

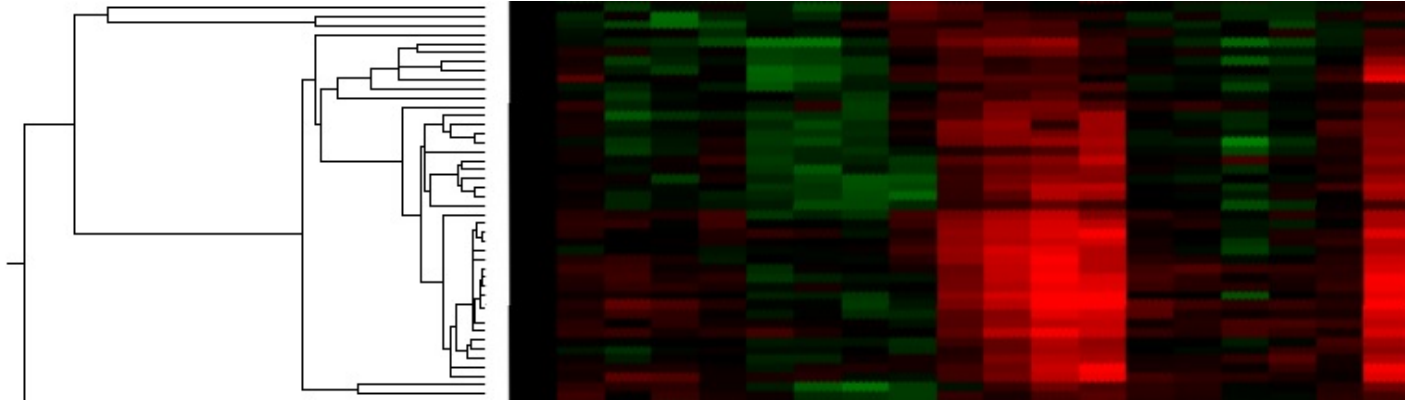
Oznamy

- Body z DÚ 1 budú časom v Moodle
- DÚ 2 bude na stránke, odovzdať do 29.11.
- Stretnutia journal klubu do 22.11.

Regulácia génovej expresie

Broňa Brejová

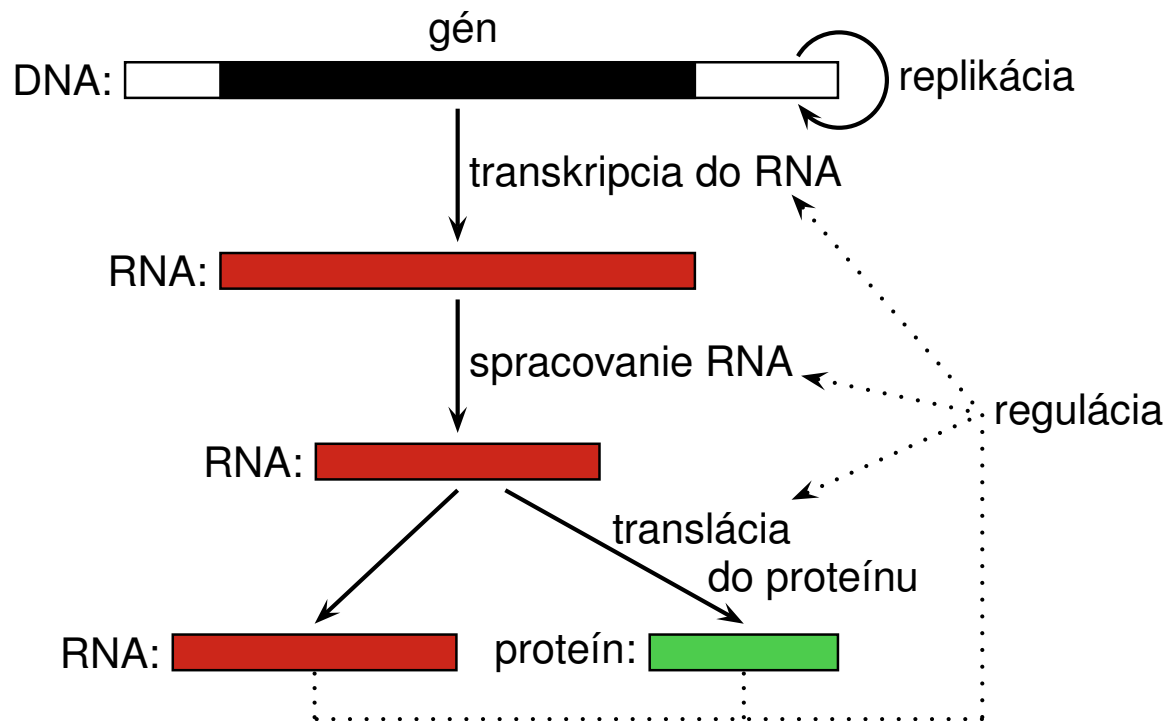
10.11.2022



Aká informácia je uložená v DNA?

Gény: Predpisy na tvorbu proteínov a funkčných RNA molekúl.

Riadenie ich expresie: kedy a koľko sa má tvoriť.



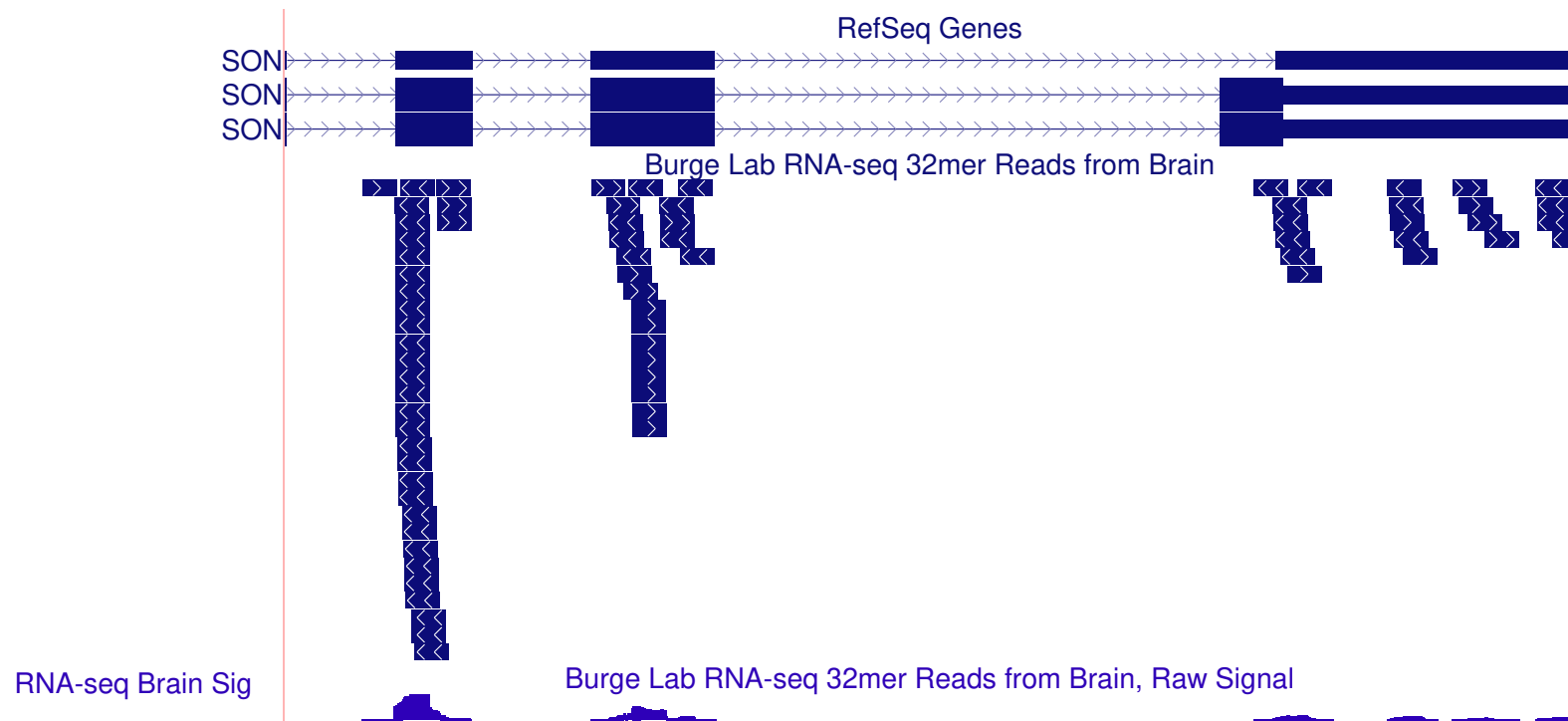
Regulácia na úrovni transkripcie, spracovania, translácie, posttranslačných modifikácií, ...

Ciele

- Zistiť, za akých podmienok je daný gén exprimovaný (súvisí s funkciou génu)
- Ktoré gény ho regulujú
- Detaily regulačného mechanizmu (väzobné miesta, zmeny v množstve expresie, ...)

Technológia: RNA-seq

Sekvenujeme RNA extrahovanú z bunky,
mapujeme na genóm, hĺbka pokrytia zodpovedá úrovni expresie,
opakujeme za rôznych podmienok



Používa sa aj staršia technológia microarray (expression array)

Príklad dát o expresii

Pomer expresie génu v meranej a kontrolnej vzorke fg/bg

	15min	30min	1hod	2hod	4hod	...
W95909	0.72	0.1	0.57	1.08	0.66	
AA045003	1.58	1.05	1.15	1.22	0.54	
AA044605	1.1	0.97	1	0.9	0.67	
W88572	0.97	1	0.85	0.84	0.72	
AA029909	1.21	1.29	1.08	0.89	0.88	
AA059077	1.45	1.44	1.12	1.1	1.15	
...						

Iyer et al 1999 The Transcriptional Program in the Response of Human Fibroblasts to Serum

Fibroblast: bunky generujúce zložky medzibunkovej hmoty

pre delenie potrebujú rastové faktory dodávané ako "fetal bovine serum"

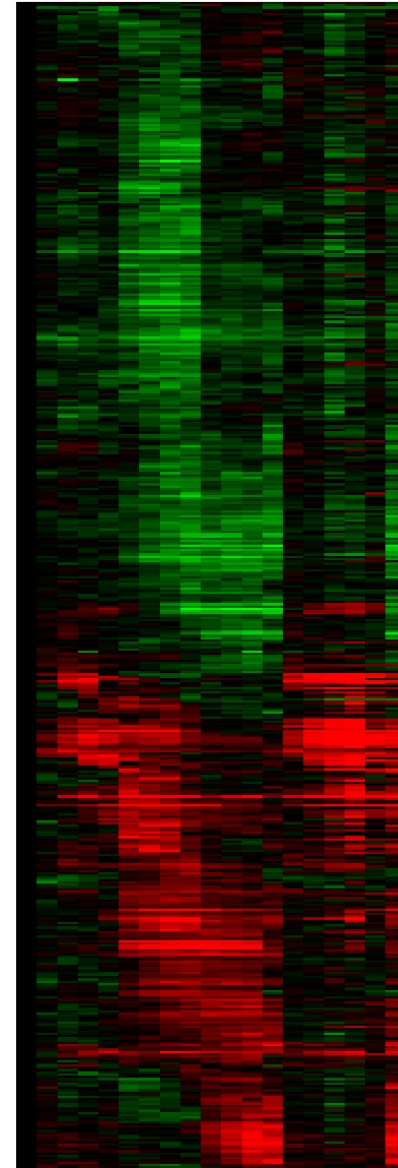
Vizualizácia

Červená: $fg > bg$

Zelená: $fg < bg$

517 génov (z 8600, ktoré boli merané)

19 experimentov



Dnes: iný typ dát

Všetky ostatné prednášky: pracujeme so sekvenciami

- zostavovanie genómov
- zarovnávanie sekvencií
- hľadanie génov
- fylogenetické stromy, populačná a komparatívna genomika
- štruktúra a funkcia proteínov a RNA

Dnes: tabuľka čísel

- typické dáta v štatistike
- možno použiť všeobecné metódy štatistiky, strojového učenia

Prvá sada problémov: predspracovanie dát

- Zarovnávanie čítaní na genóm
- Počet čítaní alebo fragmentov DNA zarovnaných ku každému génu
- Normalizácia, aby sme mali porovnateľné výsledky z rôznych experimentov
- Normalizácia vzhľadom na dĺžku a iné vlastnosti génu

Merania expresie nie veľmi presné, veľa šumu, rôzne zdroje chýb

Jednoduchý výsledok:

zoznam výrazne podexprimovaných / nadexprimovaných génov

napr. $fg / bg > 2$, resp. $fg / bg < 0.5$

často na ďalšiu analýzu používame iba tieto

Zhlukovanie (clustering)

Ciel': nájsť skupiny génov s podobným profilom expresie.

Ak veľa génov v skupine má rovnakú funkciu,
ďalšie gény asi robia to isté

Meranie podobnosti profilov: napr. Pearsonov korelačný koeficient

Profil génu 1: x_1, x_2, \dots, x_n , priemer \bar{x}

Profil génu 2: y_1, y_2, \dots, y_n , priemer \bar{y}

$$C(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Číslo od -1 do 1, 1 pre lineárne korelované dáta

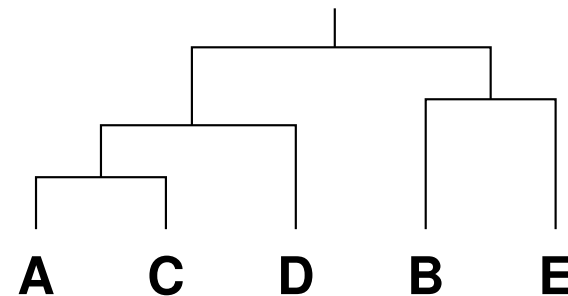
Vzdialenosť $d(x, y) = 1 - C(x, y)$

Aj iné možnosti, napr. Euklidovská vzdialenosť

Hierarchické zhlukovanie

- Podobné na metódu spájania susedov vo fylogenetických stromoch
- Začneme s každým génom v samostatnej skupinke
- Nájdeme dve najbližšie skupinky a spojíme ich do jednej
- Opakujeme, kým nie sú všetky gény spolu
- Vzdialenosť skupiniek: napr. vzdialenosť najbližších génov z jednej a druhej, alebo priemer vzdialeností cez všetky páry
- Výsledkom je strom zobrazujúci postupnosť spájania


	A	B	C	D	E
gén A	0	0.6	0.1	0.3	0.7
gén B	0.6	0	0.5	0.5	0.4
gén C	0.1	0.5	0	0.6	0.6
gén D	0.3	0.5	0.6	0	0.8
gén E	0.7	0.4	0.6	0.8	0



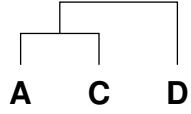
Hierarchické zhlukovanie - príklad

Vzdialenosť skupiniek ako vzdialenosť najbližších génov z jednej a druhej (single linkage clustering)

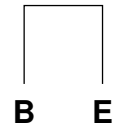
gén	A	B	C	D	E
gén A	0	0.6	0.1	0.3	0.7
gén B	0.6	0	0.5	0.5	0.4
gén C	0.1	0.5	0	0.6	0.6
gén D	0.3	0.5	0.6	0	0.8
gén E	0.7	0.4	0.6	0.8	0



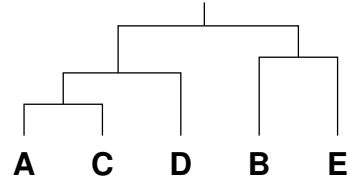
	A+C	B	D	E
A+C	0	0.5	0.3	0.6
B	0.5	0	0.5	0.4
D	0.3	0.5	0	0.8
E	0.6	0.4	0.8	0



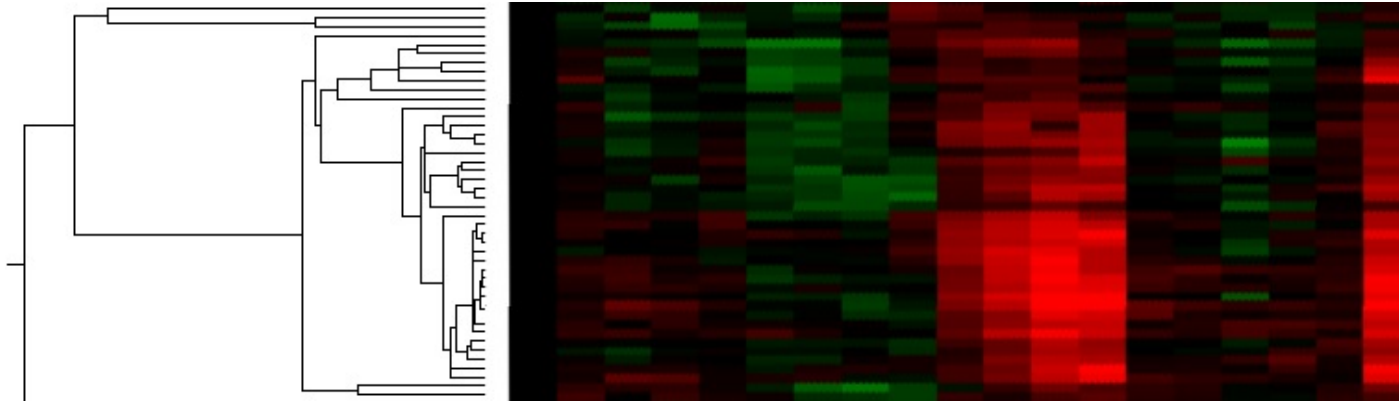
	A+C+D	B	E
A+C+D	0	0.5	0.6
B	0.5	0	0.4
E	0.6	0.4	0



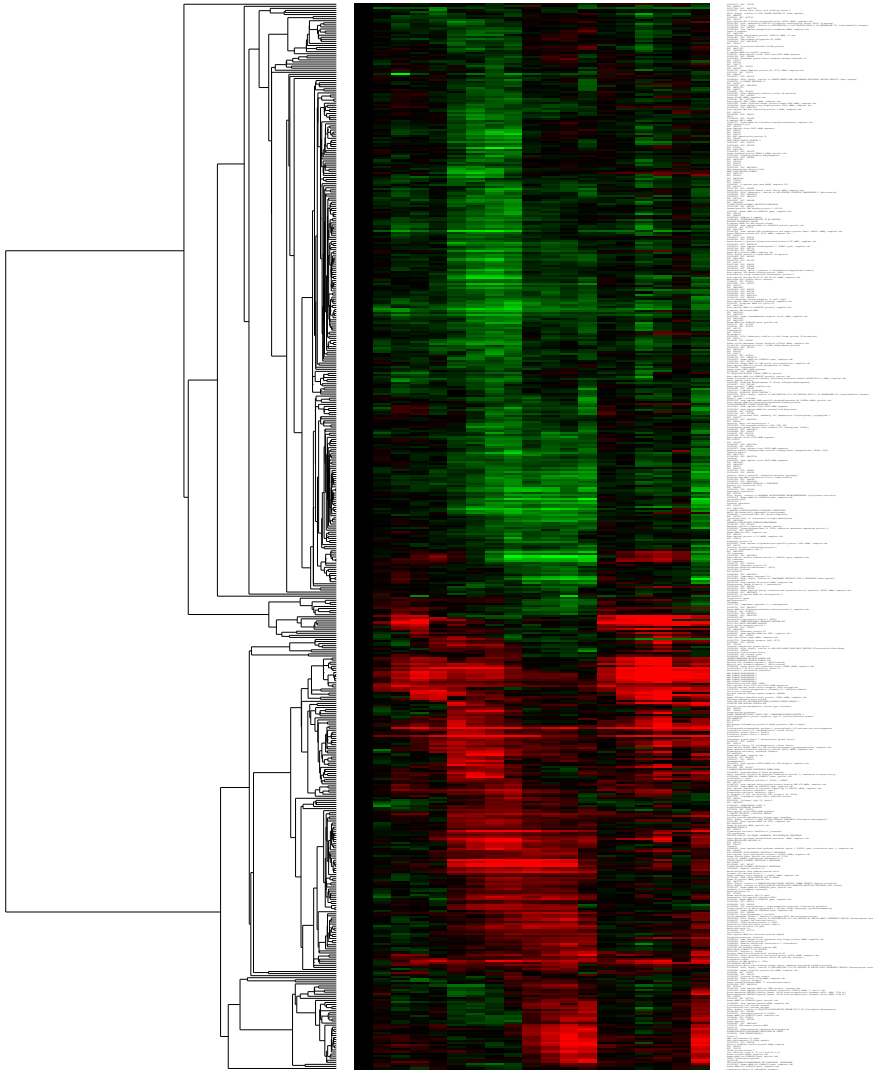
	A+C+D	B+E
A+C+D	0	0.5
B+E	0.5	0



Príklad: časť dát o expresii



Zhlukovanie tiež pomáha vizualizácii dát,
podobné gény sa dostanú ku sebe

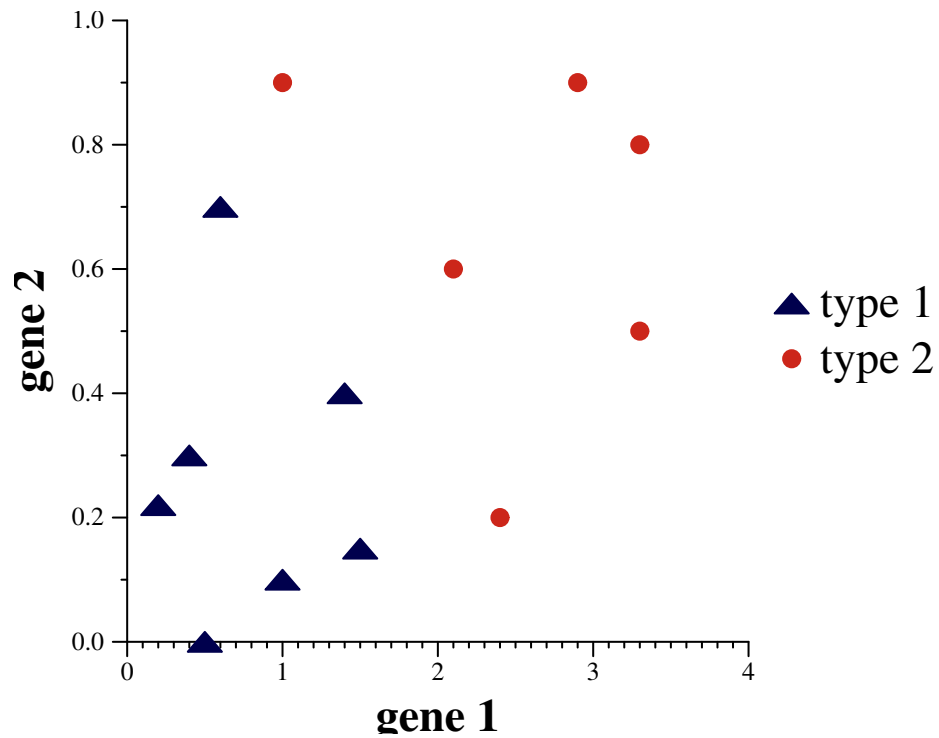


Klasifikácia

- Typický problém v strojovom učení
- Chceme odlíšiť napr. rôzne typy tumorov podľa expresie génov
- Máme nejaké príklady, kde vieme expresiu aj typ tumoru
- Chceme napr. nájsť vzorec, ktorý nám z expresie vyráta záporné číslo pre typ 1, kladné číslo pre typ 2.
- Vopred si vyberieme si typ vzorca s neznámymi parametrami (trieda hypotéz)
- Na tréningových dátach hľadáme hodnoty parametrov, pre ktoré vzorec najlepšie funguje
- Fungovanie vzorca testujeme na testovacích dátach (nepoužité na tréning)
- Hotový vzorec použijeme na dáta s neznámym typom

Jednoduchý príklad: expresia 2 génov

Trénovacie dáta so známym typom:



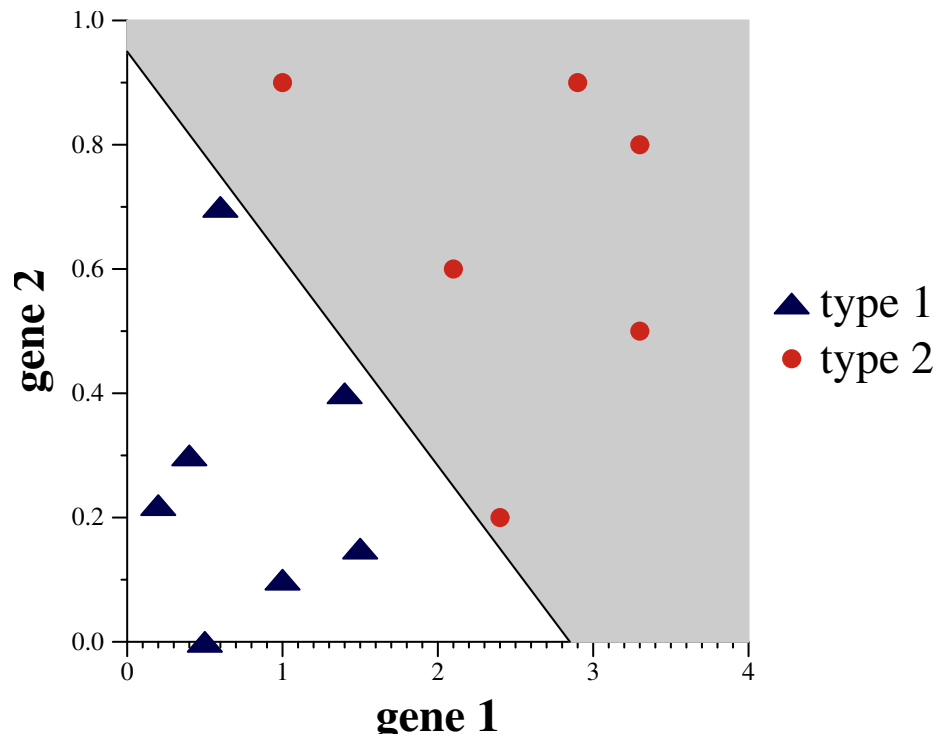
Typ vzorca: lineárne funkcie (lineárny diskriminant)

tumor typu 1 ak $ax + by + c < 0$

Hľadáme a, b, c také, aby na trénovacích dátach predpovedal dobre

Jednoduchý příklad: expresia 2 génov

Výsledný vzorec:



$$a = 1, b = 3, c = -2.85$$

tumor typu 1 ak $x + 3y - 2.85 < 0$

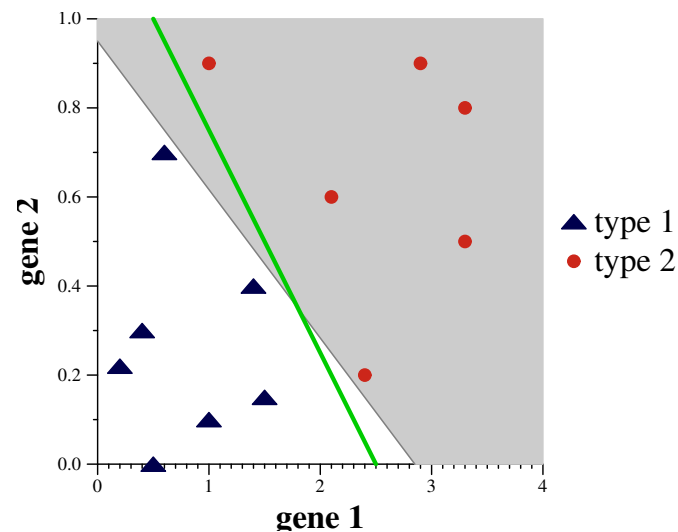
Populárne techniky na klasifikáciu

Logistic regression, logistická regresia:

lineárny diskriminátor, vracia pravdepodobnosť jednotlivých tried, dobre známa štatistická metóda.

Support vector machines

(SVM): hľadanie lineárneho diskriminátora s nulovou tréningovou chybou, ktorý je najďalej od všetkých tréningových dát.



Dá sa zovšeobecniť na nelineárne funkcie priemetom vektorov do väčšieho priestoru.

Populárne techniky na klasifikáciu

Neurónové siete:

“neuróny” poprepájané “synapsami”,
každý neurón na výstupe váhovaný priemer vstupov.

Bayesovské siete:

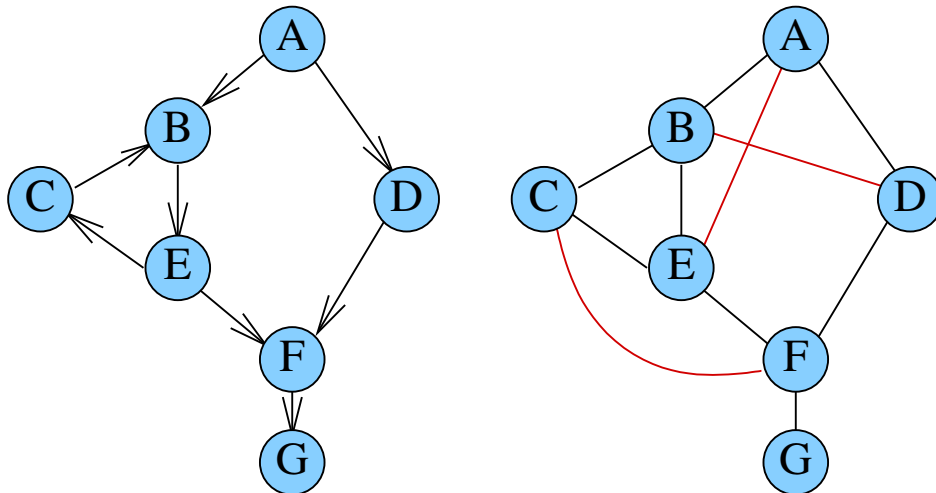
pravdepodobnostný model generujúci náhodné expresie
typ tumoru je tiež náhodná premenná, ktorej hodnotu nepoznáme
podobne ako stav v HMM

Regulačné siete z profilov expresie

Vstup: Profily expresie génov (napr. séria RNA-seq experimentov), možno so známymi podmienkami (časové rady, delečný mutant)

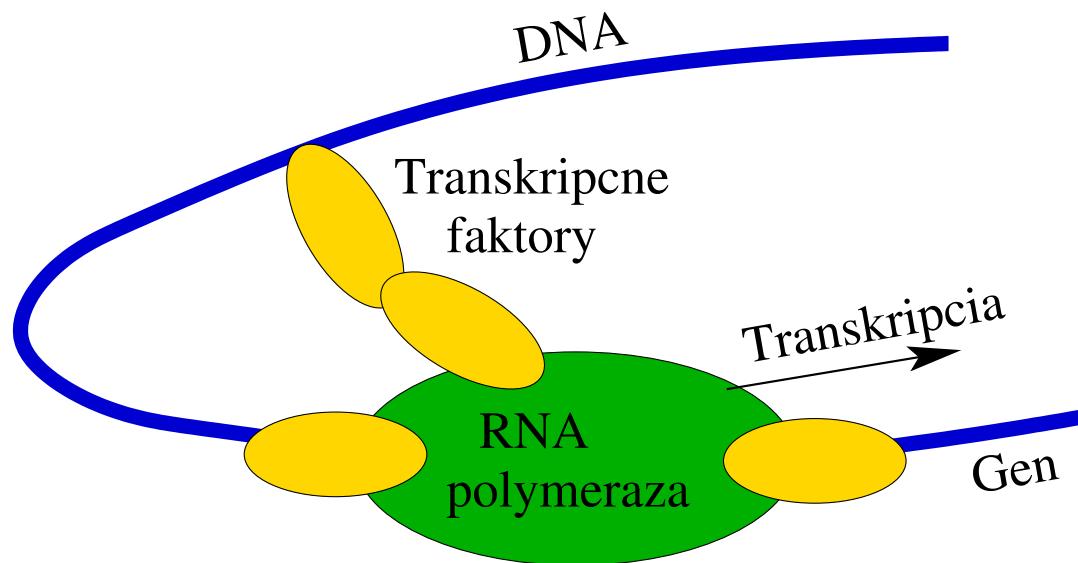
Výstup: regulačná sieť, vrcholy sú gény, orientovaná hrana $A \rightarrow B$, ak A reguluje B

Podobnosť profilov expresie nám môže dať neorientované hrany. Chceme vylúčiť hrany, ktoré vznikli tranzitivitou a správne orientovať hrany (ťažký problém)



Transkripčné faktory (TF)

Regulácia začatia transkripcie pomocou transkripčných faktorov:
proteíny viažúce DNA, pomáhajú pritiahnúť RNA polymerázu



Človek má vyše 2000 TF-ov

Môžu zvyšovať alebo znižovať mieru expresie,

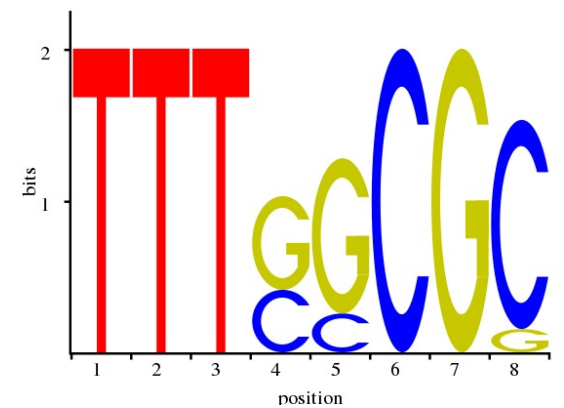
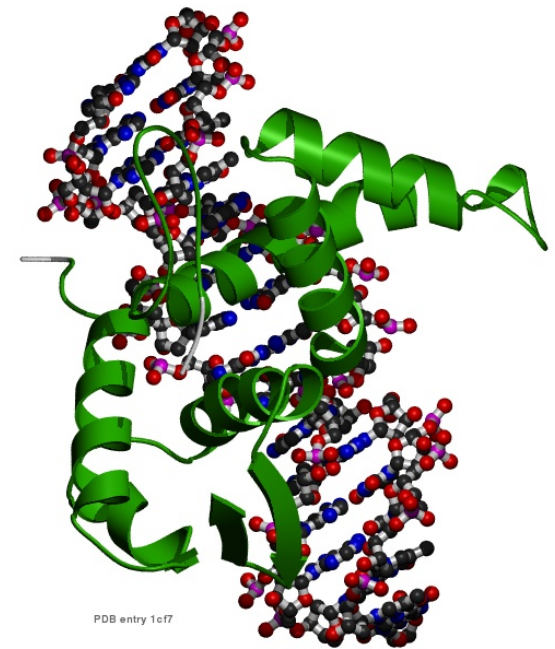
fungovať v skupinách

Príklad: transkripčný faktor E2F1

- Reguluje bunkový cyklus
- Viaže TTTCCCGC alebo TTTGCGGC, prípadne ďalšie varianty

A	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	4	2	10	0	9
G	0	0	0	6	8	0	10	1
T	10	10	10	0	0	0	0	0

- Sekvencie DNA, na ktoré sa viaže určitý TF chceme **reprezentovať** ako sekvenčný **motív** a hľadať **ďalšie výskyty** v genóme



Reprezentácia väzobných motívov

Reťazec s nezhodami (konsenzus):

motív je reťazec, výskyty môžu mať vopred ohraničený počet nezhôd

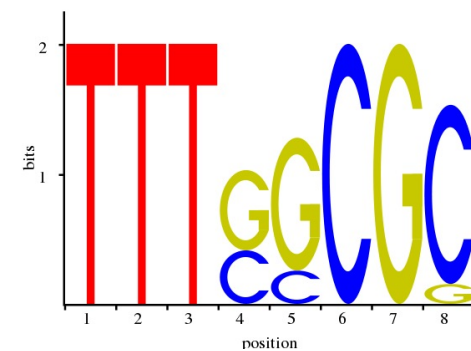
Príklad: motív TTTGGCGC + 1 nezhoda

TTTGGCGC, TT**A**GGCGC, TTTG**C**CGC sú výskyty motívu

TTT**C**CGC nie je výskyt

Zostavenie motívu: napr. vezmi najčastejšie písmeno na každej pozícii

A	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	4	2	10	0	9
G	0	0	0	6	8	0	10	1
T	10	10	10	0	0	0	0	0



Reprezentácia väzobných motívov 2

Regulárny výraz:

niektoré pozície motívu dovoľujú výber z viacej možností

[GC] znamená pozíciu, na ktorej môže byť G alebo C

N znamená hociktorú bázu

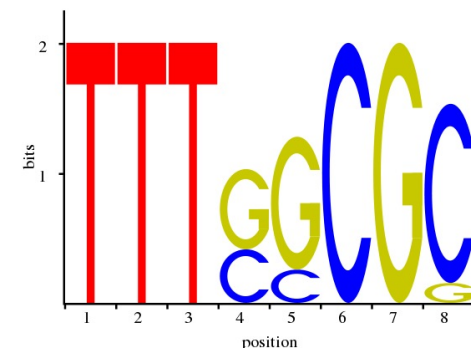
Príklad: motív TTT[CG][CG]CGC

TTTGGCGC, TTT**CC**CGC, TTTG**C**CGC sú výskyty motívu

TT**A**GGCGC nie je výskyt

Zostavenie motívu: povol' najčastejšie bázy na každej pozícii

A	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	4	2	10	0	9
G	0	0	0	6	8	0	10	1
T	10	10	10	0	0	0	0	0



Reprezentácia väzobných motívov 3

Position specific scoring matrix (PSSM, PWM):

skórovacia matica, skóre pre každú bázu na každej pozícii

Výskyty dosahujú skóre väčšie ako číslo T

Príklad: $T = 8$

A	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0
C	-1.6	-1.6	-1.6	0.6	0.0	1.5	-1.6	1.4
G	-1.6	-1.6	-1.6	1.0	1.3	-1.6	1.5	-0.5
T	1.1	1.1	1.1	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0

TTT**CC**GC je výskyt: $1.1+1.1+1.1+0.6+0.0+1.5+1.5+1.4=8.3$

TTTGG**C**G je výskyt: $1.1+1.1+1.1+1.0+1.3+1.5+1.5-0.5=8.1$

TT**A**GGCGC nie je: $1.1+1.1-2.0+1.0+1.3+1.5+1.5+1.4=6.4$

Zostavenie matice z frekvencií: budúca prednáška

Hľadanie výskytov motívu v genóme

- Zoberieme motív v niektorej reprezentácii:
 - Konsenzus, napr. TTTGGCGC + 1 nezhoda
 - Regulárny výraz, napr. TTT[CG][CG]CGC
 - Skórovacia matica, napr. prah $T = 8$ a matica:

A	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0
C	-1.6	-1.6	-1.6	0.6	0.0	1.5	-1.6	1.4
G	-1.6	-1.6	-1.6	1.0	1.3	-1.6	1.5	-0.5
T	1.1	1.1	1.1	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0

- Pre každú pozíciu v genóme testujeme, či je výskytom motívu
- Výskyty sú potenciálne väzobné miesta

Hľadanie výskytov motívu v genóme – problém

- Hľadanie motívu v genóme: skús každú pozíciu, či je výskytom
- Okrem **väzobných miest** často aj veľa **náhodných výskytov**
- Vieme spočítať E-hodnotu: koľko výskytov očakávame v náhodnej sekvencii
- Napr. TTT[CG][CG]CGC sa vyskytuje v priemere raz za 30 000 báz
- Na zlepšenie špecificity hľadáme
 - zhluky väzobných miest,
 - miesta podporené experimentálne,
 - evolučne zachované
- Databázy motívov, napr. TRANSFAC, JASPAR

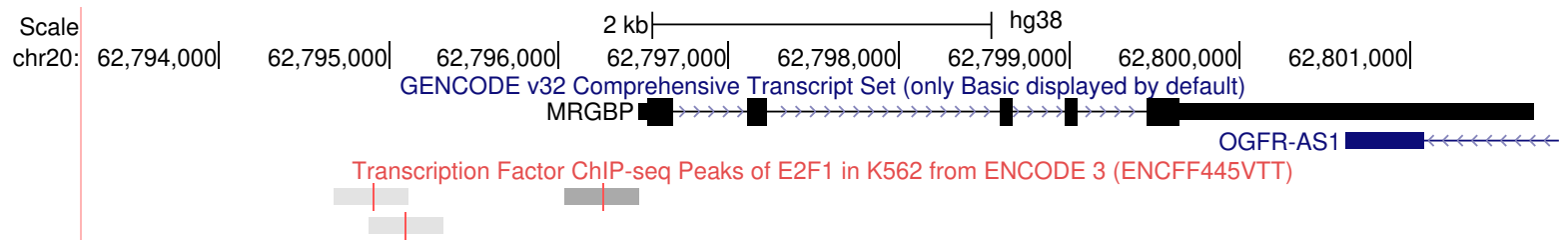
Ako nájsť väzobné miesta experimentálne?

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Pomocou protilátky (antibody) na špecifický transkripčný faktor zistí, kde približne sa tento faktor viaže:

- Väzba medzi TF a DNA sa spevní formaldehydom
- DNA sa naseká na kusy
- Kusy, na ktorých je TF, sa zachytia na protilátke
- DNA sa izoluje a sekvenuje (**ChIP-seq**)

Problém: zistíme len približnú polohu väzobného miesta



Ako nájsť motívy výpočtovými metódami?

... ak nemáme niekoľko príkladov väzobného miesta

- Máme skupinu sekvencií, kde každá obsahuje väzobné miesto toho istého TF, ale väzobné preferencie TF nie sú známe
- Snažíme sa nájsť **čo najšpecifickejší** motív, ktorý sa vyskytuje vo všetkých týchto sekvenciách resp. sa vyskytuje častejšie, ako by sme očakávali.
- **V súčasnosti:** zoberieme oblasti detegované pomocou ChIP-seq okolo väzobných miest, nájdený motív použijeme na presnejšie určenie polohy väzby TF
- **Pôvodne:** zoberieme skupinu génov s podobným profilom expresie a teda možno regulovaných tým istým TF, hľadáme motív v oblastiach pred týmito génmi

Príklad: Consensus Pattern Problem (CPP)

Jednoduchá formulácia problému hľadania motívov

Vstup: dĺžka motívu L , reťazce (sekvencie) S_1, S_2, \dots, S_k

Výstup: motív (reťazec) M dĺžky L

a výskyt motívu v každom S_i (reťazec s_i dĺžky L)

také, že celkový počet nezhôd medzi M a s_i je najmenší možný

Príklad:

Vstup: CAAACAT, AGTAGC, TAACCA, TCTCCTC, $L = 4$

Výstup: motív TAAC

výskyty a nezhody AAAC 1, TAGC 1, TAAC 0, TCTC 2

celkový počet nezhôd 4

Riešenie CPP

NP-ťažký problém

- **Idea 1:** Vyskúšaj všetky možné motívy dĺžky L

Problém: Nepraktické — prečo?

- **Idea 2:** Vyskúšaj všetky možné podreťazce dĺžky L reťazcov S_1, \dots, S_k

Problém: Nemusí fungovať — prečo?

Ale dá sa dokázať, že cena riešenia bude najviac dvojnásobok optima (2-aproximačný algoritmus)

- **Ďalšie vylepšenie:** Skúšame všetky konsenzus sekvencie ℓ podreťazcov.
PTAS (polynomial-time approximation scheme)

Príklad:

Vstup: $L = 4$

CAAACAT,

AGTAGC,

TAACCA,

TCTCCTC

Výstup:

motív TAAC

výskyty a nezhody

AAAC 1,

TAGC 1,

TAAC 0,

TCTC 2

spolu 4 nezhody

Praktickejší prístup k hľadaniu motívov

Pravdepodobnostný model generujúci sekvenciu S pomocou matice frekvencií báz v motíve W a frekvencie báz q mimo motívu

A	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
C	0.01	0.01	0.01	0.39	0.19	0.97	0.01	0.01	0.89
G	0.01	0.01	0.01	0.59	0.79	0.01	0.97	0.97	0.09
T	0.97	0.97	0.97	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

$$q(A) = 0.3, q(C) = 0.2, q(G) = 0.2, q(T) = 0.3$$

Pozícia motívu v S sa zvolí náhodne,

každá báza sa vygeneruje z q alebo z jedného stĺpca W

Tento model definuje rozdelenie $\Pr(S | W)$.

Hľadanie motívov cez pravdepodobnostné modely

Vstup: dĺžka motívu L , sekvencie S_1, S_2, \dots, S_k , frekvencie q

Výstup: spoločný motív ako matica frekvencií W maximalizujúca vierohodnosť dát $\Pr(S_1|W) \cdot \dots \cdot \Pr(S_k|W)$

- Ťažký problém, používajú sa heuristické algoritmy
- Napríklad EM (expectation maximization)
- Lokálna optimalizácia, ktorá konverguje k lokálnemu maximu vierohodnosti
- Softvér: MEME

Schéma algoritmu EM

- **Inicializácia:**

Zvoľ si počiatočnú maticu W

(napr. zostavenú podľa jedného okna dĺžky L)

- **Iterácia:**

1. Prirad' každej pozícii j v sekvencii S_i váhu $p_{i,j}$, ktorá zodpovedá pravdepodobnosti, že na pozícii $S_i[j]$ začína výskyt motívu W
2. Spočítaj W zo všetkých možných výskytov v S_1, \dots, S_k váhovaných podľa $p_{i,j}$

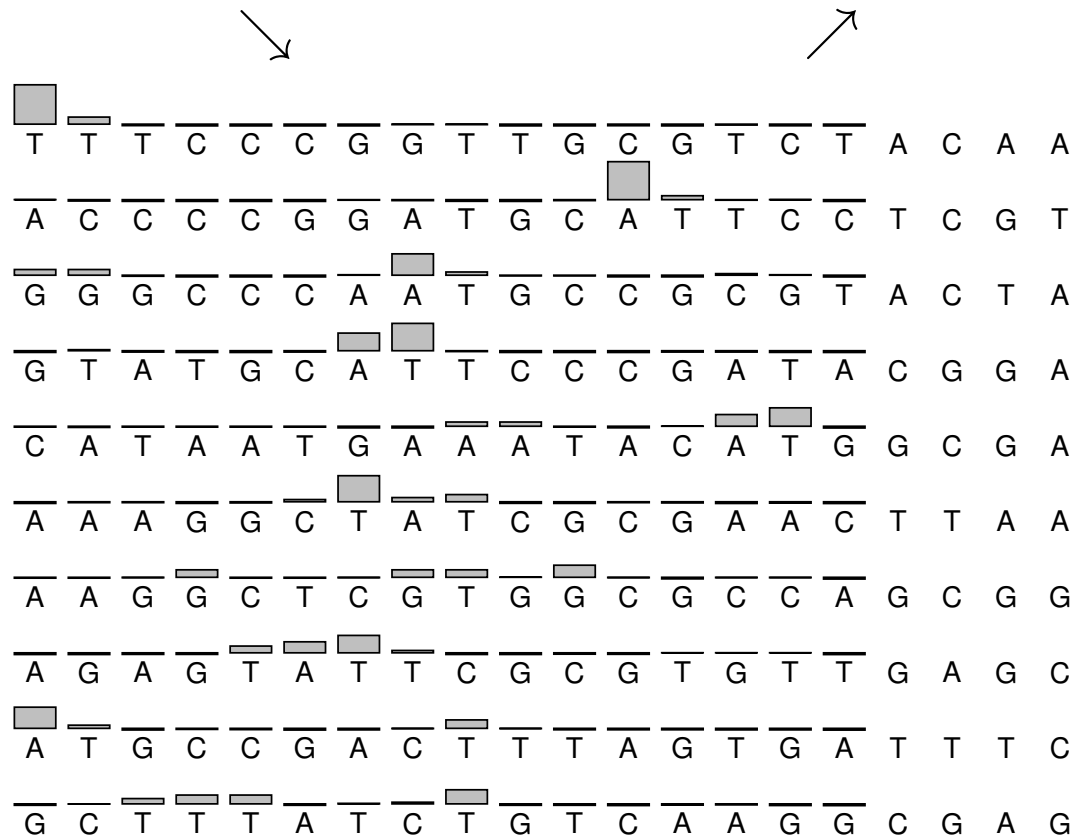
Iterácie zvyšujú vierohodnosť dát, kým nedôjde ku konvergencii.

Skúšame veľa krát z rôznych počiatočných W

Príklad algoritmu EM

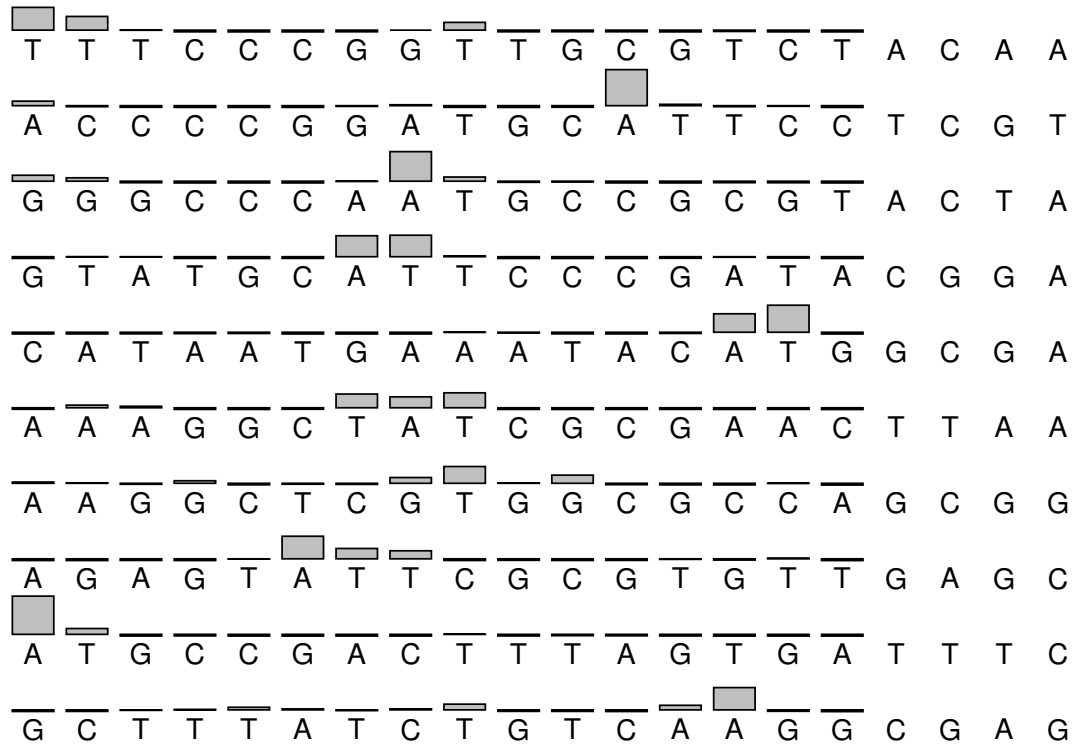
A	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
C	0.10	0.10	0.10	0.70	0.70
G	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
T	0.70	0.70	0.70	0.10	0.10

A	0.31	0.14	0.06	0.07	0.07
C	0.06	0.10	0.19	0.71	0.61
G	0.12	0.17	0.29	0.14	0.25
T	0.51	0.60	0.46	0.08	0.07



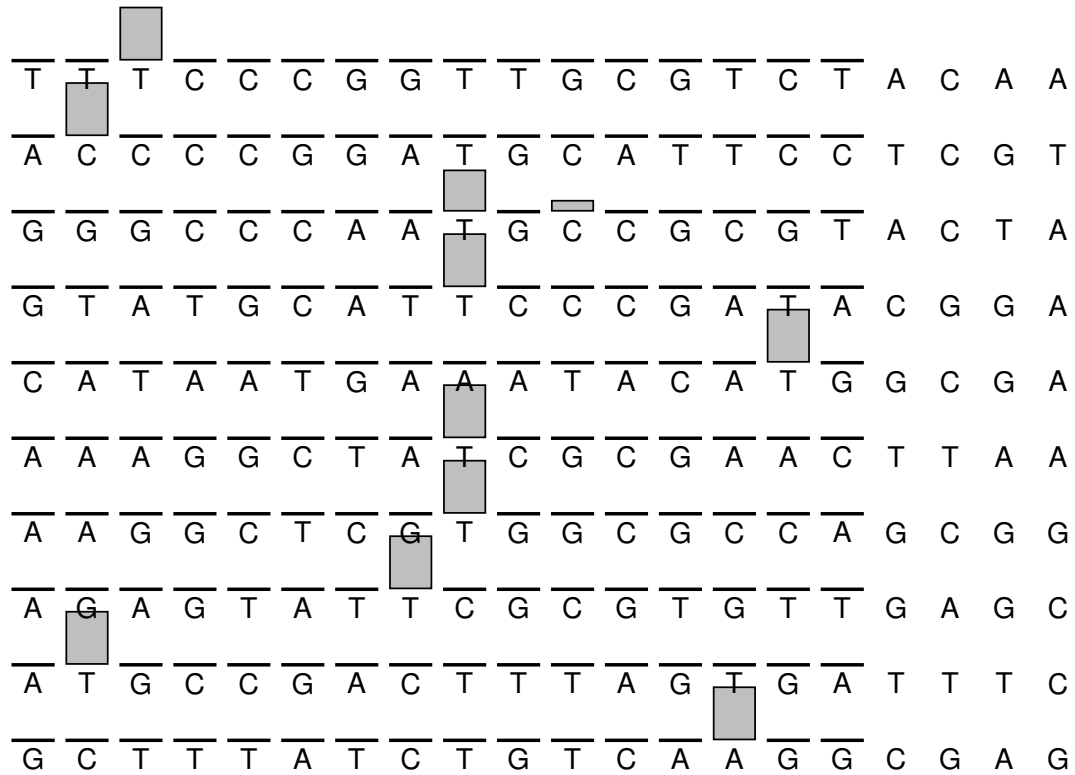
Príklad algoritmu EM: ďalšia iterácia

A	0.31	0.14	0.06	0.07	0.07	A	0.47	0.09	0.01	0.02	0.03
C	0.06	0.10	0.19	0.71	0.61	C	0.02	0.11	0.20	0.80	0.58
G	0.12	0.17	0.29	0.14	0.25	G	0.08	0.22	0.48	0.15	0.35
T	0.51	0.60	0.46	0.08	0.07	T	0.42	0.58	0.30	0.03	0.03



Príklad algoritmu EM: po 20 iteráciách

A	0.10	ϵ	ϵ	ϵ	ϵ
C	0.12	0.52	0.48	$1 - 3\epsilon$	ϵ
G	ϵ	0.48	0.52	ϵ	$1 - 3\epsilon$
T	0.78	ϵ	ϵ	ϵ	ϵ



Zhrnutie

- RNA-seq merá úroveň expresie pre všetky gény naraz, ale v dátach veľa šumu
- Zhlukovanie (clustering) nájde podobné gény, nepotrebujeme o dátach vopred nič vedieť (unsupervised learning)
- Klasifikácia môže rozlišovať napr. choroby podľa expresie, potrebuje dáta so známou odpoveďou (supervised learning)
- Dáta o expresii pomáhajú zostaviť regulačné siete
- Väzobné motívy môžeme reprezentovať rôznym spôsobom (reťazec, regulárny výraz, skórovacia matica)
- Tieto motívy nie sú dosť špecifické, okrem väzobných miest môžu mať aj ďalšie náhodné výskyty
- EM algoritmus na hľadanie nových motívov v sekvenciách