Oznamy

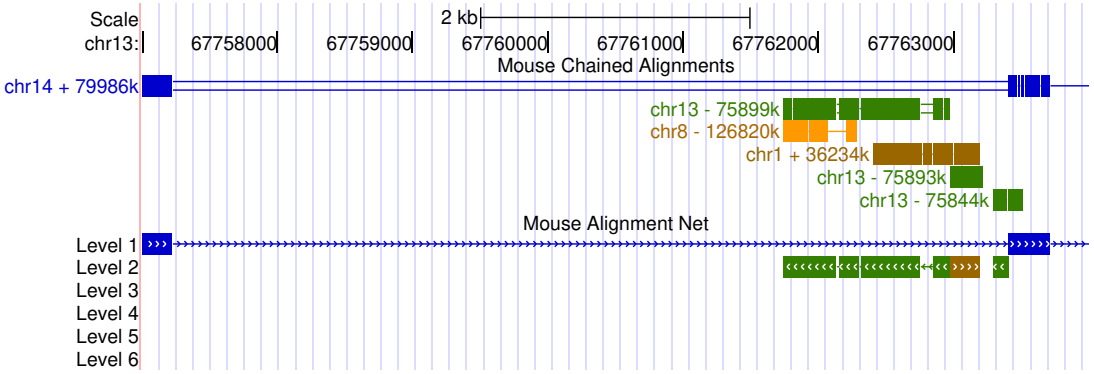
- Výber článku na journal club formulárom na stránke do budúcej stredy 23.10. 22:00.
- Domáca úloha 1 bude zverejnená budúci týždeň
- Nezabudnite na pravidelné kvízy, ak je niečo nejasné, pýtajte sa.

Zarovnávanie sekvencií 2/2

(sequence alignment)

Tomáš Vinař

17.10.2024



Zhrnutie z minulej prednášky

- **Problém globálneho a lokálneho zarovnania**

  Vstup: sekvencie $X = x_1 x_2 \ldots x_n$ a $Y = y_1 y_2 \ldots y_m$.

  Výstup:

  globálne: zarovnanie X a Y s najvyšším skóre

  lokálne: zarovnania podreťazcov $x_i \ldots x_j$ a $y_k \ldots y_\ell$ s najvyšším skóre.

- **Správny algoritmus na riešenie**

  dynamické programovanie

- **Realistické skórovacie schémy**

Máme správny algoritmus na zarovnávanie, čo viac nám chýba?

Časová zložitosť: $O(n^2)$ na dvoch sekvenciách dĺžky n.

Koľko je to času v skutočnosti?

(jednoduchá implementácia, náhodné sekvencie dĺžky n,

bežný počítač)

n	čas výpočtu
1,000	0.02s
10,000	1.5s
100,000	2.5 minúty (*)
1,000,000	4 hodiny (*)
10,000,000	17 dní (*)
100,000,000	5 rokov (*)
1,000,000,000	476 rokov (*)

Potrebujeme efektívnejší algoritmus,

najmä ak chceme pracovať s celými genómami

Pamäť: základný algoritmus $O(n^2)$, dá sa zlepšiť na $O(n)$.

Heuristické lokálne zarovnávanie

- Nie je zaručené, že nájdeme najlepšie zarovnanie, ale program pobeží rýchlejšie.
- Prehľadá iba "sľubné" časti dyn. prog. matice.

Napríklad: BLASTN (Altschul et al 1990),
FASTA (Pearson a Lipman 1988)

- Nájdi krátke zhodujúce sa úseky dĺžky w (jadrá zarovnania).
- Rozšír každé jadro pozdĺž uhlopriečky na zarovnanie bez medzier.
- Spoj zarovnania na neďalekých uhlopriečkach medzerami.
- Lokálne vylepši zarovnanie dynamickým programovaním (možno vynechať).

Ako nájdeme jadrá, zhodujúce sa úseky?

- Vybudujeme "slovník" úsekov dĺžky w z prvej sekvencie.
- Nájdeme každý úsek z druhej sekvencie v slovníku.

Príklad: CAGTCCTAGA vs CATGTCATA

Slovník:

```
AG 2, 8
CA 1
CC 5
CT 6
GA 9
GT 3
TA 7
TC 4
```

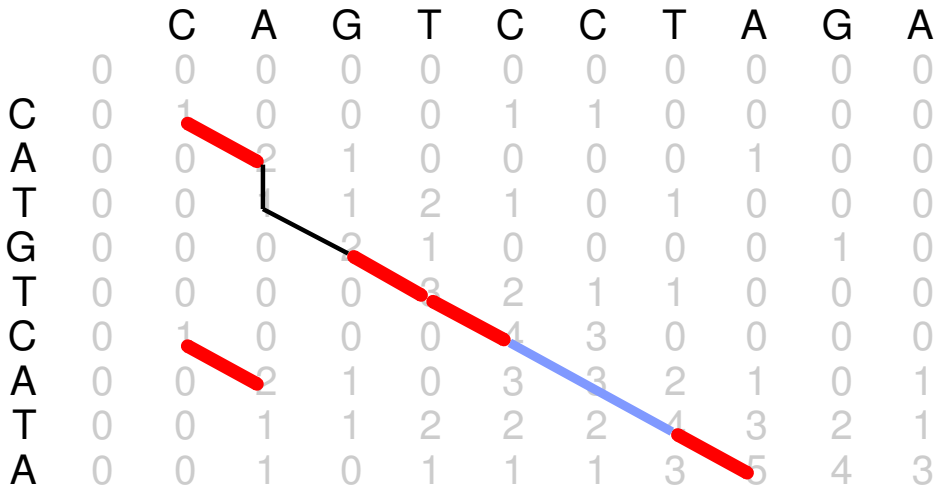
Hľadaj:

```
CA → 1
AT → -
TG → -
GT → 3
TC → 4
CA → 1
AT → -
TA → 7
```

Heuristické lokálne zarovnávanie

Príklad: začíname z jadier dĺžky $w = 2$

(V praxi sa používa $w = 11$ a viac.)



1. nájdi zhodné úseky
2. rozšír bez medzier
3. spoj medzerami

Rýchlosť heuristického algoritmu

Algoritmus:

- Nájdi jadrá zarovnaní (krátke zhodujúce sa úseky dĺžky w).
- **Drahý krok:** Rozširovanie/spájanie jadier do väčších zarovnaní.

Náhodné zhody dĺžky w: nie sú časťou zarovnania s vysokým skóre.

Vyfiltrujeme ich pri rozširovaní, ale spomaľujú program.

Koľko náhodných jadier?

Dva nukleotidy sa zhodujú s pravdepodobnosťou $1/4$.

Jadro, t.j. w zhôd za sebou s pravdepodobnosťou 4^{-w}.

Stredná hodnota počtu jadier $nm4^{-w}$.

Zvýšenie w o 1 zníži jadier cca 4 krát.

Senzitivita heuristického algoritmu

Algoritmus:

- Nájdi jadrá zarovnaní (krátke zhodujúce sa úseky dĺžky w).
- **Drahý krok:** Rozširovanie/spájanie jadier do väčších zarovnaní.

Nenájdené zarovnania: vysoké skóre, ale nemajú jadro dĺžky w

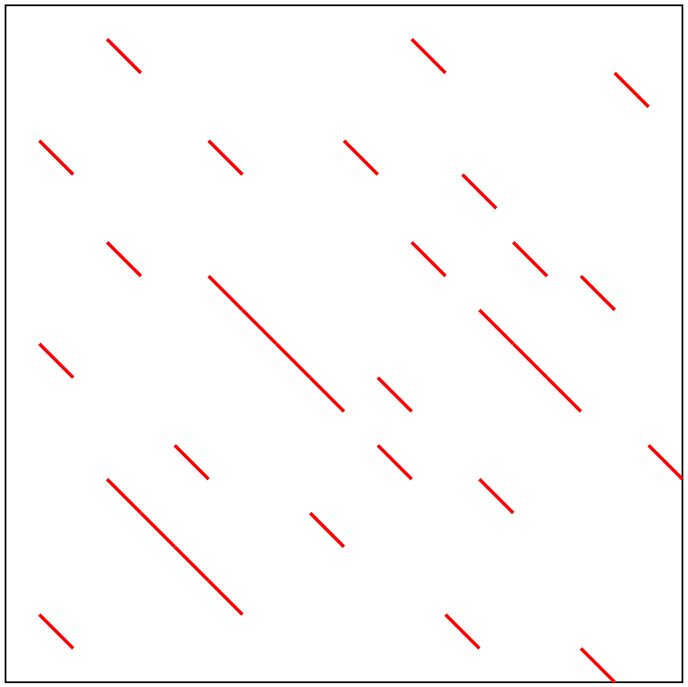
Príklad:
```
CA-GTCCTA
||  |||  ||
CATGTCATA
```
nenájdeme pre $w \geq 4$

Senzitivita: aká časť skutočných zarovnaní obsahuje jadro, t.j. zhodu dĺžky w

Rýchlosť vs. senzitivita

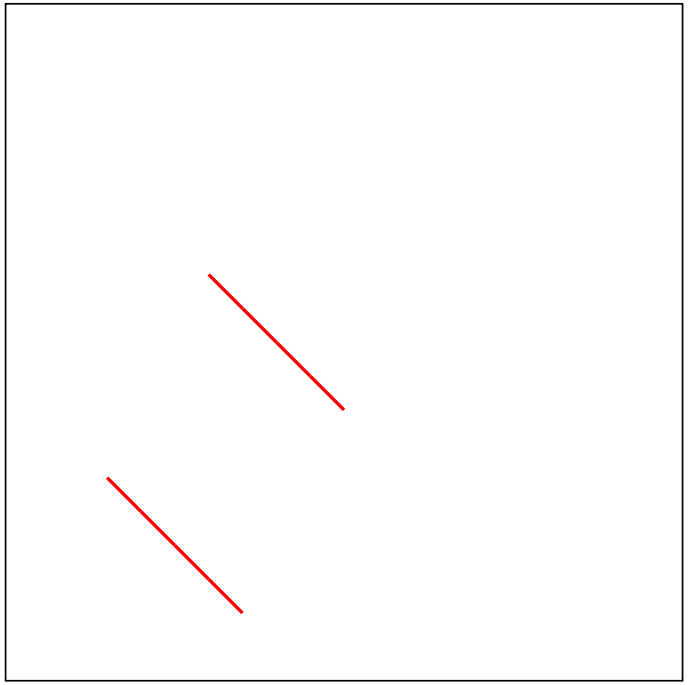
Malé w

veľa náhodných zhôd, pomalé



Veľké w

nenájdeme veľa zarovnaní



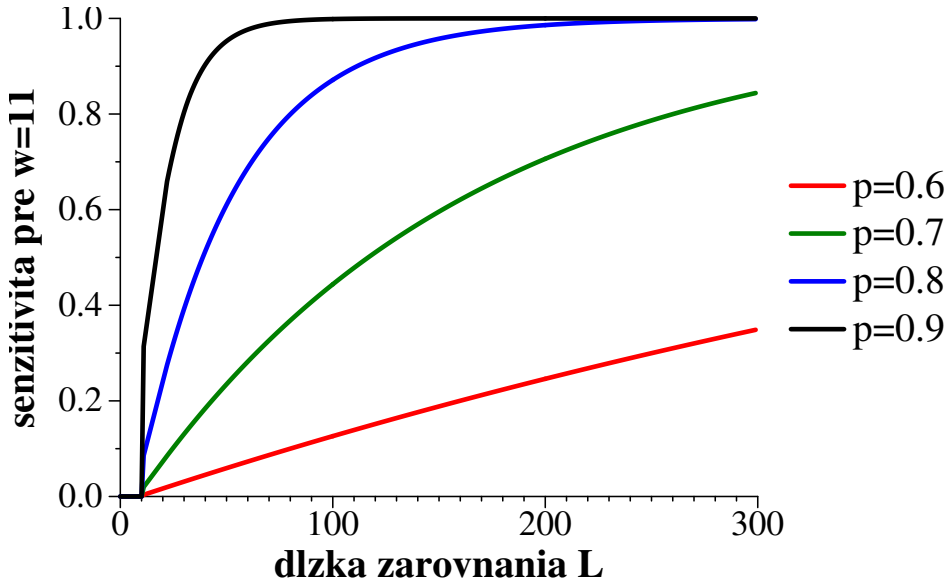
Senzitivita heuristického algoritmu

Odhad senzitivity:

Predpokladáme zarovnanie bez medzier, dĺžky L

Každá pozícia je zhoda s pravdepodobnosťou p

$f(L,p) = \Pr(\text{zarovnanie obsahuje } w \text{ zhôd za sebou})$



(človek-myš: $p \approx 0.7$)

BLAST algoritmus pre proteíny

BLOSUM62 skórovacia matica pre proteíny

```
   A  R  N  D  C  Q  E  G  H  I ...
A  4 -1 -2 -2  0 -1 -1  0 -2 -1
R -1  5  0 -2 -3  1  0 -2  0 -3
N -2  0  6  1 -3  0  0  0  1 -3
D -2 -2  1  6 -3  0  2 -1 -1 -3
C  0 -3 -3 -3  9 -3 -4 -3 -3 -1
Q -1  1  0  0 -3  5  2 -2  0 -3
E -1  0  0  2 -4  2  5 -2  0 -3
G  0 -2  0 -1 -3 -2 -2  6 -2 -4
H -2  0  1 -1 -3  0  0 -2  8 -3
I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3  4
```

Proteínový BLAST namiesto zhody dĺžky w vyžaduje 3 aminokyseliny so skóre aspoň 13

Áno:
```
N I R
N L R

6+2+5=13
```

Nie:
```
A I L
A I L

4+4+4=12
```

Príklady programov na rôzne účely

NCBI BLAST: blastn pre DNA/RNA, blastp pre proteíny,
tblastx preloží DNA do proteínu a použije blastp

UCSC Blat: pomerne rýchle vyhľadávanie veľmi podobných sekvencií, napr. kde je daná sekvencia v genóme

- používa veľké w
- vie nájsť zarovnania s veľkými medzerami (napr. intróny pri mRNA)

Minimap2: mapuje dlhé čítania na genóm alebo porovnáva dva príbuzné genómy

- používa techniku minimizerov na ušetrenie pamäti (neukladá všetky úseky dĺžky w)
- veľmi rýchly

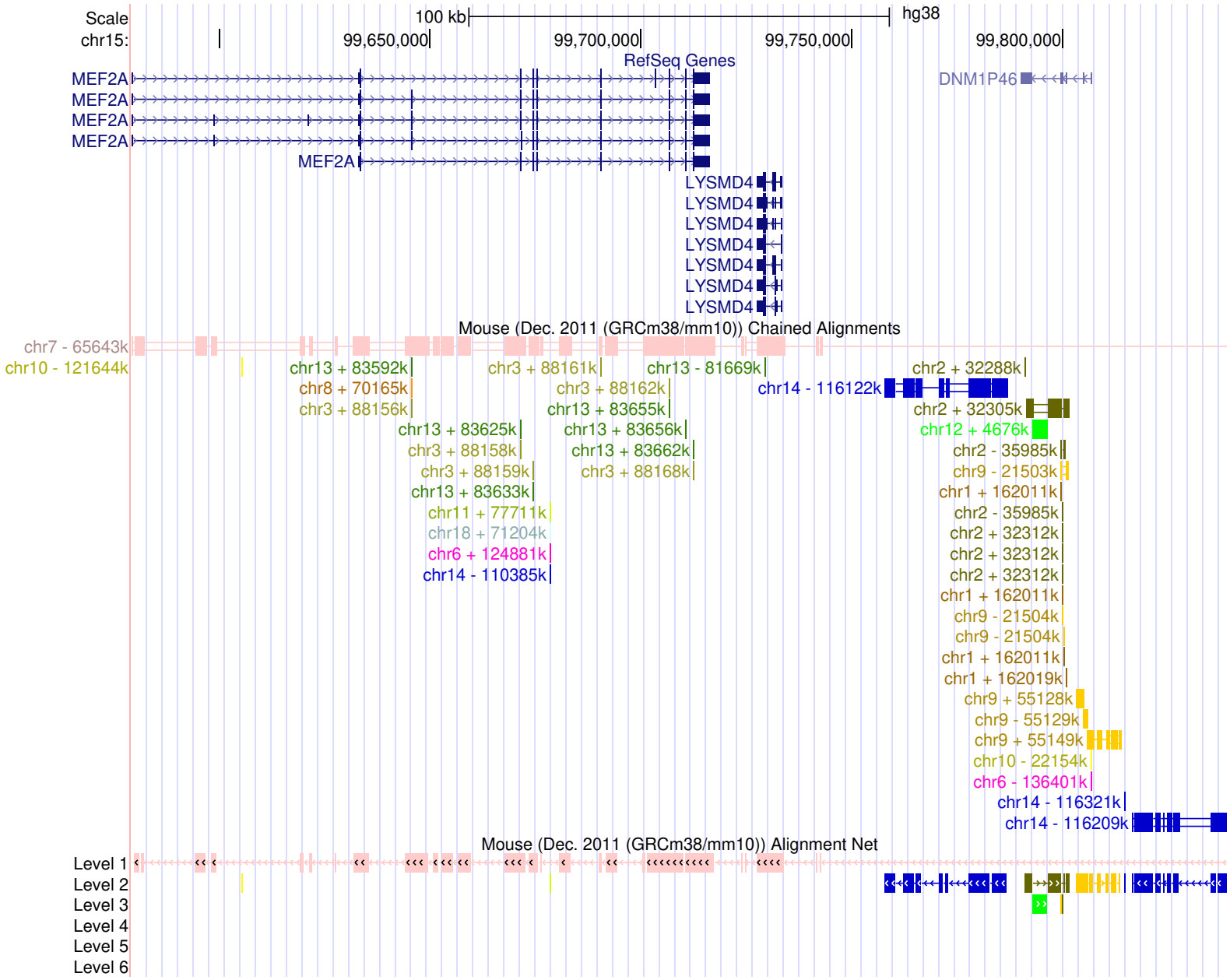
BWA-MEM/BWA-MEM2: mapuje krátke čítania na genóm

- namiesto jadier fixnej dĺžky používa maximálne presné zhody, zložitejšie dátové štruktúry

Genomické zarovnania (whole-genome alignments)

Ku každému úseku ľudského genómu nájsť zodpovedajúcu časť z myši, psa, sliepky, atď. (predpočítané v UCSC browseri)

- Lokálne zarovnania nájdu exóny a iné zachované časti, sú však úseky, ktoré sa príliš zmenili.
- Pri duplikovaných úsekoch nevieme rozhodnúť, ktoré dvojice úsekov patria k sebe.
- **Synténia (synteny):** lokálne zarovnania, ktoré sa nachádzajú v dvoch genómoch v tom istom poradí a orientácii.
  Pomáha nám určiť, ktoré dvojice úsekov vznikli z tej istej oblasti v spoločnom predkovi (ortológy)


Scale
chr15:
100 kb
hg38
99,650,000
99,700,000
99,750,000
99,800,000
RefSeq Genes
MEF2A
MEF2A
MEF2A
MEF2A
MEF2A
DNM1P46
LYSMD4
LYSMD4
LYSMD4
LYSMD4
LYSMD4
LYSMD4
LYSMD4
Mouse (Dec. 2011 (GRCm38/mm10)) Chained Alignments
chr7 - 65643k
chr10 - 121644k
chr13 + 83592k
chr8 + 70165k
chr3 + 88156k
chr3 + 88161k
chr3 + 88162k
chr13 + 83655k
chr13 - 81669k
chr13 + 83625k
chr3 + 88158k
chr3 + 88159k
chr13 + 83633k
chr11 + 77711k
chr18 + 71204k
chr6 + 124881k
chr14 - 110385k
chr13 + 83656k
chr13 + 83662k
chr3 + 88168k
chr14 - 116122k
chr2 + 32288k
chr2 + 32305k
chr12 + 4676k
chr2 - 35985k
chr9 - 21503k
chr1 + 162011k
chr2 - 35985k
chr2 + 32312k
chr2 + 32312k
chr2 + 32312k
chr1 + 162011k
chr9 - 21504k
chr9 - 21504k
chr1 + 162011k
chr1 + 162019k
chr9 + 55128k
chr9 - 55129k
chr9 + 55149k
chr10 - 22154k
chr6 - 136401k
chr14 - 116321k
chr14 - 116209k
Mouse (Dec. 2011 (GRCm38/mm10)) Alignment Net
Level 1
Level 2
Level 3
Level 4
Level 5
Level 6

Viacnásobné zarovnanie, multiple sequence alignment

Cieľ: Zarovnaj viacero sekvencií.

```
      Human  ctccatagcaatgt-cagagatagggcagagcggat------ggtggtgac
     Rhesus  ctccatggcaatgt-cagagatagggcagagcggat------gctggtgac
      Mouse  ttt--tgacaaca--tagagac-tgagatagaaaat-------atgctgac
        Dog  -tccccgctaatgtacaaagatggggcag-gaaga--a----tgtgctgaa
      Horse  -tccacggcaatac-tggagatggggcagagcaga--agat-ggtgatgaa
  Armadillo  ctgcatagaaatct-cagagatgggggaaagcaga------agacattcat
    Opossum  atccatggaaacat-cagaagtgggagaaatagaaga----tggcaatga-
   Platypus  acccggggaagggg-aagaggaagggccggccg-----------------
```

Ako by ste riešili skórovanie, aký by ste použili algoritmus?

Viacnásobné zarovnanie, multiple sequence alignment

```
      Human  ctccatagcaatgt-cagagatagggcagagcggat------ggtggtgac
     Rhesus  ctccatggcaatgt-cagagatagggcagagcggat------gctggtgac
      Mouse  ttt--tgacaaca--tagagac-tgagatagaaaat-------atgctgac
        Dog  -tccccgctaatgtacaaagatggggcag-gaaga--a----tgtgctgaa
      Horse  -tccacggcaatac-tggagatggggcagagcaga--agat-ggtgatgaa
  Armadillo  ctgcatagaaatct-cagagatgggggaaagcaga------agacattcat
    Opossum  atccatggaaacat-cagaagtgggagaaatagaaga----tggcaatga-
   Platypus  acccggggaagggg-aagaggaagggccggccg-----------------
```

Skórovanie: napr. súčet párových skór všetkých dvojíc sekvencií.

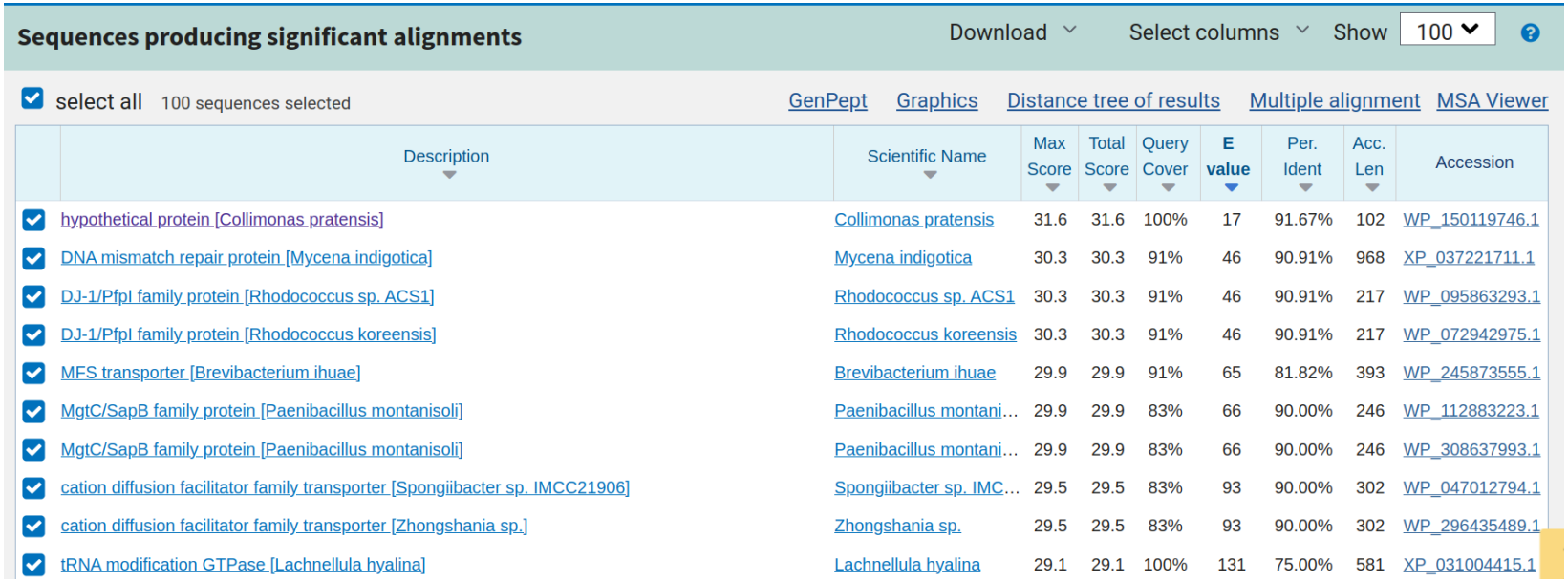
V každej dvojici vyhodím stĺpce s dvomi pomlčkami.

Zložitosť dynamického programovania: $O(2^k n^k)$ pre k sekvencií dĺžky n.

Pre všeobecné k NP-ťažké.

Heuristické algoritmy, napr. CLUSTAL-W, MUSCLE, TBA, MAFFT.

Často zarovnávajú hierarchicky vždy dve skupiny do jednej väčšej.



Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
hypothetical protein [Collimonas pratensis]	Collimonas pratensis	31.6	31.6	100%	17	91.67%	102	WP_150119746.1
DNA mismatch repair protein [Mycena indigotica]	Mycena indigotica	30.3	30.3	91%	46	90.91%	968	XP_037221711.1
DJ-1/PfpI family protein [Rhodococcus sp. ACS1]	Rhodococcus sp. ACS1	30.3	30.3	91%	46	90.91%	217	WP_095863293.1
DJ-1/PfpI family protein [Rhodococcus koreensis]	Rhodococcus koreensis	30.3	30.3	91%	46	90.91%	217	WP_072942975.1
MFS transporter [Brevibacterium ihuae]	Brevibacterium ihuae	29.9	29.9	91%	65	81.82%	393	WP_245873555.1
MgtC/SapB family protein [Paenibacillus montanisoli]	Paenibacillus montani...	29.9	29.9	83%	66	90.00%	246	WP_112883223.1
MgtC/SapB family protein [Paenibacillus montanisoli]	Paenibacillus montani...	29.9	29.9	83%	66	90.00%	246	WP_308637993.1
cation diffusion facilitator family transporter [Spongiibacter sp. IMCC21906]	Spongiibacter sp. IMC...	29.5	29.5	83%	93	90.00%	302	WP_047012794.1
cation diffusion facilitator family transporter [Zhongshania sp.]	Zhongshania sp.	29.5	29.5	83%	93	90.00%	302	WP_296435489.1
tRNA modification GTPase [Lachnellula hyalina]	Lachnellula hyalina	29.1	29.1	100%	131	75.00%	581	XP_031004415.1

Výsledok programu BLAST voči RefSeq proteínovej databáze na serveroch NCBI https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

Download GenPept Graphics

hypothetical protein [Collimonas pratensis]

Sequence ID: WP_150119746.1 Length: 102 Number of Matches: 1

Range 1: 20 to 31 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Pr

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
31.6 bits(67)	17	11/12(92%)	11/12(91%)	0/12(0%)

```
Query  1   VIVALASVEGAS  12
           VIVALASV GAS
Sbjct  20  VIVALASVIGAS  31
```

Download GenPept Graphics

DNA mismatch repair protein [Mycena indigotica]

Sequence ID: XP_037221711.1 Length: 968 Number of Matches: 1

Range 1: 482 to 492 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Pr

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
30.3 bits(64)	46	10/11(91%)	10/11(90%)	0/11(0%)

```
Query  2    IVALASVEGAS  12
            IVALASVE AS
Sbjct  482  IVALASVEDAS  492
```

Ako rozlíšiť, či ide o významné zarovnanie?

Dĺžka dotazu m. Veľkosť databázy n.

Zarovnanie so skóre S.

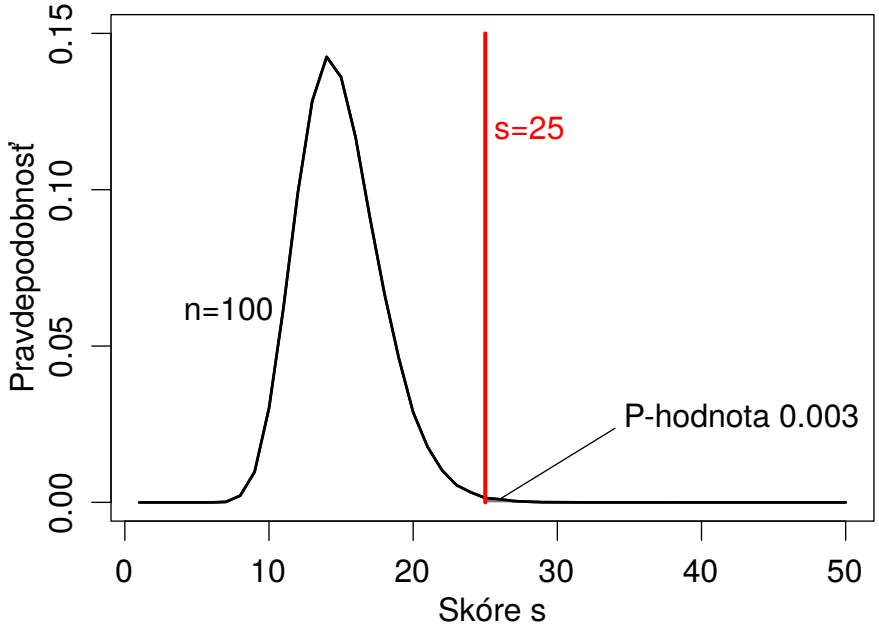
P-hodnota: Pravdepodobnosť, že pre náhodný dotaz dĺžky m v náhodnej databáze dĺžky n nájdeme zarovnanie so skóre aspoň S.

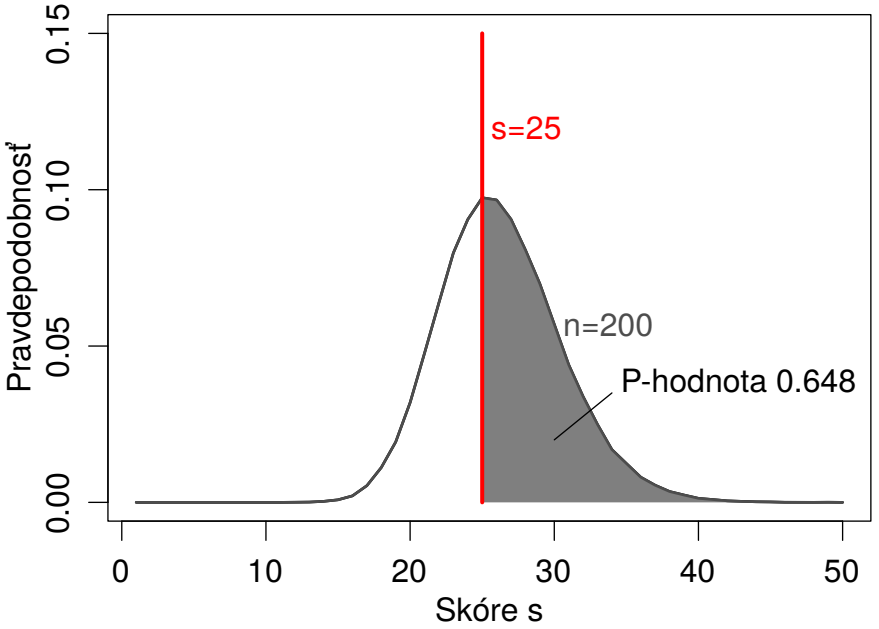
E-hodnota: Očakávaný počet zarovnaní so skóre aspoň S nájdených pre náhodný dotaz dĺžky m v náhodnej databáze dĺžky n.

Pri veľmi malých hodnotách sú E-hodnota a P-hodnota takmer identické.

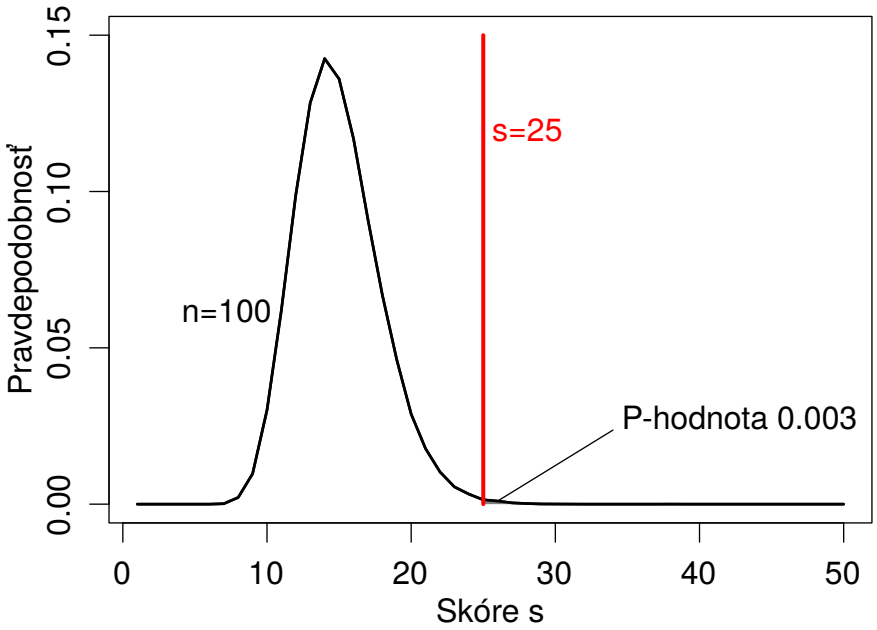
Výpočet P-hodnoty simuláciou

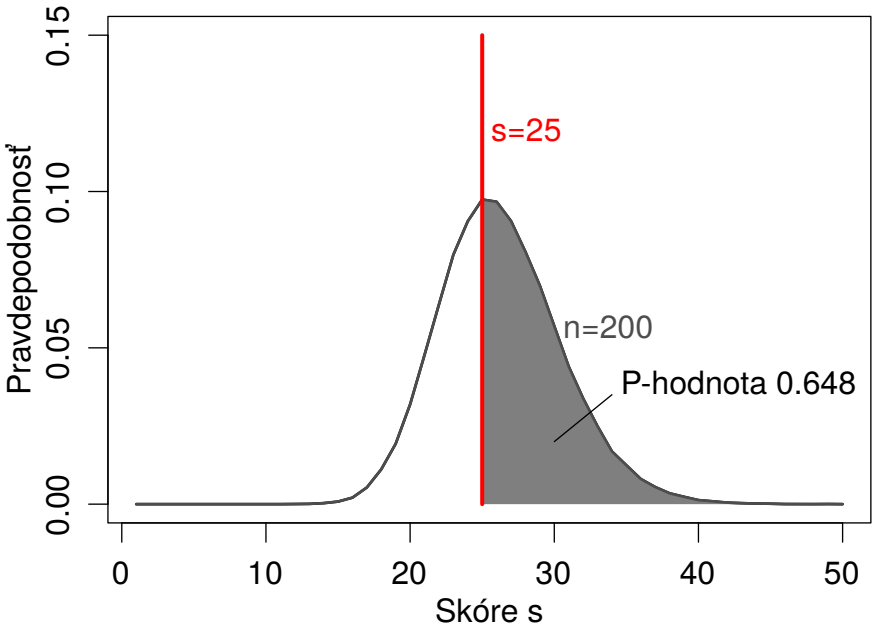
- Vygenerujeme náhodne dve sekvencie dĺžky n
- Spočítame ich najlepšie lokálne zarovnanie (schéma +1/-1)
- Zaznamenáme si výsledné skóre
- Opakujeme veľa krát





Výpočet P-hodnoty simuláciou (pokr.)





P-hodnota pre skóre 25:

Aká časť zarovnaní má skóre 25 alebo vyššie?

V praxi je simulácia pomalá, existujú matematické odhady rozdelenia.

Karlin and Althschul 1990, Dembo et al. 1994

Zhrnutie

- Zarovnávanie (alignment) je základný nástroj bioinformatiky
- Formulácia problému: voľba skórovacej schémy
- Riešenie problému: presné ale pomalé algoritmy a rýchlejšie heuristiky, ktoré nie vždy nájdu všetko
- Odhad štatistickej významnosti (E-hodnota, P-hodnota) je dôležitý nástroj na rozpoznávanie reálnych zarovnaní od tých, čo sa vyskytli náhodou
- Špecializované programy na rôzne úlohy súvisiace so zarovnávaním
  – Informatici na ďalších cvičeniach ďalšie finty na zlepšenie jadier
  – Biológovia ukážky použitia programov