Алгоритмы выравнивания биологических последовательностей

Дарья Владимировна Диброва
(к.б.н., с.н.с)

Факультет биоинженерии и биоинформатики
МГУ имени М.В. Ломоносова

2022 год

План лекции

1. Почему последовательности генов/белков из разных организмов похожи, но не одинаковы?
2. Что такое «парное выравнивание»? Оценка качества.
3. Матрицы аминокислотных замен BLOSUM
4. Алгоритмы парного выравнивания белков
5. Связанные методы и инструменты

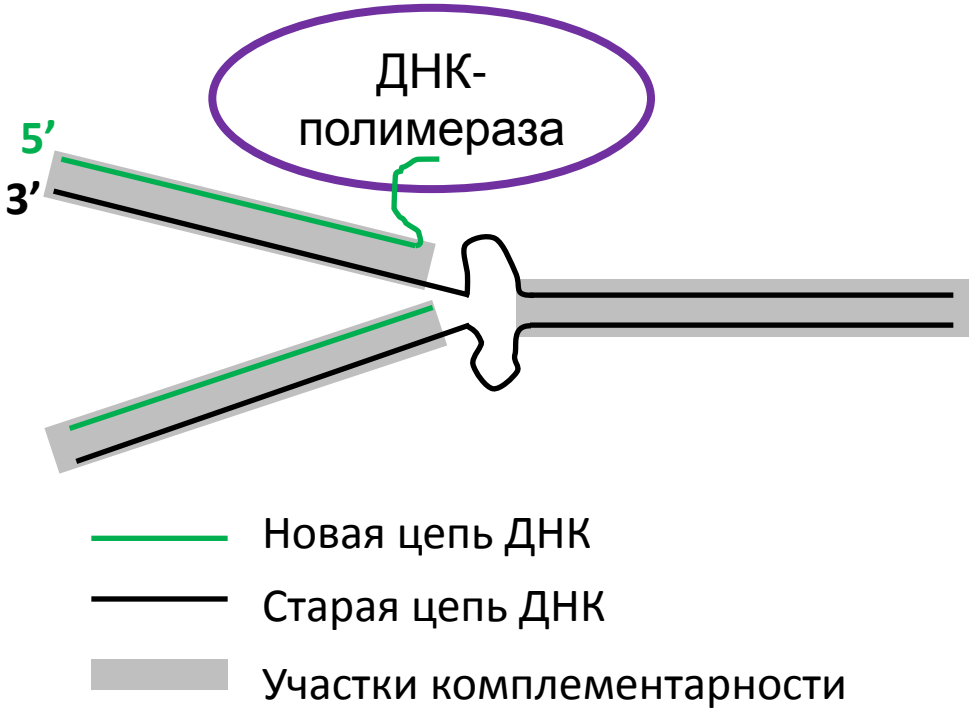
Часть 1

Почему последовательности генов/белков из разных организмов похожи, но не одинаковы?

Как может изменяться ДНК?

Генетическая информация передаются от поколения к поколению за счет процесса **репликации ДНК**, после которого клетка делится

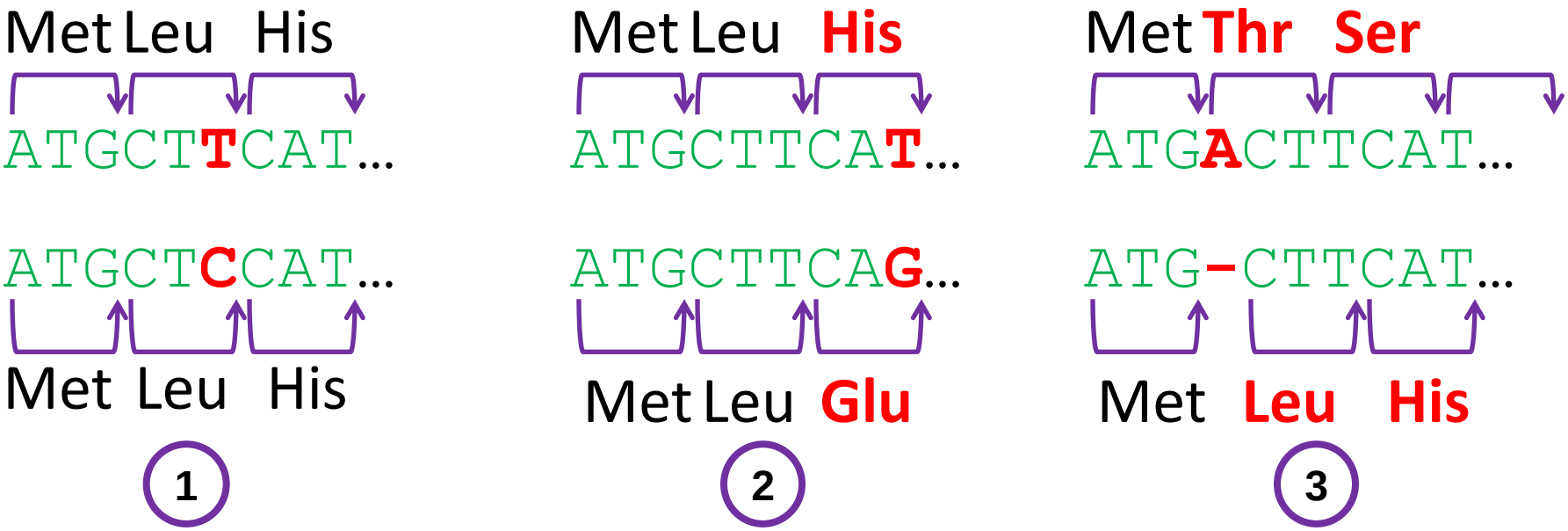
Однако ни одна ДНК-полимераза (и даже система последующей репарации) **не может** обеспечить 100% точности при копировании



Наиболее частые «рутинные» ошибки ДНК-полимеразы:

- вставка **неправильного** (нарушающего комплементарность) основания;
- **пропуск** одного или нескольких оснований;
- ошибочное **добавление** одного или нескольких лишних оснований.

Точечные мутации: замена, вставка, делеция



Последовательность кодируемого геном белка за счет свойств генетического кода и системы трансляции может:

1. не измениться вообще (синонимичная замена);
2. измениться на один аминокислотный остаток;
3. измениться чрезвычайно за счет сдвига рамки (англ. *frameshift*). При сдвиге рамки обычно очень скоро встречается стоп-кодон, и белок выходит дефектным.

Три фактора эволюции

Наследственность

ДНК (и белки) за счет процессов репликации и репарации остается практически неизменным

Изменчивость

За счет мутаций ДНК (и белки) могут изменяться

Отбор

Мутации в ДНК, приводящие к изменению белков, зачастую **вредны** или даже **летальны**

Некоторые мутации, однако, могут оказаться **нейтральны** или даже **полезны**

Наблюдаемое разнообразие последовательностей, произошедших когда-то от одной предковой последовательности: ***гомологов***

Часть 2

Что такое парное выравнивание и как можно оценить его качество?

«Парное выравнивание»

Это *любое* сопоставление двух последовательностей символов одинаковой длины, допускающее вставку в обе последовательности специального знака пропуска (*гэпа*, от англ. gap), обозначающегося обычно символом «–»

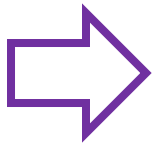
```
вчера вече-ром мама помыла раму
    **      * *
м-ама мыла раму----------------
```

Очевидно, что сопоставление может быть «удачным» и «неудачным»

```
вчера вечером мама помыла раму
                *****  *********
---------------мама --мыла раму
```

Зачем измерять «удачность» выравнивания?

Человек может оценить «удачность» на глаз; программе это не под силу



требуется численная мера, оценивающая качество выравнивания

Используются *аддитивные* и *симметричные* меры:

1) значение меры для всего выравнивания получается сложением мер для его элементов;
2) значение меры не должно зависеть от того, какая последовательность считается первой, а какая второй

M – значение меры

L – длина выравнивания

$$M = \sum_{i=1}^{L} m(A_{i1}, A_{i2})$$

Функция, зависящая от сопоставления ***i-той*** пары остатков

Как измерять «удачность» выравнивания?

1. По % совпадения (англ. *identity*);

Строгая мера, активно использующаяся для оценки качества уже построенного выравнивания

$$M = 100\% \cdot \frac{1}{L} \sum_{i=1}^{L} m(A_{i1}, A_{i2})$$

$$m(A_{i1}, A_{i2}) = \begin{cases} 1, A_{i1} = A_{i2} \\ 0, A_{i1} \neq A_{i2} \end{cases}$$

2. По % сходства (англ. *similarity*);

*Учитывается **«химия»**: аминокислоты группируются по природе бокового радикала (например, «положительно заряженные», «гидрофобные алифатические» и т.п.) Можно считать, что сопоставление разных аминокислот из одной и той же группы равносильно строгому совпадению*

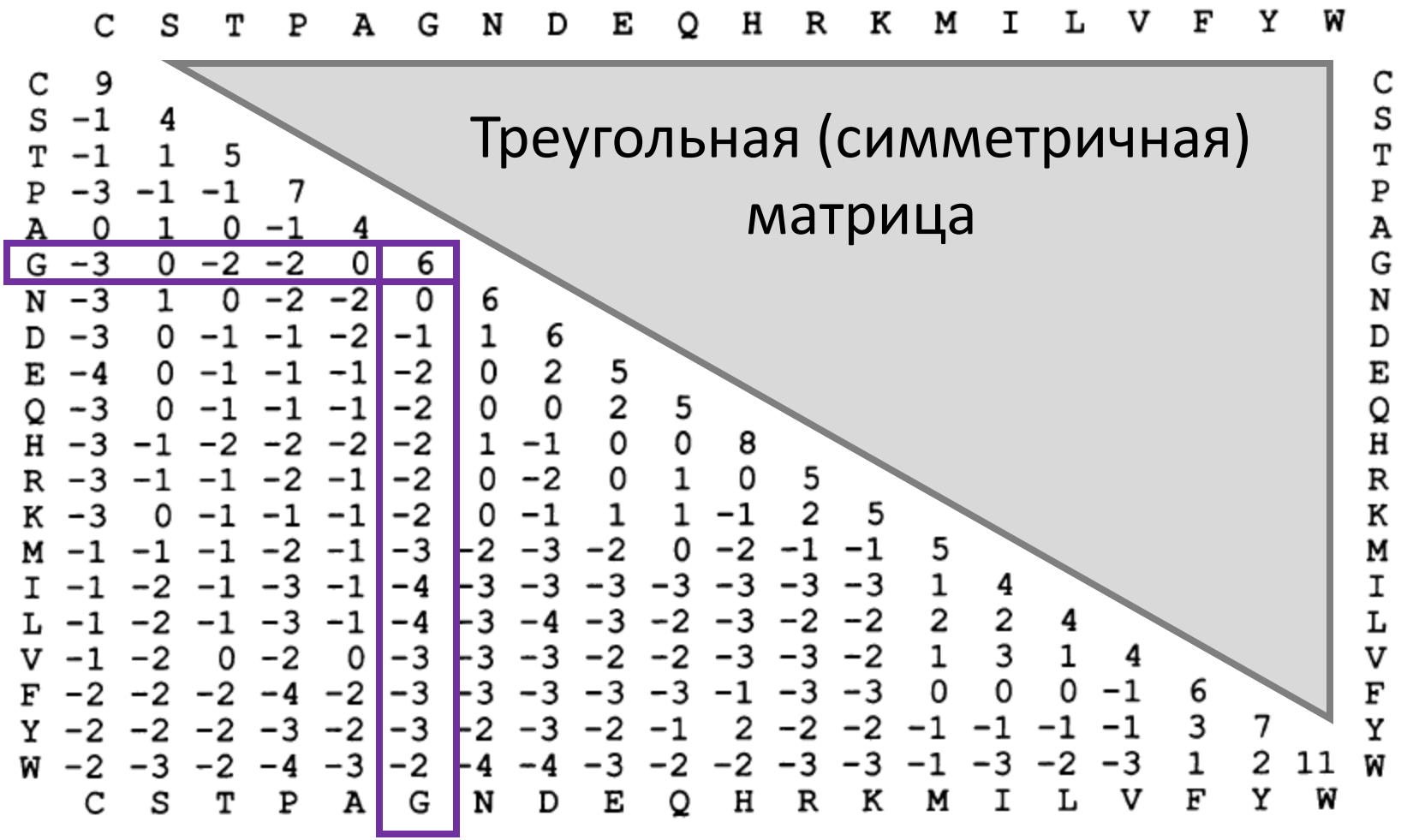
3. Используя специфические веса за замену каждой пары аминокислотных остатков

*Учитывается **«биология»**: как часто определенные замены закрепляются в белках в ходе отбора*

Часть 3

Матрицы аминокислотных замен (на примере серии BLOSUM): получение и применение

Матрица весов аминокислотных замен BLOSUM



	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W	
C	9																				C
S	-1	4																			S
T	-1	1	5																		T
P	-3	-1	-1	7																	P
A	0	1	0	-1	4																A
G	-3	0	-2	-2	0	6															G
N	-3	1	0	-2	-2	0	6														N
D	-3	0	-1	-1	-2	-1	1	6													D
E	-4	0	-1	-1	-1	-2	0	2	5												E
Q	-3	0	-1	-1	-1	-2	0	0	2	5											Q
H	-3	-1	-2	-2	-2	-2	1	-1	0	0	8										H
R	-3	-1	-1	-2	-1	-2	0	-2	0	1	0	5									R
K	-3	0	-1	-1	-1	-2	0	-1	1	1	-1	2	5								K
M	-1	-1	-1	-2	-1	-3	-2	-3	-2	0	-2	-1	-1	5							M
I	-1	-2	-1	-3	-1	-4	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	1	4						I
L	-1	-2	-1	-3	-1	-4	-3	-4	-3	-2	-3	-2	-2	2	2	4					L
V	-1	-2	0	-2	0	-3	-3	-3	-2	-2	-3	-3	-2	1	3	1	4				V
F	-2	-2	-2	-4	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-1	-3	-3	0	0	0	-1	6			F
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-3	-2	-3	-2	-1	2	-2	-2	-1	-1	-1	-1	3	7		Y
W	-2	-3	-2	-4	-3	-2	-4	-4	-3	-2	-2	-3	-3	-1	-3	-2	-3	1	2	11	W
	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W	

(Henikoff&Henikoff, **1992**, *PNAS*)

Матрица весов аминокислотных замен BLOSUM

Ключевая работа:

Amino acid substitution matrices from protein blocks

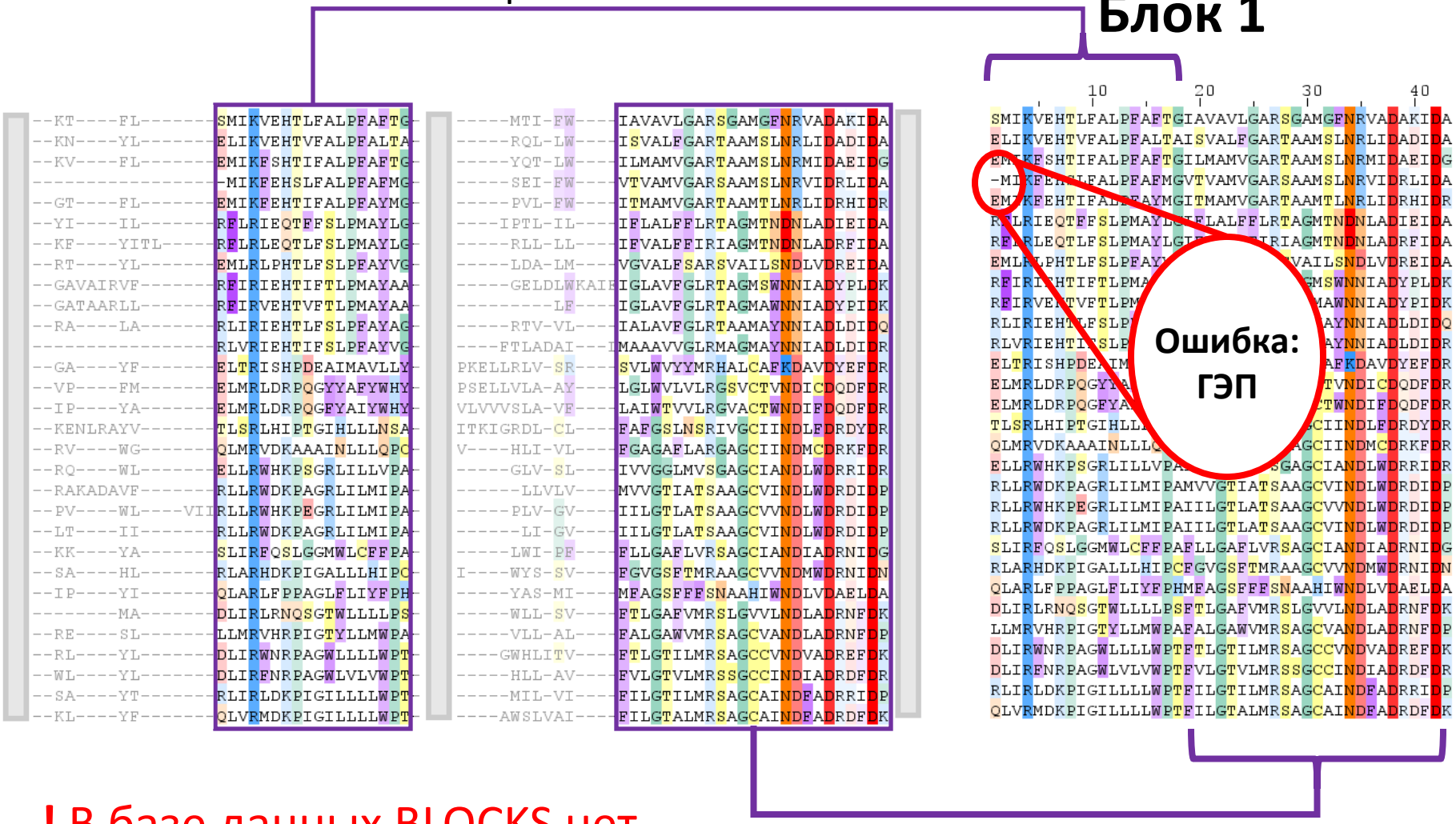
(Steven Henikoff & Jorja Henikoff, *PNAS*, **1992**)

- Матрицы построены с использованием составленной авторами ранее базы данных **BLOCKS**
- На момент публикации в этой базе содержались сопоставления белков из нескольких сотен семейств

Каковы исходные данные, или что содержится в базе данных **BLOCKS**?

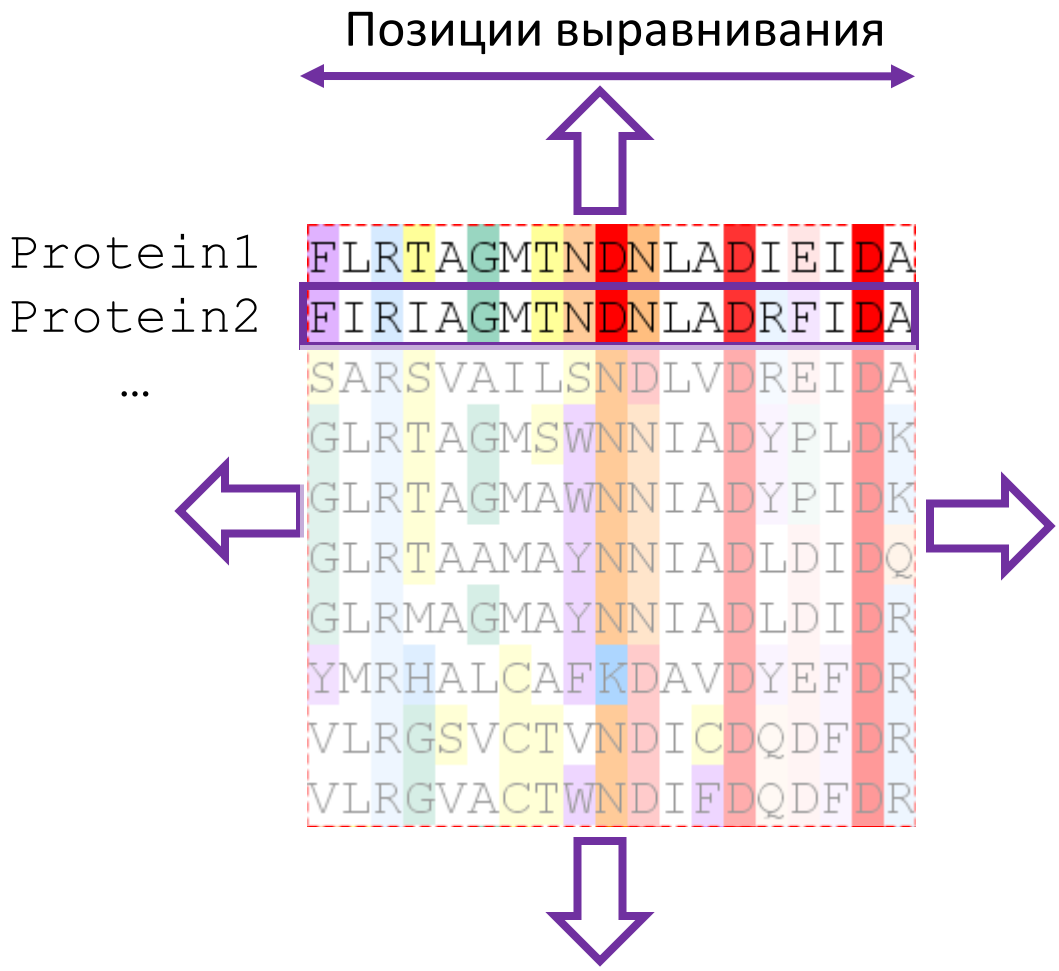
Что такое блоки (BLOCKS)?

Множественное выравнивание



! В базе данных BLOCKS нет колонок, содержащих гэпы

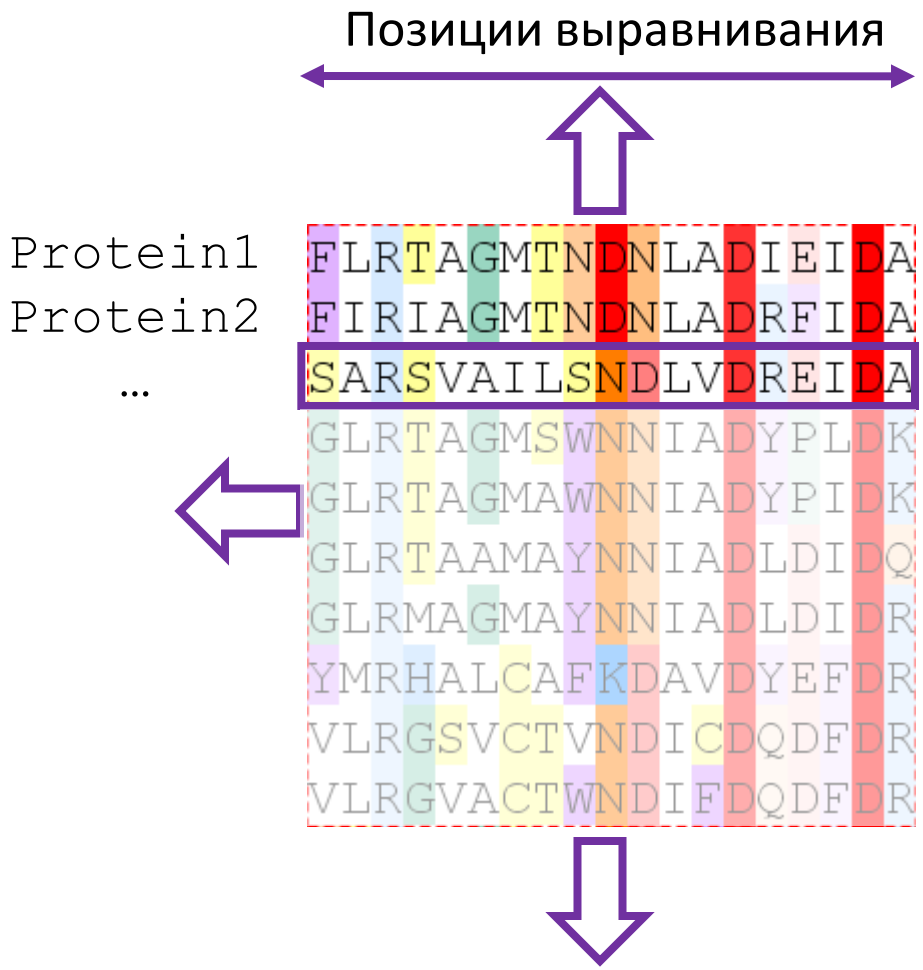
Таблица частот всех пар аминокислот



- Берем первые **две** последовательности
- Учитываем каждое сопоставление аминокислот между второй и первой

F→F = 1	T→T = 1
I→L = 1	N→N = 2
R→R = 1	D→D = 3
I→T = 1	L→L = 1
A→A = 3	R→I = 1
G→G = 1	F→E = 1
M→M = 1	I→I = 1

Таблица частот всех пар аминокислот



- Берем **третью** последовательность
- Учитываем каждое сопоставление аминокислот между ней и верхними

Получаем общее количество сопоставлений для всех пар аминокислот

(*frequency table*)

f_{ij}

Вычисление матрицы BLOSUM

$$q_{ij} = \frac{f_{ij}}{\sum_{i=1}^{20}\sum_{j=1}^{i} f_{ij}}$$

Наблюдаемая вероятность встречаемости каждой пары аминокислот (*observed probability of occurrence for each **i,j** pair*)

$$p_i = q_{ii} + \sum_{j \neq i} \frac{q_{ij}}{2}$$

$$p_i = \frac{1}{2} q_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{j=1}^{20} q_{ij}$$

Наблюдаемая частота встречаемости каждой аминокислоты (*observed probability of occurrence for amino acid **i***)

$$e_{ij} = \begin{cases} p_i p_j, i = j \\ 2 p_i p_j, i \neq j \end{cases}$$

Ожидаемая вероятность встречаемости каждой пары аминокислот (*expected probability of occurrence for each **i,j** pair*)

Вычисление матрицы BLOSUM

O o

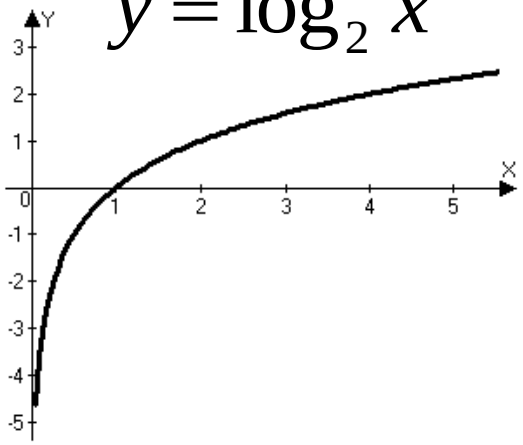
$$s_{ij} = 2 \cdot \log_2 \frac{q_{ij}}{e_{ij}}$$

Наблюдаемая вероятность для пары ***i, j***

Ожидаемая вероятность для пары ***i, j***

Значение в матрице замен

$y = \log_2 x$



$\frac{q_{ij}}{e_{ij}} = 1$ — *Частота встречаемости пары не отличается от ожидаемой случайно*

$\frac{q_{ij}}{e_{ij}} > 1$ — *Пара встречается чаще, чем ожидалось бы случайно – **«хорошая»** замена*

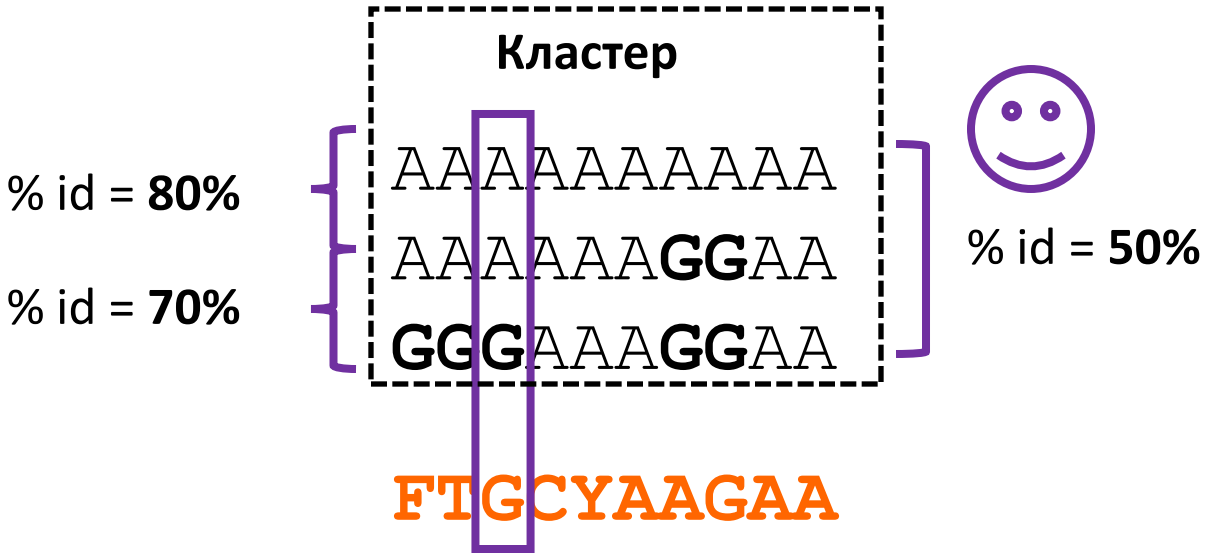
$\frac{q_{ij}}{e_{ij}} < 1$ — *Пара встречается реже, чем ожидалось бы случайно – **«плохая»** замена*

Что означает число 62 в «BLOSUM62»?

В блоках могут встречаться практически идентичные последовательности, за счет которых частоты пар могут быть ошибочно «сдвинуты»

Чтобы этого избежать, последовательности на заданном % идентичности **кластеризуют**, а порог указывают в названии матрицы

***Пример**: порог 62%*



БЕЗ кластеризации

G→G = **1**

G→A = 1 + 1 = **2**

С кластеризацией

G→G = 1 · 0.33 = **0.33**

G→A = 1 · 0.33 + 1 · 0.33 = **0.66**

Применение матриц серии BLOSUM

Компьютер может получить биологически осмысленную оценку качества построенного выравнивания

M – значение меры

L – длина выравнивания

$$M = \sum_{i=1}^{L} m(A_{i1}, A_{i2})$$

Функция, зависящая от сопоставления ***i-той*** пары остатков

Например, $m(A_{i2}, A_{i2})$ = соответствующий вес из матрицы BLOSUM.

Алгоритм парного выравнивания белковых последовательностей

Сколько существует выравниваний?

Если *m* и *n* – длины последовательностей, то число возможных выравниваний будет равно:

$$\sum_{k=0}^{\min\{m,n\}} C_n^k C_m^k = C_{n+m}^n = \frac{(n+m)!}{n!m!}$$

Для двух последовательностей длины *n*:

$$\frac{(2n)!}{(n!)^2} \approx \frac{2^{2n}}{\sqrt{\pi n}} \approx 10^{77}$$

n = 100

Чисто частиц во Вселенной ~ 10^{80}

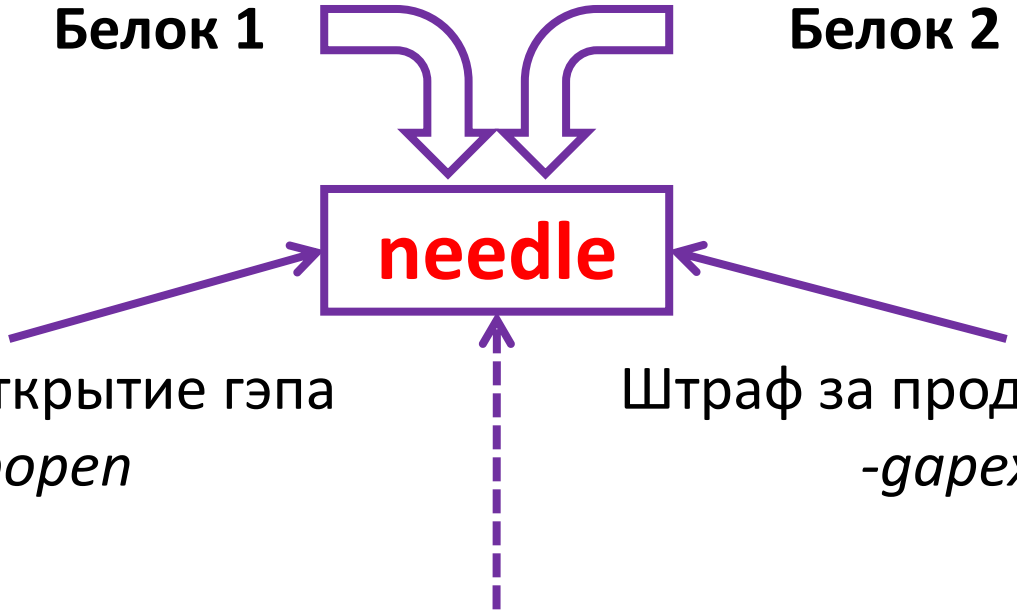
(http://ru.wikipedia.org/wiki/Гугол)

Глобальное парное выравнивание

A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins

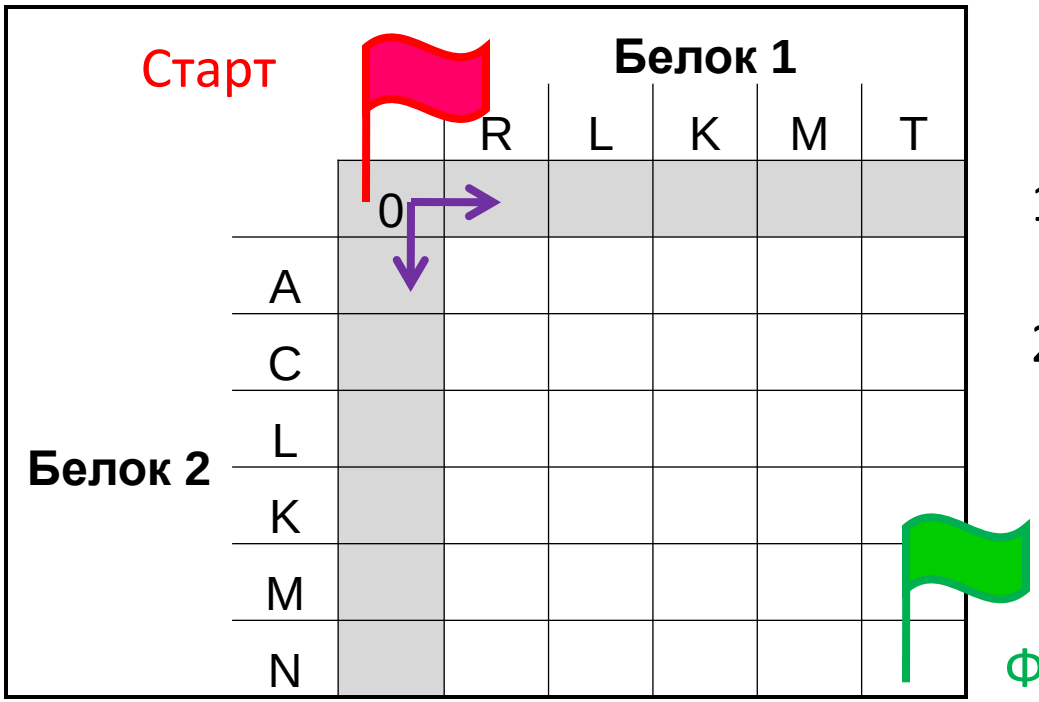
(Saul Needleman & Christian Wunsch, *J Mol Biol*, **1970**)

https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/



В исходной работе веса были 1 за совпадение, -1 за промах

Динамическое программирование



Всегда есть два варианта вставки гэпа:

1) вставить гэп в белок 1
   - штраф за гэп
2) вставить гэп в белок 2
   - штраф за гэп

Белок 1 RLKMT → **R**LKMT

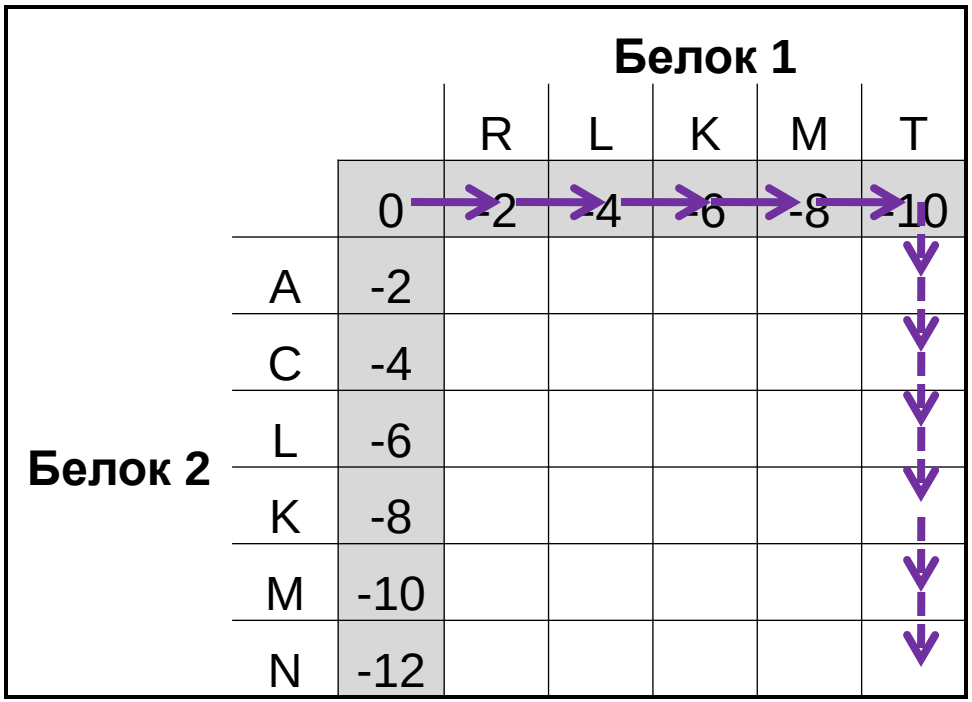
Белок 2 ACLKMN → −ACLKMN

−RLKMT

ACLKMN

Любое выравнивание однозначно задается путем в данной таблице

Динамическое программирование: гэпы



Пусть штраф за гэп будет = **–2**

Верхняя строка и левый столбец заполняются штрафами за гэпы

«**Концевые гэпы**»: можно дополнительно оштрафовать за то, что «финиш» не в конце матрицы (т.е. нужно вставить концевые гэпы в одну из последовательностей)

Параметры **needle**

-endweight

-endopen

-endextend

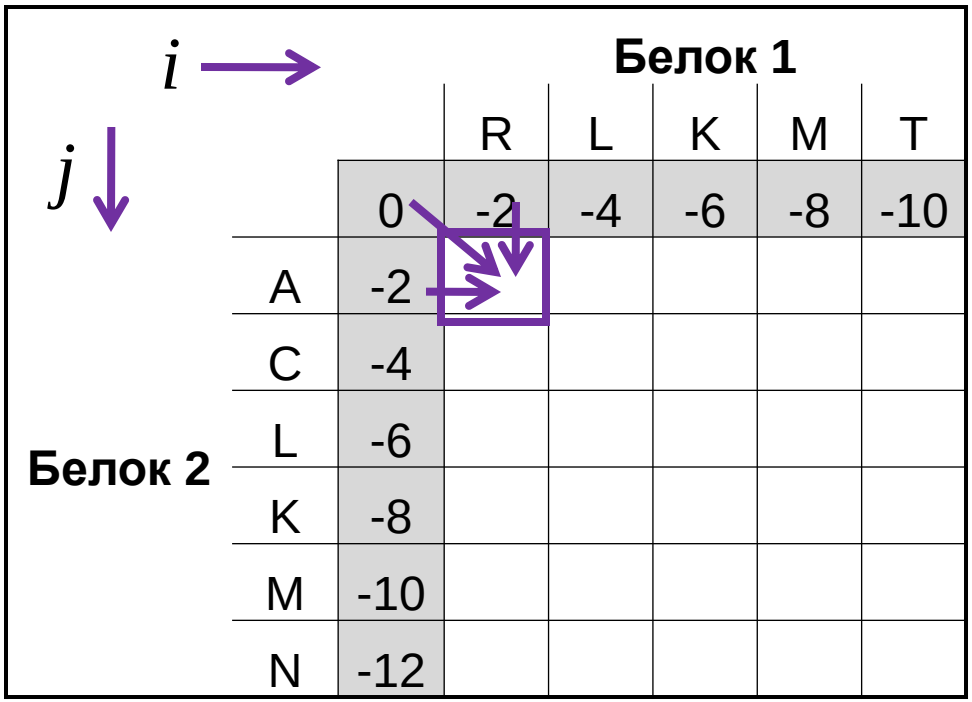
Белок 1 RLKMT

Белок 2 -----ACLKMN

RLKMT------

-----ACLKMN

Правило заполнения таблицы



Штраф за гэп $g = 2$

- Выбираем, из какой клетки перейти в данную, чтобы получился наибольший вес
- Запоминаем, из какой клетки перешли

$$F_{i,j} = \max \begin{cases} F_{i,j-1} - g & \downarrow \\ F_{i-1,j} - g & \rightarrow \\ F_{i-1,j-1} + m(A_{i1}, A_{j2}) & \searrow \end{cases}$$

- Величину m можно вычислить по матрице BLOSUM или просто как 1 за совпадение, -1 за несовпадение

Пример заполнения таблицы

		Белок 1				
		R	L	K	M	T
	0	-2	-4	-6	-8	-10
A	-2	-1	-3	-5	-7	-9
C	-4	-3	-2	-4	-6	-8
L	-6	-5	-2	-3	-5	-7
K	-8	-7	-4	-1	-3	-5
M	-10	-9	-6	-3	0	-4
N	-12	-11	-8	-5	-2	-1

Белок 2

Штраф за гэп g = 2
Цена совпадения = 1
Цена несовпадения = -1

! После заполнения матрицы мы находим наилучшее число в нижней строке или правом столбце, и **вспоминаем** путь к нему

Белок 1 R-LKMT
Белок 2 ACLKMN

Белок 1 -RLKMT
Белок 2 ACLKMN

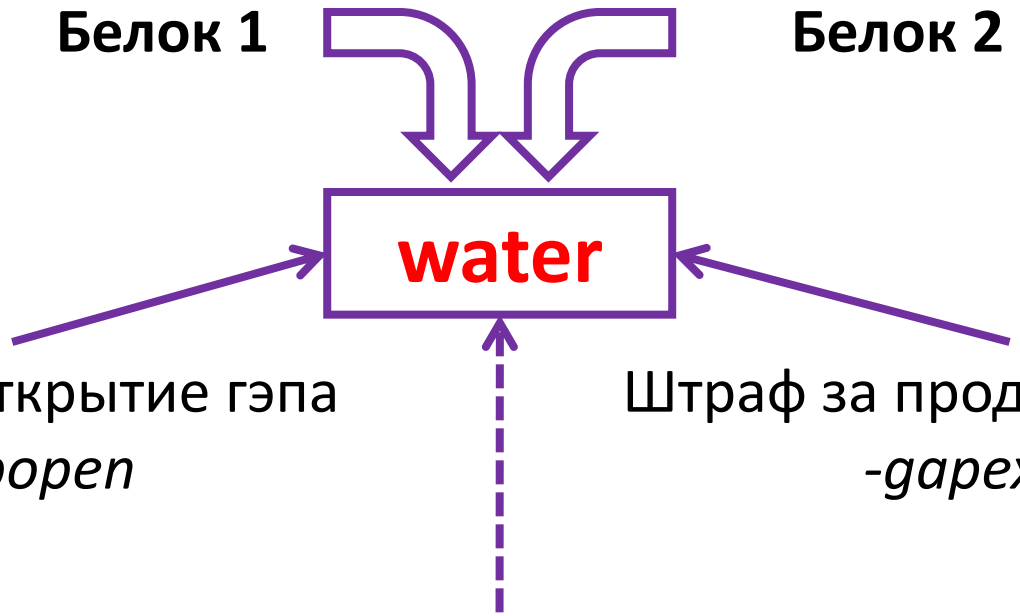
! Может быть несколько альтернативных путей

Локальное парное выравнивание

Identification of Common Molecular Subsequences

(Temple Smith & Michael Waterman, *J Mol Biol*, **1981**)

https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/



В исходной работе веса были 1 за совпадение, -1 за промах

Отличия от глобального выравнивания

		Белок 1				
		R	L	K	M	T
	0	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
A	**0**	-1	-1	-1	-1	-1
C	**0**	-1				
L	**0**	-1				
K	**0**	-1				
M	**0**	-1				
N	**0**	-1				

Белок 2

Штраф за гэп g = 2

Цена совпадения = 1

Цена несовпадения = -1

1) Нули для начальных гэпов

Отличия от глобального выравнивания

		Белок 1				
		R	L	K	M	T
	0	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
L	0	0	1	0	0	0
K	0	0	0	2	0	0
M	0	0	0	0	3	0
N	0	0	0	0	0	0

Белок 2

Штраф за гэп g = 2
Цена совпадения = 1
Цена несовпадения = -1

1) Нули для начальных гэпов
2) Все отрицательные числа в матрице приравниваются нулю

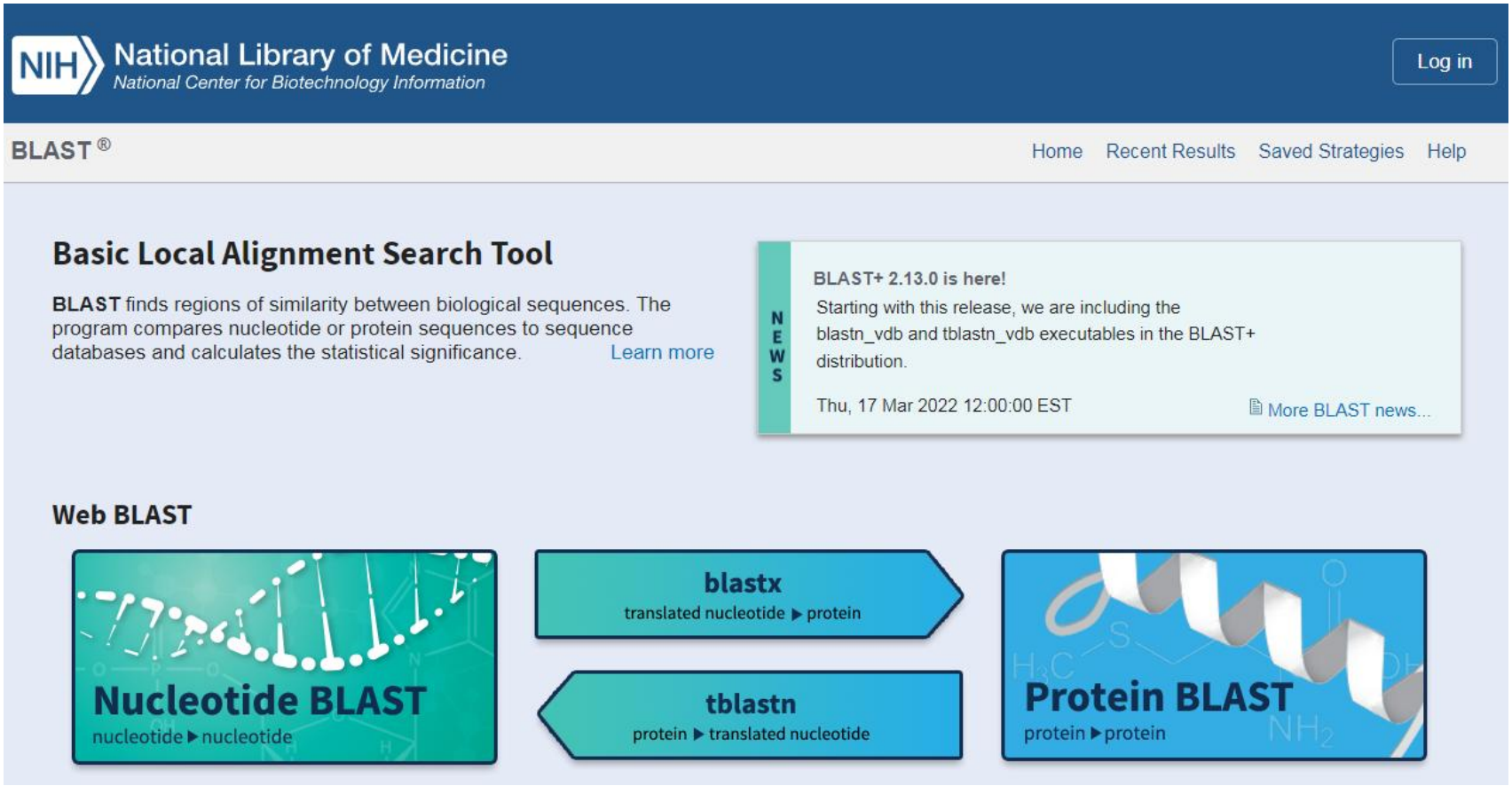
Белок 1 LKM
Белок 2 LKM

3) Находится самое большое число, от него восстанавливается обратный путь

Часть 5

Outlook: связанные и смежные методы и инструменты

BLAST: поиск сходных последовательностей



Множественное выравнивание

менязовут-Даша-
менязовут-Женя-
менязовут-Вася-
тебязовут--Аня-
я---зовусьПетя-
меняз-валиЛизой

Множественное выравнивание: одновременное сопоставление нескольких последовательностей символов

親愛利子謂之慈，反慈為闇；
子愛利親謂之孝，反孝為孽。
愛利出中謂之忠，反忠為倍。
心省恤人謂之惠；反惠為困。
兄敬愛弟謂之友，反友為虐。
弟敬愛兄謂之悌，反悌為敖。
接遇慎容謂之恭，反恭為媟。
接遇肅正謂之敬，反敬為嫚。
言行抱一謂之貞，反貞為偽。
期果言當謂之信，反信為慢。
衷理不辟謂之端，反端為跐。
據當不傾謂之平，反平為險。
行善決衷謂之清，反清為濁。
辭利刻謙謂之廉，反廉為貪。
兼覆無私謂之公，反公為私。
方直不曲謂之正，反正為邪。
以人自觀謂之度，反度為妄。
以己量人謂之恕，反恕為荒。
惻隱憐人謂之慈，反慈為忍。
厚志隱行謂之潔，反潔為汰。
施行得理謂之德，反德為怨。
放理潔靜謂之行，反行為污。