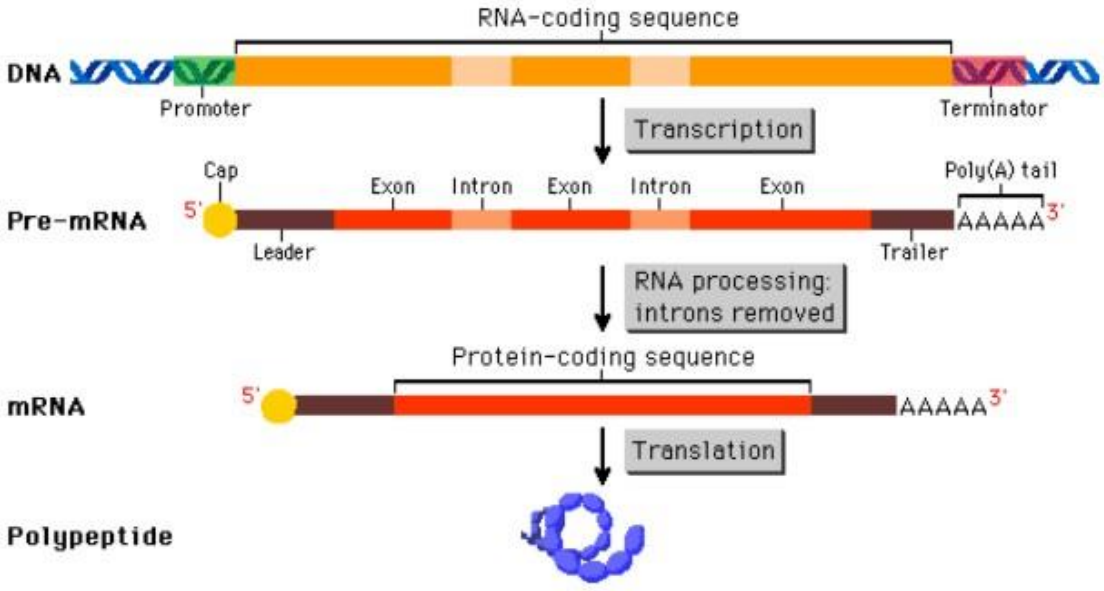
Instytut Informatyki i Matematyki Komputerowej UJ,
opracowanie: mgr Ewa Matczyńska, dr Jacek Śmietański

Przewidywanie genów

Pytanie na dzisiaj: **Jak odnaleźć gen w sekwencji DNA?**

```
CTTACTTCGAAGGCTGTGCTCCGCTCACCATCCAGAGCGGAGGTGCGGACCTTAAACTCACTCCTGGAGA
AAGATCTGCAAGTGCGCAGGTAAAGTGCACGTGCTCCGCGGTCGGGAGGAAGGAGGCGAGGAGCCAGACT
AGCCTGGGAACAGGCAGGGAGGGTTTACACAGCCCCGGCTGAGTCGCGGCTTAGGAAGCAAGGCAAGTTC
CCCTAAAGGTTAGTGTGCACAGACGGGTGCGACGGAGCCGACCTAGCGCGGCTGAGTCCGCCTGGGCCTG
CAGCAGCTGCCCCCTGAGCACCCCCTCCGGCTCTCTGCCAGGCGACCCAGGAAAAAGTCGCCCCCTGGTG
GGCCATGAGGTCATGGGTGGGGGGAGTTTGGAAAGGTTCAGACAGCAAATGTTCCACTTGAACTCCAGGG
CAGCATCTGGCACTGCGGGGCCTCCTAGCCATGAGCCGTGGTCAGGCGTTTCCTTAGAATGGAATGCACT
GGAGTGAAAACACTAAATCCCTCAAAGCTGCTTCTCTTTACTGTGGTCACACACAGTGAAATCAATGGGC
ATTAGTGCAGCTAGCTCTTTTCAAGGACACAATGTTAAGCACAGGAAGCCTGGTATGTGGACGCTCTGGG
TTTGCAGAACCAGGCAGGGGCCAGGGGCTCAGGACAAGTGCCCGGTGCTCCCTTCCCATTGGGCGAATCA
GAGCCTGGGGCCCGGCGGTGAAGCTCCCCAGGTGACTCTAATGTGCAGTGCACTTTGAGGAGCACTACTT
AGACCAATGTGACAGTCTACAATGTGTAGATTTAGGGTGAGTGATTCTGAGGAAAAGAAACCCGAGGCTG
TTAGCAGTTGTGGGCAGCTGCTGTCTACCTAAACCAGCTGCGGTTTGCTTGCTTGGTGAGCCTGAGCTTC
GCGGGGCGGGCATGGCATCTGCCATCCAGGACCCTGGGACGGGGCCTGCCAGGGCAAGGAGCTGAGCATT
GAACGCATCTGGGGATAACTATCTCTCATAGAAGAACTAATGAGGATTGAACCTGAACACAGAGATGAAA
GAGCTGAGTAGACTGCAAAGAATTGCACAAAAACTGCTTGTTCTGCAAATTTAGTTTACAACAATTTGAG
```

1. Budowa genu eukariotycznego



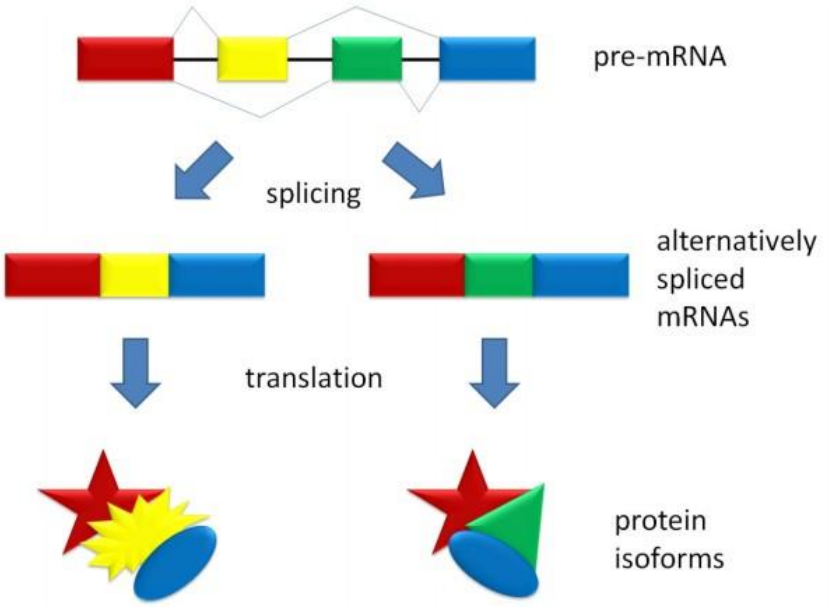
Rysunek 1: Budowa genu eukariotycznego i procesy, którym gen zostaje poddany aby został przetłumaczony na białko.

Gen to pewien ciągły fragment DNA, który koduje białko. Okazuje się, że u organizmów eukariotycznych (czyli takich, których komórki posiadają jądro w którym zawarte jest DNA)

budowa genu jest istotnie bardziej skomplikowana niż u prokariontów (organizmów bez jądra komórkowego, np. bakterii). Skupimy się teraz na budowie genu eukariotycznego.

Zwykle gen jest poprzedzony fragmentem DNA zwanym promotorem, który jest rozpoznawany przez maszynerię komórkową. Przyłącza się ona do tego fragmentu i rozpoczyna transkrypcję czyli przepisywanie DNA na mRNA. Od charakterystyki promotora zależy regulacja takiego genu, czyli w uproszczeniu – jak dużo białka na podstawie tego genu powstaje w danej chwili w komórce.

Sama sekwencja genu jest podzielona na fragmenty dwóch typów: eksony i introny. Jak widać na powyższym rysunku zarówno eksony jak i introny są początkowo przepisywane na RNA, jest to tzw. pre-mRNA. Następnie z tego łańcucha usuwane są fragmenty intronów i w dojrzałym mRNA zostaje tylko sekwencja pochodząca z eksonów. Proces ten określa się jako splicing.



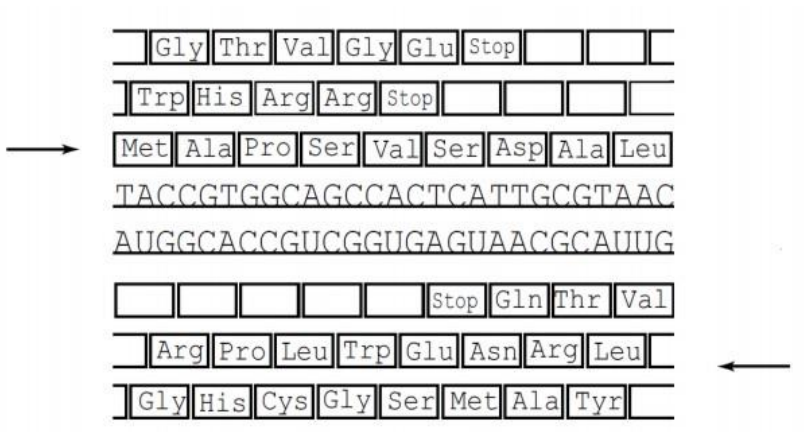
Rysunek 2: Przykład splicingu alternatywnego.

Możliwa jest sytuacja w której eksony składane są w innej kolejności niż było to określone w wyjściowej sekwencji DNA, bądź niektóre zostają pominięte. Taki proces nazywamy splicingiem alternatywnym. Dzięki niemu z jednego genu może powstać dużo wariantów białek. Kiedyś oceniano, że jest to proces stosunkowo rzadki, teraz wiadomo, że alternatywnemu splicingowi ulega ok 95% genów u człowieka.
U prokariontów czyli np. bakterii sytuacja jest łatwiejsza - introny nie występują.

Jeszcze jednym istotnym pojęciem związanym z sekwencją genu jest tzw. otwarta ramka odczytu (ORF - *open reading frame*). Jest to każda sekwencja zawarta pomiędzy kodonem start a kodonem stop w danej ramce odczytu. Może ona potencjalnie kodować białko.

2. Metody przewidywań oparte na charakterystycznych elementach sekwencji i statystyce

Pierwszym intuicyjnym podejściem dla wyszukania sekwencji genu, będzie odszukanie ORF we wszystkich ramkach odczytu (zwróć uwagę, że ORF mogą się nakładać). Możemy się spodziewać, że w losowej sekwencji raz na około 21 kodonów otrzymamy kodon STOP (dlaczego?). Geny mają zwykle dłuższą sekwencję niż losowo napotkane ORF. Naiwne podejście zakłada, że tam gdzie mamy odpowiednio długą ORF, możemy spodziewać się genu.



Rysunek 3: Sekwencja i kodowane aminokwasy w 6 ramkach odczytu. Z „Introduction to Bioinformatics Algorithms", Pevzner, MIT Press 2004

W określeniu czy dana ORF jest sekwencją genu może pomóc tzw. *codon usage*. Jak pamiętamy, większość aminokwasów jest kodowana przez więcej niż jeden kodon, co wynika ze zdegenerowania kodu genetycznego. Okazuje się, że częstość pojawiania się danego kodonu dla danego aminokwasu jest znacząco różna w rejonach kodujących i niekodujących. Na podstawie zebranych danych można stworzyć tabele *codon usage*, określające częstości danych kodonów dla aminokwasów w sekwencjach kodujących i niekodujących.

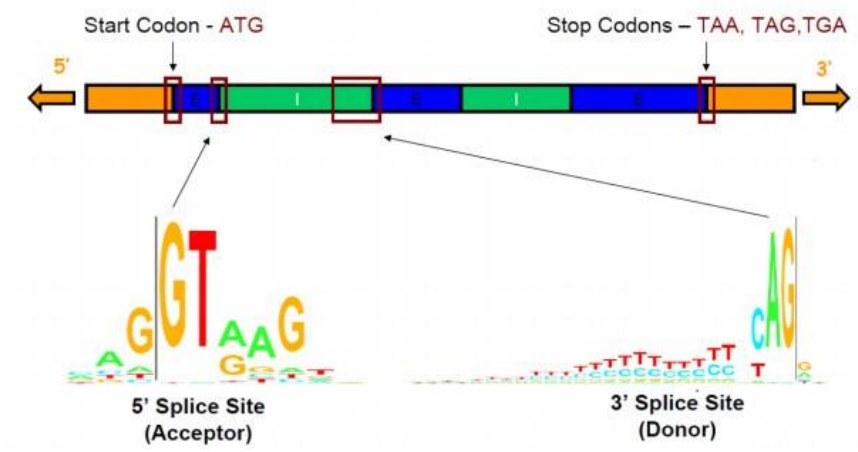
	U		C		A		G	
U	UUU Phe	57	UCU Ser	16	UAU Tyr	58	UGU Cys	45
	UUC Phe	43	UCC Ser	15	UAC Tyr	42	UGC Cys	55
	UUA Leu	13	UCA Ser	13	UAA Stp	62	UGA Stp	30
	UUG Leu	13	UCG Ser	15	UAG Stp	8	UGG Trp	100
C	CUU Leu	11	CCU Pro	17	CAU His	57	CGU Arg	37
	CUC Leu	10	CCC Pro	17	CAC His	43	CGC Arg	38
	CUA Leu	4	CCA Pro	20	CAA Gln	45	CGA Arg	7
	CUG Leu	49	CCG Pro	51	CAG Gln	66	CGG Arg	10
A	AUU Ile	50	ACU Thr	18	AAU Asn	46	AGU Ser	15
	AUC Ile	41	ACC Thr	42	AAC Asn	54	AGC Ser	26
	AUA Ile	9	ACA Thr	15	AAA Lys	75	AGA Arg	5
	AUG Met	100	ACG Thr	26	AAG Lys	25	AGG Arg	3
G	GUU Val	27	GCU Ala	17	GAU Asp	63	GGU Gly	34
	GUC Val	21	GCC Ala	27	GAC Asp	37	GGC Gly	39
	GUA Val	16	GCA Ala	22	GAA Glu	68	GGA Gly	12
	GUG Val	36	GCG Ala	34	GAG Glu	32	GGG Gly	15

Rysunek 4: Tabela *codon usage* dla regionów kodujących u człowieka . Z „Introduction to Bioinformtics Algorithms", Pevzner, MIT Press 2004

Następnie, używając prawdopodobieństw pojawienia się danego kodonu dla aminokwasu z tabeli *codon usage*, można obliczyć stosunek prawdopodobieństw warunkowych dla sekwencji s:

$$\frac{P(s \mid s\ jest\ kodujaca)}{P(s \mid s\ jest\ niekodujaca)}$$

Istnieje jeszcze wiele dodatkowych charakterystycznych elementów sekwencji genowej używanych do predykcji genów. Najważniejszymi z nich są tzw. wyspy CpG oraz miejsca początku i końca intronów. Wyspy CpG to dość długie fragmenty sekwencji (>200 bp) o znacząco wyższej częstości występowania nukleotydów C i G (>50%), zwykle wyspy te występują w promotorach genów. Miejsca początku i końca intronów mają najczęściej ściśle konserwatywny dinukleotyd odpowiednio GT i AG.



Rysunek 5: Sygnały w sekwencji genu. Z „Computational Biology: Genomes, Networks, Evolution" MIT OpenCourseWare

Oprócz tego istnieje oddzielna gałąź metod przewidywania genów oparta na podobieństwach sekwencji do już znanych genów (*comparative gene prediction*). Jest to wartościowa metoda, jeśli mamy blisko spokrewniony organizm z opisanymi sekwencjami genów, których możemy użyć do porównania. Metoda ta ma oczywiście pewne ograniczenia, nie znajdzie nam sekwencji genu, który nie wykazuje istotnego podobieństwa do tych już znanych.

3. *Hidden Markov Models* (HMM) dla przewidywania genów

Ukryte modele Markowa są modelami probabilistycznymi używanymi w wielu dziedzinach. Używa się ich np. do rozpoznawania mowy bądź pisma ręcznego. W bioinformatyce najbardziej znanym ich zastosowaniem jest właśnie przewidywanie genów. HMM zalicza się do modeli uczenia maszynowego (*machine learning)* tzn. że model początkowo uczy się charakterystycznych zależności na przedstawionych mu przykładach, a następnie sam powinien być w stanie podjąć decyzję co do nowo przedstawionego przykładu, bazując na wcześniej zdobytej wiedzy.

Jako wprowadzenie do HMM rozważmy pewien przykład nazywany „Fair Bet Casino". Otóż mamy następującą sytuację: Wyobraźmy sobie, że znajdujemy się w kasynie i gramy w

następującą grę: krupier rzuca monetą, a my stawiamy pieniądze na to czy wypadnie orzeł czy reszka. Ponieważ w kasynie oszukują krupier może rzucać także monetą oszukaną, której prawdopodobieństwo rzucenia reszki wynosi ¾. Krupier podmienia monety, ale niezbyt często, bo boi się, że ktoś to zauważy, załóżmy, że podmienia monety z prawdopodobieństwem 0.1. Obserwując wyniki kolejnych rzutów chcemy wiedzieć czy krupier rzuca monetą dobrą czy oszukaną, co pozwoli nam zwiększyć szansę na wygranie pieniędzy.
Jeśli zaobserwujemy, że cały czas wypada reszka, możemy twierdzić, że rzucana jest moneta fałszywa, ale może również to być też oczywiście przypadek dla monety dobrej, jednak interesują nas rozwiązania najbardziej prawdopodobne.

Rozważmy najpierw sytuację w której krupier nigdy nie zmienia monety. Oznaczmy typy monet: F -fair, dobra moneta, B -biased, fałszywa moneta.
Wtedy dla sekwencji wyników kolejnych rzutów oznaczonej przez: x = (x,; x_2, x_3, ..., x_n), możemy obliczyć prawdopodobieństwo pod warunkiem, że sekwencja została wyrzucona dobrą monetą:

$$P(x|F) = \Pi_{i=1}^{n} p^F(x_i) = \frac{1}{2^n}$$

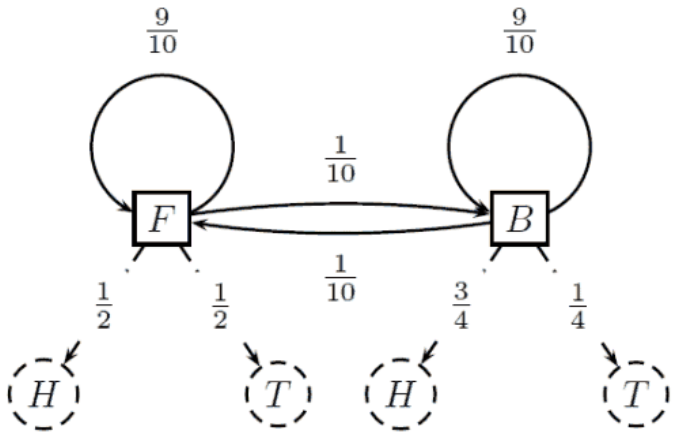
oraz prawdopodobieństwo pod warunkiem, że sekwencja została wyrzucona fałszywą monetą

$$P(x|B) = \Pi_{i=1}^{n} p^B(x_i) = \frac{1}{4^{n-k}} \frac{3^k}{4^k} = \frac{3^k}{4^n}$$

gdzie k - liczba reszek.

Teraz porównując prawdopodobieństwa, możemy określić czy bardziej prawdopodobne jest używanie monety dobrej czy fałszywej przy zadanej sekwencji. Okazuje się, że jeśli $k, \frac{n}{\log_2 3}$, $\log_2 3$ wtedy bardziej prawdopodobna jest moneta dobra.

W przypadku kiedy krupier może zamieniać monety, dobrym modelem dla tej sytuacji będzie HMM. Ukryty model Markowa składa się z pewnych stanów między, którymi przemieszcza się z pewnymi prawdopodobieństwami. Oprócz tego w każdym stanie może wyemitować pewien symbol z zadanego alfabetu z pewnym prawdopodobieństwem. Dla naszego przykładu HMM będzie wyglądał następująco:



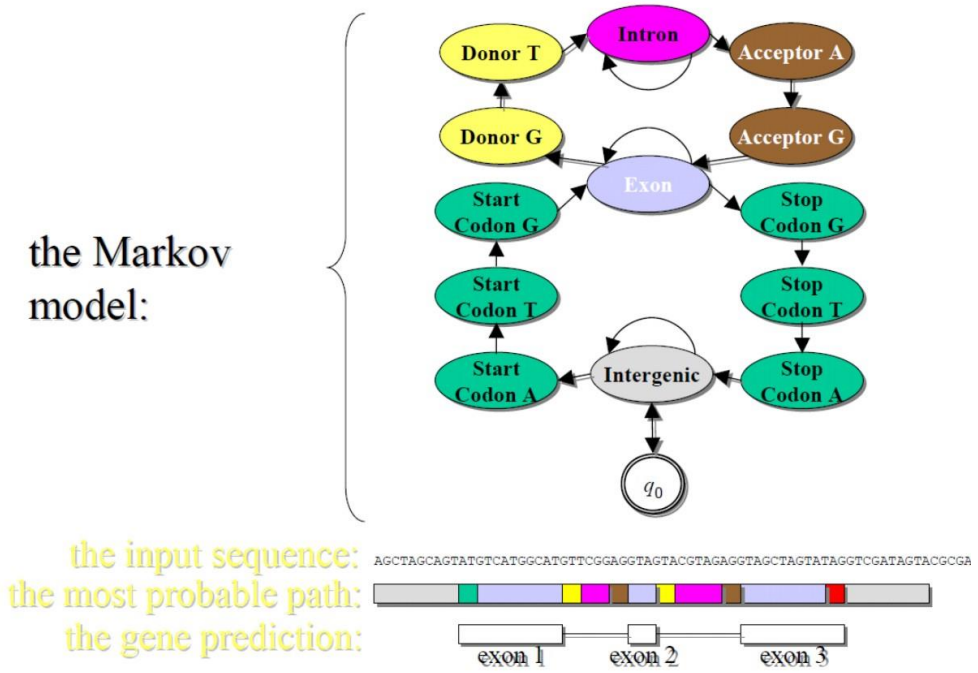
Rysunek 6: HMM dla problemu „Fair Bet Casino". Oznaczenia: F-(fair) dobra moneta, B-(biased) fałszywa moneta, H - (head) reszka, T-(tails) orzeł.

W modelu mamy dwa stany oznaczone przez F i B oznaczające rzucanie danym typem monety. Rzucając monetą emitujemy pewne symbole - u nas H bądź T, czyli orzeł bądź reszka z pewnym prawdopodobieństwem w zależności od tego czy rzucamy dobrą czy fałszywą monetą. Monety czyli stany mogą się zmieniać z prawdopodobieństwem 0.1.
Zauważmy, że obserwujemy tylko emitowane symbole, czyli wyniki rzutu monetą, natomiast nie wiemy jaki aktualny stan modelu, czyli czy krupier rzuca monetą dobrą czy fałszywą. Stąd nazwa Ukryty model Markowa, ponieważ stany są niewidoczne dla obserwatora.

Celem obserwatora jest odnalezienie najbardziej prawdopodobnej ścieżki, czyli sekwencji stanów, która wyprodukowała daną sekwencję.

Bardziej formalnie HMM M składa się z :
- alfabetu emitowanych symboli
- Q: zbioru stanów, z których każdy emituje symbol z alfabetu
- A = a_{kl} macierzy prawdopodobieństw przejść stanów rozmiaru $|Q_j|x|Q_j|$
- E = $e_k(b)$ macierzy prawdopodobieństw emisji danego symbolu w danym stanie rozmiaru $|Q_j|x|Q_j|$

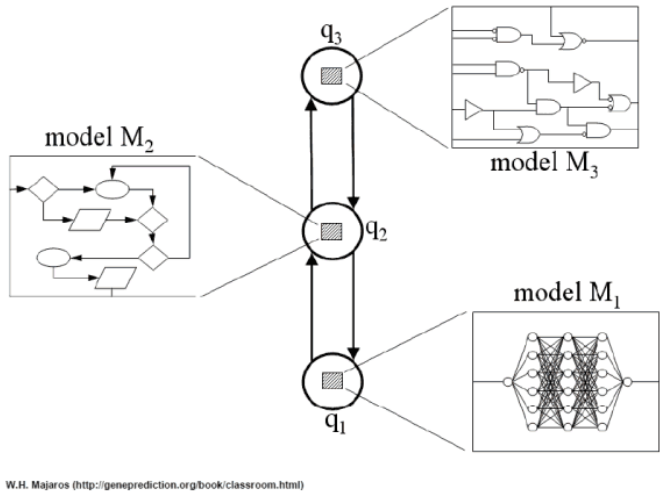
Ścieżką π nazwiemy sekwencję stanów. Jak wyglądają poszczególne składniki dla wyżej opisanego problemu?
Ogólnie, szukamy takiej ścieżki π, która maksymalizuje prawdopodobieństwo uzyskania danej sekwencji emitowanych symboli $P(x|\pi)$.
Bardzo łatwo znaleźć analogię gry z monetą do problemu predykcji genów. Emitowanym symbolem będzie kolejny nukleotyd sekwencji, natomiast ukrytym stanem, który chcemy okryć, należenie danego nukleotydu do eksonu, intronu, sekwencji między genowej, itd.



Rysunek 7: Prosty HMM dla predykcji genów. Z „Computational Biology: Genomes, Networks, Evolution", MIT OpenCourseWare

Wiele programów do predykcji genów bazuje na HMM-ach, wprowadzane są różne rozszerzenia tego modelu. W tych rozszerzonych modelach uwzględnia się również

charakterystykę częstości i sygnały, o których była mowa wcześniej. Jednym z najbardziej znanych programów przewidujących geny, nie opierającym się na podobieństwach do już znanych genów jest GENSCAN, opracowany na Uniwersytecie Stanford. GENSCAN jest narzędziem opierającym się na Ukrytym modelu Markowa, z tą różnicą, że w danym stanie możemy emitować więcej niż jeden nukleotyd. Emisja większej ilości nukleotydów jest kontrolowana przez z góry przyjęty model probabilistyczny dla każdego stanu. Jest to tzw. *generalized HMM* (GHMM).



Rysunek 8: Model GHMM.

Zadanie 1:

Wykorzystaj program GENSCAN dla poszukiwania genów w zadanych fragmentach DNA (pliki **gen1.txt** i **gen2.txt**).

1. Przeszukaj sekwencje DNA z obydwu plików. W poszukiwaniu genów wykorzystaj program GENSCAN (https://genes.mit.edu/GENSCAN.html):

W kolumnach tabeli mamy informacje o znalezionych eksonach:

Type - typ przewidzianego eksonu (*Sigl - pojedynczy, Init - inicjujący, Term - ostatni, Intr - między innymi eksonami*), może się zdażyć, że GENSCAN wykryje również inne elementy charakterystyczne jak *Prom - promotor, Poly-A - fragment złożony z samych adenin* w przepisanym na mRNA genie, charakterystyczny przy końcu genu, tzw. ogon polyA,

S - strand - nić: +wiodąca, -komplementarna
Begin End - początek i koniec exonu
Length - długość exonu
Fr - ramka odczytu
P - probability - prawdopodobieństwo exonu
Tscore - punktacja eksonu określona przez GENSCAN

Obejrzyj wyniki. Znajdź eksony 3 różnych typów i zapisz współrzędne na których zostały odnalezione, nić i ramkę odczytu oraz ich prawdopodobieństwo.

2. Czy te sekwencje rzeczywiście zawierają geny? Odszukaj prawdziwie geny odpowiadające tym sekwencjom na NCBI, znajdź nazwy tych genów. Z czym związana jest ich funkcja?

3. Na stronie bazy GENE w sekcji *Genomic regions, transcripts and products* można obejrzeć strukturę eksonów w genie w oknie graficznym. Jeśli przejdziemy do formatu GenBank, znajdziemy dokładne współrzędne eksonów.

4. Sprawdź czy predykcja GENSCANA była prawidłowa, porównaj prawdziwe eksony z przewidywanymi dla obu genów. Warto przyglądać się tym przewidywanym eksonom, które mają wysokie prawdopodobieństwo (>0.8).

4. Klasyfikacja białek

Zadanie 2.
- wejdź do bazy struktur białkowych www.rcsb.org, w wyszukiwarce wpisz 1GZX, jest to symbol struktury hemoglobiny
- jaka struktura drugorzędowa dominuje w tym białku? jak myślisz, jak wyglądałaby mapa Ramachandrana dla hemoglobiny?
- wyświetl mapę Ramachandrana dla tej struktury, w tym celu wejdź na stronę molprobity.biochem.duke.edu i wpisz 1GZX w odpowiednie pole
- czy wynik jest zgodny z twoimi przewidywaniami?
- wejdź do bazy CATH, która klasyfikuje rodziny białkowe - www.cathdb.info, wybierz browse u dołu po lewej stronie
- obejrzyj jak baza CATH dzieli białka ze względu na ich strukturę drugorzędową, wyszukaj jakieś białko, które posiada dużo arkuszy β w swojej strukturze, obejrzyj je w PDB
- wyświetl dla niego mapę Ramachandrana jak powyżej, czy mapa wskazuje na posiadanie przez strukturę dużo arkuszy β?

Rozwiązanie obu zadań prześlij mailem do wtorku, **10.12.2019** włącznie, na adres:
jacek.smietanski@ii.uj.edu.pl
Temat wiadomości proszę opatrzyć przedrostkiem **[Bio] Lab 09**. Rozwiązaniem ma być **tylko jeden plik** – dokument PDF. Proszę o nazwanie pliku wg schematu**: Imie.Nazwisko.09.pdf**.