

Organizačné poznámky

- DÚ1 je zverejnená, odovzdávanie do stredy 12.11. 22:00
- Journal club: Rozdelenie do skupín / inštrukcie na konci prednášky
- Najbližší journal club termín 21.11.

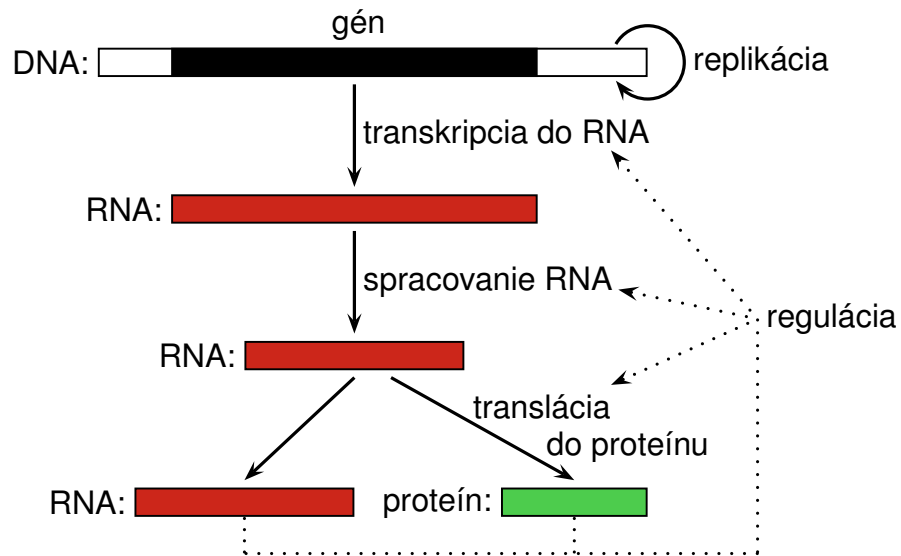
Hľadanie génov

Tomáš Vinař

23.10.2025



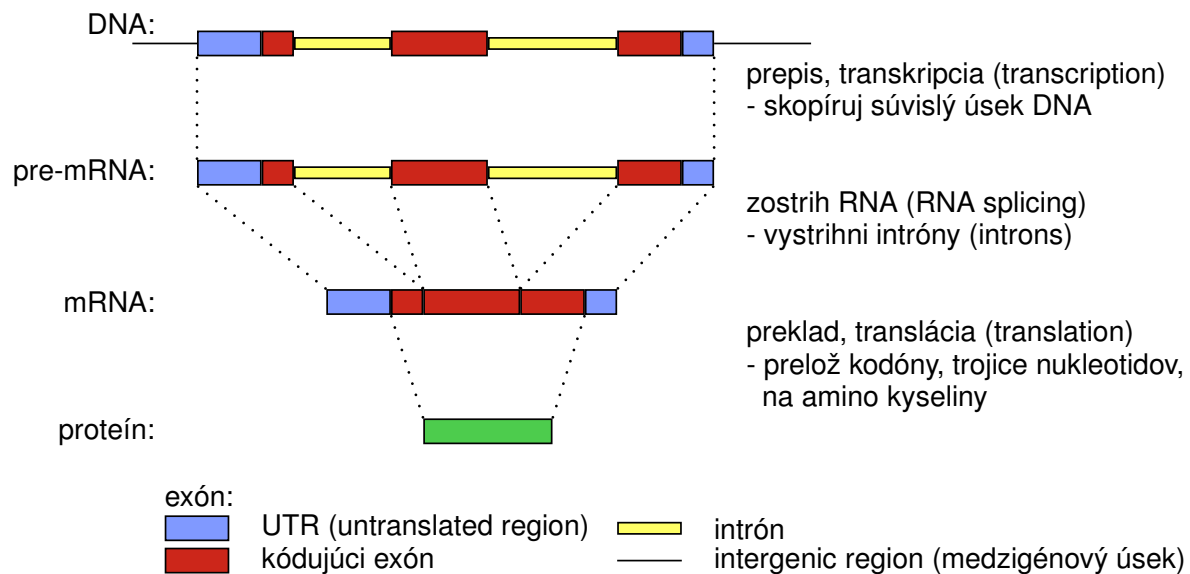
Čo s osekvenovanými genómami?



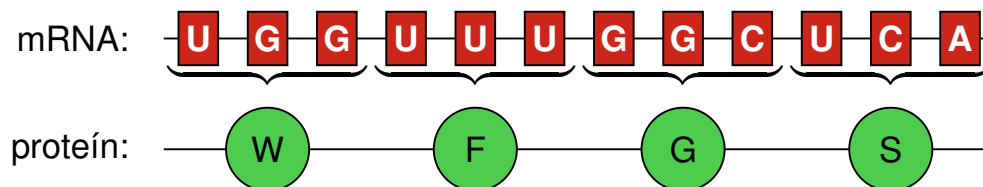
- gény kódujúce proteíny (dnešná prednáška)
- RNA gény
- signály pre reguláciu transkripcie, zostrihu, atď
- pseudogény (nefunkčné kópie génov)
- repetitívne sekvencie, opakovania (sequence repeats)

Štruktúra eukaryotických génov

Proces syntézy proteínov:



Translácia: tri bázy mRNA (kodón) → aminokyselina proteínu



L'udský genóm

Gény kódujúce proteíny

- cca 20 000, pokrývajú 40% genómu
- cca 10 exónov v géne
- exóny pokrývajú 2% genómu
- kódujúce exóny 1.2% genómu

Repetitívne sekvencie

- pokrývajú 49% genómu

Príklad: gén IGF1R zaberá 315 569nt, z toho kóduje 4101nt v 21 exónoch



Bioinformatický problém: hľadanie génov

Cieľ: nájsť všetky gény kódujúce proteíny v genóme.

Tým získame katalóg všetkých proteínov.

Zjednodušenia:

- neuvažujeme alternatívny zostrih, prekrývajúce sa gény
- nehľadáme neprekladané oblasti (UTRs) na začiatku a konci génu

Bioinformatický problém: hľadanie génov

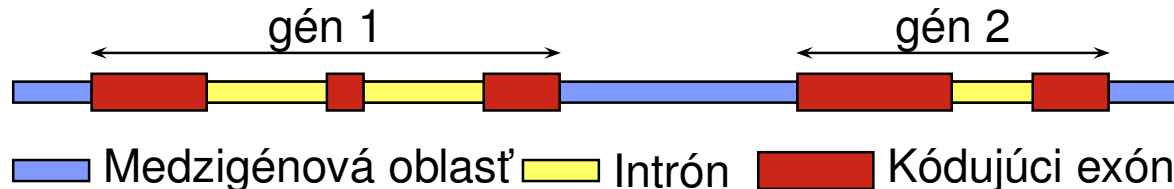
Vstup: sekvencia DNA

cgggtgaaactgcacgattggtgctggcttaaagatagaccaatcagagtgtgtaacgtca
tatttagcgtcttctatcatccaatcactgcactttacacactataaatagagcagctca
tgggcgtatttgcgctagtgttgggtgttccgctgtgctgtttttccgtcatggctcgca
ctaagcaaactgctcggaagtctactggtggcaaggcgccacgcaaacagttggccacta
aggcagcccgcaaaagcgctccggccaccggcggtgaaaaagccccaccgctaccggc
cgggcaccgtggctctgcgcgagatccgccgttatcagaagtccactgaactgcttattc
gtaaactacctttccagcgcctggtgcgcgagattgcgcgaggactttaaaacagacctgc
gtttccagagctccgctgtgatggctctgcaggaggcggtgcgaggcctacttggtagggc
tatttgaggacactaacctgtgcgccatccacgccaagcgcgctcactatcatgccaagg
acatccagctcgcccgccgcatccgcgagagagggcggtgattactgtggtctctctgac

Bioinformatický problém: Hľadanie génov

Cieľ: označ každú bázu ako intrón/exón/medzigénovú oblasť

```
cggtgaaactgcacgattggtgctggcttaaagatagaccaatcagagtgtgtaacgtca
tatttagcgtcttctatcatccaatcactgcactttacacactataaatagagcagctca
tgggcgtatttgcgctagtgttgggtgttccgctgtgctgtttttccgtcatggctcgca
ctaagcaaactgctcggaagtctactggtggcaaggcgccacgcaaacagttggccacta
aggcagcccgcaaaagcgctccggccaccggcggtgaaaaagccccaccgctaccggc
cgggcaccgtggctctgcgcgagatccgccgttatcagaagtccactgaactgcttattc
gtaaactacctttccagcgcctgtgcgcgagattgcgcgaggactttaaacagacctgc
gtttccagagctccgctgtgatggctctgcaggaggcggtgcgaggcctacttggtagggc
tatttgaggacactaacctgtgcgccatccacgccaagcgcgctcactatcatgccaagg
acatccagctcgcccgccgcatccgcgagagagggcggtgattactgtggtctctctgac
```



Bioinformatický problém: hľadanie génov

Vstup: sekvencia DNA

Cieľ: označ každú bázu ako intrón/exón/medzigénovú oblasť (anotácia)

- Toto nie je dobre definovaný problém!
Ako spoznáme, čo je gén?

Ako spoznáme gény?

Zloženie sekvencie:

- iná frekvencia k -tic báz v kódujúcich a nekódujúcich oblastiach,
- kódujúce oblasti sú 3-periodické,
- stop kodóny (TAA, TGA, TAG) len na konci posledného kódujúceho exónu.

Príklad: ak uvažujeme len jednotlivé bázy, exóny majú viac C a G (ľudský genóm)

		a	c	g	t
kódujúci exón	0	0.26	0.26	0.32	0.16
	1	0.30	0.24	0.20	0.26
	2	0.17	0.32	0.31	0.20
intrón		0.26	0.22	0.22	0.30
medzig.		0.27	0.23	0.23	0.27

Bioinformatický problém: hľadanie génov

Vstup: sekvencia DNA

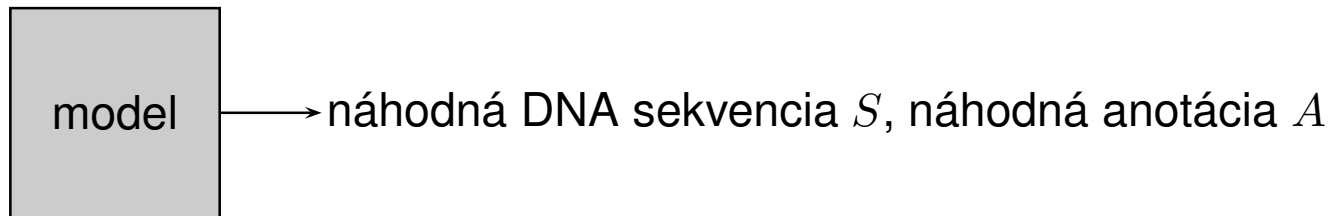
Cieľ: označ každú bázu ako intrón/exón/medzigénovú oblasť (anotácia)

- Toto nie je dobre definovaný problém!
Ako spoznáme, čo je gén?
- Žiadna informácia nám neumožňuje jednoznačne určiť, čo je gén.
- Chceme **skórovací systém**, ktorý povie, ako dobre potenciálna anotácia zodpovedá našim znalostiam.
- Potom hľadáme anotáciu (alebo: segmentáciu pôvodnej sekvencie na neprekrývajúce sa regióny, ktoré reprezentujú intróny, exóny a medzigénové úseky) **s maximálnym skóre.**
- Na definíciu skórovacieho systému použijeme **pravdepodobnostné modely.**

Pravdepodobnostný model génov

Žiadna informácia nám neumožňuje jednoznačne určiť, čo je gén.

Skombinujeme dostupnú informáciu pravdepodobnostným modelom.



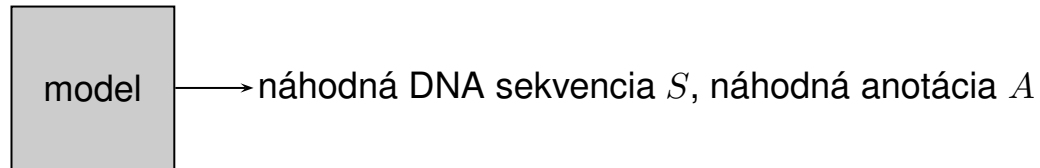
$\Pr(S, A)$ – pravdepodobnosť, že model vygeneruje pár (S, A) .

Model zostavíme tak, aby páry s vlastnosťami podobnými skutočným génom mali veľkú pravdepodobnosť.

Použitie: pre novú sekvenciu S nájdí najpravdepodobnejšiu anotáciu

$$A = \arg \max_A \Pr(A|S)$$

Pravdepodobnostný model génov



Použitie: pre sekvenciu S nájdí najpravdepodobnejšiu anotáciu A

Hračkársky príklad modelu: sekvencie dĺžky 2

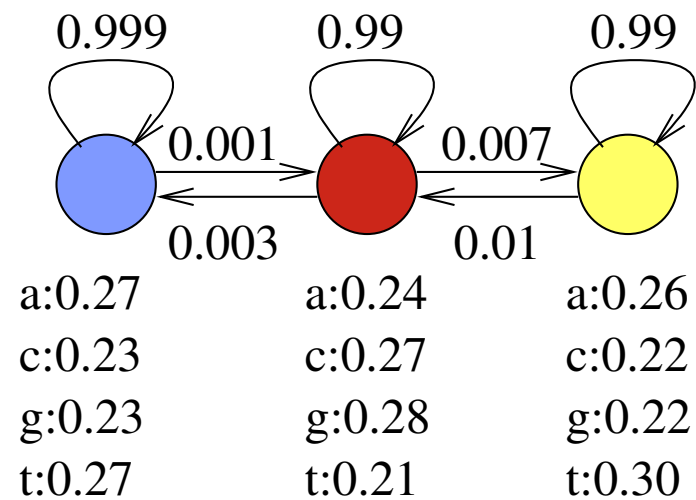
Tabuľka pravdepodobností pre 16 sekvencií, 9 anotácií (súčet 1)

Najpravdepodobnejšia anotácia pre $S = aa$ je aa .

aa	0.008	ac	0.009	ag	0.0085	...
aa	0	ac	0	...		
aa	0.011	...				
aa	0					
aa	0.009					
aa	0					
aa	0.007					
aa	0					
aa	0.010					

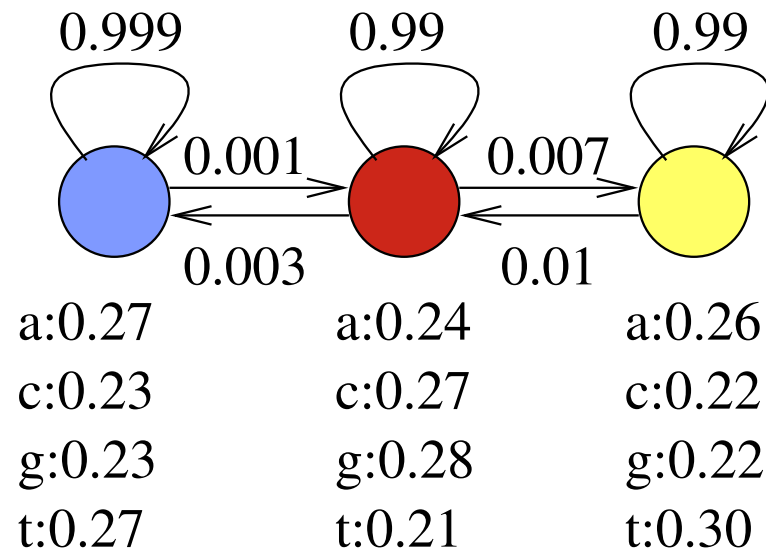
Skrytý Markovov model, hidden Markov model (HMM)

Spôsob, ako zdefinovať model pre dlhšie sekvencie.



- Konečný automat, stavy napr. exón, intrón, medzigénová oblasť
- Sekvenciu aj anotáciu generuje bázu po báze
- V každom kroku je v jednom stave a náhodne vygeneruje jednu bázu podľa tabuľky v stave
- Potom sa presunie do ďalšieho stavu podľa pravdepodobností na hranách

Skrytý Markovov model (HMM)



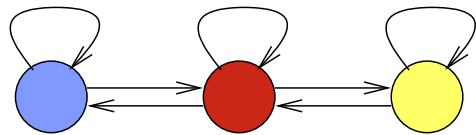
Predpokladajme, že model vždy začína v modrom stave.

Príklad:

$$\Pr(\text{aca}) = 0.27 \cdot 0.001 \cdot 0.27 \cdot 0.99 \cdot 0.24 = 0.000017$$

$$\Pr(\text{aca}) = 0.27 \cdot 0.999 \cdot 0.23 \cdot 0.999 \cdot 0.27 = 0.017$$

Matematické označenie



Sekvencia S_1, \dots, S_n







Anotácia A_1, \dots, A_n




Parametre modelu:

Prechodová pravdepodobnosť $a(u, v) = \Pr(A_{i+1} = v | A_i = u)$,

Emisná pravdepodobnosť $e(u, x) = \Pr(S_i = x | A_i = u)$,

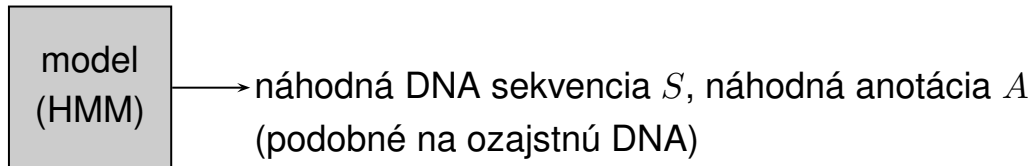
Počiatočná pravdepodobnosť $\pi(u) = \Pr(A_1 = u)$.

a			
	0.99	0.007	0.003
	0.01	0.99	0
	0.001	0	0.999

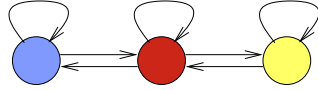
e	a	c	g	t
	0.24	0.27	0.28	0.21
	0.26	0.22	0.22	0.30
	0.27	0.23	0.23	0.27

Výsledná pravdepodobnosť: $\Pr(A_1, \dots, A_n, S_1, \dots, S_n) = \pi(A_1)e(A_1, S_1) \prod_{i=2}^n a(A_{i-1}, A_i)e(A_i, S_i)$

Hľadanie génov s HMM



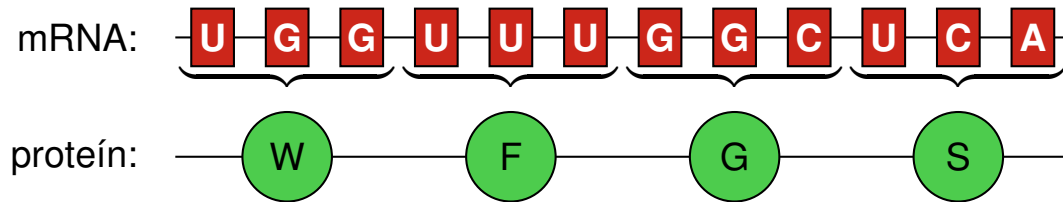
$\Pr(S, A)$ – pravdepodobnosť, že model vygeneruje pár (S, A) .

- **Určenie stavov a prechodov v modeli:** ručne, na základe poznatkov o štruktúre génu. 
- **Trénovanie parametrov:** emisné a prechodové pravdepodobnosti určíme na základe sekvencií so známymi génmi (**trénovacia množina**).
- **Použitie:** pre novú sekvenciu S nájdí najpravdepodobnejšiu anotáciu
$$A = \arg \max_A \Pr(A|S)$$

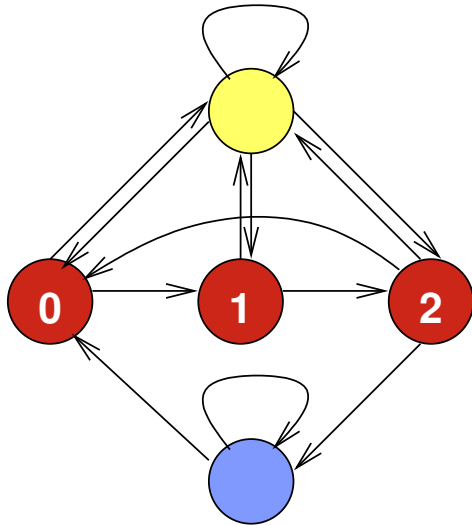
Viterbiho algoritmus v čase $O(nm^2)$ (dynamické programovanie)

HMM na hľadanie génov: 3-periodické exóny

Kodón (trojica báz) \rightarrow jedna aminokyselina



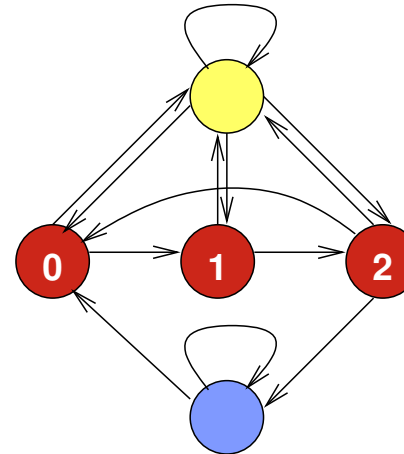
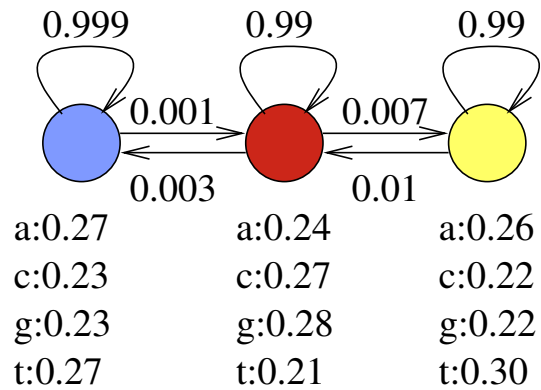
Namiesto jedného stavu pre exón použijeme tri stavy v cykle.



a	0	1	2		
0	0		0		0
1	0	0			0
2		0	0		
					0
		0	0	0	

$\Pr(A_i | A_{i-1})$

Nové stavy mají odlišné emisné pravdepodobnosti

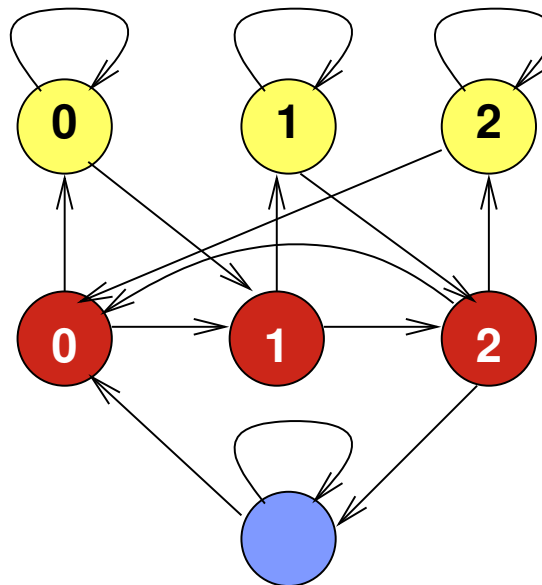
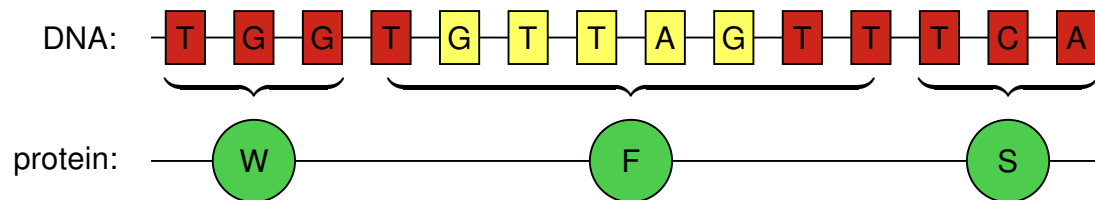


e	a	c	g	t
■	0.24	0.27	0.28	0.21
■	0.26	0.22	0.22	0.30
■	0.27	0.23	0.23	0.27

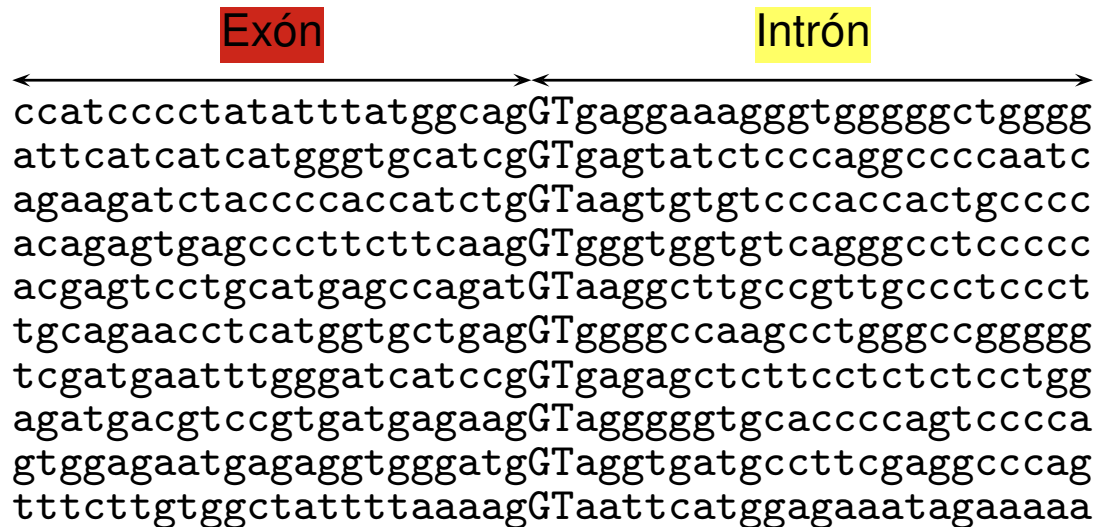
e	a	c	g	t
0	0.26	0.26	0.32	0.16
1	0.30	0.24	0.20	0.26
2	0.17	0.32	0.31	0.20
■	0.26	0.22	0.22	0.30
■	0.27	0.23	0.23	0.27

HMM na hľadanie génov: konzistentné kodóny

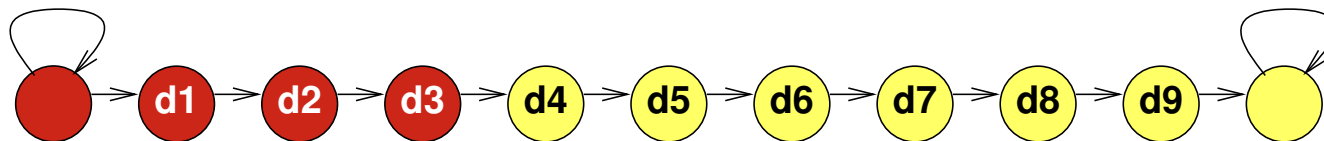
Intrón môže prerušiť kodón uprostred, chceme pokračovať, kde sme prestali.



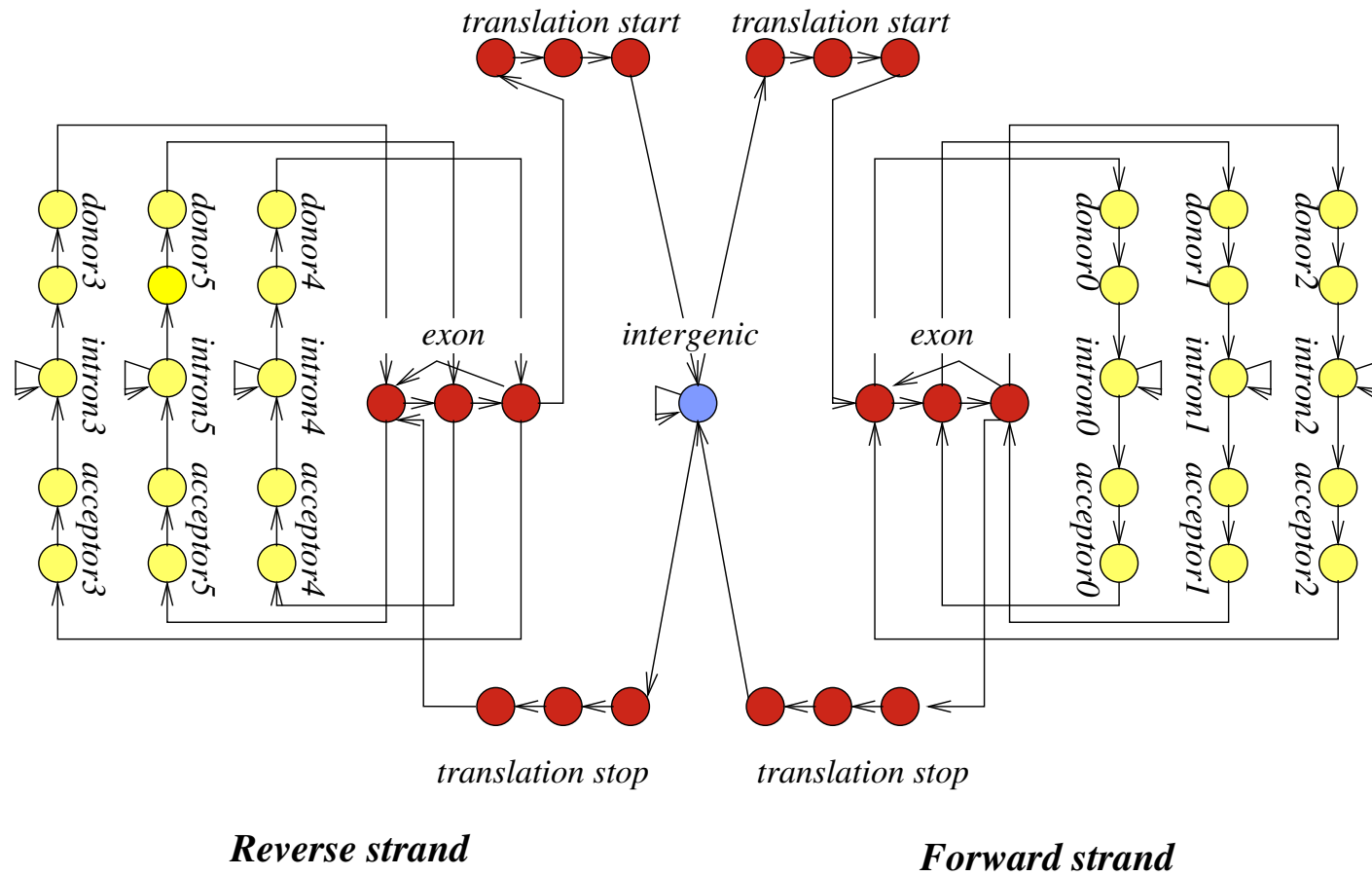
HMM na hľadanie génov: signály



Pridaj sériu stavov medzi exón a intrón:





HMM na hľadanie génov: celkový model



Stavy vyšších rádiv

Rád 0: emisná tabuľka e určuje $\Pr(S_i|A_i)$

Rád 1: e určuje $\Pr(S_i|A_i, S_{i-1})$

A_i	S_{i-1}	a	c	g	t
	a	0.24	0.23	0.34	0.19
	c	0.30	0.31	0.13	0.26
	g	0.27	0.28	0.28	0.17
	t	0.13	0.28	0.38	0.21
	a	0.30	0.18	0.27	0.25
	c	0.32	0.28	0.06	0.35
	g	0.27	0.22	0.27	0.24
	t	0.20	0.21	0.26	0.33

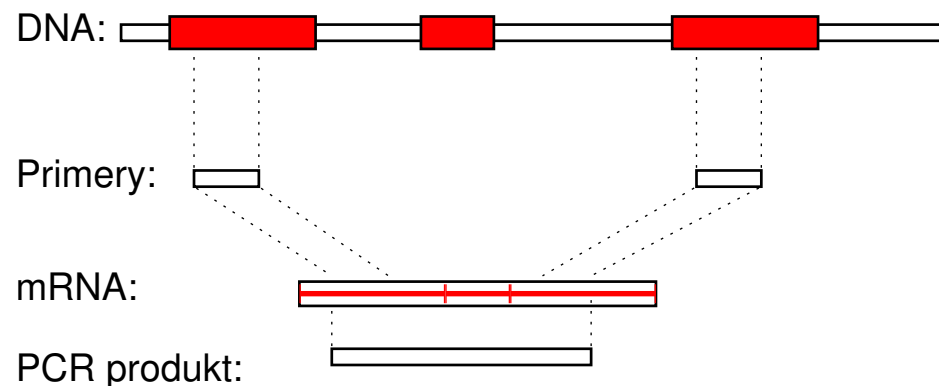
...

Na charakterizovanie exónov, intrónov atď' používame rád 4-5.

Experimentálne overovanie génov

Overenie transkripcie a zotrihu

- **RNA-Seq:** sekvenovanie častí mRNA extrahovaných z bunky. Nie je cielené na konkrétny gén.
- **RT PCR:** cielené over konkrétny predpovedaný gén pomocou špecifických primerov.



Problémy: ťažko nájsť gény s expresiou iba za zvláštnych podmienok (napr. v embryu), kontaminácia genómovou DNA, nejednoznačné namapovanie na genóm.

Experimentálne overovanie génov

Overenie translácie, prítomnosti proteínu

- Hmotnostná spektrometria (mass spectrometry) dokáže detegovať prítomnosť proteínu izolovaného napr. z 2D gélu.
- Metódy založené na protilátkach (antibody), prípadne špecifické techniky podľa typu proteínu.

Príklady programov na hľadanie génov

Len na základe sekvencie DNA:

HMMGene [Krogh 1997] (autor je priekopníkom HMM v bioinf.),
Genscan [Burge a Karlin 1997] (po mnohé roky štandard),
GeneZilla [Majoros a kol. 2004], ExonHunter [Brejová a kol. 2005], Augustus [Stanke a Waack 2003] (novšie programy založené na zovšeobecnených HMM).
CONTRAST [Gross 2007], CONRAD [DeCaprio 2007] (programy založené na conditional random fields, obmena HMM)

Prokaryotické genómy:

GeneMark [Lukashin a Borodovsky 1998], Glimmer [Delcher a kol. 1999] a ďalšie.

Vybrané programy na hľadanie génov

Porovnávaním viacerých sekvencií:

Twinscan [Korf a kol. 2001]

(prvý úspešný gene finder s dvoma genómami),

Exoniphy [Siepel a Haussler 2004]

(viacero genómov, nehľadá celé gény),

N-SCAN [Gross a Brent 2006]

(rozšírenie Twinscanu na viacero genómov).

Iná informácia: (napr. RNA-seq, príbuzné proteíny a pod.)

ExonHunter [Brejová a kol. 2005], Augustus [Stanke a kol. 2006],

Jigsaw [Allen a Salzberg 2005], Fgenesh++ [Solovyev 2006].

Augustus patrí dodnes medzi často používané programy.

Obmedzenia hľadáčov génov

- Alternatívny zostrih (alternative splicing): jeden gén môže vyprodukovať viacero mRNA molekúl. Programy väčšinou hľadajú iba jednu.

Retained intron:



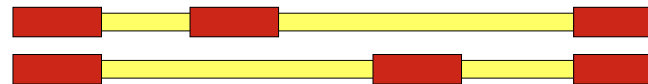
Skipped exon:



Alternative donor or acceptor:



Mutually exclusive exons:



- Pretínajúce sa gény, resp. gény v intrónoch.
- Netypické gény (neobvyklé signály, veľmi krátke alebo dlhé exóny alebo intróny atď.)
- Hľadanie UTR a začiatku/konca transkripcie.

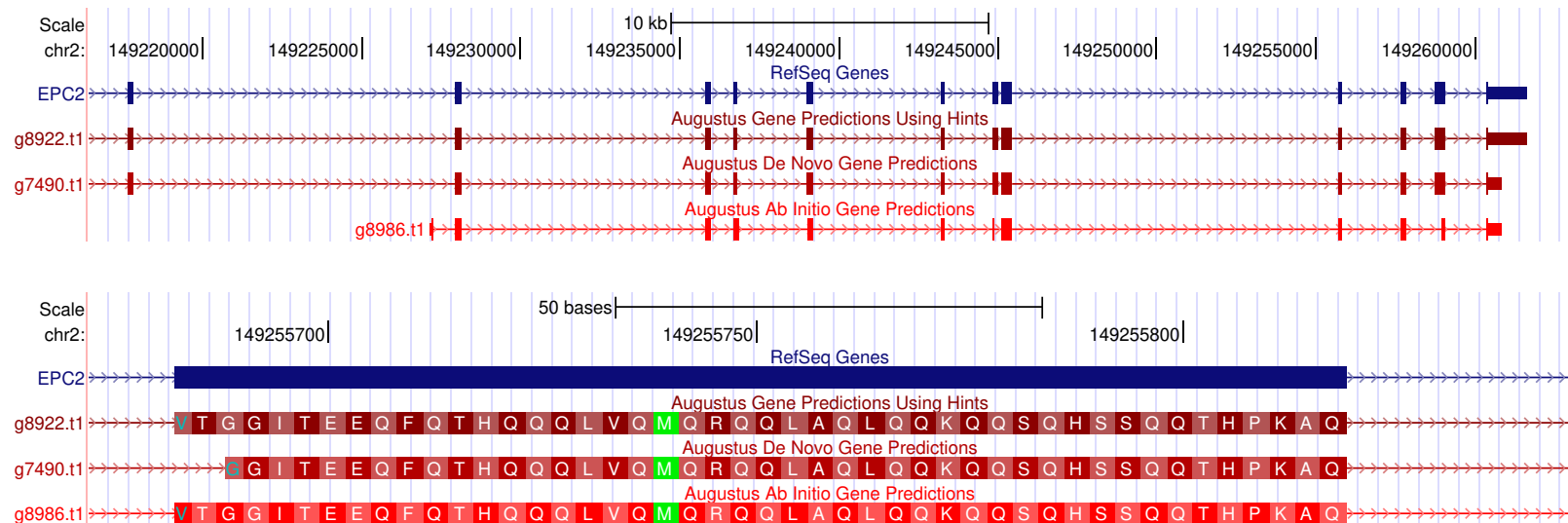
Hľadače génov robia často chyby

Najlepšie metódy v 2005 na ľudskom genóme: [Guigo et al 2006]

20% génov, 60% exónov správne iba na základe DNA

35% génov, 65% exónov správne komparatívne

70% génov, 85% exónov správne s ďalšou informáciou



Koľko génov má človek?

Do 2001: Rôzne odhady: **50 000–140 000** génov

2001: predbežná verzia ľudského genómu: **30 000–40 000** génov

2004: sekvencia ľudského genómu: **20 000–25 000** génov

2007: v katalógoch Ensembl, RefSeq a VEGA spolu **24 500** génov

[Clamp a kol. 2007] tvrdia, že iba **20 500** z nich je správnych

Ale sú gény, o ktorých ešte nevieme?

2010: RefSeq má **22 333** génov

Stále neistota ± 1000 [Perteau, Salzberg 2010]

Rôzni ľudia sa môžu líšiť v desiatkach génov

2012: Projekt ENCODE odhaduje **20 687** génov kódujúcich proteíny,

v priemere 6 alternatívnych transkriptov na gén,

plus 8 800 krátkych a 9 600 dlhých RNA génov

Zhrnutie

- Novo osekvenované genómy treba anotovať:
určovať funkcie jednotlivým oblastiam sekvencie
- Príkladom anotácie je hľadanie génov kódujúcich proteíny
- Na hľadanie génov sa hodia skryté Markovove modely
- Modely robia veľa chýb, ale dajú nám základnú predstavu o polohe a počte génov, môžeme študovať ich funkciu

Journal club: skupiny

- Zoznam skupín na stránke predmetu, každej skupine tiež príde spoločný email, aby ste sa vedeli navzájom nakontaktovať

Journal club: prvé stretnutie - pred 21.11.

- Každý si najprv prečíta článok, potom sa koná stretnutie, kde o článku diskutujete, vysvetlíte si navzájom nejasnosti, plánujete písanie správy
- Dátum, čas a miesto oznámte aspoň 24 hodín vopred v diskusii na Moodli
- Po stretnutí napíšte krátku správu zo stretnutia do príslušnej položky v Moodli (kto sa zúčastnil, čo sa dohodlo, či sú nejaké problémy, stačí pár viet)
- Ak treba, dohodnite si s nami konzultácie

Správa zo journal clubu

- Vlastnými slovami hlavné metódy a výsledky článku
- Pochopiteľná pre študentov tohto predmetu (inf aj bio)
- Vysvetlite pojmy, ktoré sú nad rámec tohto predmetu
- Netreba pokryť všetko, môžete využiť aj iné zdroje
- Podrobne vysvetliť aspoň jednu bioinformatickú metódu a aspoň jeden biologický výsledok (alebo overovanie správnosti metódy na dátach)
- Ako článok súvisí s učivom preberaným na predmete
- Nájdite zopár citujúcich prác, ktoré výsledky využili alebo vylepšili
- Rozsah cca 1-2 strany na osobu, jeden ucelený text
- V správe vymenujte členov skupiny, ktorí sa podieľali na jej spísaní, dostanú rovnako bodov