Predikce genů

Pro zajímavost, nebude součástí zkoušky…

Důležité, pravděpodobně bude u zkoušky…

Molekulárně biologická data

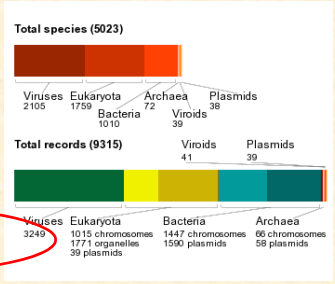
- **Výkonné technologie:**
  - Automatické sekvencování
  - MALDI-TOF
  - NMR spektroskopie
  - Proteinová krystalografie

Výrazný nárůst množství biologických dat.

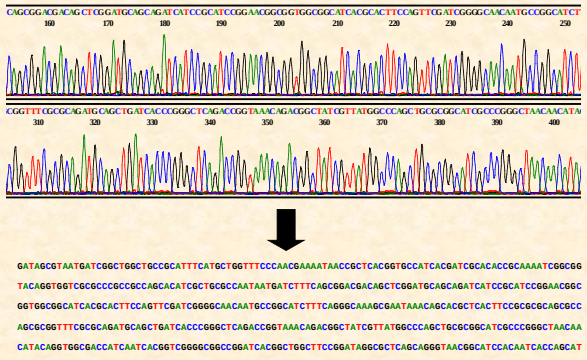
Rozdělení molekulárně biologických databází

- **Databáze:**
  - Primární
  - Sekundární
  - Strukturní

Genomové zdroje



Molekulárně biologická data



GATAGCGTAATGATCGGCTGGCTGCCGCATTTCATGCTGGTTTCCCAACGAAAATAACCGCTCACGGTGCCATCACGATCGCACACCGCAAAATCGGCGG
TACAGGTGGTCGCGCCCGCCGCCAGCACATCGCTGCCCAATAATGATCTTTCAGCGGACGACAGCTCGGATGCAGCAGATCATCCGCATCCGGAACGGC
GGTGGCGGCATCACGCACTTCCAGTTCGATCGGGGCAACAATGCCGGCATCTTTCAGGGCAAAGCGAATAAACAGCACGCTCACTTCCGCGCGCAGCGCC
AGCGCGGTTTCGCGCAGATGCAGCTGATCACCCGGGCTCAGACCGGTAAACAGACGGCTATCGTTATGGCCCAGCTGCGCGGCATCGCCCGGGCTAACAA
CATACAGGTGGCGACCATCAATCACGGTCGGGGCGGCCGGATCACGGCTGGCTTCCGGATAGGCGCTCAGCAGGGTAACGGCATCCACAATCACCAGCAT

„Syrové“ sekvence DNA

Identifikace a anotace genů a proteinů

Table 1
Software commonly used for bacterial genome annotation and comparison

DNA level annotation		
GeneMark	http://exon.gatech.edu/genemark/	Protein gene prediction
Glimmer	http://www.genomics.jhu.edu/Glimmer/	Protein gene prediction
SHOW	http://genome.jouy.inra.fr/sish/SHOW/	Protein gene prediction
tRNAscan-SE	http://lowelabucsc.edu/tRNAscan-SE/	tRNA gene prediction
RNAmmer	http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/	rRNA gene prediction
RepSeek	http://www.abi.snv.jussieu.fr/%98public/RepSeek/	Search for approximate repeats in complete DNA sequences
IslandPath	http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandpath/	Identification of genomic islands
Protein level annotation		
BLAST	http://www.ebi.ac.uk/blast/	Compare a novel sequence with those contained in nucleotide and protein databases
InterProScan	http://www.ebi.ac.uk/interProScan/	Search for domains/motifs in the InterPro database
COGNITOR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/xognitor.html	Compare a query sequence to the COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins) database
PRIAM	http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/priam/	Detection of enzymatic function in a fully sequenced genome, based on all sequences available in the ENZYME database
GOAnno	http://bips.u-strasbg.fr/GOAnno/	BLAST search on the Gene Ontology database
PSORTb	http://www.psort.org/psortb/	Prediction of bacterial protein subcellular localization
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Prediction of transmembrane helices in protein sequences
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	Prediction of signal peptide cleavage sites in protein sequences
Comparative genomic tools		
Mauve	http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/	Multiple genome alignments in the presence of large-scale evolutionary events
MOSAIC	http://mig.jouy.inra.fr/mig/mig_eng/presentation/project/mosaic	Define the set of backbones and loops in closely related bacterial genomes
ACT	http://www.sanger.ac.uk/Software/ACT/	Comparative genome analysis and visualization tools for multiple genome alignments
CGAT	http://mbgd.genome.ad.jp/CGAT/	
MaGe	http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage/	Computation of gene order conservation (syntenies) between available bacterial genomes
Pathologic	http://biocyc.org/	Metabolic network reconstruction and comparative pathway analysis
PUMA2	http://compbio.mcs.anl.gov/puma2/	Metabolic pathway reconstruction
The SEED	http://theseed.uchicago.edu/FIG/	Comparative analysis and annotation tools using the subsystem approach
STRING	http://string.embl.de/	Search Tool for the Retrieval of Interacting Proteins
PyPhy	http://www.cbs.dtu.dk/staff/thomas/pyphy/	Reconstruction of phylogenetic relationships of complete microbial genomes
HoSeqI	http://pbil.univ-lyon1.fr/software/HoSeqI/	Automatically assign sequences to homologous gene families from the HOGENOM database

Predikce genů kódujících proteiny

- **Prokaryotické geny**
- Nepřerušované úseky DNA mezi **startovním kodonem** (ATG, GTG, TTG, CTG) a **stop kodonem** (TAA, TGA, TAG).

- **Eukaryotické geny**
- Přerušovány **introny**. Průměrná délka exonu je 50 kodonů, některé jsou mnohem kratší.
- Některé introny extrémně dlouhé, geny zabírají mbp v genomové DNA.

Predikce eukaryotických genů je mnohem složitější než predikce genů prokaryotických a představuje STÁLE NEVYŘEŠENÝ problém!

Prokaryotické geny

- **Prokaryotický gen = nejdelší ORF odpovídající danému úseku DNA.**

```
GTATGCTGGTGATTGTGGATGCCGTTACCCTGCTGAGCGCCTATCCGGAAGCCAGCCGTGATCCGGCCGCCCC
GACCGTGATTGATGGTCGCCACCTGTATGTTGTTAGCCCGGGCGATGCCGCGCAGCTGGGCCATAACGATAGC
CGTCTGTTTACCGGTCTGAGCCCGGGTGATCAGCTGCATCTGCGCGAAACCGCGCTGGCGCTGCGCGCGGAAG
TGAGCGTGCTGTTTATTCGCTTTGCCCTGAAAGATGCCGGCATTGTTGCCCCGATCGAACTGGAAGTGCGTGA
TGCCGCCACCGCCGTTCCGGATGCGGATGATCTGCTGCATCCGAGCTGTCGTCCGCTGAAAGATCATTATTGG
CGCAGCGATGTGCTGGCGGCGGGCGGCGACCACCTGTACCGCCGATTTTGCGGTGTGCGATCGTGATGGCACCG
TGAGCGGTTATTTTCGTTGGGAAACCAGCATTGAAATTGCGGGCAGCCAGCCGGATACCAAACAGCCGGGCTT
TAAACCGAGCAGCGATCGCAATGGCAACTTTAGCCTGCCGCCGAATACCGCCTTTAAAGCGATCTTCTATGCG
AACGCGGCGGATCGTCAGGATCTGAAACTGTTTATTGATGATGCGCCGGAACCGGCCGCCACCTTTGTGGGTA
ACAGCGAAGATGGTGTGCGTCTGTTTACCCTGAATAGCAAAGGTGGTAAAATTCGTATTGAAGCGAGCGCGAA
CGGCCGTCAGAGCGCGACCGATGCCCGTCTGGCGCCGCTGAGCGCGGGCGATACCGTGTGGCTGGGCTGGCTG
GGCGCGGAAGATGGTGCCGATGCGGATTATAATGATGGCATTGTTATTCTGCAGTGGCCGATTACCTAATGGG
```

Překlad DNA sekvence

nonpolar polar basic acidic (stop codon)

The table shows the 64 codons and the amino acid for each. The direction of the mRNA is 5' to 3'.

1st base	2nd base U	2nd base C	2nd base A	2nd base G
U	UUU (Phe/F) Phenylalanine	UCU (Ser/S) Serine	UAU (Tyr/Y) Tyrosine	UGU (Cys/C) Cysteine
	UUC (Phe/F) Phenylalanine	UCC (Ser/S) Serine	UAC (Tyr/Y) Tyrosine	UGC (Cys/C) Cysteine
	UUA (Leu/L) Leucine	UCA (Ser/S) Serine	UAA Ochre (Stop)	UGA Opal (Stop)
	UUG (Leu/L) Leucine	UCG (Ser/S) Serine	UAG Amber (Stop)	UGG (Trp/W) Tryptophan
C	CUU (Leu/L) Leucine	CCU (Pro/P) Proline	CAU (His/H) Histidine	CGU (Arg/R) Arginine
	CUC (Leu/L) Leucine	CCC (Pro/P) Proline	CAC (His/H) Histidine	CGC (Arg/R) Arginine
	CUA (Leu/L) Leucine	CCA (Pro/P) Proline	CAA (Gln/Q) Glutamine	CGA (Arg/R) Arginine
	CUG (Leu/L) Leucine	CCG (Pro/P) Proline	CAG (Gln/Q) Glutamine	CGG (Arg/R) Arginine
A	AUU (Ile/I) Isoleucine	ACU (Thr/T) Threonine	AAU (Asn/N) Asparagine	AGU (Ser/S) Serine
	AUC (Ile/I) Isoleucine	ACC (Thr/T) Threonine	AAC (Asn/N) Asparagine	AGC (Ser/S) Serine
	AUA (Ile/I) Isoleucine	ACA (Thr/T) Threonine	AAA (Lys/K) Lysine	AGA (Arg/R) Arginine
	AUG (Met/M) Methionine; *Start* [a]	ACG (Thr/T) Threonine	AAG (Lys/K) Lysine	AGG (Arg/R) Arginine
G	GUU (Val/V) Valine	GCU (Ala/A) Alanine	GAU (Asp/D) Aspartic acid	GGU (Gly/G) Glycine
	GUC (Val/V) Valine	GCC (Ala/A) Alanine	GAC (Asp/D) Aspartic acid	GGC (Gly/G) Glycine
	GUA (Val/V) Valine	GCA (Ala/A) Alanine	GAA (Glu/E) Glutamic acid	GGA (Gly/G) Glycine
	GUG (Val/V) Valine	GCG (Ala/A) Alanine	GAG (Glu/E) Glutamic acid	GGG (Gly/G) Glycine

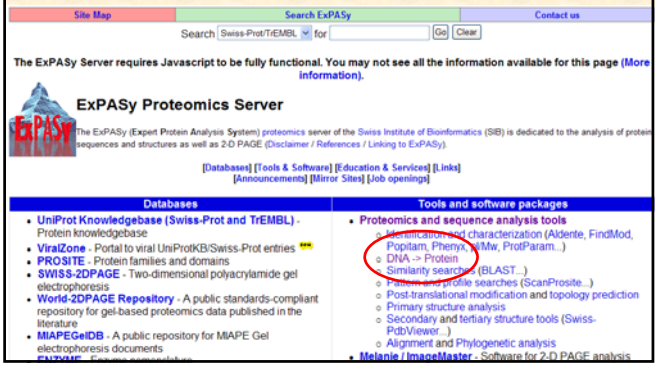
Překlad DNA sekvence

- **ExPASy**
  http://www.expasy.org/tools/dna.html

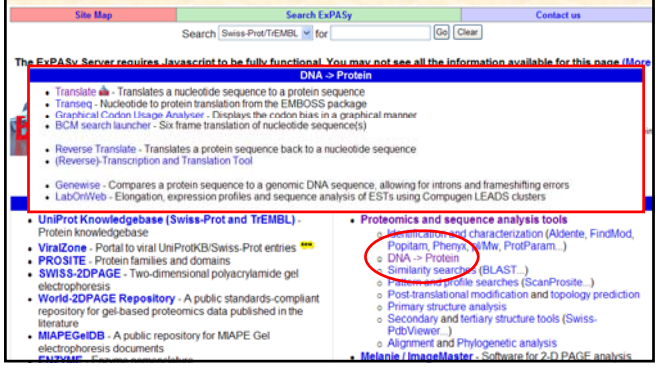
- **ORF Finder** (NCBI)
  http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html

ExPASy

http://www.expasy.org/tools/dna.html



ExPASy
http://www.expasy.org/tools/dna.html



ExPASy
http://www.expasy.org/tools/dna.html

Translate is a tool which allows the translation of a nucleotide (DNA/RNA) sequence to a protein sequence.

Please enter a DNA or RNA sequence in the box below (numbers and blanks are ignored).

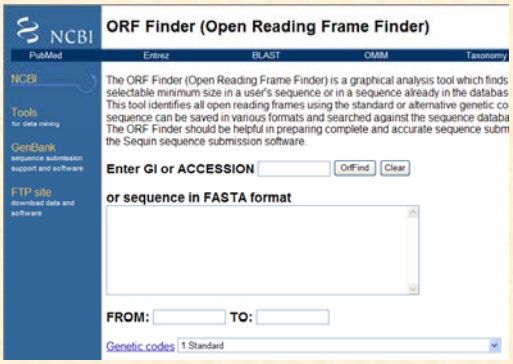
```
GTATGCTGGTGATTGTGGATGCCGTTACCCTGCTGAGCGCCTATCCGGAAGCCAGCCGTGATCCGGCCGCC
CCGACCGTGATTGATGGTCGCCACCCTGTATGTTGTTAGCCCGGGCGATGCCGCCGCAGCTGGGCCATAACGA
TAGCCGTCTGTTTACCGGTCTGAGCCCGGGTGATCAGCTGCATCTGCGCGAAACCGCGCTGGCGCTGCGCG
CGGAAGTGAGCGTGCTGTTTATTCGCTTTGCCCTGAAAGATGCCGGCATTGTTGCCCCGATCGAACTGGAA
GTGCGTGATGCCGCCACCGCCGTTCCGGATGCGGATGATCTGCTGCATCCGAGCTGTCGTCCGCTGAAAGA
TCATTATTGGCGCAGCGATGTGCTGGCGGCGGGCGCGACCACCTGTACCGCCGATTTTGCGGTGTGCGATC
GTGATGGCACCGTGAGCGGTTATTTTCGTTGGGAAACCAGCATTGAAATTGCGGGCAGCCAGCCGGATACC
AAACAGCCGGGCTTTAAACCGAGCAGCGATCGCAATGGCAACTTTAGCCTGCCGCCGAATACCGCCTTTAA
AGCGATCTTCTATGCGAACGCGGCGGATCGTCAGGATCTGAAACTGTTTATTGATGATGCGCCGGAACCGG
CCGCCACCTTTGTGGGTAACAGCGAAGATGGTGTGCGTCTGTTTACCCTGAATAGCAAAGGTGGTAAAATT
CGTATTGAAGCGAGCGCGAACGGCCGTCAGAGCGCGACCGATGCCCGTCTGGCGCCGCTGAGCGCGGGCGA
TACCGTGTGGCTGGGCTGGCTGGGCGCGGAAGATGGTGCGATGCGGATTATAATGATGGCATTGTTATTC
TGCAGTGGCCGATTACCTAATGGG
```

Output format: Verbose ("Met", "Stop", spaces between residues)

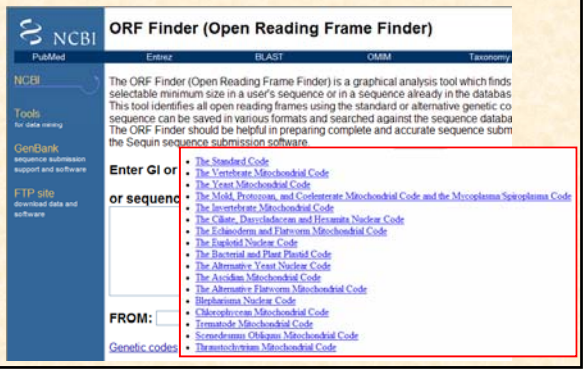
Reset or TRANSLATE SEQUENCE

Translate Tool - Results of translation

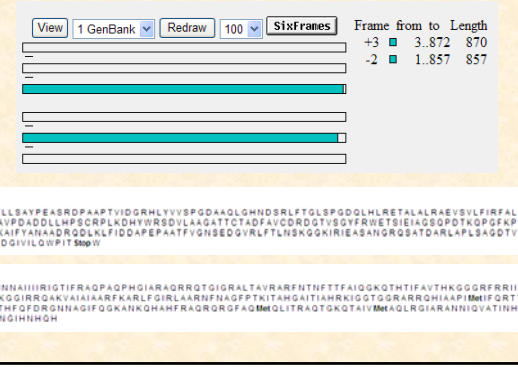
ORF Finder (NCBI)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html



ORF Finder (NCBI)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html



ORF Finder (NCBI)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html



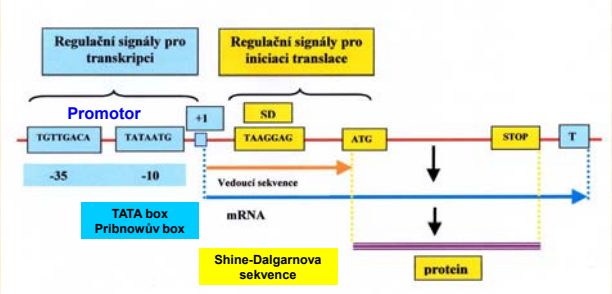
Prokaryotické geny

- **Velmi jednoduchý přístup k predikci genů**
  Zjednodušení vede k chybám, ale jejich množství je POMĚRNĚ MALÉ.
- **Chyby mohou vznikat při SEKVENCOVÁNÍ DNA.**
  Přidání/odstranění startovního a/nebo stop kodonu může vést ke ZKRÁCENÍ, PRODLOUŽENÍ nebo úplnému VYNECHÁNÍ genu.

Opravdu ORF kóduje protein?

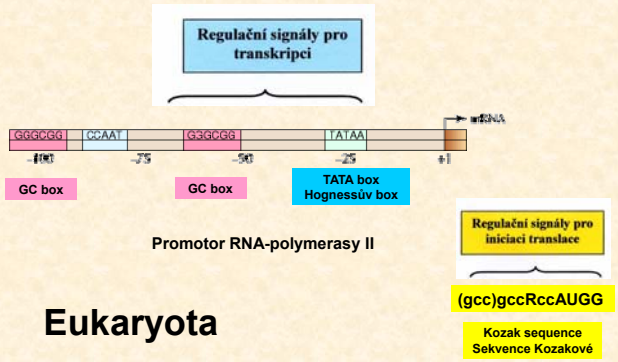
- **ORF kóduje protein, který je podobný již dříve popsanému proteinu** (prohledávání DATABÁZÍ pomocí ALIGNMENTU).
- **ORF má typický obsah GC nebo frekvenci kodonů.** Srovnání s charakteristickými vlastnostmi známých genů ze stejného organismu.
- **Před ORF se nachází typické RBS (ribosome-binding site) nebo promotor.**

Translační a transkripční signální sekvence



Prokaryota

Translační a transkripční signální sekvence

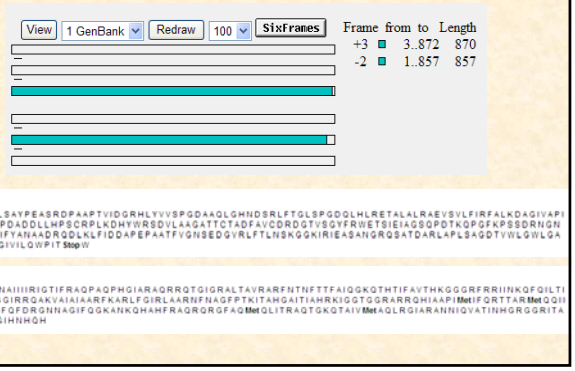


Eukaryota

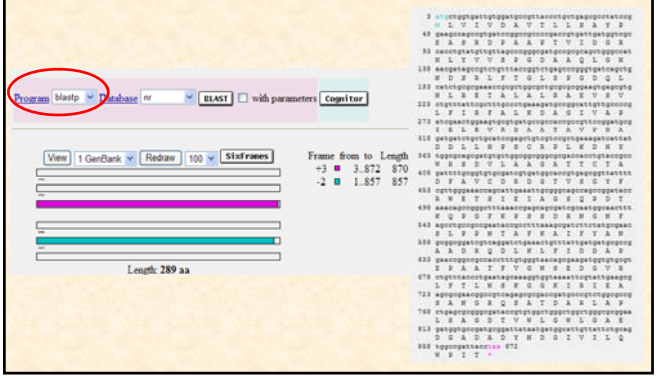
Opravdu ORF kóduje protein?

- ORF kóduje protein, který je podobný již dříve popsanému proteinu (prohledávání DATABÁZÍ pomocí ALIGNMENTU) **= nejspolehlivější ověření.**
- **Nástroje pro překlad DNA jsou propojeny s prohledáváním databází.**

ORF Finder (NCBI)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html



ORF Finder (NCBI)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html



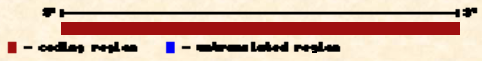
Eukaryotické geny
Jednobuněčná eukaryota

- **Genomy jednobuněčných eukaryot se výrazně liší** (frekvence intronů, jak velká část genomu je tvořená geny kódujícími proteiny).
- *Saccharomyces cerevisiae* – 67% genomu je protein-kódující, jen 4% obsahují introny.
- Hlenky – průměrný gen obsahuje 3,7 intronu.
- **Pro některá jednobuněčná eukaryota (kvasinky) je možné použít stejné postupy jako pro prokaryota.**

Eukaryotické geny
Mnohobuněčná eukaryota

- **Mnohobuněčná eukaryota**

Komplexní organizace genomu, geny separovány dlouhými INTERGENOVÝMI úseky, geny obsahují množství INTRONŮ, i velmi DLOUHÝCH.



Glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasa
Candida albicans

Eukaryotické geny
Mnohobuněčná eukaryota

- **Mnohobuněčná eukaryota**

Komplexní organizace genomu, geny separovány dlouhými INTERGENOVÝMI úseky, geny obsahují množství INTRONŮ, i velmi DLOUHÝCH.

Glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasa
Homo sapiens

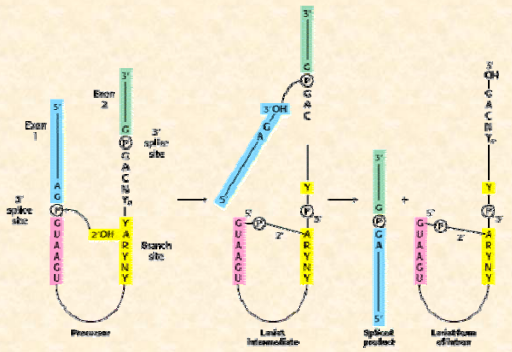
Eukaryotické geny
Mnohobuněčná eukaryota

- **Rozpoznání exonů/intronů**

Identifikace míst sestřihu: GT na 5´konci, AG na 3´konci.

- **Chyby při rozpoznávání exonů/intronů**

Velké množství chyb. Dlouhé introny – určeny jako intergenové úseky. Krátké intergenové useky – určeny jako introny.



Splicing Mechanism Used for mRNA Precursors. The upstream (5′) exon is shown in blue, the downstream (3′) exon in green, and the branch site in yellow. Y stands for a purine nucleotide, R for a pyrimidine nucleotide, and N for any nucleotide. The 5′ splice site is attacked by the 2′-OH group of the branch-site adenosine residue. The 3′ splice site is attacked by the newly formed 3′-OH group of the upstream exon. The exons are joined, and the intron is released in the form of a lariat. [After P. A. Sharp. *Cell* 2(1985):3980.]

Algoritmy a nástroje pro identifikaci genů

- **Predikce genů na základě sekvenční homologie – vyhledávání v databázích pomocí algoritmů.**
- **Predikce genů *ab initio* – predikce na základě statistických parametrů DNA sekvence.**
- **Většina běžně používaných metod kombinuje oba dva přístupy.**

Prokaryota

ATG……TAA
Bez intronů
SEKVENČNÍ HOMOLOGIE

↓

IDENTIFIKOVANÉ GENY VYUŽITY PRO „TRÉNOVÁNÍ“ STATISTICKÉ METODY

↓

ANALÝZA ZBÝVAJÍCÍCH ČÁSTÍ GENOMU

Eukaryota

Mnoho intronů, dlouhé intergenové úseky
Ab initio STATISTICKÉ METODY

↓

IDENTIFIKOVANÉ EXONY

↓

SEKVENČNÍ HOMOLOGIE

Algoritmy a nástroje pro identifikaci genů

- **Každý program má výhody a nevýhody – rozumné použít více predikčních nástrojů.**

  GeneMark
  GlimmerM
  GRAIL
  GenScan
  Fgenes

Algoritmy a nástroje pro identifikaci genů

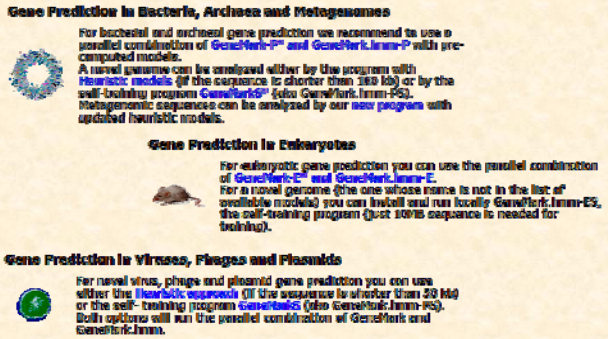
- **GeneMark**
  http://exon.gatech.edu/GeneMark

  Využívá Markovovy modely

  Vyžaduje parametry specifické pro daný organismus = nutné „natrénování“ pomocí známých genů

  Varianty pro prokaryotické, eukaryotické, virové sekvence

GeneMark
http://exon.gatech.edu/GeneMark



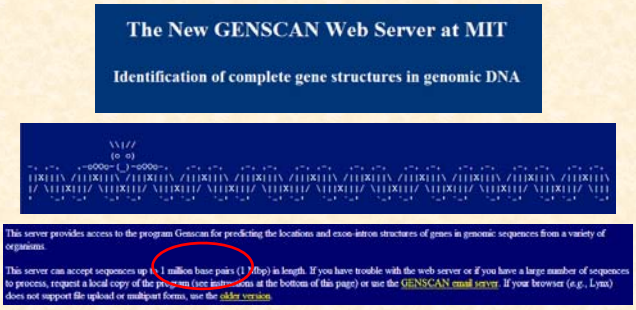
Algoritmy a nástroje pro identifikaci genů

- **GeneScan**
  http://genes.mit.edu/GENSCAN.html

  Komplexní probablistický model struktury genu (transkripční, translační, sestřihové signály + statistické vlastnosti kódujících a nekódujících úseků)

  Primární analýza velkých úseků eukaryotické genomové DNA

GeneScan
http://genes.mit.edu/GENSCAN.html



Algoritmy a nástroje pro identifikaci genů

Program	Organism	Algorithm*	Website	Homology
GeneID	Vertebrates, plants	DP	http://www1.imim.es/geneid.html	
FGENESH	Human, mouse, Drosophila, rice	HMM	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind	
GeneParser	Vertebrates	NN	http://beagle.colorado.edu/~eesnyder/GeneParser.html	EST
Genie	Drosophila, human, other	GHMM	http://www.fruitfly.org/seq_tools/genie.html	protein
GenLang	Vertebrates, Drosophila, dicots	Grammar rule	http://www.chil.upenn.edu/genlang/genlang_home.html	
GENSCAN	Vertebrates, Arabidopsis, maize	GHMM	http://genes.mit.edu/GENSCAN.html	
GlimmerM	Small eukaryotes, Arabidopsis, rice	IMM	http://www.tigr.org/tdb/glimmerm/glmr_form.html	
GRAIL	Human, mouse, Arabidopsis, Drosophila	NN, DP	http://compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm	EST, cDNA
HMMgene	Vertebrates, *C. elegans*	CHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/HMMgene/	
AUGUSTUS	Human, Arabidopsis	IMM,WWAM	http://augustus.gobics.de/	
MZEF	Human, mouse, Arabidopsis, Fission yeast	Quadratic discriminant analysis	http://rulai.cshl.org/tools/genefinder/	

*DP, dynamic programming; NN, neural network; MM, Markov model; HMM, Hidden Markov model; CHMM, class HMM; GHMM, generalized HMM; IMM, interpolated MM

Shrnutí

- **Predikce prokaryotických genů mnohem jednodušší než u eukaryotických.**
- **Predikce genů *ab initio*/na základě sekvenční homologie.**
- **Nutné kombinovat oba přístupy.**
- **Rozumné využívat více predikčních programů.**