Počítačové vyhledávání genů a funkčních oblastí na DNA

Hodnota genomových sekvencí záleží na kvalitě anotace

- Anotace – Charakterizace genomových vlastností s použitím výpočetních a experimentálních metod
- Hledání genů:
  - Predikce – Kde jsou geny lokalizovány?
  - Podobnost – Jak geny vypadají?
  - Domény – Jakou funkci mají proteiny?
  - Funkce – V jakých metabolických drahách?
  - Evidence – Experimentální důkaz genu

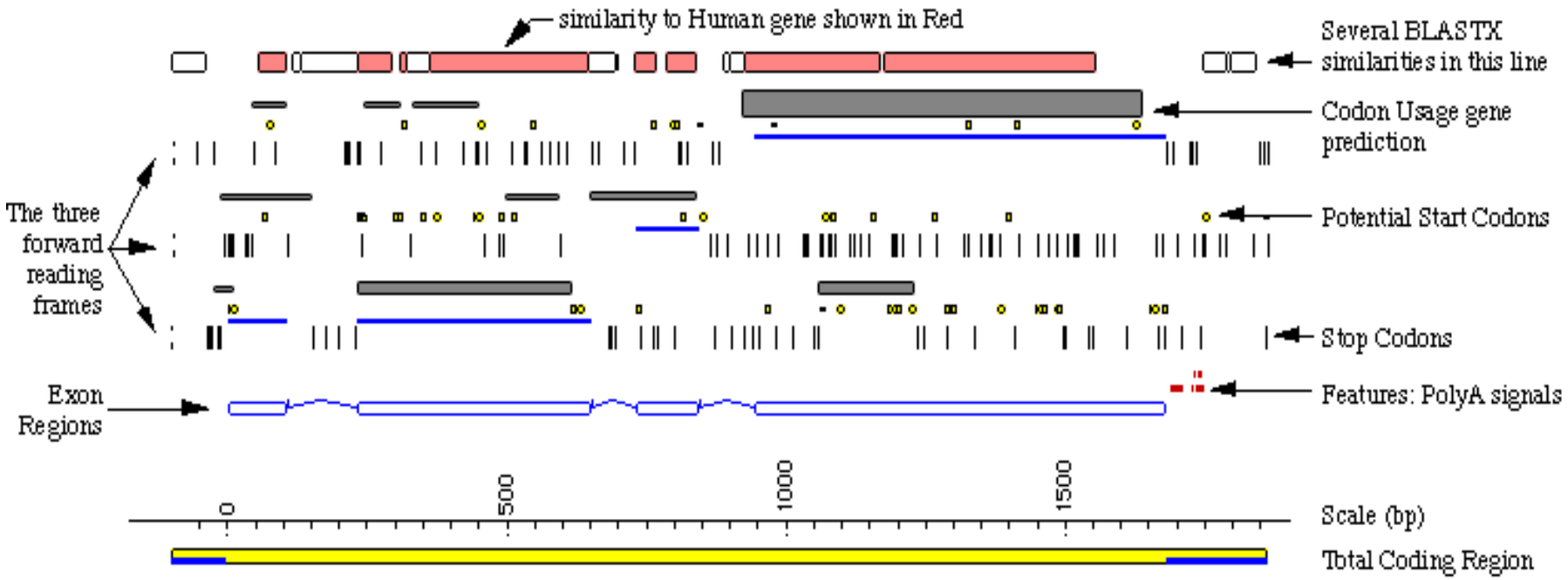
Hledání genů

- Geny tvoří **obsahovou složku** genomu
  - Jedinečné sekvence odpovědné za funkční produkt
  - Variabilní délka
  - Mnohdy složené z exonů a intronů
  - Geny pro funkční RNA
    - RNAi (interfering RNA)
    - rRNA (ribosomal RNA)
    - tRNA (transfer RNA)
    - snRNA (small nuclear)
    - snoRNA (small nucleolar)
- Jakým způsobem vyhledávat geny?

Přístupy pro hledání genů

1. Metody založené na hledání podobností s již popsanými geny
2. Metody srovnávací genomiky
   - Srovnání více dokončených genomů
   - Hledání konzervativních oblastí
3. Využití algoritmů a statistických metod pro analýzu sekvence
   - Hledání signálů
4. Integrované přístupy

Integrovaný přístup predikce genu



Prokaryotický versus eukaryotický gen vyžadují odlišné přístupy

- Prokaryota
  - malé genomy 0.5 – $10 \cdot 10^6$ bp
  - Vysoká hustota kódujících sekvencí (>90%)
  - Žádné introny (vyjímky Archea, fágy)
  - Hledání otevřených čtecích rámců
  - Doplněno např. hledáním signálů pro vazebná místa ribozómu
  - Operony: jeden transkript, mnoho genů
  - Úspěšnost cca 99 %
  - Problémy: překrývající se ORFs, krátké geny, místa TSS a promotory
- Eukaryota
  - Velké genomy 10^7 – 10^{10} bp
  - Nízká hustota kódujících sekvencí (<50%)
  - UTRs
  - Struktura intron/exon
  - Statistické modely frekvencí nukleotidů
  - Sledování závislostí přítomných ve struktuře kodonů
  - Obsah GC
  - Přesnost dosahuje cca 50 %
  - Problémy: mnoho!
    - postranskripční modifikace
    - alternativní sestřih

Příklady velikostí genomů

Druh	Velikost	Genů	Genů/Mb
H. sapiens	3 200 Mb	22 000	7
D. melanogaster	137 Mb	13 338	97
C. elegans	85,5 Mb	18 266	214
A. thaliana	115 Mb	25 800	224
S. cerevisiae	15 Mb	6 144	410
E. coli	4,6 Mb	4 300	934

1. Metody založené na hledání podobností s již popsanými geny

- Založené na konzervativním charakteru sekvencí s určitou funkcí
- Využívají nástroje pro lokální nebo globální přiložení sekvencí (BLAST, FASTA, LAGAN, AVID, atd.)
- Nemohou identifikovat geny, které nejsou v databázi (~50% genů)
- Omezení u sekvencí s nízkou podobností

Metody založené na hledání podobností

- Databáze
  - Proteiny
  - cDNA (evidence RNA)
  - EST, UniGene
- Nástroje pro párové přiložení sekvencí umožňující analýzu genů
  - **Hledání genů na základě podobnosti sekvencí proteinů**
    - **blastx**
    - **tblastn**
    - **fastX**
    - **genomové prohlížeče**

2. Srovnávací genomika – hledání na základě homologie

- Hledání založené na předpokladu, že kódující sekvence jsou více konzervativní než nekódující
- Dva přístupy:
  - intra-genomický (genové rodiny)
  - inter-genomický (mezi druhy)
- Mnohonásobné přiložení homologických oblastí
  - exony
  - regulační oblasti
- Obtížné stanovení limitů podobnosti a optimální evoluční vzdálenosti

Co je srovnáváno?

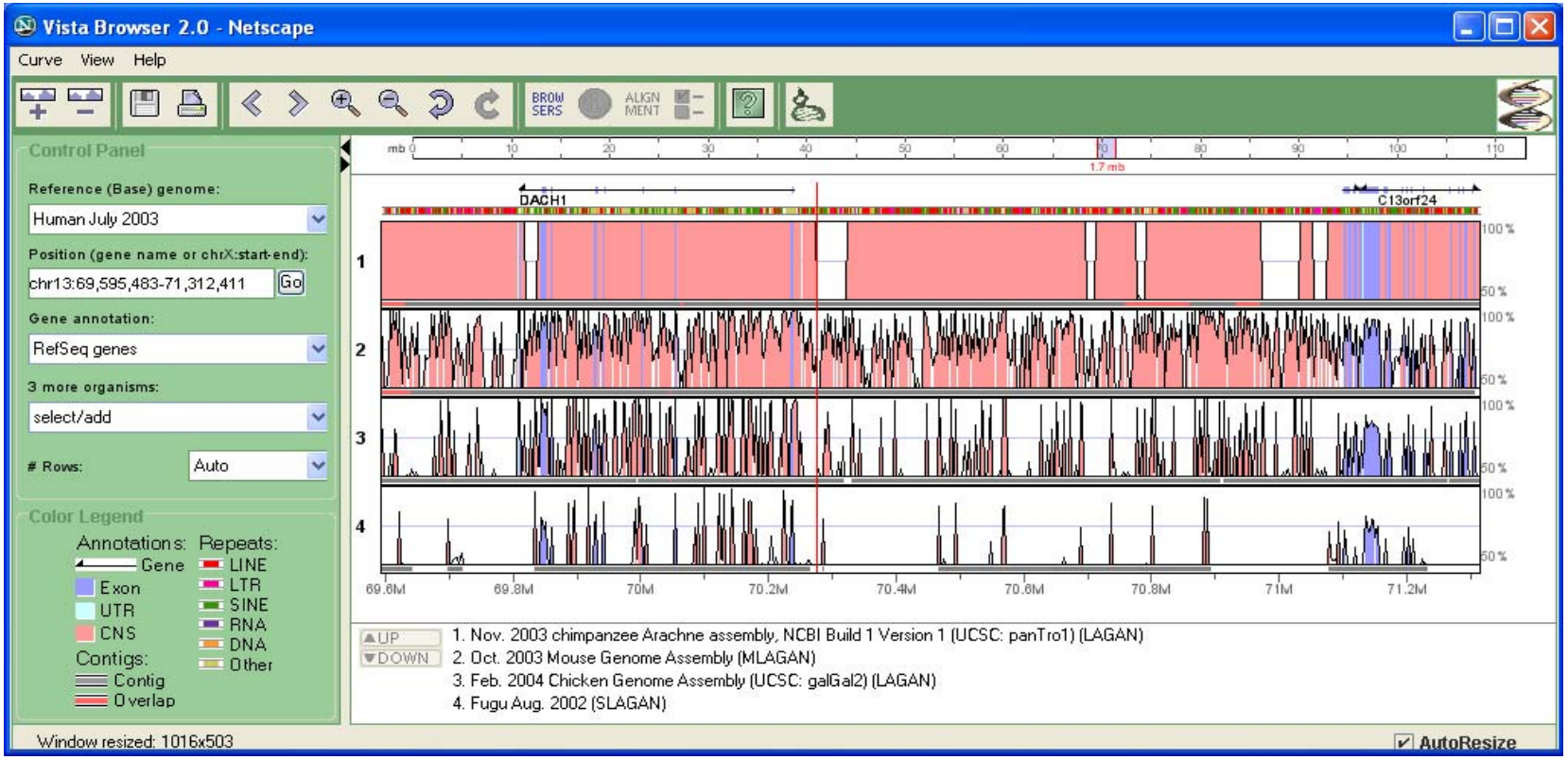
- **Lokalizace genů v genomu**

- **Struktura genů**
  - Počet exonů
  - Délky exonů
  - Délky intronů
  - Podobnost sekvencí

- **Vlastnosti genů**
  - Místa sestřihu
  - Využití kodonů
  - Konzervované sekvence

Proč používat přístupy srovnávací genomiky ?

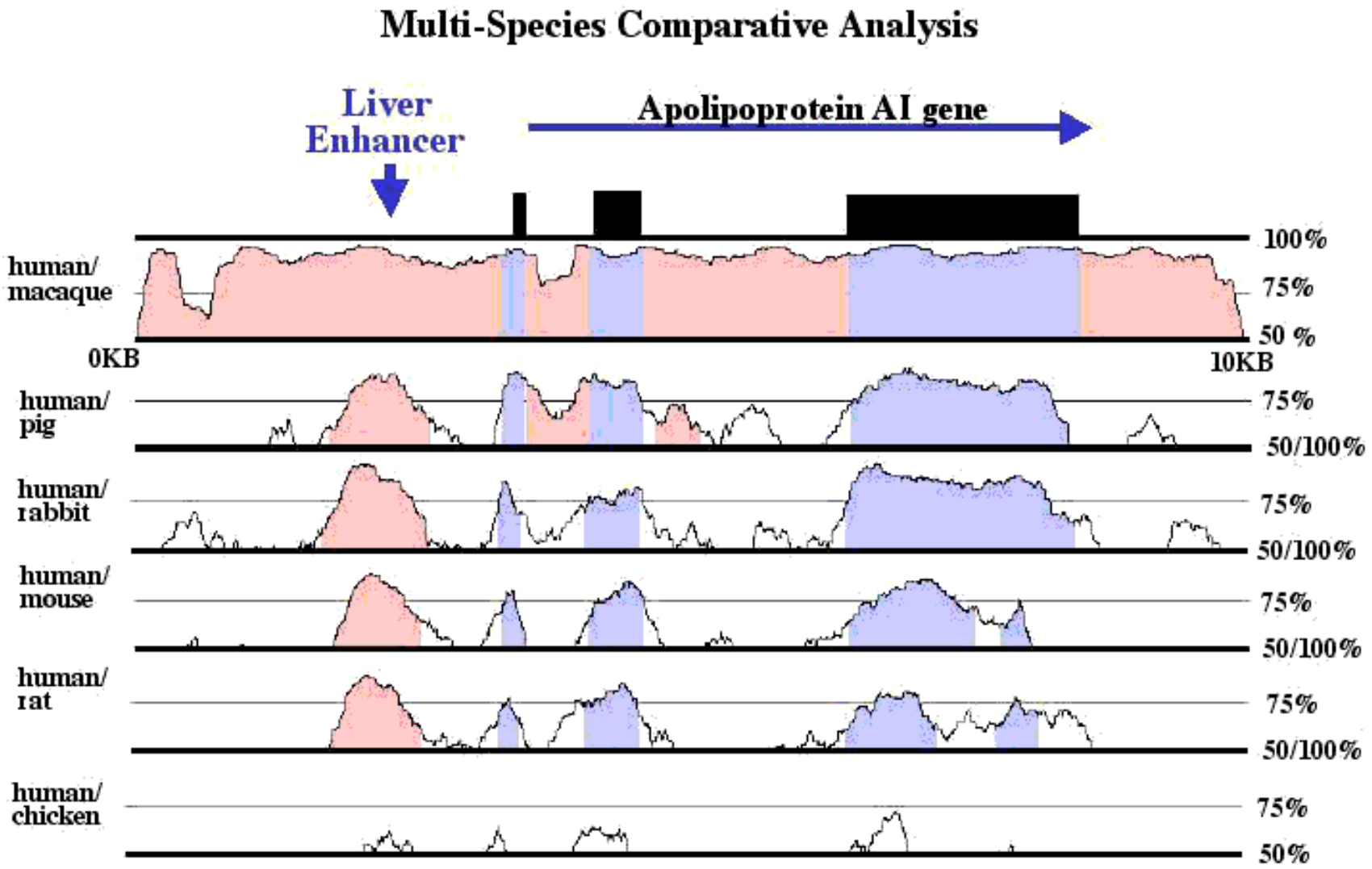
- Konzervovanost sekvencí v průběhu značných evolučních vzdáleností značí specifickou funkci (geny, funkční-regulační oblasti)
- Ztráta konzervovanosti během krátkých evolučních vzdáleností značí adaptivní evoluci



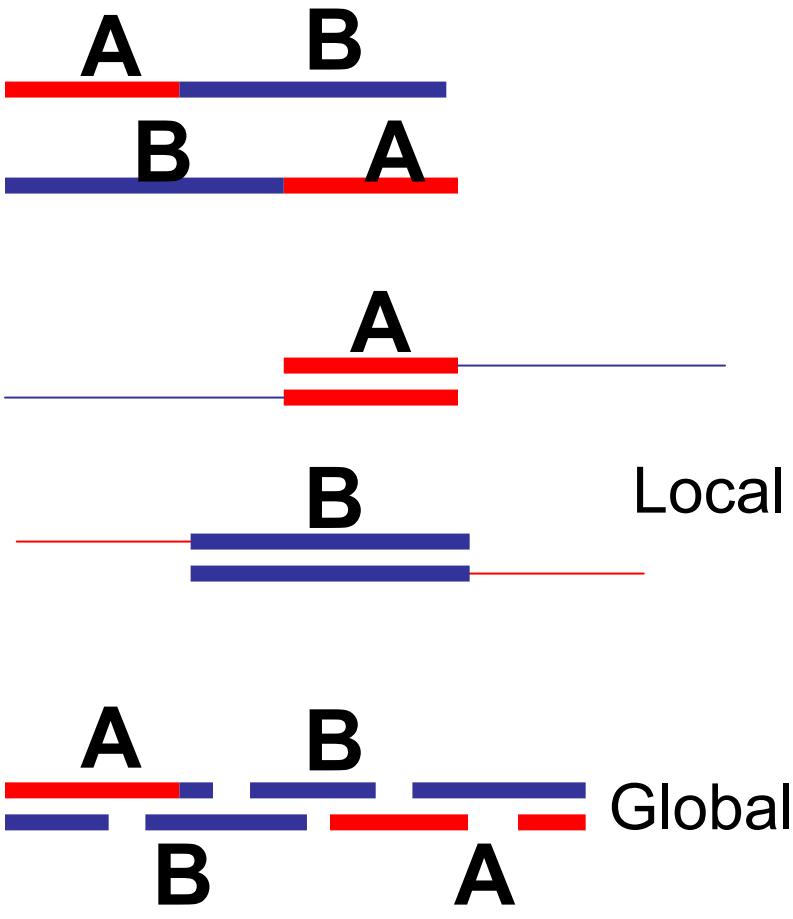
- šimpanz
- myš
- kuře
- Fugu

VISTA Genome Browser http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml

Konzervativní charakter regulačních oblastí a exonů

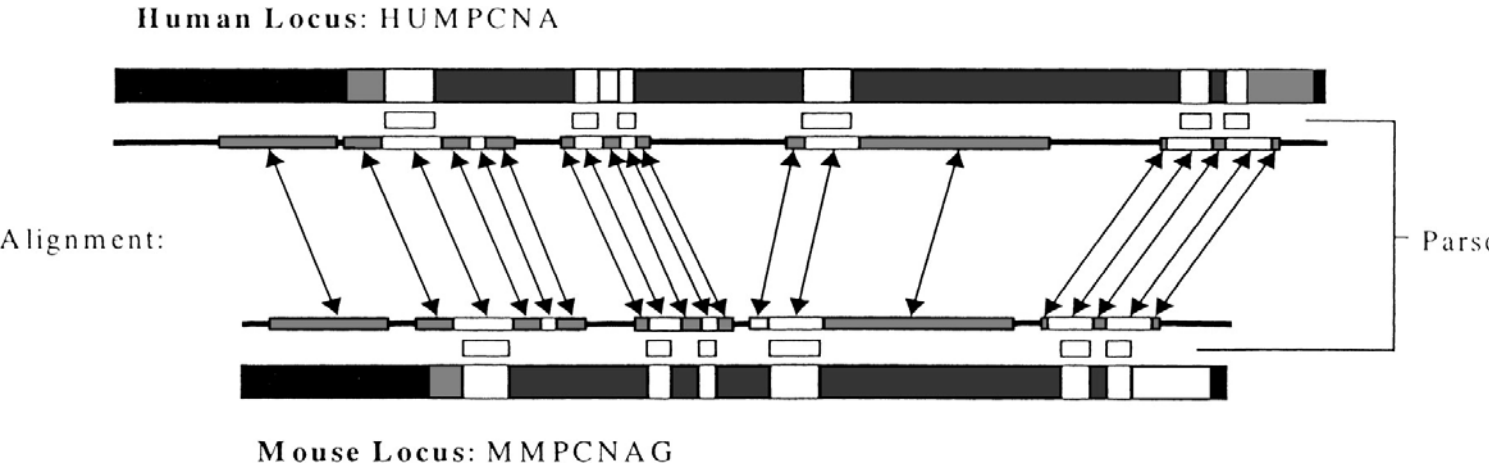


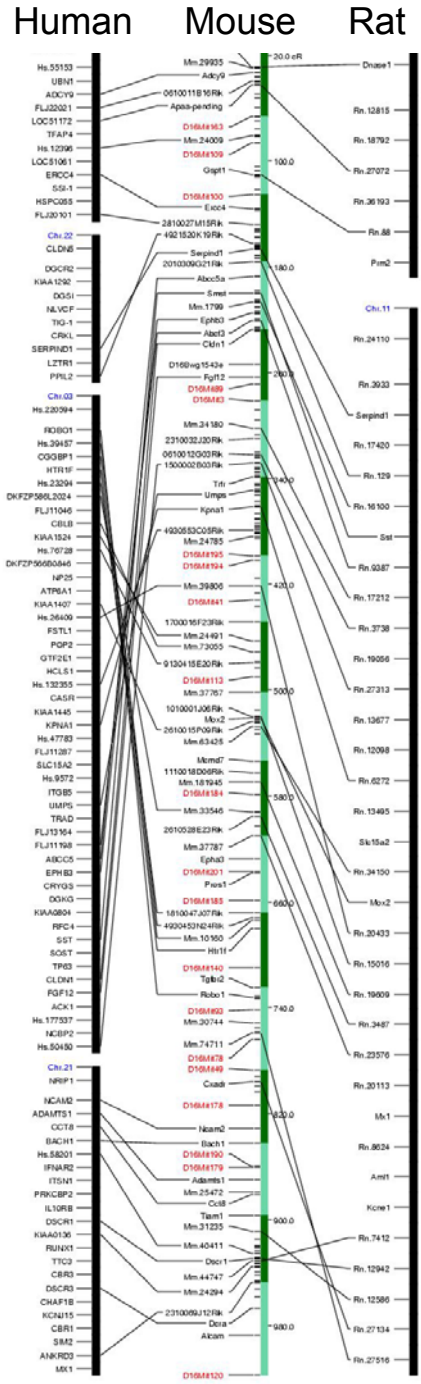
Lokální versus globalizované sekvenční přiložení



Příklad srovnání lokusů a chromozómů

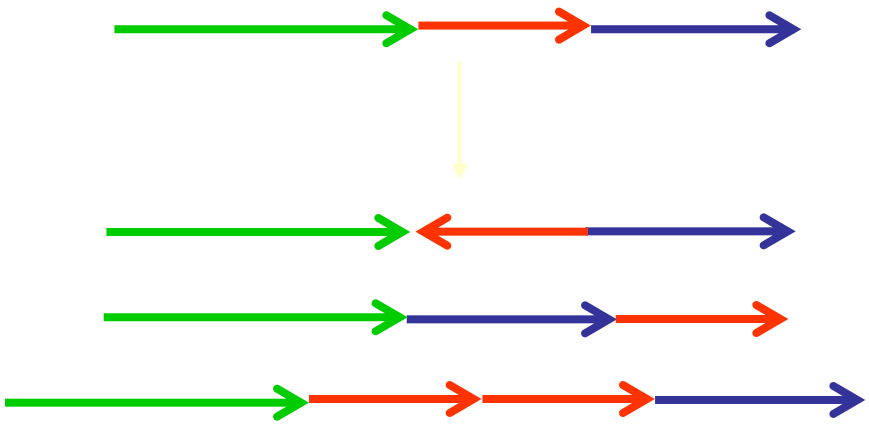
Charakterizace rozdílů umožňuje odhalit mechanismy změn





Problém globálního přiložení

Nalezení nejefektivnější transformace jedné sekvence do druhé vyžaduje využití přístupů pro identifikaci přestaveb



- Bodové změny, delece
- Inverze
- Translokace
- Duplikace
- Kombinace uvedených změn

Základní zdroje a přístupy

- Databáze
  - NCBI: Genomy, Geny, Proteiny, SNPs, ESTs, Taxonomie, atd.
  - databáze genomových center
- Analytický software
  - Databázové dotazy (nalezení podobných sekvencí), algoritmy pro přiložení, shluková analýza, vyhledávání repetic, predikce genů
- Algoritmy pro dlouhá globální přiložení
  - lokální přiložení s rozšířeným vkládáním mezer – citlivé, ale málo specifické pro dlouhé sekvence
    - BLASTZ
    - BLAT
  - globální přiložení
    - AVID
    - LAGAN
    - S-LAGAN
    - MAVID, MLAGAN

AVID

- Umožňuje srovnání pouze homologních sekvencí bez duplikací, inverzí nebo translokací
- Pokud je aplikován na celé genomy, vyžaduje předem přípravu a identifikaci vzájemně si odpovídajících regionů

LAGAN
(Limited Area Global Alignment)

- Umožňuje srovnat mnohem delší sekvence než AVID v důsledku jiného algoritmu pro identifikaci vzájemně odpovídajících si úseků
- Používá se společně s následným lokálním přiložením dlouhých sekvencí (BLAT)
  - rat – mouse
  - rat - human

Multi-LAGAN (MLAGAN)

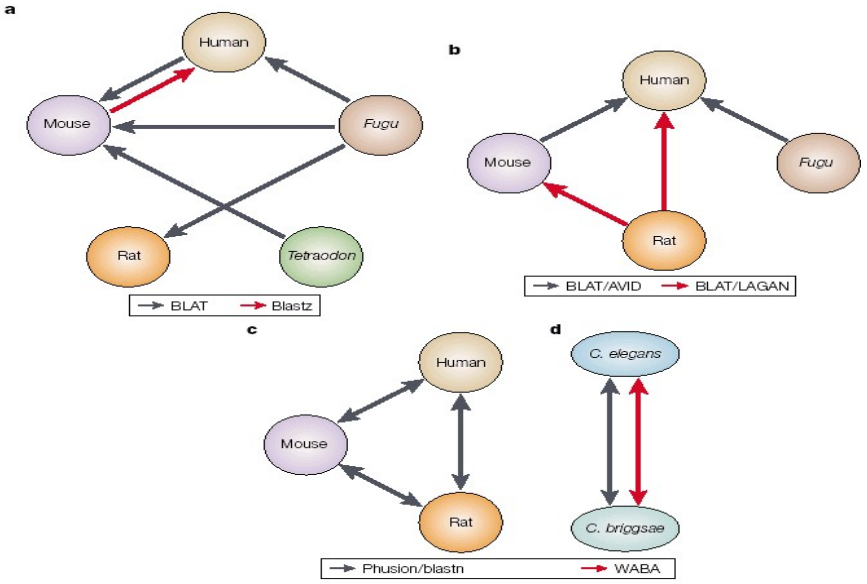
- V porovnání s LAGAN provádí navíc mnohonásobná globální přiložení
- Nejprve provede přiřazení více příbuzných genomů a následně přiřazuje genomy více fylogeneticky vzdálené
- Umožňuje konstrukci fylogenetických stromů na základě globálního přiložení genomů

Shuffle-LAGAN (S-LAGAN)

- Slouží pro globální přiložení kompletních sekvencí genomů
- Detekuje genomová přeskupení a inverze
- Poskytuje přiřazení všech kombinací vložených sekvencí

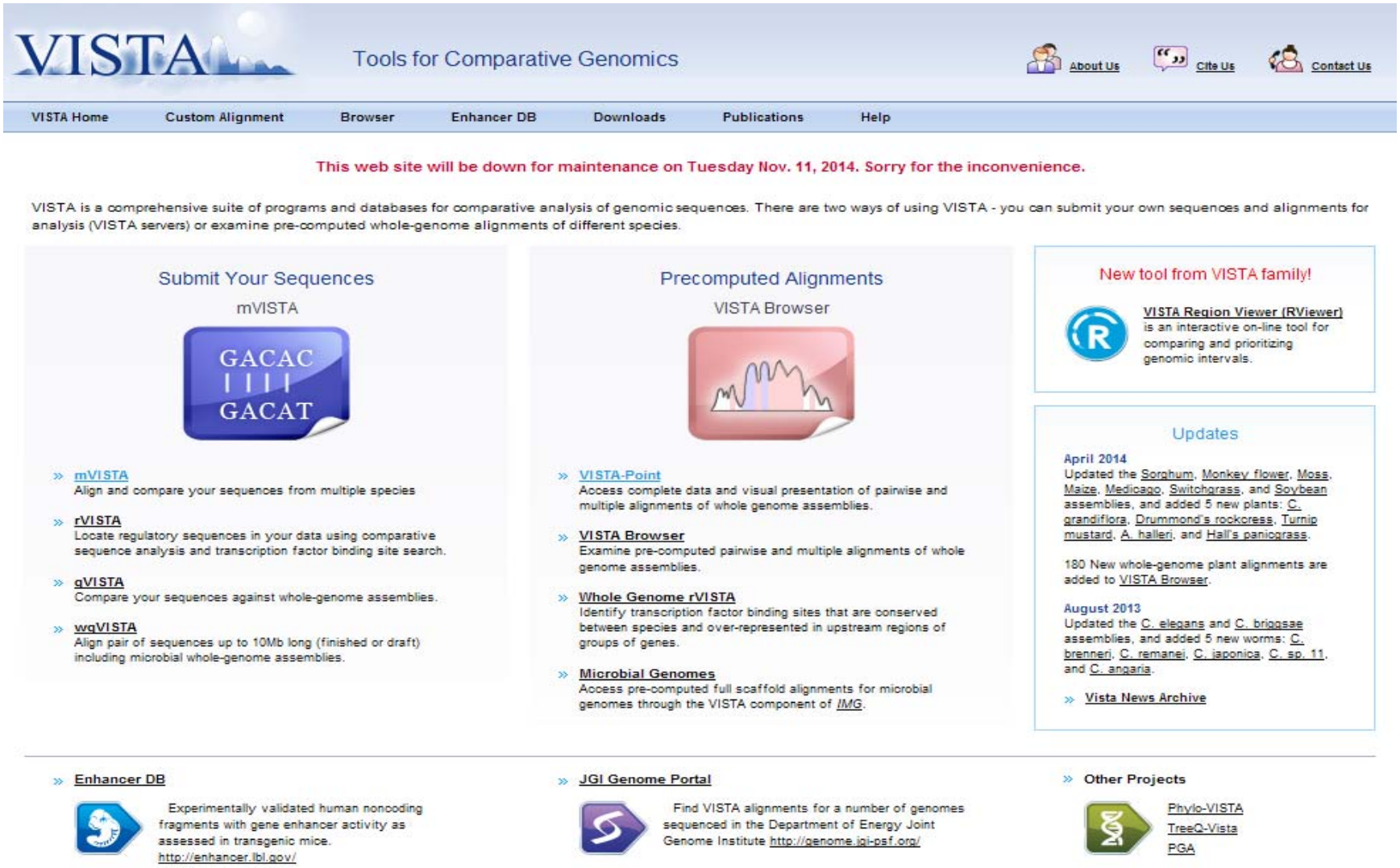
Precomputed alignments

- U významných skupin organismů jsou k dispozici rozsáhlá mezidruhová srovnání
  - UC Santa Cruz/PennState (translated BLAT or BLASTZ)
  - Berkeley Genome Pipeline (BLAT/AVID)
  - Ensembl (Phusion/Blastn)
  - Vista Genome Server (LAGAN/SLAGAN/AVID)
  - NMPDR (National Microbial Pathogen Data Resource)

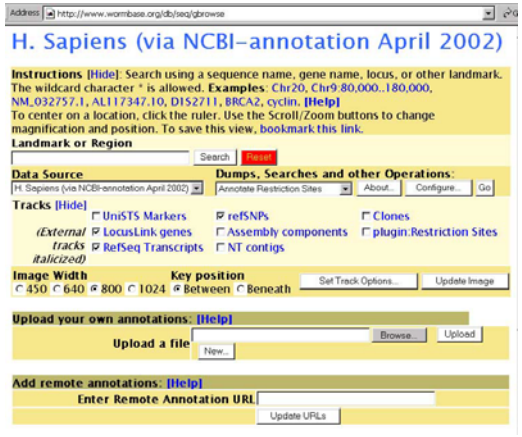


Vista Tools

http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml

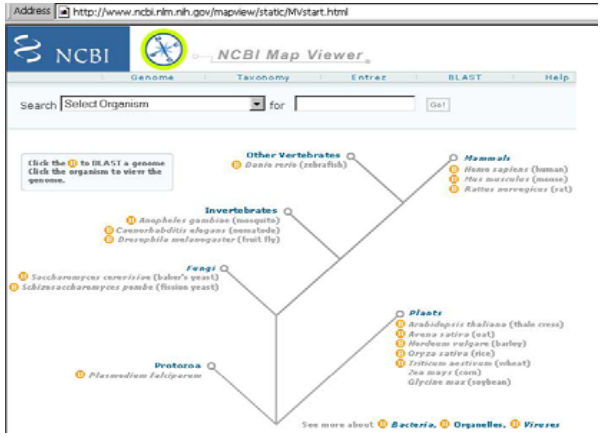


Other Genome Browsers



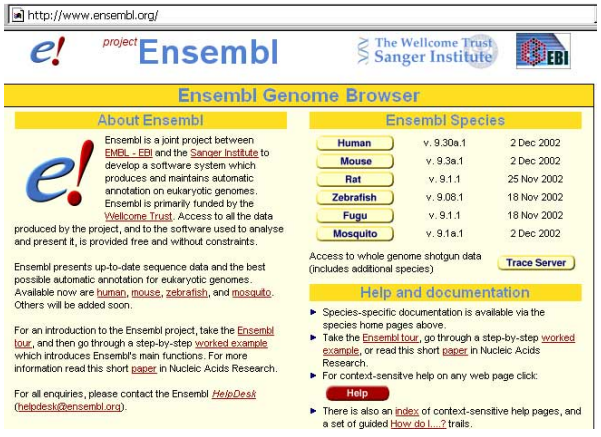
Generic Genome Browser (CSHL)

www.wormbase.org/db/seq/gbrowse



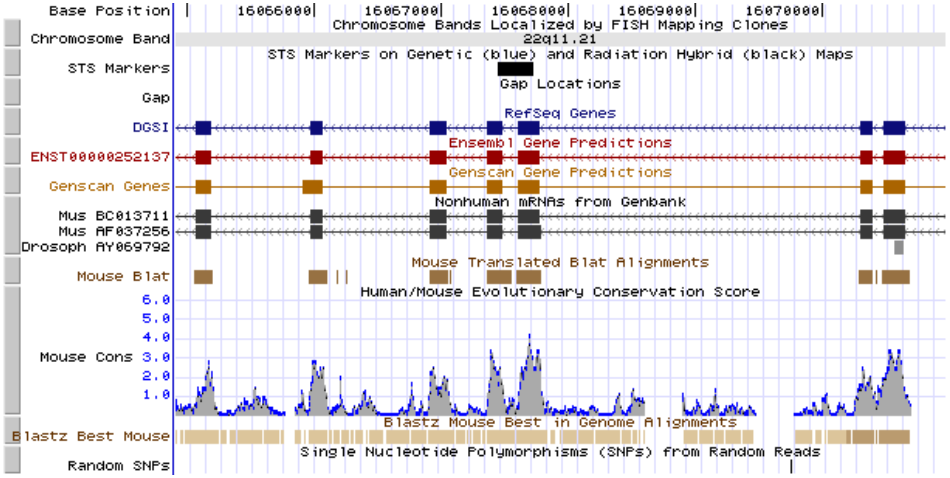
NCBI Map Viewer

www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/



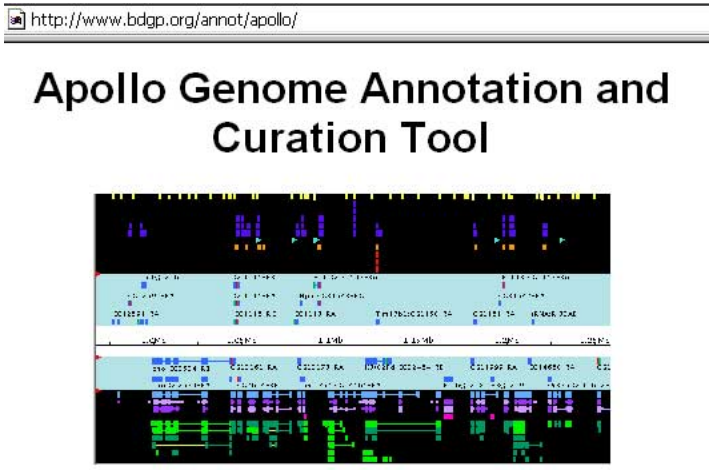
Ensembl Genome Browser

www.ensembl.org/



UCSC Genome Browser

genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?org=human



Apollo Genome Browser

www.bdgp.org/annot/apollo/

Odhalení genů s použitím ESTs

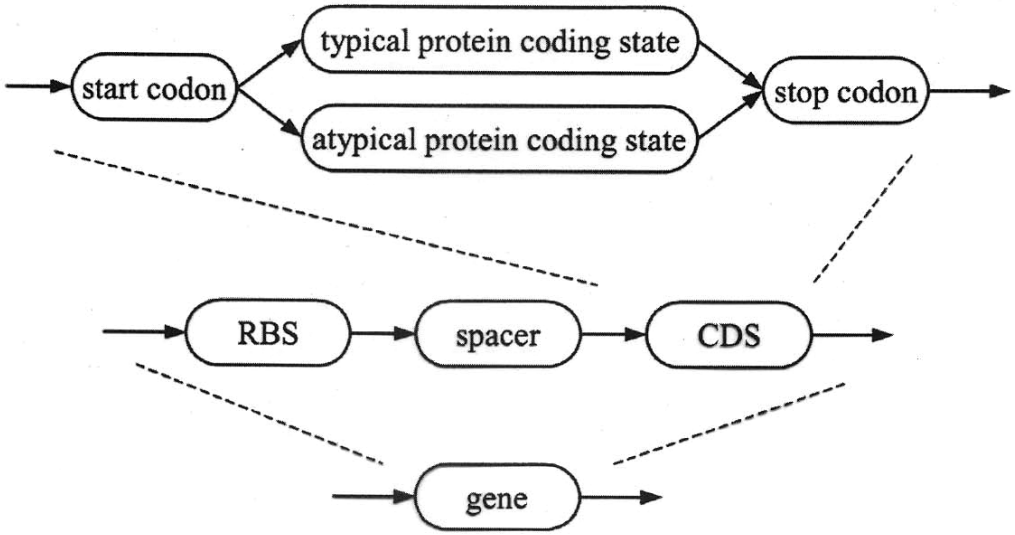
- Expressed Sequence Tags (ESTs) reprezentují sekvence exprimovaných genů (cDNA).
- Jestliže se oblast shoduje s EST s vysokou stringencí, pravděpodobně se jedná o gen
  - EST podává přesnou predikci hranic exonů.

3. Predikce kódující oblasti na základě hledání signálů

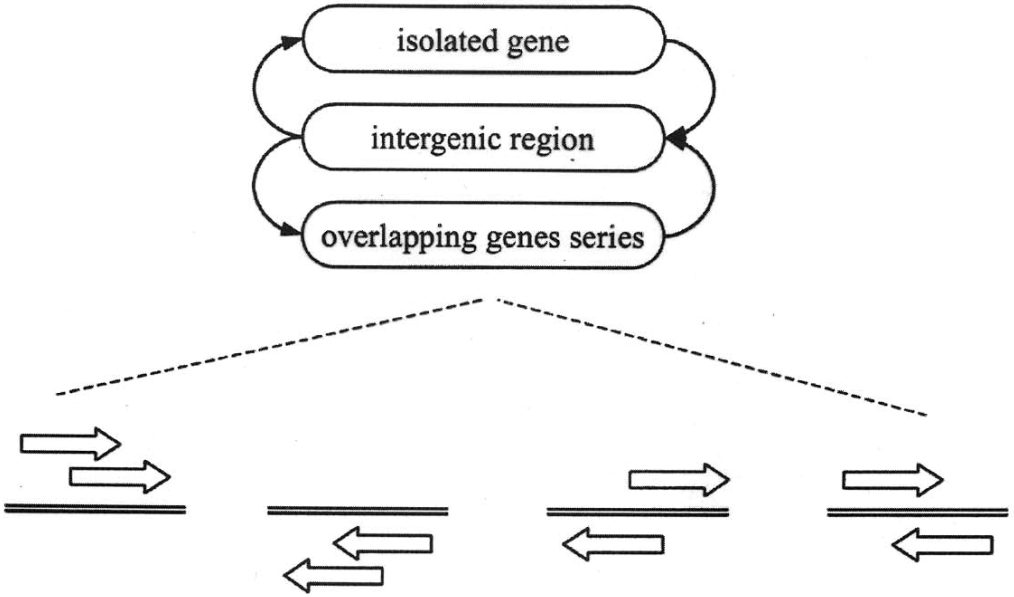
- Prokaryota
  - Hledání otevřených čtecích rámců doplněné hledáním konzervativních signálů v transkripčních jednotkách
  - **ORF Finder (Open Reading Frame Finder)** http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
- Eukaryota
  - Predikce promotorů
  - Predikce polyA-signálů
  - Predikce míst sestřihu a start/stop kodonů

Výpočetní přístupy
*Klíčové jsou **signály** pro odhalení genů*

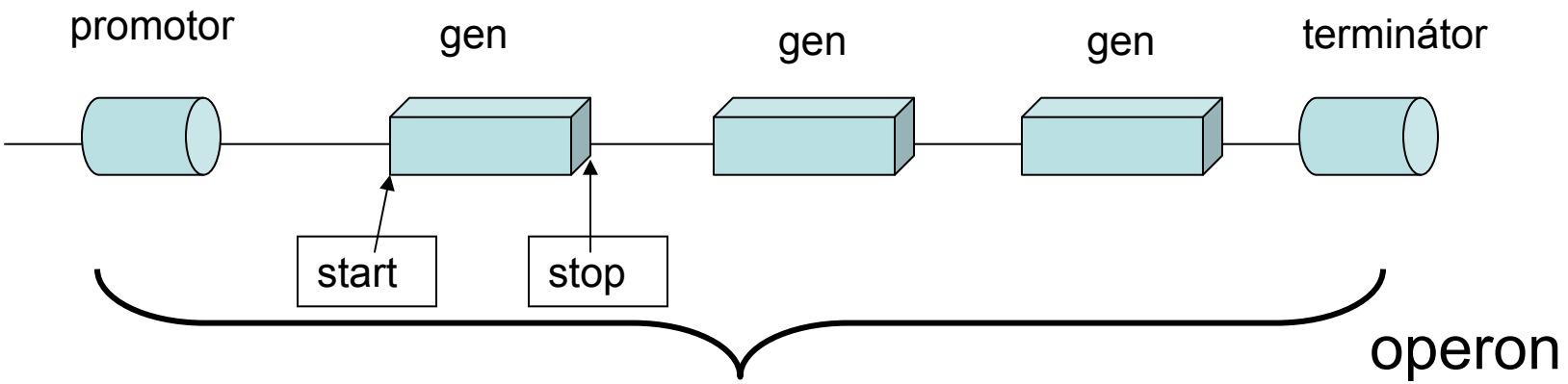
- iniciační a terminační kodony
- promotory
- vazebná místa pro ribozómy (RBS)
- místa sestřihu
- terminátory transkripce
- polyadenylační místa
- vazebná místa pro transkripční faktory



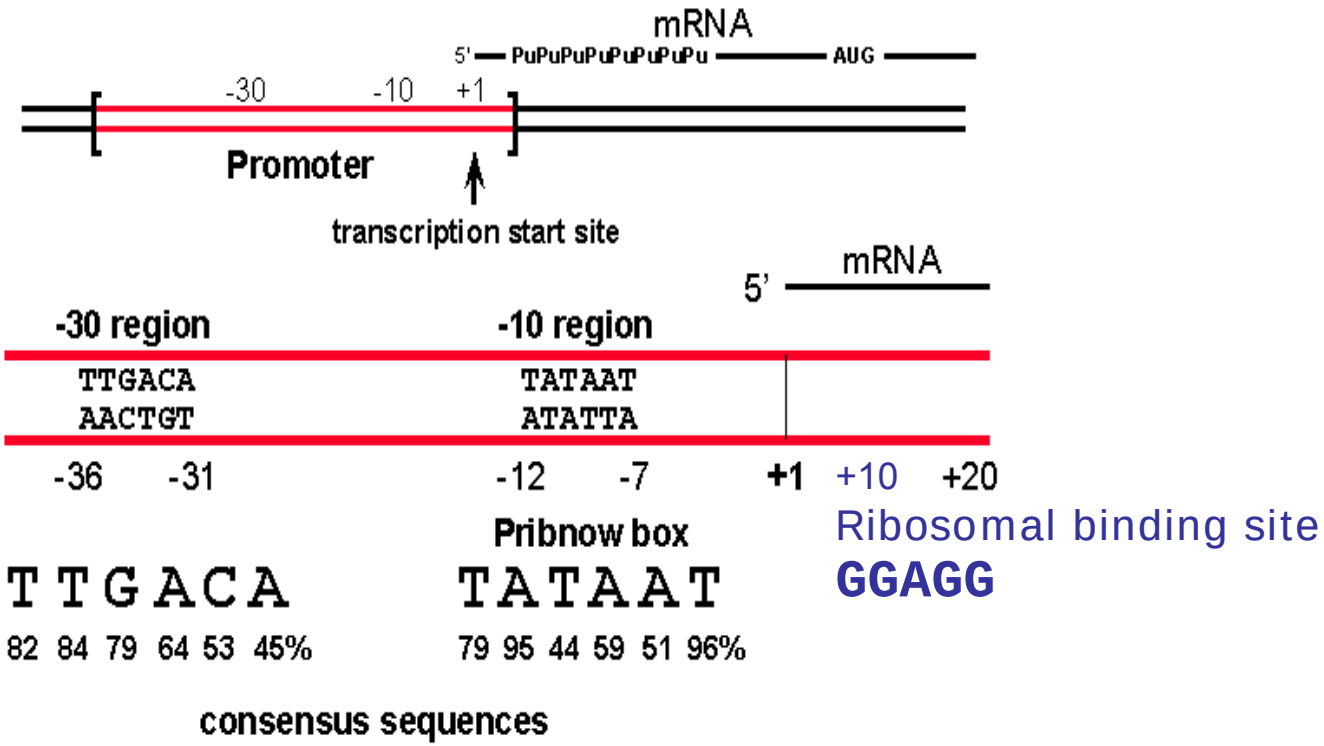
Model pro hledání jednoduchých genů



Struktura prokaryotické transkripční jednotky



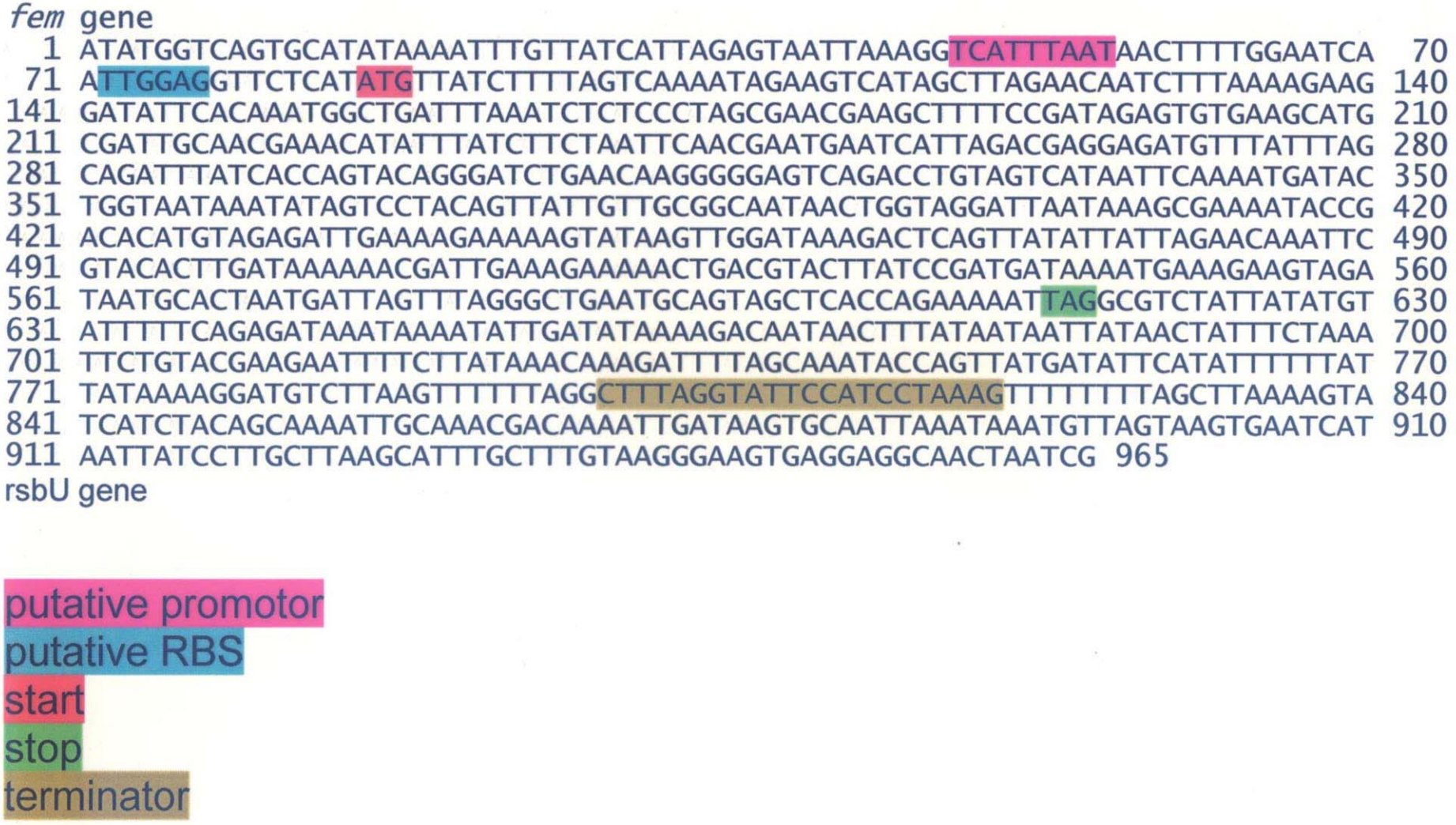
Konzervativní struktury v promotoru prokaryot



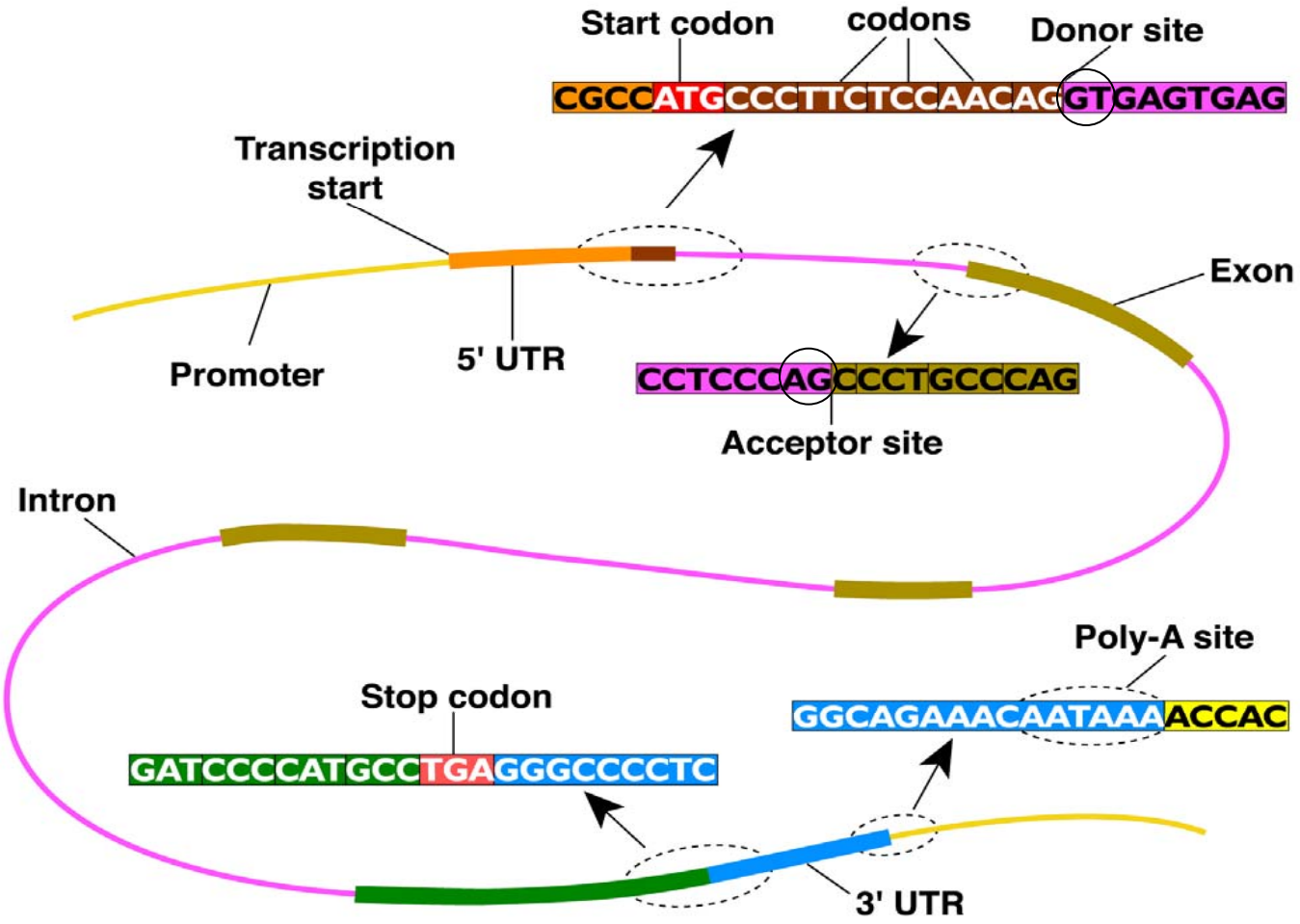
Ribosomal binding site

GGAGG

Signály v jednoduchém strukturním genu



Signály – senzory ve struktuře eukaryotického genu



Metody pro vyhledávání signálů

- hledání konvenční sekvence spolu s možnostmi přípustných odchylek
- použití vážených matic
  - každá pozice vzoru signálu připouští shodu s jakýmkoli zbytkem
  - různé zbytky mají v každé pozici přiřazenou jinou významnost

Příklad konsenzní sekvence signálu

- Získána výběrem nejčastěji se vyskytující báze v každé pozici mnohonásobného přiložení příslušné subsekvence našeho zájmu

TACGAT
TATAAT
TATAAT
GATACT
TATGAT
TATGTT

konsensus sequence TATAAT

konsensus (IUPAC) TATRNT

- Vede ke ztrátě informací a získání mnoha falešně pozitivních i negativních výsledků

Příklad poziční vážené matice

- Vyjadřuje frekvenci každé báze v každé pozici příslušné sekvence

TACGAT
TATAAT
TATAAT
GATACT
TATGAT
TATGTT

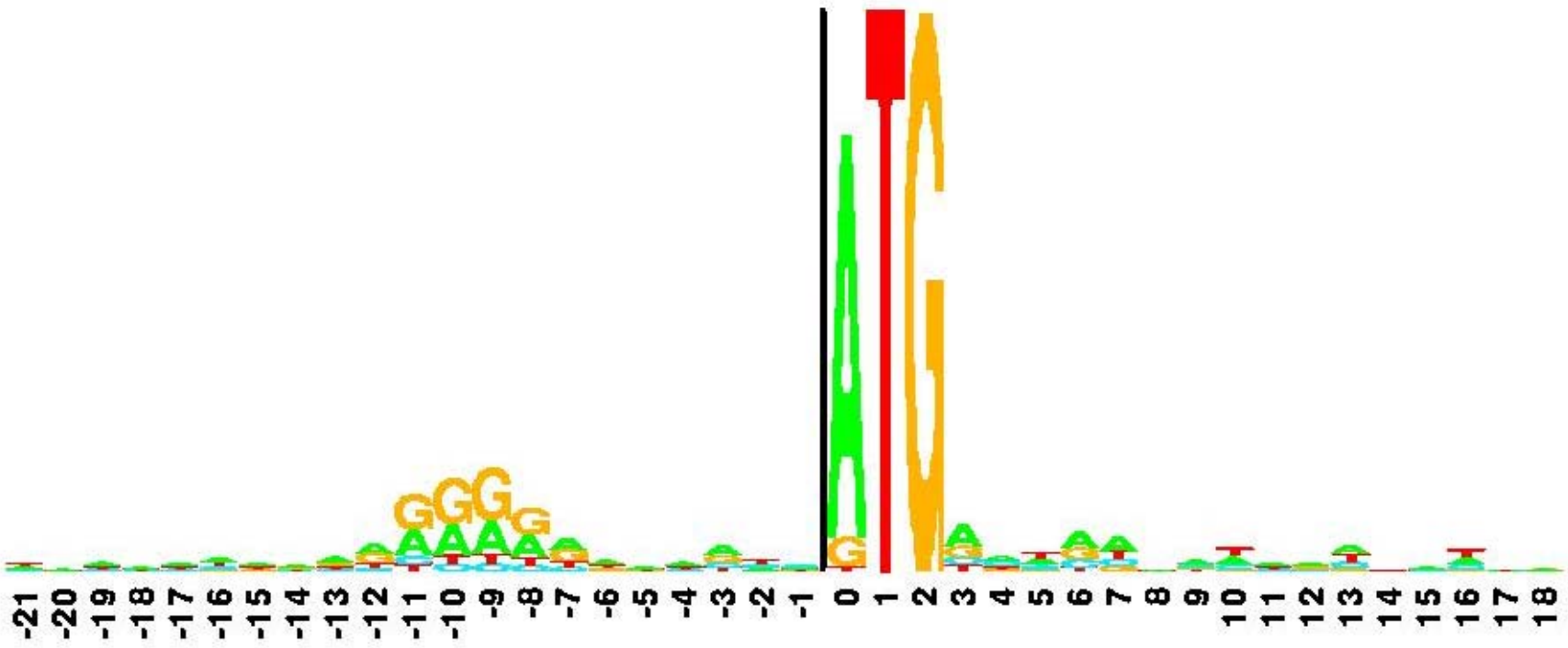
	1	2	3	4	5	6
A	0	6	0	3	4	0
C	0	0	1	0	1	0
G	1	0	0	3	0	0
T	5	0	5	0	1	6

- Skóre každého předpokládaného místa je vyjádřeno součtem hodnot z matice (převedeno na pravděpodobnosti)
- Nevýhody:
  - Je vyžadována hraniční hodnota
  - Předpokládá nezávislost sousedících bází

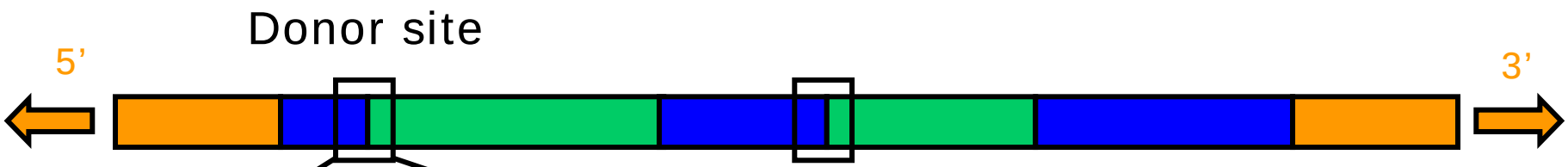
Příklad signálu

RBS (vazebné místo pro ribozóm)

Vazebné místo pro ribozóm (RBS) a iniciační kodon ATG u *E. coli*

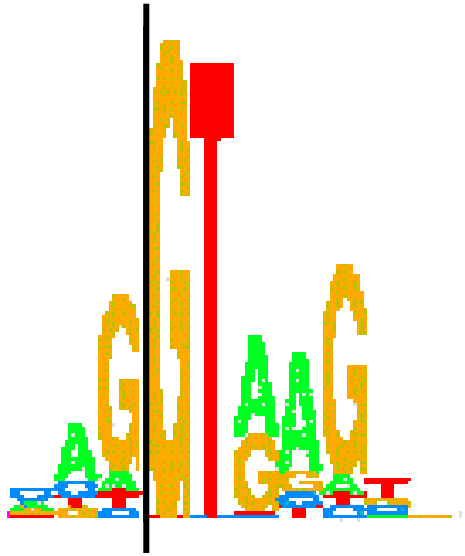


Pozičně vážená matice pro odvození donorového místa sestřihu

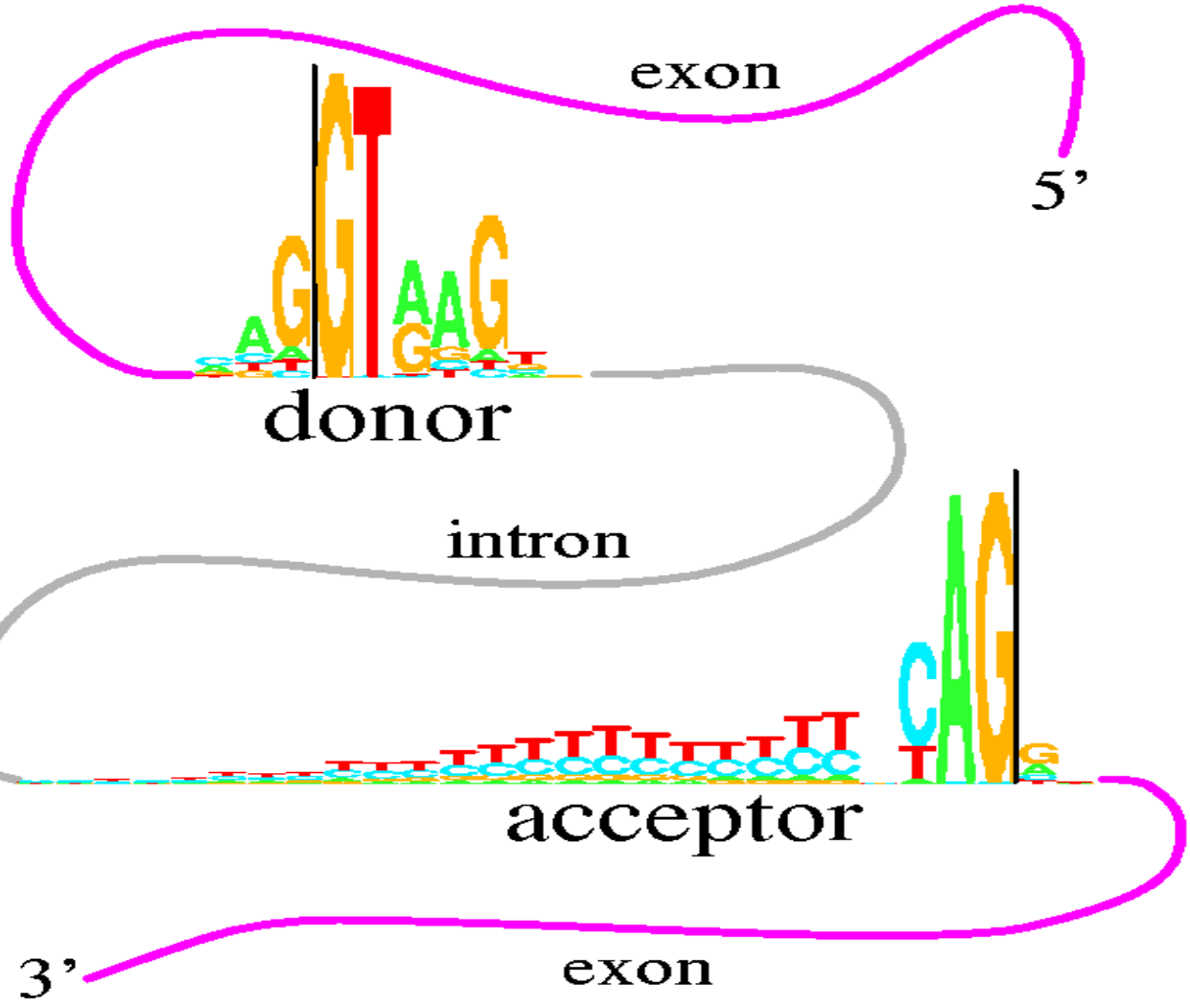


Position

%	-8	…	-2	-1	0	1	2	…	17
A	26	…	60	9	0	1	54	…	21
C	26	…	15	5	0	1	2	…	27
G	25	…	12	78	99	0	41	…	27
T	23	…	13	8	1	98	3	…	25



Příklad signálů: místa sestřihu (myš)



Statistická analýza sekvence predikovaného genu

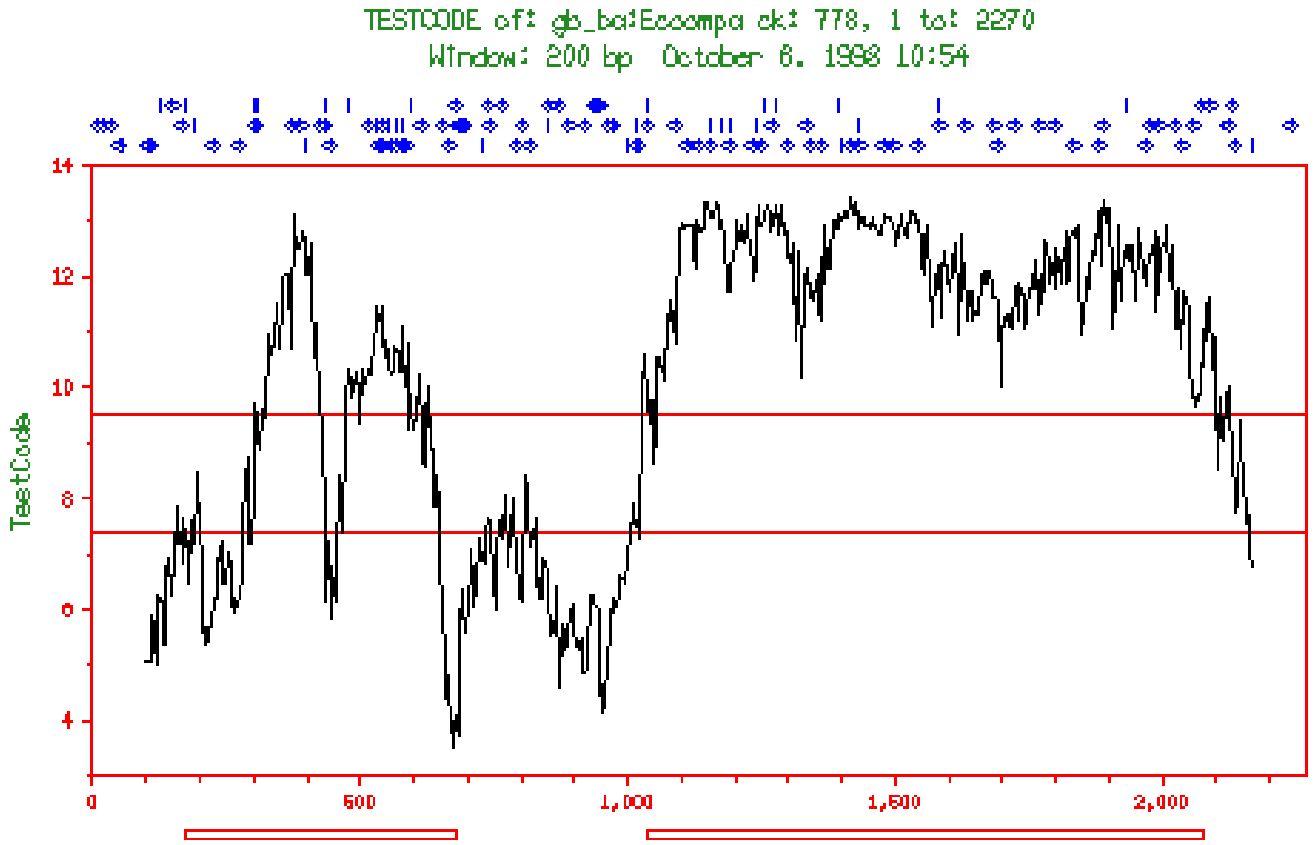
- Důležité je posouzení charakteru sekvence
  - délka
  - obsah GC
  - statistické modely modely frekvencí nukleotidů
  - frekvence využití kodonů

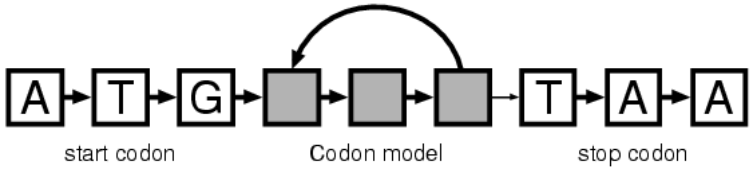
Testování ORF – využití kodonů

The Human Codon Usage Table

Gly	GGG	17.08	0.23	Arg	AGG	12.09	0.22	Trp	TGG	14.74	1.00	Arg	CGG	10.40	0.19
Gly	GGA	19.31	0.26	Arg	AGA	11.73	0.21	End	TGA	2.64	0.61	Arg	CGA	5.63	0.10
Gly	GGT	13.66	0.18	Ser	AGT	10.18	0.14	Cys	TGT	9.99	0.42	Arg	CGT	5.16	0.09
Gly	GGC	24.94	0.33	Ser	AGC	18.54	0.25	Cys	TGC	13.86	0.58	Arg	CGC	10.82	0.19
Glu	GAG	38.82	0.59	Lys	AAG	33.79	0.60	End	TAG	0.73	0.17	Gln	CAG	32.95	0.73
Glu	GAA	27.51	0.41	Lys	AAA	22.32	0.40	End	TAA	0.95	0.22	Gln	CAA	11.94	0.27
Asp	GAT	21.45	0.44	Asn	AAT	16.43	0.44	Tyr	TAT	11.80	0.42	His	CAT	9.56	0.41
Asp	GAC	27.06	0.56	Asn	AAC	21.30	0.56	Tyr	TAC	16.48	0.58	His	CAC	14.00	0.59
Val	GTG	28.60	0.48	Met	ATG	21.86	1.00	Leu	TTG	11.43	0.12	Leu	CTG	39.93	0.43
Val	GTA	6.09	0.10	Ile	ATA	6.05	0.14	Leu	TTA	5.55	0.06	Leu	CTA	6.42	0.07
Val	GTT	10.30	0.17	Ile	ATT	15.03	0.35	Phe	TTT	15.36	0.43	Leu	CTT	11.24	0.12
Val	GTC	15.01	0.25	Ile	ATC	22.47	0.52	Phe	TTC	20.72	0.57	Leu	CTC	19.14	0.20
Ala	GCG	7.27	0.10	Thr	ACG	6.80	0.12	Ser	TCG	4.38	0.06	Pro	CCG	7.02	0.11
Ala	GCA	15.50	0.22	Thr	ACA	15.04	0.27	Ser	TCA	10.96	0.15	Pro	CCA	17.11	0.27
Ala	GCT	20.23	0.28	Thr	ACT	13.24	0.23	Ser	TCT	13.51	0.18	Pro	CCT	18.03	0.29
Ala	GCC	28.43	0.40	Thr	ACC	21.52	0.38	Ser	TCC	17.37	0.23	Pro	CCC	20.51	0.33

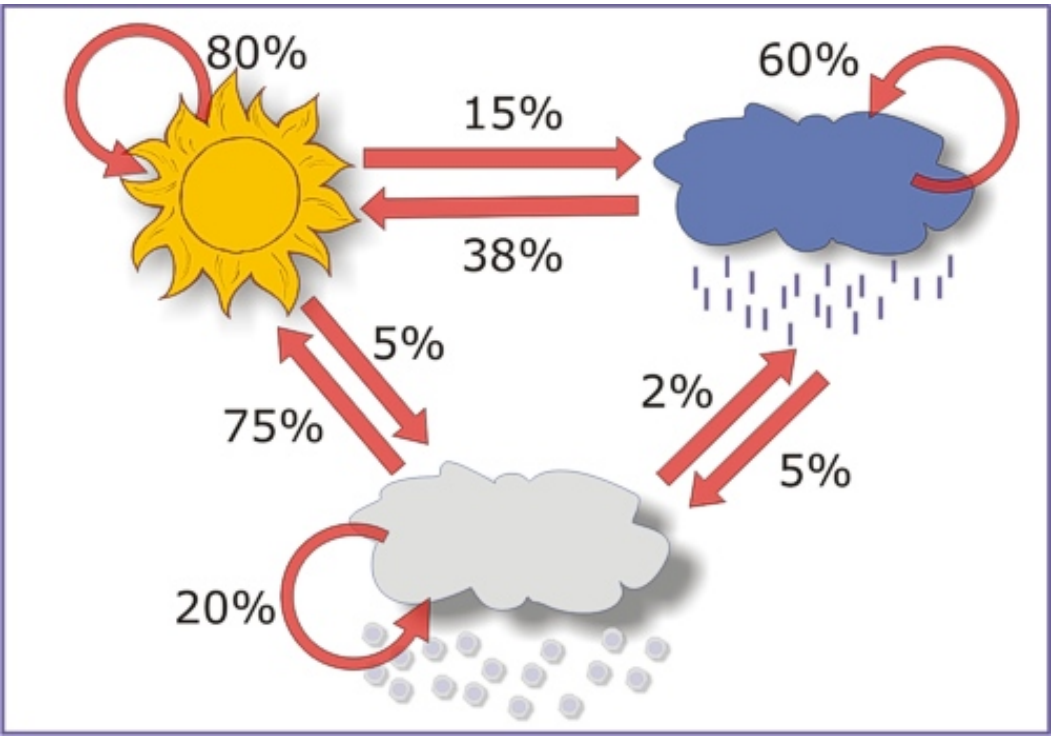
Testování ORF – frekvence nukleotidů

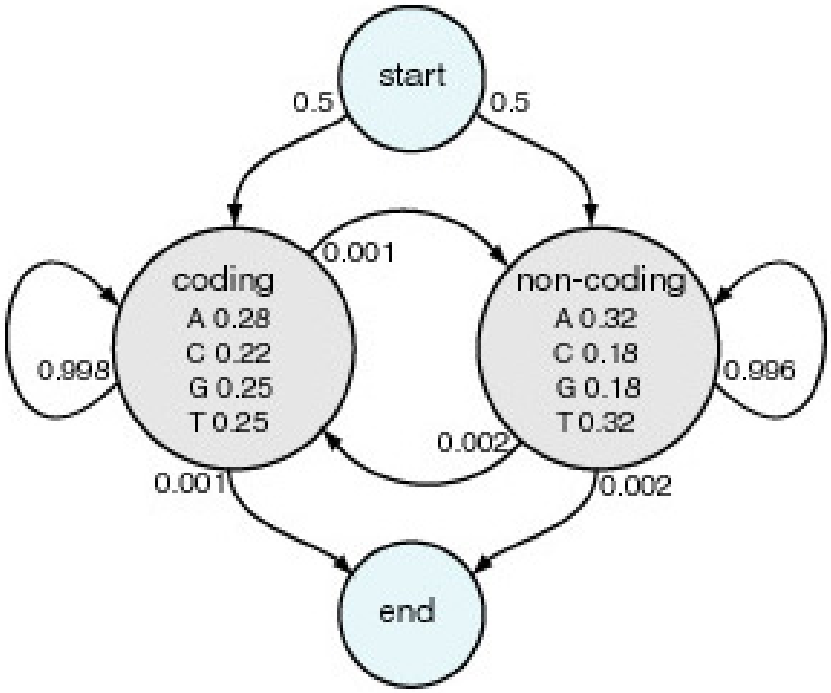




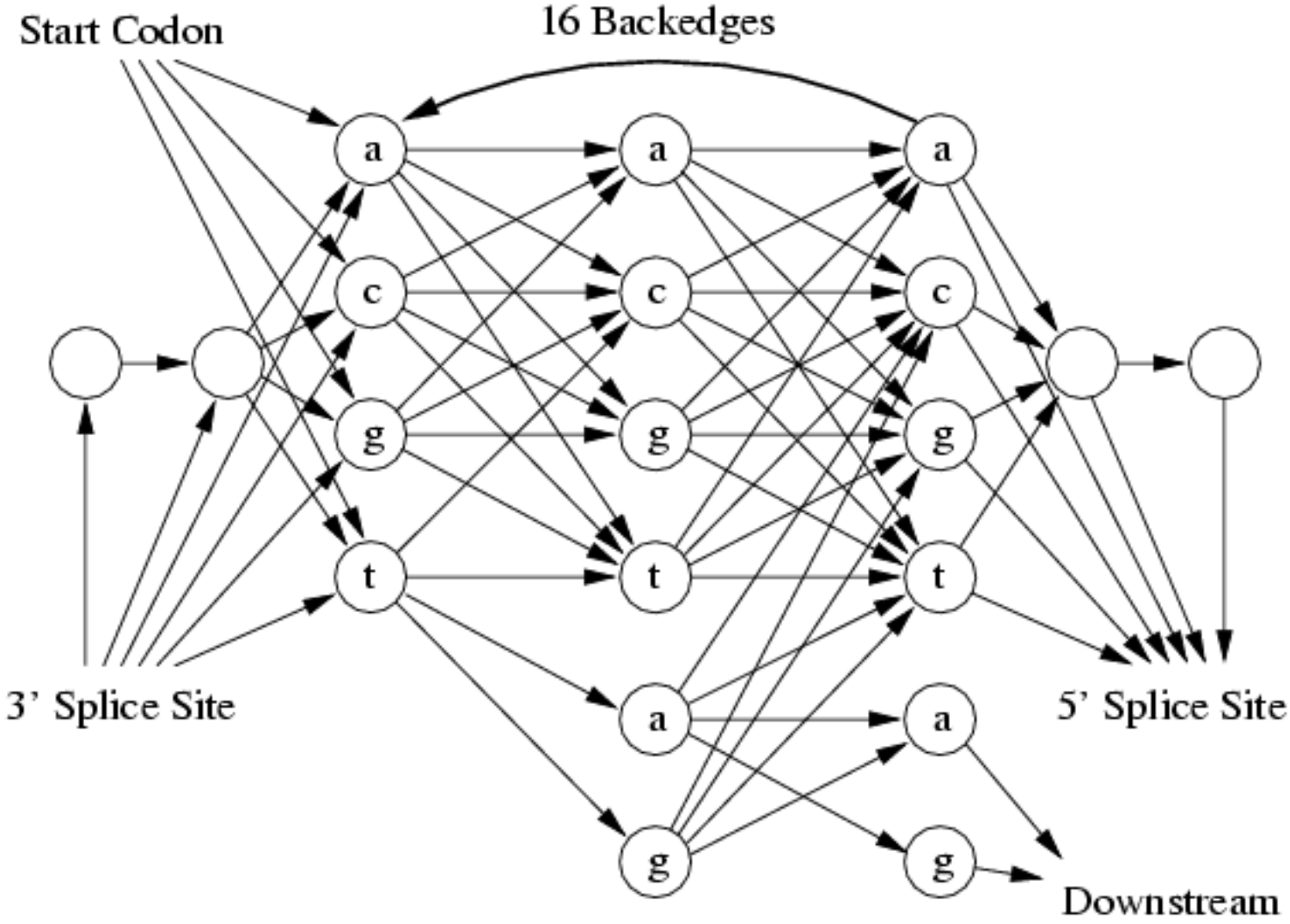
Markovovy modely

- Vyjadřují pravděpodobnost sekvenčních událostí
- Nejčastěji používané statistické modely pro hledání genů

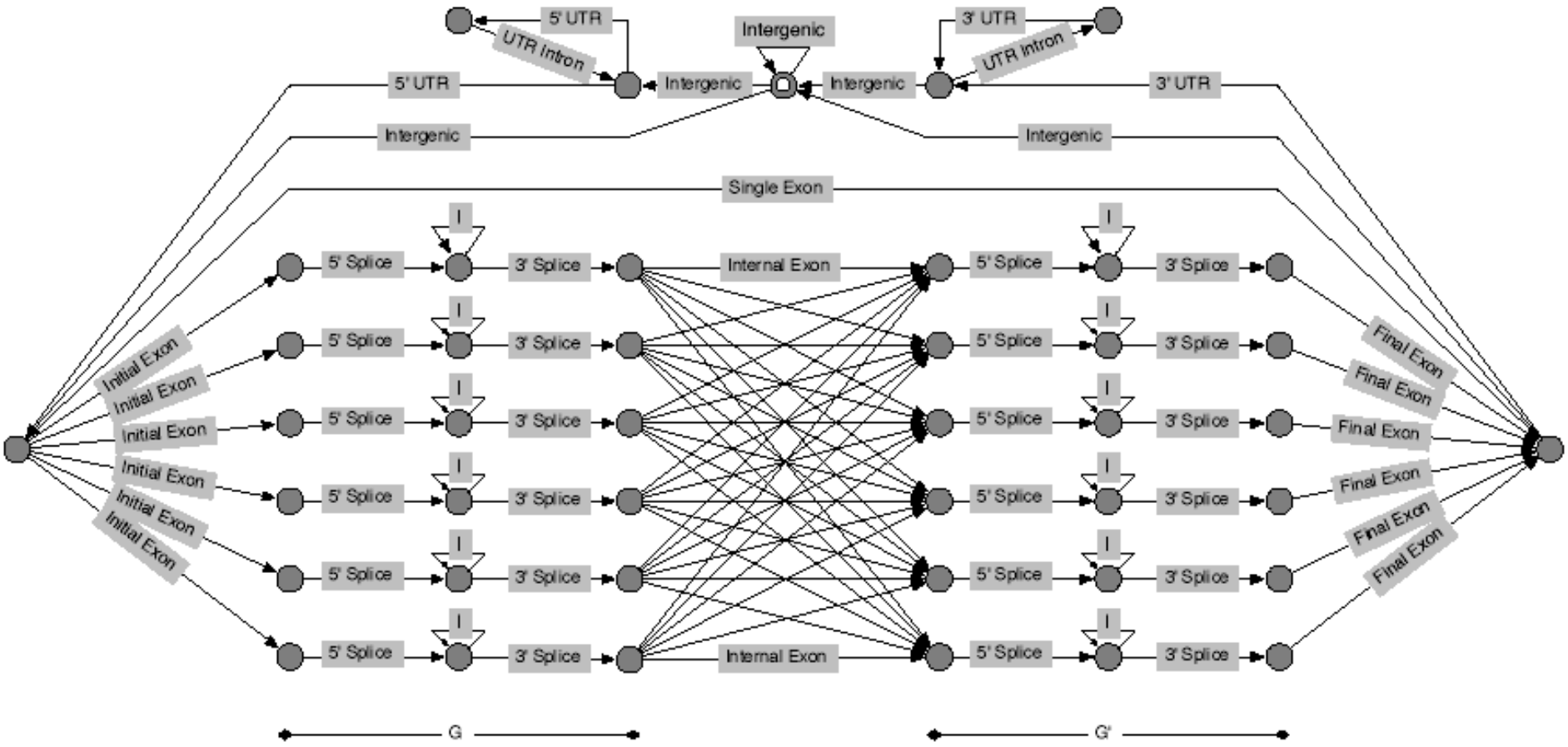




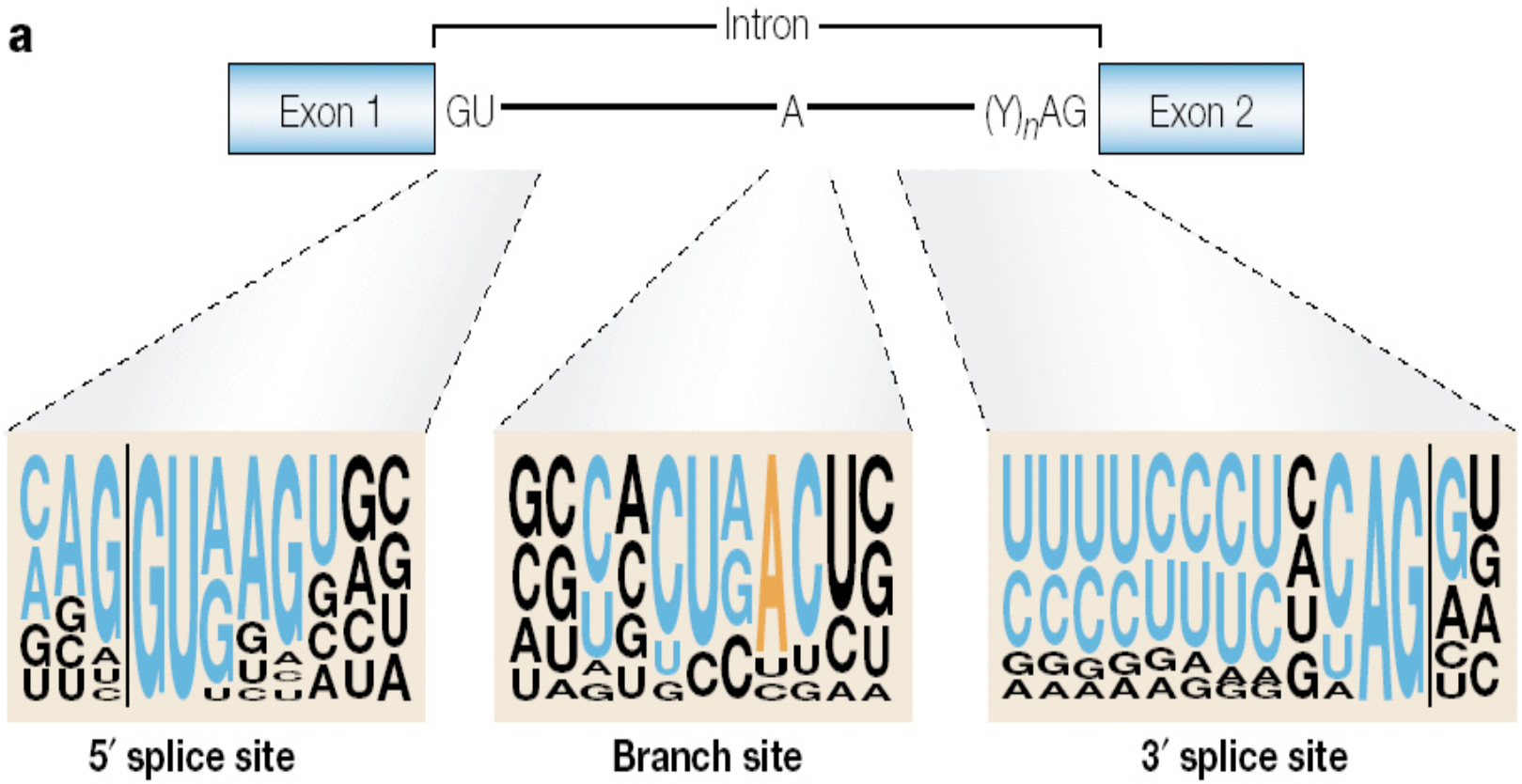
Příklad komplexního algoritmu se skrytými Markovovy modely (HMM)



Příklad komplexního algoritmu se skrytými Markovovy modely (HMM)



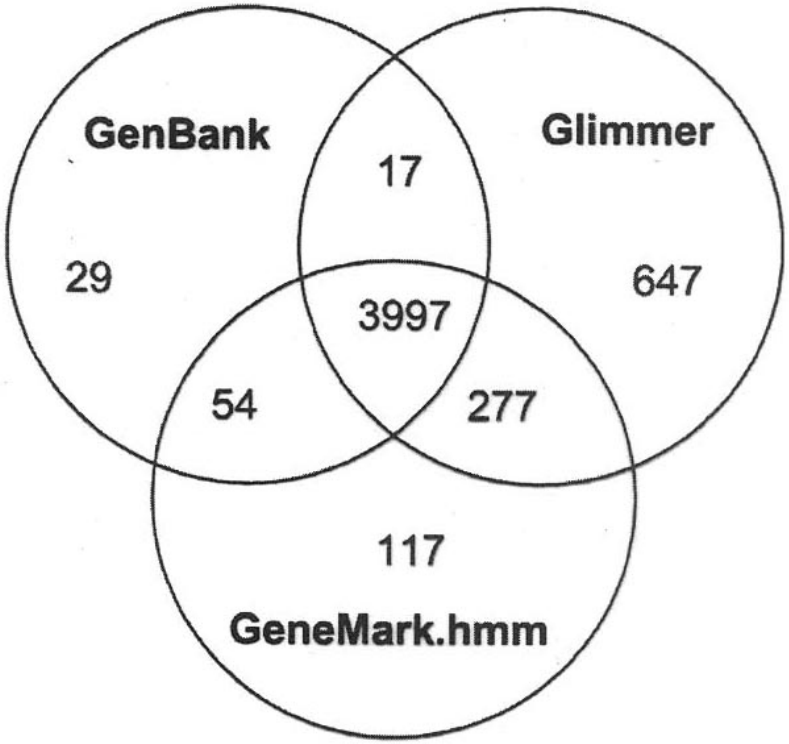
Predikce míst sestřihu



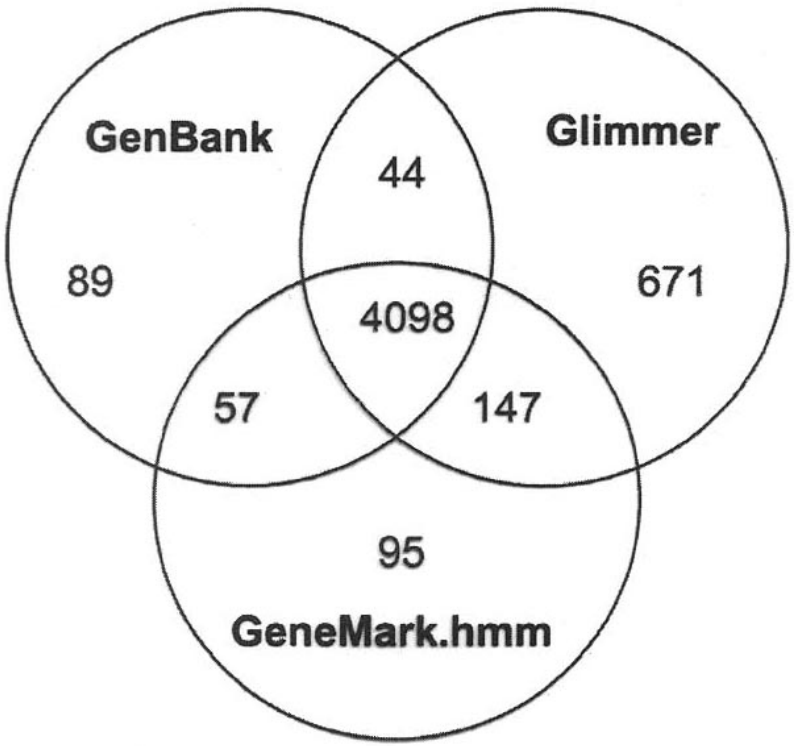
Populární programy pro predikci genů

- Programy využívající explicitní pravidla
  - GeneFinder
- Programy založené na „Hidden Markov Models“
  - GeneMark
  - Glimmer
  - GenScan
  - TwinScan
- Programy využívající neuronové sítě
  - Grail,
  - GrailEXP

Srovnání různých přístupů pro vyhledávání genů



B. subtilis



E. coli

GeneMark

http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/

GeneMark
A family of gene prediction programs developed by Mark Borodovsky's Bioinformatics Group at the Georgia Institute of Technology ,Atlanta, Georgia, USA.

What's New:
Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm:
GeneMark.hmm-ES

Supported by NIH

Gene Prediction in Bacteria, Archaea and Metagenomes

For bacterial and archaeal gene prediction you can use the parallel combination of GeneMark-P and GeneMark.hmm-P. For a novel genome you can use either the Heuristic models option (if the sequence is shorter than 200 kb) or the self-training program GeneMarkS (aka GeneMark.hmm-PS).

Gene Prediction in Eukaryotes

For eukaryotic gene prediction you can use the parallel combination of GeneMark-E and GeneMark.hmm-E. For a novel genome (the one whose name is not in the list of available models) you can run GeneMark.hmm-ES, the self-training program (just 10MB sequence is needed for training).

Gene Prediction in Viruses

For gene prediction in novel viruses and phages you can use GeneMark.hmm. Viral genome annotations are accessible via VIOLIN database.

Gene Prediction in EST and cDNA

To analyze ESTs and cDNAs you can use GeneMark-E.

Powered by IBM

Borodovsky Group

Gene Prediction Programs

- GeneMark
- GeneMark.hmm
- GeneMarkS
- Heuristic models
- Frame-by-Frame

Information

- Background
- References
- In GenBank
- FAQ
- Contact

Databases of predicted genes

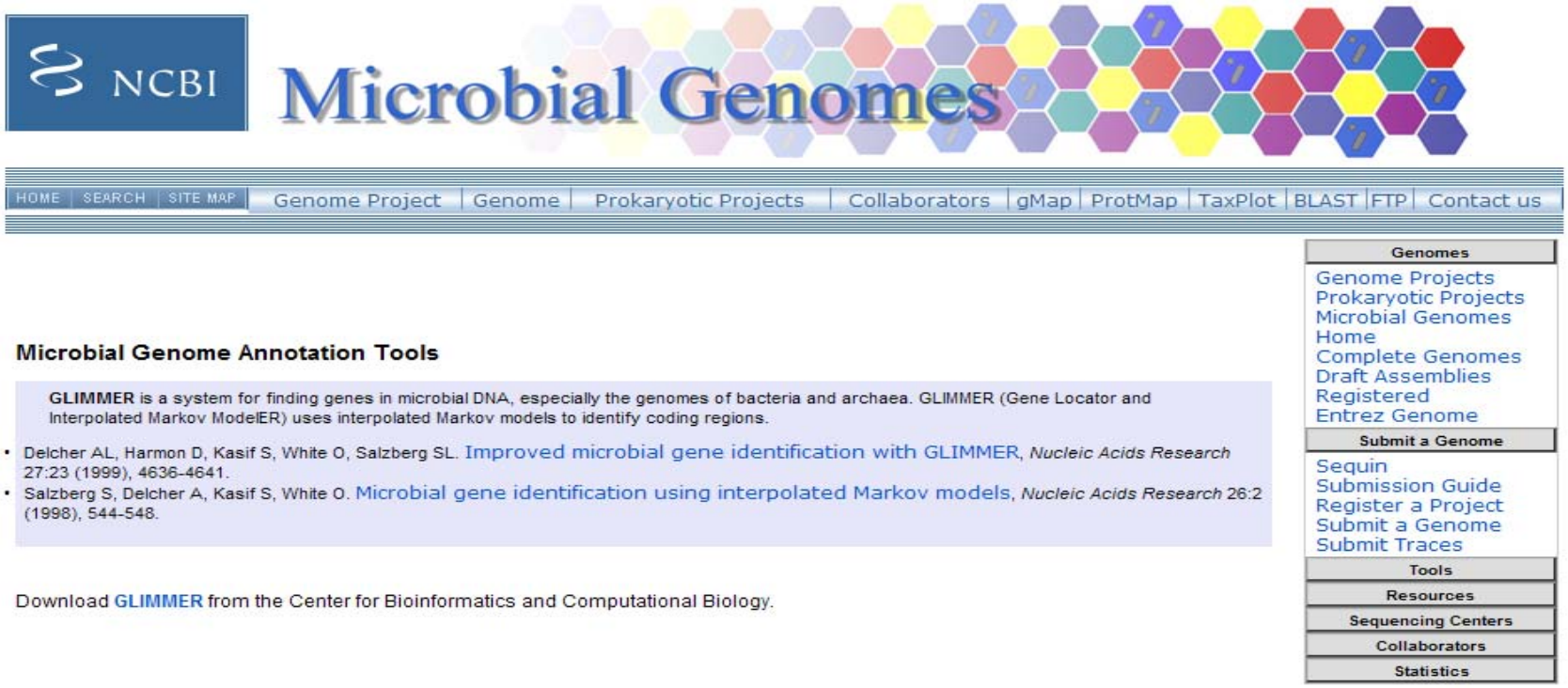
- Prokaryotes Closed, Updating
- Viruses/Phages (VIOLIN)

Models for Gene Prediction

- Download

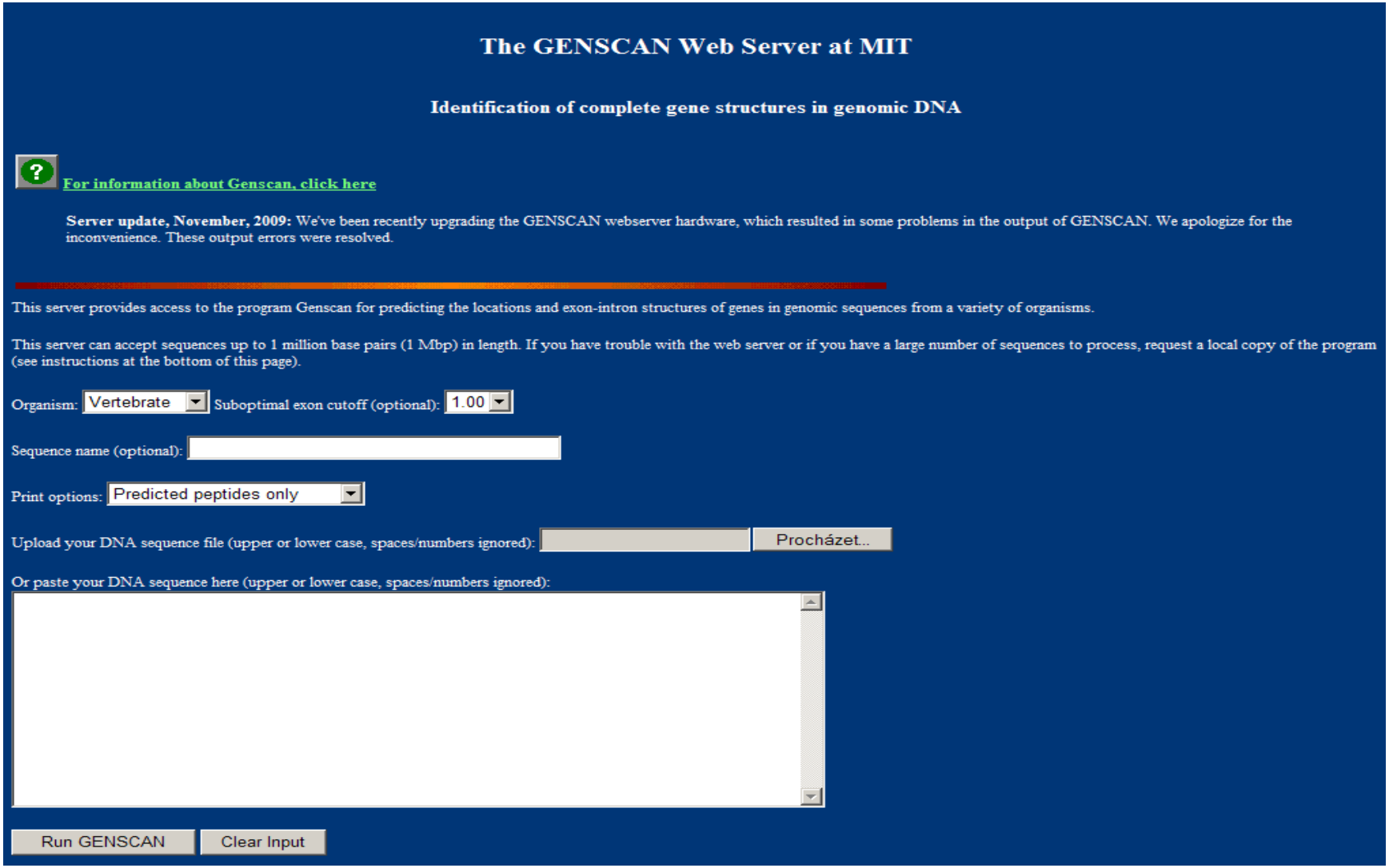
Glimmer

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi

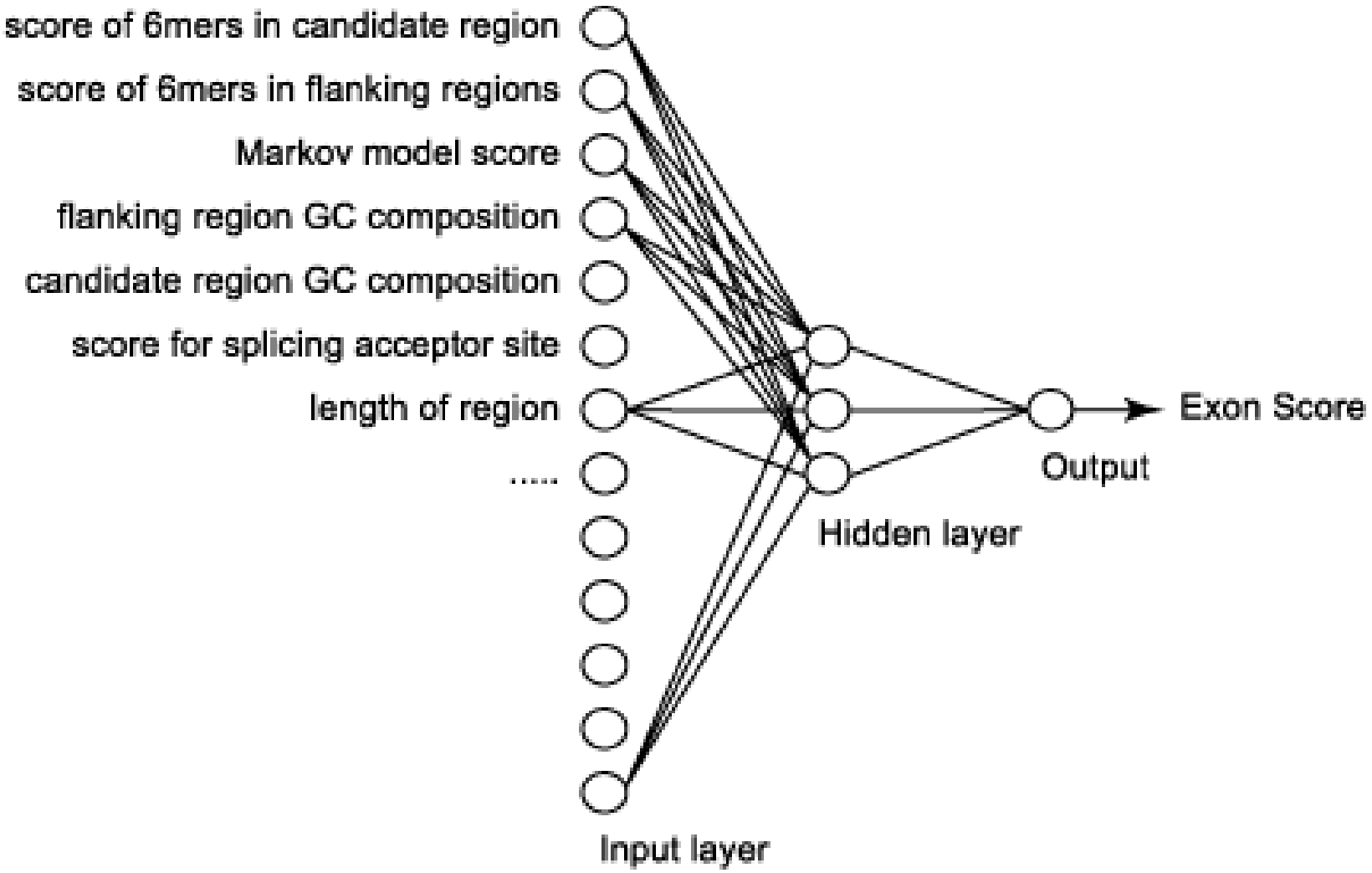


Genscan

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



Predikce eukaryotických genů: GRAIL II: využívá neuronové sítě



Užitečné nástroje

- Vyhledávače ORF
  - NCBI: http://www.ncbi.nih.gov/gorf/gorf.html
- Predikce promotoru
  - CSHL: http://rulai.cshl.org/software/index1.htm
  - BDGP: fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
  - ICG: TATA-Box predictor
- Predikce polyA signálu
  - CSHL: argon.cshl.org/tabaska/polyadq_form.html
- Predikce míst sestřihu
  - BDGP: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
- Identifikace start/stop kodonu
  - DNALC: Translator/ORF-Finder
  - BCM: Searchlauncher

Evaluace vyhledávačů genů

- Citlivost versus specificita

- Citlivost
  - Kolik genů bylo nalezeno?
- Specificita
  - Kolik predikovaných genů představuje skutečné geny?

Nomenklatura používaná při anotacích genomů

- **Known Gene** – Predikovaný gen shodující se v celé délce se známým experimentálně dokázaným genem.
- **Putative Gene** – Predikovaný gen obsahující region homologický s konzervovaným regionem známého genu. *Also referred to as "like" or "similar to".*
- **Unknown Gene** – Predikovaný gen vykazující shodu s genem nebo EST, jejichž funkci neznáme.
- **Hypothetical Gene** – Predikovaný gen nevykazující významnou podobnost k žádnému známému genu nebo EST.