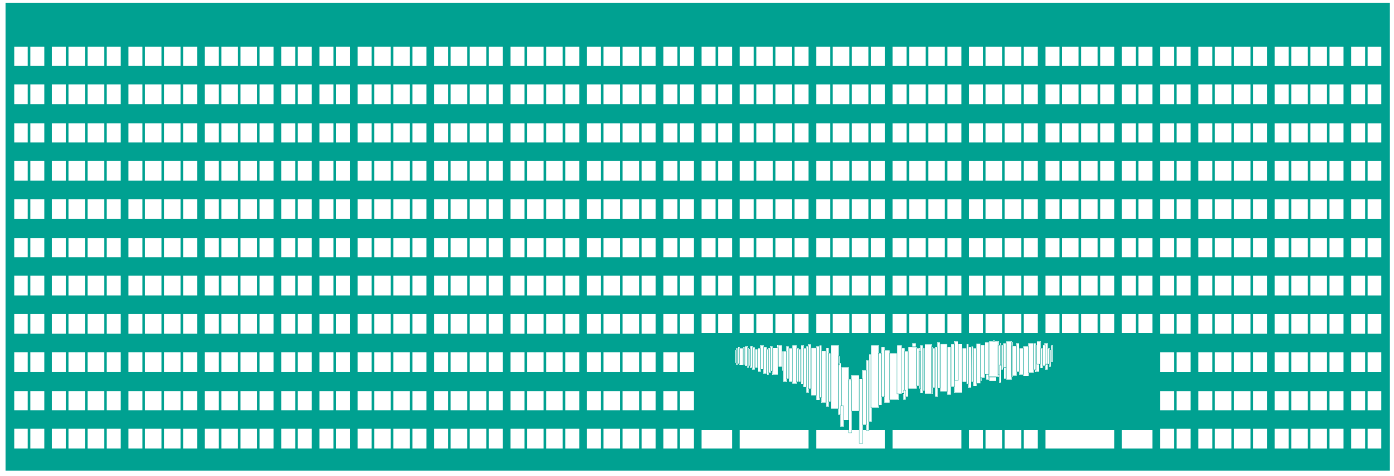
VŠB TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA

VSB TECHNICAL UNIVERSITY OF OSTRAVA



www.vsb.cz

Algoritmy pro Bioinformatiku

Predikce genů

Michal Vašinek

VŠB – Technická univerzita Ostrava

FEI/EA404

michal.vasinek@vsb.cz

6. listopadu 2019

Přehled přednášky

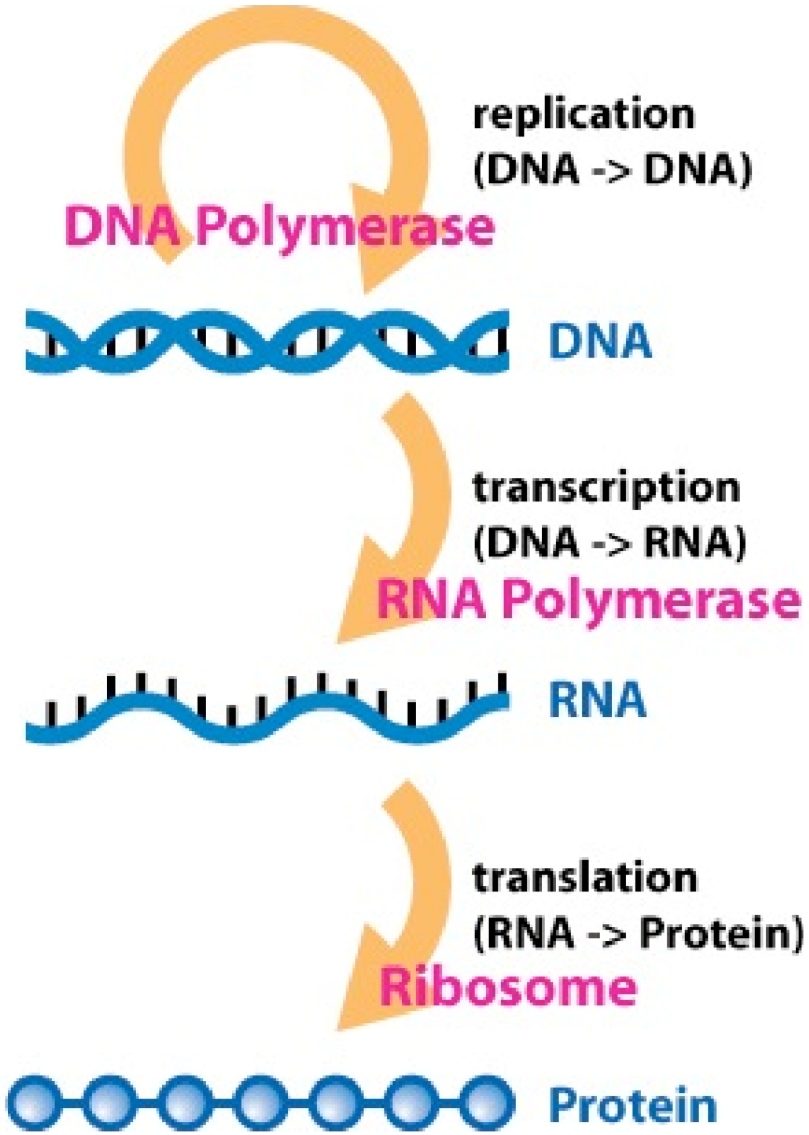
- Příipomenutí pojmů
- Statistické metody
- Metody založené na homologii sekvencí
- Srovnávací metody

Historie

- V roce 1961 Sydney Brenner a Francis Crick objevili, že pokud dojde v DNA ke smazání jednoho či dvou nukleotidů, pak dojde k dramatické změně ve struktuře proteinu, tzv. frameshifting mutations. Pokud jsou však smazány tři po sobě jdoucí nukleotidy, pak je změna ve struktuře výsledného proteinu velmi malá.
- Důsledek: gen a jeho protein jsou kolineární strukturou s přímou korelací mezi trojicemi nukleotidů a aminokyselinami v proteinu.
- V roce 1977 překvapivé zjištění - gen není tvořen celou sekvencí, ale skládá se z několika podsekvencí oddělenými nekódujícími oblastmi => exony a introny.

Centrální dogma

- Původně vysloveno v roce 1958.
- V 60 létech napadeno Teminem a kol., nalezena možnost přenosu virové RNA do DNA.
- Transkripce a translace pouze genů.



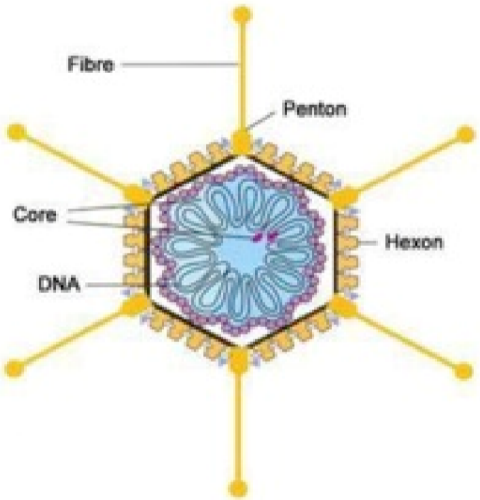
Genetický kód

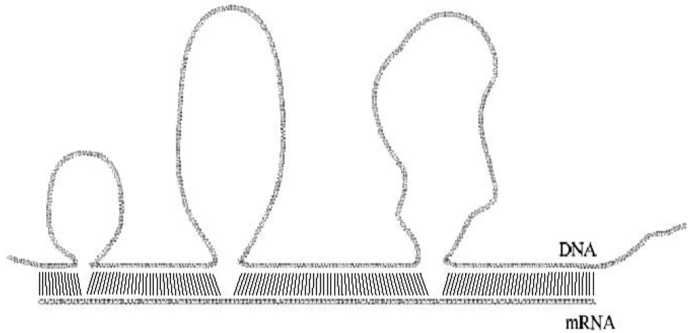
- Kodon - trojice nukleotidů.
- 64 kodonů je namapováno na 20 aminokyselin a STOP kodony.
- Některé aminokyseliny kódovány více kodony.
- Bodová mutace - substituce:
  - synonymní => nedojde ke změně proteinu.
  - nesynonymní => změna v aminokyselině vede k produkci jiného proteinu.

Aminoacid	Codons	Redundancy
Alanine	GC*	4
Cysteine	TGC,TGT	2
Aspartic Acid	GAC,GAT	2
Glutamine Acid	GAA,GAG	2
Phenylalanine	TTC,TTT	2
Glycin	GG*	4
Histidine	CAC,CAT	2
Isoleucine	ATA,ATC,ATT	3
Lysine	AAA,AAG	2
Leucine	CT*,TTA,TTG	6
Methionine	ATG	1
Aspargine	AAC,AAT	2
Proline	CC*	4
Glutamine	CAA,CAG	2
Arginine	AGA,AGG,CG*	6
Serine	AGC,AGT,TC*	6
Threonine	AC*	4
Valine	GT*	4
Tryptophan	TGG	1
Tyrosine	TAC,TAT	2
Stop	TAA,TAG,TGA	3

Jednoduché a Složené Geny

- Na základě experimentů s bakteriemi bylo zjištěno, že sekvence DNA, RNA a proteinů jsou kolineární. Předpokládalo se, že u eukaryotických buněk (organismů) to bude stejně.
- V roce 1977 Phillip Sharp a Richard Roberts experimentovali s mRNA virového proteinu, tzv. hexonu.
- Namapovali vzniklou mRNA zpět na DNA viru a výsledek zkoumali elektronovou mikroskopií.
- mRNA - DNA hybrid utvořil zvláštní tří smyčkovou strukturu namísto spojitého namapování.

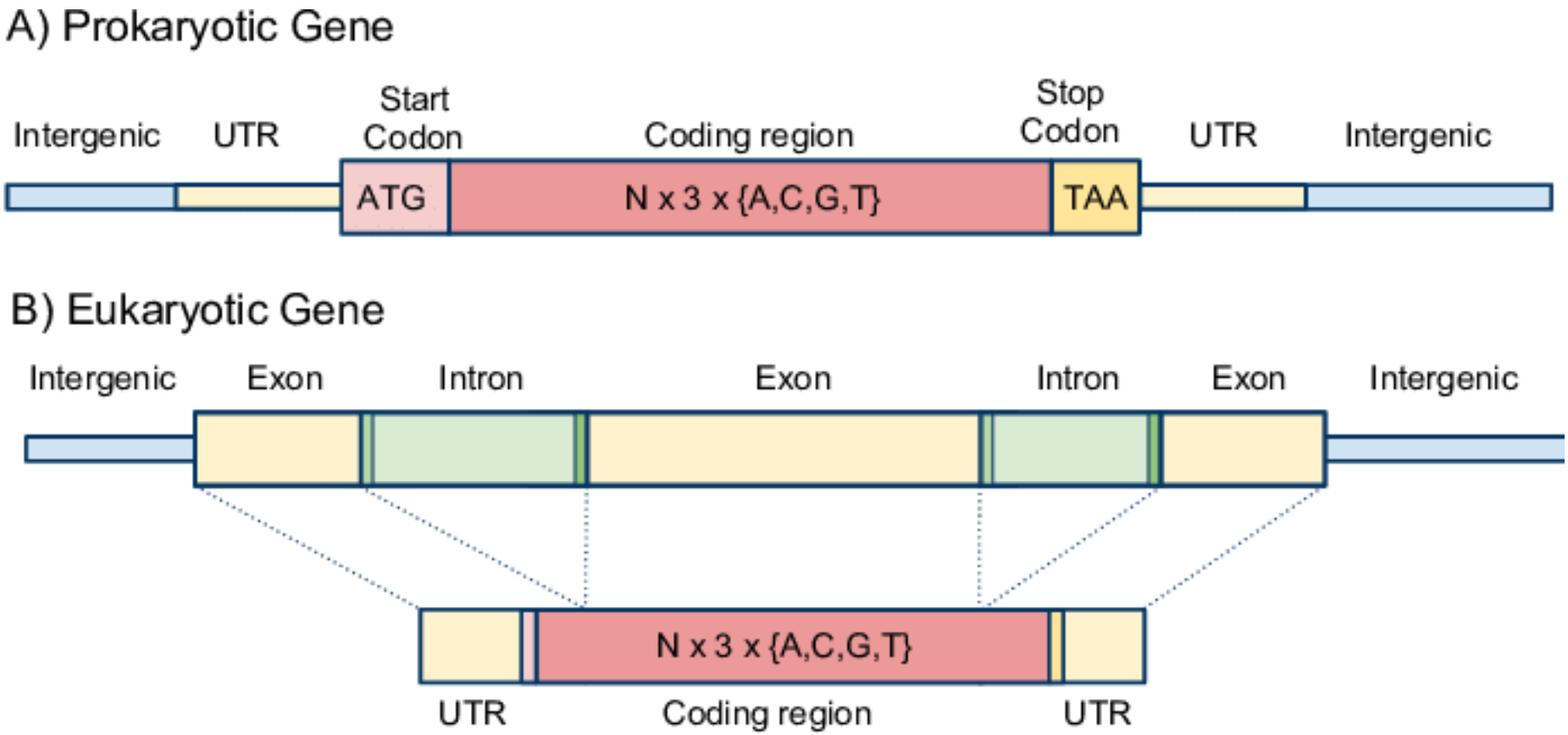




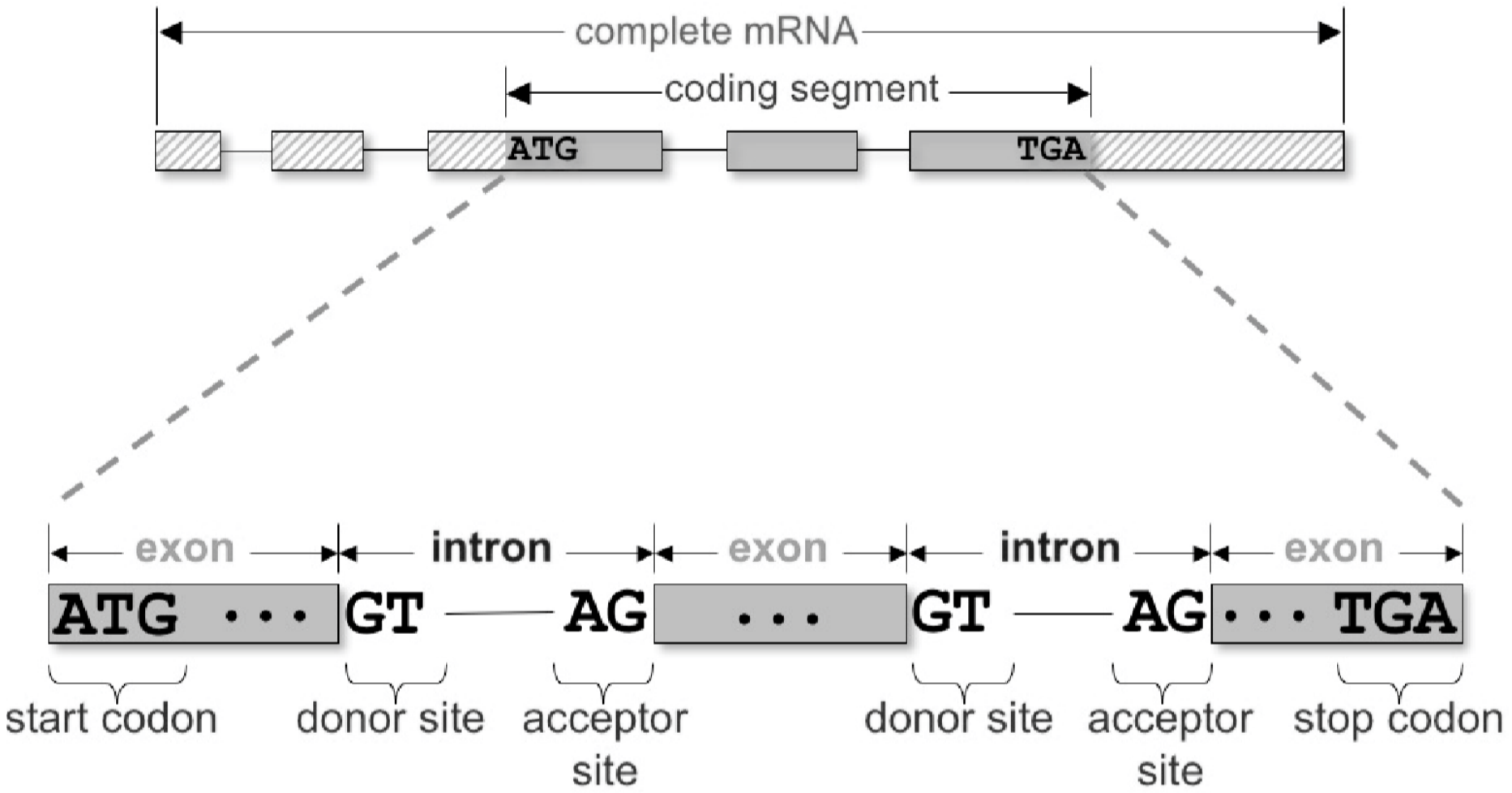
Exony a Introny

- Prokaryotické organismy nemají introny - jejich geny tvoří spojité úseky DNA.
- U eukaryotických organismů gen je kombinací kódujících úseků (exonů) a nekódujících úseků (intronů).
- Eukaryotické geny jsou obtížněji predikovatelné.

Prokaryotické a Eukaryotické Geny

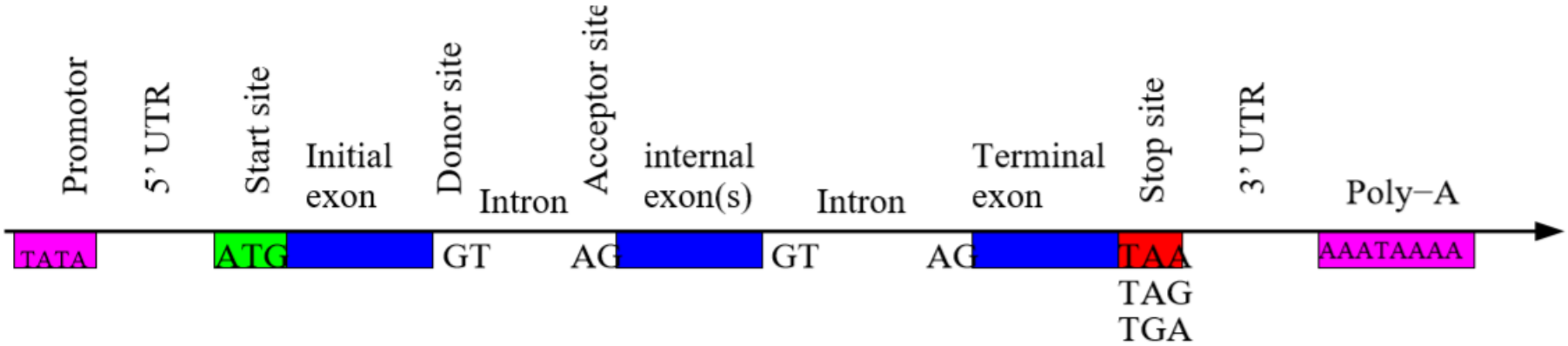


Eukaryotické Geny - detail

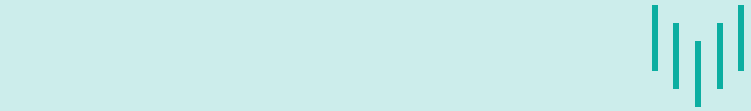


Slovník pojmů

- Exon - kódující oblast eukaryotického genu.
- Intron - nekódující oblast eukaryotického genu.
- Mezigenová oblast - oblasti DNA mimo úseky genů.
- UTR - untraslated terminal region, nekódující oblasti, lokalizovány před místem, kde dochází k incializaci translace a za místem ukončujícím translaci.
- Promoter - Oblast v mezigenové oblasti genomu, předchází gen a nepřekrývá se s ním. Iniciace transkripce.



Motivace ke Strojové Predikci Genů



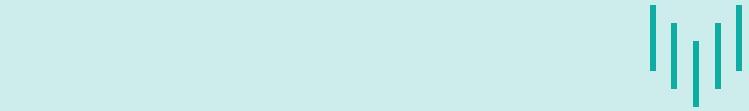
- Osekvenována celá řada genomů.
- Zajímavé sekvence jsou sekvence kódující geny => zdrojové kódy proteinů.
- Nejspolehlivější metoda osekvenování mRNA => pracné a nákladné.
- Potřeba vývoje automatizovaných postupů pro predikci genů ze znalosti sekvencí genomu.

Predikce genů

Mějme sekvenci DNA. Problém predikce genů znamená nalezení všech genů, které jsou v dané sekvenci obsaženy.

- Sekvence kódující geny nejsou náhodnými sekvencemi.
- Pořadí kodonů splňuje určitá biologická pravidla a zachovává se v průbehu evoluce.
- Předpokládáme, že geny a mezigenové oblasti mají různé rozdělení nukleotidů.
- U eukaryot předpokládáme různé rozdělení kodonů v exonech a intronech.

Přístupy k hledání genů



- Přímé:
  - Sekvenování mRNA, nebo proteinových sekvencí.
- Výpočetní:
  - Hledání shody s již známými geny. Metody založené na tzv. homologii.
  - Hledání shody statistických vzorů společných všem genům. Tzv. metody ab initio.
  - Hybridní metody.

Statistický Přístup

Deoxyribonukleová kyselina, běžně označovaná **DNA** (z anglického deoxyribonucleic acid, česky zřídka i **DNK**), je nukleová kyselina, nositelka genetické informace všech organismů s výjimkou některých nebuněčných, u nichž hraje tuto úlohu RNA (např. RNA viry). DNA je tedy pro život velmi důležitou látkou, která ve své struktuře kóduje a buňkám zadává jejich program a tím předurčuje vývoj a vlastnosti celého organismu. U eukaryotických organizmů (jako např. rostliny a živočichové) je DNA hlavní složkou chromatinu, směsi nukleových kyselin a proteinů, a je uložena zejména uvnitř buněčného jádra, zatímco u prokaryot (např. bakterie a archea) se DNA nachází volně v cytoplazmě.

Oba texty jsou vytvořeny v českém jazyce nad stejnou abecedou, různé posloupnosti a četnosti slov nás však vedou k textům popisujícím různá témata.

Počítač je v informatice zařízení a výpočetní technika, která zpracovává data pomocí předem vytvořeného programu. Současný počítač je elektronický a skládá se z hardwaru, který představuje fyzické části počítače (mikroprocesor, klávesnice, monitor atd.) a ze softwaru (operační systém a programy). Počítač je zpravidla ovládán uživatelem, který poskytuje počítači data ke zpracování prostřednictvím jeho vstupních zařízení a počítač výsledky prezentuje pomocí výstupních zařízení. V současnosti jsou počítače využívány téměř ve všech oborech lidské činnosti.

Charakteristiky genů

- ORF
- Četnosti kodonů.
- Četnosti hexamerů - oligonukleotidy o délce 6 nt.
- Promotery genů.
- Místa přechodu exon/intron (splice sites).
- UTR - untranslated terminal regions.

ORF - Open Reading Frame

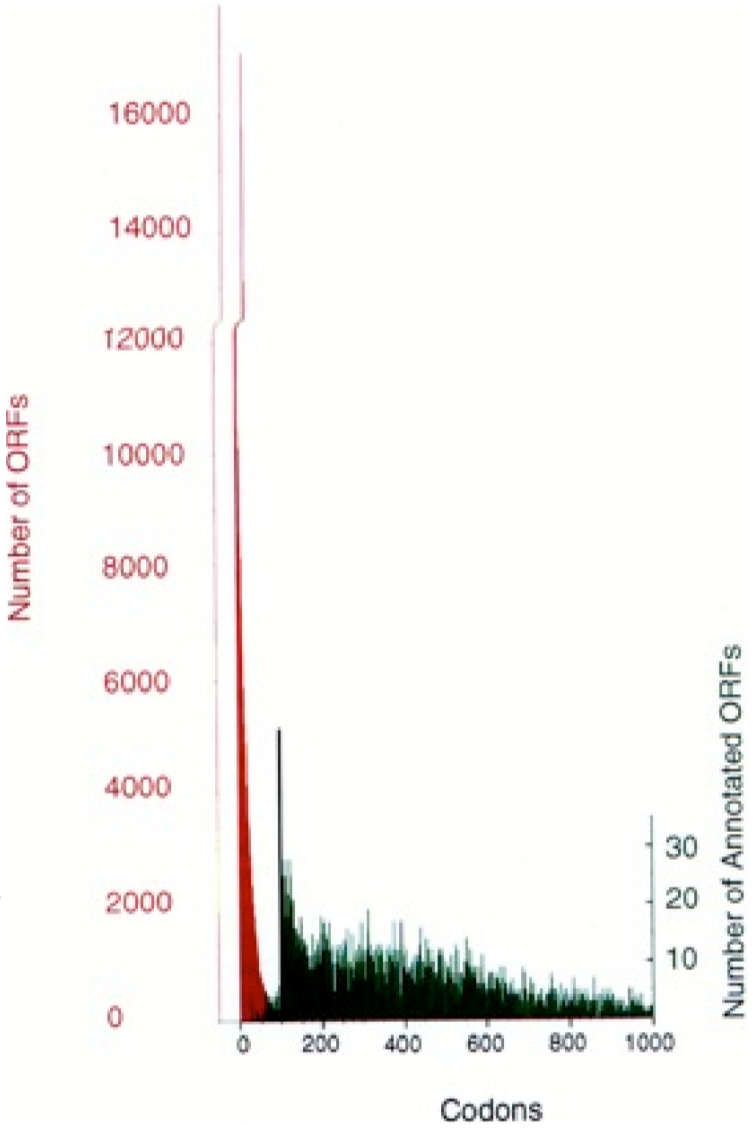
Open Reading Frame

Open Reading Frame (ORF) je jakákoli sekvence začínající start kodonem, končící end kodonem a neobsahující žádný end kodon uvnitř sekvence.

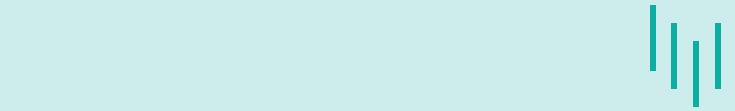
- Účel: detekovat potenciální kódující úseky.
- Každá DNA sekvence má šest možných ORF => předpokládáme, že kodony (trojice nukleotidů) čteme od pozice i, $i + 1$ a $i + 2$ v obou směrech: na přímém i komplementárním vláknu.
- Ne každý ORF kóduje gen.
- Velikost je dělitelná třemi.
- Odhalení rozdílu mezi genem a náhodným ORF je klíčovou úlohou.

ORF - základní koncept

- Základem je hledat ORF, které vypadají jako geny.
- Počet všech ORF je mnohokrát vyšší než počet anotovaných ORF.
- Hledáme delší ORF, cca 100 nt a více.
- Předchozí bod platný především u prokaryot.
- Krátké ORF jsou poměrně časté u eukaryotických organismů.

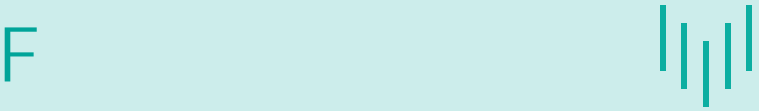


Základní charakteristiky genů



- Pokud by DNA byla náhodnou sekvencí stejně pravděpodobných nukleotidů, pak bychom očekávali, že délka jednoho genu bude cca 21 nukleotidů.
- Obecně u bakterií jsou geny poměrně dlouhé, stovky nukleotidů.
- Počet kodonů v průměrném proteinu bakterie je přibližně 300.
- Průměrná délka genu u obratlovců 30kb, průměrná délk aexonu 1-2kb.
- Prokaryoty nemají introny a mezigenové oblasti jsou krátké.
- Geny se navíc mohou překrývat nebo jsou dokonce vnořené v sobě.
- Místa začátku translace obtížně určitelná.

Problémy s detekcí genů pomocí ORF



- ORF se mohou překrývat.
- Pokud stanovíme určitou hranici délky genu nebudeme schopni detekovat krátké geny.
- U prokaryot se vyskytují alternativní start kodony, kromě ATG také GTG a TTG.
- ORF samotné nepostačují pro detekci genu, využívají se další charakteristiky.

Position specific weight matrix

- Rozdělení neukleotidů v okolí nějakého signálního místa (start kodonu, end kodonu, počátek a konec intronu).
- Používají se k odlišení konkrétních signálních oblastí od nesignálních oblastí.
- Například nukleotidy v okolí počátečního start kodonu:

Pos.	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7
A	.16	.29	.20	.25	.22	.66	.27	.15	1	0	0	.28	.24	.11	.26
C	.48	.31	.21	.33	.56	.05	.50	.58	0	0	0	.16	.29	.24	.40
G	.18	.16	.46	.21	.17	.27	.12	.22	0	0	1	.48	.20	.45	.21
T	.19	.24	.14	.21	.06	.02	.11	.05	0	1	0	.09	.26	.21	.21

Codon Adaptation Index (CAI)

- Měří relativní četnost určitého kodonu v daném organismu, genu nebo ORF.
- Například sekvence HIV-I polymerazy: čtyři kodony kódující Alanine:

Kodon	Počet
GCA	41576
GCC	9461
GCG	1017
GCT	11031

- Vidíme značné zešikmění rozdělení kodonů.

Výpočet CAI

- Relativní použití synonymních kodonů (RSCU) pro dvojic (i, j), kde i je aminokyselina a j je jeden z n_i synonymních kodonů. X_{ij} je počet j-tého kodonu aminokyseliny i.
- $RSCU > 1$ indikuje preferovaný kodon, zatímco $RCSU < 1$ nepreferovaný kodon.

$$RSCU_{ij} = \frac{X_{ij}}{\frac{1}{n_i}\sum_{k=1}^{n_i} X_k}$$

- Relativní adaptivnost:

$$w_{ij} = \frac{RSCU_{ij}}{RSCU_{max}} = \frac{X_{ij}}{max_j X_{ij}}$$

Příklad CAI - HIV1-polymeraza

Kodon	Počet	RSCU	w
GCA	41576	2.64	1
GCC	9461	0.60	0.23
GCG	1017	0.064	0.02
GCT	11031	0.70	0.27

Použití kodonů

		E.coli RSCU	E.coli w	Yeast RSCU	Yeast w			E.coli RSCU	E.coli w	Yeast RSCU	Yeast w
Phe	UUU	0.456	0.296	0.203	0.113	Ser	UCU	2.571	1.000	3.359	1.000
	UUC	1.544	1.000	1.797	1.000		UCC	1.912	0.744	2.327	0.693
Leu	UUA	0.106	0.020	0.601	0.117		UCA	0.198	0.077	0.122	0.036
	UUG	0.106	0.020	5.141	1.000		UCG	0.044	0.017	0.017	0.005
Leu	CUU	0.225	0.042	0.029	0.006	Pro	CCU	0.231	0.070	0.179	0.047
	CUC	0.198	0.037	0.014	0.003		CCC	0.038	0.012	0.036	0.009
	CUA	0.040	0.007	0.200	0.039		CCA	0.442	0.135	3.776	1.000
	CUG	5.326	1.000	0.014	0.003		CCG	3.288	1.000	0.009	0.002
Ile	AUU	0.466	0.185	1.352	0.823	Thr	ACU	1.804	0.965	1.899	0.921
	AUC	2.525	1.000	1.643	1.000		ACC	1.870	1.000	2.063	1.000
	AUA	0.008	0.003	0.005	0.003		ACA	0.141	0.076	0.025	0.012
Met	AUG	1.000	1.000	1.000	1.000		ACG	0.185	0.099	0.013	0.006
Val	GUU	2.244	1.000	2.161	1.000	Ala	GCU	1.877	1.000	3.005	1.000
	GUC	0.148	0.066	1.796	0.831		GCC	0.228	0.122	0.948	0.316
	GUA	1.111	0.495	0.004	0.002		GCA	1.099	0.586	0.044	0.015
	GUG	0.496	0.221	0.039	0.018		GCG	0.796	0.424	0.004	0.001

CAI genu

- Pozorovaný CAI_{obs} sekvence o L kodonech je dán geometrickým průměrem každého z kodonů:

$$CAI_{obs} = (\prod_{k=1}^{L} RSCU_k)^{1/L}$$

- Tato hodnota je poté porovnána s maximálním možným CAI, který vytvoříme ze všech možných sekvencí kodonů stejné délky, které kódují stejný protein:

$$CAI_{max} = (\prod_{k=1}^{L} RSCU_{max})^{1/L}$$

$$CAI = \frac{CAI_{obs}}{CAI_{max}}$$

Codon Usage in Human Genome

	U		C		A		G	
U	UUU Phe	57	UCU Ser	16	UAU Tyr	58	UGU Cys	45
	UUC Phe	43	UCC Ser	15	UAC Tyr	42	UGC Cys	55
	UUA Leu	13	UCA Ser	13	UAA Stp	62	UGA Stp	30
	UUG Leu	13	UCG Ser	15	UAG Stp	8	UGG Trp	100
C	CUU Leu	11	CCU Pro	17	CAU His	57	CGU Arg	37
	CUC Leu	10	CCC Pro	17	CAC His	43	CGC Arg	38
	CUA Leu	4	CCA Pro	20	CAA Gln	45	CGA Arg	7
	CUG Leu	49	CCG Pro	51	CAG Gln	66	CGG Arg	10
A	AUU Ile	50	ACU Thr	18	AAU Asn	46	AGU Ser	15
	AUC Ile	41	ACC Thr	42	AAC Asn	54	AGC Ser	26
	AUA Ile	9	ACA Thr	15	AAA Lys	75	AGA Arg	5
	AUG Met	100	ACG Thr	26	AAG Lys	25	AGG Arg	3
G	GUU Val	27	GCU Ala	17	GAU Asp	63	GGU Gly	34
	GUC Val	21	GCC Ala	27	GAC Asp	37	GGC Gly	39
	GUA Val	16	GCA Ala	22	GAA Glu	68	GGA Gly	12
	GUG Val	36	GCG Ala	34	GAG Glu	32	GGG Gly	15

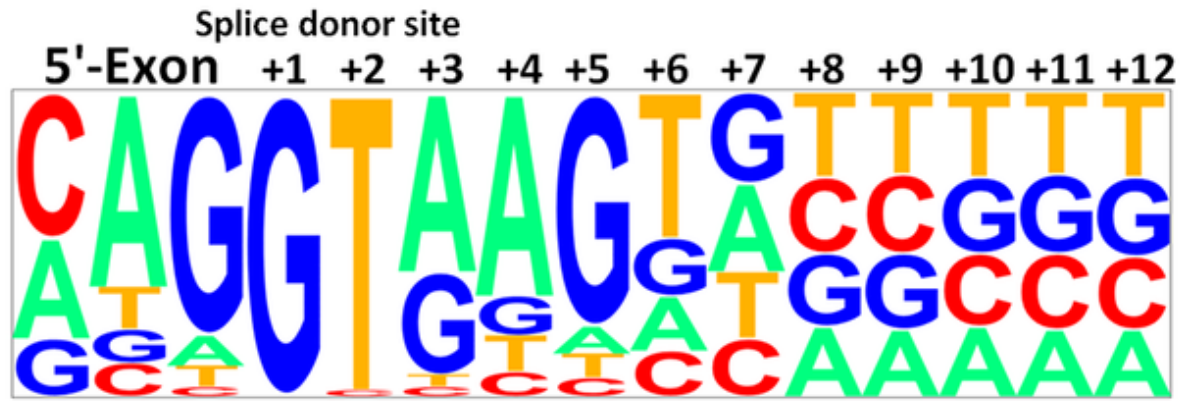
10.

Detekce Exon/Intron předělu

- Začátky a konce exonu jsou signalizovány dvojicemi dvou-nukleotidových úseků GT a AC tzv. donor a acceptor sites.
- GT a AC jsou krátké sekvence a vyskytují se velmi často => detekce je obtížná.
- Vykazují však zajímavé statistické okolí.

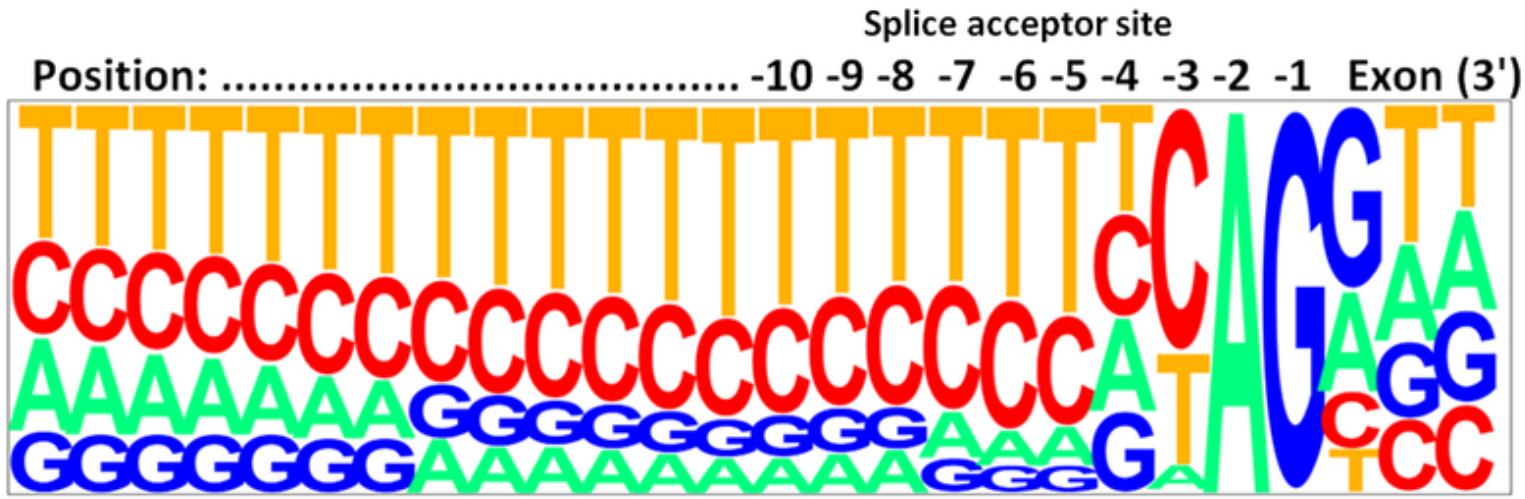
Detekce Exon/Intron předělů - statistika u lidských genů

A



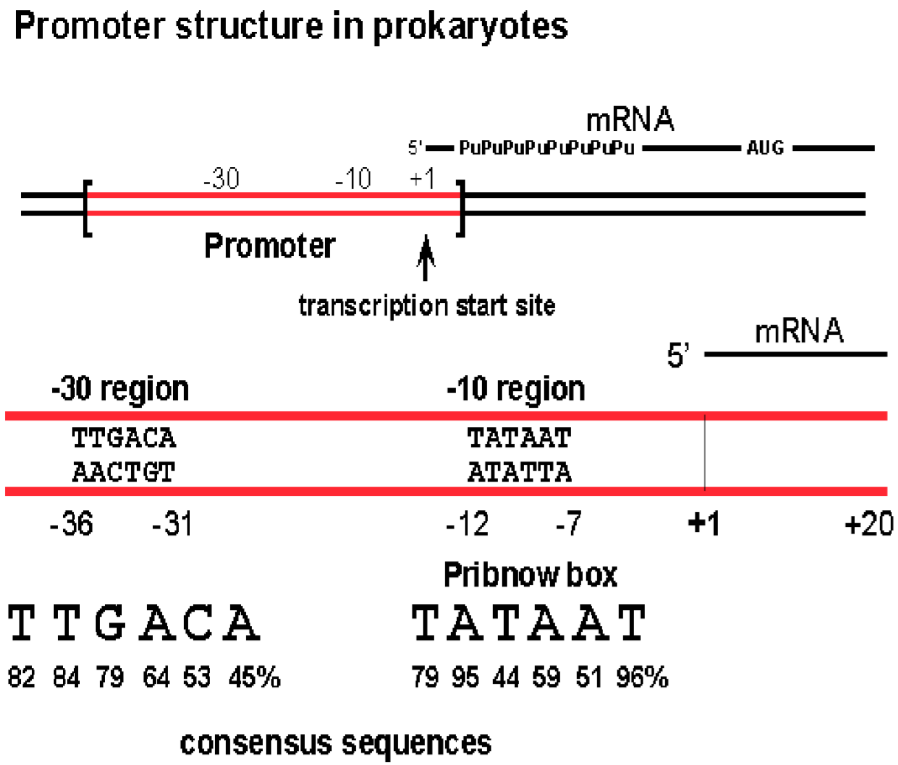
A	32.9%	63.6%	9.8%	0.2%	0.1%	59.1%	67.7%	9.1%	17.7%	29.4%	22.6%	22.1%	22.7%	22.1%	21.7%
T	12.2%	13.8%	6.9%	0.1%	98.4%	3.4%	11.7%	8.0%	47.5%	21.9%	28.6%	27.1%	27.8%	27.3%	28.5%
G	18.8%	11.8%	80.4%	99.6%	0.1%	34.2%	12.4%	76.7%	19.3%	29.6%	23.7%	24.3%	25.6%	26.0%	25.8%
C	36.0%	10.8%	2.8%	0.1%	1.4%	3.3%	8.1%	6.2%	15.4%	19.1%	25.1%	26.5%	23.9%	24.6%	24.1%
Consensus	C	A	G	G	T	A	A	G	T	G	T	T	T	T	T

B



A	23.5%	22.6%	21.3%	20.1%	18.0%	16.4%	14.8%	13.5%	12.5%	11.6%	10.6%	9.8%	9.1%	9.1%	10.2%	11.2%	11.7%	9.2%	9.6%	23.8%	6.3%	99.7%	0.1%	25.9%	24.9%	25.9%
T	36.8%	36.9%	37.9%	39.4%	40.7%	42.4%	44.1%	45.3%	46.2%	48.1%	49.8%	51.5%	54.6%	51.6%	49.0%	46.3%	45.8%	50.1%	54.2%	28.1%	28.7%	0.1%	0.1%	11.5%	36.4%	27.2%
G	15.6%	15.4%	15.2%	14.9%	14.9%	14.4%	14.0%	13.7%	13.0%	12.4%	11.9%	10.9%	10.4%	11.0%	11.6%	10.6%	9.5%	6.8%	6.8%	20.9%	0.8%	0.1%	99.6%	47.8%	19.4%	23.7%
C	25.1%	25.1%	25.6%	25.6%	26.4%	26.8%	27.1%	27.4%	28.3%	27.9%	27.7%	27.8%	26.0%	28.3%	29.2%	31.9%	33.0%	33.9%	29.4%	27.2%	64.3%	0.1%	0.2%	14.7%	19.3%	23.2%
Consensus	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	A	G	G	T	T

Promotery



- Transkripce začíná indexem 0.
- Pribnow Box (-10)
- Gilbert Box (-30)
- Místo nasednutí ribozomu (+10)

Vyhodnocení Charakteristik

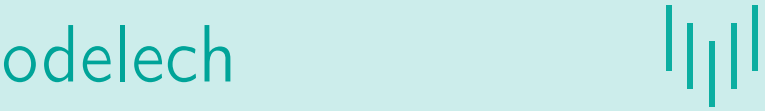
- Charakteristiky použity k vytvoření trénovacích datasetů.
- Detekce se stává klasifikačním problémem.

Table 2. Percentage accuracy (average of specificity and sensitivity) of the coding measures in predicting region coding

Measure	Human 54 Penrose	Human 108 Penrose	Human 162 Penrose	*E.coli* 54 Penrose	Human 54 Classical
Hexamer	70.5	73.1	74.2	67.5	–
Position Asymmetry	70.2	76.6	80.6	61.6	70.3
Dicodon Usage	70.2	72.9	73.9	67.5	–
Fourier	69.9	76.5	80.8	61.3	69.9
Hexamer-1	69.9	72.6	73.8	66.8	–
Hexamer-2	69.9	72.6	73.8	66.7	–
Run	66.6	70.3	71.3	63.6	67.9
Codon Usage	65.2	68.0	69.5	64.1	66.
Repeat	65.1	69.9	73.1	62.4	–
Autocorrelation	64.9	71.1	77.0	58.2	64.9
Dinucleotide Bias	62.9	55.5	50.7	55.9	62.7
Diamino Acid Usage	62.8	66.3	67.8	61.3	–
Composition	61.7	64.1	65.9	61.7	61.3
Amino Acid Usage	60.6	63.4	64.7	59.7	61.3
Word	59.5	66.4	71.4	56.6	61.0
Entropy	58.4	63.1	66.2	55.0	58.4
Dinucleotide Frame	58.0	62.9	66.6	54.6	58.0
Open Reading Frame	57.8	59.2	60.7	57.4	57.8
Stability Hydrophobicity	55.5	57.5	58.7	55.5	55.5
Codon Prototype	54.7	56.1	56.4	54.7	54.7
Period 9	52.5	53.0	52.8	51.8	52.4

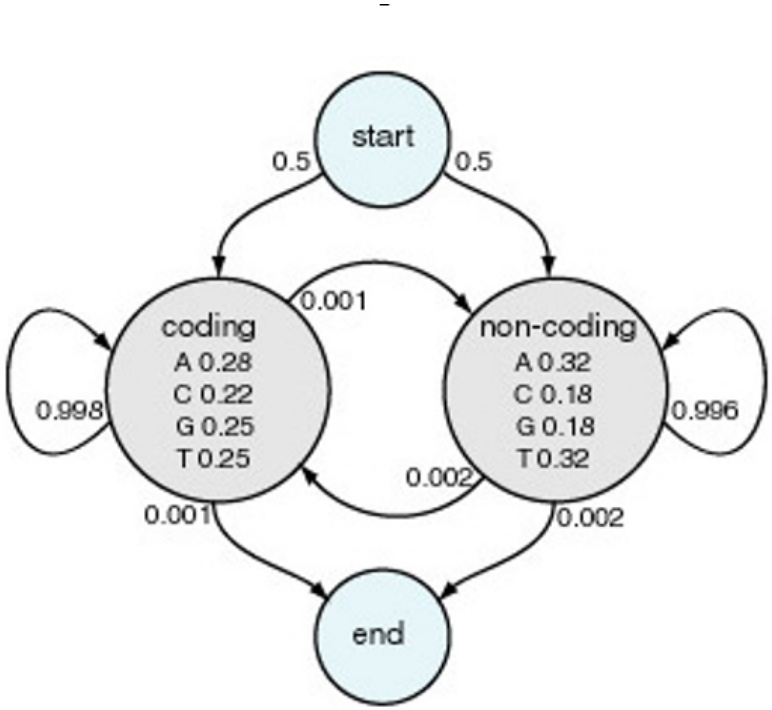
Data from five benchmark situations are shown, with varying data set (Human or *E.coli*), window length (54, 108, or 162) and decision method (Penrose discriminant or Classical linear discriminant).

Metody založené na Markovových modelech



- První program založený na Markovových modelech GeneMark.
- Předpoklad, že dlouhé ORF sekvence jsou geny => slouží jako trénovací dataset, např. Glimmer
- Obecně použijeme Markovův model pro ohodnocení pravděpodobnosti, že daná sekvence odpovídá modelu.
- Vybíráme takovou interpretaci sekvence, která má nejvyšší pravděpodobnost.
- Markovův model sestavujeme z již existujících anotovaných sekvencí genů.

Jednoduchý Markovův model pro Prokaryoty

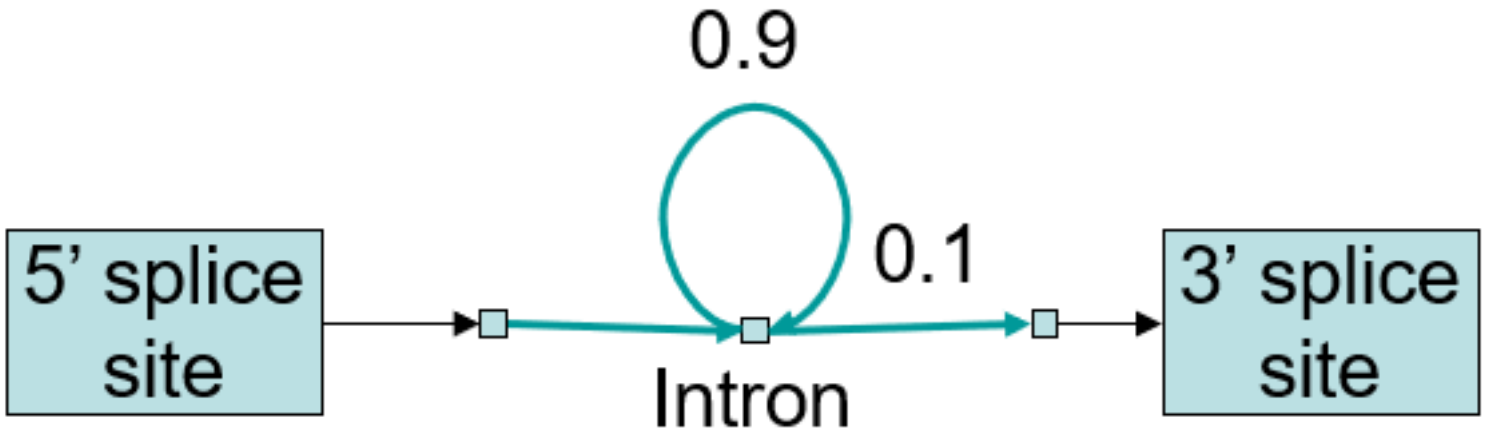


$$\Phi = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0.5 & 0.998 & 0.002 & 0 \\ 0.5 & 0.001 & 0.996 & 0 \\ 0 & 0.001 & 0.002 & 0 \end{bmatrix}$$

$$H = \begin{bmatrix} 0.28 & 0.32 \\ 0.22 & 0.18 \\ 0.25 & 0.18 \\ 0.25 & 0.32 \end{bmatrix}$$

- $x_m(i)$ - pravděpodobnost, že jsme ve stavu m na pozici i
- $H(m, y_i)$ - pravděpodobnost, že zvolíme symbol y_i ve stavu m.
- Φ_{mk} - Pravděpodobnost, že přejdeme ze stavu k do stavu m.

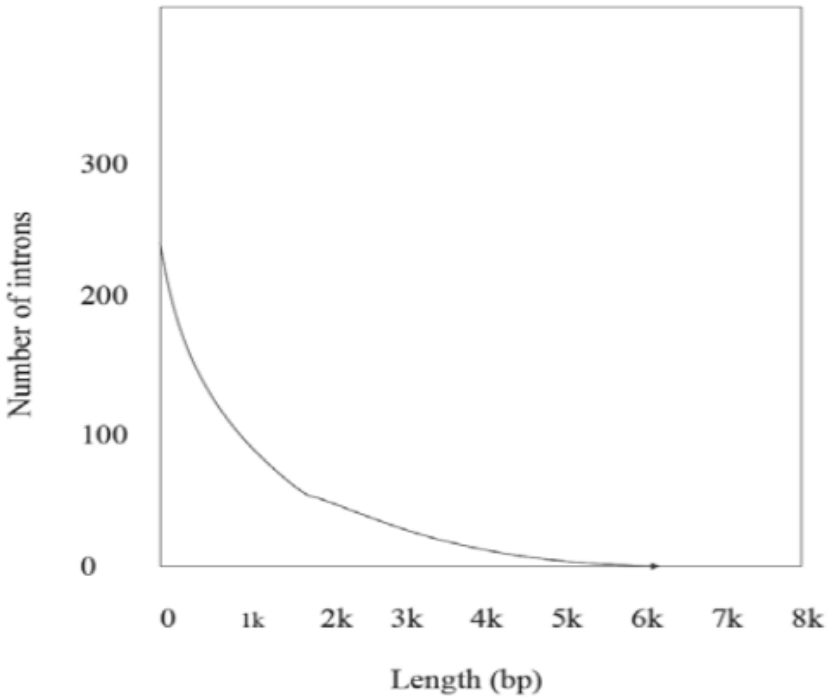
Příklad



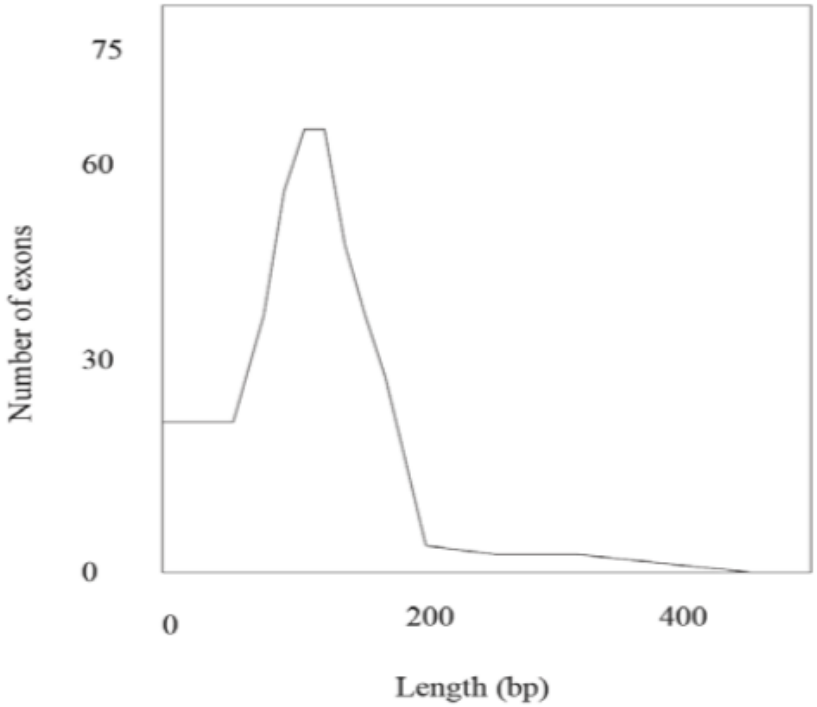
- Předpokládejme, že každá modrá šipka vyprodukuje jeden symbol.
- Jaká je pravděpodobnost, že intron bude mít délku právě 4 nukleotidy (uvažujeme pouze GT,AG)? 10%
- Jaká je pravděpodobnost, že intron bude mít délku právě 5 nukleotidů (uvažujeme GT,AG a jeden nukleotid)? 9%
- Jaká je pravděpodobnost, že intron bude mít délku právě 6 nukleotidů (uvažujeme GT,AG a dva nukleotidy)? 8.1%

Markovovy modely řešením?

Výpočet délek Markovových řetězců pro exony/introny vede na geometrické rozdělení: $p^k(1-p)$ => neodpovídá realitě:



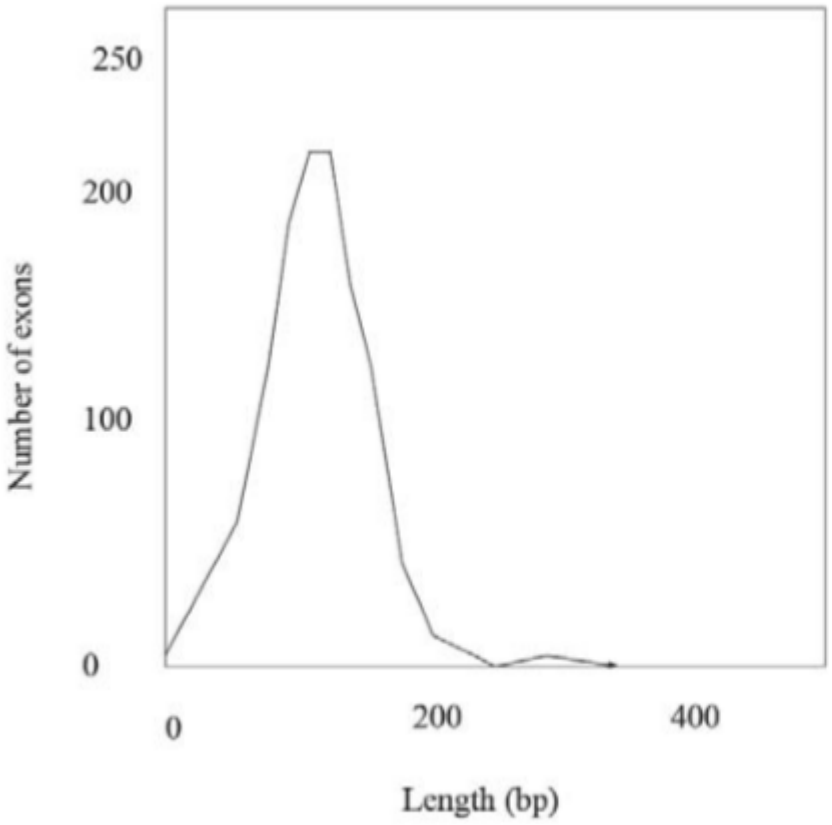
introns



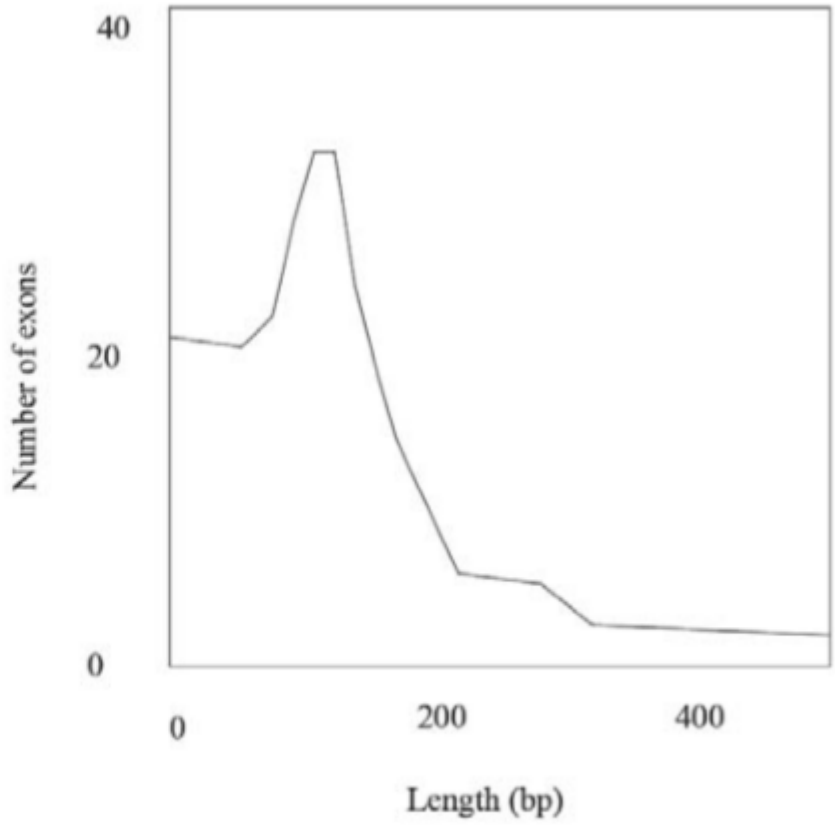
initial exons

Markovovy modely řešením?

Výpočet délek Markovových řetězců pro exony/introny vede na geometrické rozdělení: $p^k(1-p)$ => neodpovídá realitě:



internal exons



terminal exons

Metody založené na dynamickém programování

- Například nástroj Prodigal.
- Nepoužívá dlouhé ORF sekvence => vedou k chybným predikcím v případech sekvencí bohatých na GC nukleotidy.
- Stop kodony: TAA, TGA a TAG obsahují AT, jejich četnost u organismů s vysokým obsahem GC nukleotidů je nižší a tudáž vede k vyšší pravděpodobnosti zachycení delších ORF.
- V kódující DNA obsah GC na třetí pozici v kodonu je vyšší oproti nekódující DNA.

Homologie

- Evoluce kódujících oblastí je pomalejší, než evoluce nekódujících oblastí.
- Umožňuje porovnat genomovou sekvenci s příbuzným organismem a najít podobné anotované sekvence.
- Nejrozšířenější nástroj BLAST.
- Nejspolehlivější metoda pro predikci genů.
- Společně se sekvencí obvykle obdržíme také anotaci (k určení funkce genu).
- Limitem metody je neúplný obsah databází proteinových sekvencí. Některé příbuzné orgranismy stále nemusí být vůbec v databázích.

Komparativní metody

Daná DNA sekvence je porovnána s podobnou DNA sekvencí z evolučně blízkého organismu. Geny jsou predikovány v obou sekvencích na základě hypotézy, že exony se při evoluci zachovávají, zatímco introny ne.

- CEM - conserved exon method.
- TWINSCAN - použití Markovových modelů a podobnosti genomů..

Shrnutí

- Obecně jsou softwarové nástroje specifické pro každý organismus.
- Nejlépe fungují na genech, které jsou podobné nějakým již anotovaným genům.
- Schopny nalézt protein kódující oblasti daleko lépe než nekódující oblasti.
- Všechny modely jsou nedokonalé.

Budoucnost?

- Stále spousta prostoru pro další rozvoj => především porozumění inicializace translace.
- Schopnost predikovat geny je silně závislá na GC obsahu sekvencí.
- Odhadovalo se, že 10-30% anotovaným genů v databázích jsou náhodné ORF.
- Shrnutí: neexistuje nástroj, který by se 100% přesností našel všechny geny.

DÄŻkuji za pozornost

Michal Vašinek

VŠB – Technická univerzita Ostrava

FEI/EA404

michal.vasinek@vsb.cz

6. listopadu 2019

VŠB TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA | FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A INFORMATIKY