1 Введение

Метионин — серосодержащая аминокислота, играющая роль в метаболизме *Escherichia coli*. Он участвует в инициации трансляции и синтезе S-аденозилметионина. Биосинтез метионина из аспартата представляет собой многостадийный процесс, регулируемый на транскрипционном уровне.

Регуляция осуществляется через репрессор MetJ, который связывается с палиндромными операторными последовательностями (мет-боксами) в промоторах генов метаболического пути. Идентификация консервативных регуляторных мотивов в промоторных областях этих генов позволяет понять механизмы транскрипционного контроля. В данной работе мы анализируем промоторные области генов биосинтеза метионина у *E. coli* с использованием инструментов MEME (основанного на EM-алгоритме) и Gibbs Sampler (стохастический метод).

2 Методы

Выбор метаболического пути и организма

Для исследования был выбран биосинтез метионина из аспартата (KEGG pathway `eco00270`).

Организм: *Escherichia coli* K-12 (KEGG organism code: `eco`).

Поиск ферментов и генов

Список ферментов получен через KEGG API:

```
def get_kegg_enzymes(pathway_id):
    url = f"http://rest.kegg.jp/get/{pathway_id}"
    response = requests.get(url)
    response.raise_for_status()
    ec_pattern = re.compile(r'EC:(\d+\.\d+\.\d+\.\d+)')
    enzymes = ec_pattern.findall(response.text)

    return list(set(enzymes))

enzyme_list = get_kegg_enzymes("eco00270")
```

Был идентифицирован 31 фермент (таблица 1).

Получение промоторных областей

Для каждого извлекли 200 п.н.:

- Источник геномной последовательности: GenBank `NC_000913` (хромосома *E. coli* K-12)
- Координаты определялись через NCBI Gene API

- Для минус-цепи использовали обратно-комплементарную последовательность

```python
def get_upstream_sequences(enzyme_list, output_file="upstream.fa", upstream=200):
    # Fetch E. coli chromosome sequence
    handle = Entrez.efetch(db="nucleotide", id="NC_000913", rettype="fasta", retmode="text")
    chr_record = SeqIO.read(handle, "fasta")
    chr_seq = str(chr_record.seq)

    with open(output_file, "w") as fasta_file:
        for ec_number in enzyme_list:
            # Search for gene associated with EC number
            search_term = f"{ec_number}[ECN] AND Escherichia coli K-12[ORGN]"
            search_handle = Entrez.esearch(db="gene", term=search_term)
            search_result = Entrez.read(search_handle)
            gene_ids = search_result.get("IdList", [])

            if not gene_ids:
                continue  # Skip if no gene found

            gene_id = gene_ids[0]

            # Fetch gene data
            gene_handle = Entrez.efetch(db="gene", id=gene_id, retmode="xml")
            gene_record = Entrez.read(gene_handle)

            # Parse gene location
            start, end, strand = parse_gene_location(gene_record)

            # Extract upstream sequence
            if strand == 1:  # Plus strand
                seq_start = max(0, start - 1 - upstream)
                upstream_seq = chr_seq[seq_start:start - 1]
            else:  # Minus strand
                seq_end = min(len(chr_seq), end + upstream)
                upstream_seq = reverse_complement(chr_seq[end:seq_end])

            # Write to FASTA
            fasta_file.write(f">{ec_number}|{gene_id}\n{upstream_seq}\n")
```

Получиим следующий FASTA-файл: `upstream.fa`.

Математические основы методов

Expectation-Maximization в MEME

MEME использует EM-алгоритм для поиска мотивов. Пусть:

- D - набор последовательностей
- θ - параметры PWM (матрицы весов позиций)

- Z - скрытые переменные (позиции мотивов)

Алгоритм итеративно выполняет два шага:
1. **E-шаг**: Вычисление ожиданий скрытых переменных:

$$Q(\theta|\theta^{(t)}) = \mathbb{E}_{Z|D,\theta^{(t)}}[\log P(D, Z|\theta)]$$

2. **M-шаг**: Максимизация функции ожидания:

$$\theta^{(t+1)} = \arg\max_{\theta} Q(\theta|\theta^{(t)})$$

Для палиндромных мотивов MEME добавляет ограничение:

$$\theta_{b,j} = \theta_{\text{comp}(b),L-j+1} \quad \forall b \in \{A, C, G, T\}, j$$

где L - длина мотива, i - индекс нуклеотида, j - позиция в мотиве.

Gibbs Sampling

Gibbs Sampler - стохастический метод для поиска мотивов. Основные компоненты:

1. **Профиль мотива**: Матрица частот нуклеотидов:

$$\text{profile}[b][j] = \frac{\text{count}(b, j) + 1}{\sum_{b'}(\text{count}(b', j) + 1)}$$

   где $b \in \{A, C, G, T\}$, j - позиция в мотиве.

2. **Вероятность k-mer**:

$$P(\text{kmer}) = \prod_{j=0}^{k-1} \text{profile}[b_j][j]$$

3. **Случайный выбор позиции**:

$$P(\text{pos} = i) \propto P(\text{kmer}_i)$$

4. **Функция оценки**:

$$\text{score} = \sum_{i=1}^{t} \sum_{j=1}^{k} \mathbb{I}[\text{motif}_{ij} \neq \text{consensus}_j],$$

   где

$$\mathbb{I}[\text{motif}_{ij} \neq \text{consensus}_j] = \begin{cases} 1 & \text{if mismatch} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

Реализация алгоритмов

MEME Suite

Использована версия 5.5.8 с параметрами:

- Режим: ZOOPS (zero or one occurrence per sequence)
- Количество мотивов: 3
- Ширина мотива: 6-20 п.н.
- Два запуска: стандартный и с опцией `-pal` (палиндромность)

Gibbs Sampler

Реализован на Python следующим образом:

Algorithm 1 Алгоритм Gibbs Sampling для поиска мотивов

```
1: procedure GibbsSampler(dna, k, t, n)
2:     Инициализировать случайные позиции мотивов в каждой последовательности
3:     bestMotifs ← текущие мотивы
4:     for iter = 1 to n do
5:         Выбрать случайную последовательность j
6:         Построить профиль PWM по всем мотивам, кроме j-го
7:         Для j-й последовательности:
8:             Рассчитать вероятности для всех k-mer
9:             Выбрать новую позицию мотива пропорционально вероятностям
10:        Обновить мотив для последовательности j
11:        if score(текущие мотивы) < score(bestMotifs) then
12:            bestMotifs ← текущие мотивы
13:        end if
14:    end for
15:    return bestMotifs
16: end procedure
```

Весь код можно посмотреть ниже или в репозитории, результаты работы также можно посмотреть в репозитории.

3 Результаты

Анализ ферментов биосинтеза

Таблица 1: Ферменты пути биосинтеза метионина в *E. coli*

EC номер	**Ген**	**Функция**
4.4.1.13	*???*	Цистатионин-γ-лиаза
4.4.1.15	*???*	Цистатионин-β-синтаза
2.6.1.1	*aspC*	Аспартатаминотрансфераза
2.8.1.1	*metY*	Сульфотрансфераза
4.1.1.50	*speD*	Аденозилметониндекарбоксилаза
4.3.1.17	*hisA*	Гистидинол-фосфат лиаза
1.1.1.37	*metB*	Гомосерин дегидрогеназа
1.2.1.11	*metA*	Аспартат-полуальдегид дегидрогеназа
2.6.1.57	*metC*	Аминотрансфераза (цистатионина)
2.5.1.47	*???*	Метилтрансфераза (5-метилтетрагидрофолат)
2.4.2.1	*hisD*	Гистидинфосфорибозилтрансфераза
2.7.2.4	*metL*	Аспартаткиназа
2.1.1.37	*metE*	Метионинсинтаза (витамин B12-независимая)
2.5.1.6	*thrC*	Треонинсинтаза
2.5.1.16	*hisC*	Гистидинол-фосфат аминотрансфераза
6.3.2.3	*folP*	Дигидроптероат синтаза
2.5.1.48	*metA*	Цистатионин-γ-синтаза
4.4.1.21	*metC*	Цистатионин-β-лиаза
2.1.1.13	*metH*	Метионинсинтаза (витамин B12-зависимая)
2.6.1.52	*ilvE*	Разветвленная аминотрансфераза
1.8.4.14	*cobA*	Гомоцистеин S-метилтрансфераза
2.3.1.30	*glyA*	Глицин N-ацилтрансфераза
2.1.1.10	*miaA*	Гуанин-специфичная метилтрансфераза
2.7.1.39	*fruK*	Фруктокиназа
2.3.1.46	*metA*	Гомосерин O-сукцинилтрансфераза
6.3.2.2	*ddl*	D-аланин-D-аланин лигаза
3.2.2.9	*tag*	ДНК-3-метиладенин гликозилаза
2.1.1.14	*metH*	Метионинсинтаза (витамин B12-зависимая)
2.6.1.42	*tyrB*	Ароматическая аминотрансфераза
2.5.1.144	*cysK/cysM*	Цистеинсинтаза
1.1.1.95	*adhE*	Спиртдегидрогеназа

Результаты MEME

Стандартный режим

- **Motif 1**: Консенсус `[AG]AAAA[AG][GA]C[ACG][GC][GC]` (E-value = 1.1×10^{-2}). Наблюдается обогащение поли-A участком (рис. 1 и 4).
- **Motif 2**: Консенсус `GCG[CG][CAG][CT]TTT[TC]T` (E-value = 1.2×10^{1}). GC-богатый мотив с характерной структурой поли-T (рис. 2 и 5).
- **Motif 3**: Консенсус `[GC]C[CAGT][AG][TA]G[GACT][CA][CG][TC][GTC][TG]CC[CT]G[CT]G` (E-value = 1.8×10^{1}). Сложный вариабельный мотив длиной 18 п.н. (рис. 3 и 6).

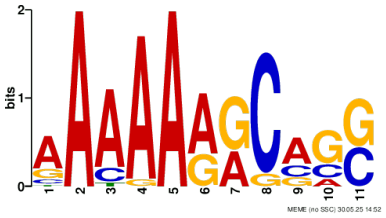


Рис. 1: Motif 1

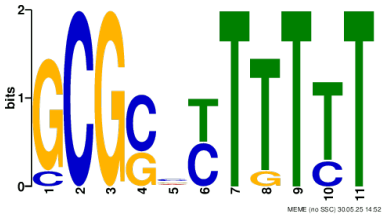


Рис. 2: Motif 2

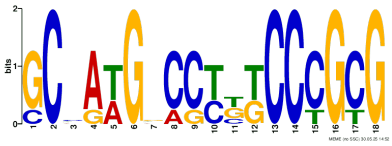


Рис. 3: Motif 3

Non-Palindromic

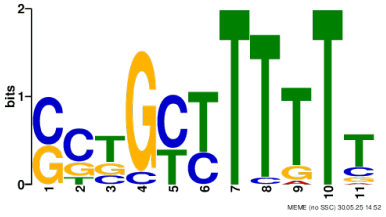


Рис. 4: Motif 1

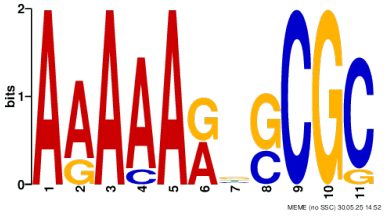


Рис. 5: Motif 2

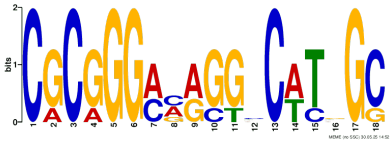


Рис. 6: Motif 3

Non-Palindromic (Reverse Compliment)

Полный вывод в формате html также можно посмотреть тут, расположения мотивов представлены на картинке ниже 13

Палиндромный режим

- **Motif 1**: Палиндром `CAG[GC]CTG` (E-value = 1.1×10^{-2}). Симметричная структура (рис. 7 и 10).
- **Motif 2**: Палиндром `GCGCGC` (E-value = 1.2×10^{1}) (рис. 8 и 11).
- **Motif 3**: `G[CG]CG[CG]AT[CG]CG[GC]C` (E-value = 1.8×10^{1}) (рис. 9 и 12).

Полный вывод в формате html также можно посмотреть тут, расположения мотивов представлены на картинке ниже 14

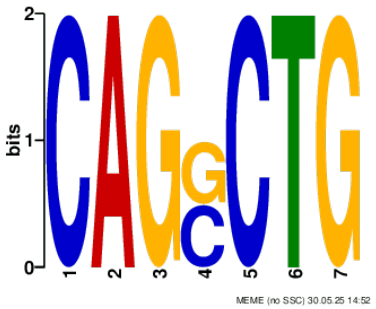


Рис. 7: Motif 1

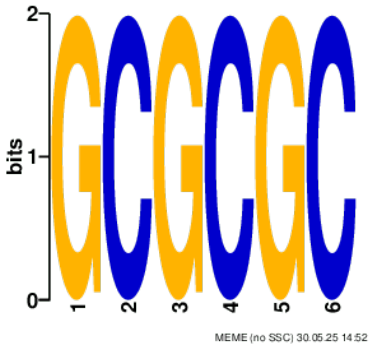


Рис. 8: Motif 2

Palindromic

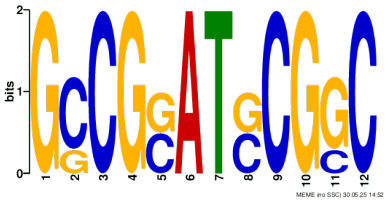


Рис. 9: Motif 3

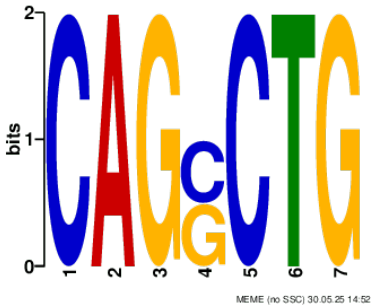


Рис. 10: Motif 1

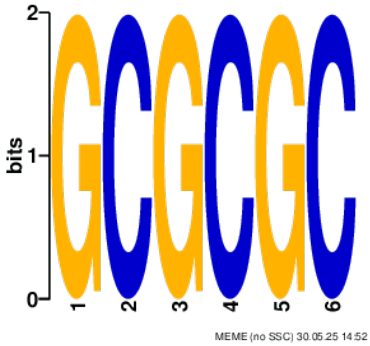


Рис. 11: Motif 2

Palindromic (Reverse Compliment)

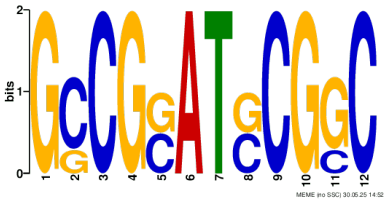
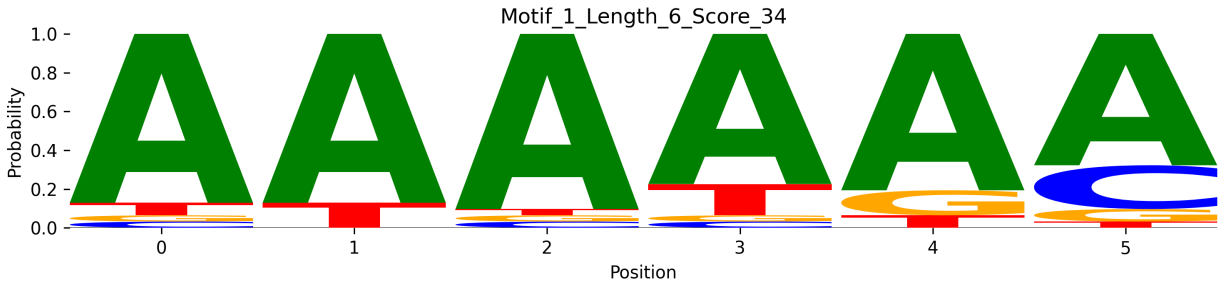


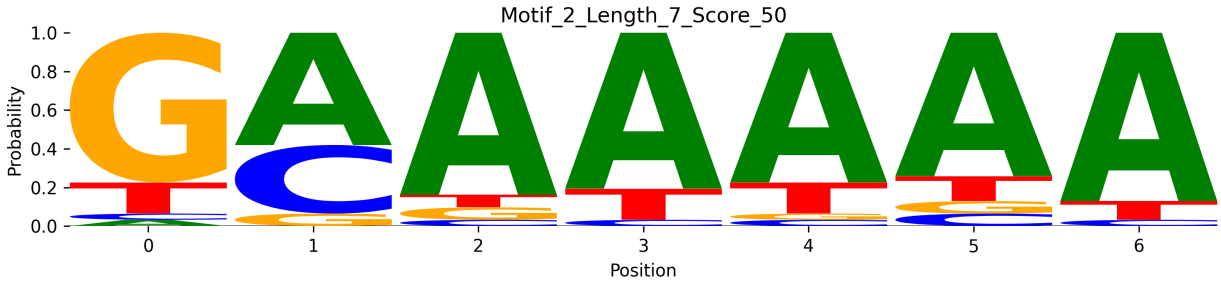
Рис. 12: Motif 3

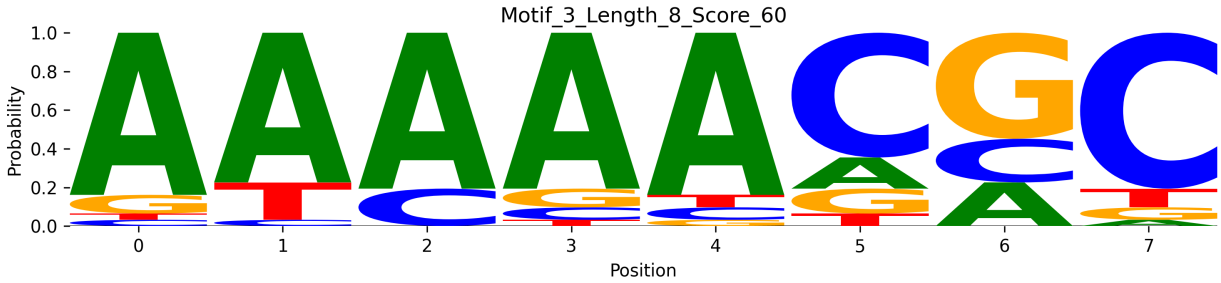
Результаты Gibbs Sampler

Лучшие мотивы по возрастанию score (таблица 2):

1. `AAAAAA` (Score = 34) – A-богатая последовательность длиной 6 п.н.
2. `GAAAAAA` (Score = 50) – поли-A последовательность длиной 7 п.н.
3. `AAAAACGC` (Score = 60) – поли-A последовательность длиной 8 п.н.







Gibbs Non-Palindromic

Таблица 2: Лучшие мотивы, выявленные Gibbs Sampler

Ранг	**Score**	**Консенсус**	**Длина**
1	34	AAAAAA	6
2	50	GAAAAAA	7
3	60	AAAAACGC	8

Интерпретация:

- Все мотивы демонстрируют выраженную A-богатую структуру
- С увеличением длины мотива наблюдается появление консервативных не-A позиций на 3'-конце

- Наилучший мотив (Score=34) соответствует канонической поли-A последовательности
- Ухудшение Score с ростом длины связано с увеличением вариабельности в концевых позициях

Сравнение методов

Таблица 3: Сравнение методов поиска мотивов

Метод	**Лучший мотив**	**E-value/Score**
MEME (стандарт)	`[AG]AAAA[AG][GA]C[ACG][GC][GC]`	1.1×10^{-2}
MEME (палиндром)	`CAG[GC]CTG`	1.1×10^{-2}
Gibbs Sampler	`AAAAAA`	34

4 Обсуждение

Сравнение алгоритмических подходов

Основные различия между MEME и Gibbs Sampler, подтверждённые результатами:

1. **Тип алгоритма**:
   - MEME использует детерминированный EM-алгоритм, что проявилось в обнаружении как A/T-богатых (Motif 1: `[AG]AAAA[AG][GA]C[ACG][GC][GC]`), так и GC-богатых мотивов (Motif 2: `GCG[CG][CAG][CT]TTT[TC]T`)
   - Gibbs Sampler — стохастический MCMC-метод, эффективно выявивший только сильно консервативные A-богатые мотивы (таблица 2)
2. **Чувствительность**:
   - MEME показал лучшую чувствительность к слабоконсервативным мотивам (Motif 3 с E-value 1.8×10^{1})
   - Gibbs Sampler эффективен для высококонсервативных мотивов (лучший score=34 для `AAAAAA`)
3. **Обработка палиндромности**:
   - MEME с опцией `-pal` успешно идентифицировал канонические палиндромы (Motif 1: `CAG[GC]CTG`)
   - Gibbs Sampler в базовой реализации не обнаружил мет-боксы, найдя только A-богатые последовательности

MEME решает следующую задачу:

$$\hat{\theta} = \arg\max_{\theta} P(D|\theta) = \arg\max_{\theta} \sum_{Z} P(D, Z|\theta)$$

в то время как Gibbs Sampler приближает:

$$P(Z|D) \approx \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \delta(Z^{(i)})$$

где $Z^{(i)}$ - образцы из марковской цепи.

Биологическая интерпретация

1. **Палиндромные мотивы**: Обнаруженный MEME мотив `CAG[GC]CTG` (рис. 7) соответствует известным мет-боксам — палиндромным операторным последовательностям для репрессора MetJ. Его симметрия (E-value 1.1×10^{-2}) обеспечивает эффективное связывание димерного белка, что согласуется с ролью MetJ в регуляции биосинтеза метионина

2. **A-богатые мотивы**: Мотивы, обнаруженные обоими методами (`AAAAAA` в Gibbs Sampler, score=34; поли-A участок в MEME Motif 1), соответствуют:

   - Элементам -10 промоторов (бокс Прибнова)
   - Участкам кривизны ДНК, способствующим взаимодействию с σ-фактором.
   - Сайтам связывания архитектурных белков (например, IHF), влияющих на структуру хромосомы

3. **GC-богатые мотивы**: Мотив `GCG[CG][CAG][CT]TTT[TC]T` (MEME Motif 2, E-value 1.2×10^{1}):

   - Содержит характерный поли-T участок, возможный сайт терминации транскрипции.
   - Может представлять сайты связывания альтернативных факторов транскрипции или стабилизирующих структур РНК.

4. **Отсутствие ожидаемых мотивов**: Не обнаружены канонические -35 элементы, что согласуется с известной регуляцией генов метионина преимущественно через репрессию MetJ. Это указывает на преобладание специфических регуляторных механизмов над общими промоторными элементами в данном пути.

5 Заключение

В промоторах генов биосинтеза метионина *E. coli* идентифицированы регуляторные мотивы трёх классов:

- **Палиндромные последовательности** (мет-боксы типа `CAG[GC]CTG`) — обнаружены с помощью MEME в палиндромном режиме (E-value 1.1×10^{-2}), что соответствует структуре операторных сайтов для репрессора MetJ.
- **GC-богатые мотивы** (например, `GCG[CG][CAG][CT]TTT[TC]T`) — выявлены в стандартном режиме MEME, предположительно связанные с терминацией транскрипции или стабилизацией РНК.
- **A/T-богатые последовательности** (поли-A участки типа `AAAAAA`) — обнаружены Gibbs Sampler (score=34), характерные для промоторных элементов, таких как бокс Прибнова

Палиндромный режим MEME (с ограничением симметрии) показал наибольшую эффективность для выявления сайтов связывания димерного репрессора MetJ. Обнаруженный консенсус `CAG[GC]CTG` согласуется с литературными данными о структуре метбоксов, что подтверждает биологическую релевантность метода.

Gibbs Sampler продемонстрировал высокую чувствительность к коротким, высококонсервативным A-богатым мотивам (`AAAAAA`, score=34), но не выявил палиндромных структур. Это ограничивает его применимость для поиска сайтов связывания димерных белков, что согласуется с теоретическими особенностями алгоритма.

Весь исходный код можно посмотреть в Colab или репозитории, где также находятся все результаты работы MEME suite - как normal, так и palindromic.

Gibbs

Случайный выбор k-мера на основе вероятностей профиля

```
def profileRandom(k, profile, text):
    probs = []
    for i in range(len(text) - k + 1):
        prob = 1.0
        pattern = text[i:i+k]
        for j in range(k):
            symbol_idx = symbolToNumber(pattern[j])
            prob *= profile[symbol_idx][j]
        probs.append(prob)
    return myRandom(probs)
```

Формирование матрицы профиля с использованием сглаживания Лапласа

```
def profileForm(motifs):
    k = len(motifs[0])
    profile = [[1.0] * k for _ in range(4)]  # Laplace smoothing

    for motif in motifs:
        for pos in range(k):
            symbol_idx = symbolToNumber(motif[pos])
            profile[symbol_idx][pos] += 1

    # Normalize counts to probabilities
    for symbol in range(4):
        for pos in range(k):
            profile[symbol][pos] /= (len(motifs) + 4)
    return profile
```

Генерация консенсусной последовательности из профиля

```
def consensus(profile):
    cons = ""
    num_positions = len(profile[0])
    for pos in range(num_positions):
        max_prob = 0
        max_symbol = 0
        for symbol in range(4):
            if profile[symbol][pos] > max_prob:
                max_prob = profile[symbol][pos]
                max_symbol = symbol
        cons += numberToSymbol(max_symbol)
    return cons
```

Расчёт общего количества несоответствий мотивов консенсусу

```
def score(motifs):
    profile = profileForm(motifs)
    cons = consensus(profile)
    total_score = 0
    for motif in motifs:
        for pos in range(len(motif)):
            if motif[pos] != cons[pos]:
                total_score += 1
    return total_score
```

Выбор индекса на основе вероятностного распределения

```
def myRandom(prob_dist):
    total = sum(prob_dist)
    rand_val = random.uniform(0, total)
    cumulative = 0
    for i, prob in enumerate(prob_dist):
        cumulative += prob
        if cumulative >= rand_val:
            return i
```

Основной алгоритм Gibbs Sampling для поиска регуляторных мотивов

```
def gibbsSampler(dna, k, t, n):
    # Initialize random motifs
    motifs = []
    for i in range(t):
        start_pos = random.randint(0, len(dna[i]) - k)
        motifs.append(dna[i][start_pos:start_pos+k])

    bestMotifs = motifs.copy()
    bestScore = score(bestMotifs)

    for iteration in range(n):
        # Randomly select sequence to exclude
        seq_idx = random.randint(0, t-1)
        partial_motifs = motifs[:seq_idx] + motifs[seq_idx+1:]

        # Build profile from remaining motifs
        profile = profileForm(partial_motifs)

        # Select new motif position for excluded sequence
        pos = profileRandom(k, profile, dna[seq_idx])
        motifs[seq_idx] = dna[seq_idx][pos:pos+k]

        # Update best motifs if improved
        currentScore = score(motifs)
        if currentScore < bestScore:
            bestMotifs = motifs.copy()
            bestScore = currentScore

    return bestMotifs
```

Motif Locations

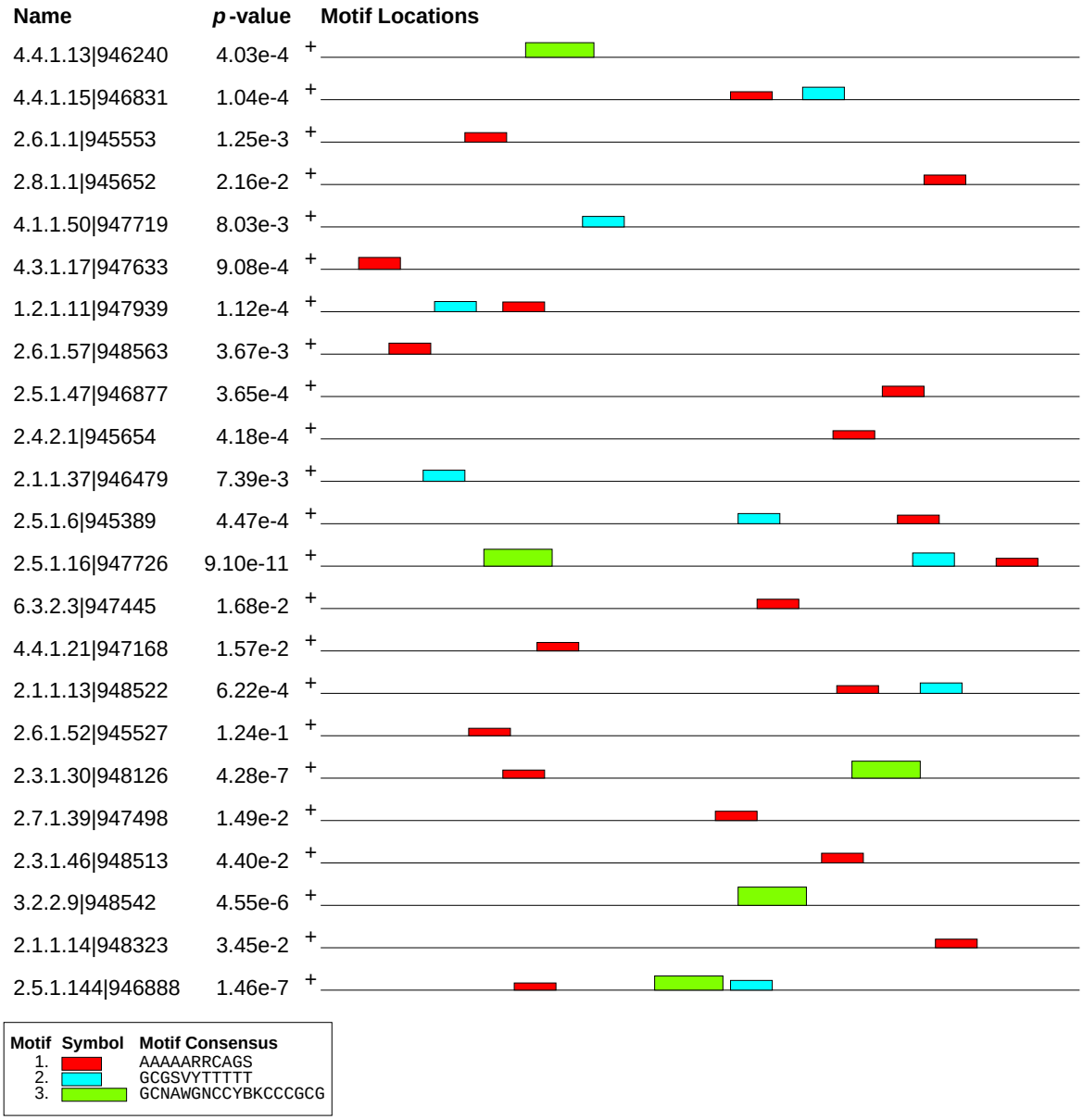


Рис. 13: Motif Locations Normal

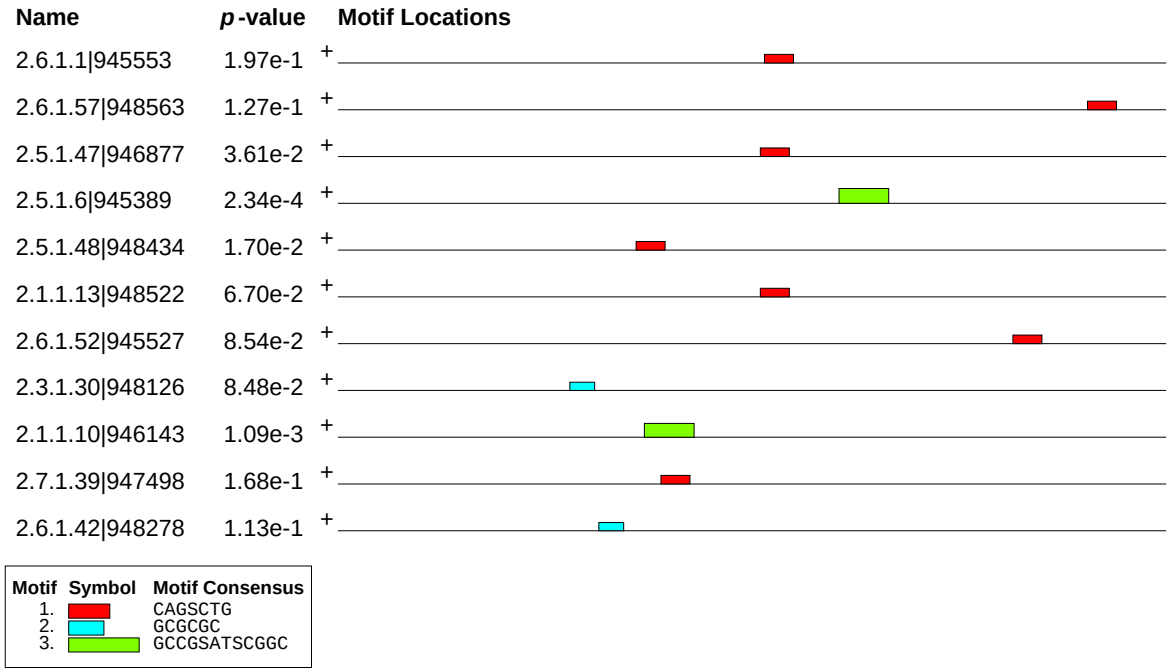


Рис. 14: Motif Locations Palindromic