Задание №1

# Поиск регуляторных мотивов транскрипции в бактериальных последовательностях

В первом задании Вам необходимо найти регуляторный мотив (набор сайтов) в полученных последовательностях с помощью программы MEME.
В этом файле после задания №1 и инструкций к программаме MEME приведены последовательности перед генами, экспрессия которых регулируется пуриновым репрессором **PurR**. **Экспериментально установленные** сайты связывания белка **PurR** выделены в них синим цветом. Задача состоит в том, чтобы определить, при каких длинах последовательностей и каком числе лишних (*то есть не содержащих сайта*) последовательностей каждая программа способна находить сайты, совпадающие с экспериментальными. Поэтому с помощью двух упомянутых выше программ Вам надо найти реуляторный мотив длиной 16 нуклеотидов.
Каждому будет выдан текстовый файл с последовательностями в FASTA-формате.

**Что представляет собой FASTA-формат:**
FASTA-формат – это определенная форма записи последовательностей, с которой работает большая часть программ для анализа геномных последовательностей.
В первой строке должно стоять название последовательности после знака “>”. Начиная со следующей строки приводится сама последовательность. Следующие друг за другом разные последовательности должны быть разделены пустой строкой. Ниже приводится пример записи нескольких последовательностей в FASTA-формате:

```
>guaB
acctgtcccatctcatgctcaagcagcagacgaaccgtttgattcaggcgactaacggtaaaaattgcaggggattgagaa
ggtaacatgtgagcgagatcaaattctaaatcagcaggttattcagtcgatagtaacccgccctt

>glnB
gggtgaaaatacggcgctgccaacctttgttgaggcacgtaatcagtttgaactcaactatttgcgtaagctgctgcaaat
caccaaaggcaacgtcacccacgcggcgagaatggcggggcgcaaccggacagaa

>purL
attctctgtgtcgtgcgcgtcccagcttgaaaaaacgtaataatagtgaaaggtttactcataaatgagcggcattttgcg
taaacctgcgccagatggcaacttattacagccattggcggcacgcgttgctaattcacga
```

Часть выданных Вам последовательностей не содержит сайтов. Поэтому не удивляйтесь, если сайты будут найдены не во всех последовательностях. Сайт считается совпадающим с экспериментальным, если он пересекается с ним **на 8 или более нуклеотидов**.
Ответ на задание следует представить в виде файла в формате *.doc с размечеными последовательностями. Для этого

- скопируйте из текстового файла в Word только те последовательности, в которых были найдены сайты. Последовательности должны быть скопированы ***полностью***.
- выделите синим **экспериментально установленные** сайты.
- сайты, найденные с помощью программы MEME с параметром **«One per sequence»** (см. в инструкции) должны быть выделены *курсивом*
- сайты, найденные с помощью программы MEME с параметром **«Zero or one per sequence»** (также см. в инструкции) должны быть выделены **жирным шрифтом**
- все сайты (и экспериментальные, и предсказанные) должны быть на сером фоне

То есть ответ должен выглядеть так:

>prsA
ttcagcaatgattgcgaggttatc**gc*aagaaaacgttttc*gcgagg*ttgatgcggtgctttcctggctgtt
agaatacgccccgtcgcgcctgactgggacaggggcctgtgtctttgctgaatttga

В данном случае:

***aagaaaacgttttc***gc – экспериментально установленный сайт связывания **PurR**

***aaacgttttc***gcgagg – сайт, найденный с помощью программы MEME с параметром **«One per sequence»**

**gc*aagaaaacgttttc*** – сайт, найденный с помощью программы MEME с параметром **«Zero or one per sequence»**

Все выше перечисленные предсказанные сайты считаются совпадающим с экспериментальным, поскольку пересекаются с ним более чем наполовину.

# Инструкция по использованию программой MEME

**On-line** версия программы MEME находится по адресу http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html

Окно программы содержит следующие поля:

**Your e-mail address:** Адрес Вашей электронной почты, на который будут высланы результаты.

**Re-enter e-mail address:** То же самое, еще раз (*это сделано для того, чтобы предотвратить введение адреса с ошибками*)

Ввести последовательности, в которых будет производится поиск сайтов, возможно двумя способами:

- **Enter the name of a file containing the sequences here:** нужно сослаться на файл, содержащий последовательности в FASTA-формате. Удобнее воспользоваться кнопкой "**Обзор…**"
  ***(в некоторых браузерах эта кнопка называется*** "**Browse…**")

- **The actual sequences here (Sample Input Sequences):** в окно вводятся непосредственно сами последовательности, тоже в FASTA-формате.

**Description of your sequences:** описание вводимых последовательностей, данное поле не обязательно для заполнения.

**How do you think the occurrences of a single motif are distributed among the sequences?**
– необходимо пометить, сколько сайтов **одного типа** Вы рассчитываете найти **в каждой последовательности.**

- **One** per sequence – по одному сайту в каждой последовательности;
- **Zero or one** per sequence – найти в каждой последовательности по одному сайту или вообще не найти в ней сайтов;
- **Any number** of repetitions – позволяет найти в каждой последовательности несколько сайтов **одного типа**.

*При выполнении задания необходимо произвести поиск два раза: в первый раз установив* **One** per sequence*, во второй* – **Zero or one** per sequence.

**MEME will find the optimum width of each motif within the limits you specify here:** длина искомого сайта, необходимо задать минимальную и максимальную длину в располагающихся ниже окнах.
*При выполнении задания надо установить и минимальную, и максимальную длину сайта* **16** *нуклеотидов.*

**Maximum number of motifs to find:** количество различных типов мотив, которые предполагается найти.
*При выполнении задания необходимо указать значение* 1*, то есть искать мотивы* ***только одного*** *типа.*

**MEME will find the optimum number of sites for each motif within the limits you specify here:**
- количество сайтов каждого типа, которое предполагается найти во всей обучающей выборке.
*Данная функция имеет смысл лишь в том случае, если предполагается найти* более 1 *сайта в каждой последовательности. Поэтому, при выполнении задания поля* **Minimum** sites (>= 2) *и* **Maximum** sites (<= 300) ***следует оставить пустыми***.

Следующие четыре функции не потребуются для выполнения задания и поэтому возле них **не должно** стоять галочек:

- **Text output format** – формат, в котором будут представлены результаты: по умолчанию результаты будут оформлены в виде гипертекста (HTML формат).
- **Shuffle sequence letters** – осуществляет перетасовку букв в последовательности.
- **Search given strand only** – поиск сайта осуществляется только в приведенной последовательности, по умолчанию программа ищет сайт как в приведенной последовательности, так и в комплементарной.
- **Look for palindromes only** – осуществляется поиск только палиндромных сайтов.

После того, как все необходимые поля заполнены, нажимайте "**Start search**"
(***в некоторых браузерах эта кнопка называется*** "**Submit Query**"

После этого результаты будут высланы Вам по почте на адрес, указанный в окне **Your e-mail address**. В обновленном окне браузера при этом появляется информация о входных данных:

- e-mail, на который высланы результаты
- имя файла, содержащего последовательности
- количество искомых сайтов (в каждой последовательности)
- количество искомых мотивов (разных типов сайтов)
- минимальное и максимальное число искомых сайтов в каждой последовательности (если предполагается найти более 1 сайта в каждой последовательности)
- минимальная и максимальная длина искомого сайта
- таблица, отражающая статистику ваших данных:

| | | |
|---|---|---|
| type of sequence | **dna** | - тип последовательностей |
| number of sequences | **10** | - количество последовательностей |
| shortest sequence (residues) | **100** | - длина самой короткой последовательности |
| longest sequence (residues) | **100** | - длина самой длинной последовательности |
| average sequence length (residues) | **100.0** | - средняя длина последовательности |
| total dataset size (residues) | **1000** | - суммарная длина всех последовательностей |

**Работа с результатами.**

В ответ на запрос на почтовый ящик высылаются следующие письма:
1) Подтверждение о том, что запрос принят и обрабатывается
2) Результаты обработки последовательностей программой MEME
3) Результаты обработки последовательностей программой MAST

*Программа MAST, используя полученный с помощью программы MEME профиль для распознавания сайта, картирует сайты в тех последовательностях, которые были использованы для поиска мотива.*

Для выполнения задания Вам потребуются **только результаты программы MEME**.

Файл с результатами содержит несколько разделов.

**MEME - Motif discovery tool** – информация об используемой версии программы.

**REFERENCE** – ссылка на статью о программе.

**TRAINING SET** – сведения о введенных последовательностях.
**COMMAND LINE SUMMARY** - информация обо всех параметрах, часть из которых программа сама и устанавливает.

*Далее следует описание каждого найденного мотива. В первой строке сообщаются сведения о длине сайта (**width**), количестве найденных сайтов (**sites**) и приводятся различные критерии оценки статистической значимости сайта (**llr** и **E-value**).*

**simplified pos.-specific probability matrix** – построенная на основании найденных сайтов матрица вероятности нуклеотидов. По вертикали указаны нуклеотиды, а по горизонтали – позиции в последовательности сайта. Вероятность данного нуклеотида в данной позиции указывается в десятых долях, то есть, если в матрице стоит число 7, то частота этого нуклеотида в данной позиции равна 0,7.
“:” – данный нуклеотид не встречается в этой позиции
“a” – данный нуклеотид встречается в этой позиции со 100%-ной вероятностью

**Information Content Diagram** – диаграмма, показывающая информационное содержание каждой позиции.

**Multilevel consensus sequence** – консенсусная последовательность для найденного сайта.

Далее приводится таблица, включающая сведения о найденных сайтах:

| NAME | STRAND | START | P-VALUE | SITES | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| gapA | + | 74 | 1.68e-08 | GCTGCACCTA | AATCGTGATGAAAATCACATTT | TTATCGTAAT |
| mtlA | + | 21 | 6.74e-08 | ATCAAAACAA | AAATGTGACACTACTCACATTT | AAATGCCATT |
| tnaL | + | 206 | 9.82e-08 | CTCCCCGAAC | GATTGTGATTCGATTCACATTT | AAACAATTTC |
| caiT | - | 143 | 9.82e-08 | ATAAGCTGTA | TTCTGTGATTGGTATCACATTT | TTGTTTCGGG |
| exuT | - | 148 | 1.40e-07 | TACAACTTTA | AAAGGTGAGAGCCATCACAAAT | GTGGGAATAT |

**NAME** – имя последовательности
**STRAND** – Цепь ДНК, в которой найден сайт: “+” - введенная последовательность, “–” - комплементарная ей
**START** – положение сайта (то есть положение **первой** позиции сайта относительно начала последовательности)
**P-VALUE –** критерий статистической значимости сайта, чем он ниже, тем сайт имеет большую значимость. Сайты в списке перечислены именно по возрастанию ***p-value***.

**SITES** – выравненные последовательности найденных сайтов. Приводятся последовательности сайтов (раскрашены) плюс по 10 нуклеотидов с каждой стороны.

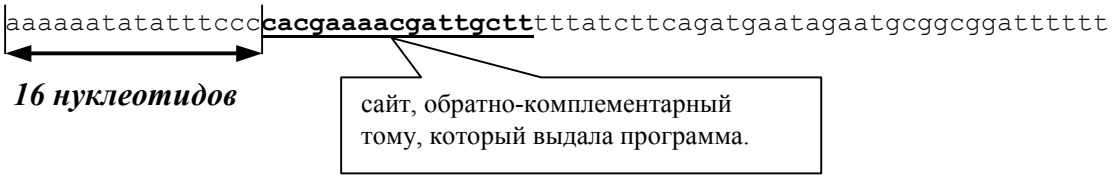
В случае, если сайт найден не во введенной цепи, а в комплементарной ей, необходимо искать обратно-комплементарный ему.

Например, в результатах приведен следующий сайт:

```
codB      -       17   9.57e-09   TGAAGATAAA AAGCAATCGTTTTCGTG GGGAAATATA
```

Вам следует искать **обратно-комплементарный** ему, то есть CACGAAAACGATTGCTT

В рассматриваемой последовательности такой сайт будет располагаться следующим образом:




**Будьте внимательны!**

Указывается не количество нуклеотидов до начала сайта, но **положение первой позиции** сайта.

**Block diagrams** – графическое отображение расположения сайтов по последовательностям, “+” и “–” обозначают цепи ДНК, в которых найден сайт (так же, как и в предыдущем случае).

## Экспериментально установленные сайты связывания PurR

*codB*
aaaaaatatatttcccc**acgaaaacgattgctt**tttatcttcagatgaatagaatgcggcggatttttgggtttcaaacagcaa

*purE*
tgatttcacagcc**acgcaaccgttttcct**tgctctctttccgtgctattctctgtgccctctaaagccgagagttgtgcaccaca

*pyrC*
agggcgcattcgcgccctttatttttcgtgcaa**aggaaaacgtttccgc**ttatcctttgtgtccggcaaaaacatcccttcagcc

*purR*
ggcgtaccgcaacacttttgttgtgcgtaaggtgtgtaa**aggcaaacgtttacct**tgcgattttgcaggagctgaagttagggtc

*cvpA*
tttattgatgcgcgggaaggaaatccct**acgcaaacgttttctt**tttctgttagaatgcgccccgaacaggatgacagggcgtaa

*purM*
aaaggttgtgtaaagcagtc**tcgcaaacgtttgctt**tccctgttagaattgcgccgaattttatttttctaccgcaagtaacgcg

*guaB*
gatagcaagcatttttgcaaaaaggggtag**atgcaatcggttacgc**tctgtataatgccgcggcaatatttattaaccactctg

*glnB*
ttcccgacacgagctgg**atgcaaacgatttcaa**ggaatgaattggcgttatgtgttacgtttagcagatcaaaagacaggcgacc

*purL*
ttatttcc**acgcaaacggtttcgt**cagcgcatcagattctttataatgacgcccgtttcccccccttgggtacaccgaaagctta

*purA*
aggtcatttttgagtgcaaaaagtgctgtaactctgaaaaagcgatggtagaatccatttttt**aagcaaacggtgattt**tgaaaaa

Задание №2

## Поиск сайтов в эукариотических последовательностях

Во втором задании Вам необходимо будет найти сайты для известных сигналов в полученных последовательностях с помощью программы rVISTA. Для выполнения этого задания необходимо будет сделать попарные выравнивания последовательности из генома человека с последовательностями из геномов других млекопитающих. Всего Вам будет выдано три последовательности: одна – для человека, две другие – для других млекопитающих (*например*, Human_Aldolase.txt, Mouse_Aldolase.txt *и* Dog_Aldolase.txt).
Все последовательности, с которыми Вы будете работать, представляют собой промоторные области генов, экспрессирующихся в мышечной ткани. Поэтому в них Вы будете пытаться найти сайты связывания мышечно-специфичных факторов транскрипции.
Вам потребуется найти сайты для восьми таких факторов:

| | | | |
|---|---|---|---|
| AP2 | GATA1 | MEF2 | MEF3 |
| MYOD | SRF | TEF1 | TEF |

Список этих факторов приведен также в инструкции по использованию программы.

Ответ должен состоять из трех частей:

**1.** Выравнивание последовательностей, на котором размечены **все** найденные сайты (*должно быть представлено в формате* *.doc)

Программа выдает выравнивания, на которых отмечен ***сайт только для одного*** транскрипционного фактора и ***только по одной цепи***. Вам же следует на одно выравнивание нанести **все** найденные сайты, отметив их **по обеим цепям**.

Например, программа выдала:

Для фактора MEF2 :

```
60         70         80         90        100        110
seq1     TTGCCCCTCTAGCCCCTGTCCGTACCGAGAAGCCCCAAGAGGAGCAGGACCCCAAGCGGA
         | || || ||  ||||||||| |||| |  ||   || ||| |||||| | |||||| ||
seq2     TGGCTCCCCTGACCCCTGTCCCTACCAAAGAGTGTCAGGAGAAGCAGGGCACCAAGCAGA
         50         60         70         80         90        100

        120        130        140        150        160        170
seq1     GCCCTTGCCATCCTGCTGCGTGGTTCTCAGGGTTATTCTGAGCTCTGGCAGGCTTGGAGG
         |||| |||||||||| ||  ||||||||| |||||||||||||| || || |||| ||||
seq2     GCCCCTGCCATCCTGATGTCTGGTTCTCA-GGTTATTCTGAGCTTTGACAAGCTT-GAGG
        110        120        130        140        150        160
```

Для фактора MYOD :

```
seq1     TTGCCCCTCTAGCCCCTGTCCGTACCGAGAAGCCCCAAGAGGAGCAGGACCCCAAGCGGA
         | || || ||  ||||||||| |||| |  ||   || ||| |||||| | |||||| ||
seq2     TGGCTCCCCTGACCCCTGTCCCTACCAAAGAGTGTCAGGAGAAGCAGGGCACCAAGCAGA
         50         60         70         80         90        100

        120        130        140        150        160        170
seq1     GCCCTTGCCATCCTGCTGCGTGGTTCTCAGGGTTATTCTGAGCTCTGGCAGGCTTGGAGG
         |||| |||||||||| ||  ||||||||| |||||||||||||| || || |||| ||||
seq2     GCCCCTGCCATCCTGATGTCTGGTTCTCA-GGTTATTCTGAGCTTTGACAAGCTT-GAGG
        110        120        130        140        150        160
```

Ваш ответ в данном случае должен выглядеть так:

```
                MYOD
seq1    TTGCCCCTCTAGCCCCTGTCCGTACCGAGAAGCCCCAAGAGGAGCAGGACCCCAAGCGGA
        | || || ||  ||||||||| |||| |  ||   || ||| |||||| | |||||| ||
seq2    TGGCTCCCCTGACCCCTGTCCCTACCAAAGAGTGTCAGGAGAAGCAGGGCACCAAGCAGA

                                        MEF2
seq1    GCCCTTGCCATCCTGCTGCGTGGTTCTCAGGGTTATTCTGAGCTCTGGCAGGCTTGGAGG
        |||| |||||||||| ||  ||||||||| ||||||||||||| || || |||| ||||
seq2    GCCCCTGCCATCCTGATGTCTGGTTCTCA-GGTTATTCTGAGCTTTGACAAGCTT-GAGG
```

Если сайты разных факторов будут перекрываться между собой, то их необходимо выделять так, чтобы было видно, какие именно нуклеотиды принадлежат к данному фактору, например

```
              MYOD       SP1
seq1    TTGCCCCTCTAGCCCCTGTCCGTACCGAGAAGCCCCAAGAGGAGCAGGACCCCAAGCGGA
        | || || ||  ||||||||| |||| |  ||   || ||| |||||| | |||||| ||
seq2    TGGCTCCCCTGACCCCTGTCCCTACCAAAGAGTGTCAGGAGAAGCAGGGCACCAAGCAGA
```

**2**. Результаты расчетов, на сколько нуклеотидов приходится один сайт (*для каждого выравнивания*).

1) Поделите среднюю длину одной пары последовательностей (то есть той пары, которую Вы выравнивали) на суммарное число всех найденных сайтов. Это и будет число нуклеотидов, на которое в среднем приходится один сайт.

2) Вы искали сайты для 8 мышечно-специфичных факторов. А теперь представьте себе, что Вам необходимо найти сайты для всех 407 факторов, имеющихся в арсенале программы rVISTA. На какое число нуклеотидов в среднем тогда приходился бы один сайт? Чтобы узнать это, разделите полученное значение на 50.

**3.** Ваши выводы

## Инструкция по использованию программы rVISTA.

**On-line** версия программы rVISTA находится по адресу
http://genome.lbl.gov/vista/rvista/submit.shtml

Перейдя по данному адресу необходимо в окне Total number of sequences набрать цифру "**3**" (поскольку у Вас три последовательности) и нажать **"Submit"**

Таким образом Вы перейдете в окно программы.

Окно программы содержит следующие поля:
Your email address: Ваш электронный адрес, на который будут высланы результаты.

Sequence #1: последовательность из генома человека;
Sequence #2, Sequence #3 : последовательности из других геномов.

**Обязательно проследите, чтобы первой была именно последовательность из генома человека, иначе можете запутаться в результатах.**
Для заполнения этих полей требуется воспользоваться кнопкой **"Обзор"**
(***в некоторых браузерах эта кнопка называется*** **"Browse…"**)

Также желательно, чтобы Вы написали названия организмов в разделе **Additional options**, в окнах "Name" – чтобы впоследствии не запутаться в результатах.

Проследите, чтобы стояли следующие пометки:

- в **Alignment program** должна стоять пометка возле AVID
- возле поля "Find potential transcription factor binding sites using rVISTA" должна стоять галочка,

Если все установлено правильно, нажмите **"Submit"**

В новом окне содержатся функции, требуемые для поиска сайтов связывания.
Пометки должны стоять возле надписей **"**Use TRANSFAC matrices и **"**vertebrates**"**. Если все правильно, можно нажимать **"Submit"**

После этого загрузится окно со списком известных для позвоночных факторов транскрипции. Здесь Вам необходимо будет поставить галочки возле следующих названий:

| | | | |
|---|---|---|---|
| AP2 | GATA1 | MEF2 | MEF3 |
| MYOD | SRF | TEF1 | TEF |

и нажать **"Submit"**

После этого в новом окне появится сообщение

> Your sequences were successfully submitted.
> An email will be sent to you when your request is processed.

Это значит, что результаты уже высланы на адрес, указанный в поле Your email address

В полученном письме будет содержаться ссылка на страницу с результатами. По этой ссылке Вам и следует перейти.

В открывшемся окне будут приведены сведения о построенных выравниваниях. Всего должно получиться два выравнивания, и с каждым Вы сможете работать по-одтельности. Для того, чтобы приступить к работе с выравниванием, пройдите по соответствующей **rVISTA** ( *внизу, в правой части экрана, например*, rVISTA: Human-Cow )

По этой ссылке Вы перейдете в окно **Choose matrices to visualize**, в котором будут перечисленны все факторы транскрипции, отмеченные вами ранее. Возле каждого из названий поставьте галочку и нажмите **"Submit"**

После этого Вы попадете на страницу **Visualization Options**, где в средней колонке увидите перечислены все факторы транскрипции, сайты для которых Вы пытаетесь найти. Возле каждого имени фактора находится надпись view in alignment, кликнув по которой Вы перейдете на страницу с выравниванием.

Найденные сайты связывания ***данного*** фактора будут показаны на розовом фоне.