MUNI
SCI

MASARYK UNIVERSITY
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL BIOLOGY
LABORATORY OF MICROBIAL MOLECULAR DIAGNOSTICS

Bi5000 – Bioinformatika

Vyhledávání genů a funkčních oblastí na DNA

Přínos genomových sekvencí záleží na kvalitě anotace

- Anotace – Charakterizace vlastností genomů
  - s použitím výpočetních a experimentálních metod
- Hledání genů:
  - Predikce – Kde jsou geny lokalizovány?
  - Podobnost – Jak geny vypadají?
  - Funkce – Jakou funkci mají kódované proteiny?
  - Jakých procesů se účastní – V jakých metabolických drahách?
  - Regulace – Oblasti důležité pro expresi genů
  - Evidence – Experimentální důkaz genu / omiky (omics)
    - Transkriptom
    - Proteom

Hledání genů

- Geny tvoří **obsahovou složku** genomu
  - Jedinečné sekvence odpovědné za funkční produkt
    - Variabilní délka
    - Strukturní geny
      - jednoduché
      - složené z exonů a intronů
  - Geny pro funkční RNA
    - rRNA (ribosomal RNA)
    - tRNA, tmRNA (transfer RNA)
    - snRNA (small nuclear)
    - snoRNA (small nucleolar)
    - RNAi (interfering RNA) a jiné regulační RNA
    - CRISPR lokusy
  - Regulační sekvence (ori, promotory, terminátory)

Co nás zajímá při hledání genu

U necharakterizované sekvence DNA zjišťujeme:

- Která oblast kóduje protein
- Který DNA řetězec je kódující
- Který čtecí rámec je využíván
- Jaké jsou koordináty genu
- Kde jsou hranice exonů a intronů
- Kde se nacházejí regulační sekvence
- Jaká je modulární struktura genomů

Sekvenování RNA pak umožňuje popsat expresi genů a její regulaci

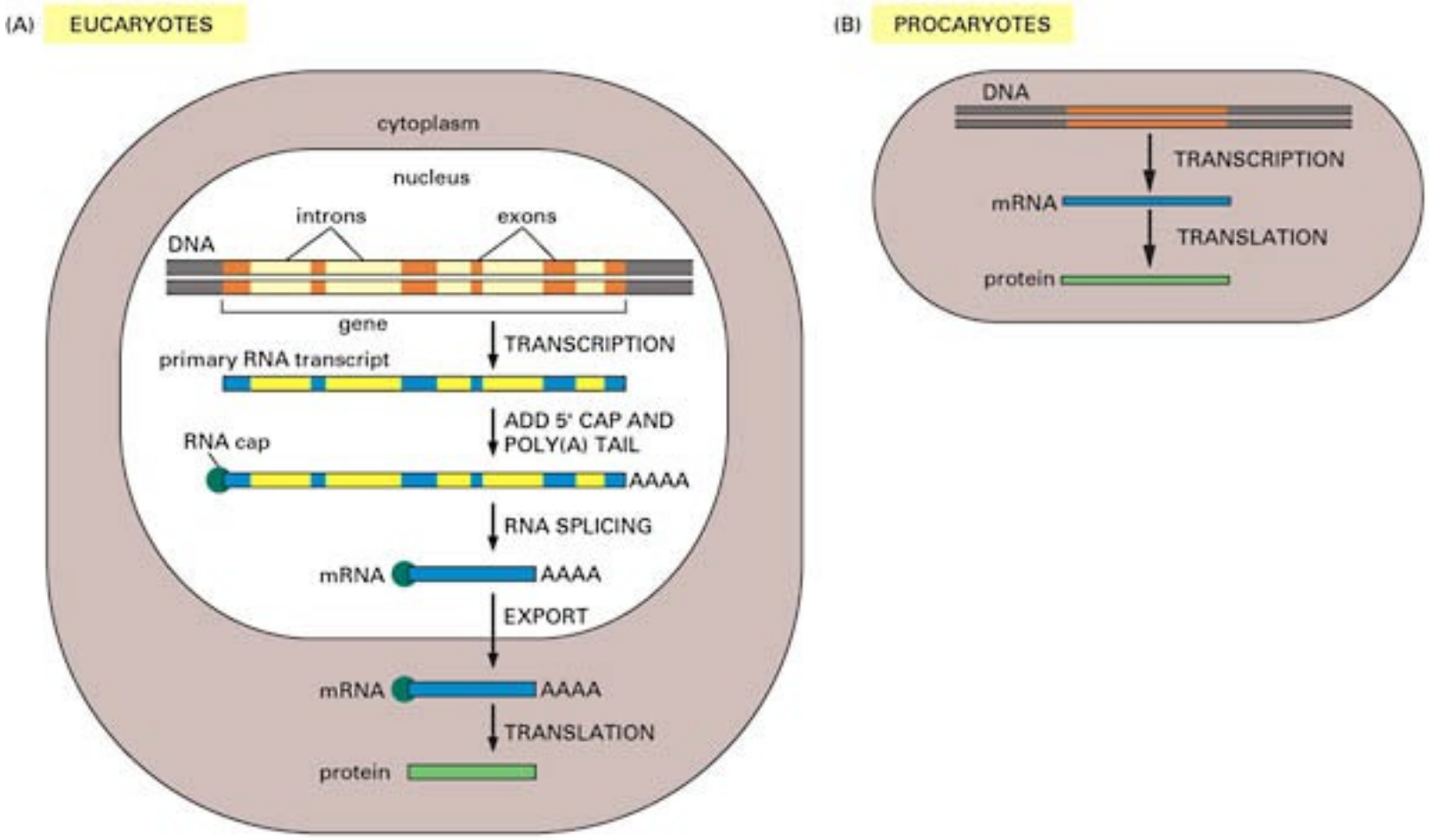
Přístupy pro hledání genů

1. Metody založené na hledání podobností s již popsanými geny
2. Metody srovnávací genomiky
   - Srovnání více dokončených genomů
   - Hledání konzervativních oblastí, které jsou využity pro predikci genů
3. Využití algoritmů a statistických metod pro analýzu sekvence
4. Integrované přístupy, automatické anotace

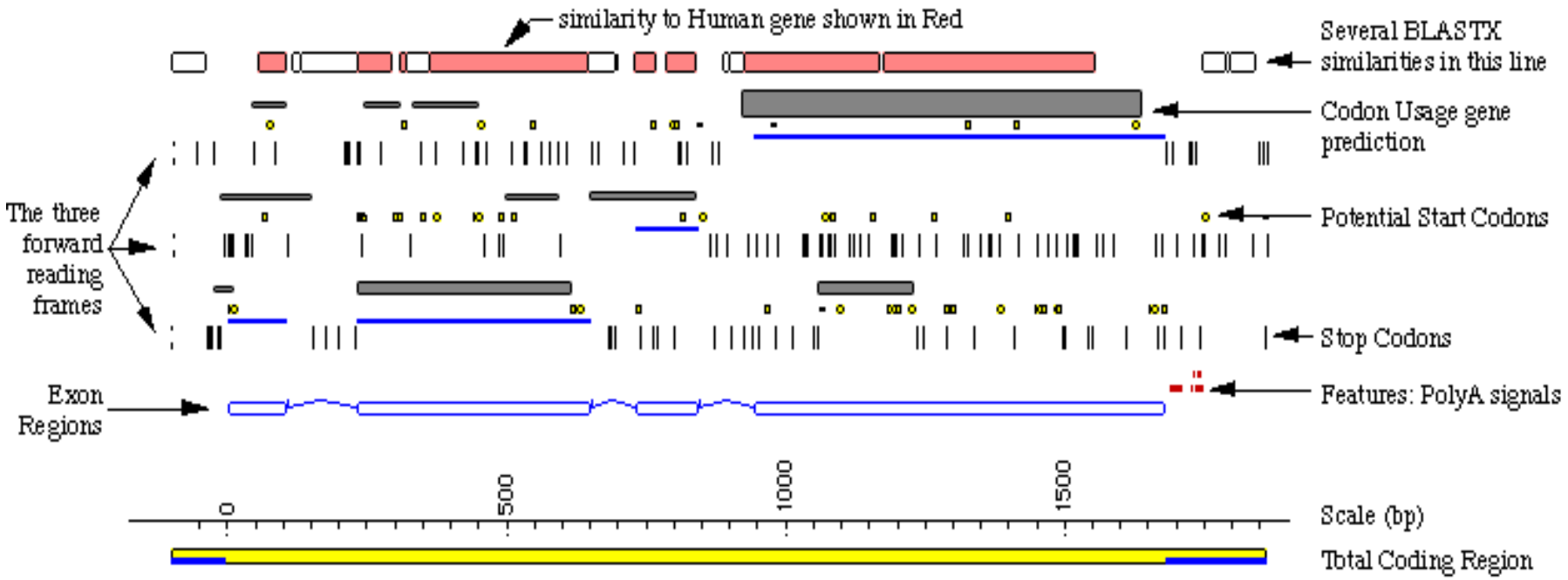
Příklady velikostí genomů

Druh	Velikost	Genů	Genů na Mb
H. sapiens	3 200 Mb	28 000	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

Prokaryotický versus eukaryotický gen



Integrovaný přístup při expertní anotaci genomů



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%)
  - Konzervovanost 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

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.)
- Specializované databáze: proteiny, EST (cDNA), GSS
- Nemohou identifikovat geny, které nejsou v databázi (~50% genů)

- Omezení u sekvencí s nízkou podobností

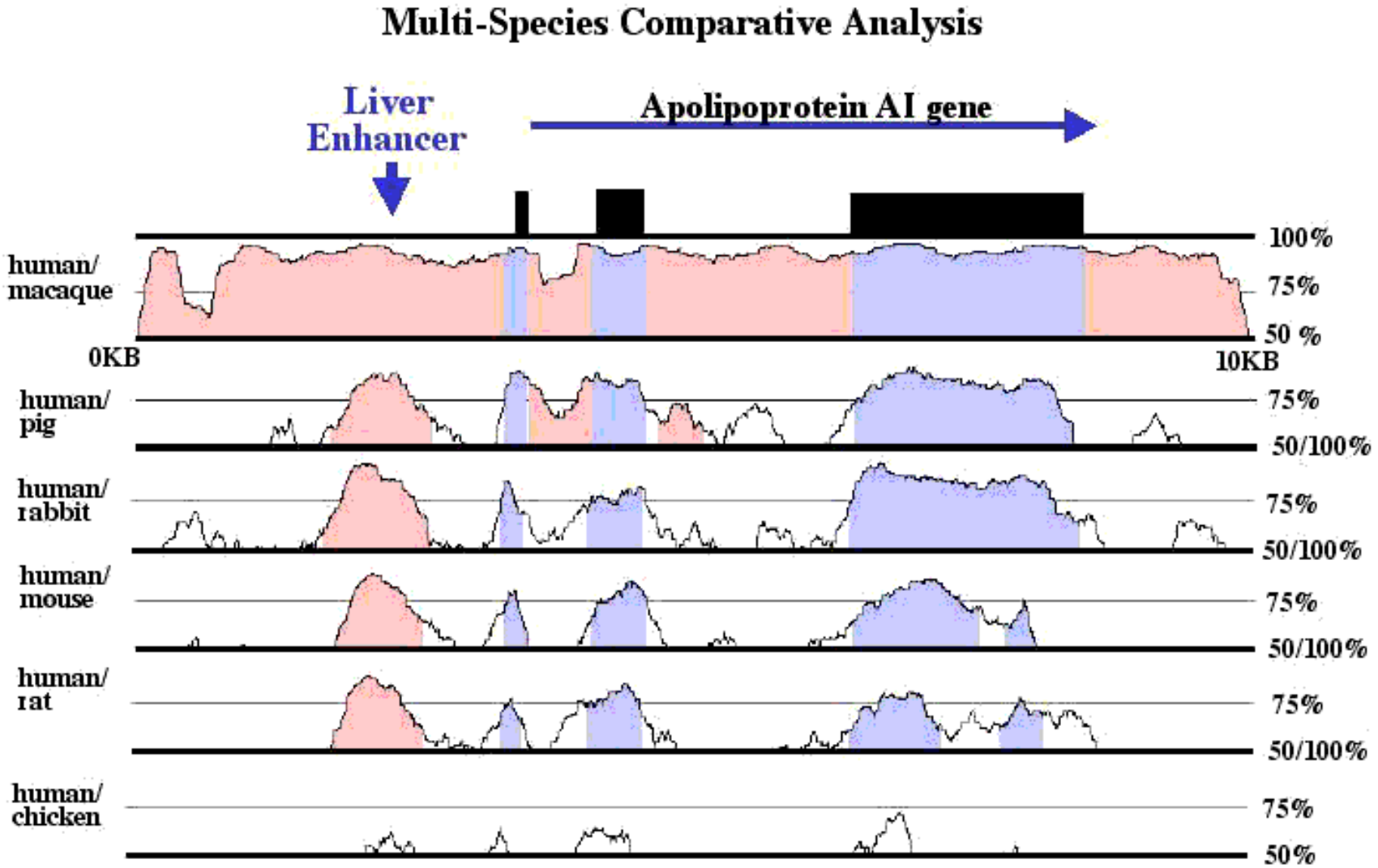
Odhalení genů eukaryot s použitím sekvencí cDNA

- Expressed Sequence Tags (EST) databáze 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.
- Genome Survey Sequences (GSS) je divize GenBank podobná EST s rozdílem, že sekvence jsou genomového původu

2. Srovnávací genomika – hledání na základě konzervovanosti

- Hledání založené na předpokladu, že významné sekvence jsou více konzervativní než sekvence bez funkce
- Dva přístupy:
  - intra-genomický (genové rodiny)
  - inter-genomický (mezi druhy)
- Mnohonásobné přiložení homologických oblastí
  - exony
  - regulační oblasti

Konzervativní charakter regulačních oblastí a exonů



Co je srovnáváno?

- **Lokalizace genů v genomu**

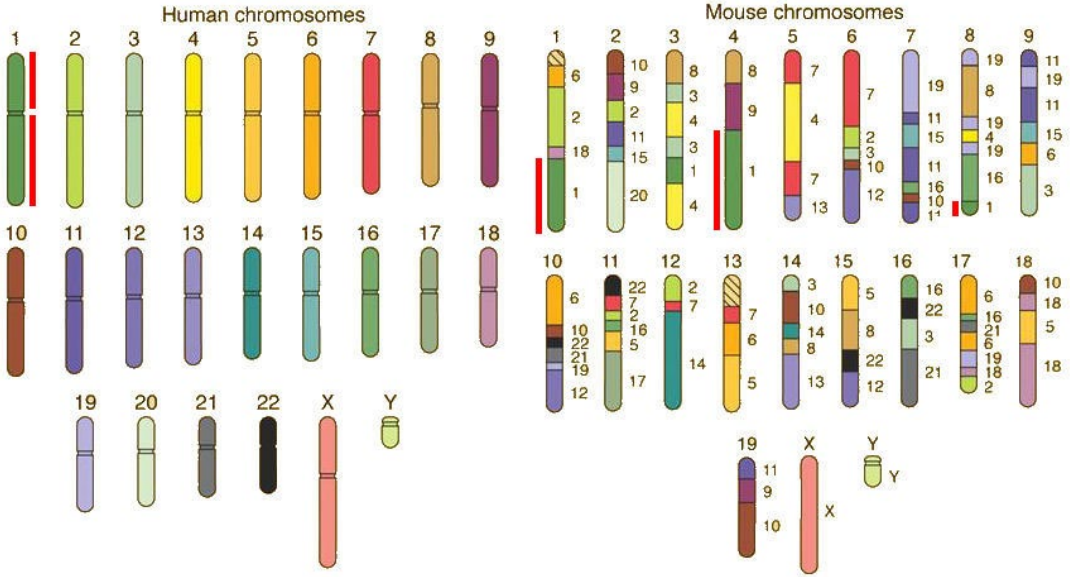
- **Struktura genů**
  - Počet exonů
  - Délky exonů
  - Délky intronů
  - Podobnost sekvencí

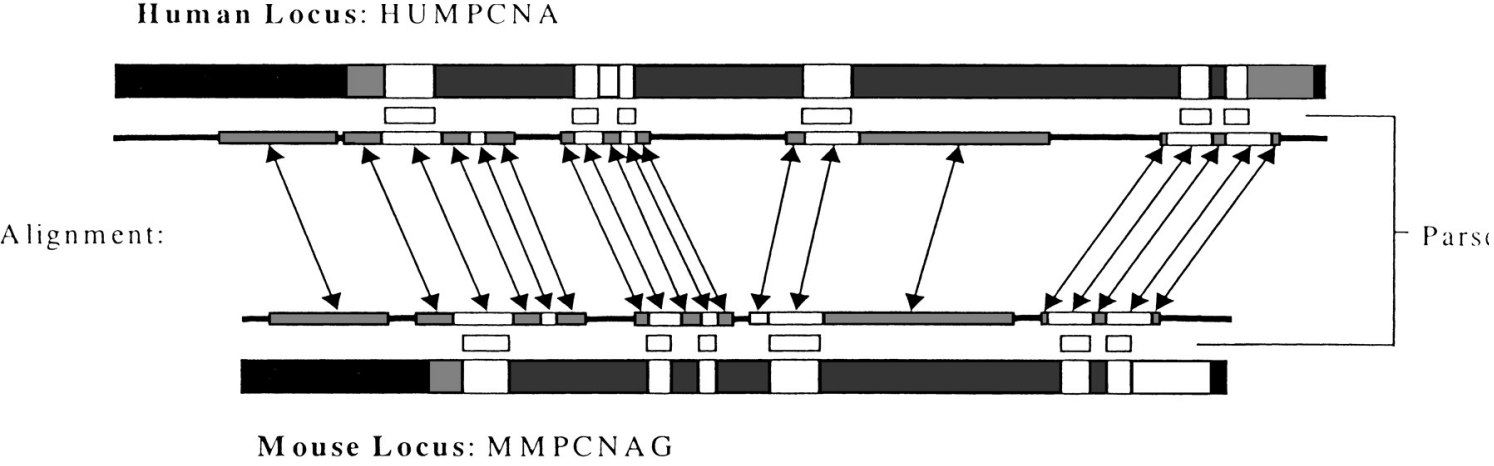
- **Vlastnosti genů**
  - Místa sestřihu
  - Využití kodonů
  - Konzervované sekvence

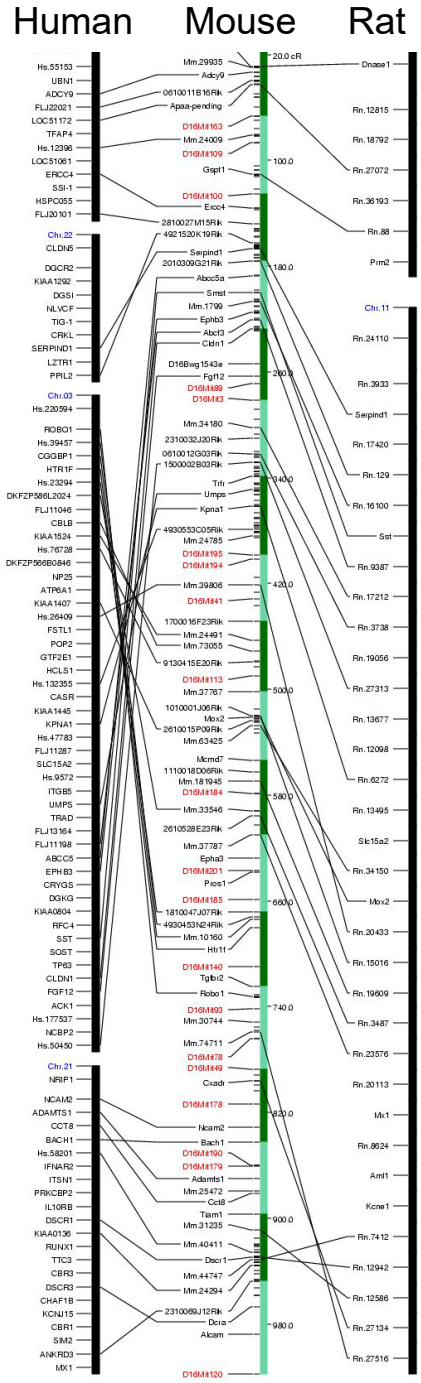
lidský vs. myší genom- srovnání chromozómů

99% genů má ortology u lidí, divergence 75 milionů let

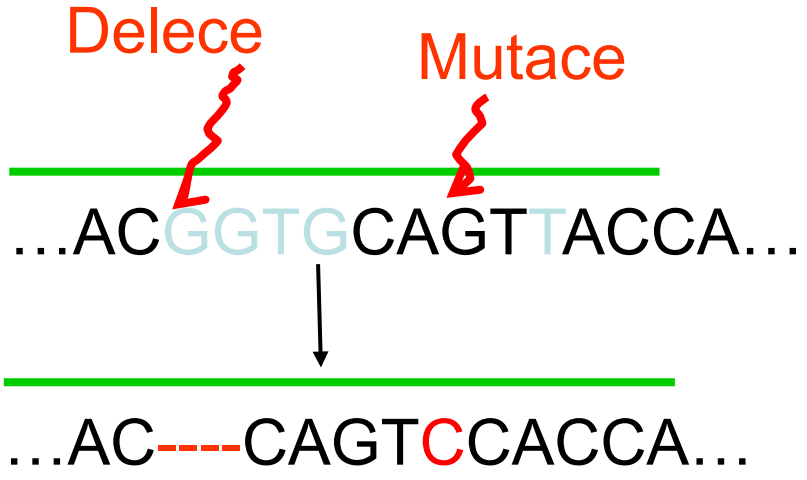
Genomy během evoluce procházejí podstatnými změnami.
Charakterizace rozdílů umožňuje odhalit mechanismy změn.





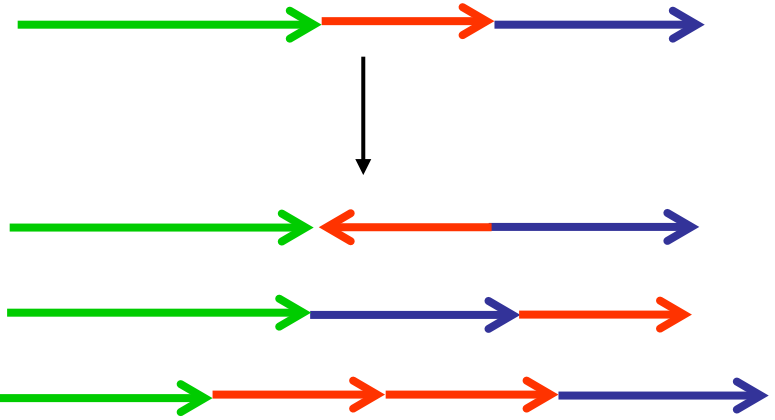


Evoluce na úrovni DNA - Problém globálního přiložení



Výsledná sekvence

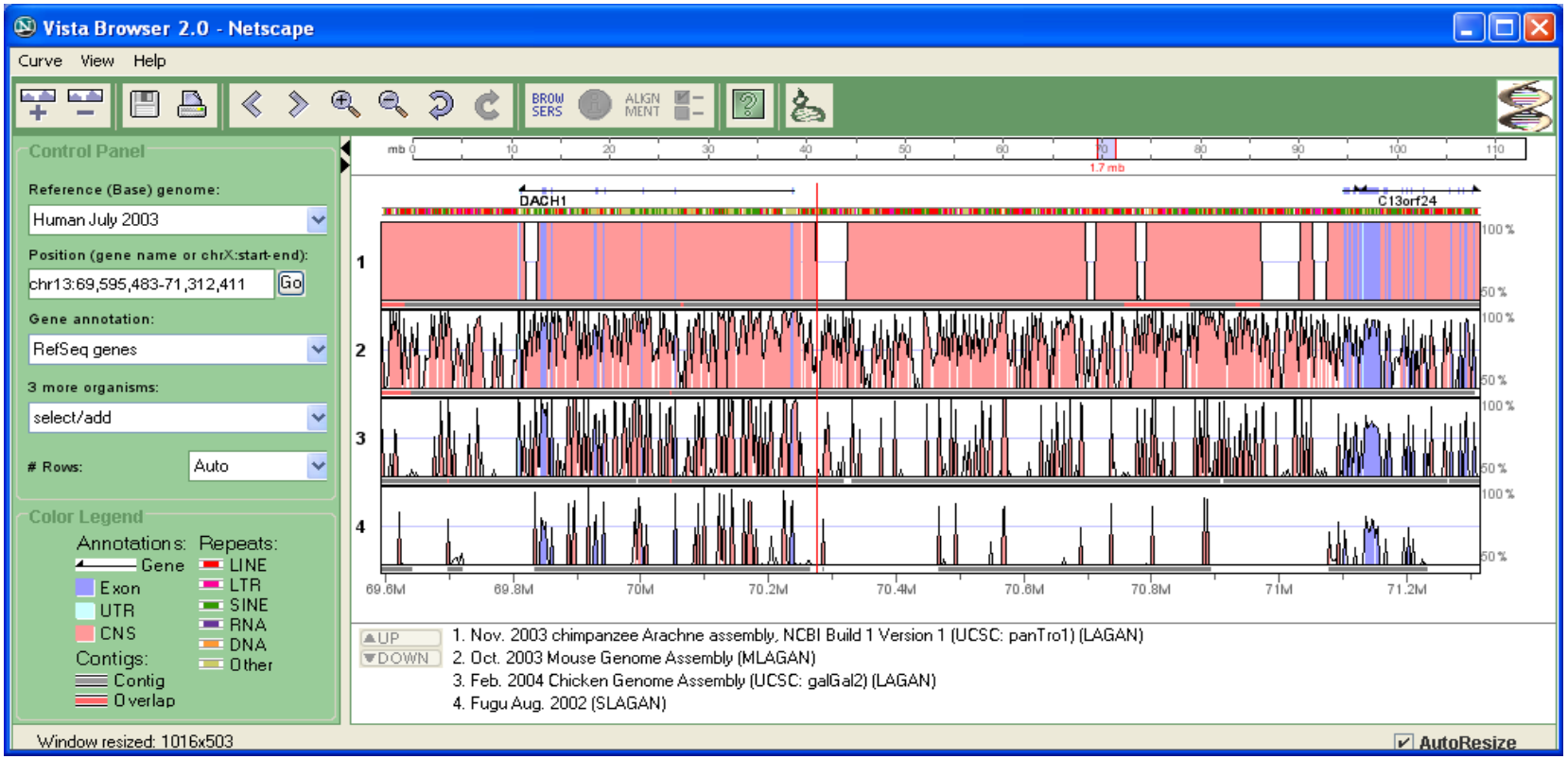
PŘESKUPENÍ



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

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
- Obtížné stanovení limitů podobnosti a optimální evoluční vzdálenosti



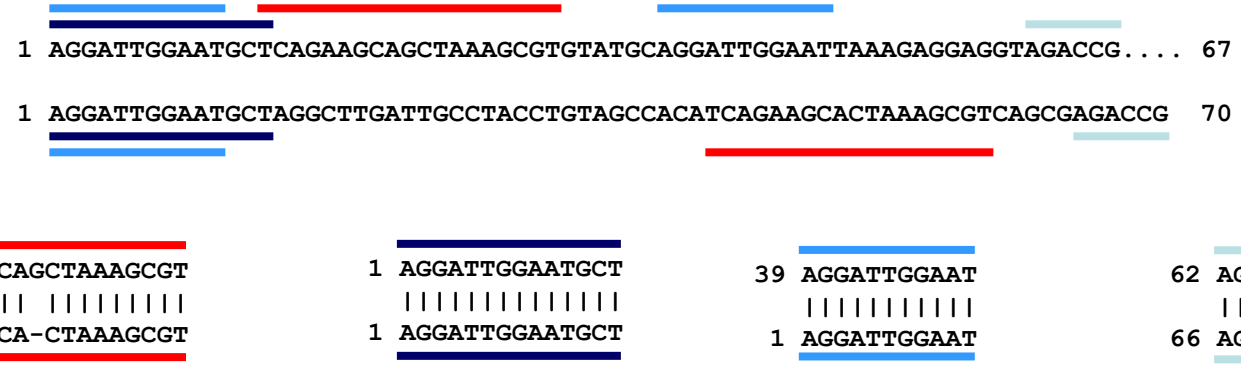
- šimpanz
- myš
- kuře
- Fugu

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

Základní zdroje a přístupy

- Databáze
  - NCBI: Genomy, Geny, Proteiny, SNPs, ESTs, GSSs, Taxonomie, atd.
  - databáze genomových center
- Analytický software
  - Databázové dotazy (nalezení podobných sekvencí), algoritmy pro přiložení, shluková analýza, predikce genů, identifikace motivů v DNA
- 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

Lokální přiložení



Globální přiložení

Dvě sekvence sdílejí oblasti s lokální podobností (end-to-end alignment)

Algoritmy pro globální přiložení

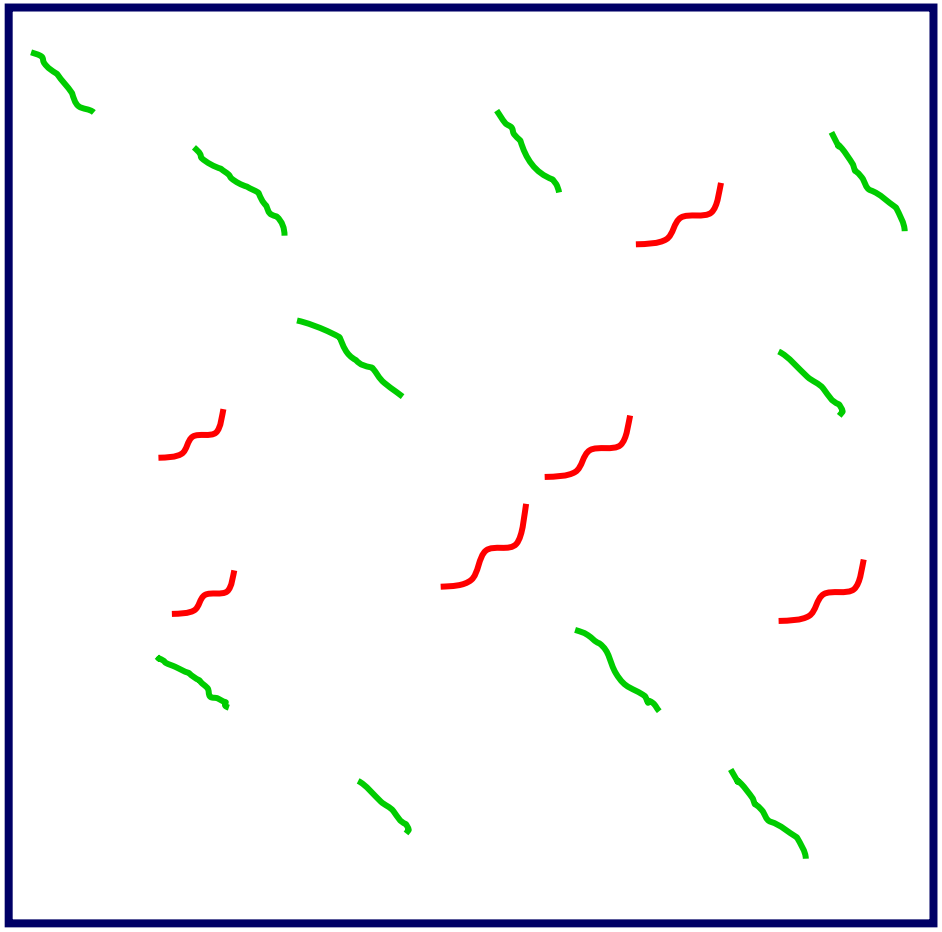
- **AVID**
  - Umožňuje srovnání pouze homologních sekvencí bez duplikací, inverzí nebo translokací
  - vyžaduje předem přípravu a identifikaci vzájemně si odpovídajících regionů
- **LAGAN (Limited Area Global Alignment)**
  - Umožňuje srovnat mnohem delší sekvence než AVID
  - Používá se společně s lokálním přiložením dlouhých sekvencí (BLAT)
- **Multi-LAGAN**
  - mnohonásobná globální přiložení
  - 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

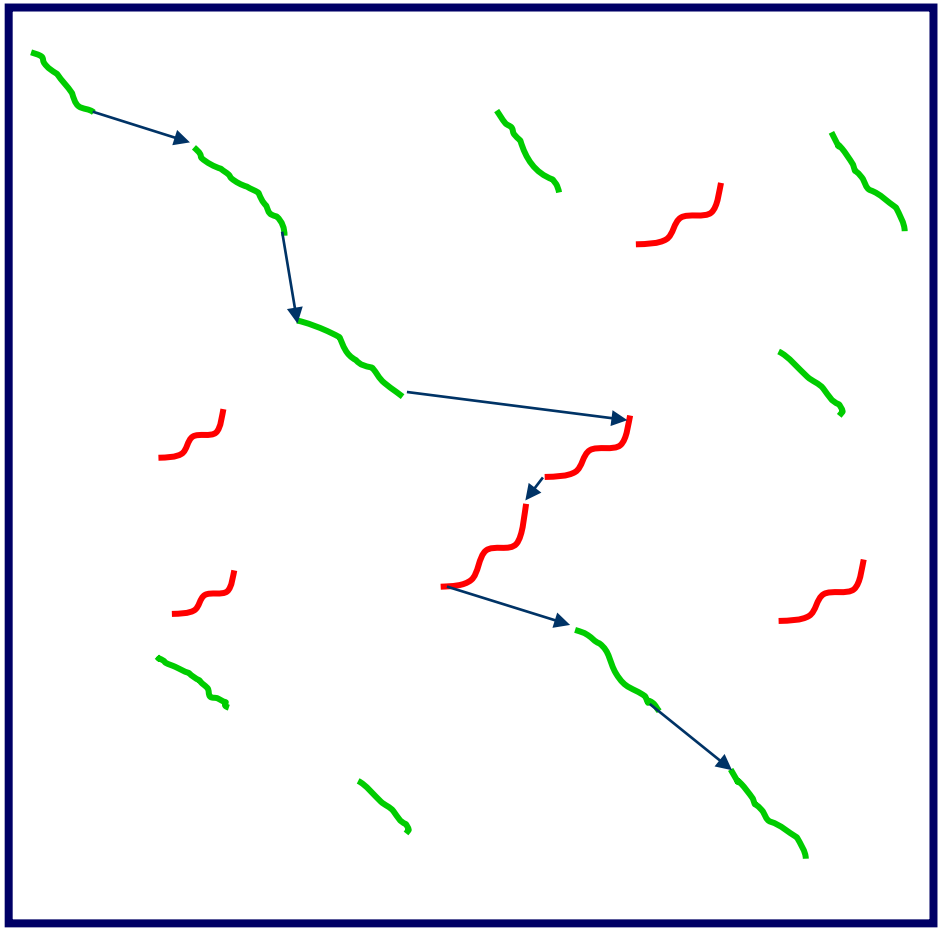
Shuffle-LAGAN (S-LAGAN)

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



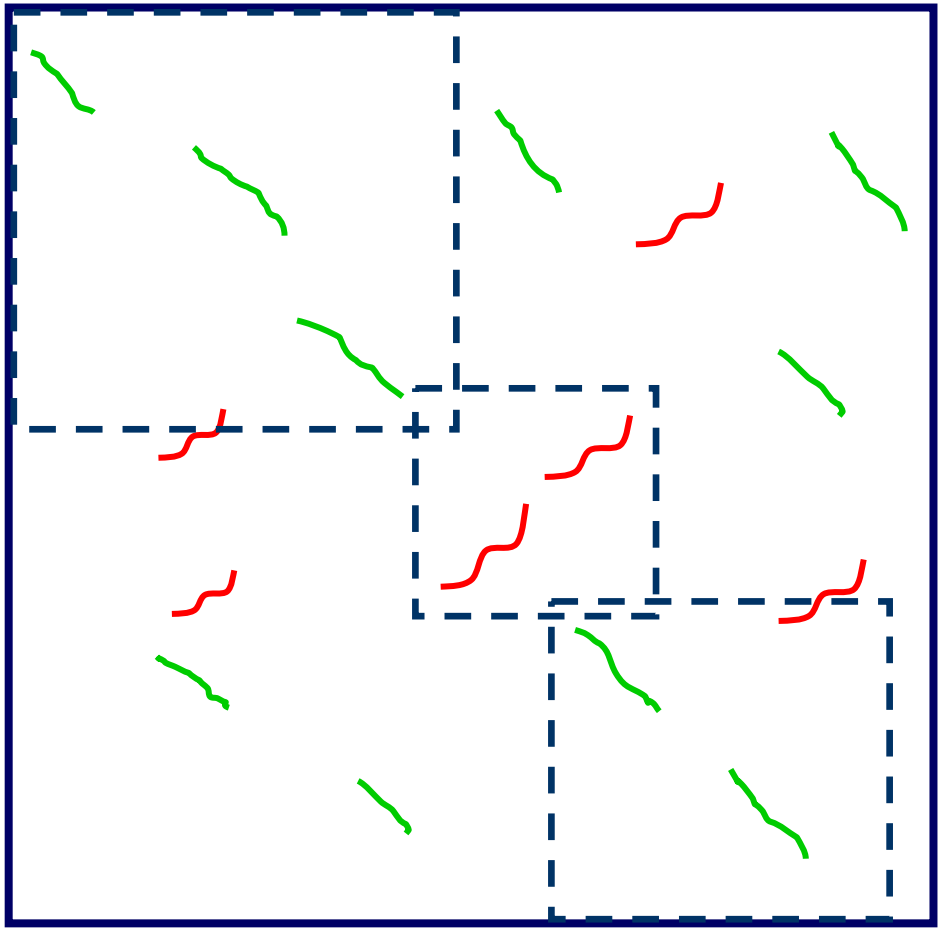
1. Nalezení lokálních přiřazení
2. Sestavení hrubé mapy homologií
3. Globální zarovnání dle odpovídajících si částí

Shuffle-LAGAN (S-LAGAN)



1. Nalezení lokálních přiřazení
2. Sestavení hrubé mapy homologií
3. Globální zarovnání dle odpovídajících si částí

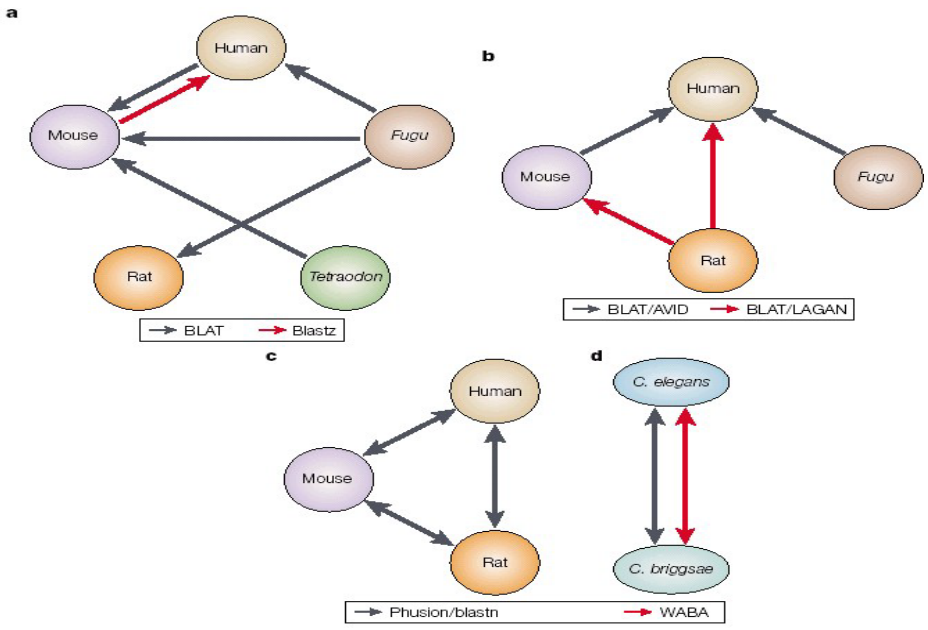
Shuffle-LAGAN (S-LAGAN)



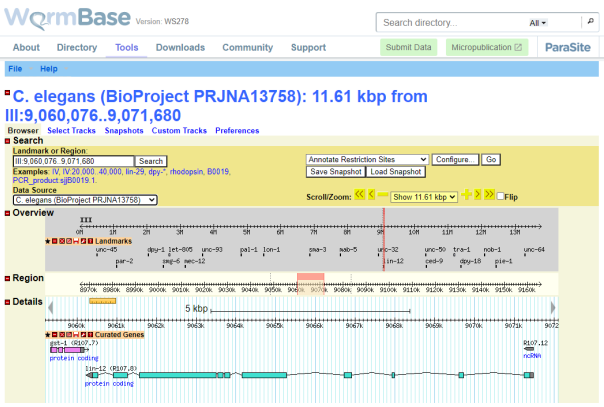
1. Nalezení lokálních přiřazení
2. Sestavení hrubé mapy homologií
3. Globální přiložení dle odpovídajících si částí

Biologie genomů

- U významných skupin organismů jsou k dispozici rozsáhlá genomová srovnání (Precomputed alignments)
  - UC Santa Cruz/PennState (translated BLAT or BLASTZ)
  - Berkeley Genome Pipeline (BLAT/AVID)
  - Ensembl (Phusion/Blastn)
  - Vista Genome Server (LAGAN/SLAGAN/AVID)
  - NMPDR (Microbial Pathogen Data Resource)
- Funkční genomika
- Populační genomika
- Evoluční genomika
- Lékařská genomika a rakovina

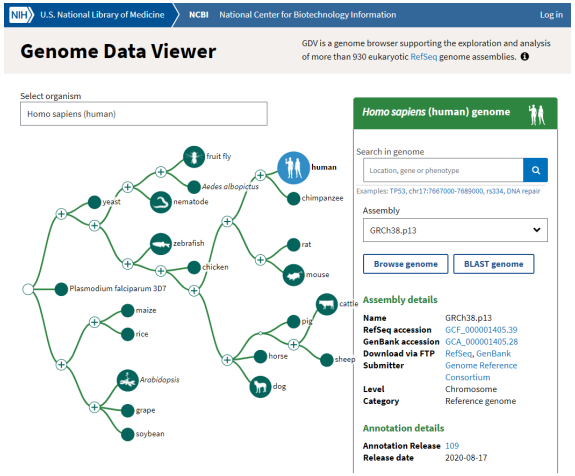


Genome Browsers



Generic Genome Browser (CSHL)

www.wormbase.org/db/seq/gbrowse

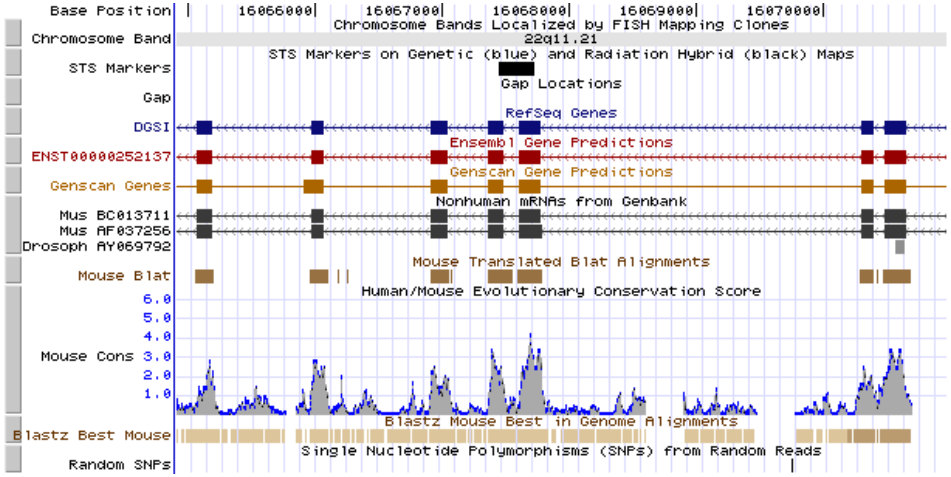


NCBI Genome Viewer

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/

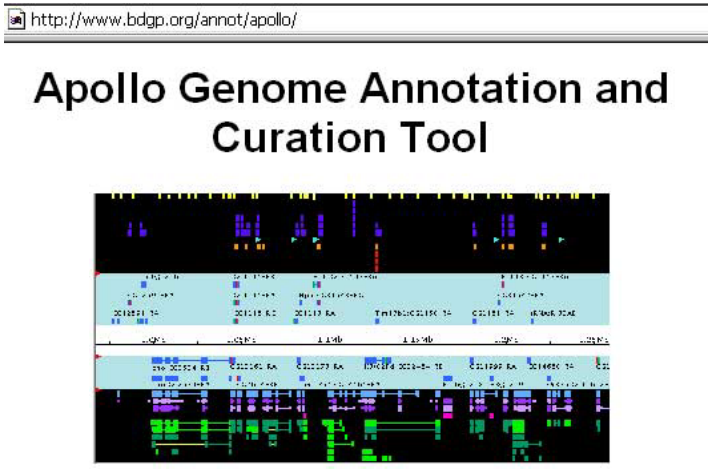
Ensembl Genome Browser

www.ensembl.org/



UCSC Genome Browser

http://genome-euro.ucsc.edu/

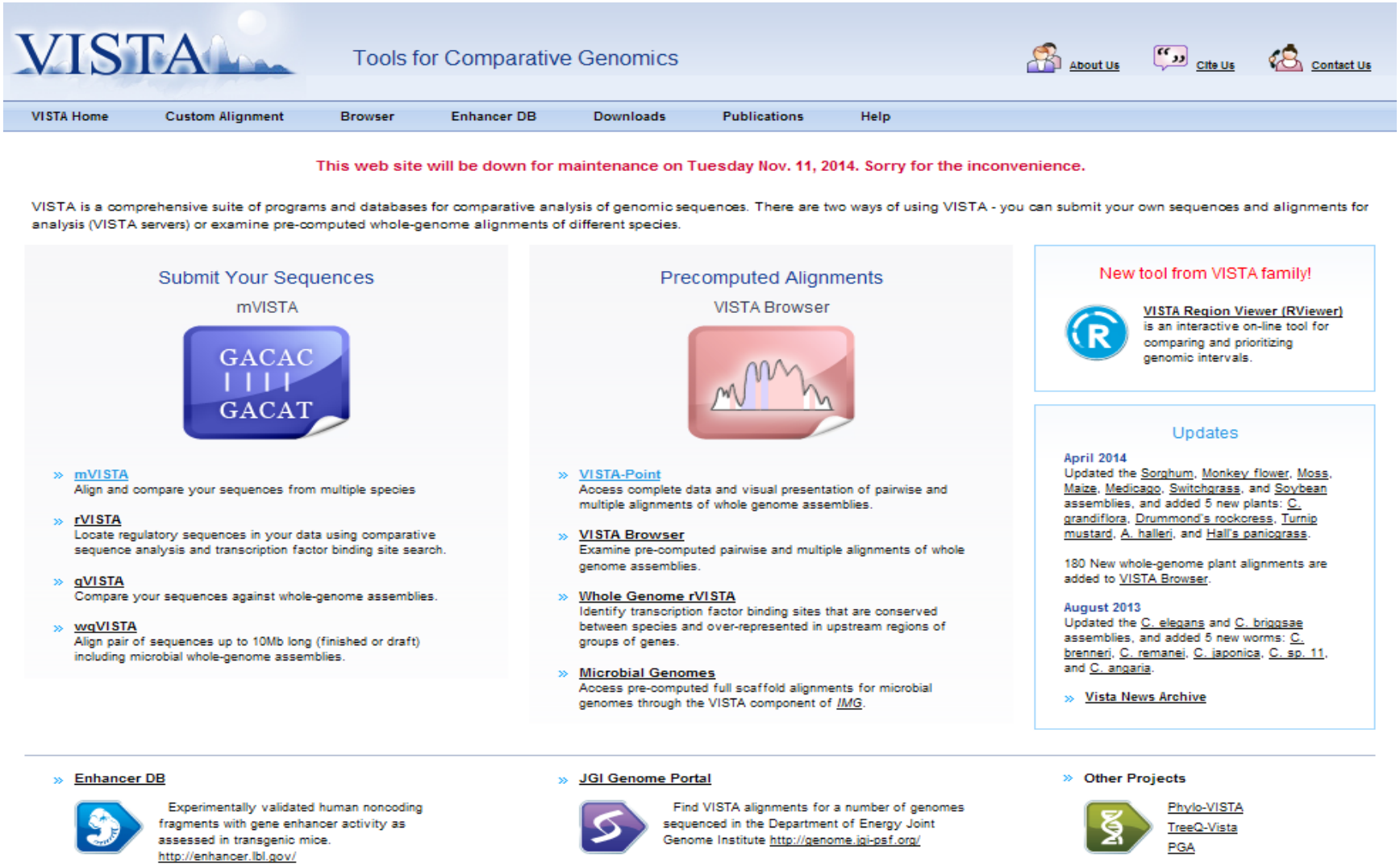


Apollo Genome Browser

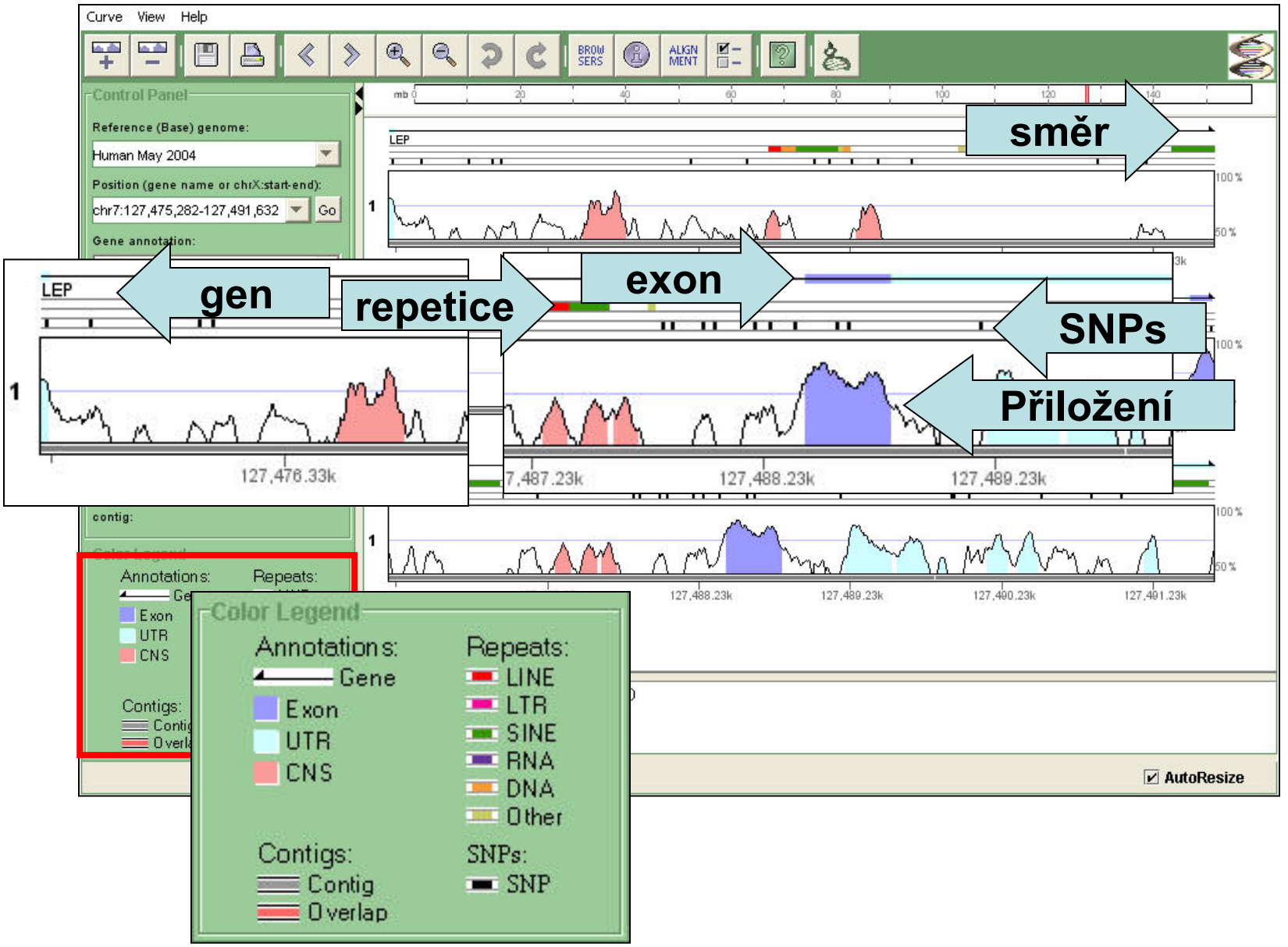
https://genomearchitect.readthedocs.io/

Vista Tools

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



VISTA Browser: Alignment Details



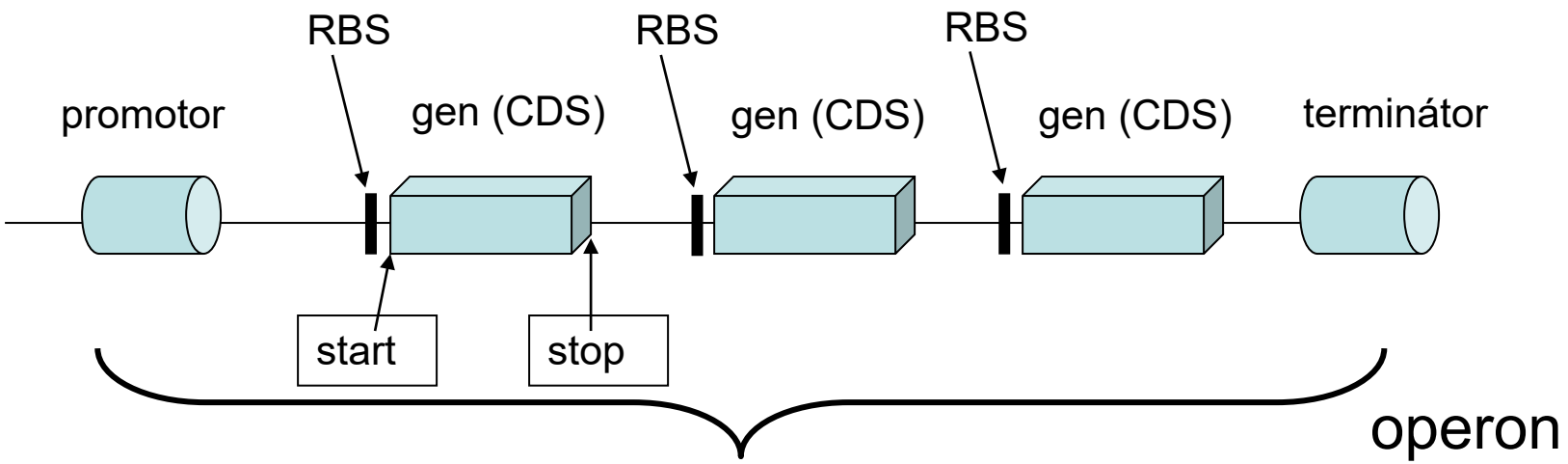
3. Predikce kódující oblasti na základě hledání (*ab initio*)

- Využívá pouze sekvenční data a výpočetní přístupy integrující analýzu sekvence a detekci 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
  - Analýza frekvencí

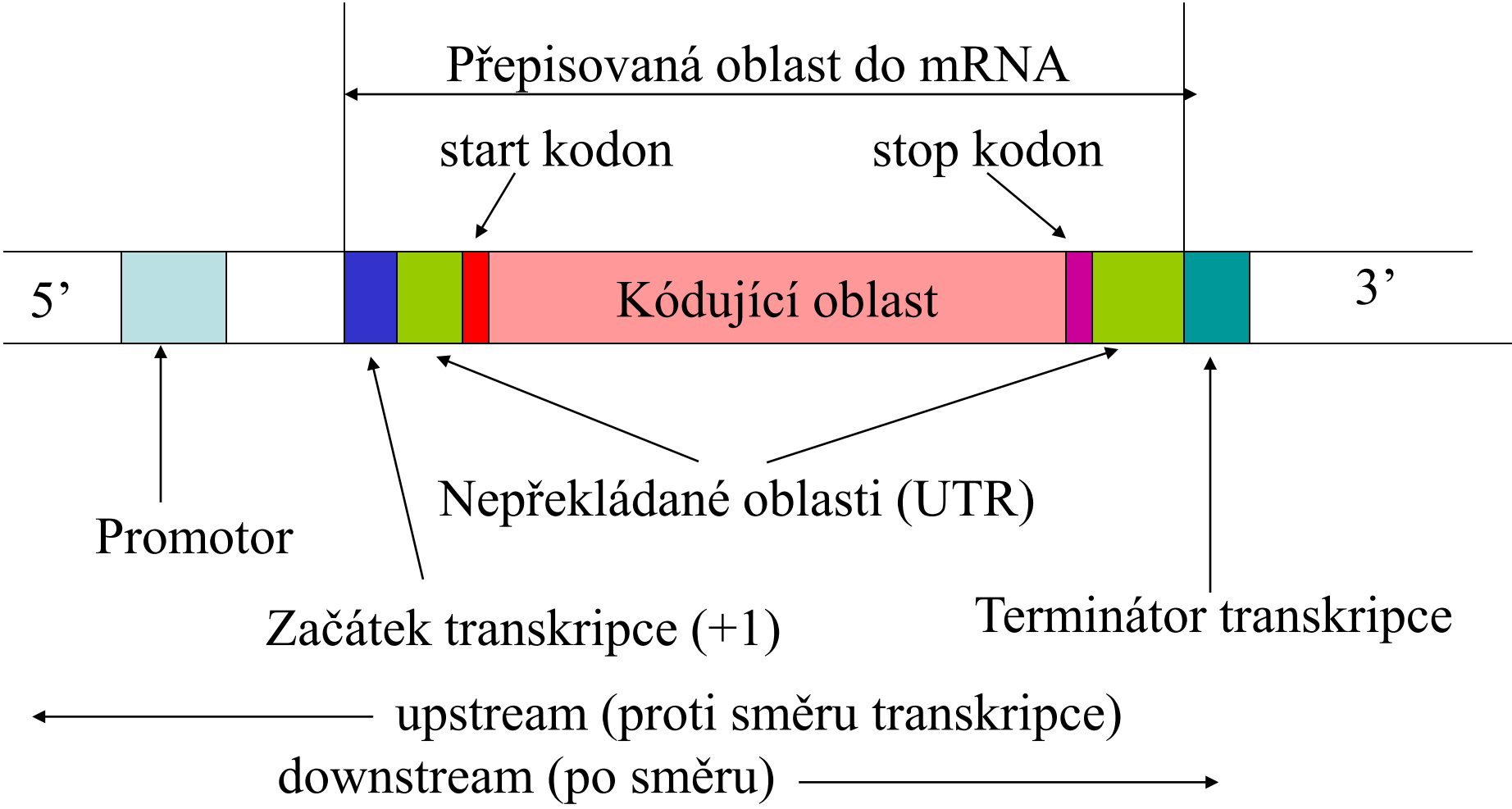
Klíčové signály pro odhalení genů

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

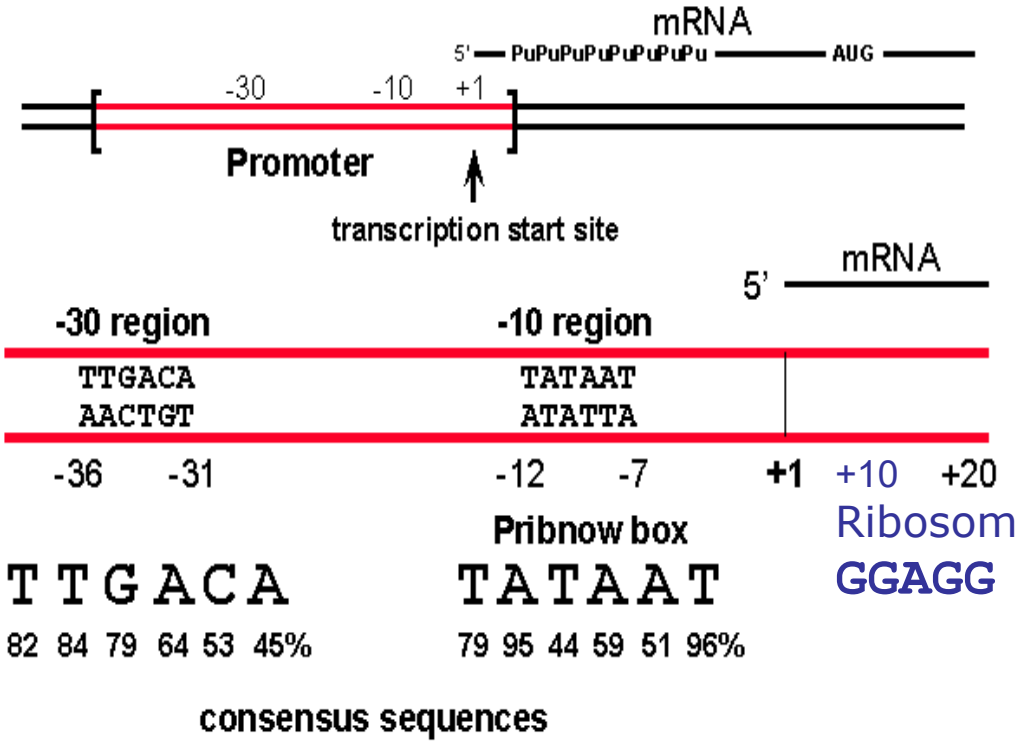
Struktura prokaryotické transkripční jednotky



Struktura prokaryotického genu



Konzervativní struktury v promotoru prokaryot

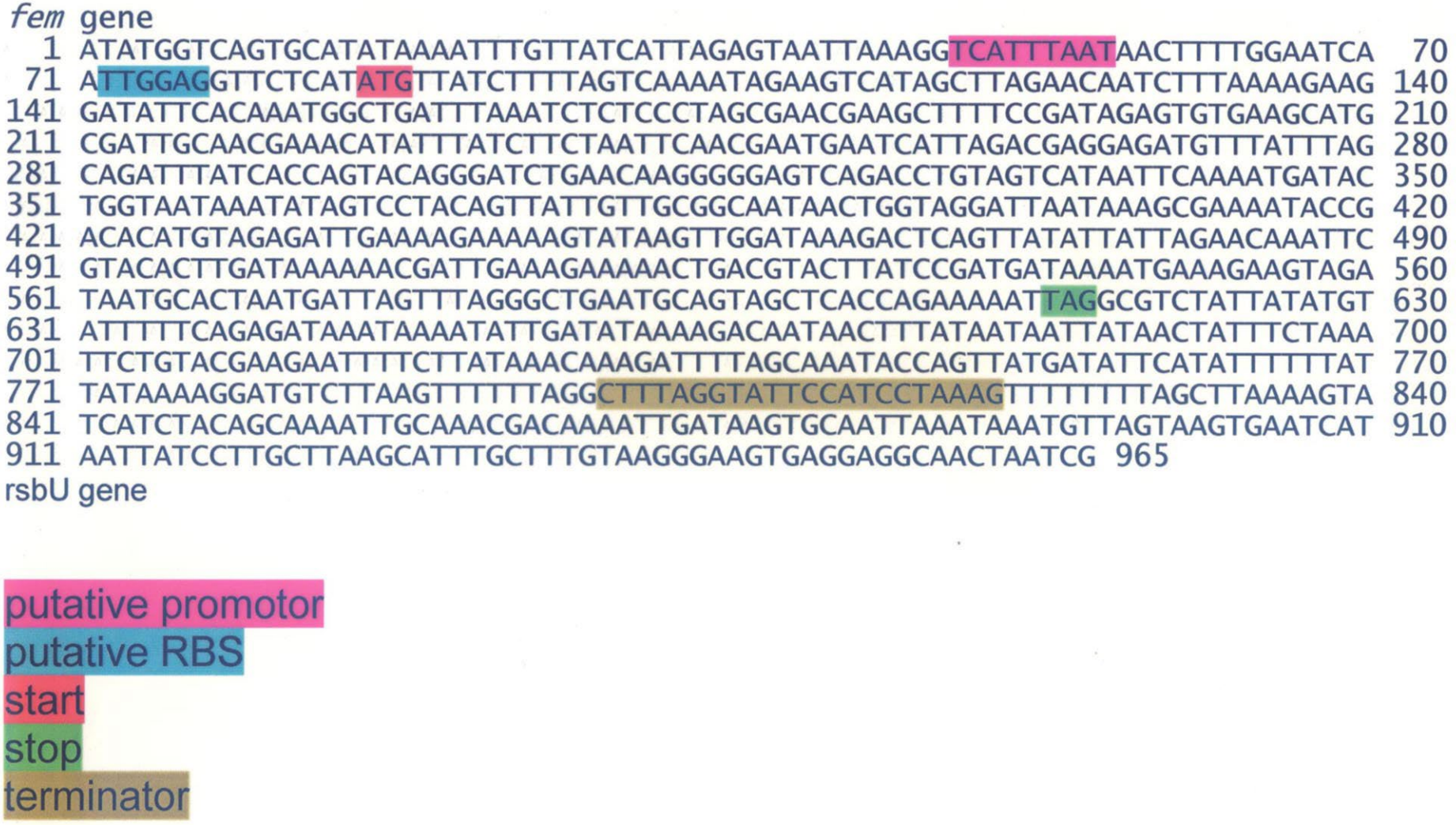


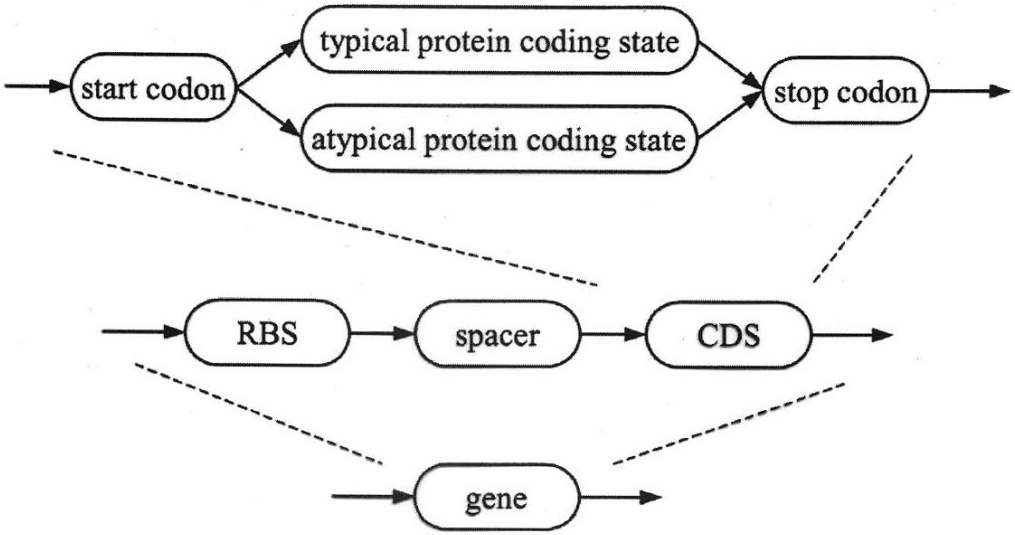
Ribosomal binding site (RBS)

GGAGG ATG

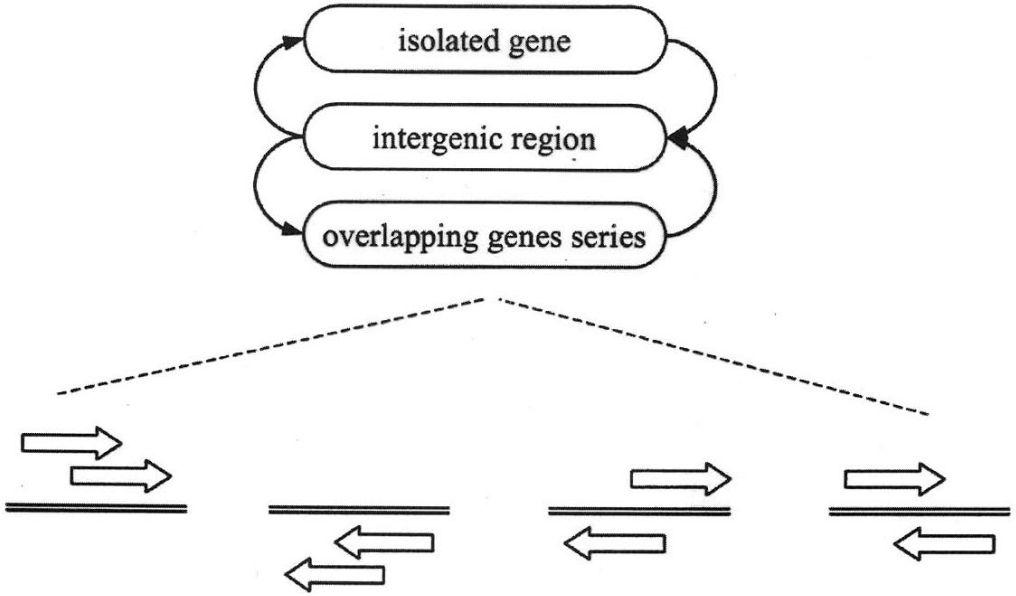
protein

Signály v jednoduchém strukturním genu

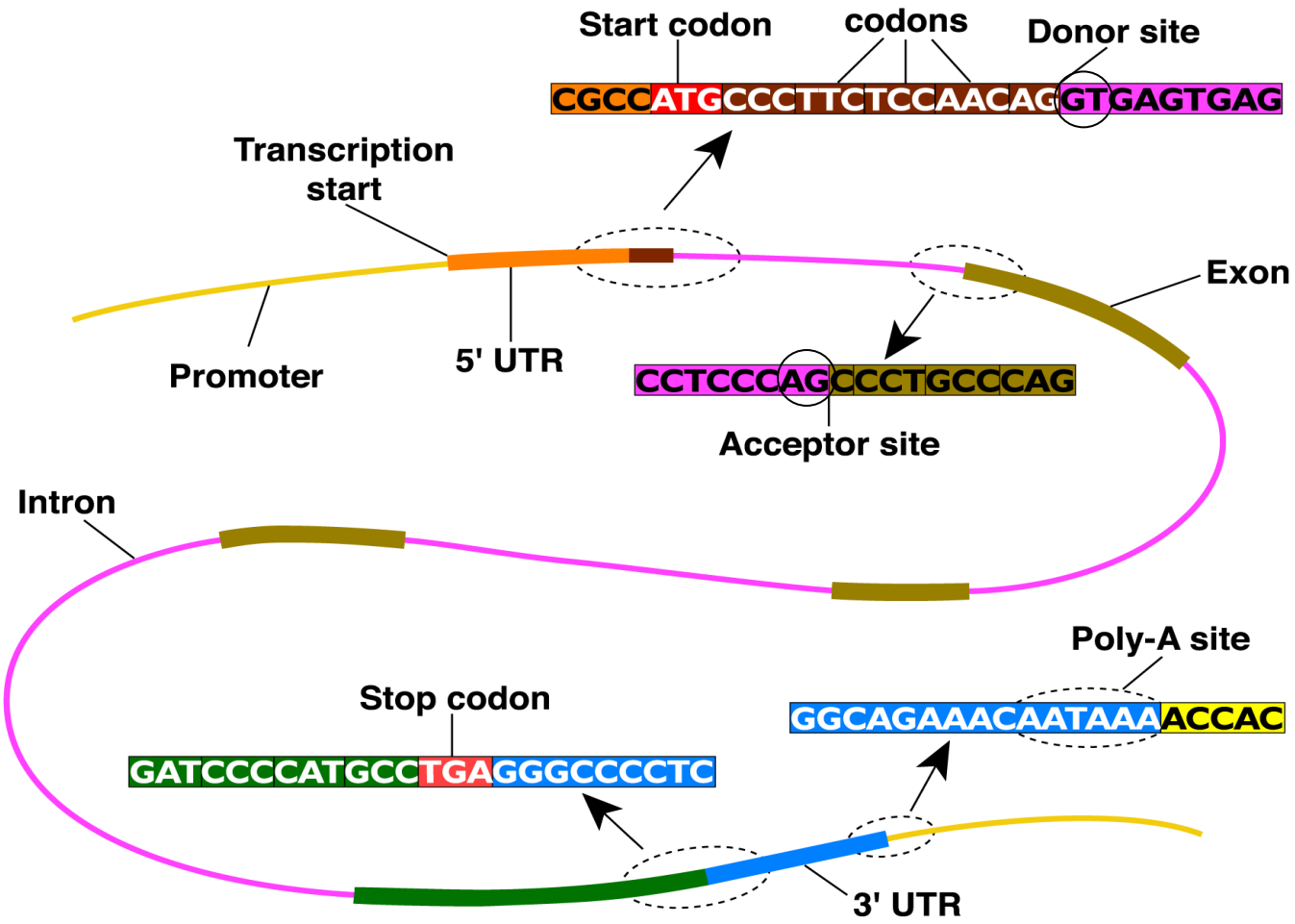




Model pro hledání jednoduchých genů



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

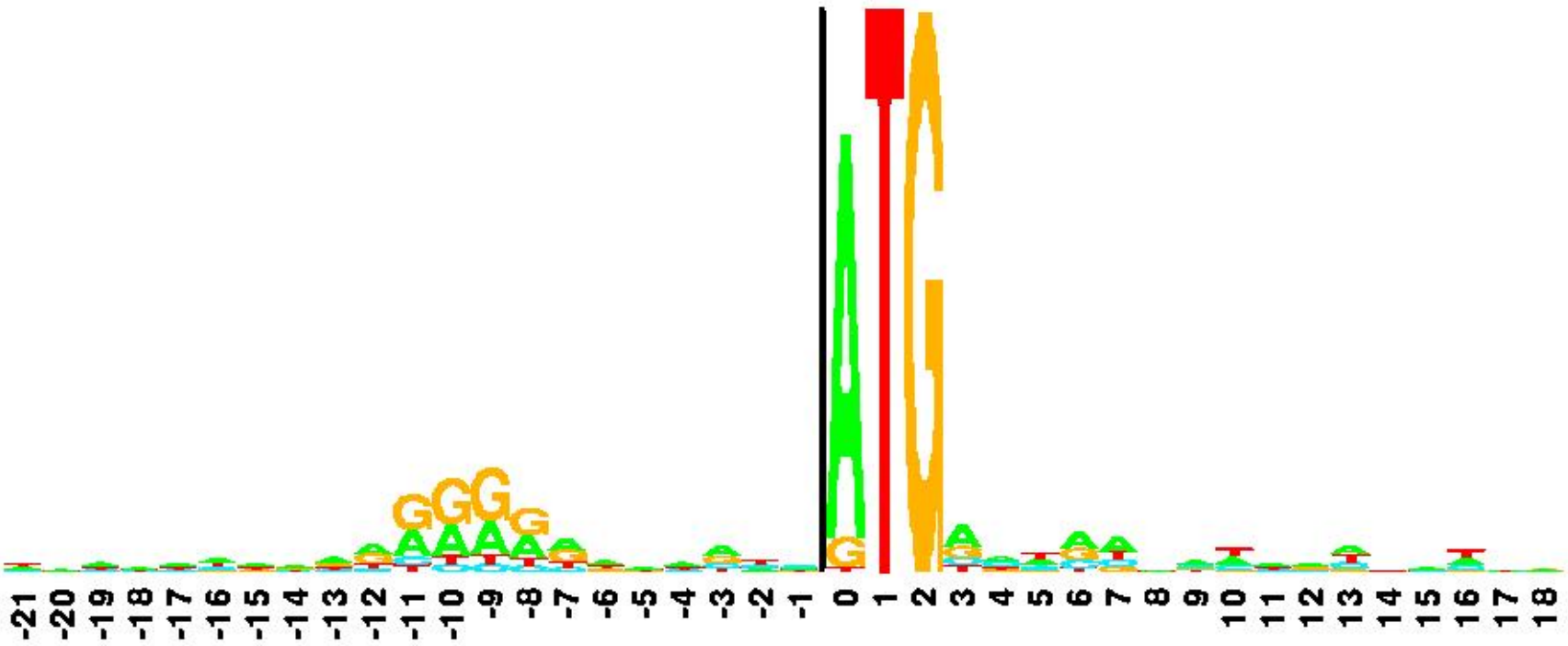
	1	2	3	4	5	6
A	0	6	0	3	4	0
C	0	0	1	0	1	0
G	1	0	0	3	0	0
T	5	0	5	0	1	6

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

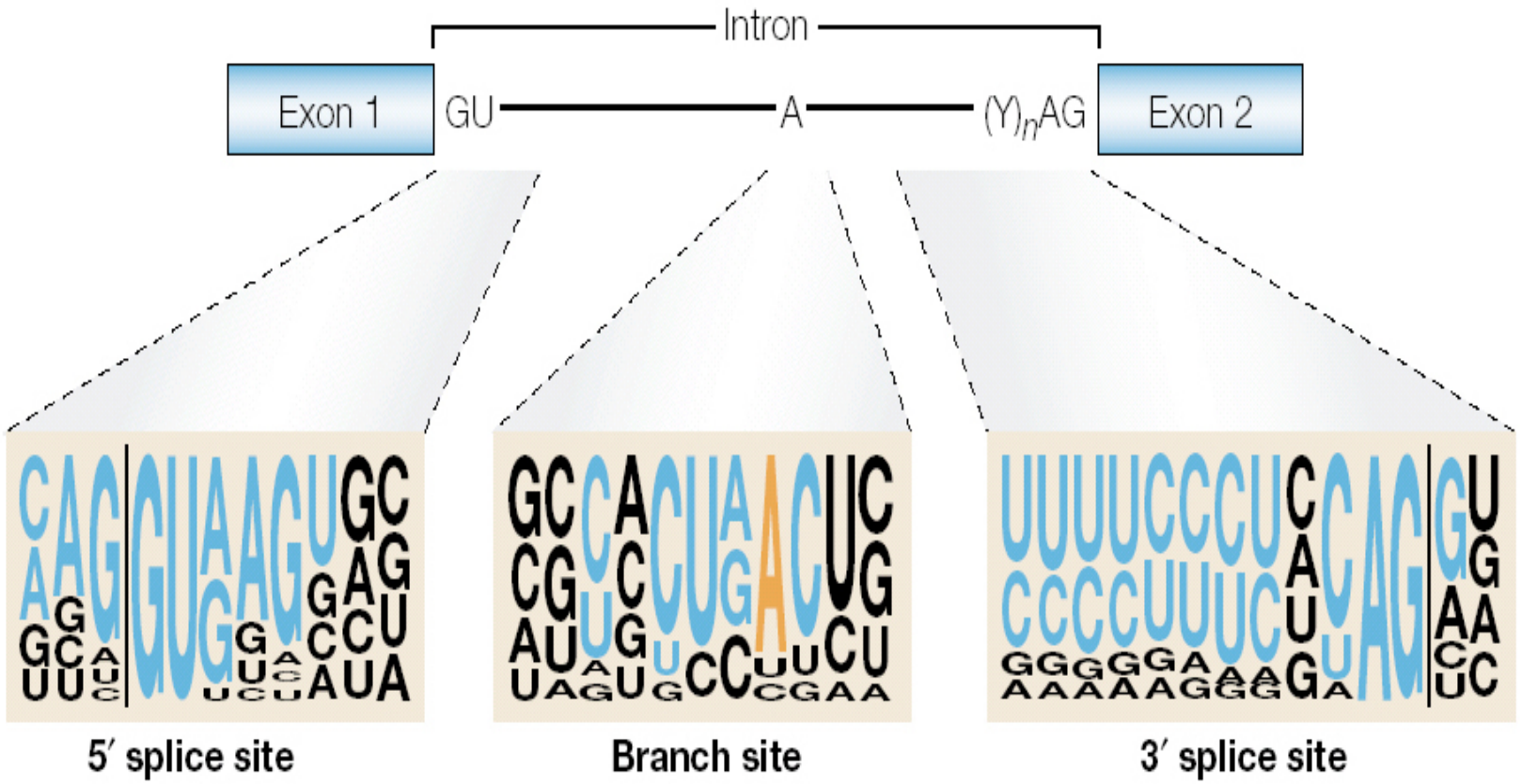
Příklad signálu

RBS (vazebné místo pro ribozóm) u *Bacillus subtilis*

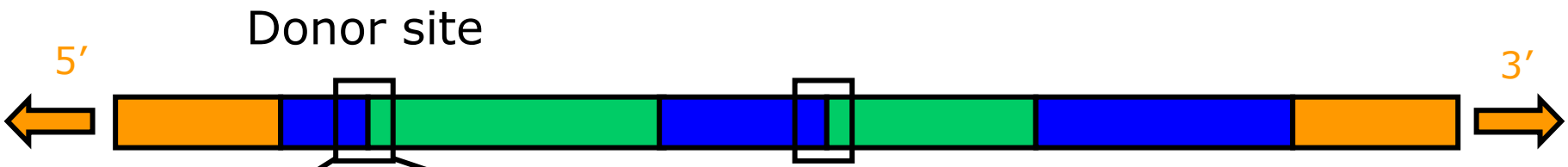
Vazebné místo pro ribozóm (RBS) a iniciační kodon ATG u *E. coli*



Predikce míst sestřihu

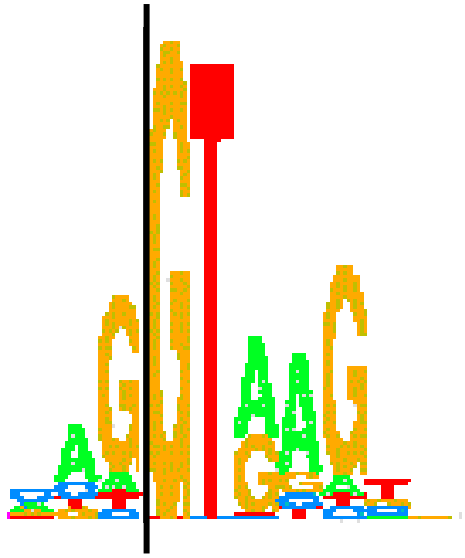


Pozičně vážená matice pro odvození donorového místa sestřihu

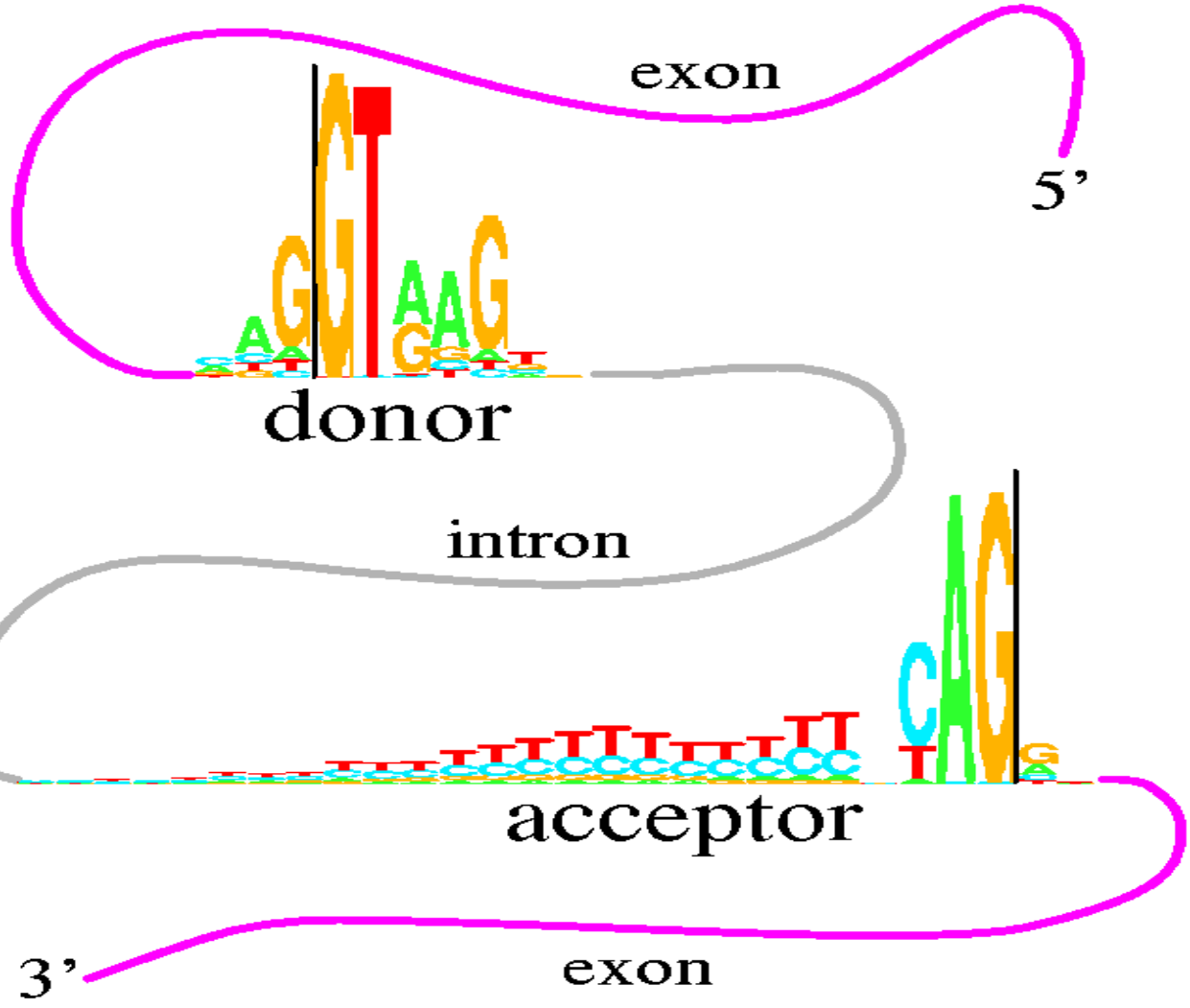


Position

%	-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 genu
  - frekvence využití kodonů
  - obsah GC (indikace horizontálního přenosu)
  - GC skew a AT skew
    - GC skew = (G − C)/(G + C)
    - AT skew = (A − T)/(A + T)
  - statistické modely modely frekvencí nukleotidů (využití hexamerů)
  - periodicita nukleotidů

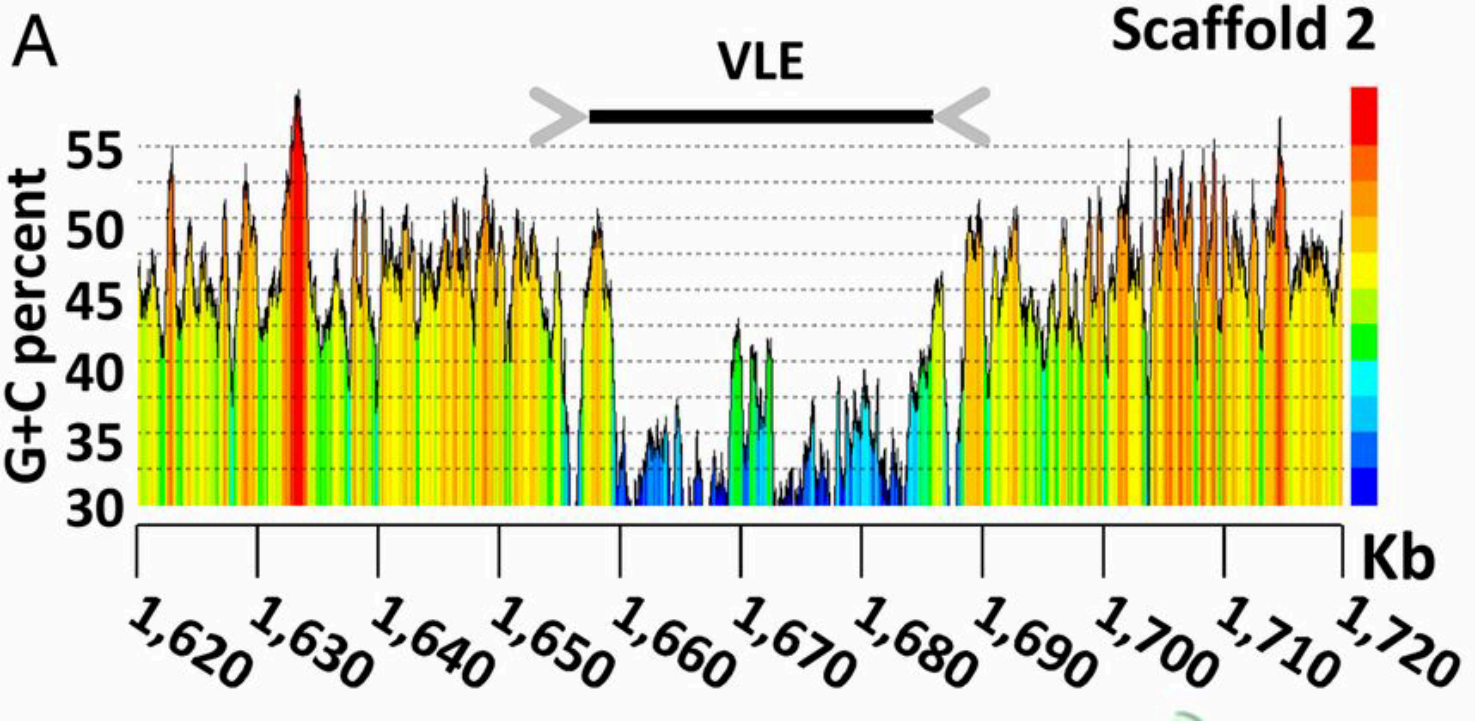
Testování exonů – využití kodonů

AA	codon	/1000	frac
Ser	TCG	4.31	0.05
Ser	TCA	11.44	0.14
Ser	TCT	15.70	0.19
Ser	TCC	17.92	0.22
Ser	AGT	12.25	0.15
Ser	AGC	19.54	0.24
Pro	CCG	6.33	0.11
Pro	CCA	17.10	0.28
Pro	CCT	18.31	0.30
Pro	CCC	18.42	0.31

AA	codon	/1000	frac
Leu	CTG	**39.95**	0.40
Leu	CTA	7.89	0.08
Leu	CTT	12.97	0.13
Leu	CTC	20.04	0.20
Ala	GCG	6.72	0.10
Ala	GCA	15.80	0.23
Ala	GCT	20.12	0.29
Ala	GCC	**26.51**	0.38
Gln	CAG	**34.18**	0.75
Gln	CAA	11.51	0.25

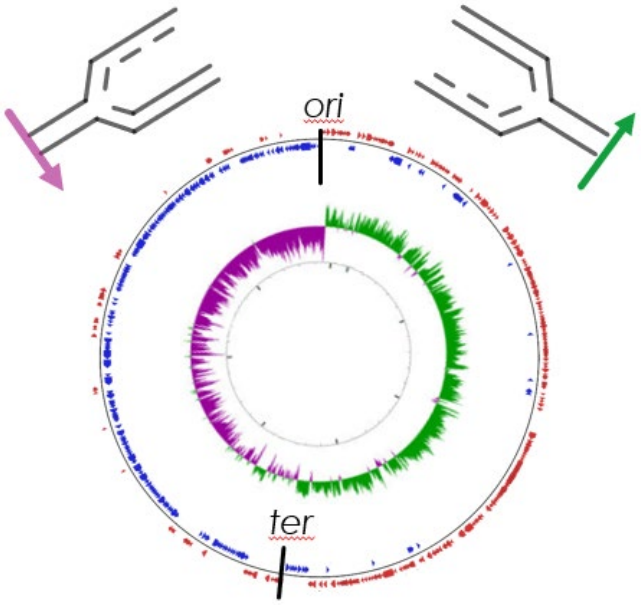
Codon usage database: http://www.kazusa.or.jp/codon/

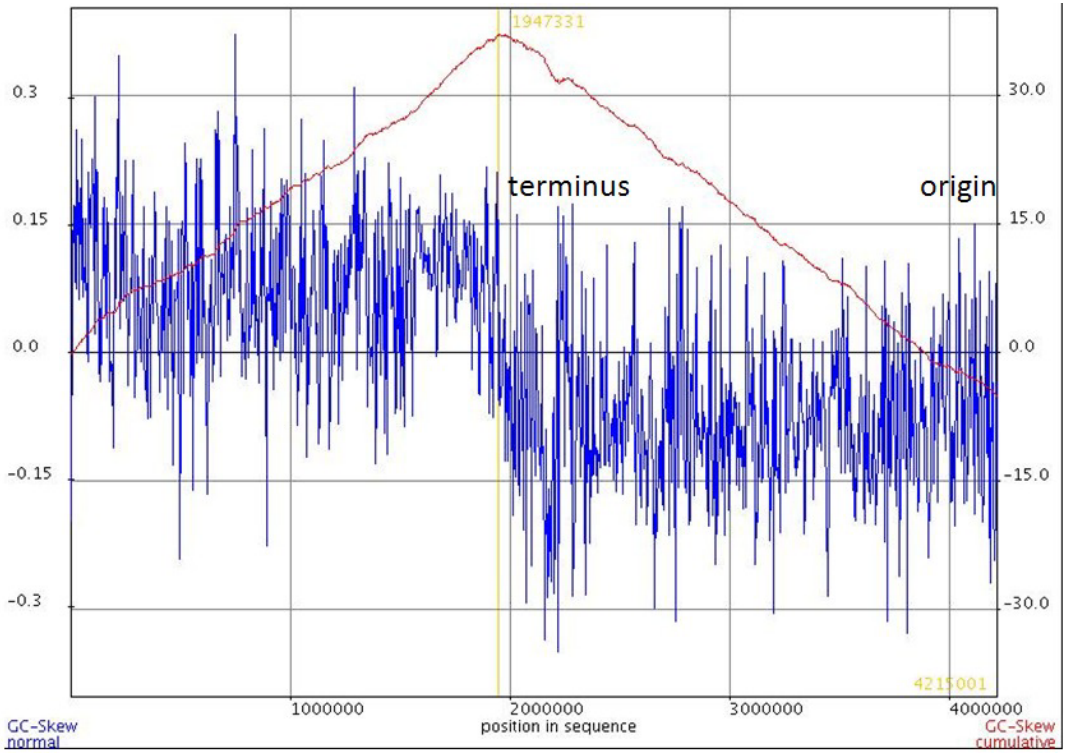
Obsah G+C – příklad využití pro identifikaci horizontálně přeneseného mobilního elementu



Odlišný obsah G+C indikuje horizontální přenos

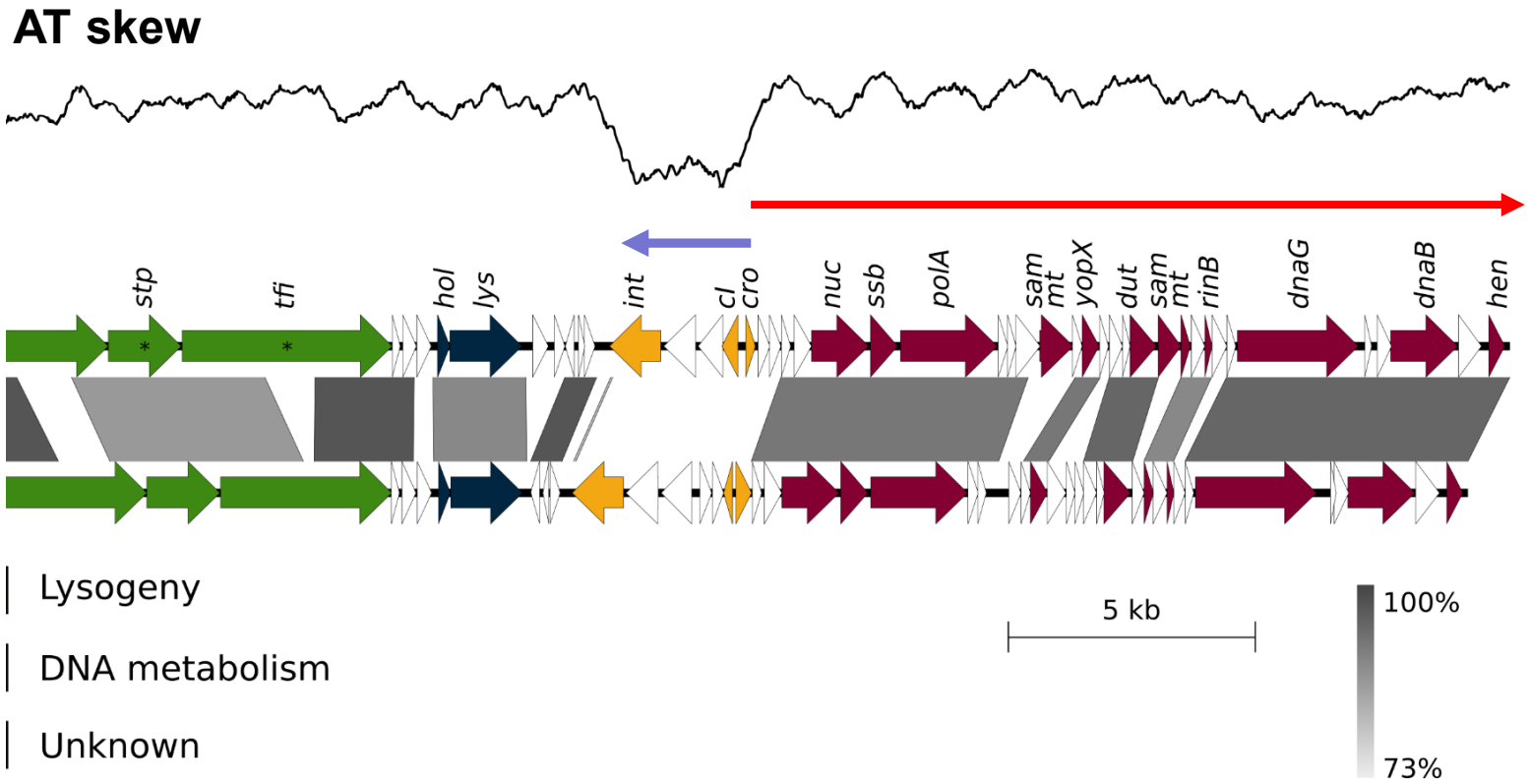
GC skew – příklad využití pro identifikaci prokaryotického počátku replikace





GC skew = [G% − C%] / [G% + C%]

AT skew – příklad využití pro identifikaci kódujícího vlákna DNA

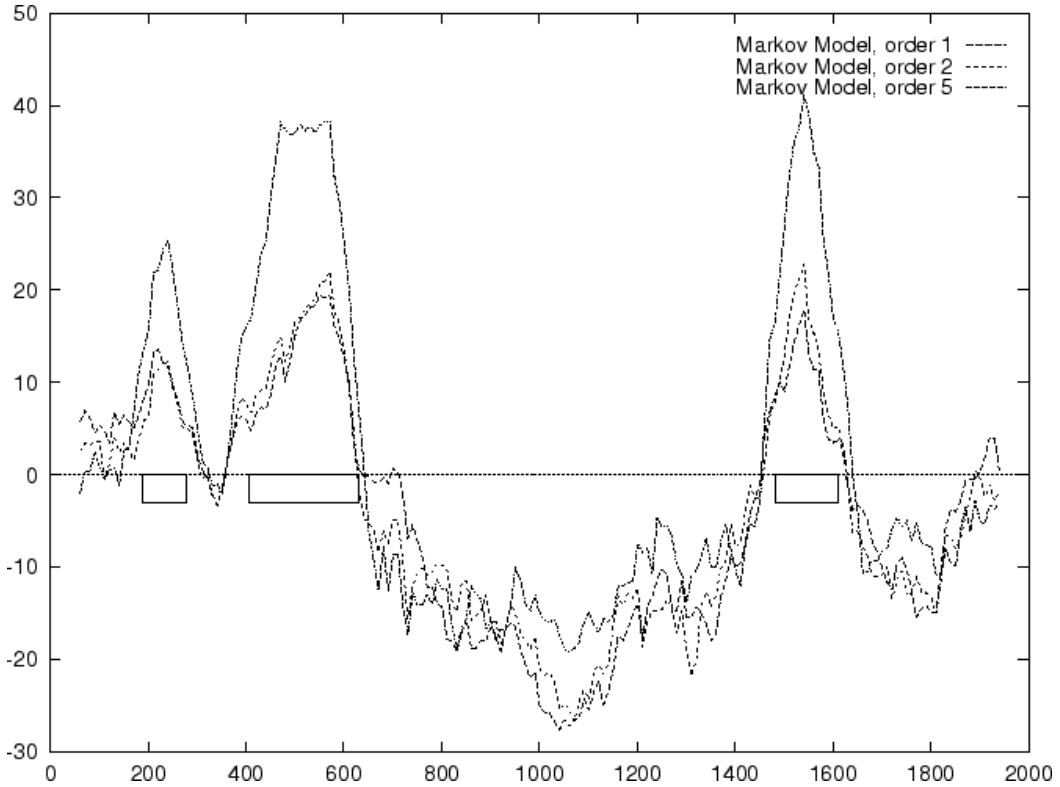


AT skew = [A% − T%] / [A% + T%]

Frekvence oligonukleotidů - rozlišení mezi kódujícími a nekódujícími oblastmi

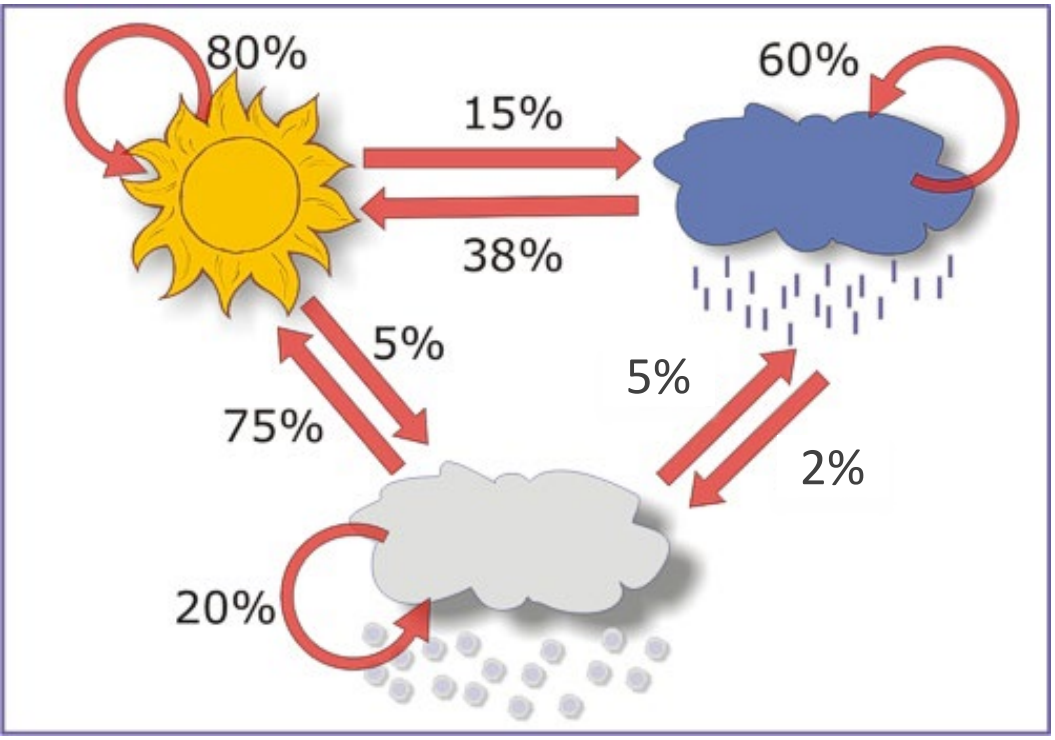
- Rozdíly v distribuci jiných oligonukleotidů než kodonů, tj. tri-nukleotidů, např. hexamerů

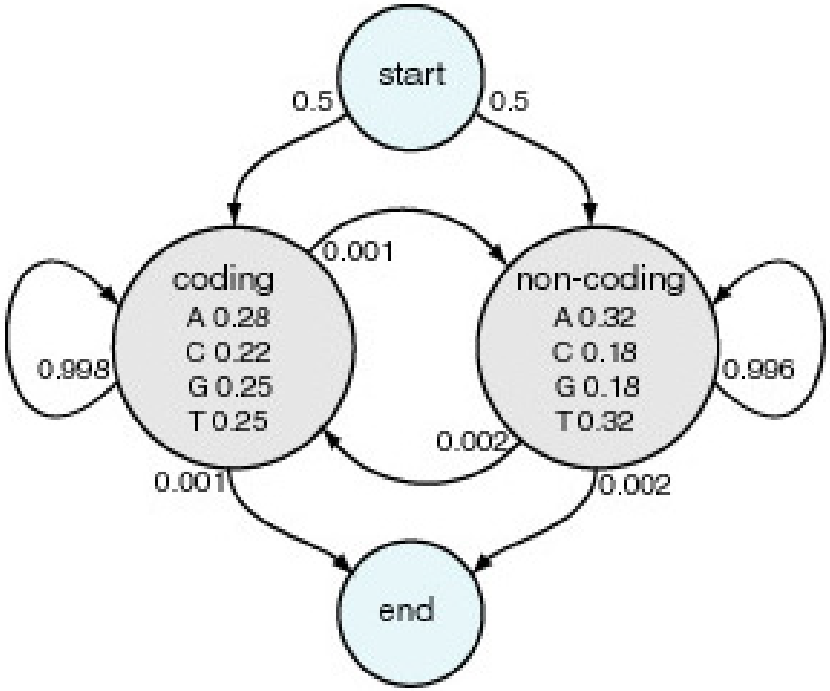
- odráží závislosti mezi sousedními aminokyselinami v proteinech



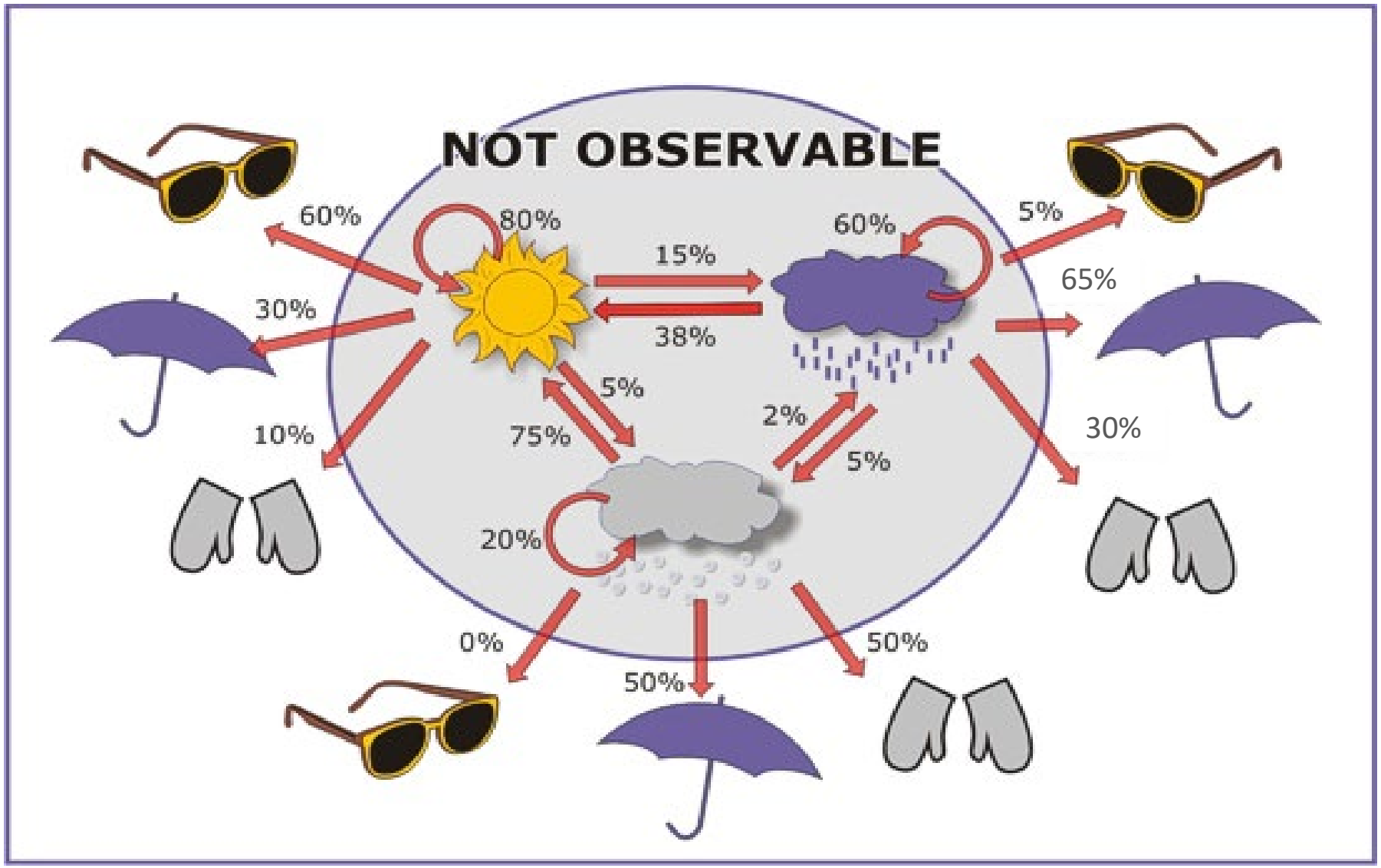
Markovovy modely

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

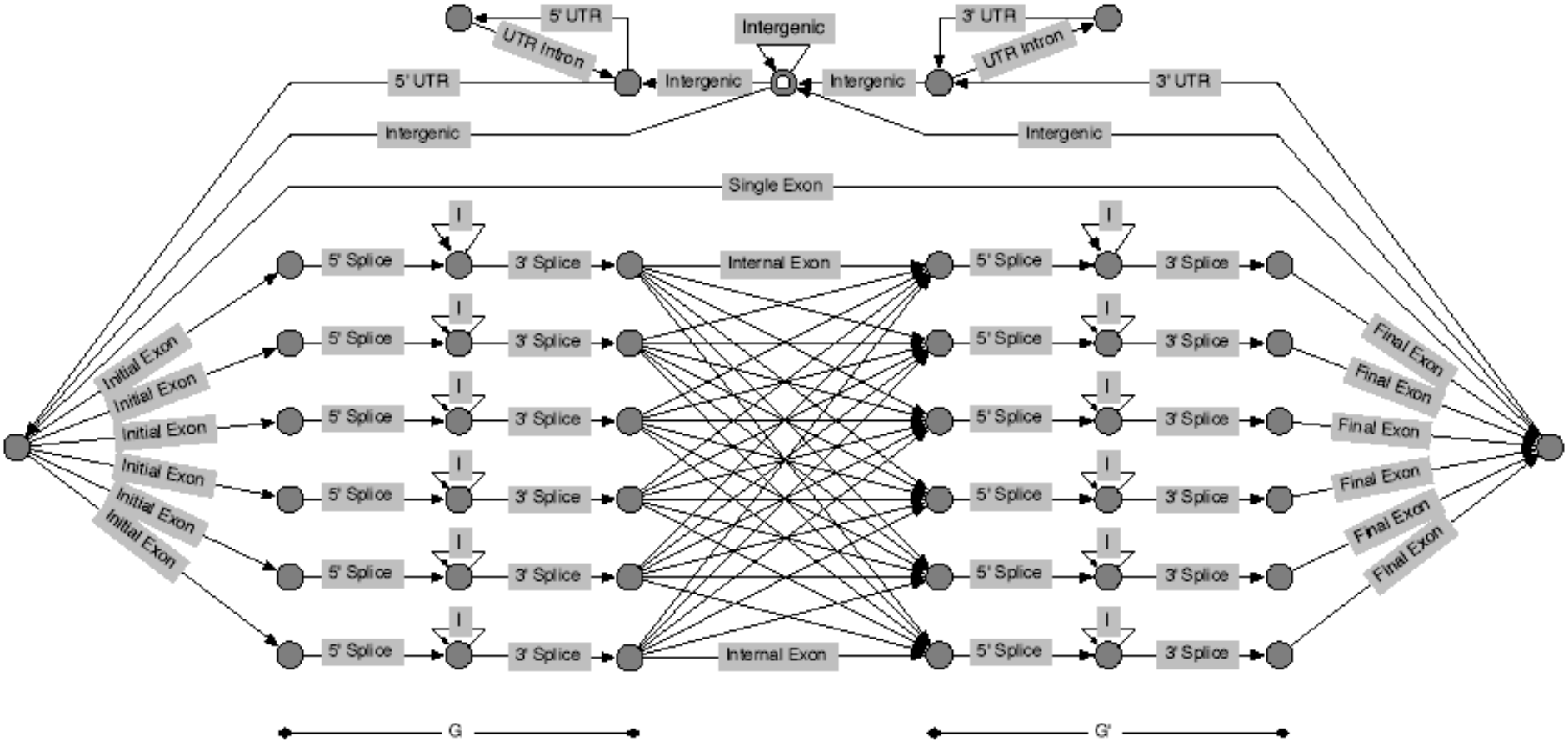




Hidden Markov Models (HMM)



Příklad komplexního algoritmu se skrytými Markovovy modely (HMM)



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

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

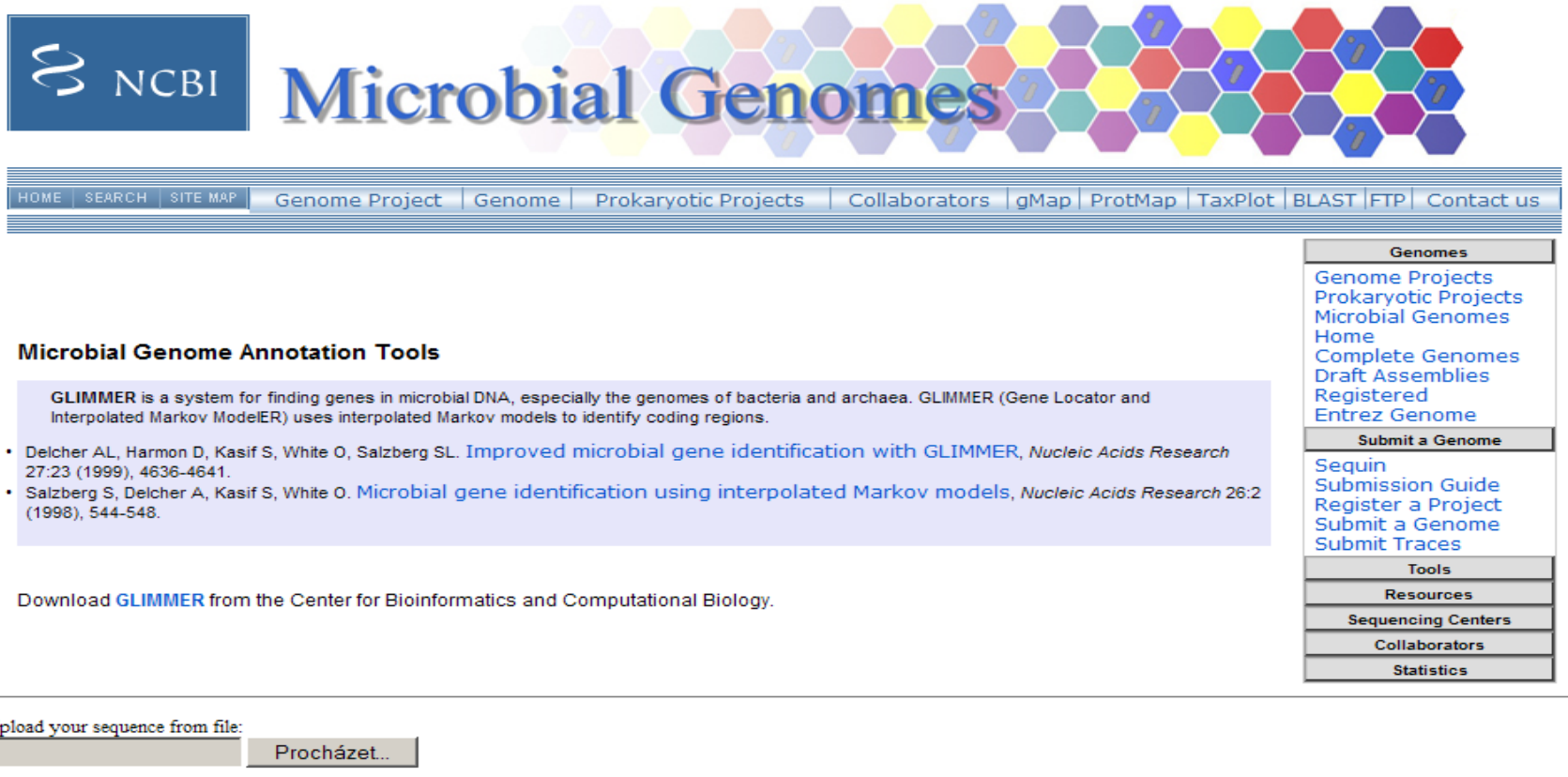
- Prokaryotes Closed, Updating
- Viruses/Phages (VIOLIN)

Models for Gene Prediction

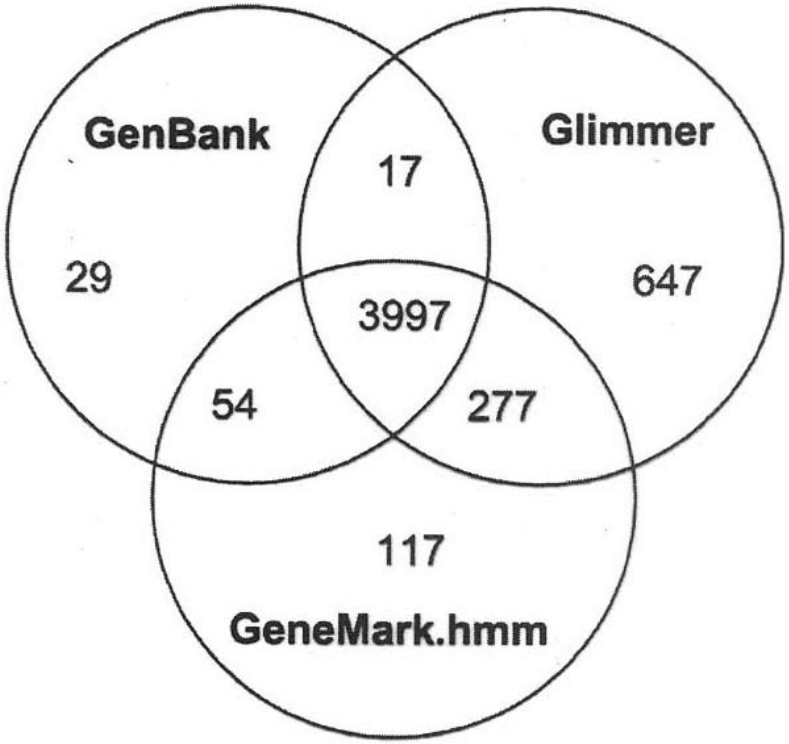
- Download

Glimmer

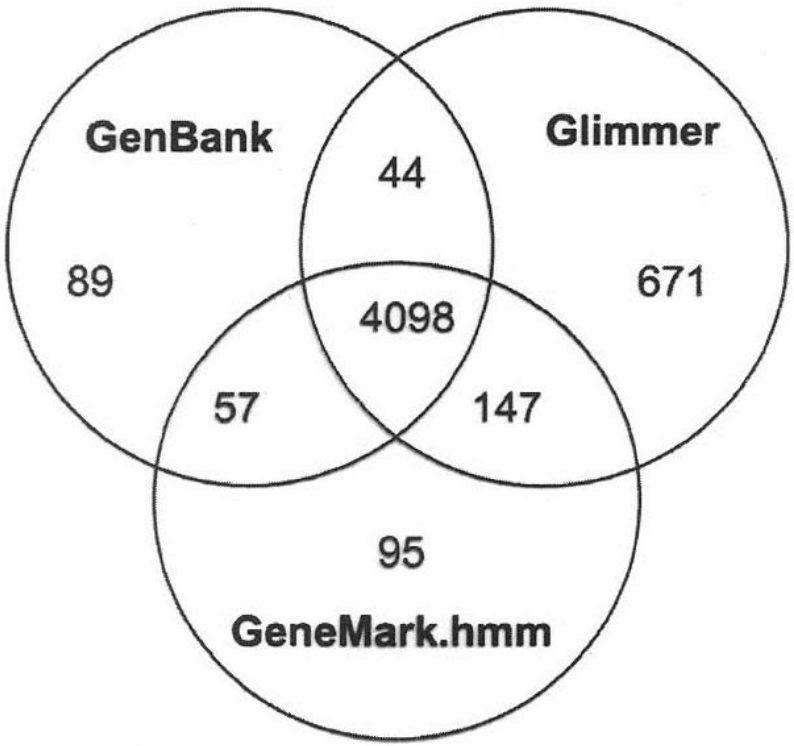
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi



Příklad srovnání různých přístupů pro vyhledávání prokaryot. genů



B. subtilis

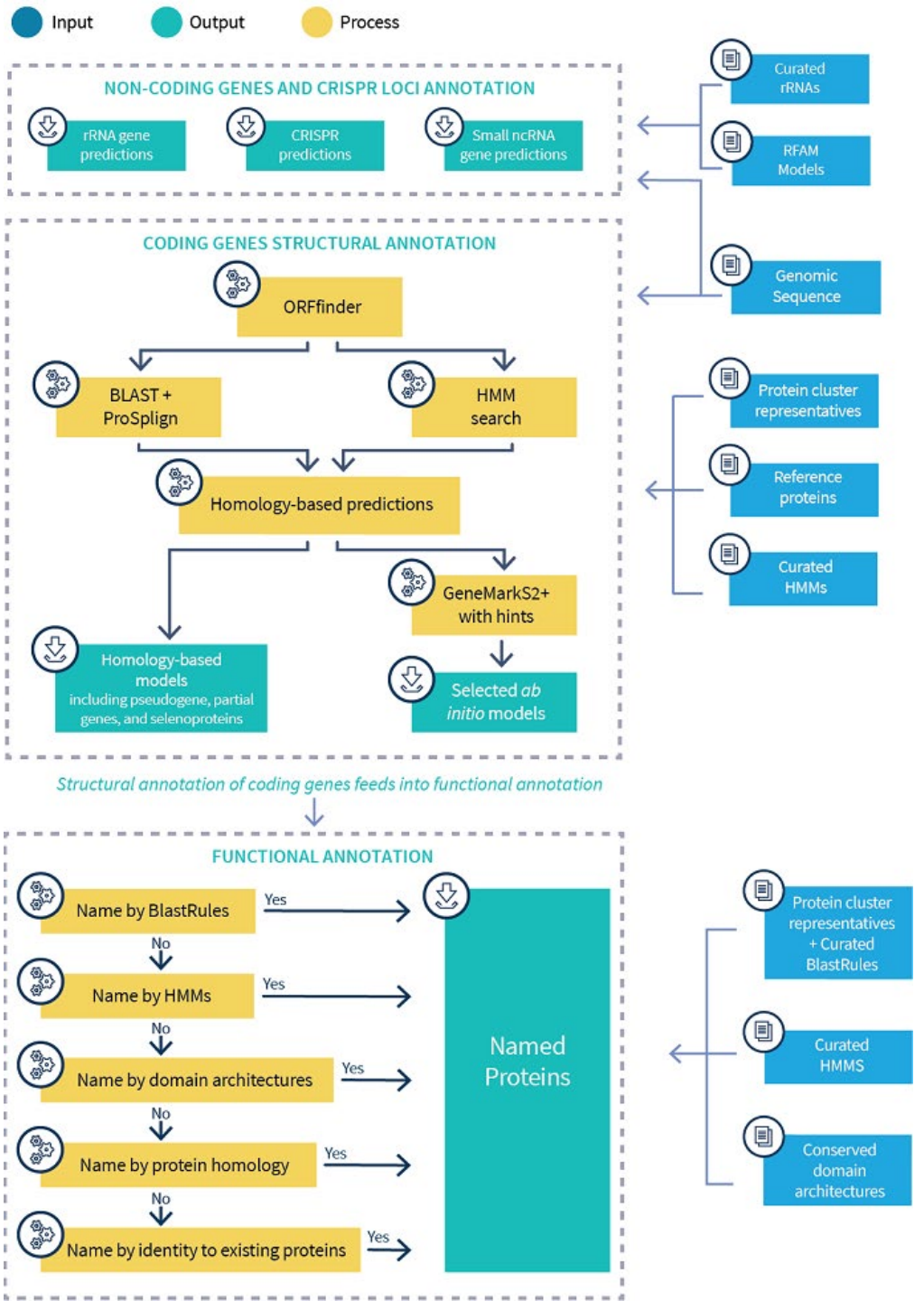


E. coli

PGAP - NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline

Víceúrovňový proces kombinuje ab initio predikci a metody založené na podobnosti

- predikce genů kódujících protein
- další funkční jednotky
  - strukturní RNA
  - tRNA
  - malé RNA
  - pseudogeny
  - kontrolní oblasti
  - Repetice
  - mobilní elementy



RAST Rapid Annotation using Subsystem Technology version 2.0

The NMPDR, SEED-based, prokaryotic genome annotation service.
For more information about The SEED please visit theSEED.org.

http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi

RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)

- Anotace na základě vlastní pipeline
- Využívá integrovaný přístup včetně NCBI databáze (BLAST)
- Klasifikace genů do subsystémů a identifikace metabolických drah podle KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (https://www.genome.jp/kegg/)
- Příklad parametrů anotovaného genomu:

Organism Overview for Massilia sp. CCM 8692 (6666666.478097)

Genome	Massilia sp. CCM 8692
Domain	Bacteria
Taxonomy	Bacteria; Massilia sp. CCM 8692
Neighbors	View closest neighbors
Size	7,576,397
GC Content	63.8
N50	191842
L50	11
Number of Contigs (with PEGs)	141
Number of Subsystems	475
Number of Coding Sequences	6982
Number of RNAs	104

For each genome we offer a wide set of information to browse, compare and download.

Browse | Compare | Download | Annotate

Browse through the features of Massilia sp. CCM 8692 both graphically and through a table. Both allow quick navigation and filtering for features of your interest. Each feature is linked to its own detail page.

Click here to get to the Genome Browser

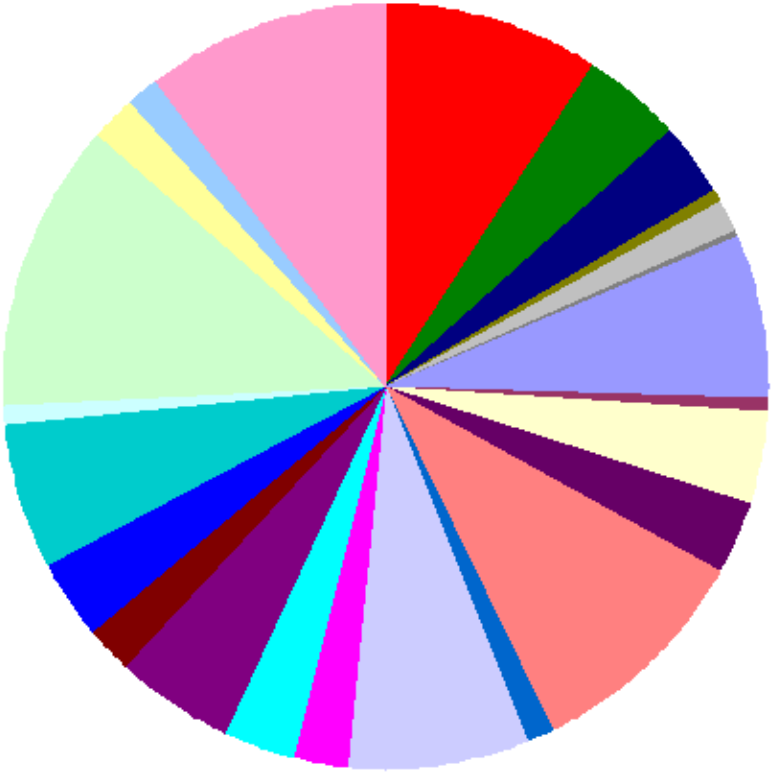
- RAST rozdělí anotované geny do jednotlivých funkčních kategorií, ty zahrnují další podkategorie – např. geny zapojené do jednotlivých metabolických drah

Subsystem Information

Subsystem Statistics | Features in Subsystems

Subsystem Coverage

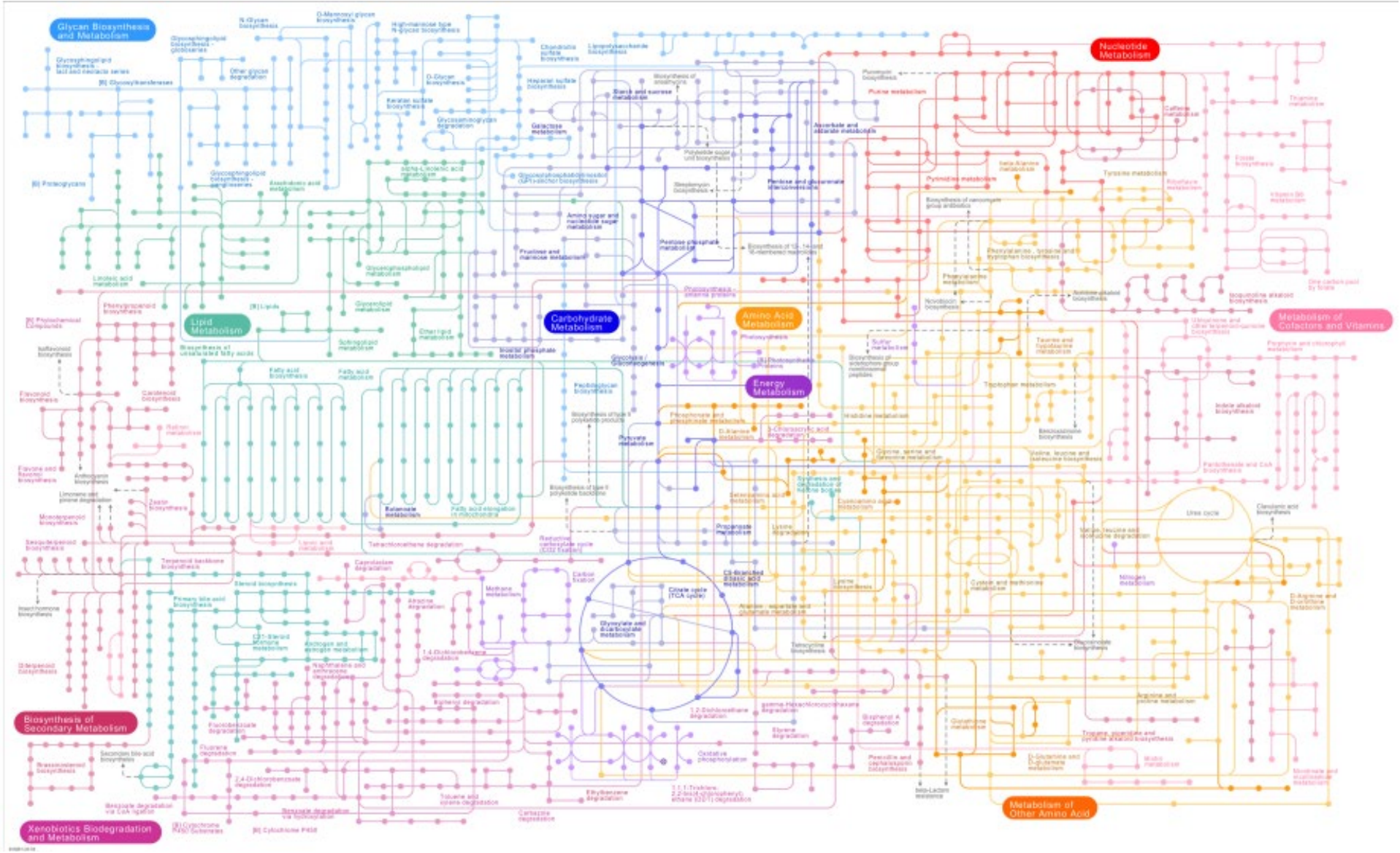
Subsystem Category Distribution



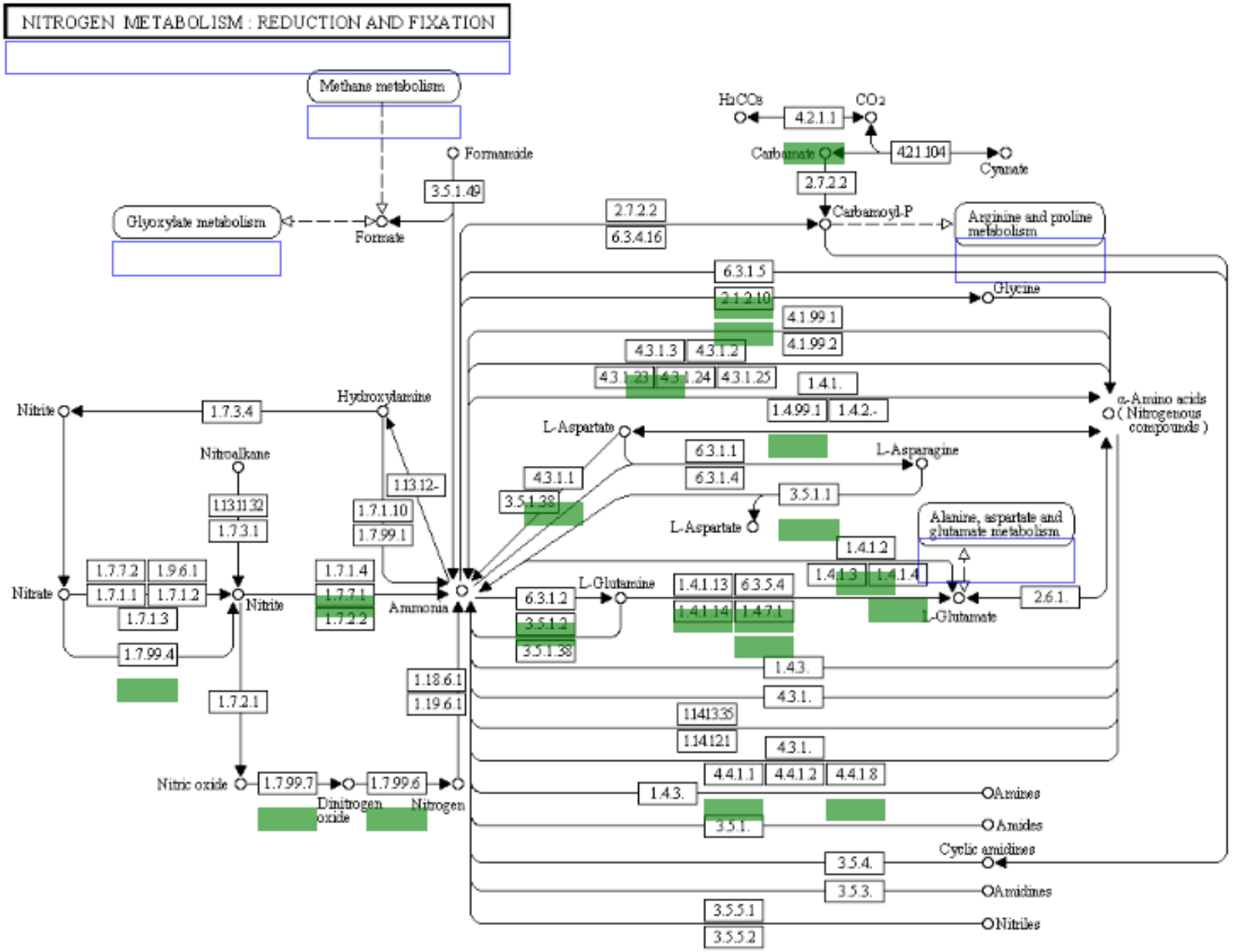
Subsystem Feature Counts

- Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments (327)
- Cell Wall and Capsule (145)
- Virulence, Disease and Defense (116)
- Potassium metabolism (19)
- Photosynthesis (0)
- Miscellaneous (45)
- Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids (13)
- Membrane Transport (248)
- Iron acquisition and metabolism (16)
- RNA Metabolism (135)
- Nucleosides and Nucleotides (108)
- Protein Metabolism (343)
- Cell Division and Cell Cycle (39)
- Motility and Chemotaxis (280)
- Regulation and Cell signaling (71)
- Secondary Metabolism (5)
- DNA Metabolism (116)
- Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids (178)
- Nitrogen Metabolism (63)
- Dormancy and Sporulation (4)
- Respiration (118)
- Stress Response (222)
- Metabolism of Aromatic Compounds (24)
- Amino Acids and Derivatives (428)
- Sulfur Metabolism (69)
- Phosphorus Metabolism (57)
- Carbohydrates (346)

KEGG mapa všech metabolických drah nalezených u daného organismu dle automatické anotace RASTem.
- možnost sledovat jednotlivé metabolické dráhy



Grafické znázornění proteinů, které byly v daném organismu identifikovány – identifikace na základě podobností v BLASTu



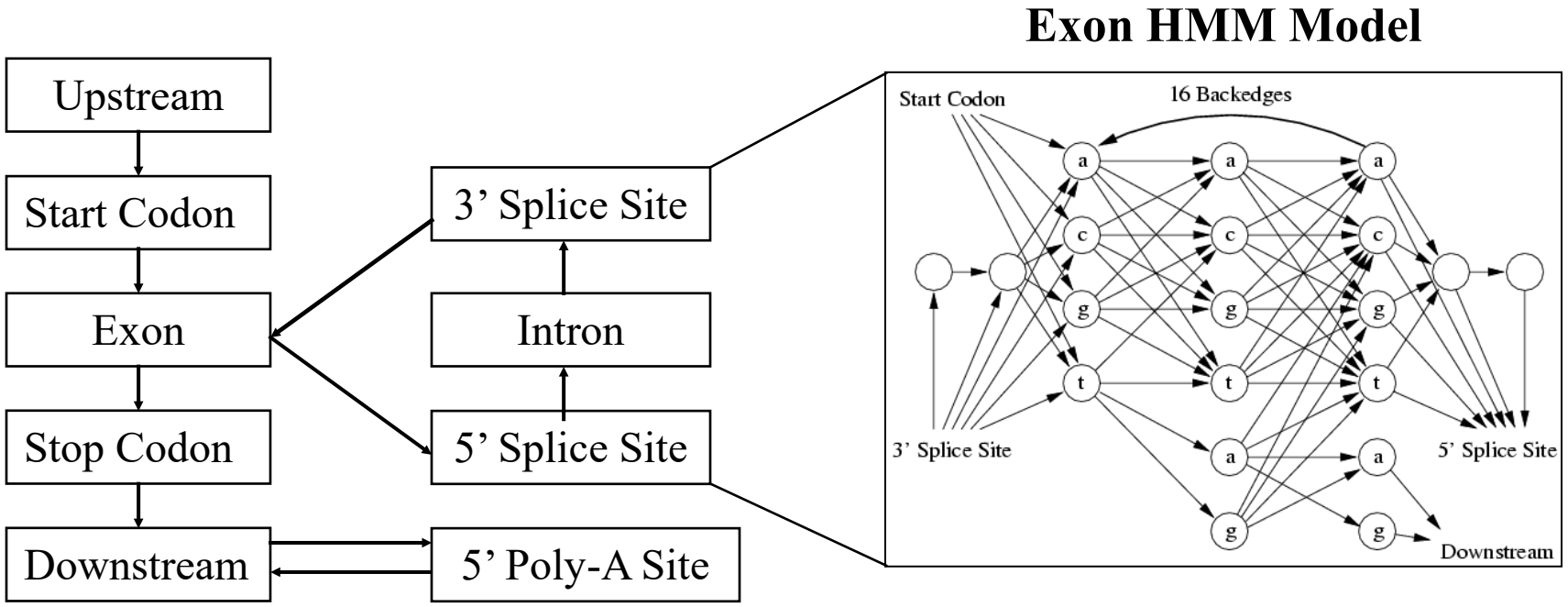
Vyhledávače eukaryotických genů

Využívají integrované přístupy

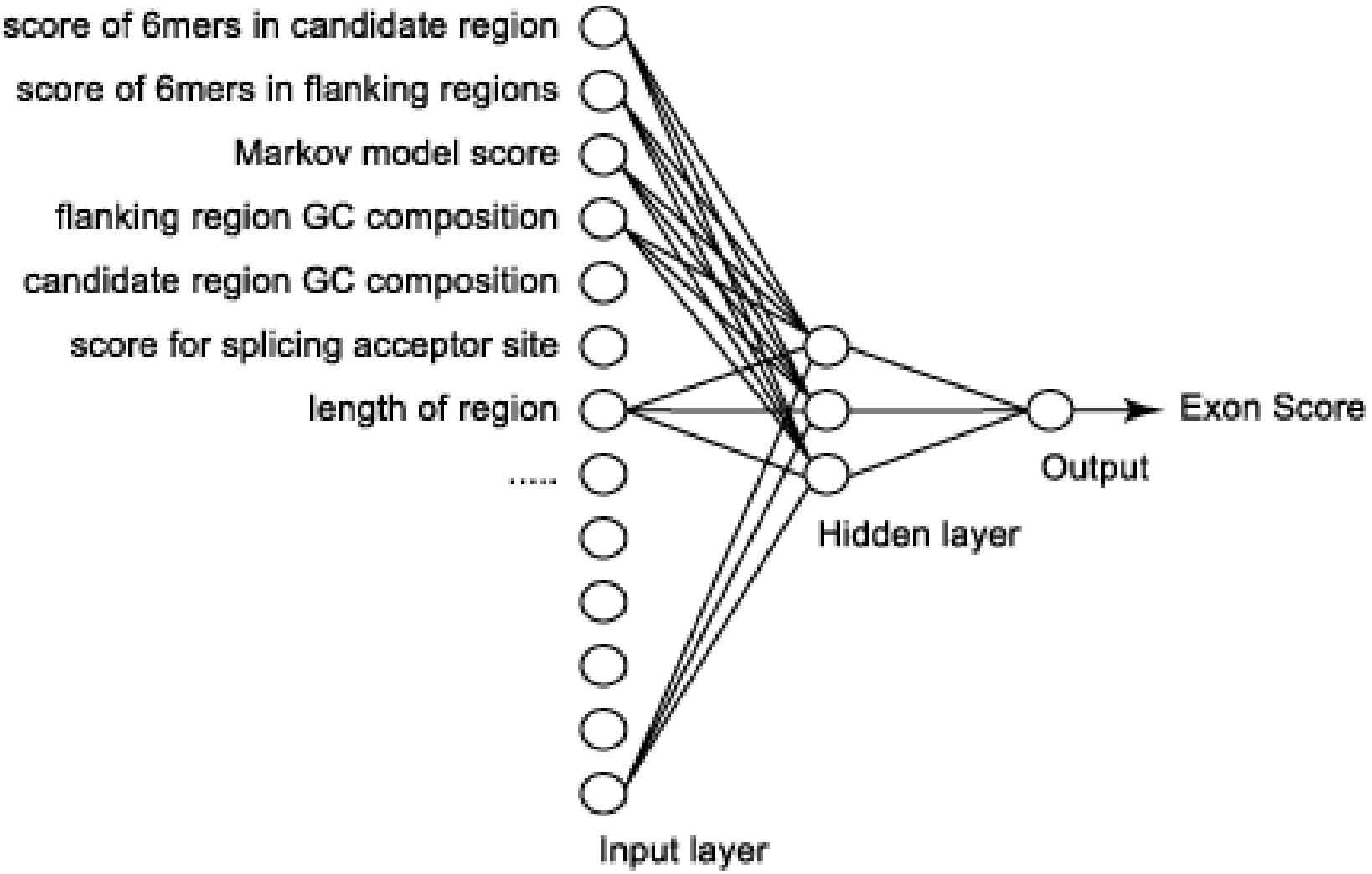
- **Genie** používá informace ze známých genů a odhaduje, které oblasti genomu pravděpodobně obsahují nové geny
- **Fgenes** je vhodný pro hledání exonů a stanovení struktury genů
- **Genscan** přehledný vyhledávač využívá integrované přístupy
- **Veil** komplexní vyhledávač exonů a intronů a míst sestřihu, HMM modely

Veil komplexní vyhledávač exonů a intronů a míst sestřihu, HMM modely

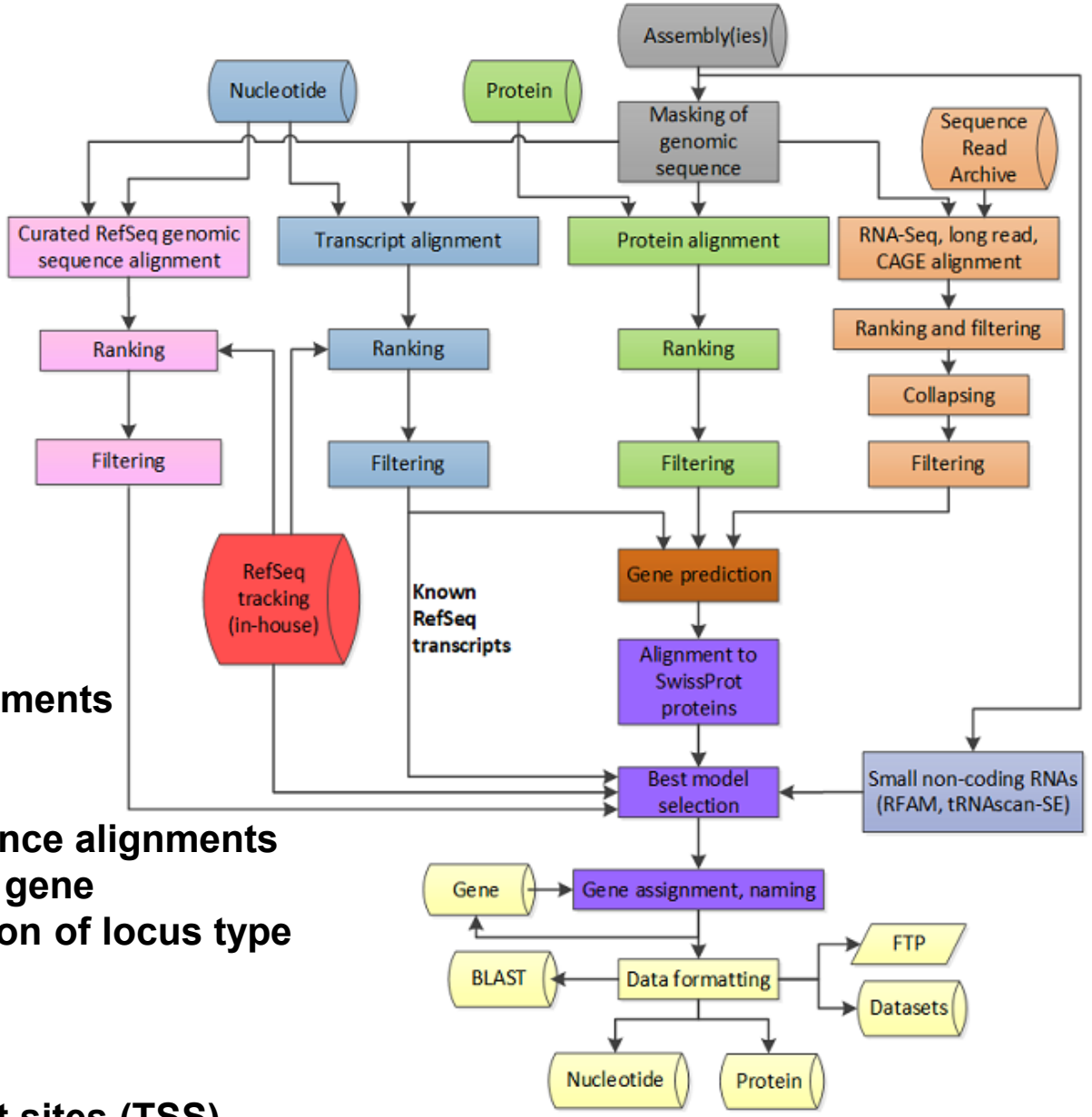
- Obsahuje 9 skrytých modulů, z nichž každý je komplexní Markovův model



Predikce eukaryotických genů
GRAIL II: využívá neuronové sítě



EGAP - NCBI Eukaryotic Genome Annotation Pipeline



Source of genome assemblies
Masking
RNA-Seq read alignments
Transcriptomics long read alignments
Protein alignments
Model prediction
Curated RefSeq genomic sequence alignments
Choosing the best models for a gene
Protein naming and determination of locus type
Gene Ontology
Assignment of GeneIDs
Annotation of small RNAs
Annotation of transcription start sites (TSS)

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.

Evaluace vyhledávačů genů

- Citlivost versus specificita
- Musí být optimalizovány / „trénovány“ pro specifický organizmus
- Citlivost
  - Kolik genů bylo nalezeno?
- Specificita
  - Kolik predikovaných genů představuje skutečné geny?
- Odpověď nám poskytne srovnání výsledků s transkriptomickými a proteomickými daty