БИОИНФОРМАТИКА 4

ПРОФ. ПЛАМЕНКА БОРОВСКА

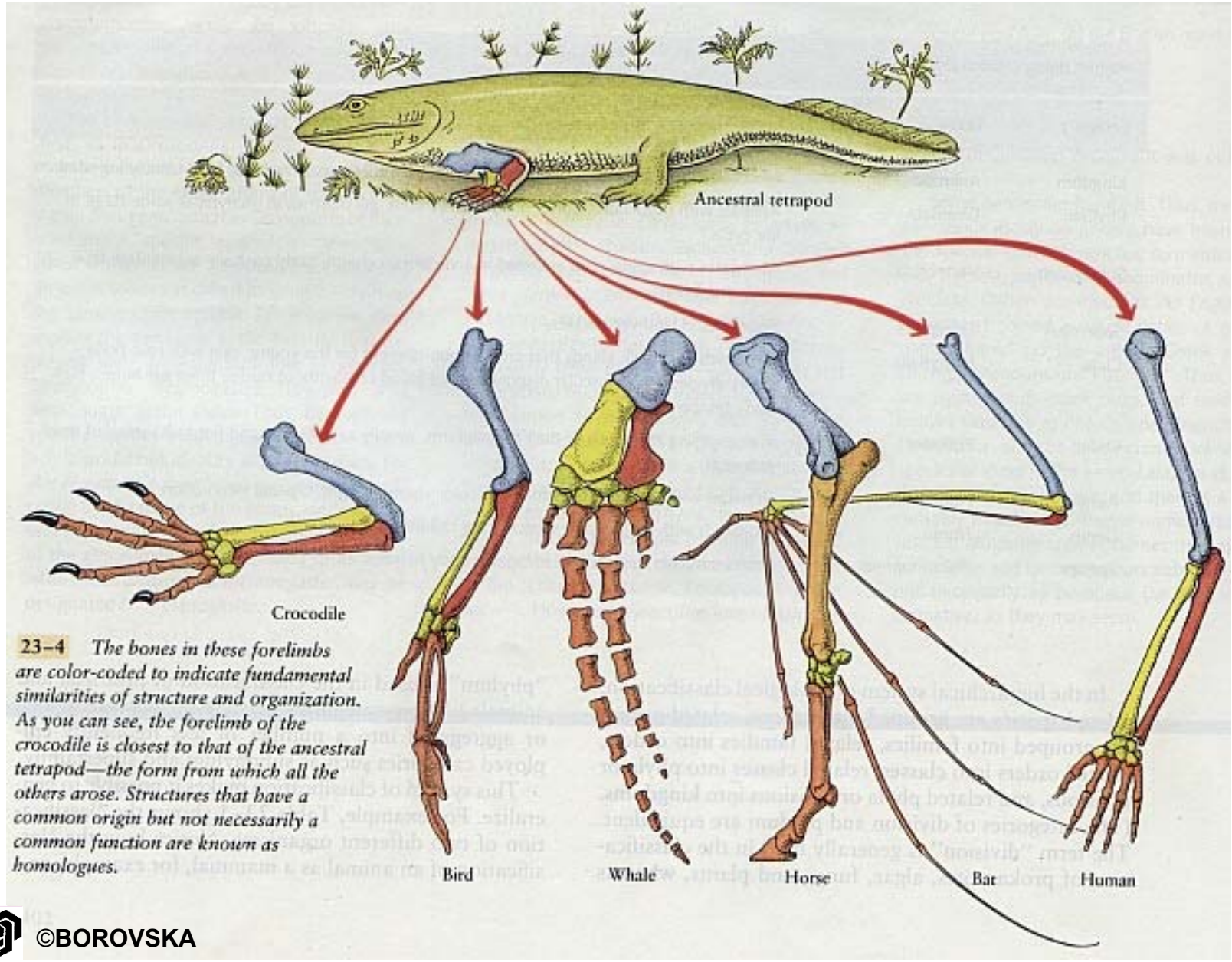
ПОДРЕЖДАНЕТО НА БИОЛОГИЧНИ СЕКВЕНЦИИ СЕ ИЗПОЛЗВА ЗА:

- *Предсказване на функционалност*
- *Търсене в биологични бази данни*
- *Откриване на гени*
- *Откриване на различията (дивергенция) между секвенциите*
- *Асемблиране на секвенции*

ПОДОБИЕ (СХОДСТВО) ПРИ СЕКВЕНЦИИТЕ

- **Хомология**: гени, които произлизат от един общ прародител – наричат се хомоложни гени ***(хомолози)***
- **Ортология:** хомоложни гени в различни организми ***(ортолози)***
- **Паралогия:** хомоложни гени в един организъм, които произхождат от **дублирането на гените** ***(паралози)***
- **Дублиране на гените**: създават се множество копия на един ген, като всяко копие на гена може да еволюира отделно и независимо от другите и да придобива нова функционалност

ХОМОЛОЗИ И ПАРАЛОЗИ



23–4 *The bones in these forelimbs are color-coded to indicate fundamental similarities of structure and organization. As you can see, the forelimb of the crocodile is closest to that of the ancestral tetrapod—the form from which all the others arose. Structures that have a common origin but not necessarily a common function are known as homologues.*

ПРИЧИНИ ЗА СХОДСТВАТА И РАЗЛИЧИЯТА МЕЖДУ СЕКВЕНЦИИТЕ

- ***Мутация***: в дадена позиция (определено място) на гена един нуклеотид се замества с ***друг*** нуклеотид
  (напр., ATA → AGA)

- ***Вмъкване***: в дадена позиция на гена нов нуклеотид се вмъква между два съществуващи нуклеотида
  (напр., AA → AGA)

- ***Заличаване***: в дадена позиция на гена се заличава съществуващ нуклеотид
  (напр., ACTG → AC-G)

- ***Вмъкване/заличаване (indel)***: вмъкване (insertio) или заличаване (deletion)

БИОЛОГИЧНИЯТ ПРОБЛЕМ ЗА ПОДРЕЖДАНЕ НА СЕКВЕНЦИИ

- Основна цел: откриване на сходствата между две (или повече) секвенции ДНК чрез намиране на сходните им участъци.

ДНК-секвенция1

```
tcctctgcctctgccatcat---caaccccaaagt
|||| ||| ||||| ||||| ||||||||||||||
tcctgtgcatctgcaatcatgggcaaccccaaagt
```

ДНК-секвенция2

Подреждане (Alignment) –
Привеждане в съответствие

ДЕФИНИРАНЕ НА ПОДРЕЖДАНЕТО НА СЕКВЕНЦИИ

- *Подреждането на биологични секвенции* представлява подреждането на две или повече секвенции по начин, който дава възможност за *откриване на сходството между тях.*
- В секвенциите се вмъкват необходимият брой празни позиции (gaps), които се отбелязват с тирета, така че, колоните да съдържат ***еднаквите символи*** в секвенциите

```
tcctctgcctctgccatcat---caaccccaaagt
||||  |||  |||||  |||||    ||||||||||||
tcctgtgcatctgcaatcatgggcaaccccaaagt
```

АЛГОРИТМИ ЗА ПОДРЕЖДАНЕ НА СЕКВЕНЦИИ

- Алгоритъм на Needleman-Wunsch – глобално подреждане по двойки (Pairwise global alignment).
- Алгоритъм на Smith-Waterman – локално или глобално подреждане по двойки (Pairwise, local or global alignment).
- BLAST - Pairwise – евристично локално подреждане (heuristic local alignment)

ПОДРЕЖДАНЕ ПО ДВОЙКИ

- *Основната цел на методите за подреждане на биологични секвенции по двойки е да се направи такова локално или глобално подреждане на нуклеотидните или протеиновите секвенции, което да открива максимален брой еднакви участъци в тях.*
- Най-често, целта е откриването на *хомолози* (*роднини*) на специфициран ген или или генни продукти в биологични бази данни с познати гени.
- *Получената информация е полезна при даването на отговор на различни биологични въпроси като:*
- 1. Идентифицирането на секвенции с *неизвестна* структура или функция.
- 2. Изследването на *молекулярната еволюция*.

ГЛОБАЛНО ПОДРЕЖДАНЕ

- *Глобалното подреждане на две секвенции обхваща всичките символи (нуклеотиди или протеини) на секвенциите.*
- *Подреждане = привеждане в съответствие*
- Най-често глобалното подреждане се използва за откриването на тясно свързани секвенции (много сходни секвенции).
- За същата цел се използват успешно и методите за локално подреждане.
- Освен това, съществуват усложнения при молекулярната еволюция, като напр., разместването на домейни (domain shuffling), които ограничават полезността на методите за глобално подреждане.

ГЛОБАЛНО ПОДРАВНЯВАНЕ

- Намиране на глобално подреждане на две секвенции, което показва всички еднакви символи
- Пример: секвенция **s** = VIVALASVEGAS и секвенция **t** = VIVADAVIS се подреждат глобално по следния начин:
- $A(\mathbf{s},\mathbf{t})$ =

```
V I V A L A S V E G A S
| | | |   |   |       |
V I V A D A - V - - I S
```

indels

АЛГОРИТЪМ НА NEEDLEMAN-WUNSCH

- Използва се както при нуклеотидните, така и при протеиновите секвенции
- Оценъчна функция за качеството на подреждането (*Alignment scoring function*)
- *Качеството на подреждането* (alignment cost) на два символа x_i и y_j се оценява с функцията $\sigma(x_i,y_j)$
- *Качеството на подреждането на целите секвенции се оценява посредством сумата от оценките на отделните символи в секвенциите*

$$M = \sum_{i=1}^{c} \sigma(x_i, y_i)$$

ПРОСТА ОЦЕНЪЧНА ФУНКЦИЯ

- Вмъкване на празна позиция в секвенцията

$$\sigma(-,a) = \sigma(a,-) = -1$$

- Различни символи на секвенциите в една и съща позиция (колона)

$$\sigma(a,b) = -1 \text{ if } a \neq b$$

- Еднакви символи на секвенциите в една и съща позиция (колона)

$$\sigma(a,b) = 1 \text{ if } a = b$$

ОЦЕНЪЧНА ФУНКЦИЯ

- Качеството (цената) на подреждането на двете секвенции **s** = VIVALASVEGAS и **t** = VIVADAVIS :

$A(\mathbf{s},\mathbf{t})$ =

```
V I V A L A S V E G A S
| | | |   |   |       |
V I V A D A - V - - I S
```

се оценява по следния начин:

***M*(*A*)** **= 7 съвпадения + 2 разлики + 3 празни позиции**
= 7 – 2 – 3 = 2

МАТРИЦА НА ЗАМЕСТВАНИЯТА (THE SUBSTITUTION MATRIX)

- По-реалистична оценъчна функция, която е инспирирана от биологията:

-	A	G	C	T
A	10	-1	-3	-4
G	-1	7	-5	-3
C	-3	-5	9	0
T	-4	-3	0	8

ОПТИМАЛНО ГЛОБАЛНО ПОДРЕЖДАНЕ

- Оптималното глобално подреждане A* на две секвенции *s* и *t* е такова подреждане A(s,t), при което се получава максимална стойност на общата оценъчна функция *M*(*A*) в сравнение с всички възможни подравнявания.

$$A^* = \max M(A_i)$$

- *Намирането на оптималното глобално подреждане A* е комбинаторен оптимизационен проблем и обхваща следните стъпки:*

  1. Генериране на всички възможни подреждания;
  2. Изчисляване на качеството на всички подреждания *M*;
  3. Селекция на оптималното подреждане *A** с максимално качество *M*;*

ЛОКАЛНО ПОДРЕЖДАНЕ

- *Методите за локално подреждане откриват сходни участъци в рамките на секвенциите* – подреждането обхваща подмножества от символите в изследваните секвенции.

- Напр., позиции 30-59 в секвенция *A* могат да бъдат подредени с позиции 30-59 в секвенция *B*.

- Тази техника се счита за по-гъвкава от глобалното подреждане и има предимството, че сходни участъци, които са подредени по различен начин в изследваните секвенции (*domain shuffling*) могат да бъдат идентифицирани като сходни.

- Това не е възможно при методите за глобално подреждане.

АЛГОРИТЪМ НА SMITH WATERMAN

- Алгоритъмът Smith-Waterman (1981) се използва за откриване на сходните участъци в две нуклеотидни или протеинови секвенции.
- Базира се на техниките на динамичното програмиране
- Представлява подобрение на алгоритъма на Needleman-Wunsch
- *Осигурява гарантирано откриване на оптималното локално подреждане* по отношение на използваната оценъчна функция, която включва матрицата на заместванията и схема за оценка (“наказания”) на вмъкнатите празни позиции.

АЛГОРИТЪМ НА SMITH WATERMAN

- Поради факта, че алгоритъмът на Smith-Waterman изчерпва всички възможни подравнявания за да гарантира намирането на оптималното подреждане, той изисква мощни изчислителни ресурси и консумира изключително голямо изчислително време – за подреждането на две секвенции с дължини *m* и *n*, сложността на алгоритъма се оценява на *O(mn)*
- Практически, най-популярен е алгоритъмът BLAST, който се базира на евристични техники, и осигурява откриването на добро (суб-оптимално) подреждане за приемливо време.

БИОЛОГИЧНАТА ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА ПОДРЕЖДАНЕТО НА СЕКВЕНЦИИ

- Подреждането на биологичните секвенции е ефективен метод *за изследването на еволюцията и определянето на общ произход*.

- *Разликите между биологичните секвенции при подреждането съответстват на мутациите*, *а празните позиции (gaps) съответстват на вмъкване или заличаване на ген (протеин).*

- Подреждането на биологични секвенции се използва, също така, за подреждания на потенциално несвързани секвенции в биологичните бази данни.

ПОДРЕЖДАНЕ НА ДВОЙКА СЕКВЕНЦИИ

1. *Анализ с точкова матрица*
2. *Алгоритми, базирани на динамичното програмиране (DP)*
3. *Методи с обработка по думи (k-tuple methods), използвани от софтуера FASTA и BLAST*

АНАЛИЗ С ТОЧКОВА МАТРИЦА

- Освен в случаите, когато е известно, че секвенциите са много сходни, препоръчително е първо да се използва метода с точкова матрица, тъй като с негова помощ могат да се наблюдават всички възможни съответствия като диагонали на матрицата.
- Анализът на основата на точкова матрица може лесно да открие наличието на вмъквания и заличавания, както и повторенията (вкл. и инвертираните повторения), които се откриват по-трудно с други методи
- Основното ограничение на този метод, е че повечето програми, основани на анализ с точкова матрица, не показват реално подреждане

СРАВНЯВАНЕ НА СЕКВЕНЦИИ С ТОЧКОВА МАТРИЦА

- *Анализът с точкова матрица се използва основно като метод за сравняване на две секвенции с цел търсене на възможни съответствия на символи между секвенциите*
- Методът се използва също така за откриване на преки или инвертирани повторения в протеинови или нуклеотидни секвенции, за предсказване на самодопълващи се участъци в РНК, и следователно, имат потенциал за формиране на вторична структура.
- Препоръчително е, всяка лаборатория, в която се прави анализ на секвенции, да разполага поне с една програма за анализ с точкови матрици.

СРАВНЯВАНЕ НА СЕКВЕНЦИИ С ТОЧКОВА МАТРИЦА

- Програмата DOTTER използва метода на точковата матрица за анализ на нуклеотидни и протеинови секвенции

  http://sonnhammer.sbc.su.se/Dotter.html

- Програмите COMPARE и DOTPLOT на Genetics Computer Group също се използват за анализ с точкова матрица.
- Въпреки, че не използва метода с точковата матрица, програмата PLALIGN в рамките пакета FASTA се основава на метода на динамичното програмиране и може да се използва за откриване на съответствията между две секвенции върху граф (Pearson 1990).

  http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/fasta_list.html

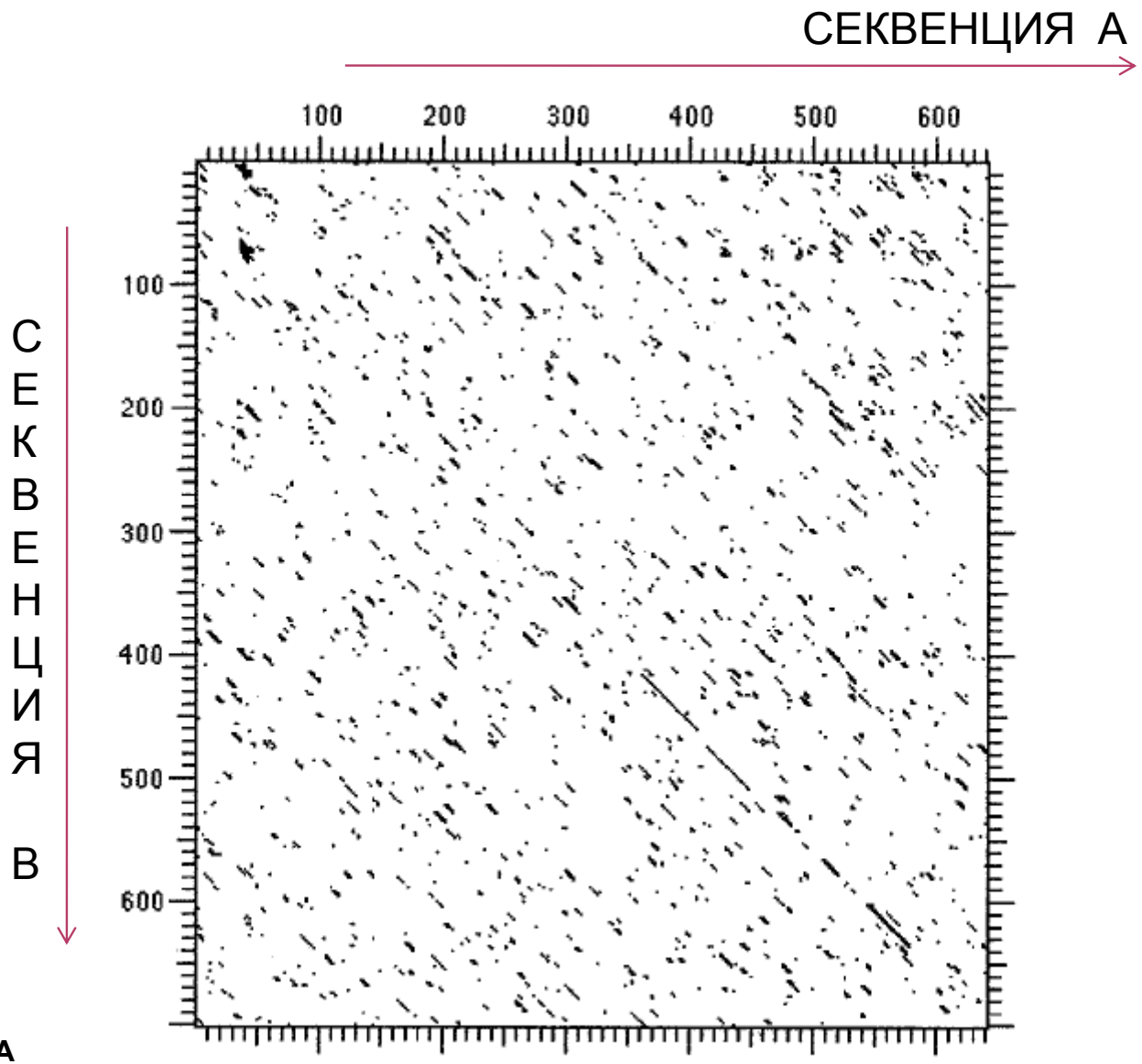
СРАВНЯВАНЕ НА СЕКВЕНЦИИ ПО ДВОЙКИ ПО МЕТОДА С ТОЧКОВА МАТРИЦА

- При метода за сравнение на секвенции с точкова матрица, едната секвенция (А) се разполага хоризонтално в горната част на страницата, а другата секвенция (В) се разполага вертикално в левия край от горе надолу
- Запълването на точковата матрица стартира от първия ред, като първият символ в секвенция В се сравнява последователно със символите на секвенция А. При откриване на съвпадение на символите в двете секвенции във всяка колона на първия ред се поставя точка.
- Следва запълването на втория ред на матрицата, като вторият символ в секвенция В се сравнява последователно със символите на секвенция А. При откриване на съвпадение на символите в двете секвенции във всяка колона на втория ред се поставя точка.

СРАВНЯВАНЕ НА СЕКВЕНЦИИ ПО ДВОЙКИ ПО МЕТОДА С ТОЧКОВА МАТРИЦА

- Процедурата се повтаря като за всеки символ от секвенция B се запълва съответния ред на точковата матрица до изчерпването на всички символи в секвенция B
- Матрицата е изпълнена с точки, представящи всички възможни съвпадения между символите на секвенция A и символите на секвенция B
- Участъците с еднакви последователности от символи се индицират с диагонал от точки
- Изолираните точки извън диагоналите представят случайни съвпадения, които най-вероятно не са свързани със значимо сходство

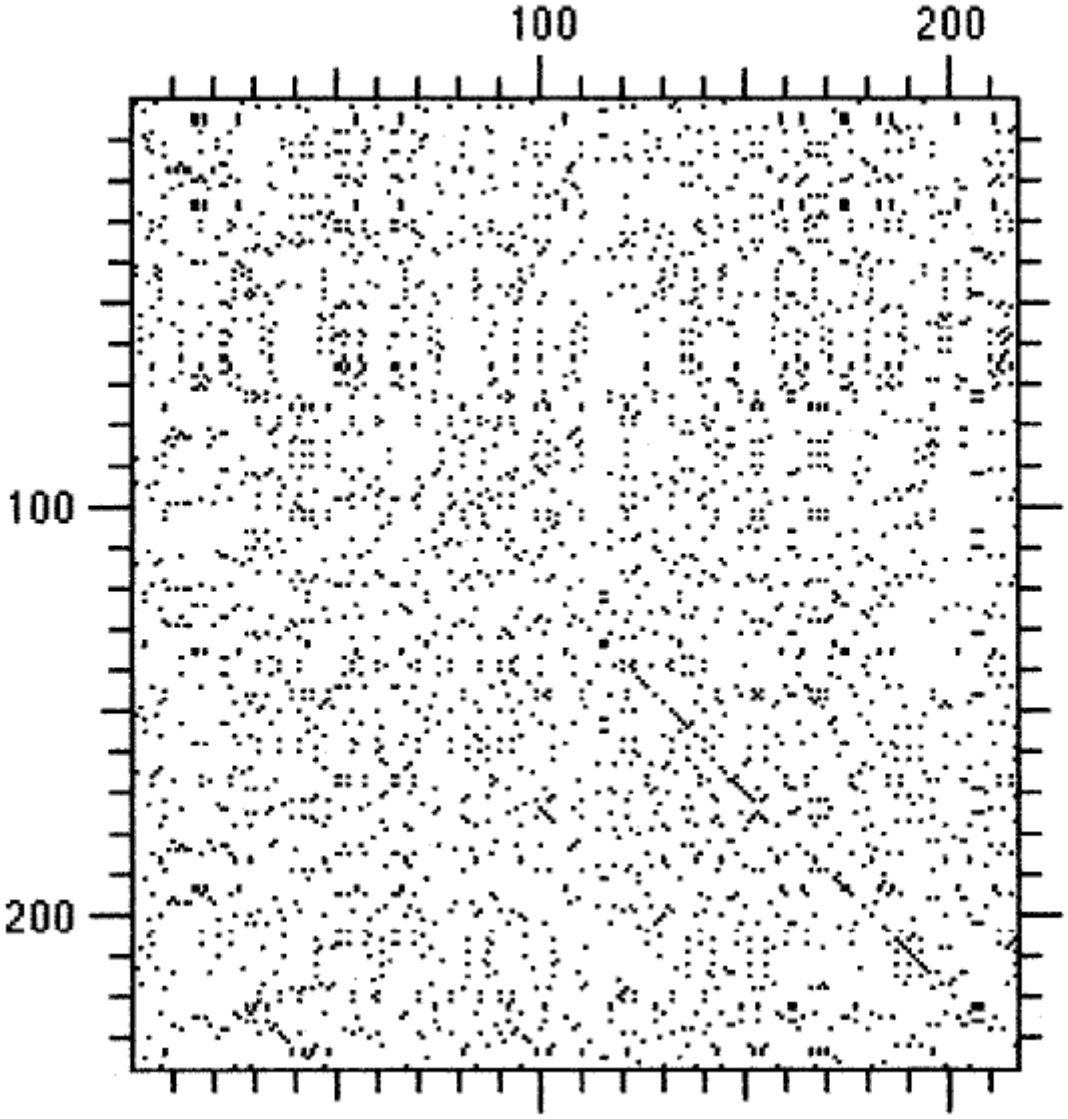
ПРОГРАМА DNA STRIDER ЗА АНАЛИЗ НА НУКЛЕОТИДНИ СЕКВЕНЦИИ



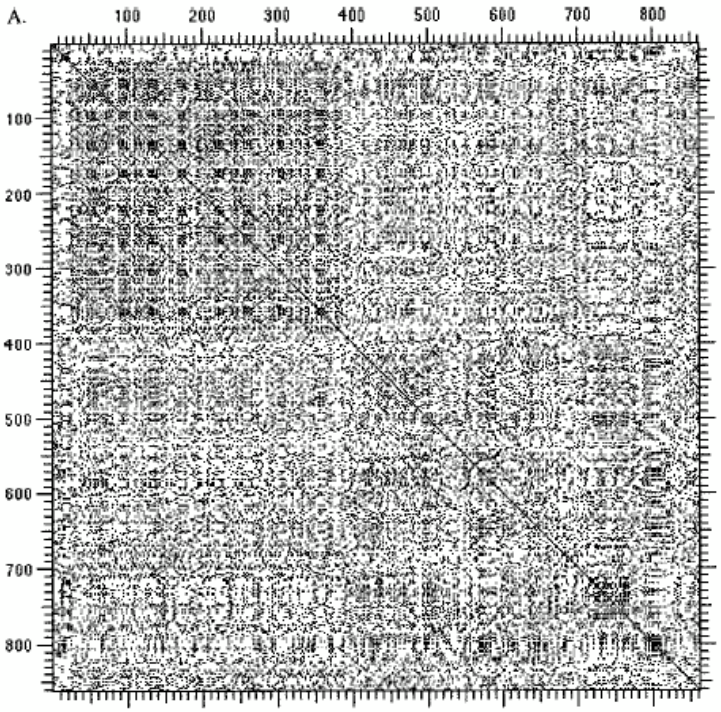
МЕТОД С ТОЧКОВА МАТРИЦА

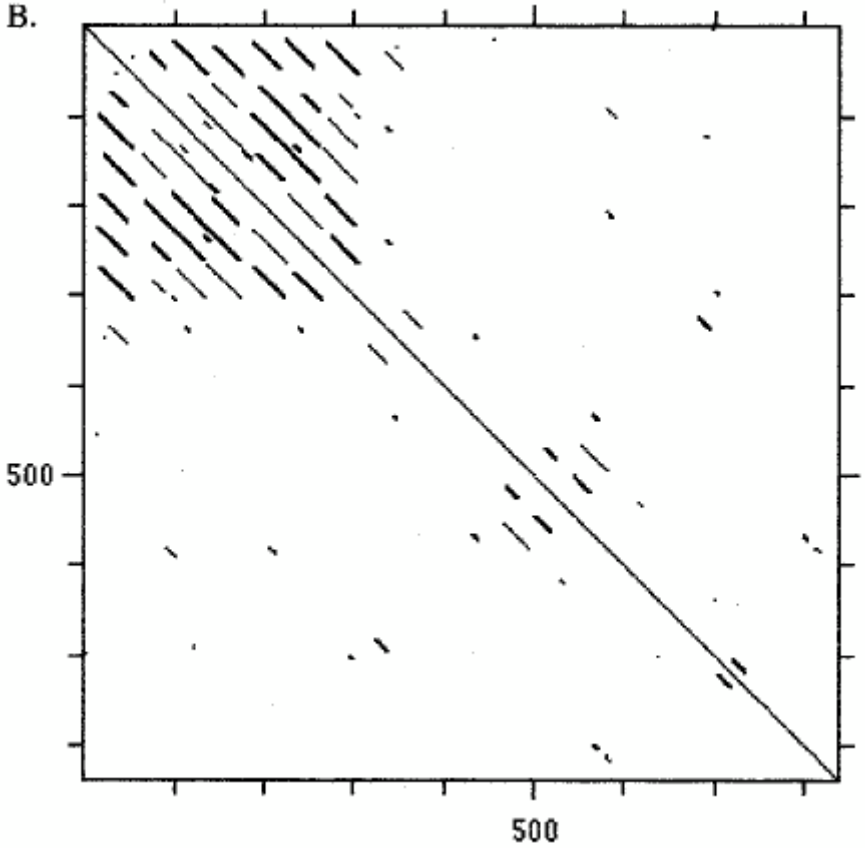
- Откриването на съвпадащи участъци може да бъде подобрено чрез филтриране на случайните съвпадения в точковата матрица.
- Филтрацията се осъществява посредством "плъзгащ се прозорец" за сравнение на двете секвенции.
- Вместо да се сравняват единични позиции в секвенциите, се използва *"прозорец", обхващащ съседни позиции в двете секвенции, които се сравняват едновременно*
- В матрицата се отпечатва точка, само ако има съвпадение при предефиниран брой съседни позиции на двете секвенции (думи с фиксирана дължина)
- Прозорецът започва от сравняваните позиции в секвенции A и B и обхваща символи в диагонала, като се движи надолу и надясно, сравнявайки всяка двойка, аналогично на подравняването.

АНАЛИЗ ПО МЕТОДА С ТОЧКОВА МАТРИЦА НА СЕКВЕНЦИИ ОТ АМИНО КИСЕЛИНИ



АНАЛИЗ ПО МЕТОДА С ТОЧКОВА МАТРИЦА НА HUMAN LDL RECEPTOR СЪС САМИЯ СЕБЕ СИ КАТО СЕ ИЗПОЛЗВА DNA STRIDER





МЕТОД С ТОЧКОВА МАТРИЦА

	M	A	T	C	H	M	A	K	E	R
M	*					*				
A		*					*			
K								*		
E									*	
A		*					*			
M	*					*				
A		*					*			
T			*							
C				*						
H					*					
M	*					*				
A		*					*			
K								*		
E									*	
R										*

МЕТОД С ТОЧКОВА МАТРИЦА