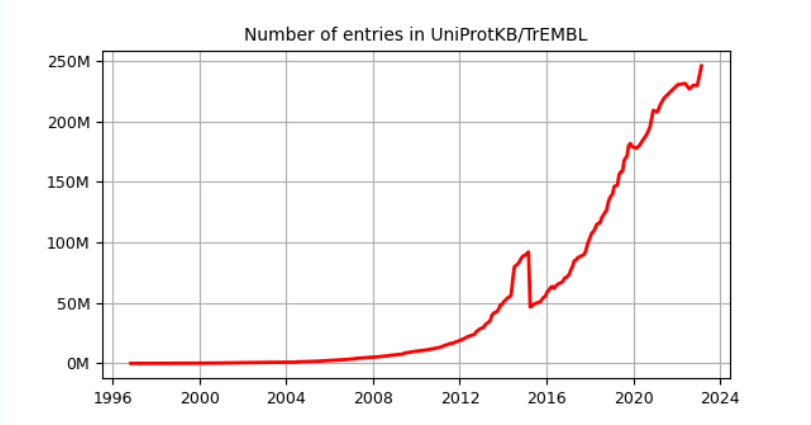


Среди аннотированных вручную белков большая часть не изучена экспериментально даже на уровне транскрипта.

Рост числа записей в Swiss-Prot



Рост числа записей в TrEMBL



Что такое "один белок"?

Какие есть проблемы?

- Два гена из одного генома кодируют один белок (недавняя дупликация).
- Два гена из разных видов (штаммов, родов, ...) кодируют один белок.
- Полиморфизм: последовательность белка отличается у разных особей одного вида.
- Соматические различия: разные белки в разных клетках организма (иммунные клетки, раковые клетки, соматические мутации).
- Альтернативный сплайсинг: у одного гена может быть несколько продуктов, разных по последовательности.
- Транссплайсинг: сплайсинг между разными генами, белок не закодирован в одном гене.

Одна запись UniProtKB

Одна запись – все продукты одного гена из организмов одного вида. Известные изоформы, полиморфизмы и т.д. указывают в аннотации записей.

Изоформы указаны в полях CC (подраздел "Alternative products") и FT (конкретные участки различий), полиморфизмы указывают в поле FT.

Правило не строгое, из него есть исключения. Например, если для гена известно множество изоформ, сильно отличающихся по последовательности и функциям, то для них создадут несколько записей.

Формат записи UniProtKB

Структура записи UniProtKB

```
ID   NU4LM_BALMU             Reviewed;         98 AA.
AC   P41301;
DT   01-FEB-1995, integrated into UniProtKB/Swiss-Prot.
DT   26-FEB-2020, entry version 75.
DE   RecName: Full=NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4L;
DE            EC=7.1.1.2;
GN   Name=MT-ND4L; Synonyms=MTND4L, NADH4L, ND4L;
OS   Balaenoptera musculus (Blue whale).
OG   Mitochondrion.
OC   Eukaryota; Metazoa; Chordata; ...; Balaenopteridae; Balaenoptera.
OX   NCBI_TaxID=9771;
RN   [1]
RP   NUCLEOTIDE SEQUENCE [GENOMIC DNA].
RX   PubMed=8308901; DOI=10.1007/bf00178861;
RA   Arnason U., Gullberg A.;
RT   "Comparison between the complete ... that can hybridize in nature.";
RL   J. Mol. Evol. 37:312-322(1993).
CC   -!- SUBCELLULAR LOCATION: Mitochondrion membrane {ECO:0000250}; Multi-pass
CC       membrane protein {ECO:0000250}.
CC   -!- SIMILARITY: Belongs to the complex I subunit 4L family. {ECO:0000305}.
DR   EMBL; X72204; CAA51003.1; -; Genomic_DNA.
DR   RefSeq; NP_007064.1; NC_001601.1.
DR   GO; GO:0016021; C:integral component of membrane; IEA:UniProtKB-KW.
DR   Pfam; PF00420; Oxidored_q2; 1.
PE   3: Inferred from homology;
KW   Translocase; Transmembrane; Transmembrane helix; Transport; Ubiquinone.
FT   CHAIN           1..98
FT                   /note="NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4L"
FT                   /id="PRO_0000118394"
FT   TRANSMEM        1..21
FT                   /evidence="ECO:0000255"
SQ   SEQUENCE   98 AA;  10747 MW;  9F770651FE65ED1B CRC64;
     MTLIHMNVLM AFSMSLVGLL MYRSHLMSAL LCLEGMMLSL FVLAALTILN SHFTLANMMP
     IILLVFAAYV AAIGLALLVM VSNTYGTDYV QSLNLLQC
//
```

метаданные

аннотация последовательности

последовательность

Основные поля записи UniProtKB

- `ID` — название записи (идентификатор)
- `AC` — код доступа (еще один идентификатор)
- `DE` — description, описание (функция) белка
- `OS` — видовое название организма–источника белка
- `OC` — таксономическое положение организма (по NCBI Taxonomy)
- `DR` — ссылки на записи в других базах данных о данном белке
- `PE` — protein existence, 5 уровней достоверности существования белка
- `KW` — ключевые слова
- `FT` — feature table, таблица локальных особенностей
- `CC` — comments, другая полезная информация, плохо поддающаяся формализации
- `SQ` — последовательность

Идентификаторы записи UniProtKB

ID – имя записи (entry name), *уникальный* идентификатор

- единственный у записи и уникальный
- может изменяться со временем
- человекочитаемый, включает мнемонику функции и мнемонику организма
- примеры: INS_HUMAN, INS1_MOUSE, A0A1S2PNH5_9ACTN

AC – код доступа (accession number), *стабильный* идентификатор

- не изменяется и не удаляется
- у записи может быть несколько AC
- может повторяться у нескольких записей (основной AC всегда уникальный)
- случайная комбинация букв и цифр
- примеры: A2BC19, P12345, A0A023GPI8

Когда ссылаетесь на запись, указывайте основной (primary) код доступа!

Таблица локальных особенностей (Feature table, FT)

Имеет строгий формат, список и описание всех возможных ключей доступно на сайте UniProt.

```
FT   CHAIN           1..188
FT                   /note="Isochorismatase family protein YecD"
FT                   /id="PRO_0000201831"
FT   HELIX           6..8
FT                   /evidence="ECO:0000244|PDB:1J2R"
FT   STRAND          9..14
FT                   /evidence="ECO:0000244|PDB:1J2R"
FT   REGION          5..34
FT                   /note="Interaction with RNase E"
FT   ACT_SITE        209
FT                   /note="Proton donor"
FT                   /evidence="ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00318,
FT                   ECO:0000269|PubMed:15003462"
FT   METAL           246
FT                   /note="Magnesium"
FT                   /evidence="ECO:0000269|PubMed:11676541,
FT                   ECO:0000269|PubMed:16516921"
FT   BINDING         159
FT                   /note="Substrate"
FT                   /evidence="ECO:0000255|HAMAP-Rule:MF_00318"
FT   MOD_RES         257
FT                   /note="N6-acetyllysine"
FT                   /evidence="ECO:0000269|PubMed:18723842"
FT   CONFLICT        180..188
FT                   /note="SVEEILNAL -> TWKRSSTRYDLHRSTAMVAS (in Ref. 1)"
FT                   /evidence="ECO:0000305"
FT   MUTAGEN         168
FT                   /note="E->Q: 5% activity; not secreted."
FT                   /evidence="ECO:0000269|PubMed:15003462"
```

вторичная структура

сайты связывания

модифицированные остатки

разночтения в последовательности

и т.д.