Motivos en el ADN

Bioinformática, 5-4-19

Basado en Kevin Yip-CSE-CUHK (Universidad china de Hong-Kong)

Señales en el ADN

- Hemos visto cómo determinar y comparar secuencias de ADN
- ¿Cómo podemos averiguar el **significado biológico** de estas secuencias de ADN?
- Queremos encontrar zonas interesantes de ADN, patrones repetidos: las **señales**
- De esas señales hoy nos centraremos en las **posiciones de unión** de proteínas al ADN

Señales en el ADN

- Para encontrar señales nos fijaremos sobre todo en **subcadenas frecuentes**
- Estas cadenas frecuentes **no tienen que ser idénticas** en todas las apariciones
- Eso complica mucho el problema informático

Hoy …

1. **¿Qué son los motivos en el ADN? ¿Qué son los TFBS?**
2. Representación de motivos
3. El problema de identificar motivos

Dejamos fuera el problema “similar” de encontrar señales en proteínas: Los **dominios**

Posiciones de unión

- Supongamos que una proteína se puede unir a ciertas posiciones de cada una de las siguientes secuencias:
  - AACCCGATACAGACGACCATTACGACC
  - GAGACGACATACATTACACCAA
  - CCGACTAAACCAGATACAGAGATTACAGCATAC
  - ACATCCATACAGACAAAAACATAGAGGGACGATT
- ¿Dónde se une la proteína?
  - Supuesto: La proteína reconoce un cierto patrón como posición de unión (debido a la forma y energía)

Posiciones de unión

- Sería más fácil si se conoce la posición de unión en una de las secuencias:
  - AACCCGATACAGACGACCATTACGACC
  - GAGACGACATACATTACACCAA
  - CCGACTAAACCAGATACAGAGATTACAGCATAC
  - ACATCCATACAGACAAAAACATAGAGGGACGATT

Posiciones de unión

- A partir del ejemplo, puede utilizar la alineación de secuencias u otros métodos para averiguar la posición de unión de las otras secuencias:
  - AACCCGATACAGACGACCATTACGACC
  - GAGACGACATACATTACACCAA
  - CCGACTAAACCAGATACAGAGATTACAGCATAC
  - ACATCCATACAGACAAAAACATAGAGGGACGATT
- Notemos que:
  - Los diferentes sucesos podrían ser ligeramente diferentes
  - Puede haber múltiples sitios de unión en una secuencia

Motivos

- En general, definimos motivos como patrones que
  1. aparecen con frecuencia
     - puede no ser exactamente el mismo en diferentes apariciones
     - Es poco probable que se produzca “por casualidad”. En otras palabras, están “**sobrerepresentados**”
  2. Por lo general, sus roles funcionales se han conocido o predicho
  3. Están evolutivamente conservados
- Hay muchos tipos de motivos

motivos de secuencia de ADN:

NAME	START	SITES	END	STRAND	MARGINAL SCORE
1	23	aaacgacgtaatgctacg	6	-	22.9
2	17	aaacgac.taat.ctacg	2	-	8.45
3	30	caacgaggta.tgcaacg	14	-	14.1
4	23	caaccacgtaatgcaacg	6	-	23.6
5	24	caaccacgtaatgcatag	7	-	17.5

Score: **51.1928**

logo with ssc

familias de ARN:

Fuentes de las imágenes: http://rosalind.info/media/problems/meme/logo1.png, Wikipedia, Rfam

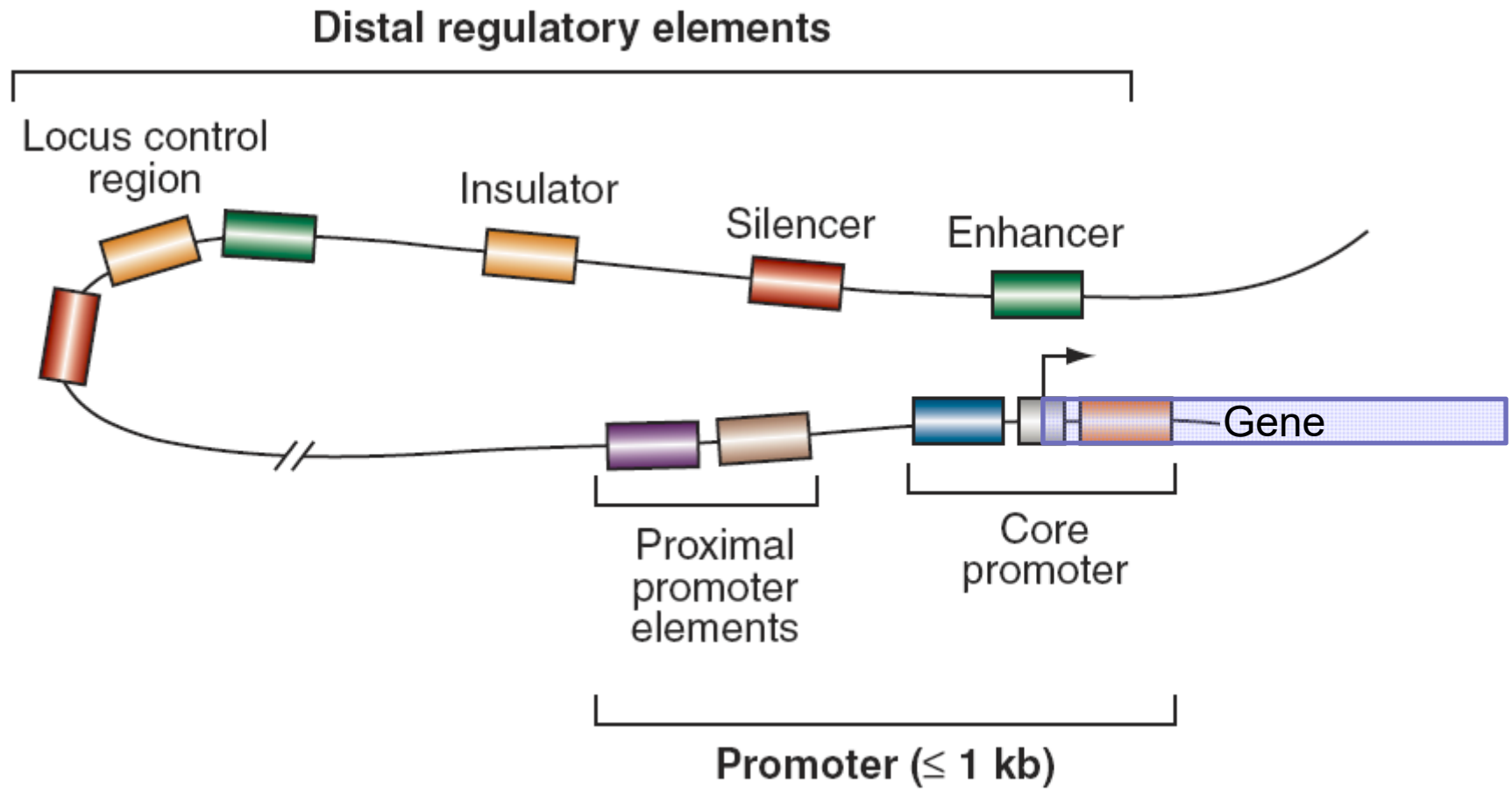
motivos de ADN: TFBS

- Veremos un tipo concreto de motivos:
  - Sitios de unión de factor de transcripción (TFBS), que son secuencias reguladoras de ADN cortas que frecuentemente aparecen en ubicaciones genómicas específicas. Algunas de ellas se conservan en todas las especies.

Las regiones reguladoras (TFBS)

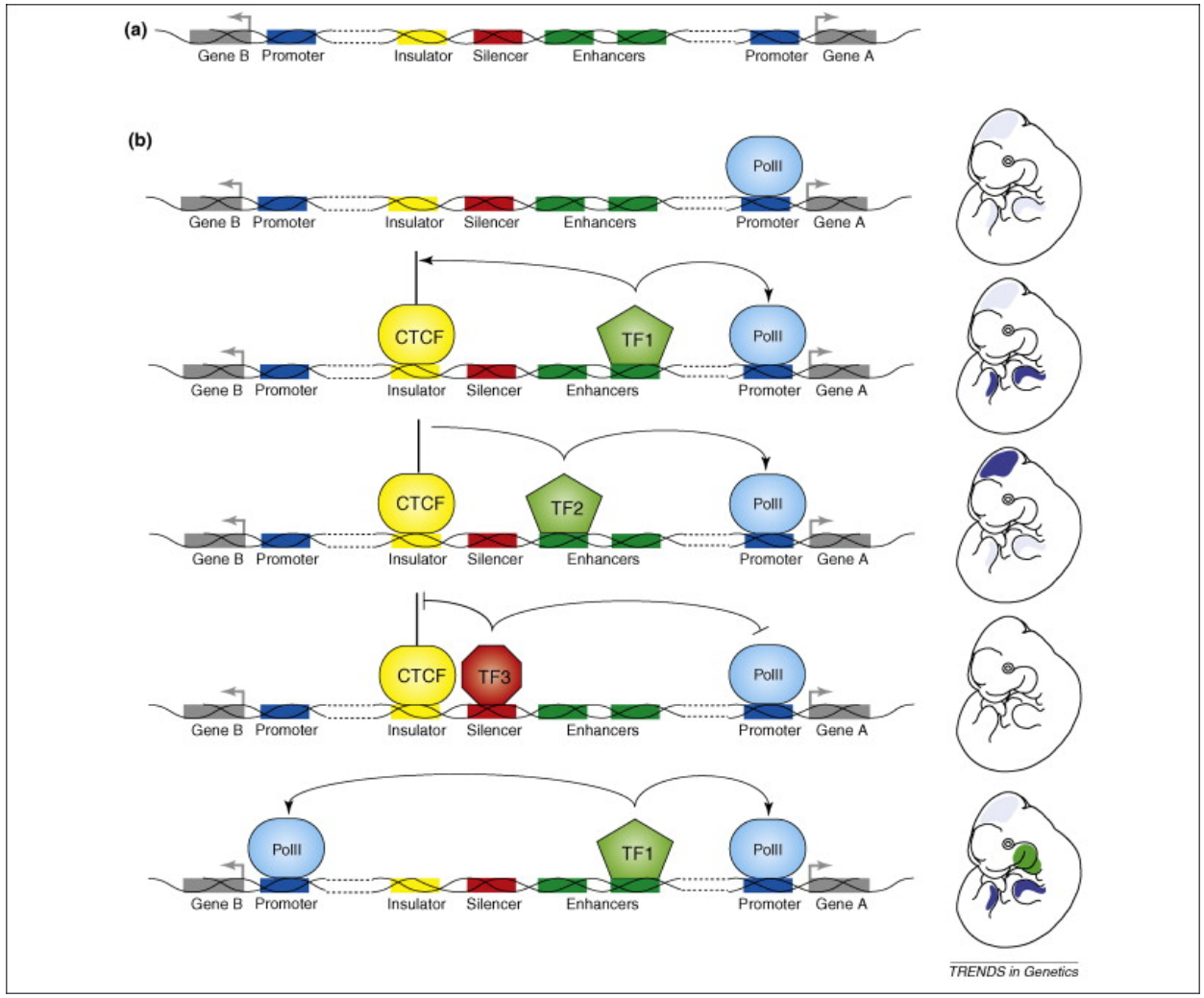
- Algunas proteínas (por ejemplo, los factores de transcripción) se unen a diferentes zonas de ADN para diferentes propósitos. Por ejemplo:
  - **Promotores** (alrededor del sitio de inicio de la transcripción): Para ayudar a la formación de la maquinaria de transcripción
  - **Potenciadores** (generalmente más lejos de un gen): Para mejorar la expresión de un gen
  - **Silenciadores**: para inhibir la expresión de un gen
  - **Aisladores**: Para marcar los límites de expresión

Las regiones reguladoras (TFBS)



Crédito de la imagen: Maston et al., *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7: 29-59, (2006)

Un ejemplo: circuito de regulación



Sin unión de TF: sólo expresión basal del gen A

Potenciador unido a TF1 (en las extremidades): elevación de la expresión del gen A

Potenciador unido a TF2 (en el cerebro): elevación de la expresión del gen A

Silenciador unido a TF3: la expresión del gen A está inhibida

Sin aislante unido a CTCF: la unión de TF1 en potenciador puede afectar tanto el gen A como al gen B

Crédito de la imagen: Sholtis y Noonan, *Trends in Genetics* 26 (3): 110-118, (2010)

TFBS

- ¿Dónde se une un factor de transcripción?
  - Donde el ADN es accesible
  - Donde hay señales especiales en el ADN (por ejemplo, la falta de metilación) y las proteínas que rodean (por ejemplo, modificaciones de las histonas)
  - Donde la estructura de ADN es adecuada
  - Donde la secuencia de ADN es adecuada ← **HOY**
    - **La región de ADN unida a un factor de transcripción se llama un sitio de unión a factor de transcripción (TFBS)**
    - Por lo general, bastante corto (por ejemplo, 6-10bp)

Hoy …

1. ¿Qué son los motivos en el ADN? ¿Qué son los TFBS?
2. **Representación de motivos**
3. El problema de identificar motivos

Representación de motivos

- ¿Cómo representar un motivo?
- Si el patrón está muy conservado, puede utilizarse una representación exacta
  - Por ejemplo, secuencia de consenso
- En la mayoría de los casos, se necesita capturar las diferencias por representaciones estadísticas
  - Por ejemplo, matriz de pesos
- Con una representación más compleja,
  - Se puede capturar más información
  - Implica más parámetros
    - Necesita más datos y tiempo para estimar valores de los parámetros
    - Es más propenso a exceso de ajuste

Representaciones (patrones)

- Supongamos que tenemos las siguientes secuencias TFBS:
  - CACAAAA
  - CACAAAT
  - CGCAAAA
  - CACAAAA
- Secuencia de consenso:
  - CACAAAA
  - Problema: La pérdida de información
- Secuencia degenerada con código IUPAC:
  - CRCAAAW

IUPAC nucleotide code	Base
A	Adenine
C	Cytosine
G	Guanine
T (or U)	Thymine (or Uracil)
R	A or G
Y	C or T
S	G or C
W	A or T
K	G or T
M	A or C
B	C or G or T
D	A or G or T
H	A or C or T
V	A or C or G
N	any base
. or -	gap (not used in motifs)

Ejemplo: http://conferences.computer.org/bioinformatics/CSB2003/NOTES/Liu_Color.pdf

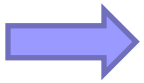
Representaciones (patrones)

- Supongamos que tenemos las siguientes secuencias TFBS:
  - CACAAAAA
  - CACAAA_T
  - CGCAAAAA
  - CACAAA_A
- Expresión regular (véase http://en.wikipedia.org/wiki/Regular_expression para la sintaxis)
  - P.ej, `C[AG]CA{3,4}[AT]`

Representaciones (patrones)

- Matrices de pesos por posición

```
ATGGCATG
AGGGTGCG
ATCGCATG
TTGCCACG
ATGGTATT
ATTGCACG
AGGGCGTT
ATGACATG
ATGGCATG
ACTGGATG
```



	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.9	0.0	0.0	0.1	0.0	0.8	0.0	0.0
C	0.0	0.1	0.1	0.1	0.7	0.0	0.3	0.0
G	0.0	0.2	0.7	0.8	0.1	0.2	0.0	0.8
T	0.1	0.7	0.2	0.0	0.2	0.0	0.7	0.2

- Pseudoconteo: A veces se suma una cantidad a todos para evitar valores pequeños

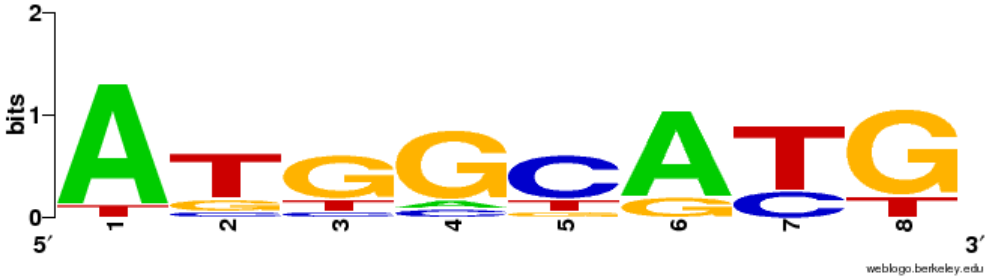
Ejemplo fuente: http://conferences.computer.org/bioinformatics/CSB2003/NOTES/Liu_Color.pdf

Representaciones (patrones)

- Secuencia logo
  - La altura de los nucleótidos depende de la probabilidad
  - La altura total de los nucleótidos en la posición *i*-ésima,

$$h_i = 2 + \sum_{x \in \{A,C,G,T\}} p_{i,x} \log_2 p_{i,x} - \frac{4-1}{2n \ln 2}$$

    - $p_{i,x}$: Probabilidad del carácter *x* en la posición *i*
    - *n*: Número de secuencias
  - Altura de nucleótido *x* = $p_{i,x}\, h_i$



	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.9	0.0	0.0	0.1	0.0	0.8	0.0	0.0
C	0.0	0.1	0.1	0.1	0.7	0.0	0.3	0.0
G	0.0	0.2	0.7	0.8	0.1	0.2	0.0	0.8
T	0.1	0.7	0.2	0.0	0.2	0.0	0.7	0.2

Hoy …

1. ¿Qué son los motivos en el ADN? ¿Qué son los TFBS?
2. Representación de motivos
3. **El problema de identificar motivos**

Identificación de motivos sobrerrepresentados

- Las representaciones anteriores son para motivos conocidos: Sabemos las subsecuencias de ADN exactas de la TFBS
- En realidad, ¿cómo encontramos estas secuencias?
  - Hay experimentos que indican aproximadamente los lugares de unión de una proteína
    - Por ejemplo, inmuno-precipitación de cromatina seguida por microarray (ChIP-chip) o secuenciación (ChIP-seq / chip-exo)
  - Si se cree que un TF regula algunos genes al unirse a sus promotores, podemos recoger estas secuencias promotoras
  - En ambos casos, la resolución no es lo suficientemente alta

Problema de descubrimiento de motivos

- Entradas: un conjunto de secuencias, cada una contienen exactamente un TFBS
  - Hay otras variantes:
    - Cada secuencia contiene uno o más TFBS
    - Cada secuencia contiene cero o uno TFBS
    - Cada secuencia contiene cero o más TFBS
- Objetivo: Averiguar las ubicaciones en las secuencias de TFBS
- La idea principal: identificar patrones comunes en las secuencias

Identificación de motivos sobrerrepresentados

- Diferentes métodos:
  1. búsqueda exhaustiva de todas las palabras de tamaño hasta *k*
     - Éxito garantizado si el motivo tiene una tamaño ≤ *k*
     - El coste aumenta exponencialmente con respecto a *k*
       - La indexación ayuda hasta cierto punto
     - Más costoso si se permiten coincidencias inexactas
  2. Multialineamiento de secuencias
     - computacionalmente duro
     - Muchas heurísticas
  3. Se puede integrar información auxiliar para encontrar un sitio de unión activo
     - nivel de expresión génica (por ejemplo, la correlación de número de sitios de unión con el nivel de expresión)
     - Evidencia directa de unión (ChIP-chip o chip-ss)
     - Señales de la cromatina (por ejemplo, la accesibilidad del ADN)

Un ejemplo ilustrativo

- Supongamos que sabemos una proteína se une a algunas posiciones de las secuencias:
  - s_1= ACCGGCT
  - s_2= GTCAGCT
  - s_3= TCGGTAT
- enfoque 3-mer:
  - Por lo tanto, el sitio de unión puede ser alrededor CGG ó GCT

3-mer	Número de secuencias que la contienen
ACC	1
AGC	1
CAG	1
CCG	1
CGG	2
GCT	2
GGC	1
GGT	1
GTA	1
GTC	1
TAT	1
TCA	1
TCG	1

Significancia estadística

- Ahora, considera la siguiente situación:
  - Un cierto genoma contiene 80% C'S y G'S, y 20% A'S y T'S.
  - Tiene 100 secuencias que contienen los sitios de unión de una proteína
    - 90 de ellas contienen el patrón GCGC
    - 85 de ellas contienen el patrón ATAA
  - ¿Cuál crees que es el motivo de unión real?

Significancia estadística

- Estadísticamente significativo: algo es poco probable que suceda por casualidad
  - Puede sugerir importancia biológica (¿por qué?)
- Pasos para determinar la significación estadística:
  - Definir una hipótesis nula (modelo de fondo)
  - Probabilidad de ocurrencia dado el modelo nulo
    - Cálculo directo
    - Simulación (más caro, pero por lo general más realista)

Significancia estadística

- Ejemplo: Para una secuencia de ADN de longitud 4, asumiendo distribución independiente y uniforme de cada base, ¿probabilidad de de observar
  - 3 ó más A'S en una cadena?
    - En una hebra: $(0,25)^4 + 4\ (0,75)\ (0,25)^3 = 0,0508$
    - En ambas hebras: $0,0508 \times 2 = 0,1016$
  - 2 ó más AT'S en una cadena?
    - En una hebra: $(0,25)^4 = 0,0039$
    - En las dos hebras: 0,0039 (¿por qué no duplicado?)
- Hay que evitar el conteo redundante en general

Significancia estadística

- ¿Cuál sería un buen modelo nulo para una secuencia de ADN?
  - ¿Independiente, uniforme?
    - No es del todo cierto
  - ¿dependencia local, uniforme?
    - Mejor, pero todavía falta de distribución global
  - ¿dependencia local, no uniforme?
    - Bueno, pero más difícil de manejar
- En general, para conseguir una distribución nula más realista
  - Toma de muestras de datos permutados
  - Preservando al mismo tiempo algunas propiedades clave
    - Para el ADN, podemos querer conservar frecuencias de nucleótidos, frecuencias de dinucleótidos, etc.
  - Por último, obtener una distribución de las muestras y ver dónde está el número observado en la distribución

Referencias

- D'haeseleer, How does DNA Sequence Motif Discovery Work? *Nature Biotechnology* 24(8):959-961, (2006)

Resumen

- Los **motivos** son patrones inexactos frecuentes en el ADN
- Los **TFBS** son patrones donde se unen los factores de transcripción (potenciadores, silenciadores, aisladores)
- Las **representaciones** simples no tienen suficiente información, las complejas son menos eficientes
- El **problema de descubrir motivos** consiste en encontrar patrones frecuentes que sean estadísticamente significativos (es decir, que no aparezcan por casualidad)
- De forma similar en las proteínas existen los **dominios**