

Transcriptómica, Regulación Genómica y Epigenómica

Resumen

La asignatura aborda el análisis de datos de transcriptómica y proteómica, analizando las tecnologías disponibles, la cuantificación de la expresión y métodos para el análisis estadístico de la expresión diferencial. Además, se verán métodos de análisis funcional, estudios de la regulación genómica y epigenómica, análisis multimodal de datos de célula única y métodos de clasificación supervisada y no supervisada (clustering) aplicados a datos ómicos de bulk y de célula única.

Obtendremos la capacidad de analizar de manera cuantitativa datos de transcriptómica y proteómica tanto a nivel de tejido como de célula única, e integrarlo con técnicas para el estudio de la expresión de la transcripción, tales como la modificación de histonas y la actividad de la cromatina y los factores de transcripción.

Índice general

I Diseño experimental y principios estadísticos del análisis de datos ómicos	4
I.1 Pipeline de un experimento ómico	5
I.2 Diseño experimental	6
I.2.1 Ejemplo de diseño experimental	7
I.2.2 Réplicas vs profundidad	8
I.2.3 Pooling, batch y blocking	8
I.2.4 Diseño experimental - Ejercicios	10
I.3 Consideraciones estadísticas para datos ómicos	11
I.3.1 Ejemplo - Statistics for Omics	11
I.3.2 Estadística en datos ómicos	14
I.3.3 Continuación ejemplo - Statistics for Omics	18
I.3.4 Ejemplo inferencia	18
I Transcriptómica	19
II RNA-Seq	20
II.1 Pipeline general y alineadores	20
II.1.1 Control de calidad inicial	21
II.1.2 Preprocesado	21
II.1.3 Alineamiento y mapeado	22
II.1.4 Galaxy	22
II.2 Expresión diferencial	23
II.2.1 Visualización con IGV	23
II.2.2 Redundancia de mapeo	24
II.2.3 Cálculo de expresión	25
II.2.4 Galaxy	25
II.3 Análisis de expresión diferencial	26
II.3.1 Galaxy	26
III ChIP-Seq	29
III.1 Procedimiento experimental	29
III.2 Análisis de Datos	29
III.3 Aplicación práctica: Pipeline de análisis con Galaxy	30
III.3.1 Obtención de datos	30
III.3.2 Preprocesamiento de datos	31
III.3.3 Descarga y extracción de lecturas	31
III.3.4 Análisis posterior	32

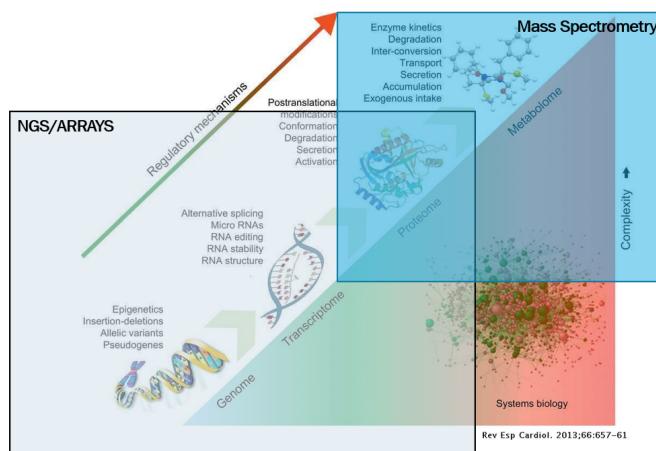
II Proteómica y Metabolómica	34
IV Introducción a la proteómica y la espectrometría de masas	35
IV.1 Introducción	35
IV.1.1 Análisis de proteínas por electroforesis	35
IV.2 Proteómica "Bottom-Up"	36
IV.2.1 Digestión tríptica	36
IV.2.2 Fraccionamiento para reducción de complejidad	36
IV.2.3 Cromatografía líquida y espectrometría de masas	36
IV.2.4 Adquisición de datos	37
IV.2.5 Identificación de péptidos y proteínas	38
IV.2.6 Aplicaciones de la proteómica "Bottom-Up"	39
IV.3 Proteómica "Top-Down"	39
V Identificación de péptidos mediante espectrometría de masas	42
V.1 Algoritmos de identificación de péptidos - Puntuaciones simples	43
V.1.1 Algoritmos empíricos de puntuación	43
V.1.2 Probabilidad en el emparejado	44
V.1.3 Probabilidad del candidato	44
V.2 Algoritmos de identificación de péptidos - Puntuaciones complejas y validación estadística	46
V.2.1 Validación mediante Posterior Error Probability (PEP)	46
V.2.2 Validación mediante conceptos estadísticos globales	47
V.2.3 Estrategia Target-Decoy para el cálculo de la FDR	49
V.2.4 Percolator y Aprendizaje Automático	50
V.2.5 Comparativa entre PEP y FDR	50
VI Cuantificación de proteínas	52
VI.1 Cuantificación con label-free	53
VI.1.1 Estrategia Match-Between-Runs	53
VI.2 Cuantificación con marcaje	53
VI.2.1 Cuantificación con SILAC	53
VI.2.2 Cuantificación con marcaje iTRAQ/TMT	54
VI.2.3 Cuantificación con péptidos sintéticos	54
VII Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	55
VII.1 Redundancia peptídica	55
VII.1.1 Agrupación de péptidos en proteínas: Grupos de proteínas	56
VII.1.2 Agrupamiento de proteínas en PAnalyzer	56
VII.2 Cálculo de la FDR de proteína a partir de sus péptidos	57
VII.2.1 Cálculo de la FDR a nivel de proteína usando la estrategia target-decoy	57
VII.2.2 Hinchamiento de la FDR a nivel de proteína	58
VII.3 Modificaciones posttraduccionales	58
VII.3.1 Modificaciones posttraduccionales más comunes	59
VII.3.2 Técnicas de detección de modificaciones posttraduccionales	60
VIII Metabolómica	61
VIII.1 Introducción a la metabolómica	61

VIII.2	Flujo de trabajo	62
VIII.2.1	Diseño experimental	62
VIII.2.2	Colección de muestras	62
VIII.2.3	Tratamiento de muestras	62
VIII.2.4	Análisis de las muestras	63
VIII.2.5	Tratamiento de datos	63
VIII.2.6	Ánalisis estadístico	64
VIII.2.7	Identificación de metabolitos	64
VIII.2.8	Hipótesis	64
VIII.2.9	Validación	64
VIII.3	Metabolómica dirigida	64
III	Regulación Genómica y Epigenómica	66
IX	Introducción y regulación genómica	67
IX.1	Avances impulsados por el Proyecto Genoma Humano	67
IX.2	Regulación genómica	67
IX.2.1	Estructura del ADN y elementos reguladores	68
IX.2.2	Predicción de genes y motivos de ADN	68
IX.2.3	Detección de enhancers	68
IX.2.4	Motivos de unión a factores de transcripción	69
IX.2.5	Descubrimiento de patrones	70
X	Epigenética	71
X.1	Mecanismos epigenéticos	71
X.1.1	Modificaciones de histonas	71
X.1.2	Cambios en la composición de histonas	73
X.2	Métodos de segmentación	73
X.2.1	Determinación de Estados de Cromatina a partir de Datos de ChIP-Seq	73
X.3	Epigenómica - Visualizador UCSC	75
X.3.1	Tracks epigenómicos	75
X.4	Mecanismos epigenéticos (continuación)	76
X.4.1	Metilación de citosinas	76

Capítulo I

Diseño experimental y principios estadísticos del análisis de datos ómicos

El transcriptoma permite estudiar cómo se expresan los ARNs, incluyendo tanto ARNs codificantes (como los ARNm) como no codificantes (como microARNs, ARN de transferencia, etc.). El proteoma se centra en el estudio de las proteínas, que son los productos funcionales de muchos ARNm. Finalmente, el metaboloma estudia los metabolitos, que son los productos finales de las reacciones bioquímicas en las células.



La genómica, transcriptómica y proteómica se pueden analizar utilizando tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) y microarrays. Sin embargo, la proteómica y la metabolómica también se estudian comúnmente con espectrometría de masas, una técnica que permite identificar y cuantificar moléculas basándose en su masa y carga. Aunque la espectrometría de masas ofrece un mayor detalle en la identificación de proteínas y metabolitos, la secuenciación es más escalable y se está popularizando, especialmente en estudios a gran escala. Dos empresas comerciales que permiten la secuenciación de proteínas son Olink y Somalogic.

I.1. Pipeline de un experimento ómico

El pipeline de un experimento ómico aplica tanto a la cuantificación de la expresión génica con NGS, como a la identificación de proteínas con espectrometría de masas o de metabolitos con espectrometría. El proceso generalmente sigue los siguientes pasos:

1. **Pregunta biológica:** Todo experimento ómico comienza con una pregunta biológica clara. Esta pregunta debe ser lo suficientemente específica para guiar el diseño experimental y la elección de la plataforma tecnológica. Por ejemplo, si la pregunta es sobre la expresión génica en una cohorte grande de pacientes, la secuenciación de ARN (RNA-seq) podría ser la opción más adecuada.
2. **Elección de la plataforma tecnológica:** La elección de la tecnología (NGS, espectrometría de masas, microarrays, etc.) debe basarse en la pregunta biológica y no al revés. Por ejemplo, si se busca un alto rendimiento y escalabilidad, la secuenciación podría ser preferible sobre la espectrometría de masas.
3. **Diseño experimental:** Es crucial diseñar el experimento de manera que se minimice el sesgo y se maximice la reproducibilidad. Esto incluye la selección adecuada de controles, la replicación biológica y técnica, y la consideración de factores de confusión.
4. **Adquisición de datos:** Una vez diseñado el experimento, se procede a la recolección de datos. Esto puede implicar la secuenciación de ARN, la identificación de proteínas por espectrometría de masas, o la cuantificación de metabolitos.
5. **Preprocesamiento de datos:** Los datos crudos suelen requerir un preprocesamiento que incluye la corrección de errores, la normalización y la eliminación de ruido. Este paso es crucial para asegurar que los datos sean de alta calidad antes de proceder al análisis.
6. **Análisis de datos:** El análisis de datos en estudios ómicos generalmente incluye:
 - **Identificación de genes diferencialmente expresados:** Esto implica comparar los niveles de expresión génica entre diferentes condiciones (por ejemplo, tejido sano vs. tejido enfermo) para identificar genes que están regulados al alza o a la baja.
 - **Análisis de clusters:** Este método agrupa genes o muestras con patrones de expresión similares, lo que puede ayudar a identificar subtipos de enfermedades o vías biológicas relevantes.
 - **Ingeniería reversa de redes génicas:** Este enfoque intenta reconstruir las redes de regulación génica a partir de los datos de expresión, lo que puede proporcionar insights sobre cómo los genes interactúan entre sí.
7. **Estandarización y almacenamiento de datos:** Los datos deben ser estandarizados y almacenados en bases de datos públicas o privadas para su posterior acceso y análisis. Una base de datos importante es el *Gene Expression Omnibus (GEO)*, que alberga datos de expresión génica de diversos organismos y condiciones experimentales.

8. **Integración e interpretación biológica:** Finalmente, los datos se integran con información biológica adicional (como anotaciones funcionales, interacciones proteína-proteína, etc.) para interpretar los resultados en un contexto biológico más amplio. Esto puede llevar a la identificación de biomarcadores, dianas terapéuticas o mecanismos moleculares subyacentes a una enfermedad.

I.2. Diseño experimental

El diseño experimental es esencial en estudios ómicos debido al alto coste de los experimentos. El objetivo es minimizar el coste y maximizar la información obtenida. Para lograrlo, hay dos aspectos clave:

1. **Pregunta biológica:** Es imprescindible tener una pregunta biológica clara y específica. Esto determina si el enfoque es *data-driven* (exploratorio) o *hypothesis-driven* (basado en hipótesis).
2. **Conocimiento de la tecnología:** Es crucial entender las limitaciones y capacidades de la tecnología utilizada. Esto incluye la precisión de las mediciones, la replicación y la identificación de variables que pueden introducir sesgos o variabilidad técnica.

En un experimento, hay dos tipos de errores:

- **Errores aleatorios:** No son predecibles, pero se pueden minimizar mediante la repetición de las mediciones.
- **Errores sistemáticos:** Son predecibles y se pueden eliminar mediante la normalización o calibración de los datos.

Los principios para minimizar errores son:

1. **Replicación:** Incluye réplicas técnicas (para minimizar errores aleatorios) y réplicas biológicas (para asegurar que los resultados sean extrapolables a la población). La distinción entre réplicas biológicas y técnicas depende de qué fuentes de variación se estudien o, alternativamente, se consideren fuentes de ruido. Existen las réplicas técnicas, las cuales minimizan los errores aleatorios mediante el promedio y ayudan a testar la tecnología, y réplicas biológicas, que permiten sacar conclusiones extrapolables a la población completa y no solo del individuo, además de poder controlar la variabilidad en diferentes pasos experimentales.
2. **Randomización:** Asegura que las muestras sean representativas de la población.
3. **Blocking:** Reduce fuentes conocidas de variación que no son relevantes para la pregunta biológica.

1.2.1. Ejemplo de diseño experimental

Supongamos que se mide la expresión de un gen en células de hígado de ratón, pudiendo realizar solo 48 mediciones. Se pueden considerar tres fuentes de variabilidad:

- **Replicación biológica:** se utilizan varios ratones, habiendo variabilidad entre los diferentes animales.
- **Replicación entre biológica y técnica:** se escogen varias células de cada rata.
- **Replicación técnica:** se realizan varias mediciones de cada célula. Las distintas mediciones de una misma célula deberían ser similares.

Si se realiza la media de los tres ratones, la medida va a ser muy variable en relación con una sola medida, pero esto sirve para el test estadístico, ya que son medidas independientes. En caso de tener medidas dependientes, no se puede utilizar la variabilidad para estudiar la significancia, ya que son medidas repetidas.

Como en este modelo propuesto hay que cuantificar la variabilidad, se pueden realizar simulaciones para determinar el número óptimo de réplicas biológicas y técnicas para minimizar la variabilidad y maximizar la precisión.

We measure the expression of a specific gene in liver cells in mice, $X=12$

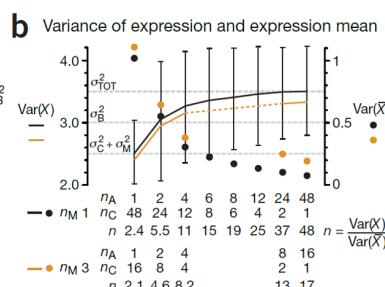
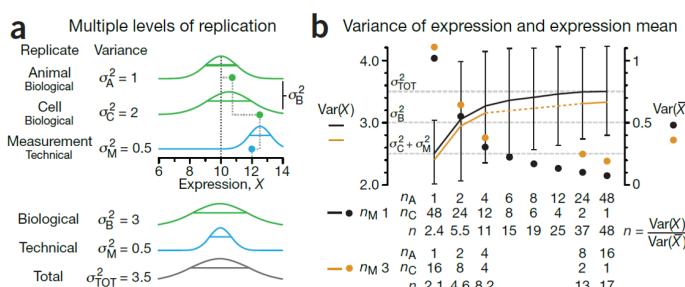


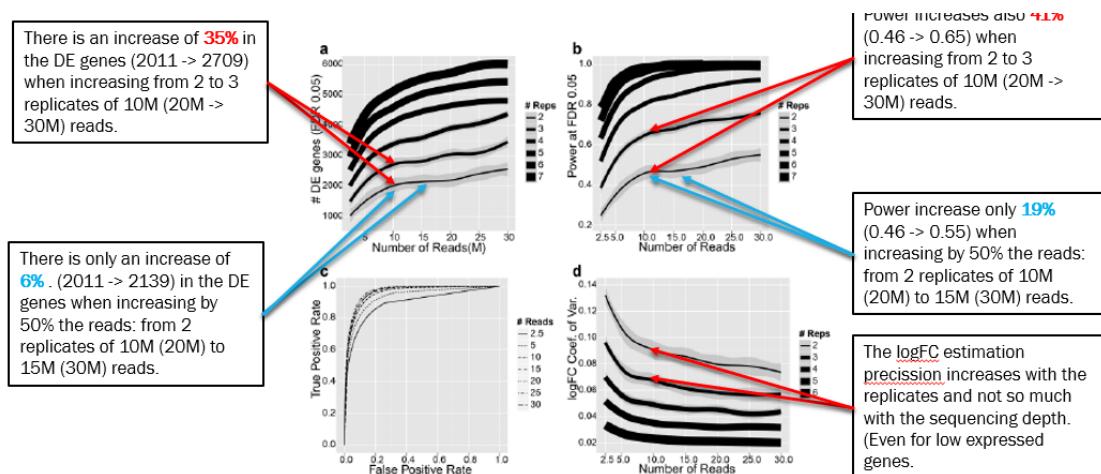
Figure 1 | Replicates do not contribute equally and independently to the measured variability, which can often underestimate the total variability in the system. (a) Three levels of replication (two biological, one technical) with animal, cell and measurement replicates normally distributed with a mean across animals of 10 and ratio of variances 1:2:0.5. Solid green (biological) and blue (technical) dots show how a measurement of the expression ($X = 12$) samples from all three sources of variation. Distribution s.d. is shown as horizontal lines. (b) Expression variance, $Var(X)$, and variance of expression mean, $Var(\bar{X})$, computed across 10,000 simulations of $n_A n_C n_M = 48$ measurements for unique combinations of the number of animals ($n_A = 1$ to 48), cells per animal ($n_C = 1$ to 48) and technical replicate measurements per cell ($n_M = 1$ and 3). The ratio of $Var(X)$ and $Var(\bar{X})$ is the effective sample size, n , which corresponds to the equivalent number of statistically independent measurements. Horizontal dashed lines correspond to biological and total variation. Error bars on $Var(X)$ show s.d. from the 10,000 simulated samples ($n_H = 1$).

En este experimento de ómicas, la expresión de un gen de células de hígado de ratón se cuantifica en 12. Las tres fuentes de variabilidad (animal, célula y medición) suman un 3,5. Las normales están centradas en 10, ya que las medidas están saliendo en ese valor, no en 12. Hay más variabilidad biológica que técnica, transformando las gaussianas en una campana más aplastada. Se realizaron simulaciones cambiando el número de animales, el número de células y el número de réplicas técnicas. Se hacen 10.000 asignaciones, para que se agrupen de forma diferente las combinaciones del número total (48 animales, 1 sola célula; 24 animales, 2 células; ...; 1 animal, 48 células). Sabiendo la cantidad de animales, células y mediciones, se puede sacar el tamaño muestral real del experimento, permitiendo calcular así la diferencia entre la variabilidad experimental y la variabilidad real. En ómicas, somos poco capaces de estimar la variabilidad, ya que en general hay pocas réplicas. Si esto después de meter en un t-test, y la variabilidad es muy pequeña (o incluso 0), entonces el resultado es muy grande, teniendo un p muy pequeño, rechazando la hipótesis nula de que no hay diferencia en la expresión.

Para tecnologías ómicas, se deben incluir al menos 3 réplicas biológicas. Todo esto es para la experimentación con animales. En caso de experimentación en humanos, la variabilidad es gigante.

I.2.2. Rélicas vs profundidad

Cuando comenzó la secuenciación, cuanto más se secuencie, más caro es el experimento. Por tanto, ¿es mejor más réplicas a menos profundidad, o menos réplicas a más profundidad? Hubo varios estudios con muchas simulaciones que vieron que lo importante era la secuenciación con réplica biológica. El número de lecturas tiene algo de relevancia, pero llegados a un número, no compensa a hacer mucha más secuenciación porque se llega a un plateau en cuanto a genes diferencialmente expresados. Las métricas aumentan más teniendo varias réplicas biológicas que teniendo varias lecturas.

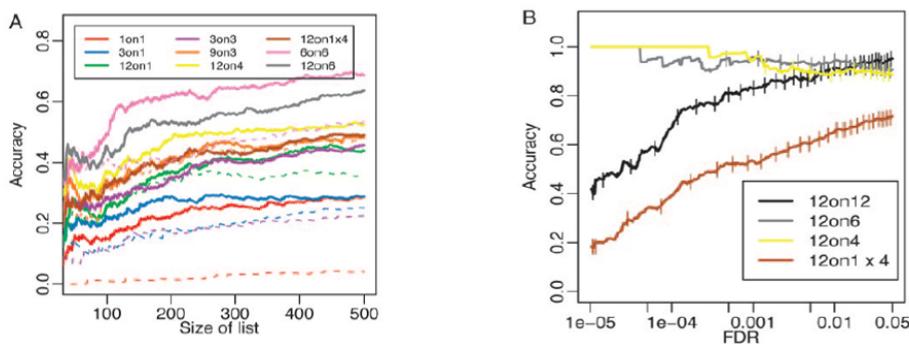


I.2.3. Pooling, batch y blocking

En el contexto de los experimentos ómicos, el **pooling** es una estrategia que consiste en combinar (o "agrupar") múltiples muestras biológicas en una sola muestra antes de realizar el análisis. Esta técnica se utiliza principalmente para reducir costes y simplificar el procesamiento de muestras, especialmente cuando se trabaja con un gran número de individuos o cuando los recursos económicos son limitados. En lugar de analizar cada muestra individualmente, se mezclan varias muestras en una sola. Por ejemplo, si tienes 12 muestras de ARN de diferentes individuos, podrías combinarlas en 3 grupos (pools) de 4 muestras cada uno. Una vez combinadas, las muestras agrupadas se procesan y analizan como una sola. Esto significa que, en lugar de obtener datos individuales para cada muestra, obtienes un resultado promedio para cada pool. En el caso de muestras humanas no se hace porque se pierde información individual fenotípica y genotípica, pero en animales sí puede ser una buena idea si las características específicas por especimen (sexo, camada, edad, etc.) no son relevantes para el experimento. Lo mejor es tener cuantas más réplicas independientes posibles.

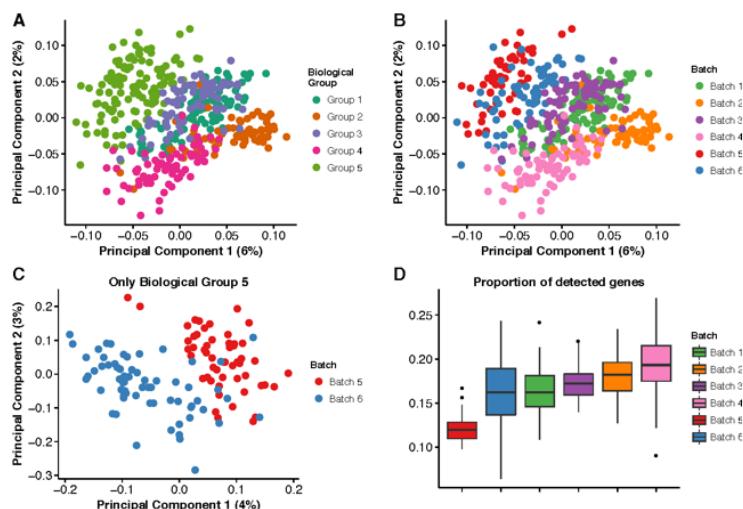
Algunos pasos en los que se introduce variabilidad en NGS son:

- Técnica: extracción del ARN, preparación de la librería, flow-cell, barcode, científico
- Biológica: sexo, camada/familia, edad

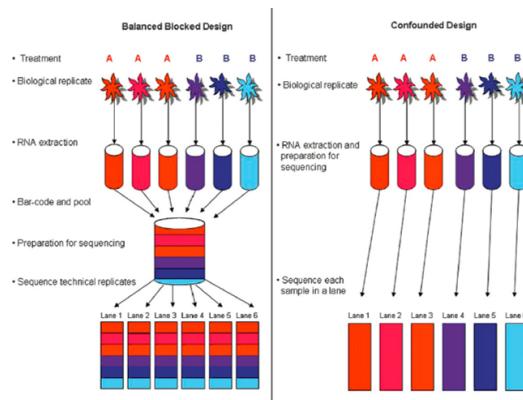


Además, hay sesgos sistemáticos y ruido por errores aleatorios.

!!!!!! Cuando los experimentos se realizan en varias tandas (por ejemplo, por ser estudios muy grandes con muchas muestras), es crucial controlar el **efecto de batch** para evitar sesgos técnicos. Esto se puede lograr mediante la randomización de muestras entre batches y el uso de modelos estadísticos mixtos. Nunca hay que confundir el batch con el grupo biológico relevante, ya que es imposible ver si las diferencias son debidas al grupo biológico o a la variabilidad técnica. Cuando hay condiciones biológicas muy fuertes, a veces no se ven, pero si se hacen todas las muestras de una condición en un mismo batch, probablemente se estén magnificando las diferencias observadas. Por tanto, no hay que medir las distintas condiciones biológicas en batches distintos, si no mezclar en un batch muestras de distintas condiciones biológicas para poder utilizar la variable batch en el modelo estadístico mixto, normalizando por las diferencias entre los batches.



El **blocking** reduce fuentes conocidas e irrelevantes de variación entre unidades, permitiendo una precisión mayor en la estimación de las fuentes de variación estudiadas. Minimiza el efecto de variables de tipo biológico o técnico, que no son relevantes para la pregunta biológica. Una forma de hacer blocking secuenciando es metiendo adaptadores para hacer un barcoding de cada muestra, preparar la librería con todo junto y crear, de esa muestra, las distintas alícuotas a secuenciar. De esta forma se reduce el efecto de línea.



I.2.4. Diseño experimental - Ejercicios

I.2.4.1. Ejercicio de animales

Tenemos un ratón knock-out en la proteína Bmi1. Para cada camada tenemos varios ratones WT y KO. Queremos encontrar metabolitos cuya expresión cambie significativamente entre condiciones. Disponemos de 6 camadas con el siguiente número de animales:

Camada	KO	WT
L1	1	2
L2	2	2
L3	1	1
L4	1	3
L5	2	3
L6	3	2

- Caso 1: No hay limitación económica:** se secuencia todo, ya que cuantas más muestras independientes, mejor.
- Caso 2: Se pueden secuenciar un máximo de 6 muestras:** De las 6 camadas se escogen aleatoriamente 3, de las cuales escoger un ratón KO y uno WT. Otra opción es coger las camadas 2 y 3 y secuenciar todos esos individuos. En este caso, como las camadas tienen efecto, se podría elegir un individuo de cada camada y hacer pool de 2 en 2.
- Caso 3: L5 no tiene ningún animal KO y seguimos con el máximo de 6 muestras:** L5 no se tendría en cuenta porque podría introducir sesgos (quizás el KO no ha salido, o quizás no es viable), y del resto de camadas se escogen 3 camadas al azar para seleccionar un ratón de cada condición. Esto se debe a que no se podría comparar el pool entre la misma camada con pool entre distintas camadas.
- Caso 4: máximo de 6 muestras si no hay efecto de la camada:** se mezclan todos los ratones de las distintas camadas, separando por condición biológica, y se sacan 3 de cada uno al azar. Se podrían coger 12 y 12 y pools de 4, o 6 y 6 y pools de 2.

I.2.4.2. Ejercicio de humanos

Tenemos una cohorte de 100 muestras humanas con diabetes. Queremos probar en ellas un fármaco y ver sus efectos en la expresión génica. Podemos secuenciar un total de 40 muestras. Por estudios piloto sabemos que el sexo y el IMC afectan al impacto del fármaco. La composición de la cohorte es la siguiente: Además, no podemos procesar

	Hombres	Mujeres
IMC alto	40	20
IMC bajo	20	20

todas las muestras juntas, tenemos que hacerlo en dos ejecuciones.

- **Q1: ¿Cómo se asignan los pacientes a los grupos fármaco y placebo?**
Se escogen 5 personas de cada condición (sexo y BMI) para fármaco y otros 5 para placebo.
- **Q2: ¿Qué pacientes se secuenciarían en cada turno?** Se cogen ordenadamente una muestra de cada grupo y condición.

I.3. Consideraciones estadísticas para datos ómicos

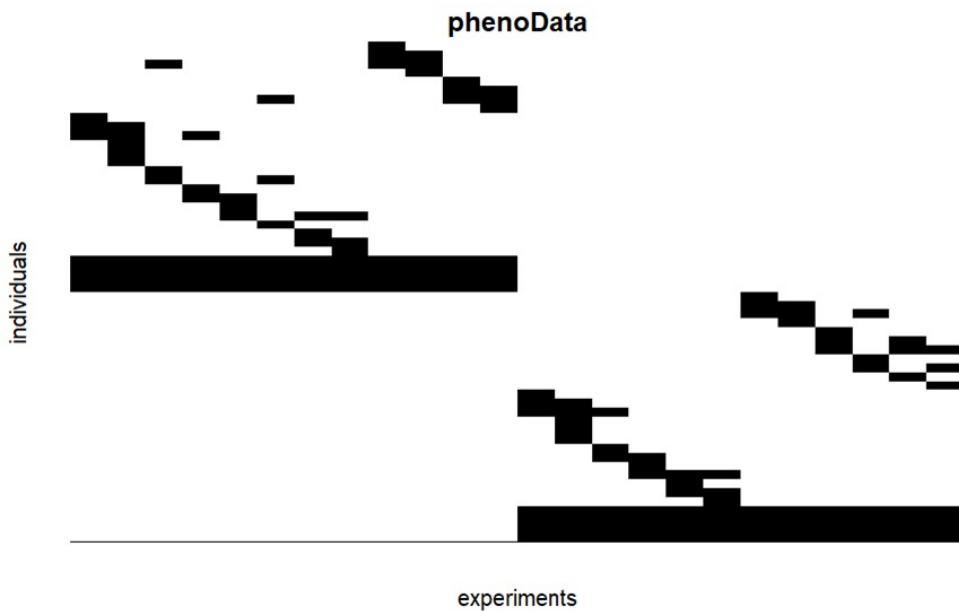
I.3.1. Ejemplo - Statistics for Omics

En este ejemplo, se utilizan datos del paquete de R maPooling, que contiene información sobre la expresión génica en dos condiciones (por ejemplo, wild-type vs. knock-out) y diferentes animales de cada condición. La matriz de diseño indica qué ratones (columna) están incluidos en cada muestra (fila), con un 1 para los ratones incluidos y un 0 para los excluidos. Por ejemplo, a3tr1 representa una réplica técnica del ratón 3 de la condición a, y aq es un pool de todos los ratones de la condición a.

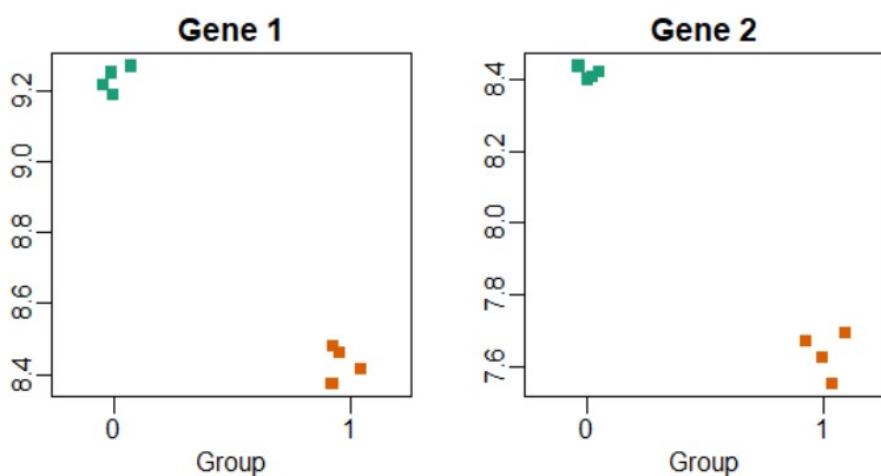
El siguiente código muestra qué ratones están incluidos en cada muestra:

```
# r
library(rafalib)
mypar()
flipt <- function(m) t(m[nrow(m):1,])
myimage <- function(m,...) {
  image(flipt(m),xaxt="n",yaxt="n",...)
}
myimage(as.matrix(pData(maPooling)),col=c("white","black"),
       xlab="experiments",
       ylab="individuals",
       main="phenoData")
```

El objetivo es identificar diferencias en la expresión génica entre las condiciones a y b. Para ilustrar esto, se examinan dos genes específicos:



```
# r
###look at 2 pre-selected genes for illustration
i=11425;j=11878
pooled_y=exprs(maPooling[,pooled])
pooled_g=factor(as.numeric(grep("b",names(pooled))))
mypar(1,2)
stripchart(split(pooled_y[i,],pooled_g),vertical=TRUE,method="jitter",col=c(1,2),
          main="Gene 1",xlab="Group",pch=15)
stripchart(split(pooled_y[j,],pooled_g),vertical=TRUE,method="jitter",col=c(1,2),
          main="Gene 2",xlab="Group",pch=15)
```



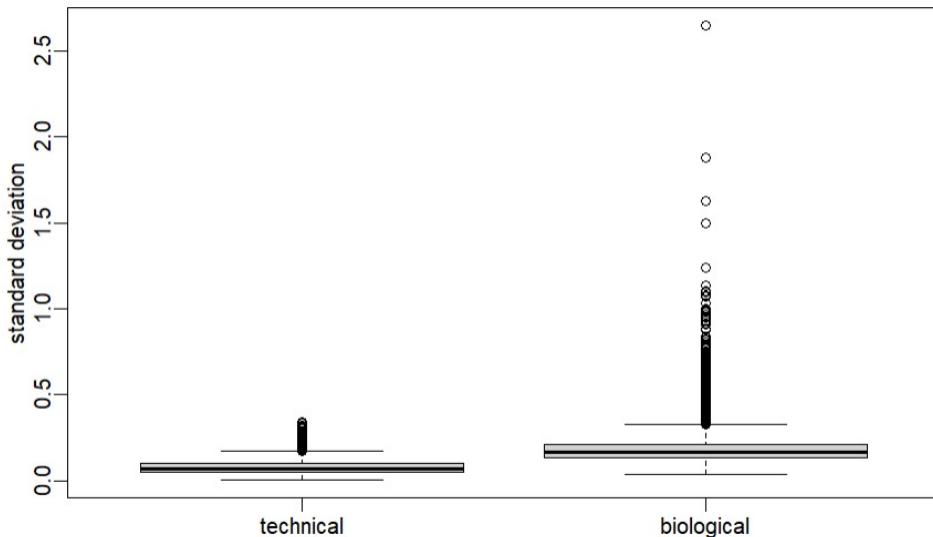
Se realiza un test estadístico (t-test) para evaluar si las diferencias en la expresión génica son significativas. Los p-valores obtenidos son muy bajos, del orden de 10^{-7} :

```
# r
library(genefilter)
pooled_tt=rowttests(pooled_y,pooled_g)
```

```
pooled_tt$p.value[i]
pooled_tt$p.value[j]
```

Para obtener la variabilidad biológica, se eliminan las réplicas técnicas y se calcula la desviación estándar de las réplicas biológicas:

```
# r
technicalsd <- rowSds(pooled_y[,pooled_g==0])
biologicalsd <- rowSds(y[,g==0])
LIM=range(c(technicalsd,biologicalsd))
mypar(1,1)
boxplot(technicalsd,biologicalsd,names=c("technical","biological"),ylab="standard
deviation")
```

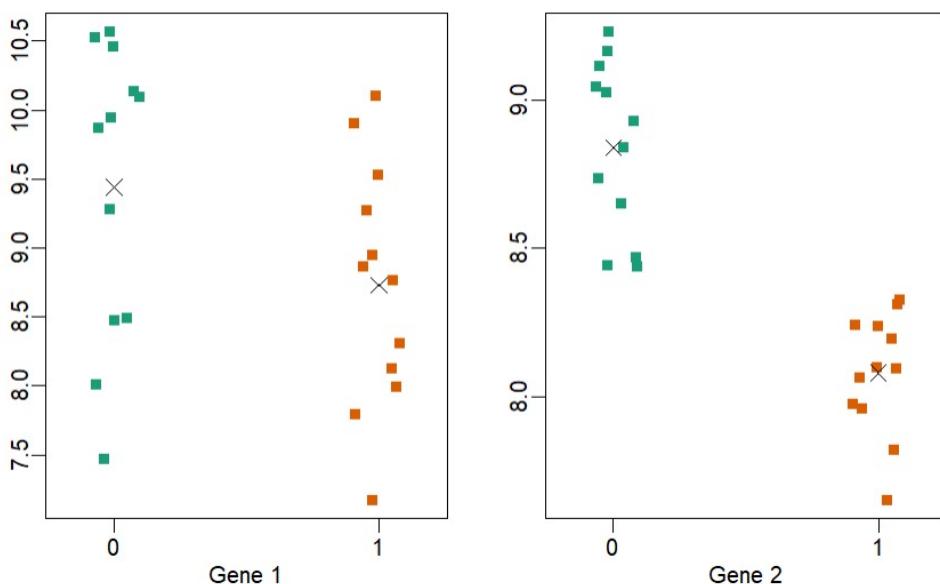


Se observa que la variabilidad biológica es mucho mayor que la variabilidad técnica. Además, la variabilidad de las varianzas también es mayor para la variabilidad biológica. A continuación, se muestran los valores de expresión de los dos genes en cada ratón individual:

```
# r
mypar(1,2)
stripchart(split(y[i,],g),vertical=TRUE,method="jitter",col=c(1,2),xlab="Gene
1",pch=15)
points(c(1,2),tapply(y[i,],g,mean),pch=4,cex=1.5)
stripchart(split(y[j,],g),vertical=TRUE,method="jitter",col=c(1,2),xlab="Gene
2",pch=15)
points(c(1,2),tapply(y[j,],g,mean),pch=4,cex=1.5)
```

Al volver a calcular el t-test, se observa que el gen 1 no es significativo, mientras que el gen 2 sí lo es:

```
# r
library(genefilter)
```



```
tt=rowttests(y,g)
tt$p.value[i]
tt$p.value[j]
```

I.3.2. Estadística en datos ómicos

En experimentos con animales, el número mínimo recomendado de réplicas biológicas independientes es 3, que pueden incluir pooling (combinación de muestras). Sin embargo, en humanos, la variabilidad es mucho mayor, y el pooling no es recomendable debido a la pérdida de información individual.

Los experimentos ómicos se caracterizan por tener una **matriz "skinny"**, es decir, muchas filas (genes, proteínas, metabolitos) y pocas columnas (muestras). Esto se conoce como la **maldición de la dimensionalidad** ("curse of dimensionality"). Aunque no es "Big Data" en el sentido estricto (ya que no hay muchas muestras), tener tantas características (filas) presenta desafíos estadísticos.

I.3.2.1. Problemas con la estimación de la variabilidad

Con pocas réplicas, la estimación de la variabilidad es imprecisa. En un t-test, se compara la diferencia de medias entre dos grupos en relación con la variabilidad dentro de cada grupo. Si la variabilidad se subestima, el t-test puede dar resultados falsamente significativos.

Para abordar este problema, se utiliza información de todo el experimento para estimar mejor la variabilidad. Esto se conoce como **moderación de la variabilidad o shrinkage**. La idea es "regularizar" la variabilidad utilizando la distribución de las desviaciones estándar de todos los genes. Por ejemplo:

- **Cálculo de la mediana:** Se calcula la mediana de todas las desviaciones estándar y se añade un offset (s_0) a la estimación de la variabilidad de cada gen. Esto evita que valores extremadamente bajos de variabilidad (debidos al azar) dominen los resultados.
- **Uso del percentil 90:** En lugar de la mediana, se puede usar el percentil 90 de las desviaciones estándar para obtener estimaciones más conservadoras. Esto es útil porque los genes con variabilidades muy altas probablemente no sean reales. Y en ómicas, lo más importante es que lo que se estudie sea real.

Este enfoque se implementa en métodos como el **t-test moderado** (por ejemplo, en el paquete limma de R), que ajusta las estimaciones de variabilidad para hacerlas más robustas.

El shrinkage es una técnica estadística que "contrae" las estimaciones de variabilidad hacia un valor central (como la mediana o el percentil 90). Esto ayuda a evitar sobreajustes y a obtener resultados más confiables en experimentos con pocas réplicas.

I.3.2.2. Problema de la no normalidad de los datos ómicos

Los datos ómicos (como los de expresión génica) a menudo no siguen una distribución normal, lo que puede complicar su análisis estadístico. Para abordar este problema, se utilizan técnicas de **transformación** y **normalización** de los datos, que permiten que estos se ajusten mejor a los supuestos de los tests estadísticos. Estas transformaciones pueden ser de dos tipos:

- **Normalizaciones interpretables:** Aquellas que buscan que los datos tengan un significado biológico claro.
- **Normalizaciones estadísticas:** Aquellas que buscan estabilizar la varianza o cumplir con los supuestos de los tests estadísticos.

Estabilización de la varianza Uno de los principales problemas en los datos ómicos es que la **variabilidad** no es constante en todos los niveles de expresión. En general, los genes poco expresados tienden a tener una variabilidad mucho mayor que los genes muy expresados. Esto puede sesgar los resultados de los tests estadísticos, ya que estos asumen que la varianza es homogénea.

Para solucionar este problema, se utiliza la estabilización de la varianza. Una herramienta común para esto es voom, que es parte del paquete limma en R. Voom transforma los datos de conteo de secuenciación (como los de RNA-seq) para estabilizar la varianza y hacer que los datos sean más adecuados para análisis estadísticos basados en modelos lineales.

Normalización por longitud del gen y tamaño de la librería En los datos de secuenciación (por ejemplo, RNA-seq), hay dos factores importantes que deben tenerse en cuenta al comparar la expresión génica:

- **Longitud del gen:** Los genes más largos tienden a tener más lecturas (reads) simplemente porque hay más regiones donde las lecturas pueden alinearse. Para comparar la expresión entre genes de diferentes longitudes, es necesario normalizar por la longitud del gen. Esto se hace típicamente mediante métricas como FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) o TPM (Transcripts Per Million).
- **Tamaño de la librería:** El número total de lecturas en una muestra (tamaño de la librería) puede variar entre condiciones experimentales. Si no se normaliza por el tamaño de la librería, las diferencias en la expresión génica podrían deberse simplemente a que una muestra tuvo más lecturas en general, en lugar de a cambios biológicos reales. Métricas como CPM (Counts Per Million) ayudan a corregir esto.

Cuando se comparan las mismas condiciones entre sí, la longitud del gen no es un problema (ya que es constante), pero el tamaño de la librería sí puede afectar los resultados y debe ser normalizado.

I.3.2.3. Problema de hipótesis múltiples

En los experimentos ómicos, se realizan miles de tests estadísticos simultáneamente (uno por cada gen, proteína o metabolito). Esto da lugar al problema de las comparaciones múltiples, que aumenta la probabilidad de obtener falsos positivos (es decir, rechazar la hipótesis nula cuando en realidad es verdadera).

Hipótesis nula La hipótesis nula en este contexto es que no hay diferencia en la expresión de un gen entre las condiciones comparadas. Sin embargo, debido al gran número de tests realizados, es probable que algunos genes aparezcan como diferencialmente expresados simplemente por azar.

Para controlar el número de falsos positivos, se utilizan métodos de corrección de múltiples comparaciones. Algunos de los más comunes son:

- **Corrección de Bonferroni:** Ajusta el nivel de significancia (α) dividiéndolo por el número total de tests realizados. Es muy conservadora y puede reducir demasiado la potencia estadística.
- **Control de la tasa de descubrimiento falso (FDR):** Controla la proporción esperada de falsos positivos entre los resultados significativos. Es menos conservadora que Bonferroni y se utiliza ampliamente en análisis ómicos. Solo se permite un 5 % de errores entre los genes que se seleccionan como diferencialmente expresados.
- **Valores q:** Son una versión ajustada de los p-valores que tienen en cuenta la corrección por múltiples comparaciones. Un valor $q < 0.05$ indica que se espera que menos del 5 % de los resultados significativos sean falsos positivos.

I.3.2.4. Tamaño del efecto vs significancia

En el análisis de datos ómicos, es crucial diferenciar entre la significancia estadística y la importancia biológica de los cambios observados. Mientras que la significancia estadística nos dice si un resultado es probablemente real (es decir, no debido al azar), el tamaño del efecto nos indica cuán grande o relevante es ese cambio biológicamente.

Tamaño del efecto: $\log_2(FC)$ El tamaño del efecto se mide comúnmente como el logaritmo en base 2 del cambio en la expresión ($\log_2(FC)$), donde FC es el "fold change" o cambio en la expresión). Este valor indica cuánto ha aumentado o disminuido la expresión de un gen entre dos condiciones. Por ejemplo:

- Un $\log_2(FC) = 1$ significa que la expresión del gen se ha duplicado.
- Un $\log_2(FC) = -1$ significa que la expresión del gen se ha reducido a la mitad.

Los datos suelen transformarse a \log_2 por dos razones principales:

- **Normalización:** La transformación logarítmica ayuda a estabilizar la varianza y hace que los datos se ajusten mejor a los supuestos de los tests estadísticos.
- **Interpretabilidad:** Los valores en \log_2 son más fáciles de interpretar, ya que los cambios se expresan en términos de duplicaciones o reducciones a la mitad.

Importancia del $\log_2(FC)$ En cualquier experimento, es esencial examinar tanto el p-valor ajustado (que indica significancia estadística) como el $\log_2(FC)$ (que indica el tamaño del efecto). Sin embargo, el umbral para considerar un $\log_2(FC)$ como biológicamente relevante puede variar dependiendo del contexto experimental. Por ejemplo:

- En algunos casos, un $\log_2(FC)$ pequeño (por ejemplo, 0.5) puede ser biológicamente relevante si afecta a genes clave en una vía importante.
- En otros casos, solo cambios grandes (por ejemplo, $\log_2(FC) > 1$) pueden considerarse relevantes.

Dependiendo del experimento, puede ser o no interesante filtrar los resultados por el $\log_2(FC)$:

- **Interpretación individual de genes:** Si el objetivo es identificar genes individuales con cambios grandes en la expresión, es útil filtrar por $\log_2(FC)$. Por ejemplo, se podría considerar solo aquellos genes con $|\log_2(FC)| > 1$.
- **Interpretación de grupos de genes:** Si el objetivo es analizar vías o grupos de genes (por ejemplo, mediante análisis de enriquecimiento funcional), puede no ser necesario filtrar por $\log_2(FC)$. En este caso, incluso cambios pequeños en múltiples genes de una misma vía pueden ser biológicamente relevantes.

I.3.3. Continuación ejemplo - Statistics for Omics

Generamos nuestra propia distribución nula. Se asigna aleatoriamente 0 y 1 a cada una de las columnas. Para esta nueva expresión barajada, se realiza el t-test para ver cuántos salen diferencialmente expresados.

```
# r
set.seed(0)
shuffledIndex <- factor(sample(c(0,1), sum(g==0), replace=TRUE ))
nulltt <- rowttests(y[,g==0], shuffledIndex)
NfalselySigAt01 = sum(nulltt$p.value<0.01)
NfalselySigAt01 #11
NfalselySigAt05 = sum(nulltt$p.value<0.05)
NfalselySigAt05 #201 falsamente significativos
```

En lugar del p-valor, vamos a calcular el q-valor, y comprobamos que efectivamente no sale ningún gen significativo.

```
# r
library(qvalue)
nullqvals = qvalue(nulltt$p.value)$qvalue
sum(nullqvals<0.05) #0
sum(nullqvals<0.01) #0
```

I.3.4. Ejemplo inferencia

Este ejemplo se basa en el paper "A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes". Script en carpeta de prácticas de la asignatura. En el CSV mice_pheno se muestra el sexo, dieta y peso de los ratones. El experimento está bastante equilibrado: 225 hembras con dieta control, 200 hembras con dieta grasa, 224 machos con dieta control y 197 machos con dieta grasa.

Hay varias representaciones. Entre ellas, el barplot es una figura muy poco explicativa. El boxplot es algo más indicativo, mostrando que hay poca diferencia entre los dos grupos de dietas al cruzarse las barras de error.

Como los ratones machos suelen ser más grandes (y por tanto, más pesados) que las ratonas hembra, solo seleccionamos a las últimas. Tras volver a hacer el boxplot, vemos que las medias no están tan desencaminadas, pero la variabilidad es mucho más grande que con toda la población. A continuación se muestran 12 ratones con dieta control y 12 ratones con dieta alta en grasas de la población total.

Se realiza lo mismo para 1000 muestras y se simula la distribución con 5 réplicas en lugar de 12, siendo el resultado una distribución más amplia (hay más variabilidad si se tienen menos réplicas).

En ómicas, como hay muchos datos, se puede simular cómo sería la distribución nula y comparar si hay una diferencia real entre los grupos.

Parte I

Transcriptómica

Capítulo II

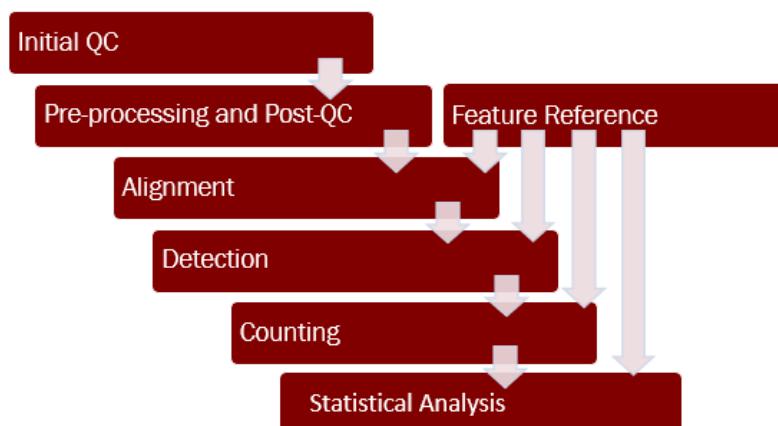
RNA-Seq

II.1. Pipeline general y alineadores

En este curso nos centraremos en los NGS de lectura corta (segunda generación). Para transcriptómica, se secuencia el cDNA generado a partir del ARNm. Este cDNA se fragmenta y se secuencia en reads cortos. Las máquinas y la forma de secuenciar es la misma que aquella vista en la asignatura "Fundamentos de Secuenciación".

Las lecturas pueden ser solo de la primera parte del fragmento (single-reads) o lecturas pareadas para tener una mayor precisión en el alineamiento. Del secuenciador sale un fichero FastQ, el cual se alinea con un genoma de referencia en FastA. Una vez con los alineamientos, se pueden mirar las regiones con reads mapeadas que estén en el transcriptoma de referencia (GTF/GFF) y cuantificar la expresión (matriz de conteo en CSV/TSV).

En general, el workflow es el siguiente: descargar datos, QC inicial, pre-procesamiento y QC posterior, alineamiento a una referencia, detección, conteo y análisis estadístico. En transcriptómica, se quiere cuantificar la expresión de las partes del genoma que se transcriben. Por ello, se necesita un genoma de referencia, pero también otro archivo GTF que relacione los exones con los tránscritos y los genes. El contejo por detección es el que se hace con CHIP-Seq, al secuenciar la parte del ADN genómico a la que se ha pegado un factor de transcripción predefinido.



II.1.1. Control de calidad inicial

Los objetivos del control de calidad de las lecturas crudas es detectar problemas de secuenciación, detectar adaptadores y comparar librerías para análisis posteriores. Distintos experimentos requieren interpretaciones distintas del análisis de control de calidad. Una herramienta muy utilizada para esto es FastQC. El análisis de la calidad por base, representa la distribución de las puntuaciones de calidad en todas las lecturas por la posición de cada lectura. En general, es normal que las últimas posiciones tengan una calidad algo peor que las demás, pero una buena muestra debe seguir teniendo una calidad alta. Si una muestra no tiene gran calidad, se puede optar por utilizar solo aquella porción de las muestras que tienen una calidad aceptable, pero hay que tener en cuenta que al acortar las lecturas, el mapeado puede darse en un mayor número de sitios. También se mide el contenido de cada base por posición (que debería ser bastante constante a lo largo de toda la lectura dependiendo de la "complejidad de la muestra", es decir, variedad de tránscritos diferentes) y la puntuación de calidad media por secuencia. La pipeline para el ARNm y los miRNA es la misma, pero hay peculiaridades. Los microARNs son ARNs de unos 20-30 nucleótidos que reprimen la expresión génica de los genes a los que se unen. Dado el bajo número de miRNAs codificados por el genoma y el más reducido número expresado en cada tejido es de esperar ver perfiles de baja complejidad en las librerías de miRNAs, dándose así un patrón irregular del contenido de bases por posición.

Las secuencias sobrerepresentadas son listas de secuencias que están presentes más veces de lo esperado por azar. La lista sobrerepresentada se anota con el tipo de secuencia si se proporciona una lista con la que comparar. Normalmente, las secuencias adaptadoras pueden estar sobrerepresentadas si hay altos niveles de ligaciones de dímeros de cebadores en el paso de preparación de la biblioteca. A menudo se debe a un desequilibrio entre los niveles de adaptadores y los niveles de fragmentos de muestra. Algunos RNA-Seq de tejidos particulares pueden dar también secuencias sobrerepresentadas. Por ejemplo, las muestras de sangre contienen grandes cantidades de transcritos de hemoglobina que siempre se reportan como lecturas sobrerepresentadas. Las muestras de miARN siempre muestran secuencias sobrerepresentadas. Las bibliotecas de ARN total muestran secuencias sobrerepresentadas de ARN ribosómicos.

II.1.2. Preprocesado

El preprocesado tiene como objetivo mejorar la calidad, la mapeabilidad, quitar contaminantes y sesgos, etc. Hay diferentes herramientas, como cutadapt o trim-galore.

La calidad de las bases puede afectar al análisis de llamadas de variantes y, si es grave, también al mapeo de características. La calidad de las bases suele disminuir al final de la lectura y a veces al principio. Además, la secuenciación de baja calidad puede producir un grupo de lecturas de baja calidad a lo largo de su longitud. Es esencial eliminar las bases de baja calidad para el análisis de llamada de variantes. Para otros análisis, elimínalas sólo si afecta al rendimiento del mapeo.

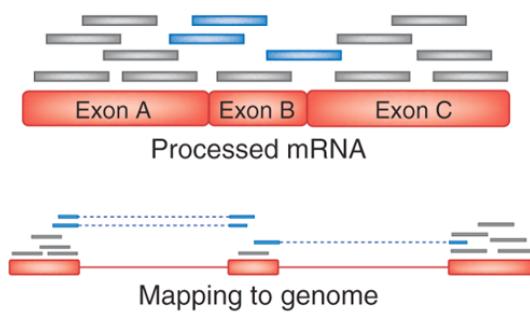
II.1.3. Alineamiento y mapeado

Hay dos tipos de alineamientos: local y global. En el caso del local, se busca que en partes específicas el alineamiento sea bueno, mientras que en el global se busca meter la lectura en la secuencia completa, metiendo gaps.

La cobertura en un segmento se mide como el número de reads que mapean a ese fragmento del genoma y la longitud de cada lectura dividido por la longitud del fragmento. Para poder hacer el mapeado se necesita la referencia en fasta, las reads en fastq y una referencia indexada. Esto es distinto de los alineadores tradicionales como BLAST. El objetivo es mapear las lecturas a las características. En transcriptómica, el alineamiento se realiza al mismo tiempo que la cuantificación.

Lo importante es la indexación del genoma de referencia para ahorrar tiempo de computación. El genoma se corta en trozos para que sea más fácil realizar las búsquedas. Esto se puede hacer por ejemplo con BWA y alineadores Bowtie que utilizan la transformación de Burrows-Wheeler al ser más rápidos.

Aunque se hable de expresión génica, los genes no se expresan, son los tránscritos. Con estas técnicas es muy complicado hilar tan fino, por lo que se cuantifican los reads al gen y contar. A la hora de alinear, si se intenta alinear reads al genoma de referencia, las reads salen del tránscribo, por lo que puede ocurrir que una parte de un read caiga en un exón y la otra parte en el otro. Esto se puede visualizar con el visor IGV. Las lecturas partidas se conocen como **exon junctions**. Por ello, se puede mapear al genoma permitiendo esa característica. Otra opción es alinear directamente al transcriptoma, pero es más grande que el genoma (puede haber 100.000 tránscritos definidos vs 20.000 - 30.000 genes) y puede que haya lecturas que no se puedan mapear a un tránscribo concreto, si no que puedan mapear a varios tránscritos con el mismo exon.



II.1.4. Galaxy

Galaxy es una plataforma con muchas herramientas y workflows ya hechos para investigación biomédica intensiva en datos. Permite generar y hacer públicas pipelines. Se puede utilizar en el servidor europeo o montar un servidor local.

Para nuestro proyecto, utilizaremos los datos del paper "Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and Nrl(-/-) retinal transcriptomes". En la parte de "Related Information" se encuentran los datasets subidos a la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus). En general, las revistas

buenas exigen poner los datos en una base de datos pública. En este caso hay 6 muestras, 3 wild-type y 3 knock-out. Cada muestra en GEO tiene un ID.

Galaxy se conecta a las bases de datos mediante API, por lo que se puede poner el link a los reads crudos y Galaxy lo lleva a nuestra sesión sin necesidad de descargarlos de las bases de datos y subirlos a Galaxy de forma manual.

Nos vamos a descargar la información de los nombres de las muestras (los metadatos). Desde GEO, hay un acceso a SRA Run Selector donde tenemos disponibles esos datos. Hay dos tablas disponibles: metadata y lista de las accesiones con los IDs de las muestras. Los metadatos se necesita posteriormente para saber qué muestras son WT y cuáles KO, pero por ahora solo necesitamos los IDs para subir a Galaxy. El siguiente paso es decirle a Galaxy que, utilizando esos identificadores, se descarguen los FastQ. Para ello, en Get Data hay una opción de Faster Download and Extract Reads in FastQ format from NCBI SRA. Para esa herramienta se selecciona la opción de "List of SRA accessions, one per line" y se ejecuta.

Una vez con los datos, vemos que en Pair-end tenemos 0 datos y en Single-end 6, indicando que las muestras son single-end (aunque esto ya lo sabíamos porque venía en SRA Run Selector). El siguiente paso es ir a FastQC con los datos de single-end. La salida es un fichero txt con los números y un html con las imágenes. Tras analizarlo brevemente, vemos que no hay ningún problema con las muestras, pudiendo continuar con el análisis.

En Ensembl nos vamos a la página de FTP Downloads donde se encuentran todas las referencias de la última versión del genoma. Para reproducir unos resultados, hay que utilizar la referencia de la fecha de publicación de los datos que se estén utilizando, pero en nuestro caso podemos utilizar la última versión generada. Como no queremos descargar el Fasta a nuestro ordenador, vamos al FastA y buscamos el fichero de primary assembly. Con click derecho, podemos copiar el enlace y en Galaxy, en Upload, se puede utilizar la función Paste/Fetch data y pegar ahí la dirección. También subimos el GTF de los cromosomas.

El siguiente paso es buscar la herramienta Trim-Galore con los datos single-end dejando todas las opciones como las predeterminadas. Con esta herramienta queremos quitar los adaptadores, y en caso de tener muestras dañadas, podríamos también eliminar esa parte.

II.2. Expresión diferencial

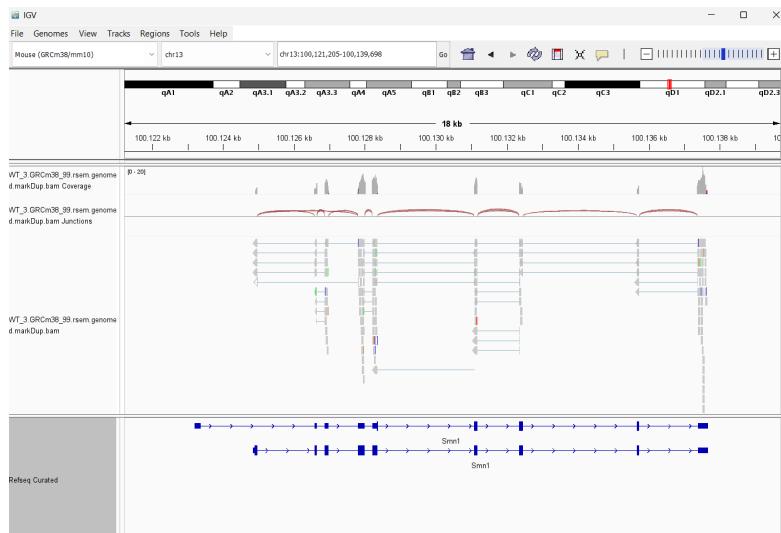
II.2.1. Visualización con IGV

Para subir un fichero a IGV, nos vamos a File y Load from File. Hay que tener en la misma carpeta el fichero BAM con el fichero BAI, es decir, el fichero indexado. Hay que cargar el BAM. Se muestran tres tracks, siendo uno la cobertura, otro los junctions y el último los duplicados (click derecho y expandir). Previamente hay que seleccionar el genoma correcto; en este caso, el de ratón.

Podemos irnos al cromosoma 13 y buscar el gen Smn1, con eso saltamos a esa región del genoma. Podemos ver las distintas isoformas del gen y dónde han mapeado

las lecturas. En Junctions, vemos que hay lecturas con un arco grande, indicando que la lectura ha mapeado a esos exones que estaban juntos en el tránscribo, pese a que en el genoma estén separados por intrones y otras regiones no codificantes. La cobertura coincide con los exones al tratarse de un RNA-Seq. Además, tiene una cobertura 0-20, indicando que en ese rango hay como máximo 20 reads y como mínimo 0.

La isoforma superior tiene un exón al principio de la proteína que no tiene ninguna lectura. Esto puede darse por la cobertura baja, indicando que nos estamos perdiendo esa isoforma.



II.2.2. Redundancia de mapeo

Pueden darse redundancias de mapeo, ya que la secuencia del genoma es larga y contiene muchas secuencias repetitivas. Por ello, hay que mirar la calidad de mapeado, ya que una lectura puede mapear en un sitio con 1 mismatch y en otra región con 2. Para reducir la ambigüedad en el mapeado (hay genes pareados, isoformas), se puede utilizar pair-end o secuenciación de reads más largas.

En NGS, se pueden detectar regiones por enriquecimiento viendo, en base a la cobertura del experimento, las regiones donde hay señal y que indicarán genes o factores de transcripción. El proceso es crosslinking, sonicación, inmunoprecipitación y secuenciación. El resultado de este tipo de experimento es un archivo tipo BED o WIG en el que se obtiene la posición donde se encuentra la señal.

En el conteo por ocurrencias, se cuentan cuántas reads caen en las distintas regiones. Para ello se requiere el GTF que asocia los disitntos exones con los tránscritos o isoformas.

En Galaxy, se puede utilizar un solo programa para alinear las lecturas a la referencia y la cuantificación. Al final, no importa si una read pertenece a una isoforma o a otra si queremos abstraer la cuantificación de una proteína, es decir, obtener la cuantificación absoluta. Para la expresión diferencial, se necesita más cobertura y los métodos son un poco diferentes para poder diferenciar las isoformas. Los tránscritos tienen una estructura de dependencia muy complicada, por lo que la expresión diferencial se suele hacer a nivel de gen.

II.2.3. Cálculo de expresión

Una vez con las lecturas mapeando a un gen, si queremos tener una medida robusta de la expresión, hay que tener en cuenta la longitud del gen y el tamaño de la librería. Una librería con una secuenciación mayor, la expresión va a parecer mayor que en una secuenciación con un tamaño menor de librería. Además, un tránsrito más corto va a tener menos reads que caigan en él por mera probabilidad, por lo que hay que normalizar por el tamaño del gen. Para ello, primero se obtienen los counts (la cobertura) y se utilizan los RPKMs:

$$RPKM : 10^9 \cdot \frac{\text{Reads mapped to the transcript}}{\text{Total reads} \cdot \text{Transcript length}}$$

Esta fórmula se modificó a la siguiente para normalizar todo a la vez:

$$TPM = 10^6 \cdot \frac{\text{reads mapped to transcript / transcript length}}{\sum \text{reads mapped to transcript/transcript length}}$$

Para las reads que mapean a varias isoformas o a varios genes del genoma, se utilizan los programas RSEM, Salmon o Sailfish. Estos métodos son procesos iterativos. Se aprovechan de la información de todos los reads para mejorar la probabilidad de qué read pertenece a qué sitio. Teniendo tres isoformas que coinciden en el primer exón, se ven las reads que caen en las partes distintas de los tránsritos para inferir las reads de la parte común de los tránsritos. La probabilidad se va cambiando y ajustando según cambian las probabilidades. Estos métodos probabilísticos hacen una estimación de los counts. Estos algoritmos cuantifican la expresión por isoforma, ya que están hechos para lidiar con el multimapping. La columna IsoPct indica el porcentaje de expresión de esa isoforma sobre toda la expresión del gen completo. Cuando se ve un proceso de splicing alternativo, la isoforma mayoritaria es la primera, y en otra condición puede darse que todas las isoformas estén igual de expresadas o que se convierta en la menos expresada.

El gen SMN1 de ratón es esencial, no puede haber ninguna mutación al ser inviable. De hecho, en humanos, una mutación en este gen causa SMA (spinal muscular atrophy). Esto se debe a que tenemos otro gen, SMN2, que solo se diferencia del 1 en una base y puede ayudar a compensar. Aunque las reads sean prácticamente idénticas, RSEM es capaz de asignarlas a una forma u otra.

II.2.4. Galaxy

Volviendo a la práctica, nos vamos a Ensembl y BioMart. Seleccionamos el genoma de ratón, seleccionamos como atributos solo Gene stable ID y transcript stable ID (quitamos los version) y exportamos los resultados como tsv. En Galaxy subimos ese fichero (Gene2Transcript) y utilizamos la herramienta "Sort Column Order by heading" para poner la columna 2 como identificador.

El siguiente paso es construir la referencia del tránsrito (el fasta del transcriptoma) a partir del GTF que habíamos subido previamente con la herramienta gffread. Debería coger automática el fichero gtf, y en caso contrario lo seleccionamos manualmente. En el apartado de Reference Genome, debemos poner "From your history" para poder



indicar el fasta. Además, en "select fasta outputs", seleccionamos la opción de "fasta file with spliced exons for each GFF transcript". También hay que activar "full GFF attribute preservation", y en Feature File Output poner GTF.

A continuación utilizamos salmon_qual utilizando el fichero exons.fa que se acaba de generar. Los alineadores/mapeadores alinean los reads base a base y cuantifican por exón, tránscrito y gen el número de reads que caen en cada una de esas regiones. Por ello, debe recibir la referencia exons.fa creado a partir del GTF y del Fasta. También recibe la tabla que mapea los tránscritos a los genes (la que hemos construido con el sort column) para conseguir la cuantificación por gen. Aunque nosotros hayamos utilizado salmon, existen otros algoritmos como sailfish y RSEM. En RNA-Seq no quitamos los duplicados al poder significar una mayor expresión. Además, los tres métodos permiten el multimapping para poder ver si las reads van a una u otra isoforma mediante métodos estadísticos de expectation-maximization.

El resultado contiene el gen (no tránsrito, eso sería otro análisis), la longitud del gen, la longitud efectiva (la que se puede mapear), los TPMs y el número de reads. Esto último es el dato crudo de cuántas reads del experimento caen en ese gen, mientras que los TPMs son los datos normalizados. Para el análisis de expresión diferencial, vamos a utilizar las reads crudas.

II.3. Análisis de expresión diferencial

II.3.1. Galaxy

Para el análisis de la expresión diferencial, necesitamos una tabla con el ID del gen y las columnas con los reads. Esto lo vamos a hacer dentro de Galaxy con la función cut con el output de salmon y escogiendo las columnas 1 y 5. El siguiente paso es utilizar columnjoin sobre este resultado, siendo la columna 1 el identificador y con 1 línea de encabezado en cada fichero de input.

Con los counts normalizados por el tamaño de gen y de librería, si hiciéramos un plot de expresión sobre IgFC, habría más variabilidad a baja expresión. Limma-voom y trend permite estabilizar la varianza para poder realizar posteriormente el

test estadístico. El ejemplo en el que estamos trabajando es bastante sencillo, pero para cuando nos veamos en situaciones más complejas (varias condiciones, medidas repetidas, etc) hay un tutorial de limma escrito por su autor, Gordon Smyth. voom permite meter información sobre la calidad de las réplicas, pero en este caso no vamos a usarlo. Seleccionamos single count matrix. El factor es la variable que determina las condiciones. Por ello, nosotros vamos a añadir un factor llamado genotype y damos para cada muestra el grupo al que pertenece. Esta información está en los metadatos; las primeras tres muestras son WT y las otras tres KO, por lo que debemos proporcionar lo siguiente: WT, WT, WT, KO, KO, KO.

En Ensembl BioMart, seleccionamos Ensembl Genes y Mouse genes. En Attributes, debemos marcar Gene stable ID y Gene Name y obtener los resultados únicos. Con los resultados descargados, en Galaxy permitimos Gene Annotations y subimos este fichero. Este paso es opcional, es simplemente para que podamos ver mejor los genes. En contrast, debemos poner KO-WT.

A la hora de hacer el análisis de expresión diferencial, cuantas más hipótesis (genes) testemos, más habrá que corregir el p-valor. Por ello, genes no expresados, no aportan información y aumentan el error de tipo 1. Por ello, se pueden quitar los filtrados. En este caso, no queremos quitar aquellos genes que entre las dos condiciones esté downregulado (y en KO no tenga expresión, por ejemplo), pero si un gen no está expresado en más de 4 muestras (de 3 que tenemos por cada condición), sí podemos quitarlos, por lo que sí permitimos el filtrado de genes poco expresados. El filtrado se hace en base de las CPM, poniendo que haya al menos 1 count por million en al menos 3 muestras. Dentro de opciones de salida, seleccionamos todos los posibles plots. Del output, siempre hay que usar el p-valor ajustado.

Por detrás, se ha ejecutado un script de R, que lo veremos más en detalle a continuación. Utilizamos el script `limma_example_rma.r` localizado en la carpeta de prácticas.

De Galaxy, nos descargamos la tabla resultante (localizada en carpeta de prácticas): Galaxy64-[limma-voom_KO-WT].tabular. Ahora tenemos una colección de genes diferencialmente expresados y tenemos dos opciones: ir mirando uno a uno los genes (por ejemplo, `Nlr` tiene un p-valor ajustado de 10^{-12} y un logFC de -8, es un gen utilizado para el Knock-Out y verificamos que ha funcionado bien. A partir de ahora, buscaríamos rutas de genes que se verían afectados con el KO de este gen).

Hay dos tipos de análisis funcional:

- **ORA (overrepresentation analysis):** Tenemos 6407 genes diferencialmente expresados de 18387 (obtenidos mediante un filtro de p-valor ajustado < 0.5). Cada uno de los genes se puede clasificar en función del proceso biológico en el que está involucrado (biological process; BP), la función molecular (molecular function; MF) o el compartimento celular (cellular compartment; CC). Para un gen, podemos buscar esto en Gene Ontology Overview. Dentro de cada categoría, hay muchas clases que permiten clasificar los genes de forma cada vez más específica, y un gen puede estar en varias clases. Podemos escoger el número de procesos y la profundidad que deseamos. Asignamos así cada gen a un proceso, y contamos para cada proceso cuántos DEGs hay. Este número se compara con los valores de Whole genome. Aquellas proporciones muy enriquecidas son las que se marcan como cambio significativo. Así, se puede decir que el experimento

afecta sobre todo al proceso x (por ejemplo, regulación génica). En caso de no obtener ningún DEG, se podrían utilizar filtros más laxos, o utilizar GSEA.

- **GSEA (gene set enrichment analysis):** para este método, se cogen la lista de todos los genes y se ordenan de menor a mayor en función de su logFC (aunque se puede elegir en función de qué hacer la ordenación). Seguimos teniendo la lista con los procesos a los que pertenecen los genes. Por ello, podemos ver dónde caen los genes de cada proceso. Si para un proceso todos los genes se encuentran cerca, esto se puede reportar (tienen una magnitud de cambio similar; el experimento perturba ese proceso).

En el NIH está la herramienta [DAVID](#) que permite subir una lista o un background (pestaña functional annotation). En el caso de los arrays, no se miran todos los genes, por lo que no tiene sentido comparar en el ORA con whole genome, si no que se utiliza otro background (por ejemplo, solo el cromosoma 1, lo que se utilice como total). En nuestro caso copiamos los primeros 150 gene ID, pero también se podría subir en forma de fichero. Se selecciona que los identificadores sean de genes de Ensembl y que se trata de una lista, no background. Hay 14 genes que no se pueden detectar con esta herramienta, pero es algo asumible. Aparece una pestaña de Gene Ontology que especifica los distintos niveles de las tres partes (BP, MF y CC). Por ejemplo, para BP, hay 5 niveles, cada uno a un mayor nivel. En direct, se mezclan los distintos niveles para obtener una clasificación que sea detallada, pero sin ser exhaustiva. Como se están testando muchos genes, hay que volver a hacer el ajuste del p-valor, que en este caso aparece en una columna con la corrección de Benjamini. Esto sería el equivalente al ORA.

Capítulo III

ChIP-Seq

III.1. Procedimiento experimental

ChIP-Seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing) es una técnica diseñada para identificar las regiones del ADN donde se unen los factores de transcripción. Utiliza secuenciación de nueva generación (NGS) de lecturas cortas (short reads) y se basa en la inmunoprecipitación de factores de transcripción. Si no se dispone de un anticuerpo específico para el factor de transcripción de interés, la técnica no puede llevarse a cabo.

El procedimiento experimental es el siguiente:

1. **Fijación y fragmentación del ADN:** Se fijan las células de un tejido con un agente químico para mantener el factor de transcripción unido al ADN. Se extrae el ADN junto con las proteínas unidas y se fragmenta mediante sonicación, obteniendo fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases, ideal para la secuenciación con tecnología Illumina. Este tamaño permite además acotar la región donde buscar posteriormente los enriquecimientos.
2. **Inmunoprecipitación:** Se introduce un anticuerpo específico para el factor de transcripción en la solución de fragmentos de ADN. Como control, se puede preparar una muestra sin anticuerpo para evaluar la distribución del coverage del genoma. Los fragmentos de ADN unidos al factor de transcripción se capturan utilizando una columna con bolitas que se unen a la región constante del anticuerpo.
3. **Preparación de la librería y secuenciación:** Se deshace la fijación para eliminar las proteínas y se prepara la librería de ADN para secuenciar. Se realiza la secuenciación, idealmente obteniendo entre 20 y 40 millones de lecturas (reads).

III.2. Análisis de Datos

Alineamiento de lecturas Las lecturas se alinean al genoma de referencia. En general, se utiliza secuenciación single-end, donde las lecturas no están pareadas. Se

observa un patrón donde las lecturas se alinean en la región 5' en un sentido y en la región 3' en sentido inverso, lo que indica la señal de enriquecimiento.

Identificación de regiones enriquecidas Se utilizan herramientas como MACS (Model-based Analysis of ChIP-Seq) para identificar regiones enriquecidas. MACS modela una distribución nula, fragmenta el genoma en bins y calcula el número de lecturas en cada bin. La herramienta desplaza y junta los picos de las distribuciones (una por cada sentido) para aumentar la señal y evaluar las regiones enriquecidas en comparación con el control.

Análisis de motivos de unión Se identifican las secuencias de ADN donde se une el factor de transcripción y los genes asociados. Se utilizan herramientas para buscar motivos enriquecidos de 10-15 nucleótidos mediante el algoritmo de expectation-maximization. Esto permite estimar la secuencia consenso de unión y predecir otros sitios potenciales en el genoma mediante el logo generado.

III.3. Aplicación práctica: Pipeline de análisis con Galaxy

III.3.1. Obtención de datos

Vamos a construir una pipeline para analizar datos de ChIP-Seq del artículo "[Analysis of the DNA-binding profile and function of tale homeoproteins reveals their specialization and specific interactions with hox genes/proteins](#)". Este estudio evalúa los sitios de unión de tres factores de transcripción: Prep1, Meis1 y Pbx1, relacionados con los genes Hox del desarrollo embrionario.

En este estudio se realizaron tres ChIP-Seqs con tres anticuerpos, uno para cada factor. Meis1 salió muy ruidoso, Prep1 tenía unos picos muy marcados, y Pbx1 mostró algo intermedio. Los picos de Meis tenían dos distribuciones, y donde estaba Prep, Meis también tenía un pico marcado.

Para esta pipeline utilizamos el [servidor americano de Galaxy](#). Ahí podemos buscar en historias públicas la historia "Pbx1 ChIPSeq Raw Data" del usuario "cartof", que es Carlos Torroja (el profesor). Los datos del artículo están disponibles en GEO, y podemos acceder desde la sección de "Additional Information" de PubMed. Desde ahí podemos navegar a SRA Run Selector, donde aparecen todas las muestras del artículo. Hay dos tipos de assays, RNA-Seq y ChIP-Seq, por lo que seleccionamos solo aquellas pertenecientes a ChIP-Seq. Hay un botón de "Computing Galaxy" que importa los datos directamente al servidor americano; para utilizar el servidor europeo, habría que descargar las tablas de metadatos e importarlas manualmente como se hizo en la pipeline de RNA-Seq.

III.3.2. Preprocesamiento de datos

Los datos ya están subidos a Galaxy, pero hay que preprocesar el contenido. Las anotaciones de los campos son libres, no hay estándar, por lo que la pipeline se debe adaptar a los datos concretos. En este caso, solo nos queremos quedar con tres columnas: la columna 1 run con los identificadores SRR, la columna 17 con el nombre de la librería y la columna 32 con el nombre del anticuerpo utilizado. Para esto, utilizamos la herramienta `cut columns`. Tras ver el resultado, vemos que algunas celdas contienen "signos prohibidos" en bioinformática, como espacios o paréntesis. Por ello, el siguiente paso es utilizar `column regex find and replace`. Esto se debe ejecutar dos veces:

1. **Columna 2:** debemos realizar dos comprobaciones. Primero, se sustituye `.*WT\s([\w\s]+)` por `\1`. El segundo check debe buscar `\s` y reemplazar por `_`.
2. **Columna 3:** buscamos `[\/\s].+` y lo queremos reemplazar por nada, por lo que se deja el campo en blanco.

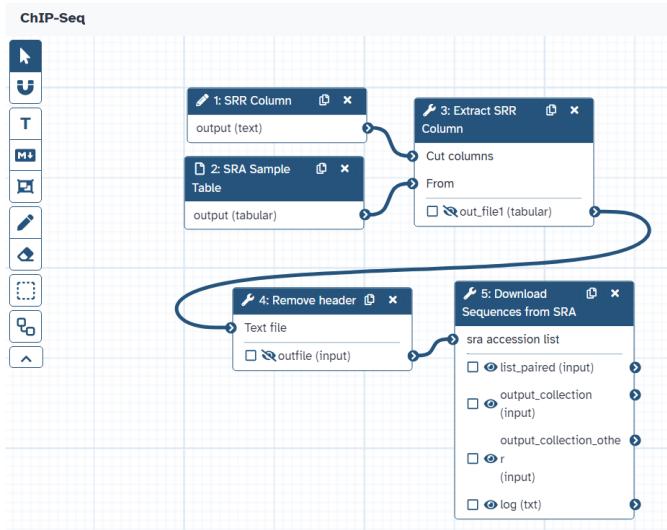
III.3.3. Descarga y extracción de lecturas

Hasta ahora, hemos realizado los pasos anteriores directamente en la historia. Los siguientes pasos los vamos a crear como parte de un flujo de trabajo, creando un nuevo workflow desde la pestaña con ese mismo nombre. Los flujos de trabajo se construyen con casillas que representan distintas entradas o herramientas, pudiendo ordenar todo.

Primero incluimos una casilla de "input database" que llamamos SRA Table con descripción "Sample table with SRR column and sample name column" y formato tabular. A continuación añadimos la herramienta "cut" con nombre "Extract SRR Column", desactivando los parámetros de la herramienta. De esta forma, a la hora de lanzar el flujo de trabajo, se pide al usuario la introducción de las columnas que se desean mantener. La alternativa sería, en lugar de desactivar el parámetro, generar una entrada que se utilice en la herramienta. Esto se consigue pulsando el icono de las dos flechas, permitiendo así enlazar una casilla de "input" con la herramienta.

La primera fila del fichero contiene la cabecera de las columnas, y no queremos que forme parte del análisis bioinformático. Para ello, incluimos una casilla con la herramienta "select last lines from a database (tail)". Entre los parámetros, debemos especificar "keep everything from this line on" y "2", de manera que siempre se vaya a eliminar la cabecera.

El flujo de trabajo contiene por ahora solo pasos intermedios. Para evitar su aparición en la historia cuando se lance el flujo, generando ruido visual, se pueden ocultar pulsando sobre el símbolo del ojo. Ahora ya podemos incluir la herramienta "Faster Download and Extract Reads in FastQ format". Por defecto, no permite introducirle una entrada, primero hay que seleccionar la opción de "list of SRA accession, one per line". La salida de esta herramienta se divide en cuatro. Para una secuenciación single-end, debemos trabajar con la salida "output_collection", mientras que para una secuenciación pair-end, "list_paired".



III.3.4. Análisis posterior

Los siguientes pasos del análisis serían realizar un control de calidad con FastQC y utilizar una herramienta de trimmeado (como Trim-Galore) para eliminar los adaptadores de la secuencia, aumentando así la capacidad de alinear. A continuación se podría pasar al alineado para saber la parte del genoma de donde provienen las lecturas mediante herramientas como BWA. En el FastQC se podría ver el tamaño de las regiones, que en este caso son de unos 35 nucleótidos, por lo que se puede utilizar la herramienta BWA estándar al no necesitar incluir gaps u otros eventos complejos más propios de secuencias más largas.

El resultado es un fichero BAM que se utiliza a continuación para realizar un control de calidad con la herramienta plotFingerprint. Del genoma se obtienen fragmentos pequeños que se utilizan para contar las lecturas que caen en cada fragmento. Esto se calcula para todas las muestras, y posteriormente se genera un gráfico que muestre la información: fragmentos por counts y un gráfico cumulativo.

En un análisis de ChIP-Seq, no hay un genoma de referencia, por lo que es necesario incluir un paso de detección de los picos de lectura. Esta detección se realiza en base a un patrón o en base al enriquecimiento. Esto se realiza con la herramienta MACS, la cual se encarga de la detección, del conteo y del análisis estadístico. Se identifican las regiones enriquecidas a través de la distribución de las lecturas. Se deben encontrar dos distribuciones, una para cada sentido de lectura. MACS puede detectar una distribución y emplearla para buscar una distribución opuesta en el rango de la sonicación (es decir, unos 200 pares de bases que se especifican como parámetro). A continuación junta ambas distribuciones en un pico central para aumentar la detección. El siguiente paso es la búsqueda en distintos tamaños de fragmento, quedándose con el que mejor se adapte y simulando la distribución nula con los datos. Además, se pueden modificar el tamaño efectivo del genoma de referencia e incluir en las salidas adicionales la de "peak summits".

El resultado es un fichero bed que se debe ordenar según el score. Este fichero se emplea para la búsqueda de los motivos de unión del factor de transcripción. En el fichero bed se incluyen las posiciones del nucleótido donde empieza y donde termina, por lo que debemos aumentar el número en 50 nucleótidos en ambas direcciones (restar

50 a la posición de inicio y sumar 50 a la de fin). De la colección de regiones, se pueden filtrar las 500 entradas más altas y utilizar la herramienta "Extract Genomic DNA" para obtener la secuencia de esas posiciones. Con esto se puede utilizar la herramienta "MEME", obteniendo así los logos. Pulsando la flecha en Submit/Download, podemos buscar ese logo en la base de datos para encontrar otras secuencias iguales recogidas en ella.

Parte II

Proteómica y Metabolómica

Capítulo IV

Introducción a la proteómica y la espectrometría de masas

IV.1. Introducción

El **proteoma** se define como el conjunto completo de proteínas que se expresan, o pueden expresarse, a partir del genoma de una célula, tejido u organismo en un momento y condición específicos. La **proteómica**, por su parte, es la disciplina científica que estudia el proteoma mediante técnicas sistemáticas para identificar, cuantificar y caracterizar proteínas. Entre las herramientas más utilizadas en proteómica se encuentran la electroforesis, la espectrometría de masas (MS), la resonancia magnética nuclear (RMN), la microscopía óptica y electrónica, y la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, entre otras.

IV.1.1. Análisis de proteínas por electroforesis

La electroforesis es una técnica clásica de separación de proteínas basada en su carga eléctrica y masa molecular. En este método, las proteínas se separan en un gel según su punto isoelectrónico (pl), que es el pH al cual una proteína tiene una carga neta cero. Posteriormente, se realiza una segunda separación en función del peso molecular. Esta técnica ha sido fundamental en la proteómica "clásica" y sigue utilizándose para la validación de biomarcadores.

Tras la separación, el gel puede cortarse para aislar las proteínas de interés, las cuales se someten a una digestión con proteasas (como la tripsina) para generar péptidos. Estos péptidos pueden analizarse posteriormente mediante espectrometría de masas.

Sin embargo, la electroforesis presenta limitaciones: no es automática, tiene baja reproducibilidad y no es adecuada para proteínas grandes o hidrofóbicas. Además, suele ser efectiva solo para proteínas altamente abundantes. Estas limitaciones llevaron al desarrollo de la proteómica "Bottom-Up", que supera muchos de estos problemas.

IV.2. Proteómica "Bottom-Up"

La proteómica "Bottom-Up" es un enfoque moderno que se basa en la digestión de proteínas en péptidos, seguida de su análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Este método es más sensible, reproducible y adecuado para el análisis de proteínas de baja abundancia.

IV.2.1. Digestión tríptica

El primer paso en la proteómica "Bottom-Up" es la digestión de las proteínas. Las proteínas, en su estado nativo, están plegadas y pueden contener enlaces disulfuro que estabilizan su estructura. Para facilitar su análisis, las proteínas se desnaturizan utilizando agentes como el dodecilsulfato sódico (SDS), que rompe los enlaces disulfuro y despliega las proteínas. Una vez desnaturizadas, se someten a una digestión con tripsina, una enzima que corta específicamente después de los residuos de lisina (K) y arginina (R), generando péptidos de tamaño adecuado para su análisis por espectrometría de masas.

IV.2.2. Fraccionamiento para reducción de complejidad

Tras la digestión, los péptidos resultantes pueden fraccionarse para reducir la complejidad de la muestra. Esto es especialmente útil en muestras que contienen múltiples proteínas o especies. El fraccionamiento puede realizarse mediante técnicas como la cromatografía de fase reversa, donde los péptidos se separan según su hidrofobicidad. Este paso permite una introducción más controlada y ordenada de los péptidos en el espectrómetro de masas.

IV.2.3. Cromatografía líquida y espectrometría de masas

Los péptidos, fraccionados o no, se introducen en un sistema de cromatografía líquida (LC). Aquí, los péptidos se separan en función de su interacción con la fase estacionaria, lo que permite su elución en tiempos específicos. A medida que los péptidos salen de la columna cromatográfica, se ionizan mediante técnicas como la ionización por electrospray (ESI), formando gotitas cargadas que contienen los péptidos ionizados. A medida que el solvente se evapora, los péptidos ionizados entran en el espectrómetro de masas.

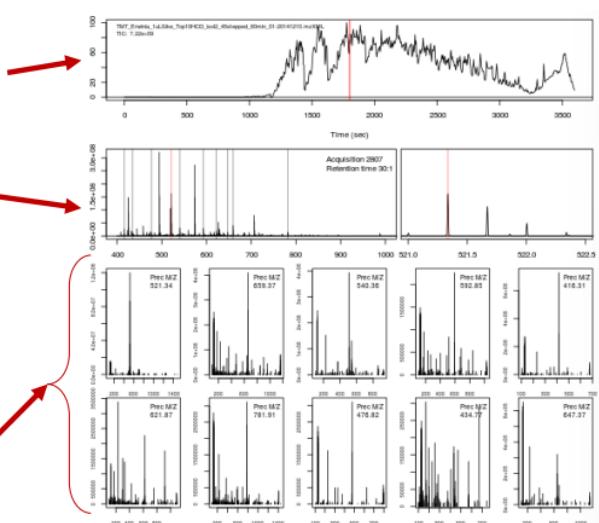
IV.2.3.1. Componentes del espectrómetro de masas

Un espectrómetro de masas consta de los siguientes componentes principales:

- **Sistema de introducción de muestras:** Introduce los péptidos ionizados en el espectrómetro.
- **Cámara de ionización:** Aquí, los péptidos se ionizan. Una de las técnicas más comunes es la ionización por electrospray (ESI).

- **Analizador:** Determina la relación masa-carga (m/z) de los iones. Existen diferentes tipos de analizadores, como los de cuadrupolo, tiempo de vuelo (TOF) y trampa de iones.
- **Detector:** Registra la masa y la intensidad de los iones detectados.

El **cromatograma** muestra la corriente iónica total a lo largo del tiempo de retención. La línea roja identifica un barrido en particular en el tiempo de retención de 1800,68 segundos (la adquisición 2,807).



Este espectro representan el **MS1** completo marcado por la línea roja (del cromatograma). Las líneas verticales identifican los 10 iones precursores seleccionados para el análisis MS2. El zoom de la derecha muestra un pico precursor específico.

Los espectros **MS2 (MS/MS)** mostrados son los resultantes de la fragmentación de los 10 picos precursores identificados (líneas grises y roja) por las barras verticales anteriores.

Figura IV.1: La figura superior indica el chromatograma obtenido. Primero hay un tiempo de retención con la intensidad encontrada de toda la carga iónica recibidas. A partir de un tiempo de retención señalado con la línea roja, empieza el tiempo de adquisición. El MS1 (panel central) es la ampliación de la línea roja del chromatograma. Cada línea vertical indica la masa detectada con sus intensidades. La parte derecha es un zoom de la línea roja. El MS1 se genera por cada péptido encontrado. Para este ejemplo, se cogen los iones marcados en gris y rojo y se fragmentan. Se saca la masa, carga e intensidad por cada uno de los iones en el segundo analizador.

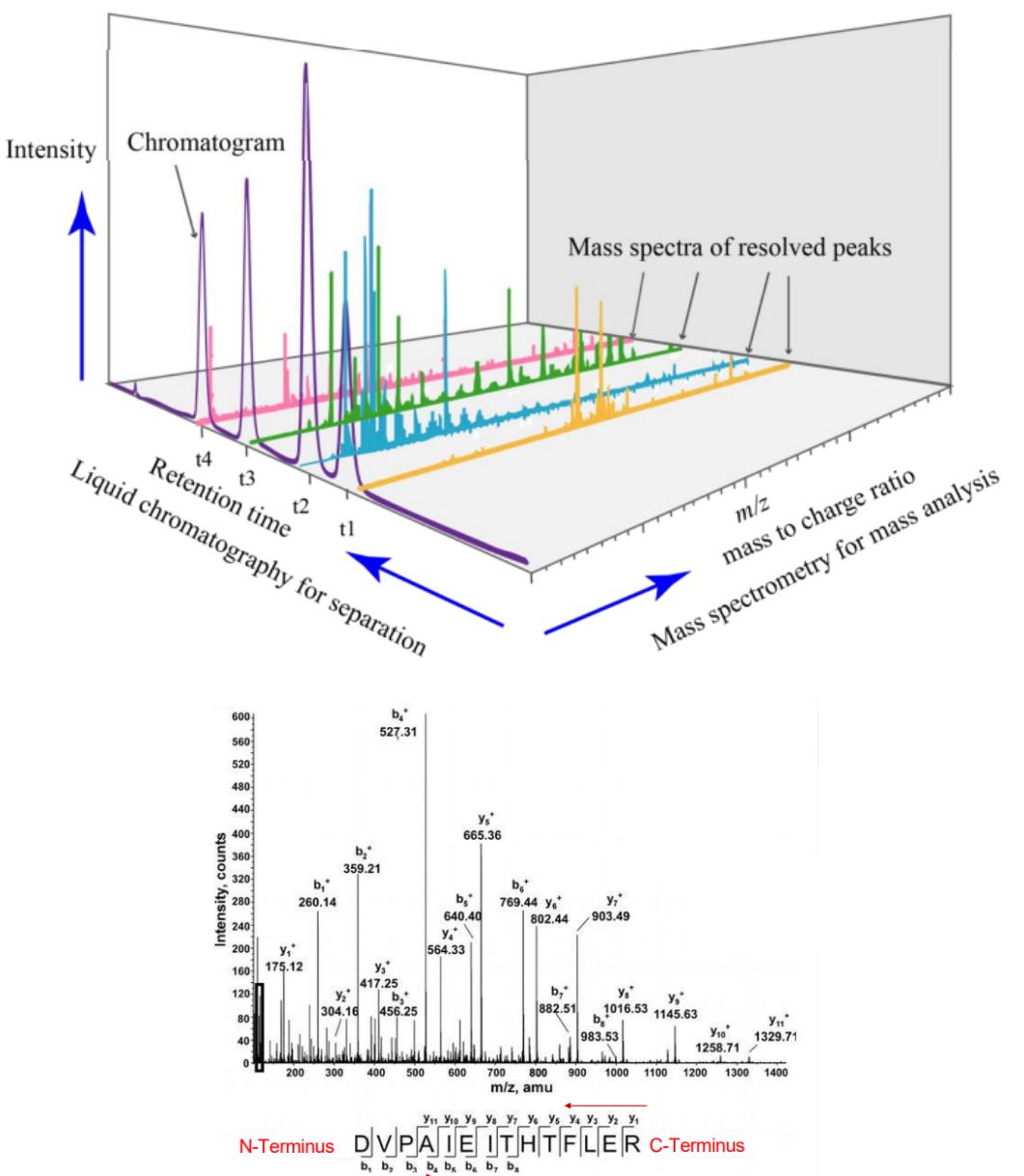
La siguiente imagen muestra una representación de un LC-MS. A partir de un determinado tiempo de retención, hay una serie de masas cargas de los péptidos con una intensidad asociada a cada uno. Para diferentes tiempos de retención hay diferentes picos del espectrómetro.

Se tienden a coger los picos con mayor intensidad, ya que el resto son ruido del espectrómetro. Se sabe que a la hora de tener los péptidos, hay unos iones que van del extremo N-terminal al C-terminal y otros que van en sentido contrario. Estos iones van calculando la masa acumulativa. De esta forma se pueden saber los aminoácidos que componen el espectro.

IV.2.4. Adquisición de datos

La adquisición de datos en espectrometría de masas puede realizarse de dos formas principales:

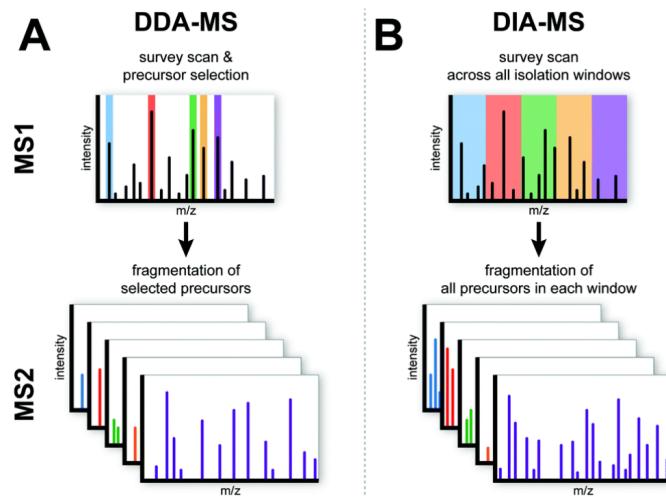
- **Adquisición dependiente de datos (DDA):** En este modo, los iones más abundantes detectados en el espectro MS1 se seleccionan para su fragmentación, generando espectros MS2. Este proceso se repite secuencialmente para múltiples iones.



- **Adquisición independiente de datos (DIA):** En este modo, se fragmentan regiones específicas del espectro MS1, independientemente de la intensidad de los iones. Esto permite la detección de iones de baja abundancia, aunque puede resultar en espectros MS2 más complejos debido a la co-fragmentación de múltiples péptidos.

IV.2.5. Identificación de péptidos y proteínas

La identificación de péptidos y proteínas se realiza comparando los espectros experimentales con bases de datos teóricas. Estas bases de datos contienen información sobre las masas y secuencias de péptidos generados in silico a partir de proteínas conocidas. Al comparar los espectros experimentales con los teóricos, se puede determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos y, por tanto, identificar las



proteínas presentes en la muestra. Cada identificación se asocia con un score de confianza que indica la fiabilidad del resultado.

IV.2.6. Aplicaciones de la proteómica "Bottom-Up"

La proteómica "Bottom-Up" tiene dos enfoques principales:

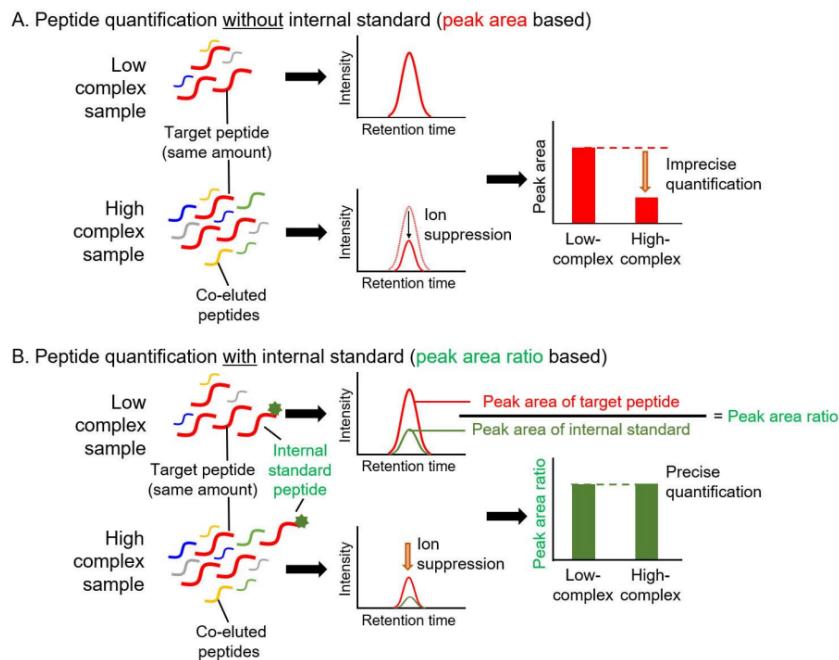
- **Proteómica de descubrimiento (Discovery Proteomics):** Se utiliza para analizar proteomas completos, identificando y cuantificando proteínas de abundancia moderada a alta. Un posible ejemplo es la búsqueda de posibles biomarcadores.
- **Proteómica dirigida (Targeted Proteomics):** Se centra en la cuantificación de proteínas específicas, incluso en bajas abundancias. Una técnica común en este enfoque es el monitoreo de reacciones seleccionadas/múltiples (SRM/MRM), que utiliza tres analizadores de cuadrupolo para seleccionar y cuantificar péptidos específicos. Un ejemplo de aplicación es la validación de biomarcadores.

IV.2.6.1. Cuantificación y estándares internos

En la cuantificación de proteínas, es crucial utilizar estándares internos para corregir variaciones en la ionización y la eficiencia de la cromatografía. Estos estándares son péptidos sintéticos con propiedades similares a los péptidos de interés, pero marcados con isótopos estables. Al comparar las áreas bajo la curva de los péptidos de interés con las de los estándares internos, se obtiene una cuantificación precisa y reproducible.

IV.3. Proteómica "Top-Down"

En este caso, tenemos la proteína intacta y se calcula la masa con el espectrómetro. Se usan los mismos tipos de espectrómetros: cromatografía líquida y espectrómetro de masas. Químicamente, la muestra biológica no se desnaturiza ni se digiere, si no que se sigue un protocolo de lisis para romper las membranas celulares. Dependiendo

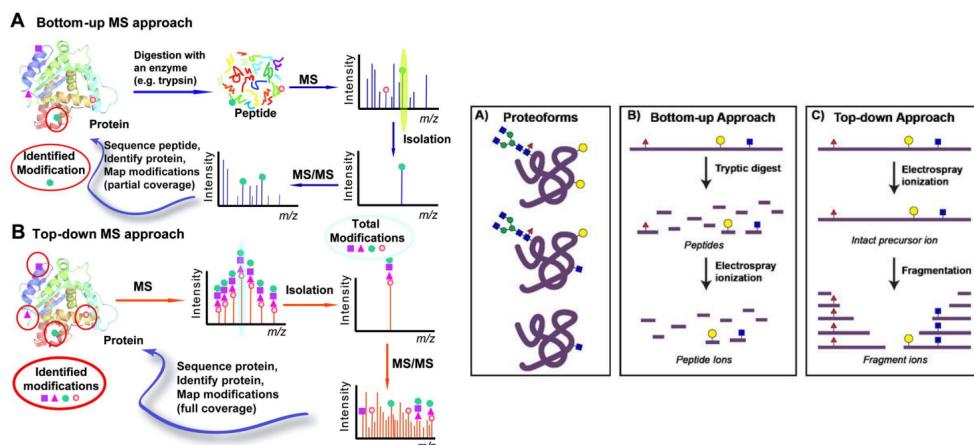


de las muestras y sus condiciones, las proteínas mantendrán su estructura o si están haciendo ligando, se mantendrán las relaciones. Si para esas condiciones de muestra hay alguna modificación post-traduccional, va a ser más fácil de identificar con esta técnica de Top-Down.

Las proteínas intactas se pasan a un HPLC. Se realiza la ionización por electrospray y con el tiempo de retención y las intensidades, se obtiene la masa carga de toda la proteína (MS1). Posteriormente se fracciona en determinados puntos dentro de la proteína. Es más fácil obtener la estructura de la proteína. El MS2 permite ver la estructura de fragmentos de la proteína.

En el caso del Bottom-Up, tenemos toda la proteína y se hace una digestión tríptica. Los péptidos se ionizan, y esos fragmentos ionizados son los que detectará el MS. En Top-Down, la proteína intacta se ioniza. Al fragmentar para el MS2, hay trozos y fragmentos de los iones con una conformación de la proteína más larga, siendo así más fácil ver la estructura completa.

Comparando las dos técnicas en proteómica:



Aspecto	Top-Down	Bottom-Up
Tamaño de las proteínas	Adecuado para proteínas pequeñas y medianas	Adecuado para todo tamaño, especialmente proteínas grandes
Equipos	Instrumentos de alta resolución	Instrumentos más accesibles
Sensibilidad	Menor, difícil para proteínas en baja abundancia	Mayor sensibilidad
Complejidad computacional	Alta, espectros más difíciles de interpretar	Menor, espectros de péptidos más sencillos
Cobertura	Cobertura completa de la proteína	Cobertura parcial (depende de la digestión)
Manejo de mezclas complejas	Difícil para mezclas de muchas proteínas	Más fácil, adecuado para muestras complejas
Detección de PTMs	Precisa, localización directa en la proteína intacta	Puede perder algunas PTMs, pero identifica modificaciones en péptidos
Preparación de muestras	Más compleja, requiere proteínas intactas	Más sencilla, con digestión enzimática

Capítulo V

Identificación de péptidos mediante espectrometría de masas

Las máquinas actuales generan millones de espectros MS/MS en muy poco tiempo. No se pueden interpretar manualmente, siendo necesario usar herramientas computacionales. Las estrategias más utilizadas para identificar péptidos mediante MS/MS son:

- **Secuenciación *de novo*:** Consiste en obtener la secuencia del péptido directamente a partir del espectro. Se usa en casos donde el genoma del organismo no está (o sólo parcialmente) secuenciado. La secuencia se infiere directamente del espectro sin ayuda de una base de datos de referencia. También se usa para identificar o caracterizar modificaciones postraduccionales.
- **Búsqueda contra bases de datos:** Se identifica el péptido en la base de datos a partir del espectro MS/MS. Para ello se hace una "correlación" entre el espectro MS/MS obtenido experimentalmente y los espectros teóricos generados a partir de las secuencias de los péptidos en la base de datos.

Los motores de búsqueda se encargan de asignar a cada espectro obtenido experimentalmente un péptido, que es el mejor candidato de una lista de los posibles péptidos en la base de datos, de acuerdo a cierta **puntuación**, que mide el **grado de similitud entre el espectro empírico y el teórico**. A cada una de estas **parejas péptido-espectro** se les denomina **PSM** (Peptide-Spectrum Match, Asignación Péptido-Espectro).

Denominaremos **puntuaciones simples** a aquellos algoritmos que generan una puntuación para cada PSM que es independiente de la puntuación asignada al resto de PSMs en el mismo experimento. Los algoritmos que asignan una puntuación a cada PSM considerando el comportamiento del resto de las PSM generan puntuaciones que denominaremos **complejas**.

V.1. Algoritmos de identificación de péptidos - Puntuaciones simples

Hay varios algoritmos para poder obtener esta puntuación:

- **Algoritmos empíricos de puntuación**
 - SEQUEST
 - Reginamiento de las puntuaciones SEQUEST
- **Algoritmos basados en la probabilidad del emparejado**
 - Mascot
 - Andromeda
- **Algoritmos basados en la probabilidad del candidato entre el resto de los candidatos**
 - p-value y e-value
 - X!Tandem
 - MSFragger

V.1.1. Algoritmos empíricos de puntuación

SEQUEST mide el grado de similitud entre el espectro adquirido y el espectro teórico. Todos los péptidos tienen una suma de masas que concuerdan con el espectro y un rango de posible error. Tras obtener la lista de los fragmentos que coinciden con la suma de masas, se crea un espectro teórico y se compara uno y otro. En caso de SEQUEST, es ver que los picos de fragmentos coincidan con ellos. El score da la suma de cada fragmento con un margen de error y ver si coincide. Con esto se selecciona el fragmento con mayor similitud y nos quedamos con él.

A partir de esto, aparecen otras puntuaciones de refinamiento. Un ejemplo es ΔC_n . Este algoritmo indica el valor de la diferencia entre las puntuaciones ordenadas. Si el segundo candidato en puntuación es muy bajo (hay una gran diferencia), nos podemos fiar más del primer candidato por el score obtenido. Puede suceder que el valor de ΔC_n sea alto, pero la puntuación base sea baja. O al revés, que haya muy poca diferencia entre puntuaciones, pero éstas sean muy altas.

Otro refinamiento de SEQUEST es $cXcorr$. Éste refinamiento depende de la masa: a mayor masa, más aminoácidos, habiendo más fragmentos que emparejar y un valor más elevado de Xcorr. También depende de la carga, ya que a igual m/z, los péptidos con más carga tienen más aminoácidos, por lo que el valor de Xcorr también tiende a ser más alto. Por tanto, Xcorr da prioridad a los péptidos de mayor masa y de mayor carga. Una forma de corregir este efecto es con $cXcorr$, que se hace independiente de la longitud del péptido.

V.1.2. Probabilidad en el emparejado

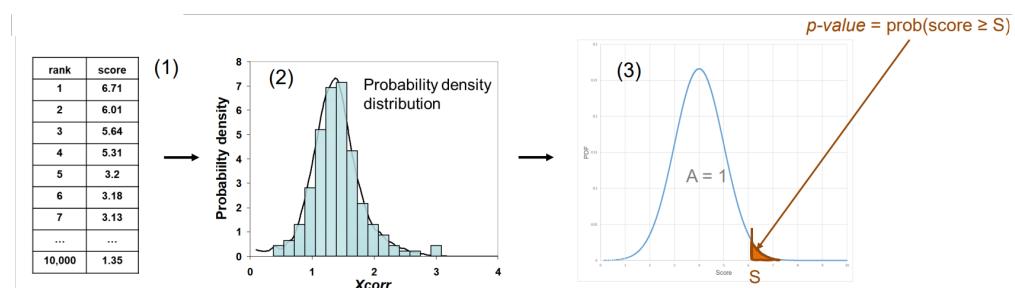
Mascot Mascot puntuá el emparejamiento entre una secuencia y un espectro MS/MS calculando la probabilidad de que el emparejamiento sea un evento aleatorio. El algoritmo no se ha publicado. Utiliza la puntuación Ion Score (IS) que se define como $IS = -10 \cdot \log P$, donde P es la probabilidad de que la coincidencia observada entre el espetro teórico y el experimental sea un evento aleatorio. El IS refleja la calidad del emparejamiento. Cuanto más bajo sea P , mayor será el puntaje; es decir, una puntuación alta es indicativo de un emparejamiento más fiable entre el espectro experimental y la secuencia teórica. Se trata de un software comercial de uso gratuito para búsquedas pequeñas.

Andromeda Andromeda es un motor de búsqueda de péptidos que utiliza un concepto semejante a Mascot. El algoritmo ha sido publicado. Se basa en el cálculo de la probabilidad binomial de tener un número de fragmentos en el espectro que coincidan al azar. Andromeda se ofrece como “software” libre que puede funcionar de forma independiente o integrada dentro del paquete MaxQuant.

V.1.3. Probabilidad del candidato

V.1.3.1. p-value y función de densidad de probabilidad (FDP)

Para calcular el p-valor (p-value) se tienen en cuenta las puntuaciones obtenidas por todos los candidatos de la base de datos contra los que se compara un determinado espectro MS/MS. El p-valor de una puntuación x se define como la probabilidad de que el espectro encuentre una PSM de puntuación igual o mejor que x . Esta probabilidad se puede obtener a partir de la Función de Densidad de Probabilidad (FDP o Probability Density Distribution). Para generar la FDP se ordenan las puntuaciones de menor a mayor (1), se construye un histograma y se ajusta a una función empírica (2), se normaliza la función para que el área sea la unidad (3) y se calcula el área por encima de la puntuación (s) dada.



V.1.3.2. Valor esperado (e-value)

Supongamos que obtenemos una PSM con $p\text{-value} = 0.001$ después de buscar contra $N = 1000$ secuencias candidatas. ¿Se puede considerar este resultado significativo? La probabilidad de obtener una o más coincidencias con una probabilidad

p o menor cuando el evento se repite N veces es igual a la probabilidad de no tener N coincidencias con $(1 - p)$, es decir:

$$p(\text{one or more matches with } p \text{ or lower}) = 1 - (1 - p)^N \sim Np$$

Como se indica en la fórmula, cuando p es un valor pequeño, esta probabilidad se aproxima al producto de N y p. En el caso comentado, $Np = 1000 \times 0.001 = 1$ y, por lo tanto, la coincidencia no es significativa. En otras palabras, esperaríamos que al menos una secuencia puntaría con $p = 0.001$ por puro azar.

El valor esperado (e-value o expectation value) se define como el producto de N por p, y mide el número esperado de coincidencias con un valor p que se obtendría cuando el espectro MS/MS se busca contra N candidatos.

$$e = N \cdot p$$

El e-value es una forma compacta de calcular la probabilidad real de forma aproximada, y da una idea más realista de la significatividad de una PSM.

V.1.3.3. X!Tandem

X!Tandem es un motor de búsqueda que usa una puntuación llamada hyperscore (HS).

$$HS = \left(\sum_{i=0}^n I_i P_i \right) N_b! N_y!$$

La puntuación HS tiene en cuenta la intensidad de los fragmentos que coinciden entre el espectro observado y el teórico, y el número de iones “b” e iones “y” asignados. Además, X!Tandem calcula el p-value asociado al HS para determinar si una identificación es correcta o no.

V.1.3.4. MSFragger

MSFragger es un motor de búsqueda ultrarrápido que cuya puntuación y modelado probabilístico son muy parecidos a X!Tandem. La búsqueda ultrarrápida se consigue construyendo un theoretical fragment index a partir de todas las secuencias de las bases de datos. Cada fragmento en el espectro observado se compara con todos los fragmentos de la misma masa de todos los candidatos en un solo paso.

MSFragger es adecuado para cualquier análisis de proteómica de shotgun, para búsquedas sin restricciones de enzimas, búsquedas de bases de datos “abiertas”, y para la identificación de péptidos modificados glicopéptidos. MSFragger es suficientemente rápido para ser usado incluso en un ordenador portátil.

V.1.3.5. Mejor método

Se han publicado muchas comparativas entre los diferentes motores de búsqueda, pero la situación no está clara. Algunos algoritmos funcionan mejor para ciertos

péptidos, mientras que otros funcionan mejor para diferentes conjuntos de péptidos. La principal preocupación no es cuál debería usarse, sino cómo interpretar correctamente los resultados. Por lo tanto, si nos encontramos cómodos con un método de identificación de péptidos MS/MS (conocido), lo mejor es seguir usándolo. Lo importante es asegurarse de que la **validación de las identificaciones** está hecha correctamente.

V.2. Algoritmos de identificación de péptidos

- Puntuaciones complejas y validación estadística

V.2.1. Validación mediante Posterior Error Probability (PEP)

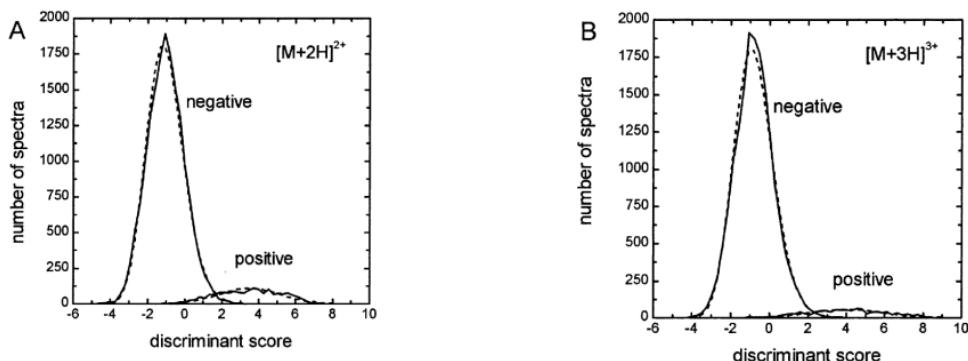
V.2.1.1. PeptideProphet - Función Discriminatoria

PeptideProphet fue en su momento un nuevo concepto de algoritmo que tiene en cuenta todos los factores que pueden influir en un buscador a la hora de decidir si una identificación es correcta. Utiliza una **función discriminatoria F** que se construye como combinación lineal de todos los factores (Xcorr, ΔCn, Ln SpRank, etc.):

$$F(x_1, x_2, \dots, x_s) = c_0 + c_1x_1 + c_2x_2 + c_3x_3 + \dots + c_sx_s$$

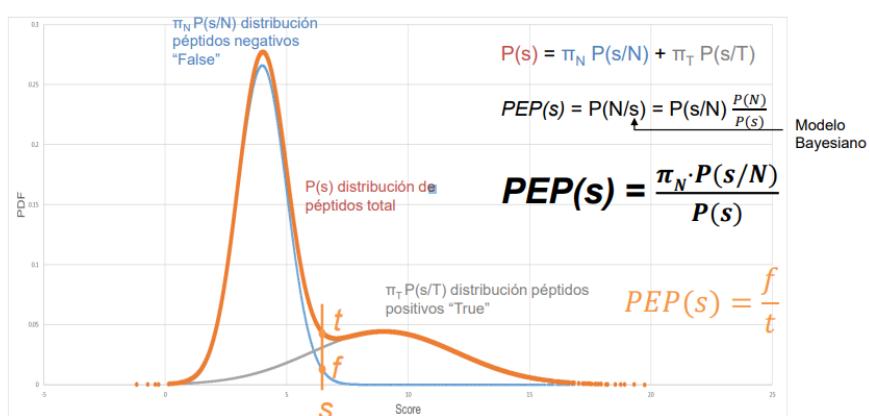
Se aplicó originalmente a las puntuaciones de Sequest, pero el concepto es de aplicabilidad universal y se ha usado con otros motores de búsqueda (Mascot, Andromeda, X!Tandem, etc).

La función F primero se aplica a un conjunto de datos de entrenamiento (una población de espectros MS/MS bien caracterizados), con los que se optimizan los coeficientes lineales que mejor discriminan entre identificaciones correctas e incorrectas mediante un algoritmo iterativo. De esta manera se obtienen distribuciones de F separadas para las identificaciones de péptidos correctas (positivas) e incorrectas (negativas).



V.2.1.2. Cálculo bayesiano de PEP

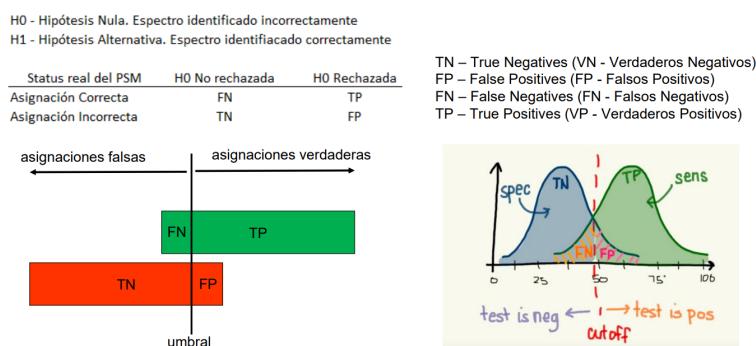
Las funciones F se normalizan para convertirlas en funciones de densidad de probabilidad (PDF), de manera que la distribución de todos los péptidos se expresa como una superposición de la de los ciertos y la de los falsos. A cada puntuación "s" se le asigna un valor PEP(s), que se define como la probabilidad de obtener un péptido falso (negativo ó N) cuando se obtiene esa puntuación "s" ("N dado s"), es decir la probabilidad bayesiana $P(N/s)$. $P(N/s)$ se calcula como el cociente entre la PDF de la distribución de negativos (f) y la de la distribución total (t).



V.2.2. Validación mediante conceptos estadísticos globales

V.2.2.1. Tabla de contingencia

Las tablas de contingencia se utilizan en estadística para valorar de qué manera un parámetro (en este caso la puntuación) permite discernir entre dos condiciones dadas (en este caso entre asignaciones verdaderas y falsas). En el caso ideal hay un umbral por encima del cual todas son verdaderas o todas son falsas. Idealmente, hay una separación perfecta, pero en la realidad, la separación entre ciertos y falsos es incompleta.

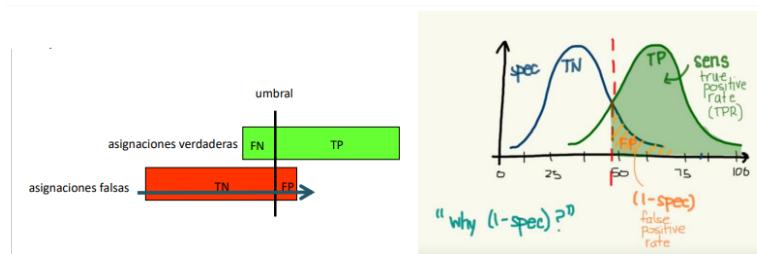


V.2.2.2. Tasa de Falsos Positivos (FPR, False Positive Rate)

La tasa de falsos positivos es la proporción de asignaciones consideradas correctas entre el total de asignaciones incorrectas.

$$FPR = 1 - \text{especificidad} = \frac{FP}{TN + FP}$$

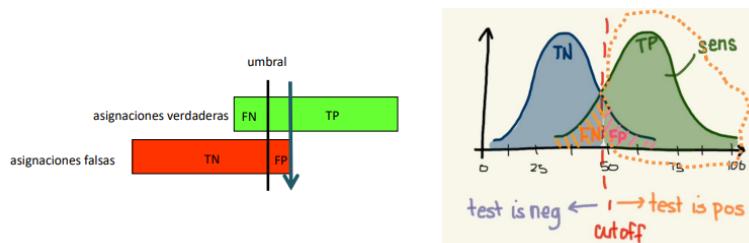
La FPR equivale al p-value de la distribución global de puntuaciones.



V.2.2.3. Tasa de Falsos Descubrimientos (FDR, False Discovery Rate)

La tasa de falsos descubrimientos es la proporción de asignaciones consideradas incorrectas entre el total de asignaciones consideradas (por encima del umbral).

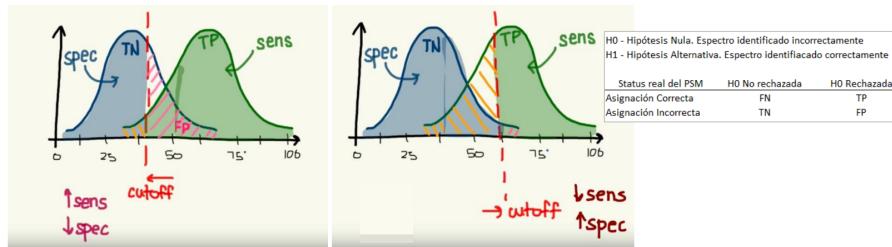
$$FDR = \frac{FP}{TP + FP}$$



Muy importante: la FDR es el método idóneo para corregir la FPR (ó p-value) cuando se realizan test múltiples (cuando se identifican muchos péptidos al mismo tiempo en experimentos a gran escala).

V.2.2.4. Errores tipo I y errores tipo II

- **Error de tipo I**, es el error que se comete cuando el investigador rechaza la hipótesis nula siendo ésta verdadera. Se evalúa calculando la probabilidad de encontrar un resultado falso positivo.
- **Error de tipo II**, es el error que se comete cuando no se rechaza la hipótesis nula siendo falsa. Se evalúa calculando la probabilidad de encontrar un resultado falso negativo.

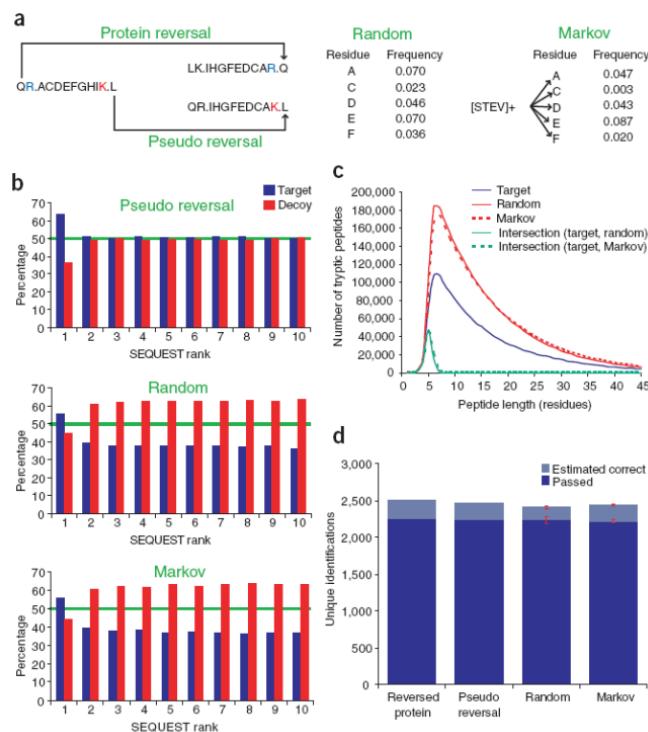


V.2.3. Estrategia Target-Decoy para el cálculo de la FDR

V.2.3.1. Uso de bases de datos señuelo o decoy

Este es un método muy robusto y ampliamente aceptado. Se busca sobre las bases de datos de objetivo y señuelo. Se utilizan los resultados de la base de datos señuelo para estimar el número de falsos positivos en un umbral de puntaje dado.

La base de datos señuelo ("decoy") es una base de datos idéntica a la objetivo ("target") pero invirtiendo el orden de las secuencias de aminoácidos de cada proteína (C-terminal se convierte en N-terminal y viceversa), o invirtiendo las secuencias de aminoácidos de cada péptido, manteniendo los extremos básicos N-terminales (pseudoreversión).



Las bases de datos aleatorias no se comportan de manera idéntica y sobreestiman las tasas de error (la repetición de dominios y/o motivos en la base de datos de objetivo reduce el número total de secuencias únicas).

V.2.3.2. Bases de datos separadas vs bases de datos concatenadas

En las **bases de datos separadas**, la búsqueda se realiza contra las bases de datos objetivo y señalero de forma separada. Para cada puntuación se calcula:

- D: número de péptidos identificados en la base de datos señalero (falsos)
- T: número de péptidos identificados en la base de datos objetivo (total = ciertos + falsos)

La FDR se calcula de la siguiente manera: $FDR = D/T$.

En las **bases de datos concatenadas**, la búsqueda se realiza contra una base de datos compuesta por la base de datos señalero, unida a la base de datos objetivo. En este caso, el número de falsos identificados en cada puntuación equivale al doble de D, y el total equivale a D + T, por lo que $FDR = 2 * D / (D + T)$

El primer método tiende a sobreestimar el número de falsos positivos, porque los espectros MS/MS de alta calidad (que corresponde a asignaciones correctas) tienes a dar puntuaciones altas en la base de datos. El segundo método evita este efecto al permitir que las secuencias objetivo y señalero compitan por los mejores espectros, pero la FDR se calcula en una población "inflada" (contiene D). En la actualidad se prefiere el uso de bases de datos concatenadas y la FDR se calcula como $FDR = D/T$.

V.2.3.3. Uso de Decoys en el modelo bayesiano: adaptación de PeptideProphet

El enfoque de modelado probabilístico de PeptideProphet y la estrategia target-decoy se pueden combinar dentro de un solo marco semi-supervisado. Se utiliza un algoritmo de maximización de expectativas (EM) semi-supervisado para construir un clasificador bayesiano para la identificación de péptidos usando como falsos las puntuaciones "decoy" y como ciertos las puntuaciones "target". Esto permite calcular la FDR además de la PEP.

V.2.4. Percolator y Aprendizaje Automático

Percolator utiliza un método de aprendizaje semi-supervisado automático iterativo, que se entrena para optimizar la separación entre asignaciones "target" y "decoy". Conceptualmente equivale a Peptide-Prophet (con la estrategia target-decoy), pero en vez de usar una función discriminatoria incluye los parámetros de la búsqueda utilizando algoritmos tipo machine-learning. Entrena un algoritmo de aprendizaje automático, Máquinas de vectores de soporte (SVM), para discriminar entre PSM positivas y negativas. Percolator calcula directamente la FDR usando la estrategia target-decoy.

V.2.5. Comparativa entre PEP y FDR

PEP y FDR son parámetros que se basan en la misma distribución de ciertos (target) y falsos (decoy). PEP mide la proporción "local" de falsos en la puntuación

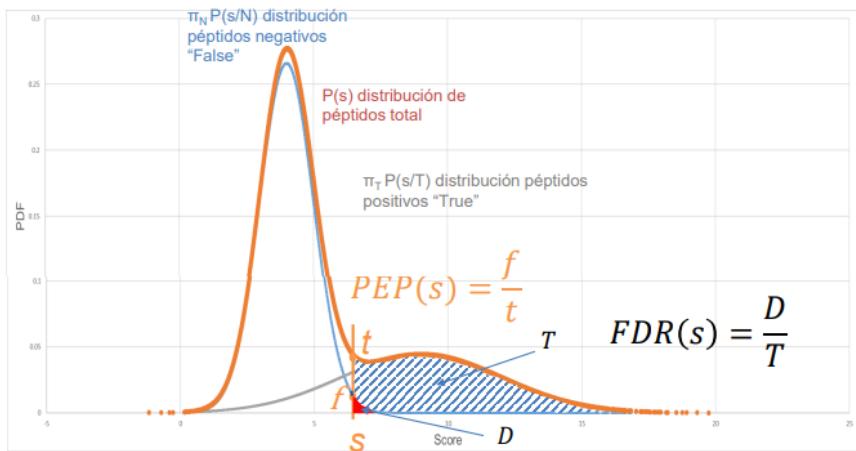
Algorithm 1 The percolator algorithm. The input variables are defined as follows: S = a set of spectra; D = a peptide database; t = the desired FDR threshold; I = the number of iterations. SEQUEST returns, for a given set of spectra, a corresponding set of top-ranked peptides and the respective scores.

```

1: procedure PERCOLATOR( $S, D, t, I$ )
2:    $(P_r, X_r) \leftarrow \text{SEQUEST}(S, D)$                                  $\triangleright$  Compute target PSMs.
3:    $(P_d, X_d) \leftarrow \text{SEQUEST}(S, \text{shuffle}(D))$                    $\triangleright$  Compute decoy PSMs.
4:    $F_r \leftarrow \text{computeFeatures}(S, P_r)$                              $\triangleright$  Compute the corresponding feature vectors.
5:    $F_d \leftarrow \text{computeFeatures}(S, P_d)$ 
6:   for  $i \leftarrow 1 \dots I$  do
7:      $F_r^+ \leftarrow \text{selectByFDR}(t, F_r, X_r, F_d, X_d)$                  $\triangleright$  Select the positive PSMs.
8:      $W \leftarrow \text{trainSVM}(F_r^+, F_d)$                                    $\triangleright$  Train the classifier.
9:      $X_r \leftarrow \text{classify}(W, F_r)$                                      $\triangleright$  Re-rank the PSMs.
10:     $X_d \leftarrow \text{classify}(W, F_d)$ 
11:   end for
12:    $(P_d, X_d) \leftarrow \text{SEQUEST}(S, \text{shuffle}(D))$                    $\triangleright$  Compute new decoy PSMs and features.
13:    $F_d \leftarrow \text{computeFeatures}(S, P_d)$ 
14:   return ( $\text{selectByFDR}(t, F_r, X_r, F_d, X_d)$ 
15: end procedure

```

“ s ” (valor en la curva). FDR mide la proporción de falsos que tienen una puntuación igual o mayor que “ s ” (área de la curva). Por ello PEP se puede interpretar como la FDR “local” en la puntuación “ s ”. PEP es más adecuada para valorar la identificación de una PSM aislada. FDR es la que debe usarse en experimentos a gran escala cuando queremos identificar muchas PSM al mismo tiempo.



Capítulo VI

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas consiste en cuantificar en distintas muestras o situaciones (caso-control, a distintos tiempos, etc). Las mediciones que hay en espectrometría de masas se distinguen en dos enfoques: la cuantificación sin marcaje (label-free) y con marcaje. Dentro de las cuantificaciones label-free hay una relacionada con la cuantificación de los espectros MS2 o mediante picos. Las muestras de cada caso se analizan por separado. En el caso del marcaje, al tener más posibles muestras a analizar, se analizan todas de forma conjunta. De esta forma, se reduce el error entre diferentes tandas, que es el error sistemático del propio espectrómetro.

Las diferencias entre marcaje y label-free son las siguientes:

Características	Label-Free	Marcaje
Uso de etiquetas	No utiliza etiquetas ni marcadores químicos	Utiliza etiquetas químicas o isotópicas.
Multiplexación	No permite multiplexación directa; se analizan las muestras por separado	Permite analizar múltiples muestras simultáneamente mediante etiquetas únicas.
Sensibilidad y precisión	Puede ser menos sensible y preciso, especialmente en muestras complejas	Mayor sensibilidad y precisión en la cuantificación
Flexibilidad	Mayor flexibilidad, no requiere preparación previa con etiquetas	Menor flexibilidad debido al proceso de marcado.
Tiempo de procesamiento	Más rápido, ya que no incluye pasos de marcado	Más lento debido a la preparación y marcado de muestras
Costo	Más económico, ya que no requiere reactivos de marcaje	Más costoso debido al uso de reactivos específicos para el marcaje.
Aplicaciones principales	Estudios exploratorios, análisis de grandes cohortes, biomarcadores emergentes	Ánálisis comparativo detallado, estudios cuantitativos precisos.
Complejidad del análisis	Más simple en términos de preparación de muestras	Más complejo debido a la necesidad de etiquetar y calibrar.
Ejemplos de técnicas	Espectrometría de masas label-free (DDA, DIA)	SILAC, iTRAQ, TMT.

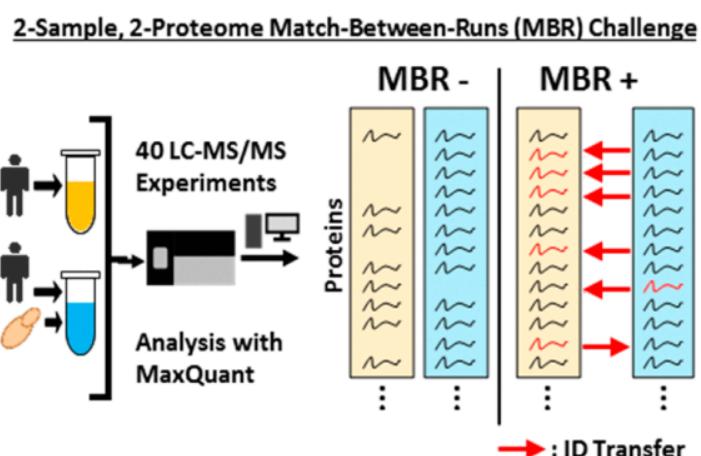
VI.1. Cuantificación con label-free

Las muestras pasan por el espectrómetro de forma separada. Hay dos MS1 por cada muestra (caso y control) con su tiempo de retención, intensidad y masa por carga. A la hora de obtener la cuantificación, se cuenta cada uno de los espectros de fragmentación. Por la cuantificación de espectros se puede llegar a saber la cantidad de proteína que hay para las distintas muestras. Estos espectros identifican luego a un péptido, y el péptido a una proteína.

Para una cuantificación por integración de picos, se tienen en cuenta el área bajo la curva del pico de fragmentación del MS1. Ese área con respecto a la intensidad da lugar a la cuantificación del péptido en cuestión. Para una proteína, se suman las intensidades de los péptidos que definen a esa proteína.

VI.1.1. Estrategia Match-Between-Runs

En función de la dilución, hay péptidos que pueden no ser identificados. La estrategia MBR asigna péptidos no identificados en una muestra desde otra muestra. Se ordenan los péptidos en los tiempos de retención (donde se espera que el péptido sea identificado). Esto se hace para todas las muestras. Luego se ajustan los tiempos de retención entre las muestras. De esta forma, se identifican péptidos en una muestra que falta en otra, migrando así los datos. Esta estrategia hay que cogerla con pinzas al coger falsos positivos de una muestra a otra. Por ello, solo se recomienda hacer en casos con muestras muy parecidas o donde deben aparecer las mismas proteínas.



VI.2. Cuantificación con marcaje

VI.2.1. Cuantificación con SILAC

Este método está pensado para células. Tenemos los cultivos de células, y cada célula se marca con isótopos más pesados. Así, se incrementa la masa carga de las proteínas. Se mezclan los cultivos y se digiere para generar los péptidos. Al tener las muestras con y sin marcaje juntas, los espectros se diferenciarán en la masa carga. Se

ve la abundancia entre cada uno de los péptidos encontrados, comparando la intensidad asociada a cada señal.

VI.2.2. Cuantificación con marcaje iTRAQ/TMT

Con iTRAQ se pueden tener hasta 4 muestras debido a los reactivos a utilizar, mientras que para TMT podemos tener hasta 18 muestras. Los reactivos son específicos para ellos. La particularidad de este marcaje consiste en digerir los péptidos y añadir unos reactivos específicos para cada uno de los canales o de las muestras. Lo novedoso es que la composición química de los reactivos hace que los péptidos tenga la misma masa para cada una de las muestras, apareciendo así con un único pico de intensidad para MS1. El pico más alto (el péptido más intenso) se vuelve a fragmentar para generar el MS2. En el MS/MS hay una región reportera que representa la cantidad del péptido en cada muestra. Para la cuantificación del péptido se mide la intensidad del ion del marcaje. Como los distintos marcas pesan lo mismo en los péptidos o proteínas, se pueden comparar directamente los picos de intensidad al representar la diferencia en la cuantificación de las distintas muestras.

VI.2.3. Cuantificación con péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos se pueden utilizar como estándar interno para comparar la cuantificación de las distintas muestras.

Capítulo VII

Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

Las proteínas se identifican a partir de sus péptidos. Una proteína puede ser identificada por uno o más péptidos. A la hora de valorar las identificaciones a nivel de proteína surgen diversos problemas para los que se han propuesto varias soluciones.

- **Redundancia peptídica:** grupos de proteínas.
- **Cálculo de la FDR a nivel de proteína usando la estrategia target-decoy:** el cálculo de la FDR de proteína se puede calcular a partir de sus péptidos o a partir de la puntuación de la proteína.

VII.1. Redundancia peptídica

Los espectros MS/MS identifican un péptido, pero la secuencia del péptido puede pertenecer a más de una proteína posible. Se dice que los péptidos compartidos entre varias proteínas están "degenerados", y presentan un desafío ya que no puede saberse cuál de las proteínas a las que pertenece está siendo identificada. Esto suele ocurrir con mayor frecuencia en proteínas homólogas, variantes de empalme (alternative splicing) o debido a entradas redundantes en la base de datos de secuencias de proteínas. Los péptidos redundantes son más frecuentes en las búsquedas que utilizan bases de datos grandes.

Los principales enfoques para solucionar la redundancia peptídica son:

- **Péptidos proteotípicos:** se basa en usar solo péptidos cuya secuencia sea exclusiva de una única proteína.
- **Occam's razor:** se basa en el principio de la "navaja de Occam", que sostiene que la mejor explicación de un fenómeno es la explicación más sencilla. Se busca la combinación mínima de proteínas que explique los péptidos observados.

- **Grupos proteicos:** En vez de identificar proteínas individuales se identifican "grupos de proteínas" que comparten péptidos, evitando así la eliminación de proteínas válidas pero sin inflar el recuento de proteínas. Existen varias herramientas (PeptideClassifier, IsoformResolver, PAnalyzer) que difieren en la forma de clasificar y agrupar.
- **Modelos de probabilidad a nivel de proteína (ProteinProphet):** El modelo calcula la probabilidad de cada proteína a partir de las PEP de sus péptidos. Los péptidos se reparten entre las proteínas de acuerdo a la probabilidad de cada una, y se vuelve a calcular la probabilidad de cada proteína. El algoritmo itera hasta que los péptidos quedan "repartidos" entre las proteínas por un factor de peso. Por tanto este modelo asume que cada péptido puede pertenecer a más de una proteína.

VII.1.1. Agrupación de péptidos en proteínas: Grupos de proteínas

De acuerdo a los péptidos compartidos, las proteínas pueden clasificarse de muchas maneras. Las diferentes entradas de la base de datos de secuencias podrían contarse como identificaciones de proteínas separadas cuando, de hecho, todas comparten el mismo conjunto de péptidos y, por lo tanto, son indistinguibles. En la mayoría de los casos, estas redundancias no solo inflan el número total de proteínas informadas como identificadas, sino que también pueden conducir a una interpretación biológica incorrecta de los datos.

El problema se complica aún más cuando no se realiza un análisis estadístico para determinar la validez de las identificaciones de péptidos y proteínas. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una nomenclatura común y un conjunto de pautas para asignar péptidos a proteínas y para interpretar los conjuntos de datos de identificación de proteínas resultantes.

VII.1.2. Agrupamiento de proteínas en PAnalyzer

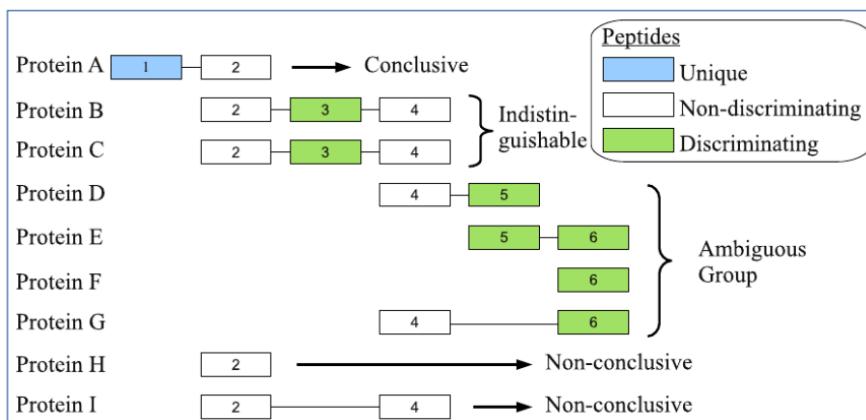
Considera tres tipos de péptidos:

- **Únicos:** asignables a una única proteína
- **Discriminantes:** compartidos por proteínas sin péptidos únicos
- **No discriminantes:** compartidos por proteínas con péptidos únicos o discriminantes

En función de estos péptidos agrupa las proteínas según cuatro tipos de evidencia:

- **Concluyentes:** proteínas con algún péptido único.
- **Indistinguibles:** proteínas con péptidos discriminantes sólo compartidos por ellas y que también comparten el resto de péptidos.

- **Grupo ambiguo:** proteínas que comparten péptidos discriminantes (y no son indistinguibles).
- **No concluyentes:** proteína que sólo tiene péptidos no discriminantes.



Las **proteínas indistinguibles** mayoritariamente se corresponden con isoformas y su grupo con el gen correspondiente. En este caso se podría dar evidencia concluyente a nivel de gen pero no a nivel de isoforma. En los **grupos ambiguos** algunas proteínas tienen que estar presentes, pero no sabemos cuáles. La explicación más sencilla (Occam) no tiene por qué ser la real. Las **proteínas no concluyentes** no tienen por qué estar presentes para explicar los péptidos observados, no deberían "contar".

El algoritmo empleado por PAnalyzer comienza marcando los péptidos únicos y sus correspondientes proteínas como concluyentes. Los péptidos compartidos presentes en proteínas concluyentes serán no discriminantes. El resto de péptidos se recorren formando grupos de proteínas temporales para decidir cuáles son discriminantes y cuáles no. Una vez marcados todos los péptidos se forman los grupos de proteínas definitivos.

VII.2. Cálculo de la FDR de proteína a partir de sus péptidos

VII.2.1. Cálculo de la FDR a nivel de proteína usando la estrategia target-decoy

Igual que los péptidos, la identificación de proteínas puede validarse calculando la FDR a nivel de proteína a partir de la estrategia target-decoy. Cada proteína puede identificarse mediante varios péptidos. La estrategia más sencilla para calcular la FDR a nivel de proteína consiste en llevar a cabo la identificación a nivel de péptido:

- Se calcula la FDR a nivel de péptido usando la estrategia target-decoy
- Se seleccionan los péptidos target identificados correctamente a la FDR considerada

- Se seleccionan también los péptidos decoy por encima del umbral de puntuación
- Los péptidos target se usan para identificar proteínas target
- Los péptidos decoy se usan para identificar proteínas decoy
- Se calcula la FDR a nivel de proteína de la misma manera que a nivel de péptido

$$FDR_{prot} = \frac{\text{Número de proteínas Decoy}}{\text{Número de proteínas Target}}$$

Esta estrategia tiene el problema del hinchamiento de la FDR a nivel de proteína (aún así sigue siendo muy usada hoy en día), que es filtrar los péptidos target y decoy usando la FDR a nivel de péptido, a partir de ellos identificar proteínas target y decoy y a partir de ellas calcular la FDR a nivel de proteína.

VII.2.2. Hinchamiento de la FDR a nivel de proteína

Las identificaciones de péptidos target tienden a concentrarse en las proteínas presentes en la muestra (proteínas reales), mientras que las identificaciones de péptidos decoy se distribuyen aleatoriamente entre las proteínas de la base de datos. Por tanto, la proporción entre el número de péptidos y el número de proteínas es mayor para los péptidos "Target" que para los péptidos "Decoy". Por lo tanto, la FDR a nivel de proteína es siempre mayor que a nivel de péptido. El problema se agudiza en experimentos donde se identifican números altos de proteínas. Este problema se denomina hinchamiento de la FDR a nivel de proteína (protein FDR buildup problem). Para resolver este problema existen varias soluciones:

- Bajar la FDR a nivel de péptido hasta conseguir una FDR aceptable a nivel de proteína. Este método es muy fiable, aunque disminuye mucho la sensibilidad de identificación. Se utiliza en experimentos donde la fiabilidad de la identificación es muy importante
- La estrategia MAYU
- Utilizar puntuaciones a nivel de proteína

VII.3. Modificaciones posttraduccionales

Actualmente se estima que haya 20.000 genes codificantes y 90.000 tránscritos codificantes. Hay distintos tipos de modificaciones que se pueden dar dentro de la célula: acetilaciones y metilaciones en las histonas, cascadas de fosforilación, etc. Por ejemplo:

- La activación de enzimas inactivas, como el tripsinógeno, que se convierte en tripsina activa mediante el corte de un fragmento específico.

- Algunas PTM (como la ubiquitinación) marcan la proteína para su degradación por el proteosoma
- Modificaciones (fosforilación o glicosilación) actúa como una señal para que otras moléculas reconozcan y se unan a la proteína.
- Las histonas pueden ser acetiladas y metiladas en diferentes combinaciones, lo que regula la accesibilidad del ADN y la expresión génica

Las modificaciones posttraduccionales pueden ser reversibles (adición de grupos químicos, polipéptidos o moléculas complejas) o irreversibles (modificación de algún aminoácido o cortes dentro de la proteína).

VII.3.1. Modificaciones posttraduccionales más comunes

Fosforilación: adición y eliminación de grupos fosfato La fosforilación proteica reversible controla gran parte de la actividad del proteoma celular. Esta modificación regula procesos clave como la diferenciación celular, el ciclo celular, el metabolismo y la apoptosis. También juega un papel esencial en la comunicación intracelular y la respuesta inmunitaria. La fosforilación puede activar o inactivar enzimas, reclutar otras proteínas y provocar cambios estructurales o de localización en las proteínas.

Glicosilación: adición de fracciones de azúcar Se unen moléculas de azúcar a las proteínas, formando glicoproteínas. Glicosilación ligada a N, se une en residuos de asparagina (N). Glicosilación ligada a O, se une en residuos de serina (S), treonina (T) o hidroxilisina (Hyl). Modificación crucial para el plegamiento, estabilidad e interacciones celulares de las proteínas. Participa en el control de calidad de las proteínas, protegiendo de la degradación. Implicada en la respuesta inmunitaria y la adhesión celular.

Ubiquitinación: selección de proteínas para su degradación La ubiquitinación, PTM que consiste en la unión covalente de ubiquitina a proteínas diana. Modificación que marca las proteínas para su degradación por el proteasoma, facilitando el recambio y control de calidad de las proteínas. Regula la homeostasis celular, la reparación del ADN, el ciclo celular y las respuestas inmunitarias. Ocurre mediante una reacción enzimática que involucra enzimas E1 (activadoras), E2 (conjugadoras) y E3 (ligasas).

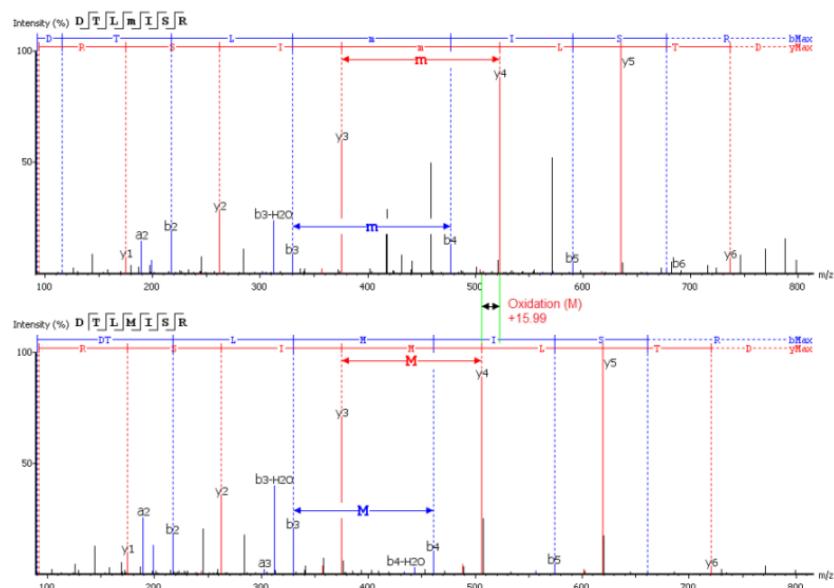
N-acetilación: modificación en el extremo N Ocurre principalmente en residuos de lisina o en el extremo N de las proteínas. Regula la estabilidad de las proteínas, incluyendo su degradación (señal Ac/N-degron). Se asociaba con modificaciones epigenéticas en las histonas y también en proteínas no histónicas bajo control metabólico. Regula la función celular y puede combinarse con otras PTM para generar variantes funcionales. Desempeña un papel fundamental en la actividad y regulación de las proteínas.

Metilación: adición de grupos metilo Modificación que añade grupos metilo a residuos de lisina y arginina. Puede producirse como mono-, di- o trimetilación, lo

que afecta diversas funciones de las proteínas. Papel clave en la regulación epigenética, influyendo en la estructura de la cromatina, la expresión génica y la reparación del ADN. También regula las interacciones proteína-proteína y puede estabilizar las proteínas al impedir su degradación.

VII.3.2. Técnicas de detección de modificaciones posttraduccionales

Para la detección de las modificaciones posttraduccionales hay distintas técnicas: La **espectrometría de masas** caracteriza PTM con alta precisión, usando enfoques de análisis de proteínas. Técnicas basadas en **anticuerpos** (western blot e inmunoprecipitación) detectan y aislan proteínas modificadas. Los **ensayos funcionales** evalúan cómo las PTM afectan la actividad de las proteínas. **Tecnologías emergentes** como Biold y APEX estudian interacciones proteína-proteína en células vivas.



Capítulo VIII

Metabolómica

VIII.1. Introducción a la metabolómica

Los metabolitos son moléculas pequeñas presentes en fluidos biológicos, compartimentos celulares o tejidos. Se dividen en cinco categorías:

1. Compuestos endógenos reales: Originados por reacciones enzimáticas bajo el control del genoma del huésped.
2. Factores esenciales transformados por el metabolismo: Como aminoácidos esenciales, vitaminas y cofactores.
3. Metabolitos derivados del co-metabolismo: Productos de la interacción entre el huésped y microorganismos (por ejemplo, la modificación de ácidos biliares por la microbiota intestinal).
4. Moléculas externas convertidas en compuestos endógenos.
5. Xenobióticos: Sustancias externas que influyen en el metabolismo del huésped, ya sea como productos o mediante interferencia.

La metabolómica es el estudio del conjunto completo de metabolitos presentes en una célula o tejido bajo un conjunto específico de condiciones (conocido como metaboloma), generando un perfil bioquímico. Este perfil describe la bioquímica que define diferentes estados fisiológicos, incluyendo estados patológicos, que una célula o tejido puede adoptar.

Los objetivos de la metabolómica son identificar, caracterizar y cuantificar todas las moléculas biológicas que están involucradas en la estructura, función y dinámica de una célula, tejido u organismo.

1. Detección de cambios en el perfil metabólico de una enfermedad o condición
2. Comprender le mecanismo patológico/fisiológico en la base de una condición particular
3. Nueva estratificación de pacientes

4. Evaluar nuevas respuestas al tratamiento
5. Identificación de biomarcadores potenciales
6. Desarrollo de nuevas herramientas pronósticas y diagnósticas

Hay tres estrategias fundamentales:

- Targeted analysis: tenemos un solo metabolito de interés
- Profiling analysis: nos centramos en metabolitos específicos según su estructura química y/o actividad biológica
- Un-targeted: sin sesgo, cribado global por clasificación de muestra

VIII.2. Flujo de trabajo

VIII.2.1. Diseño experimental

Buen conjunto de muestras correctamente clasificadas para evitar resultados impulsados por la variabilidad. Los grupos deben ser representativos del problema en estudio. Estudio en humanos: los participantes deben coincidir en edad, sexo, comorbilidades y IMC (BMI); los controles y la enfermedad deben definirse mediante pruebas de diagnóstico adecuadas. Estudio en animales o *in vitro*: modelo biológico representativo del problema en investigación. El diseño debe ser adecuado de acuerdo con las técnicas y el equipo disponibles. Aprobación del comité de ética. El muestreo debe ser realizado directamente por personal especializado utilizando protocolos estandarizados.

VIII.2.2. Colección de muestras

Los **tejidos** contienen información relacionada con alteraciones específicas *in situ*: los cambios bioquímicos y la regulación upstream aparecen primero en el tejido y luego en los biofluidos. Los **fluidos no endógenos** se obtienen mediante diversos procedimientos y son más adecuados para revelar mecanismos celulares cuando no se pueden utilizar tejidos. Los **biofluidos** reflejan tanto cambios sistémicos como localizados. Las **muestras *in vitro*** pueden reproducir alteraciones *in situ*.

VIII.2.3. Tratamiento de muestras

1. **Descongelar la muestra en un baño de agua y hielo.** Esto es crucial para preservar la integridad de los metabolitos y evitar cambios químicos durante el proceso.
2. **Detención rápida de reacciones y extracción:** La muestra se somete a un proceso de "quenching" para detener rápidamente cualquier actividad metabólica o enzimática y, luego, se realiza la extracción de los metabolitos presentes.

3. **Secado:** Los componentes extraídos se someten a un proceso de secado (liofilización o deshidratación), para eliminar cualquier rastro de solvente y conservar los metabolitos en un estado seco.
4. **Re-suspender en un solvente adecuado:** Finalmente, la muestra seca se re-suspende en un solvente adecuado para su análisis posterior.

VIII.2.4. Análisis de las muestras

Las muestras se pueden analizar por espectrometría de masas, al igual que en proteómica.

VIII.2.5. Tratamiento de datos

Toda la información obtenida de los datos es difícil de cuantificar por Missing Values, mucho ruido y muchas variables. Los datos se preprocesan para ajustar determinados picos de masas por si ha habido pequeñas descalibraciones entre muestras. Transformar los datos sin procesar en una matriz que contenga la lista de las características observadas con sus áreas de pico o intensidades relativas para cada muestra en un experimento determinado. Los metabolitos se extraen y se agrupan caracterizaciones con las mismas ionizaciones y masa para reducir las caracterizaciones de los metabolitos.

A partir de los datos crudos se limpia la matriz:

- Filtrar por frecuencia: reducir el conjunto de datos en función de la diferencia biológica dentro de las muestras
- Filtrar por variabilidad: eliminar resultados irrelevantes y no reproducibles, cuando la variabilidad analítica es mayor que la variación biológica.
- Reemplazo de valores ausentes: los datos no disponibles para el análisis se pueden deber por una señal no presente o por debajo del límite de detección o por un error de software durante la extracción de características.
- Corregir la heterocedasticidad reduciendo el impacto de posibles valores atípicos y convirtiendo los datos en una distribución más normal tipo Gaussiana.
- Normalización para minimizar el error sistemático en los datos debido a la variación en las concentraciones de metabolitos, la sensibilidad y el rendimiento del instrumento, haciendo que los espectros sean comparables entre diferentes análisis.
- Escalado: importancia de ajustar las variables del modelo dividiendo cada una de ellas por un factor de escala diferente.

VIII.2.6. Análisis estadístico

Se clasifican las muestras para establecer correlaciones entre variables, identificar variables significativas y ayudar a evaluar la calidad de todo el experimento. En el univariate data analysis se prueba la significancia estadística de compuestos individuales entre diferentes grupos de muestras. Para el multivariate data analysis, son estrategias útiles para modelar datos complejos para reducir y resumir la gran cantidad de variables en unas pocas variables latentes que expliquen la correlación existente simultáneamente entre ellas.

VIII.2.7. Identificación de metabolitos

No existe un código genético subyacente del cual se pueda deducir la composición química. Solo cuando tenemos metabolitos rigurosamente identificados, podemos involucrarnos completamente en la descripción de las vías metabólicas e integrar el metabolismo con otros niveles de la jerarquía biológica

VIII.2.8. Hipótesis

Los metabolitos son el resultado de procesos bioquímicos, como las cascadas de señalización. A través de ellos podemos reconocer vías alteradas y obtener una visión general de todos los cambios metabólicos que ocurren en una enfermedad. Pueden estar conectados con proteínas, transcritos y datos ambientales, lo que lleva a la revelación de biomarcadores en diferentes niveles.

VIII.2.9. Validación

La validación es fundamental para probar los hallazgos estadísticos. La efectividad de los biomarcadores candidatos como herramientas diagnósticas o pronósticas debe ser evaluada en una población amplia. Se requieren estudios clínicos para confirmar el posible uso de estas moléculas en un procedimiento rutinario. El mecanismo potencial debe ser confirmado en ratones knockout, donde las vías involucradas son estimuladas a propósito o inhibidas por modificaciones genéticas.

Entre los desafíos se encuentran las inconsistencias en los biomarcadores identificados entre experimentos similares, la necesidad de equipos interdisciplinarios y un biobanco de gran población.

VIII.3. Metabolómica dirigida

Para la metabolómica dirigida, se extraen los metabolitos con protocolos adaptados según la naturaleza del biomarcador candidato. Los métodos dirigidos de LC-MSMS son específicos, sensibles y rápidos para analizar un gran número de muestras. En cuanto a la cuantificación, se utilizan MS para obtener la concentración de metabolitos. Se utiliza un estándar interno marcado con isótopos estables, compuestos donde varios

átomos del analito son reemplazados por sus respectivos isótopos estables. Al tener las mismas o similares propiedades físicas y químicas que el analito, pueden añadirse con una concentración conocida a las muestras antes de la extracción de metabolitos.

Parte III

Regulación Genómica y Epigenómica

Capítulo IX

Introducción y regulación genómica

IX.1. Avances impulsados por el Proyecto Genoma Humano

El coste del proyecto genoma humano fue equivalente a mandar el hombre a la Luna, por lo que tuvo un gran impacto a nivel global y de humanidad. Cambió la visión de la biología. Entre los avances se encuentran:

- Datos democratizados, públicos, disponibles gratuitamente online a la información.
- Mapa genético y físico: alrededor de 21.000 genes y conocemos su localización en el genoma, aún más sus interacciones 3D
- Desarrollo de nuevas tecnologías: secuenciación
- Identificación genética: conocemos el mapa de posición y rastreamos las consecuencias de las variaciones.
- Aplicación de técnicas bioinformáticas y de machine learning

Nota rápida: Margaret Oakley Dayhoff fue la pionera en el campo de la bioinformática. Dedicó su carrera a la aplicación de tecnologías computacionales en biología y medicina, principalmente mediante la creación de bases de datos de proteínas y ácidos nucleicos, así como de herramientas de acceso a historias cortas.

Luego se vivió la revolución de la secuencia del genoma humano. Se desarrollaron muchos proyectos de cáncer, transcriptómica, aumento de las bases de datos, etc.

IX.2. Regulación genómica

La regulación genómica controla cuándo, dónde y cuánto se expresan los genes.

IX.2.1. Estructura del ADN y elementos reguladores

Siendo muy simplista, el ADN se divide en la hebra simple, que se empaqueta con las histona hasta llegar al cromosoma completamente compactado. La regulación va de esto: cómo se empaqueta y desempaquetan el ADN para que se produzcan distintos sucesos (la transcripción fundamentalmente).

Los genomas son muy complejos, ya que más de 10x y 30x del ADN es necesario para codificar proteínas. Los genomas se pueden clasificar en regiones codificantes (exones) y regiones no codificantes, entre los que se encuentran intrones, regiones intergénicas, regiones reguladoras (promotores, potenciadores, regiones silenciadoras, insulatores, generalmente relacionados con la actividad de los factores de transcripción), pseudogenes (relacionados con genes pero que han perdido actividad debido a un proceso mutacional), regiones repetitivas (regiones satélite, retrotransposones, SINE, LINE, ...) y regiones transcritas no codificantes (miRNA, siRNA, piRNA, lncRNA). Éstos últimos se analizan como si fueran datos transcriptómicos, cuantificándolos.

Entre los elementos reguladores destacan:

- Promotores: regiones que inician la transcripción mediante TATA box, CAAT box, GC box
- Enhancers: aumentan la expresión de genes distantes. Esto es muy complicado de encontrar en la inmensidad del genoma al no estar caracterizados.
- Silencers: reprimen la transcripción de genes distantes. También son difíciles de caracterizar computacionalmente.
- Insulatores: aíslan regiones para prevenir efectos reguladores no deseados. Estas regiones están asociadas a determinadas proteínas.

Un gen empieza por un promotor y tiene distintos exones e intrones. El gen termina en una señal de poliadénilación. Las regiones promotoras son segmentos del ADN que precede los sitios de iniciación de los sitios de transcripción (transcription start site). Esta región atrae la ARN polimerasa.

IX.2.2. Predicción de genes y motivos de ADN

Existen regiones del ADN con secuencias que permiten predecir la presencia de genes, como el transcription start site. Ahora mismo ya no es un gran reto porque hay muchas bases de datos sobre esto (por ejemplo, [EPD](#)), pero se utiliza mucho en el laboratorio, teniendo que hacer un fine-tuning.

Los estudios CAGE capturan los inicios de la transcripción de forma experimental. Se marca el inicio del ARN mensajero con un cap para seguirlo y detectarlo. FANTOM es un buen recurso para asignar anotaciones funcionales a los tránscritos.

IX.2.3. Detección de enhancers

Los enhancers son complicados desde el punto de vista bioinformático al tener varias conformaciones distintas. Además, como pueden estar lejos en el espacio, no conocemos

la distancia concreta. Otras veces se necesitan varios factores de transcripción hasta llegar a unirse a la polimerasa en el promotor, y en otras ocasiones se forma un loop. Aquí no hay números, por lo que su estudio es complejo. Pero como esto es lo que más regula la expresión de los genes, es un campo en auge.

No siempre es 1 enhances - 1 gen, si no que puede haber 1 enhancer para varios genes, afectándolos de formas distintas, aumentando su complejidad. Si sabemos que unas proteínas necesitan un determinado enhancer, con datos de ChIP-Seq sí se podría localizarlos.

Con los silenciadores, el concepto es el mismo, pero con el efecto contrario.

Por convenio, se buscan promotores en 1 kilobase, pero la decisión está en el bioinformático. No es lo mismo decidir 1 kb que 5 kb, y esta decisión afecta posteriormente al análisis de enriquecimiento.

IX.2.4. Motivos de unión a factores de transcripción

Los factores de transcripción se unen al promotor para afectar al gen. Estos factores tienen motivos concretos de unión, lo cual facilita el análisis al poder escanear todo el genoma en busca de ese motivo. Pero hay varios problemas:

- Consensos a menudo mal definidos, no siempre son perfectos al poder cambiar alguna base, tener una base más o menos.
- Secuencias no conservadas dentro de las especies, y peor aún entre especies, por lo que no vale buscar el motivo en una especie para aplicarlo en otra.
- Ejemplos de enhancers conservados funcionalmente pero no conservados en su secuencia, por lo que encontrar motivos de unión puede ser complicado.
- La mayoría de los datos de secuencias de TFBS proceden de unas pocas especies: ratón, humano y poco más.
- Muy a menudo son experimentos *in vitro*, pero poco a poco está aumentando ChIP-Seq.
- 2 sitios de unión completamente diferentes podrían fusionarse en la misma matriz/consenso.

Una matriz tiene una fila para cada secuencia y una columna para cada posición. Se cuentan así las bases para cada posición, calculando el consenso. Gracias a estas matrices se pueden buscar los motivos en el genoma. Esto se puede representar después con logos, en el que el contenido de información de la columna de una matriz va desde 0 hasta 2.

Bases de datos a utilizar es TRANSFAC, pero es de pago. No obstante, hay programas que pagan para poder utilizar la base de datos dentro, por lo que es una de las más utilizadas. Esta base de datos tiene un score de calidad:

1. Sitio de unión al factor de transcripción confirmado funcionalmente

2. Unión de proteína pura (purificada o recombinante)
3. Actividad de unión caracterizada inmunológicamente de un extracto celular
4. Actividad de unión caracterizada mediante una secuencia de unión conocida
5. Unión de proteína de extracto no caracterizada a un elemento de buena fe
6. Sin calidad asignada

Otra base de datos es JASPAR. Permite elegir los factores de transcripción y sus matrices, la especie, etc.

IX.2.4.1. Ejercicio

Nos vamos a Ensembl y nos descargamos la región codificante del gen BRCA2. Una vez en Jaspar, en la búsqueda seleccionamos el genoma humano y seleccionamos todos los factores de transcripción. A la derecha hay varias opciones y debemos seleccionar Scan. Pegamos la secuencia en FASTA y podemos especificar el umbral de puntuación del perfil relativo.

IX.2.5. Descubrimiento de patrones

Es posible encontrar motivos desconocidos mediante el análisis del genoma completo, clusterizando y realizando análisis. Además, se pueden realizar estadísticas como frecuencia esperada y observada. A veces no es necesario coger el genoma completo. Por ejemplo, para analizar solo enhancers, se puedes coger regiones que ya se han establecido como enhancers. Hay programas que no lo permiten, pero en otras ocasiones se puede especificar o poner una "black list".

Los factores de transcripción pioneer se unen a determinadas regiones para estirar el ADN y liberar los genes para su transcripción. Estos son difíciles de trabajar, ya que se unen a zonas con nucleosomas, siendo complicado establecer sus motivos de unión. Al recibir un fichero con datos de ChIP-Seq de estos factores de transcripción, es importante conocerlo para adaptar el análisis.

Otras herramientas útiles son:

- MEME-Suite: tiene muchas herramientas para identificar secuencias, clusterizar, etc.
- HOMER Motif Analysis: sirve para motivos de unión, pero también Hi-Seq, análisis funcional, etc.
- RSAT: está separado en hongos, procariotas, plantas, etc.
- TRAP

IX.2.5.1. Ejercicio

Desde GEO, nos descargamos los picos del experimento GSE47535 y eliminamos la primera línea. Convertimos el BED en FASTA y lo analizamos con Meme-Suite.

Capítulo X

Epigenética

La epigenética se ha definido de muchas maneras a lo largo del tiempo. Primero fue el estudio entre la interacción entre genes y el ambiente. Posteriormente fue el estudio de los mecanismos que controlan la actividad de los genes durante el desarrollo. En el 2009 ya se definió como el estudio de los fenotipos hereditarios resultantes de cambios cromosómicos sin alteraciones en la secuencia del ADN. Ahora se podría definir como el estudio de la organización cromosomal y la regulación de la actividad genómica sin cambio nucleotídico.

La genética estudia la secuencia primaria del ADN y sus cambios, mientras que la epigenética estudia la modificación química en el ADN y proteínas asociadas sin cambios de secuencia. En un nucleosoma hay 8 histonas, y se buscan cambios químicos en el ADN y las histonas. También puede haber distintas conformaciones de las histonas. Lo más importante son las colas de las histonas, ya que es donde se darán los cambios.

X.1. Mecanismos epigenéticos

Hay fundamentalmente cuatro mecanismos epigenéticos:

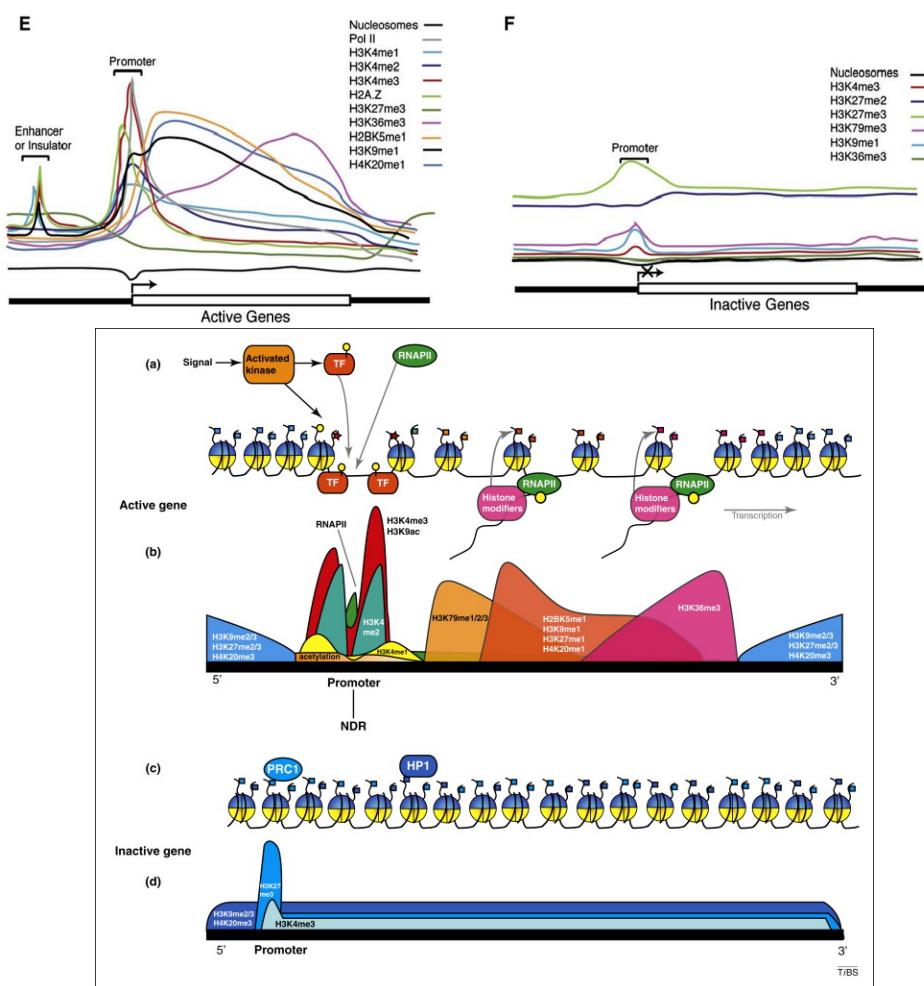
- Modificación de histonas
- Cambios de composición de histonas
- Modificaciones de citosina
- Interacción de modificadores de cromatina

X.1.1. Modificaciones de histonas

Hay varias, pero las principales son acetilación, metilación, ubiquitinación, sumoylación y fosforilación. Las modificaciones se han asociado a distintas funciones. Es importante saber con qué tipo de histonas se trabajan y qué residuos de las colas pueden tener esas modificaciones. También hay que saber la anotación: H3K27me3 significa que en la histona 3, en la lisina 27 hay una triple metilación.

Las modificaciones de las histonas se van a combinar entre ellas, por lo que el análisis se puede complicar. Las modificaciones tienen distintas acciones: escribir cosas, borrar o leer. Algunas modificaciones son compatibles, mientras que otras son incompatibles. En estudios en bulk, las pequeñas diferencias son importantes al poder indicar pequeñas subpoblaciones. Algunas modificaciones de histonas se han relacionado con enhancers unirse con factores de transcripción.

Muchas de las histonas están ya estudiadas y tienen unos perfiles conocidos. Esto ayuda a la hora de analizar un perfil para saber qué esperamos. Las histonas son mecanismos generales, no específicos, teniendo que salir perfiles iguales. Para histonas activadoras, la densidad es muy superior al background. El problema está con las histonas inhibidoras, ya que la densidad es similar al background. Las señales no son tan grandes, y los peak callers funcionan muy mal en general, teniendo que utilizar log ratio.



Como cada vez aumenta la capacidad computacional, la cantidad de muestras también aumenta. Hay estudios con 10.000 mapas epigenómicas de 800 muestras. Esto permite ver las modificaciones de histonas en distintos tipos celulares y tejidos.

Epimap es un repositorio de mapas epigenéticos de 15.000 datasets.

X.1.2. Cambios en la composición de histonas

Las histonas se detectan con anticuerpos o ChIP-Seq. Se han estudiado las distintas combinaciones de las histonas que tienen funciones distintas. Para el ChIP-Seq, se utilizan anticuerpos que se unen a la histona. Mediante DNAsas se recorta el ADN y se libera el anticuerpo. En estos experimentos se necesita un control para evaluar los picos. Esto habitualmente se hace igual, pero sin anticuerpo. Las densidades de las secuencias se mapean y se compara cómo de denso es el pico frente al control.

Las modificaciones de la cromatina coexisten en regiones genómicas. Por ello se han generado distintos modelos:

- Modelo combinatorio: Combinación de modificaciones específicas de las histonas que codifica
- Modelo aditivo: La suma de los efectos individuales de las modificaciones de las histonas que contribuye a la estabilidad y robustez.

X.2. Métodos de segmentación

El objetivo es combinar las distintas modificaciones de las histonas para detectar diferentes estados funcionales de la cromatina en todo el genoma. Se quieren revelar elementos funcionales sin tener que mirar la secuencia. De esta forma, se puede aprender *de novo* patrones espaciales y combinatorios de marcas de cromatina. También se utiliza mucho para anotar genes.

Una herramienta para esto es ChromHMM. Las histonas tienen dos estados: datos conocidos (los picos en el genoma) y los datos no conocidos (estados de cromatina). La herramienta utiliza los modelos ocultos de Markov.

Se crean ventanas del genoma de 200 pares de bases. Con estos fragmentos se calculan enriquecimientos individuales de cada modificación de histona (presencia o ausencia, binario). Se entrena un modelo de Machine Learning con todas las modificaciones de histonas y tipos celulares al mismo tiempo. Algo no resuelto es la cantidad de estados que hay que entrenar, por lo que hay que probar. La recomendación genera es definir los estados como el mínimo número de variables con interpretación biológica. Se intenta anotar con ayuda de datos externos como RefSeq o distancia a TSS, CpG, etc. Una vez con el modelo creado, se utiliza el genoma de las muestras y se segmenta el genoma de las muestras para ver el estado de cada una de las ventanas. Si algunos estados son muy similares, se pueden agrupar a posteriori.

X.2.1. Determinación de Estados de Cromatina a partir de Datos de ChIP-Seq

Nos descargamos ChromHMM. Funciona tanto en Linux como en la CMD de Windows. En el directorio con el programa, ponemos `java -mx1600M -jar ChromHMM.jar LearnModel SAMPLEDATA_HG18 OUTPUTSAMPLE 10 hg18`, y se debe ejecutar y crear un `webpage_10.html`. Ahora nos vamos a descargar los

datos. Para la práctica, se nos han facilitado los ficheros ya procesados, pero habría que descargarlos (`wget wgEncodeBroadHistoneMonocd14ro1746*AlnRep*.bam`), eliminar duplicados (`samtools rmdup -s <file>.bam <file>_RM.bam`), convertir bam a bed (`bamToBed -i <file>_RM.bam > <file>_RM.bed`).

En la carpeta CHROMSIZES creamos un fichero `hg19_chr16.txt` y escribimos `chr16 90354753` separado por tabulador. Ahora debemos crear `config_chromHmm_bin.txt` como se indica en el manual: `cell1 mark1 cell1_mark1.bed cell1_control.bed` separado por tabuladores.

El siguiente paso es binarizar los datos en ventanas de longitud 200pb. `java -jar ChromHMM.jar BinarizeBed -c ./input/ ./CHROMSIZES/hg19_chr16.txt ./archivos/config_chromHmm_bin.txt ./RESULTS`

Ahora vamos a entrenar modelos HMM para los distintos estados. No conocemos los estados, por lo que entrenamos varios para ver cuál es el mejor. Empezamos por un modelo con 8 estados y repetimos para 9-11: `java -jar ChromHMM.jar LearnModel -i Master_8 -l ./CHROMSIZES/hg19_chr16.txt -printposterior -printstatebyline ./RESULTS ./RESULTS/LearnModel_8 8 hg19`

```
java -jar ChromHMM.jar LearnModel -i Master_9 -l ./CHROMSIZES/hg19_chr16.txt -printposterior -printstatebyline ./RESULTS ./RESULTS/LearnModel_9 9 hg19
```

```
java -jar ChromHMM.jar LearnModel -i Master_10 -l ./CHROMSIZES/hg19_chr16.txt -printposterior -printstatebyline ./RESULTS ./RESULTS/LearnModel_10 10 hg19
```

```
java -jar ChromHMM.jar LearnModel -i Master_11 -l ./CHROMSIZES/hg19_chr16.txt -printposterior -printstatebyline ./RESULTS ./RESULTS/LearnModel_11 11 hg19
```

Abrimos por ejemplo el report `website_11_Master_11.html`. El primer heatmap representa los estados con las marcas epigenéticas. Después hay un plot de transición de estados, en el cual se representa la probabilidad de pasar de un estado a otro contiguo.

Entre los archivos resultantes, se ha generado un txt con el modelo generado. Esto es muy útil si recibimos muestras nuevas con las mismas marcas epigenéticas, ya que no es necesario volver a ejecutar todo. No obstante, si hubiese alguna marca nueva no incorporada en el modelo, sí habría que replicar el procedimiento anterior.

Cuando hay replicados, se puede crear una regla en la que nos quedemos con regiones en las que x replicados muestren un mismo estado para poder definir la región a nivel biológico. En otros casos, tenemos un solo replicado. Como referencia, nos podemos quedar con aquellos estados con una probabilidad posterior mayor del 0.95.

Ahora hay que comparar los modelos. Creamos una carpeta `Compare` en la que copiamos los ficheros `emissions.txt` de los cuatro modelos ahí. Ahora ejecutamos el siguiente comando:

```
java -jar ChromHMM.jar CompareModels ./RESULTS/LearnModel_11/emissions_11_Master ./RESULTS/Compare/ ./RESULTS/Compare/Model_compared.
```

X.3. Epigenómica - Visualizador UCSC

Se necesita visualizar los datos con los que se trabaja. El control de calidad indica la calidad de las lecturas obtenidas en secuenciación, pero no da información sobre lo buen o mal genoma que es. Para ello, se debe visualizar. El visualizador más utilizado es el UCSC Genome Browser. Seleccionamos la herramienta Genome Browser y elegimos un mirror. Importante acordarnos del mirror. Una vez ahí elegimos el ensamblaje (lo mantenemos por defecto) y buscamos el gen CD69. Esto nos lleva directamente al visualizador de la región. Se puede hacer zoom in y zoom out, movernos, etc. Las flechitas en el gen indican hacia dónde se transcribe.

En el propio visualizador viene mucha información por defecto. Primero hay una representación del gen con su orientación. También hay fenotipos alélicos, SNPs anotados en la base de datos dbSNP. Se incluye un track con GTEx que muestra el nivel de expresión del gen, elementos regulatorios de ENCODE. Otros tracks incluyen la representación en vertebrados, regiones repetidas, etc.

En la parte inferior hay multitud de información que se puede cargar de otras bases de datos o publicaciones. Todos los que pone "hide" no están activos en el visualizador. Hay información de secuencia y mapping, información de genes, fenotipos y variantes, variación, pangenoma humano, ARNm, expresión, single-cell ARN, genómica comparativa, etc.

En la pestaña de "configure" se puede personalizar el visualizador para ponerlo al gusto de cada uno o prepararlo para alguna figura de un paper.

X.3.1. Tracks epigenómicos

El principal track epigenómico es el de ENCODE. Se puede personalizar y descargar los datos.

Todo esto es para bajar regiones concretas. Para un track completo, sería mejor ir a la pestaña de Downloads.

En la pestaña My Data se pueden subir los ficheros propios con un ensamblaje concreto. Se puede salvar la sesión creándose una cuenta. Además, la sesión se puede enviar a otras personas, compartiéndola y trabajando de forma colaborativa (aunque no se pueden ver los cambios).

Hay Track Hubs con datos externos que se han compartido, pero no están validados por UCSC. Esto puede ser interesante para datos de otros grupos de investigación o líneas celulares y experimentos concretos. Cuando tenemos muchos experimentos, podemos crear nuestro propio Track Hub con un FTP propio para poder subir todos los datos, además de poder enlazarlo con publicaciones científicas.

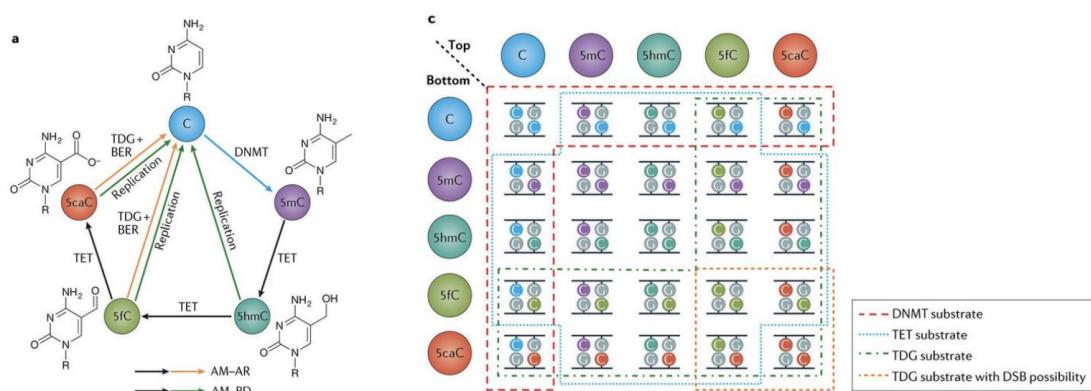
X.4. Mecanismos epigenéticos (continuación)

X.4.1. Metilación de citosinas

La metilación está presente en plantas, hongos, vertebrados e invertebrados. Es heredable y reversible. Modifica el fenotipo, pero no el genotipo. Esto significa que es un cambio en la citosina, pero que no cambia el nucleótido. Puede ser alterado por factores ambientales. Produce cambios estructurales y cambia la afinidad de los factores de transcripción a sus motivos de unión.

Aunque sea un cambio reversible, actualmente no se conoce el mecanismo por el que una citosina metilada pasa a no estar metilada en el ADN. Un alto nivel de metilación en promotores está asociado en silenciar genes. La metilación ocurre en un mayor nivel en las islas CpG, que suelen ser precisamente partes de las regiones promotoras de genes. No obstante, hay también en otros contextos. Cuando el ADN está metilado, se une a las histonas de forma más compacta, haciendo que el ADN no se pueda transcribir.

Existen otras conformaciones de citosinas. Desde la citosina nativa, se puede pasar a 5mC, 5hmC, 5fC y 5caC. No hay un mecanismo directo para volver de una citosina metilada a una citosina nativa, usualmente debe pasar por replicación. La modificación predominante es la metilación, las demás son minoritarias.



Hay varias formas de medir la metilación en el ADN. Una técnica puede ser **afinidad por enriquecimiento con anticuerpos**. Esto es relativamente barato, pero aporta una resolución baja. Además, tiene un sesgo en cuanto a la variación del número de copias en regiones con alto contenido en GC. Se puede medir con distintos tipos de assays, pasando de arrays a nanopore.

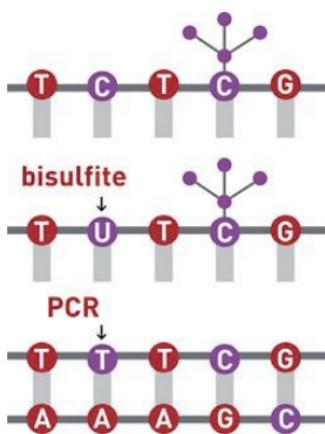
Hasta hace no mucho no se podía identificar a tiempo real y a nivel de moléculas únicas, la metilación de citosinas. Recientemente se consiguió hacer secuenciación single-cell para la metilación, pero todavía no está muy extendido al ser complejo.

Dependiendo de los métodos, vamos a ir de un procesamiento de los datos bajo a complejo y cantidad de información. Las técnicas de NGS tenían un procesamiento relativamente bajo y se obtiene una gran cantidad de CpGs analizados por secuencia. Los arrays tienen un procesamiento muy complejo, y no da tanta información. No obstante, muchos datos públicos están hechos con Infinium 450K, ya que estuvo muy de moda hace 20 años. Siempre se necesita un control de muestra para saber si hay cambios entre la metilación o no. Así, se deben hacer varios experimentos. Por ejemplo,

teniendo tejido normal y tumoral, en ambos se deben añadir anticuerpos, y luego hacer un control sin anticuerpo o con uno inespecífico.

Actualmente, Infinium 450K se dejó de vender y se sustituyó por MethylationEPIC. Este kit permite identificar sitios CpG fuera de las islas de CpG, sitios metilados no CpG en células madre humanas, sitios metilados diferencialmente en tumor vs tejido normal, enhancers de FANTOM5, etc.

La alternativa a los anticuerpos es la **técnica basada en conversión con bisulfito**, la cual tiene una resolución a nivel de nucleótido único, pero tiene un trabajo computacional intensivo. Las citosinas no metiladas se convierten en uracilos, mientras que las metiladas no se modifican. Por tanto, en una lectura de PCR, los uracilos se leen como timinas por la polimerasa.



Esto no deja de ser una modificación química, y se han descrito muchas otras reacciones, aunque el bisulfito sea el más habitual. Para mirar otro tipo de modificaciones, se pueden utilizar otras reacciones que produzcan otros cambios químicos en el ADN. El proceso del bisulfito no distingue entre citosinas metiladas, hidroxi-metiladas, formi-metiladas, etc. En determinados escenarios de desarrollo, experimentos de bisulfito no permite distinguir los tipos de modificación de la citosina. Esto también es importante para trabajos en tejido cerebral; para otros estudios puede no ser importante.

Hay dos protocolos de bisulfito: direccional y no direccional. Ahora se puede identificar si la lectura viene de una hebra o de otra.

Hay dos tipos principales de alineadores. Los wild-cards reemplazan las citosinas por Y en las lecturas secuenciadas. Los alineadores de tres letras convierten la citosina en timina en las dos lecturas secuenciadas y en el genoma de referencia. Los wild-cards hacen alineaciones más precisas y consistentes entre réplicas, y son más eficientes en el uso de memoria y tiempos de ejecución. Pero introducen un sesgo al alza en los valores de metilación. Tras el alineamiento frente al genoma de referencia, se cuenta el número de citosinas (metiladas) y timinas (citosinas no metiladas) en la misma posición para ver el ratio. Para los wild-cards se permite el alineamiento con mismatches de Y en posiciones de C.

Hay una herramienta llamada BioTools que tiene muchas herramientas para las ómicas. Es de la empresa Élixir, una empresa europea que representa la infraestructura

de los datos. Es federado al tener distintos nodos, uno por país y tener muchas comunidades de trabajo. Mantienen el catálogo de herramientas BioTools.

Una vez con la secuencia, el resto de los análisis son bastante triviales. Se hace lo mismo que con el resto de estudios, solo cambia el alineamiento. Se utiliza fastqc para ver cómo ha ido la secuenciación, se visualiza de distintas formas, se obtiene un score de metilación, se pueden anotar las citosinas en función de su localización genómica (región de enhancers, promotor, etc), metilación diferencial, clasificadores, etc.

Factores que afectan a la precisión de los resultados son el proceso de bisulfitado (no todas las citosinas se van a convertir en uracilo) y el alineamiento, que dependiendo del método puede ser más complejo.

X.4.1.1. Ejercicio: generación de datos sintéticos de bisulfito

Queremos crear 150.000 lecturas direccionales de bisulphite-seq de 70 pares de base con aproximadamente 50 % CpG.

```
./Sherman -l 70 -n 150000 -genomefolder./ --CG50 --CH2 -e0.5 >  
bisulphite-in-silico.txt
```