Программы множественного выравнивания

На материале последовательностей гомологичных белков.

Задания на дом

1. (*) Написать программу для сравнения двух выравниваний одних и тех же последовательностей. *Продемонстрируйте чему вас научили в программировании!!! (*) потому, что не уверен, что все справятся.*
2. Сравните выравнивания двух пар программ. *Вручную или с использованием программ, можно, написанных коллегами (со ссылкой)*
3. Постройте выравнивание по совмещению полипептидных цепей трёх доменов из одного семейства Pfam. Сравните с выравниванием построенным программой выравнивания последовательностей
4. Коротко опишите одну программу множественного выравнивания. *Литературное задание. Google и Pubmed вам в руки*

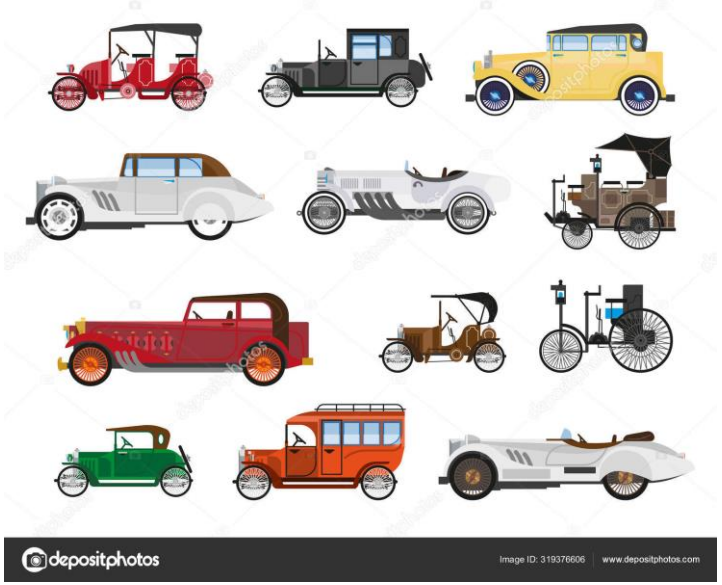
1. Выравнивание последовательностей гомологичных белков отражает *непрерывную эволюцию гена белка*

Непрерывная эволюция – это небольшие изменения последовательности белка, вызванные локальными небольшими локальными изменениями в последовательности гена белка.

А потом бац

электоавто – крупная перестройка

Самокаты – крупная перестройка путем делеции двух колес



Много доменные белки в эволюции образуются в результате последовательных единовременных крупных перестроек в генах белков

Домен белка – единица непрерывной эволюции белков

Домены белков

[Длинные] гомологичные участки из разных белков, которые эволюционируют только по типу локальных мутаций,
и максимальной длины, с сохранением этого свойства,
называются

ЭВОЛЮЦИОННЫМИ ДОМЕНАМИ

Терминологическая проблема.

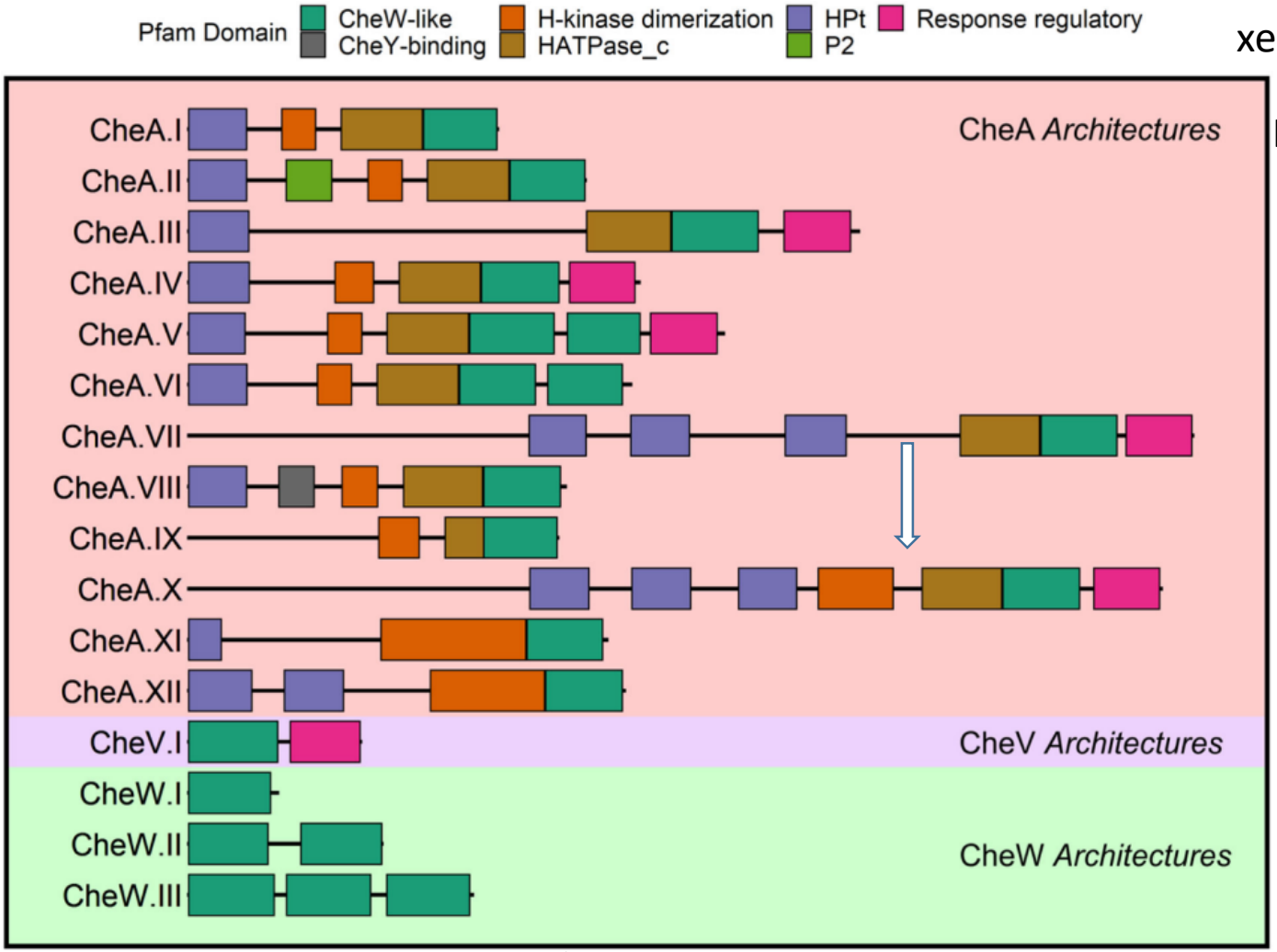
ДОМЕН – набор фрагментов последовательностей и их выравнивание. Имеет короткое название. Например, RdRP_1

ДОМЕН белка – фрагмент последовательности, входящий в определенный домен, например, в RdRP_1

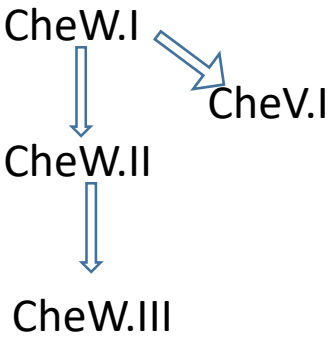
ДОМЕННАЯ АРХИТЕКТУРА – последовательность доменов в белке

Эволюционные домены в белке изображают так

Che белки участвуют в хемотаксисе бактерий



Крупные перестройки



Далее предложите варианты

Доменные архитектуры белков,
содержащих домен CheW-like

Vass LR, Branscum KM, Bourret RB, Foster CA. Generalizable strategy to analyze domains in the context of parent protein architecture: A CheW case study. Proteins. 2022

2. Программы множественного выравнивания последовательностей (MSA = Multiple Sequence Alignment)

Их много с разными алгоритмами, использующих разные эвристики

Список популярных программ MSA

Программа	Год	в Jalview	на kodomo	Website
ClustalO		yes		https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo
ClustalW	1994	yes		http://www.clustal.org/
MAFFT	2002	yes	yes	https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/
MSAProbs	2010	yes		http://msaprobs.sourceforge.net/
MUSCLE	2004	yes	yes	http://www.drive5.com/muscle/
ProbCons	2005	yes		http://probcons.stanford.edu/
T-Coffee	2000	yes		http://tcoffee.crg.cat/
Glprobs	2015	yes		
DiAlign	1998			http://dialign.gobics.de/
FAME	2020			http://github.com/naznoosh/msa
Kalign	2005			https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/
NX4	2019			https://www.nx.io
PRANK	2008			http://wasabiapp.org/software/prank/
Probalign	2006			http://probalign.njit.edu/standalone.html

Цель множественного выравнивания последовательностей гомологичных доменов или белков:

- Реконструкция эволюции белков от общего предка.
  А именно, в колонке выравнивания стоят аминокислотные остатки (ако), унаследованные от ако общего предка всех этих белков.
  Наследуются ДНК гена, т.е. кодоны, это подразумевается.
- Основа для установления гомологии – сходство последовательностей. Оно неравномерно на разных участках (слайд +1)
- Достигнута ли цель практически - не проверяемо (не считая парочки долговременных экспериментов (Ленский – E.coli, Кондрашов - Schizophyllum commune)
- На практике стремятся к этой цели, но следует понимать, что она недостижима. Разные программы множественного выравнивания используют разные алгоритмы и разные эвристики.

Как сравнивать программы?

- Нужны БД “идеальных” выравниваний (Alignment Benchmarks)
- Наиболее признанной является BAliBASE (Benchmark Alignment dataBASE)
- Есть и другие Alignment Benchmarks:
  - SABMark(SequenceAlignmentBenchMark)
  - OXBench(OXfordBenchmark)
  - SMART(SimpleModularArchitectureResearchTool)
  - PREFAB(ProteinREFerenceAlignmentBenchmark)
  - QuanTest

[1] Zhang Y, et al. A survey on the algorithm and development of multiple sequence alignment. Brief Bioinform. 2022 May 13;23(3):bbac069

Результаты сравнения программ на BaliBase [1]

Program	R1-1	R1-2	R2	R3	R4	R5	AvgScore	Tottime(s)
MSAProbs	0.441	**0.865**	**0.464**	**0.607**	**0.622**	**0.608**	**0.607**	12382
Probalign	**0.453**	0.862	0.439	0.566	0.603	0.549	0.589	10095
MAFFT	0.439	0.831	0.450	0.581	0.605	0.591	0.588	1475
Probcons	0.417	0.855	0.406	0.544	0.532	0.573	0.558	13086
ClustalOmega	0.358	0.789	0.450	0.575	0.579	0.533	0.554	539
T-Coffee	0.410	0.848	0.402	0.491	0.545	0.587	0.551	81041
Kalign	0.365	0.790	0.360	0.476	0.504	0.435	0.501	**21**
MUSCLE	0.318	0.804	0.350	0.409	0.450	0.460	0.475	789
FSA	0.270	0.818	0.187	0.259	0.474	0.398	0.419	53648
DiAlign	0.265	0.696	0.292	0.312	0.441	0.425	0.415	3977
PRANK	0.223	0.680	0.257	0.321	0.360	0.356	0.376	128355
ClustalW	0.227	0.712	0.220	0.272	0.396	0.308	0.374	766

Колонки 2-7 – разные наборы тестовых выравниваний. Указан TC вес сравнения с референсным выравниванием. Значения от 0 до 1, чем больше – тем более похоже выравнивание на референсное. Последняя колонка – время работы программы

Le et al., 2016

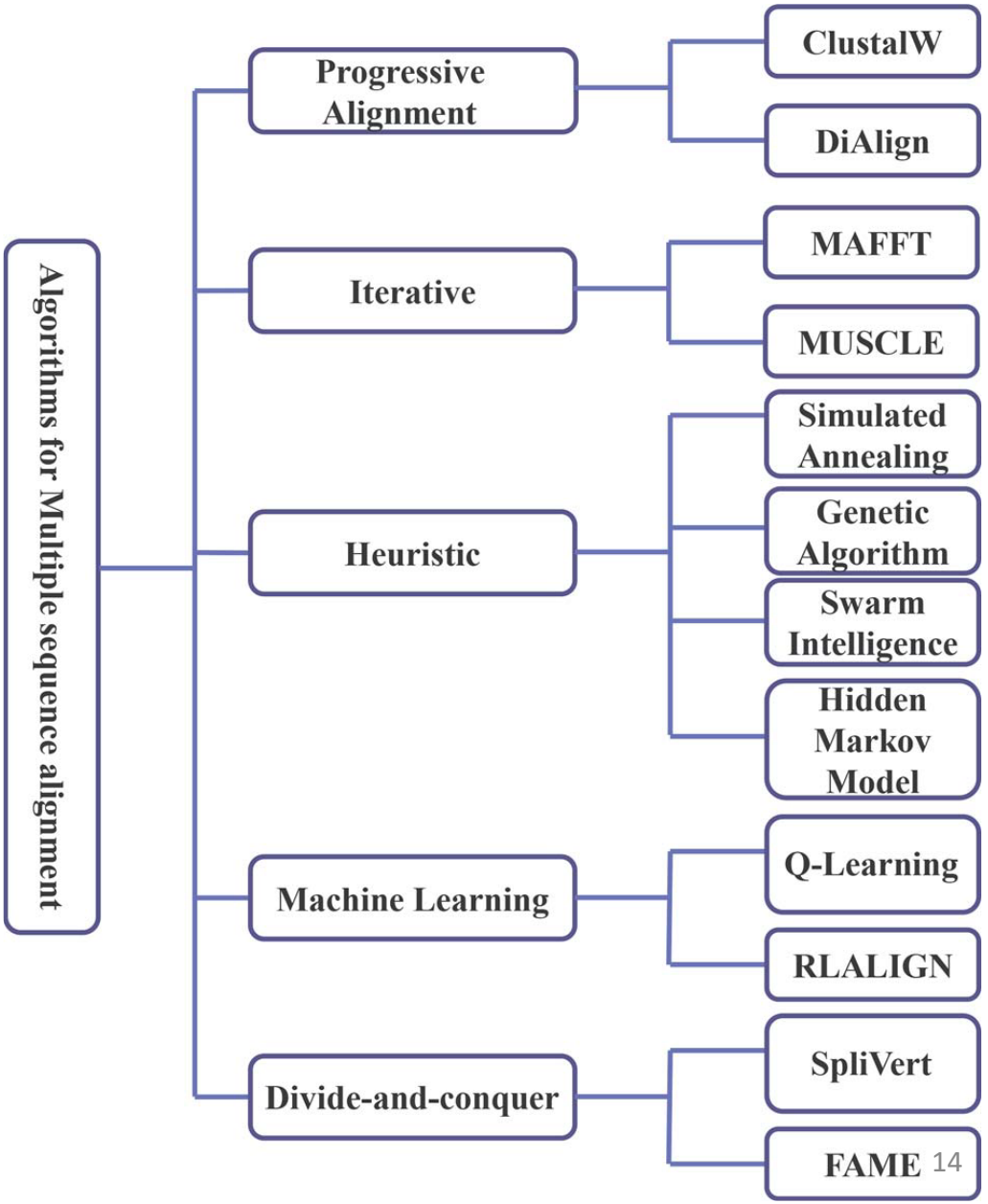
Table 1. The prediction accuracy for alignments of 200 sequences for 238 Pfam families. Aligner settings Prediction Accuracy (in %)

MAFFT L-INS-i	78.94 *
MAFFT—Default	78.19
MAFFT—Fast Mode	77.53 *
Clustal Omega—2 iter	78.36 *
Clustal Omega—1 iter	78.56 *
Clustal Omega—Default	78.63
MUSCLE—2 iter	78.17
MUSCLE—Default	78.13
MUSCLE—1 iter	77.29 *
PASTA—Default	78.70
T-Coffee—Default	78.45
Kalign 2—Default	77.93
Clustal W2—Default	77.13
HMMER—Default	77.86

For aligner settings from the same aligner, the sign (*) signifies that the score is significantly different (higher or lower) from the default score with $P<0.01$ using the Wilcoxon signed rank test.

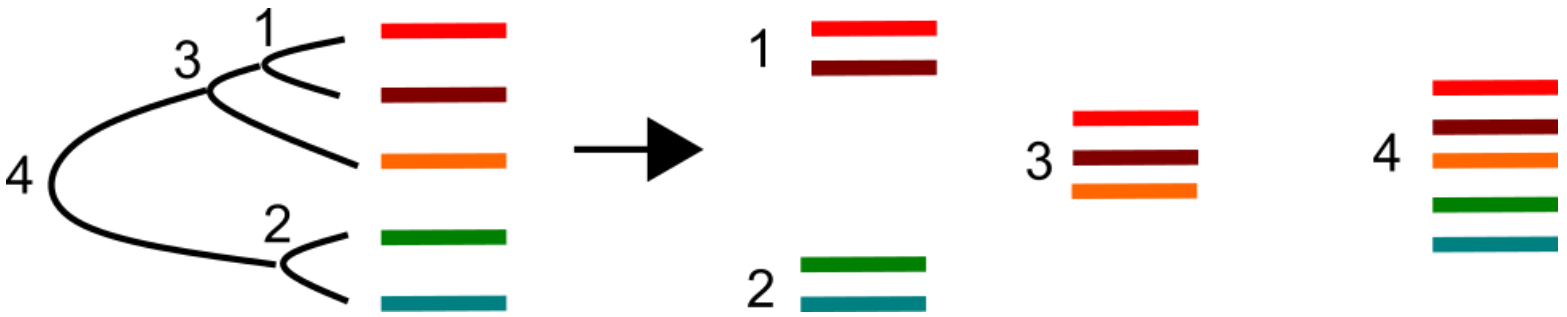
Классификация алгоритмов из того же обзора [1]

Пока не будем углубляться в алгоритмы – чтобы не утонуть)



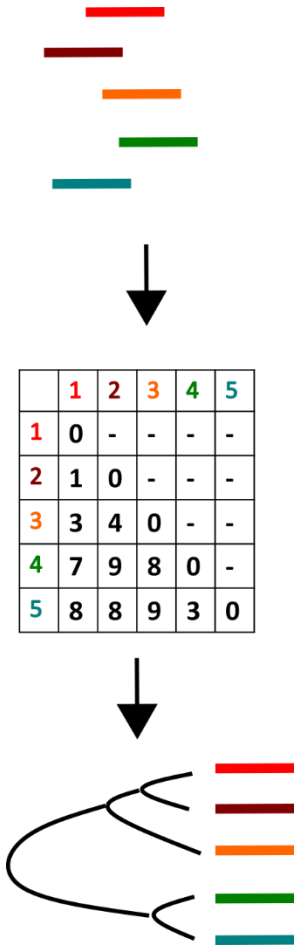
Прогрессивное выравнивание

- Основная идея: *выравнивание двух выравниваний* с помощью динамического программирования
- Этапы:
  - Построить дерево родственности всех последовательностей – направляющее дерево
  - Выравниваем стопки выровненных последовательностей от листьев до корня



Построение направляющего дерева

- Для ВСЕХ ПАР последовательностей строится парное выравнивание.
- Вес парного выравнивания пересчитывается в расстояние между последовательностями:
  - чем больше вес, тем меньше расстояние;
  - расстояние между совпадающими последовательностями равно 0.
- Получается матрица расстояний между послед-ми
- Есть алгоритмы, превращающие матрицу попарных расстояний в дерево.
  - Расстояния между листьями по дереву отражают сходство последовательностей



Пример прогрессивного выравнивания

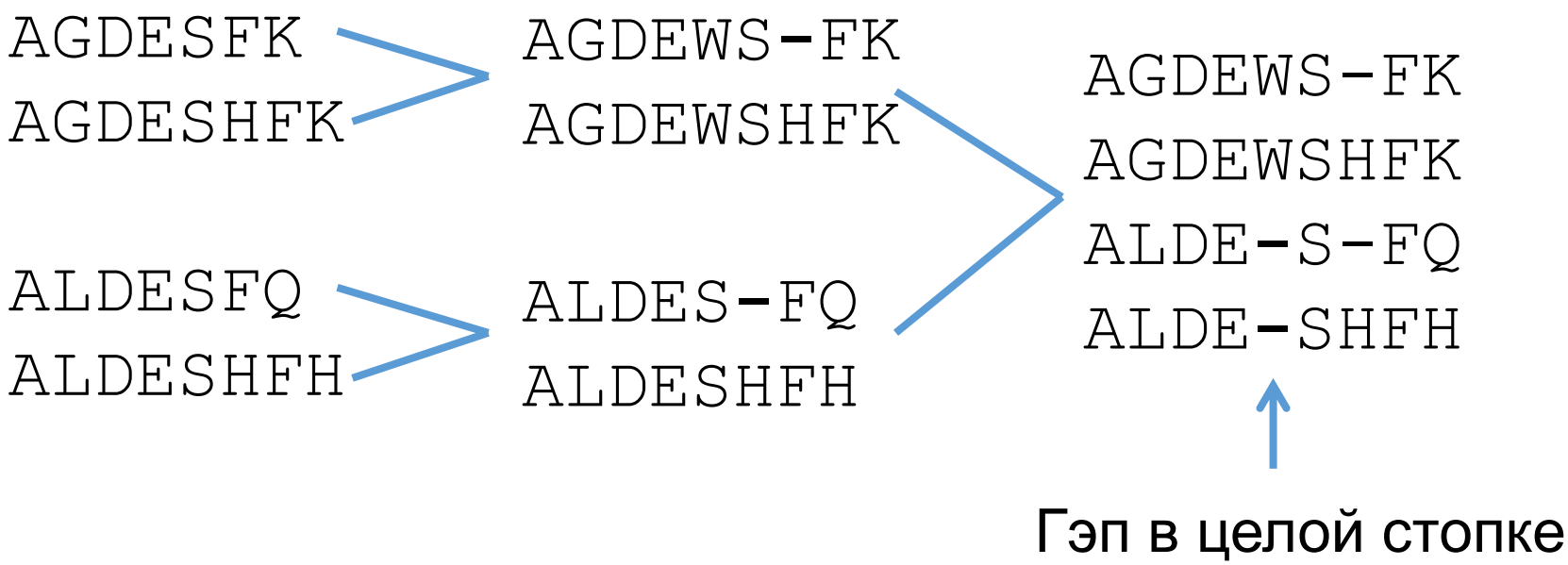
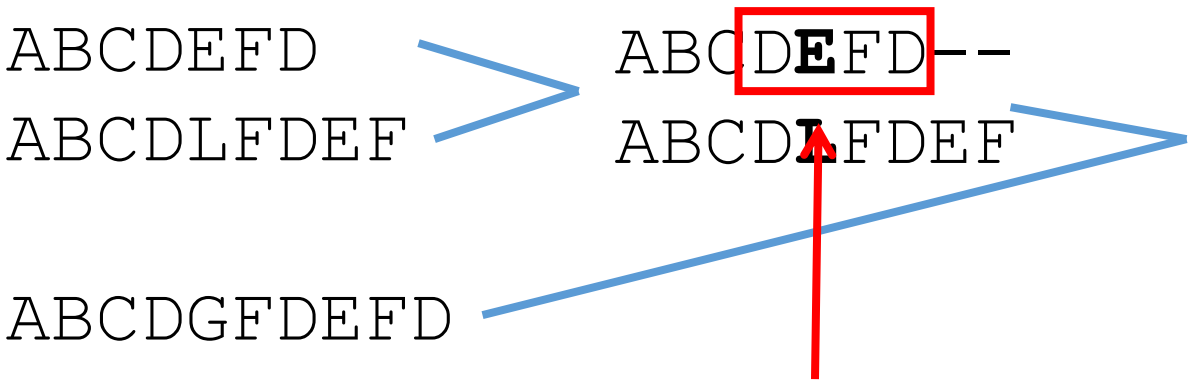


Рис. из презентации С.А.Спирина

Проблема: если ошиблись, то ошибка никуда не денется



Получилось

```
ABCDEFD---
ABCDLFDEF-
ABCDGFDEFD
```

Но уже поздно передвигать этот блок

А хотелось бы так:

```
ABC---DEFD
ABCDLFDEF-
ABCDGFDEFD
```

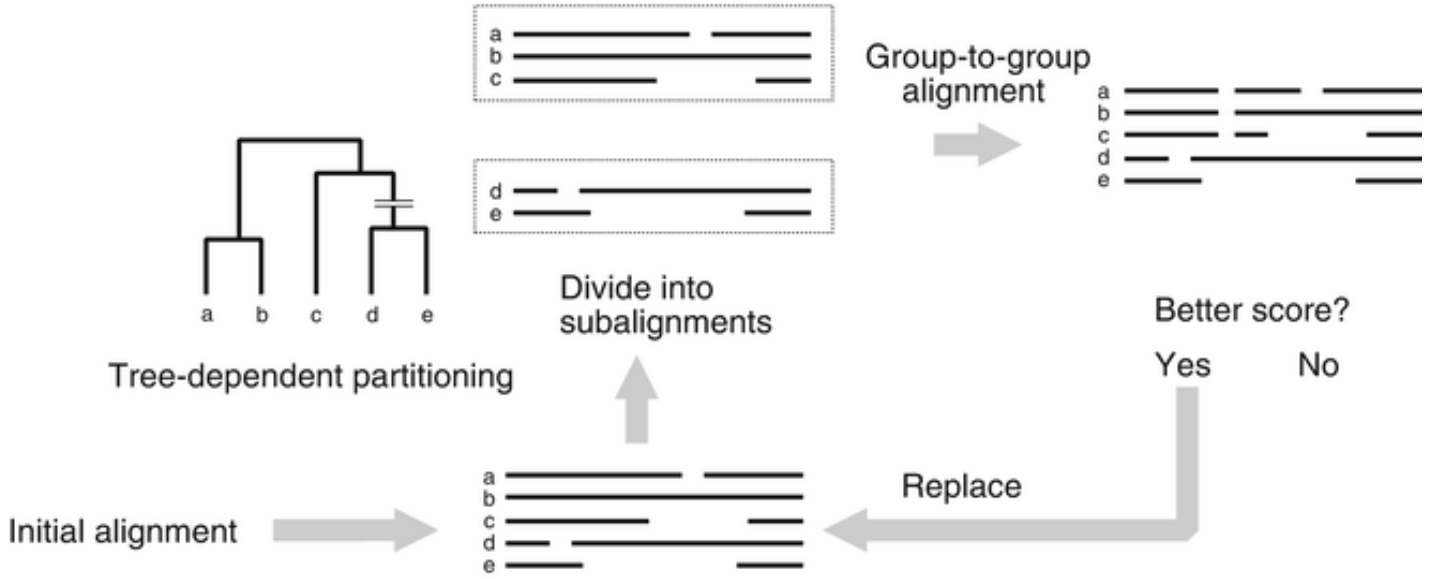
Рис. из презентации С.А.Спирина

Проблема пргрессивных выравниваний – гэп, появившийся в начальных выравниваниях например, парных) сохраняется до конца

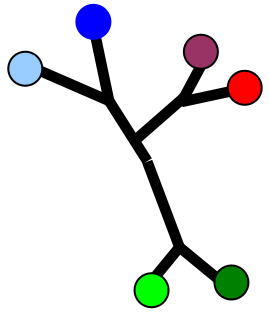
Из-за этого необходим последний этап – улучшение выравнивания (refinement)

Итеративное рафинирование выравнивания

i. Построить множественное выравнивание
ii. Разделить его на две группы
iii. Перевыровнять две группы. Повторить ii

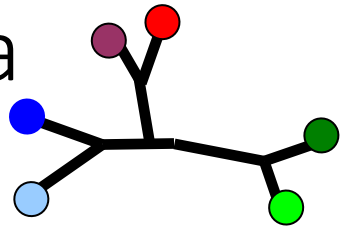


Прогрессивные = иерархические алгоритмы выравнивания многих последовательностей



- Основная идея: *выравнивание двух выравниваний* с помощью динамического программирования
- Этапы алгоритма
  - Построение направляющего дерева
  - Итерация выравнивания выравниваний
  - “Рафинирование” (refinement) выравнивания
- Результат – ГЛОБАЛЬНОЕ множественное выравнивание

Построение направляющего дерева



- Для ВСЕХ ПАР последовательностей строится парное выравнивание.
- Вес парного выравнивания пересчитывается в расстояние между последовательностями:
  - чем больше вес, тем меньше расстояние;
  - расстояние между совпадающими последовательностями равно 0.
- Получается матрица расстояний между послед-ми
- Есть алгоритмы, превращающие матрицу попарных расстояний в дерево.
  - Расстояния между листьями по дереву отражают сходство последовательностей

Книга
Multiple Sequence Alignment Methods and Protocols

Edited by Kazutaka Katoh

Research Institute for Microbial Disease, Osaka University, Osaka, Japan

https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1036-7_17

Free

Слайды +1, +2, +3 – выдержки из книги

Алгоритмы и программы MSA

Progressive Method
A reasonable and widely used heuristic is the progressive method [2–4].

In this strategy, a tentative tree, called a “guide tree,” is built based on an all-to-all approximate comparison. Then, the sequences are aligned from the leaves to the root on the tree, in a group-to-group manner.

When the calculation reaches the root, the full MSA is obtained.

Many MSA programs use the progressive method as a part of the calculation. Among them, PRANK (Chapter 2) has a notable point that it rigorously considers insertions and deletions on the guide tree.

Алгоритмы и программы MSA

Iterative Refinement
The progressive method has a well-known problem that errors can occur in early steps (i.e., close to a leaf) of the guide tree, and those errors remain in the final step (the root of the guide tree).

One effective solution is to correct this type of mistake is iterative refinement [5–7]. The procedure is:
(i) construct an initial MSA;
(ii) divide the MSA into two groups; (iii) re-align the two groups; repeat (ii) and (iii). This technique is used in Prrn5 (Chapter 5), Clustal Omega (Chapter 1), MAFFT (Chapter 11), and MSAProbs (Chapter 3).

Алгоритмы и программы MSA

Consistency

Another important idea to overcome the limitations of the progressive method is consistency [8, 9]. In the tree-based consistency transformation technique, proposed first in Notredame et al. [10], when aligning two sequences (A and B), other sequences (e.g., C) in the dataset are also used.

That is, in addition to direct alignment between A and B, an alternative alignment between A and B is synthesized by using alignments AC and BC.

Alignment AB is recalculated by considering such alternative alignments and used in the progressive alignment step. As a result, alignment errors in early steps are efficiently suppressed.

This method was further elaborated to use probabilistic pairwise alignments by a pair hidden Markov model in ProbCons [11]. MSAprobs (Chapter 3) represents this type of MSA method and gives highly accurate MSAs.

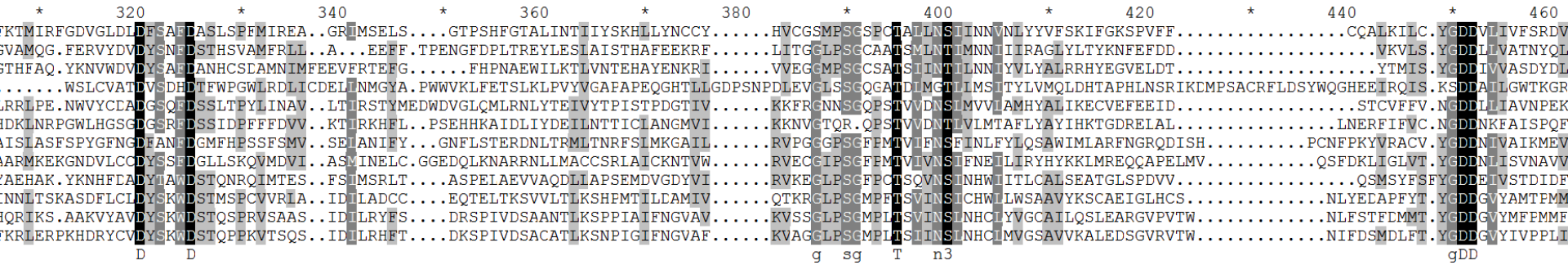
3. Сравнение разных выравнивний тех же последовательностей

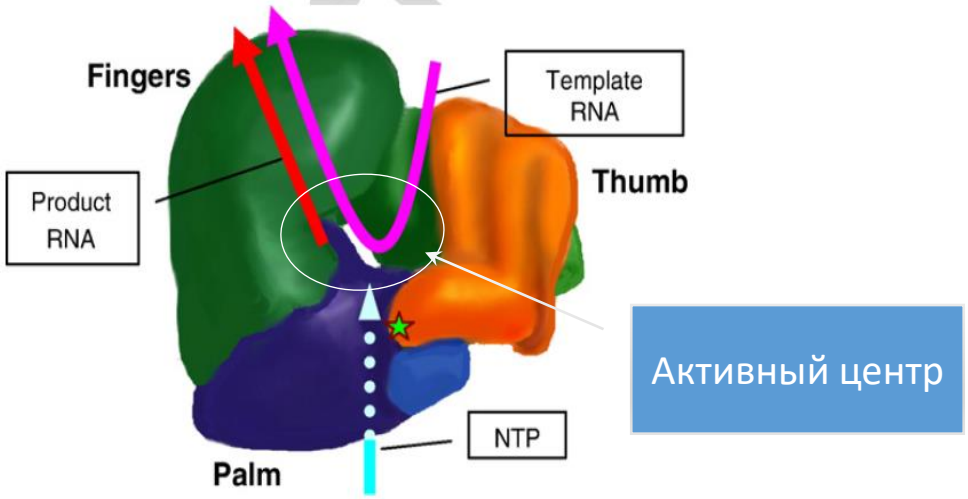
Построенных разными программами

Цель множественного выравнивания последовательностей гомологичных доменов или белков:

- Реконструкция эволюции белков от общего предка.
  А именно, в колонке выравнивания стоят аминокислотные остатки (ако), унаследованные от ако общего предка всех этих белков.
  Наследуются ДНК гена, т.е. кодоны, это подразумевается.
- Основа для установления гомологии – сходство последовательностей. Оно неравномерно на разных участках (слайд +1)
- Достигнута ли цель практически - не проверяемо (не считая парочки долговременных экспериментов (Ленский – E.coli, Кондрашов - Schizophyllum commune)
- На практике стремятся к этой цели, но следует понимать, что она недостижима. Разные программы множественного выравнивания используют разные алгоритмы и разные эвристики.

РНК зависимая РНК полимераза (RdRP), консервативные участки





На каких участках выравнивание правильное –
совпадает с эволюционным?

Точное сравнение двух выравниваний.

- Два выравнивания I и II тех же последовательностей совпадают если в каждой колонке i (i = 1, 2, …, N) выравниваний I и II стоят те же самые буквы. Буквы не в смысле а.к.о., а в смысле номера буквы в последовательности (рис. 1.)
- Различие выравниваний I и II определяется числом колонок, для которых это не так и их расположением

Какие выравнивания тех же последовательностей совпадают?

```
     1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Seq1 MKFR-SSHYA-S
Seq2 MKYRRS-HYA-S
Seq3 MEFRRRSHYA-R
```

```
     1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Seq1 MKF-RSSHYAS
Seq2 MKYRRS-HYAS
Seq3 MEFRRRSHYAR
```

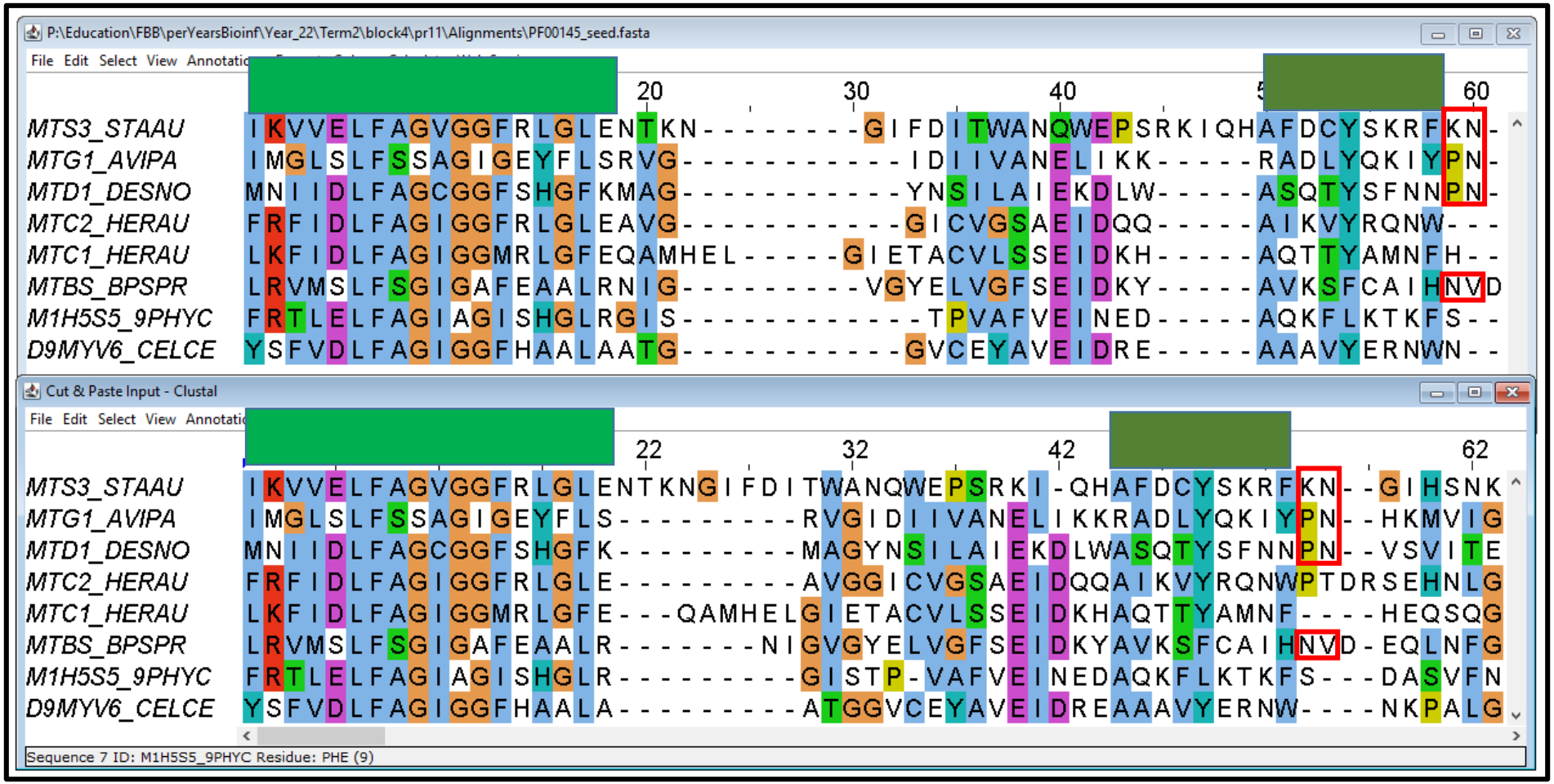
```
     1 2 3 4 5  6 7  8  9 10111213
Seq1 MKFR-SSHYA-S
Seq2 MKYR-RSHYA-S
Seq3 MEFRRRSHYA-R
```

```
     1  2  3  4 5  6 7  8  9 101112
Seq1 -MKFR-SSHYAS
Seq2 -MKYR-RSHYAS
Seq3 -MEFRRRSHYAR
```

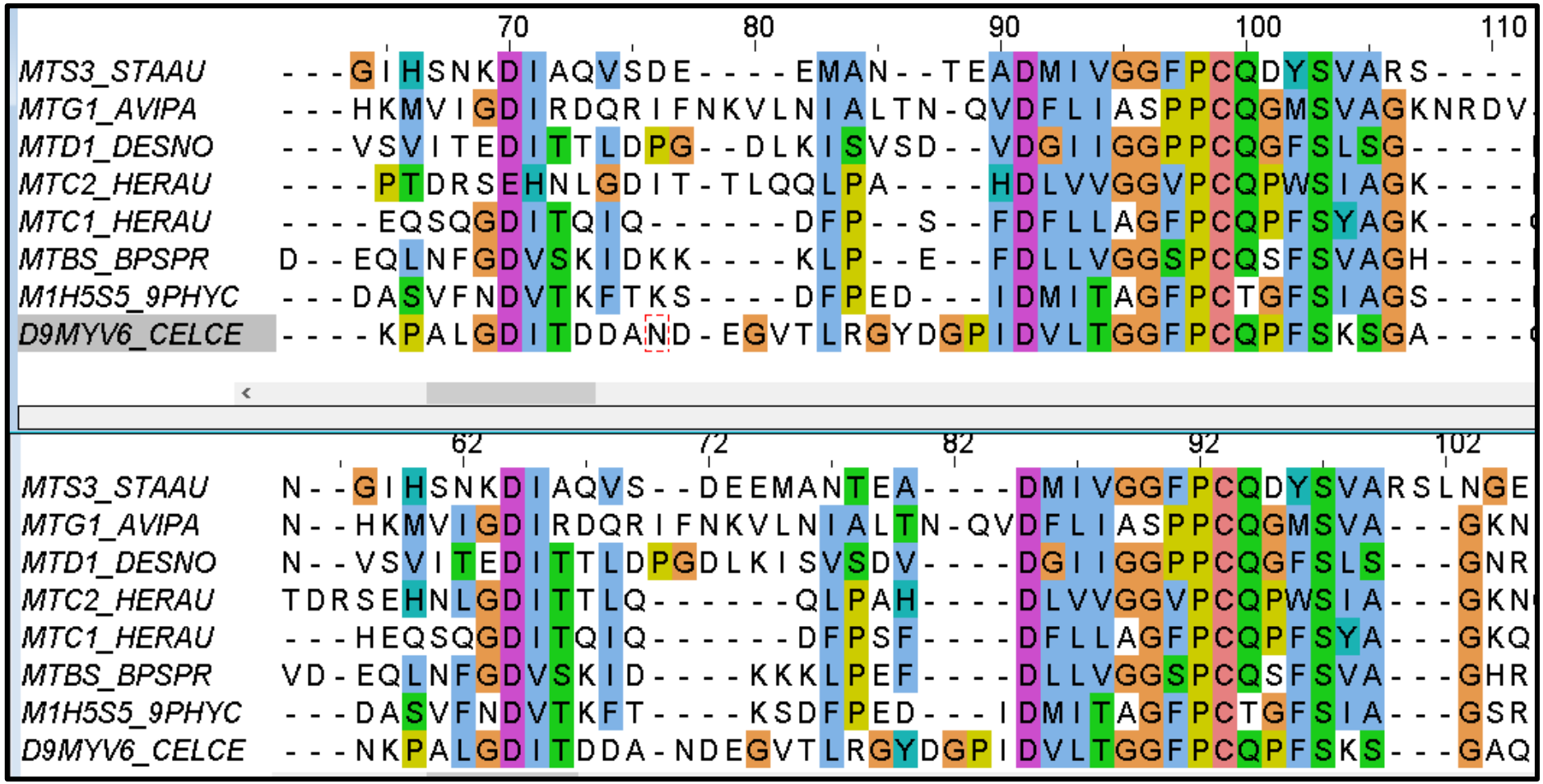
Колонка i выравнивания X совпадает с колонкой j выравнивания Y если в них – те же самые остатки; те же самые значит – с теми же номерами, а не с теми же буквами!

ПРИМЕР. На рис. выравнивания совпадают на двух выделенных зеленым участках

Ещё есть совпадения не на всех, а на подмножествах последовательностей. НАЙДИТЕ!



Продолжение. Разметьте самостоятельно!



Take home message

To compare alignments I and II

1. Sort sequences by ID in both alignments.
2. Если в двух блоках без гэпов есть хотя бы одна одинаково выровненная позиция, то блоки выровнены одинаково
3. Алгоритм сравнения

   1) Для каждого выравнивания идём по колонкам
   N = 1,2,3,… и составляем вектор S:
   N: $S_I(N)$ = s1,s2,…., s_n
   s1 – номер буквы в первой последовательности
   s2 – номер буквы во второй последовательности
   ……
   Если в последовательности i стоит гэп, то si = “-”

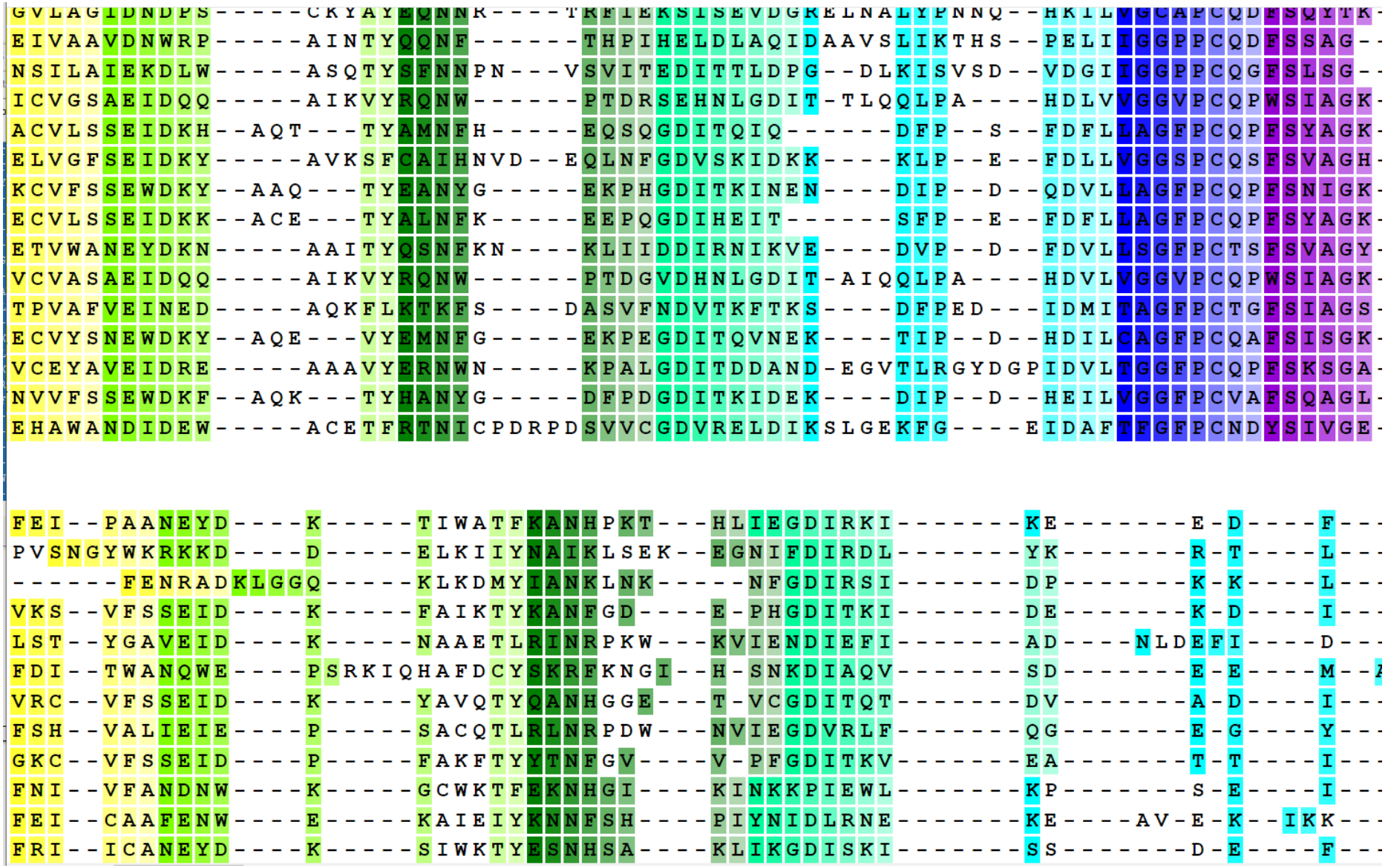
   2) Если $S_I(N) = S_{II}(N')$, то колонка N выравнивания I выровнена одинаково с колонкой N’ выравнивания II

   3) Последовательно идущие в обеих выравниваниях одинаково выровненные колонки объявляются блоком одинаково выровненных фрагментов

Для ручного сравнения 2х выравниваний тех же последовательностей удобно использовать сервис

VerAlign: a multiple sequence alignment assessment tool

VerAlign раскрашивает 2е выравнивание цветами первого. Это облегчает поиск неодинаково выровненных столбцов



3. Выравнивание последовательностей по пространственной структуре

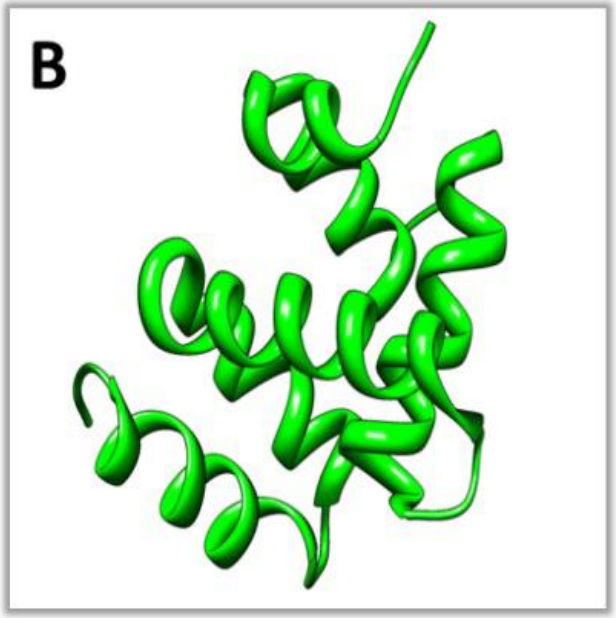
Для этого, как минимум, пространственные структуры сравниваемых последовательностей должны быть решены

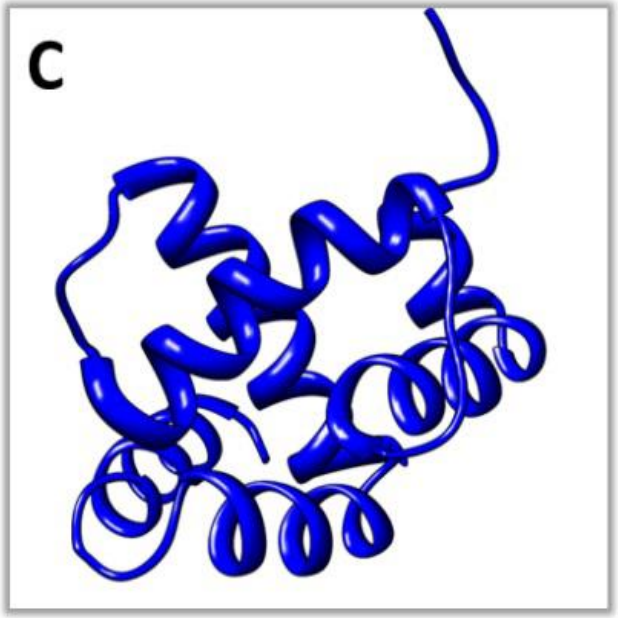
Выравнивание, построенное по совмещению полипептидных цепей

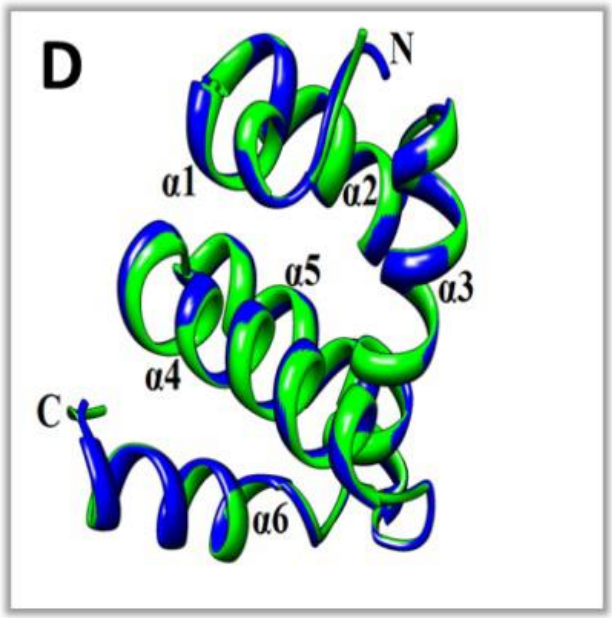
A

```
                      *       20        *       40        *       60        *
MsepCSP5_  : MNSFTVLCLFAIVALAVARPDGKYTDRYDSVNLDQILSNRRLLVPYIKCMLDQGKCTPDGKELKTHIREA :  70
MbraCSPA6  : ----------------------EDKYTDKYDNINLDEILANKRLLVAYVNCVMERGKCSPEGKELKEHLQDA :  50
                                    KYTD YD  NLD IL N RLLV Y  C    GKC P GKELK H   A

                    80        *       100       *       120       *
MsepCSP5_  : LEQDCAKCTKAQRDGTRQVMGHLINHEVDYWNELKAKYDPKNLYSTKHEQELRKLKQ----- : 127
MbraCSPA6  : IENGCKKCTENQEKGAYRVIEHLIKNEIEIWRELTAKYDPTGNWRKKYEDRAKAAGIVIPEE : 112
              E  C KCT  Q  G   V  HLI  E   W EL AKYDP      K E
```

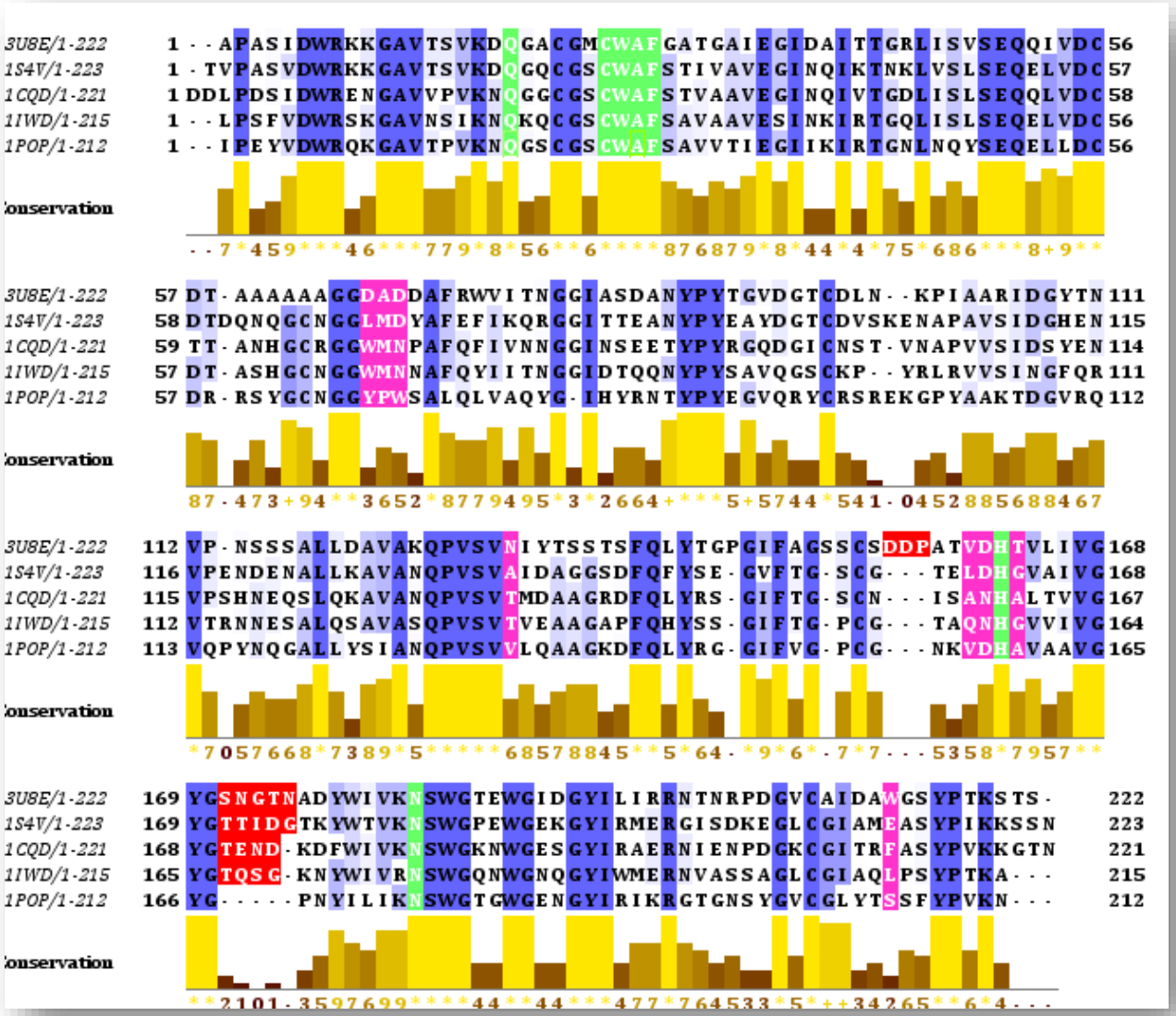






Younas et al.,. Int J Biol Sci. 2018 A chemosensory protein MsepCSP5 involved in chemoreception of oriental armyworm *Mythimna separata*

Multiple Sequence Alignment of *Cs*CP against Plant CPs



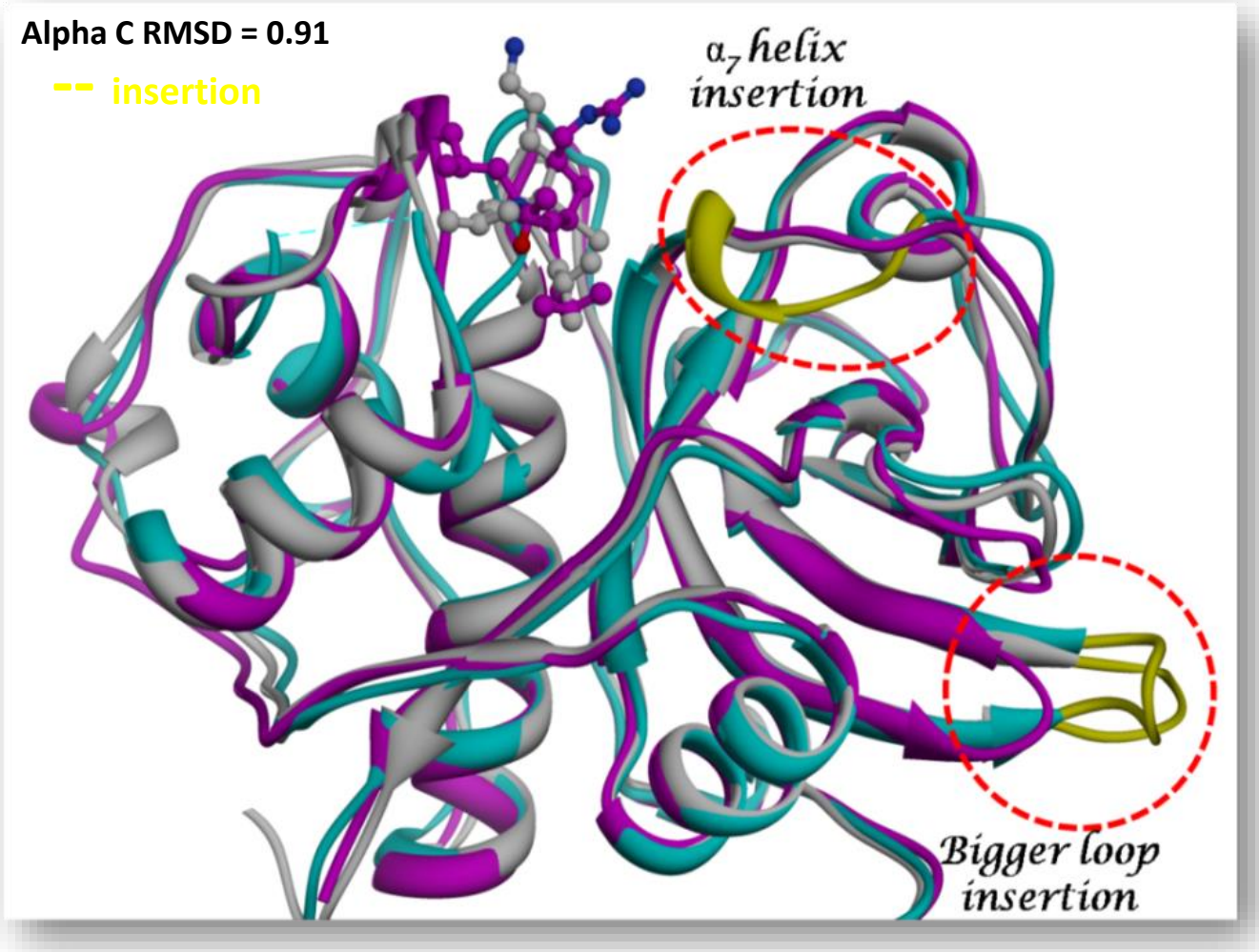
-- Conserved

-- Catalytic

-- Active site

-- *3U8E* (*Crocus sativus*)
-- 1S4V (*Ricinus communis*)
-- 1CQD (*Zingiber officinale*)
-- 1IWD (Ervatamin B)
-- 1POP (*Carica papaya*)

Conserved Structure of *Cs*CP Superimposition with Plant CPs

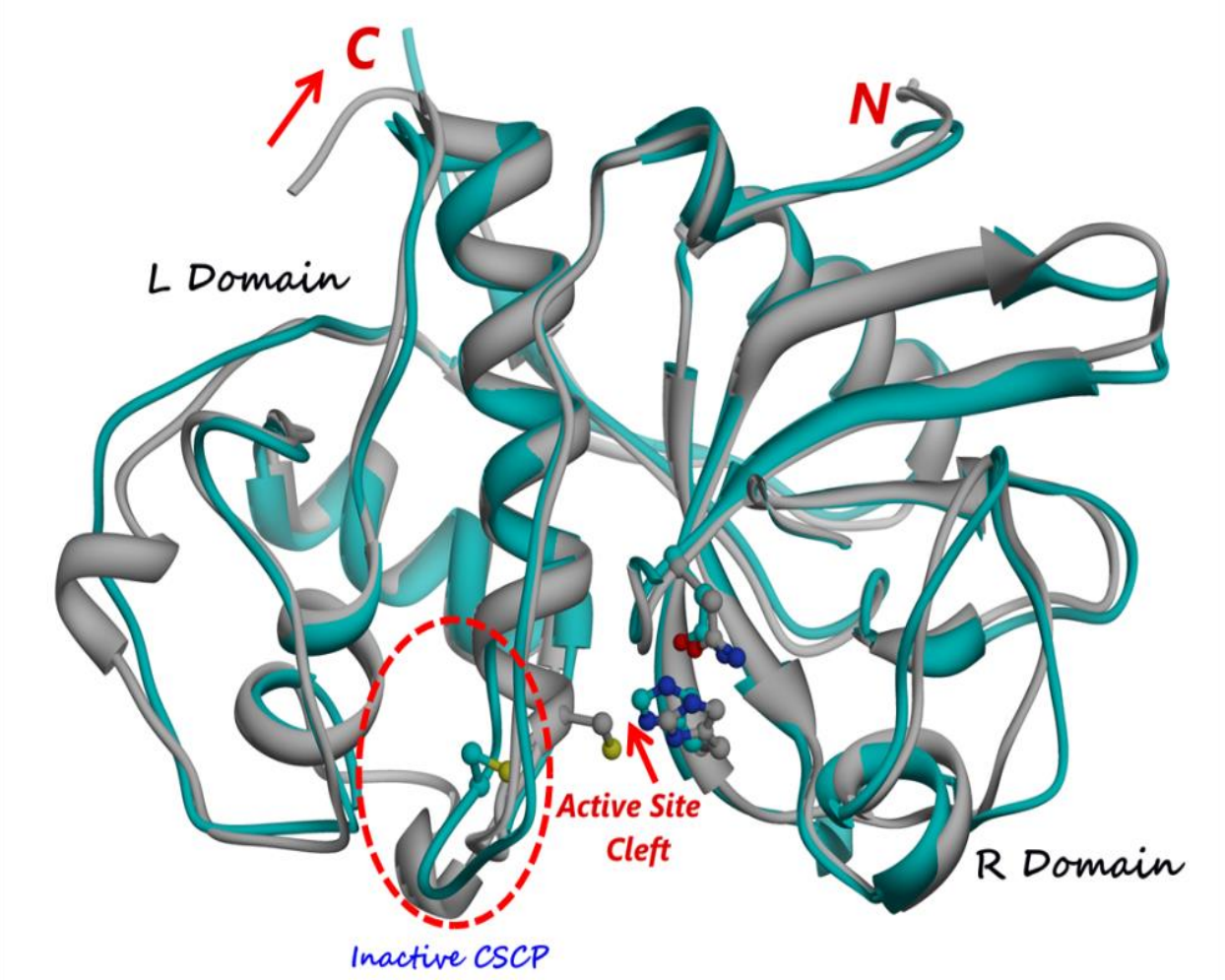


-- *3U8E (Crocus sativus)*

-- 1S4V (*Ricinus communis*)

-- 1POP (*Carica papaya*)

Overall Topology of *Cs*CP



-- Inactive Form

-- Active Form

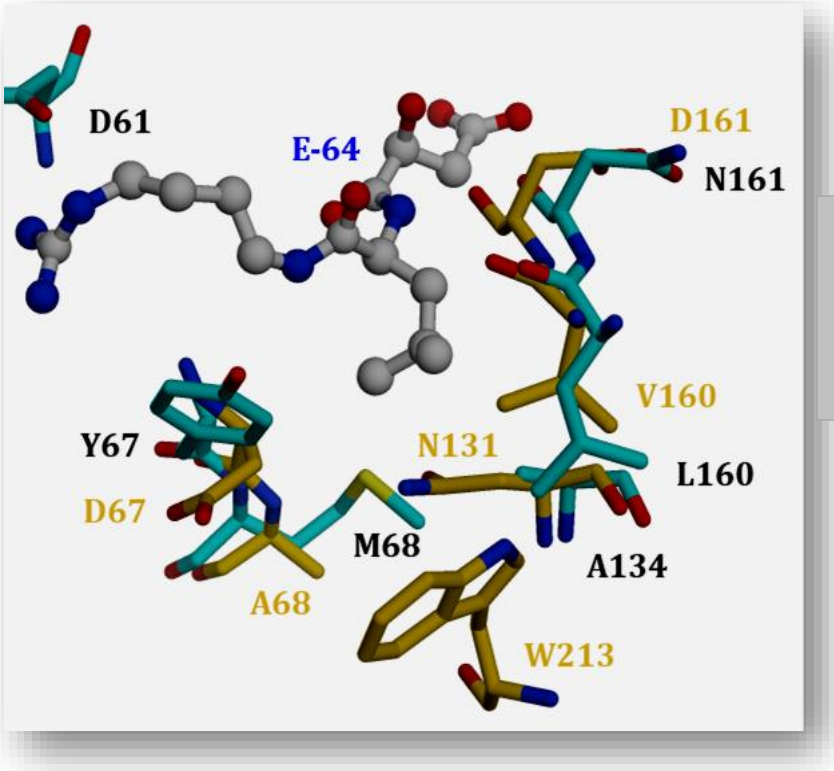
Catalytic Triad:
C25, **H162**, and **N183**
(Active Site Cleft)

Inactive Form:
C25 bridged with C22

Active Form:
C22 bridged with C64
C25 is free

KEY Findings …. Identification of S_2 Pocket Residues of CSCP

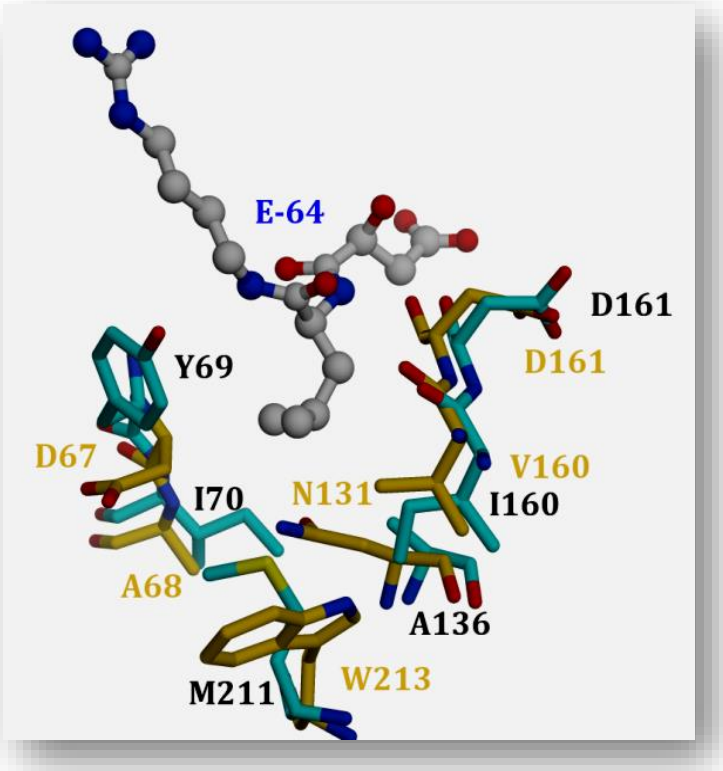
Cathepsin K-E64



-- Others

-- CsCP

Actinidin-E64



Конец презентации

Задание для работы в классе.

Дано два выравнивания pf00145_seed.fasta и pf00145_seed-tcoffee.fasta одних и тех же 31 последовательностей

Найти
(i) блок одинаково выровненных колонок в двух выравниваниях
(ii) участок, на котором выравнивания полностью различны
(iii) Результаты сохранить в форме

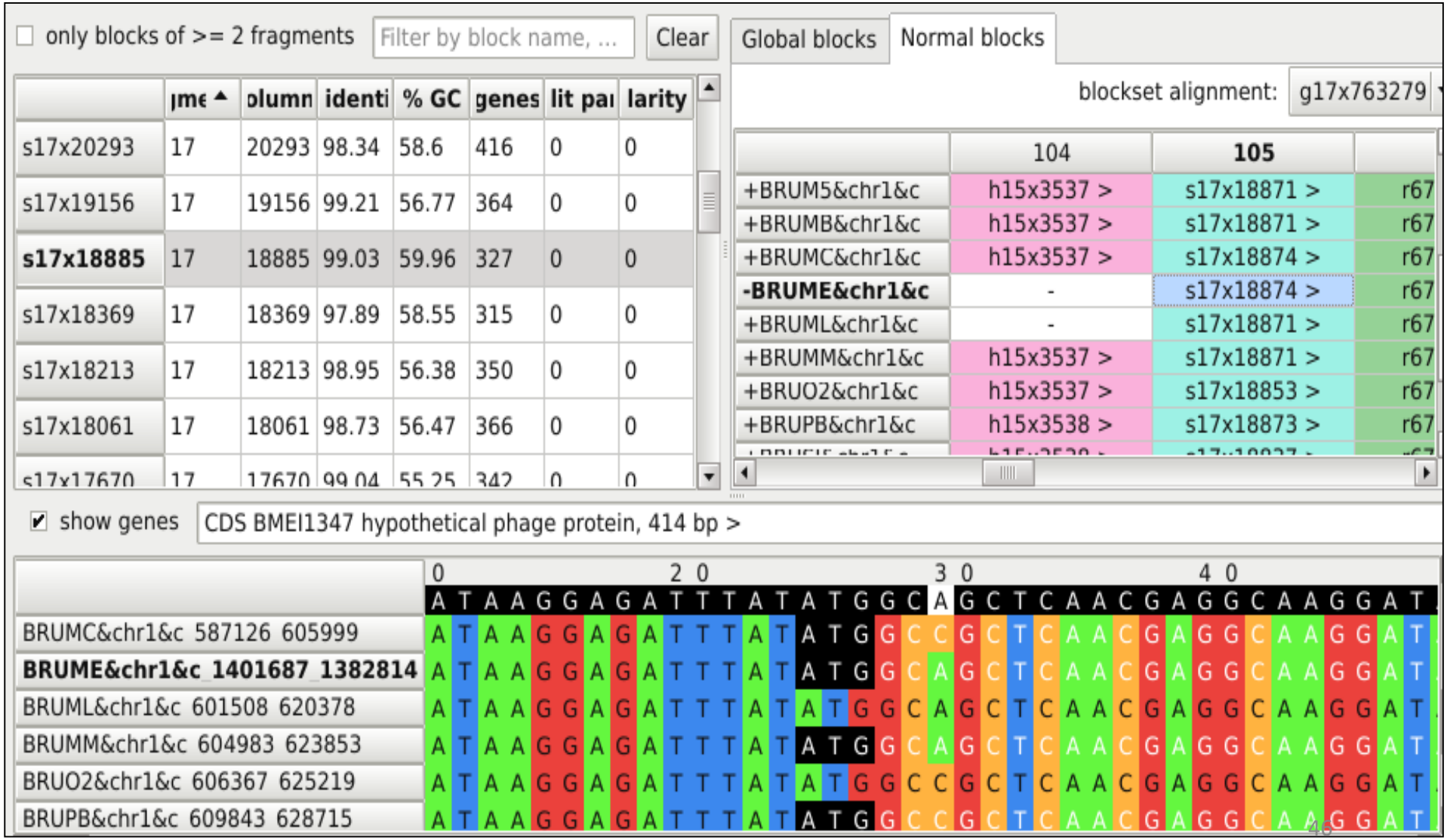
4. Проект блочного MSA

- Определение. MSA = набор блоков достоверного выравнивания во всех или части последовательностей. Аал
- Этап I: во входном выравнивании найти достоверные блоки специфичные для ветвей входного филогенетического дерева
- Этап II: во входном выравнивании найти все блоки достоверного выравнивания.
- Этап III: найти все блоки достоверного выравнивания во входном множестве последовательностей
- Этап IV: создать сервис для блочного MSA

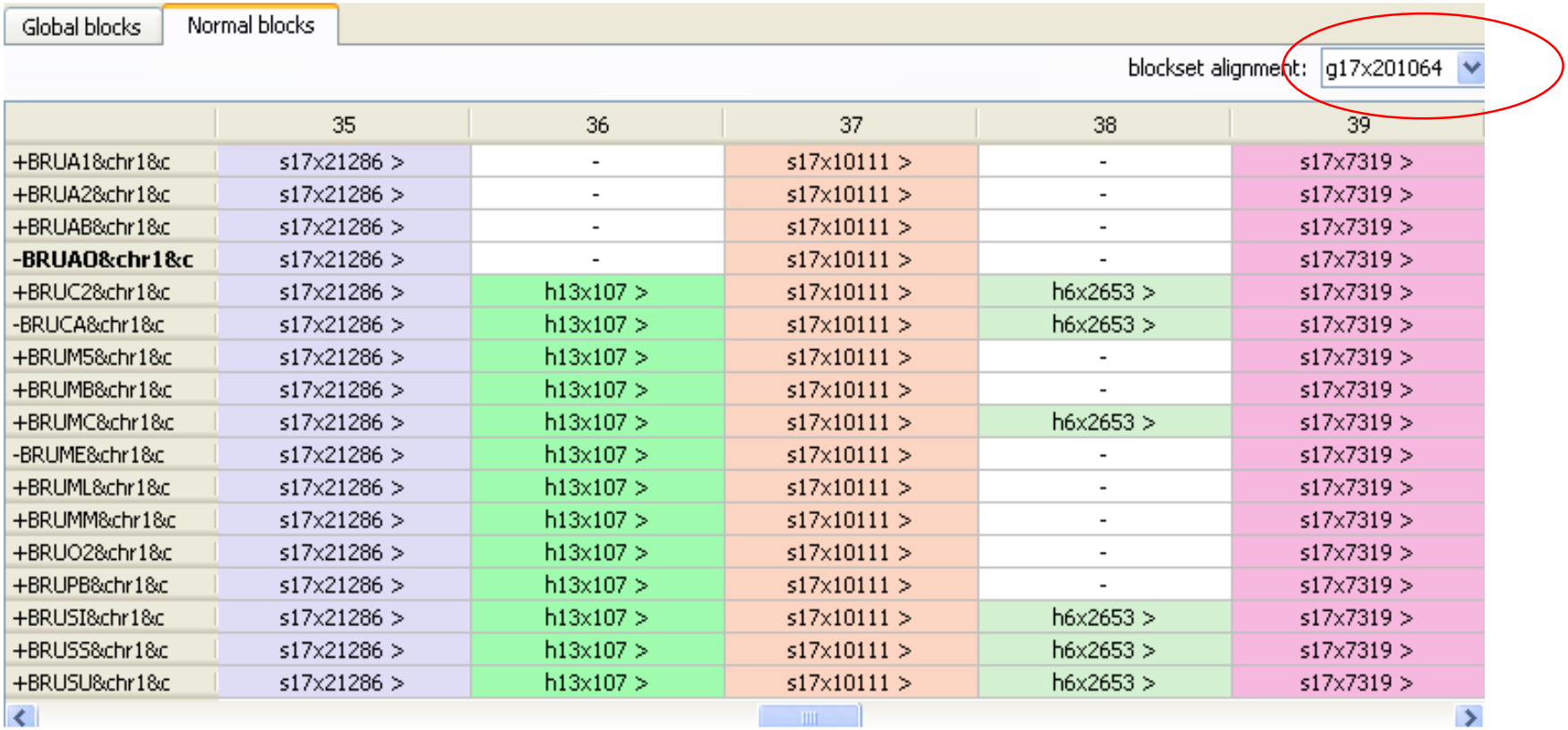
Пример: блочное выравнивание геномов

Борис Нагаев NPGexplorer

Визуализация выравнивания 17 геномов бруцелл (рис. из работы К.Худяковой)



Каждая ДНК представляется последовательностью блоков



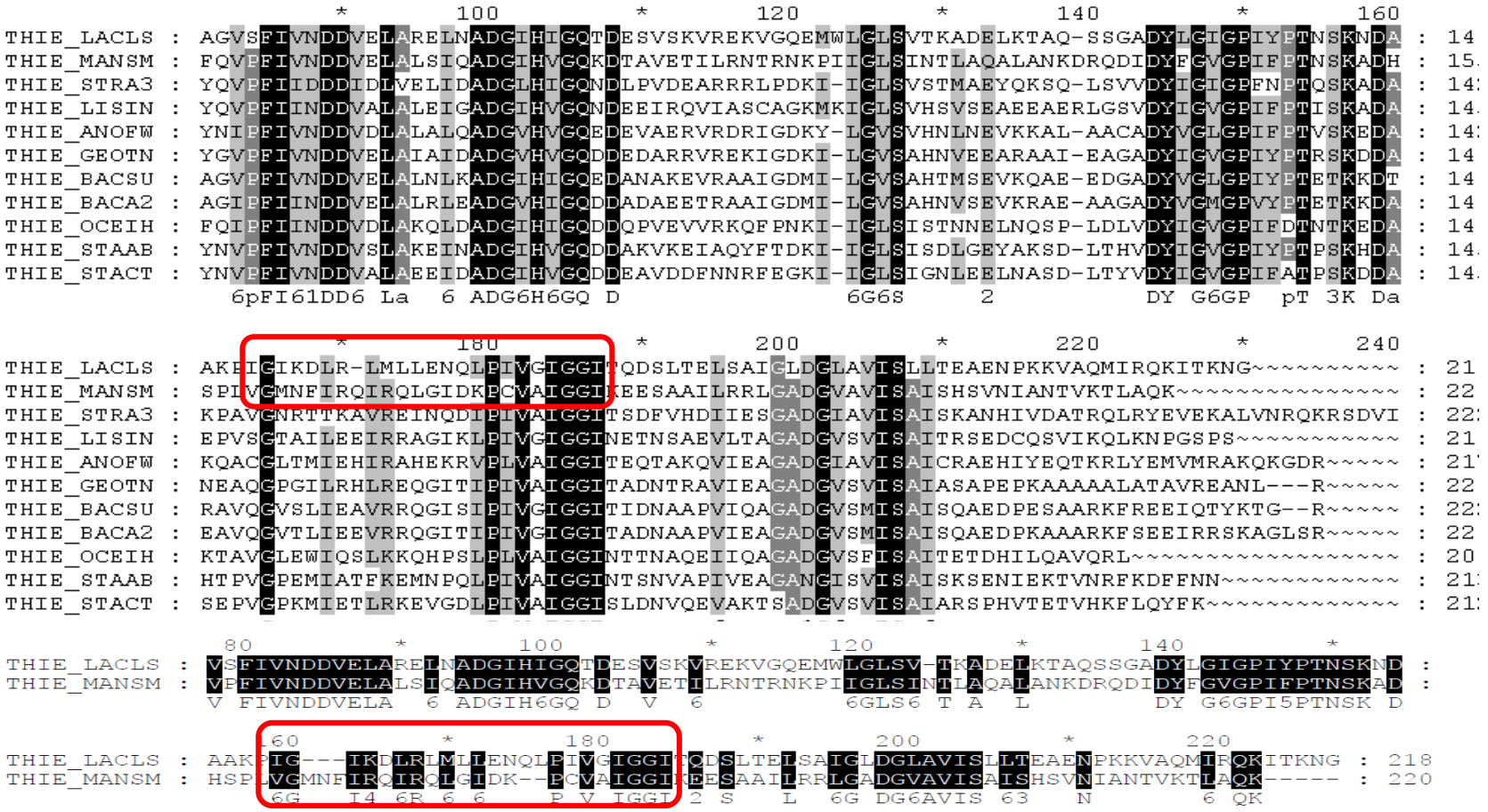
Global blocks | Normal blocks

blockset alignment: g17x201064

	35	36	37	38	39
+BRUA1&chr1&c	s17x21286 >	-	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUA2&chr1&c	s17x21286 >	-	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUAB&chr1&c	s17x21286 >	-	s17x10111 >	-	s17x7319 >
-BRUAO&chr1&c	s17x21286 >	-	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUC2&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	h6x2653 >	s17x7319 >
-BRUCA&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	h6x2653 >	s17x7319 >
+BRUM5&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUMB&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUMC&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	h6x2653 >	s17x7319 >
-BRUME&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUML&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUMM&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUO2&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUPB&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	-	s17x7319 >
+BRUSI&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	h6x2653 >	s17x7319 >
+BRUSS&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	h6x2653 >	s17x7319 >
+BRUSU&chr1&c	s17x21286 >	h13x107 >	s17x10111 >	h6x2653 >	s17x7319 >

Про типы блоков следующий слайд

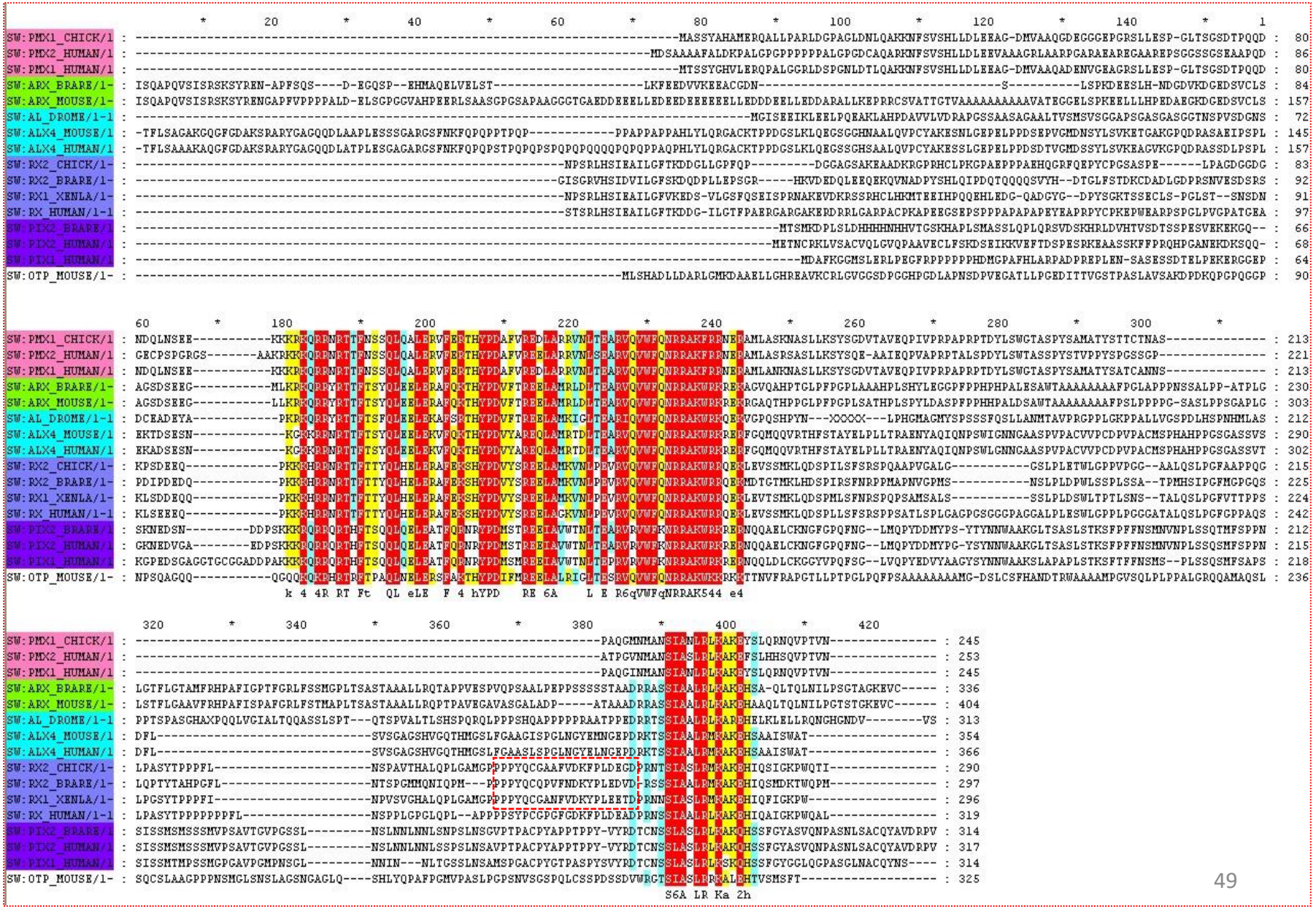
Множественное даёт аргументы, опровергающие оптимальное парное выравнивание. Пример.



В красном овале во множественном выравнивании – одна делеция между консервативными позициями.

В оптимальном парном выравнивании первых двух последовательностей в красном овале – четыре делеции. Участки те же.

ДВА ДОМЕНА гомеобелков: гомеодомен и OAR домен

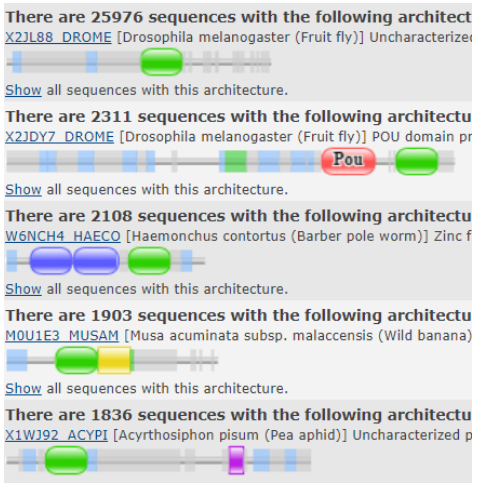


Гомеодомен является ДОМЕНОМ

Доказательство

- Выравнивание, со сходством, свидетельствующим о гомологичности последовательностей

- Представленность домена в негомологичных белках (обычно, но не обязательно)

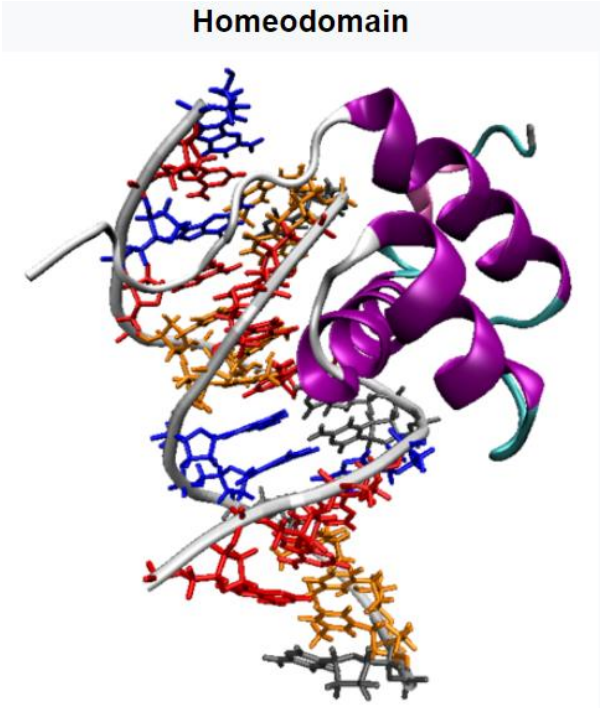


Эволюционные домены

- Имеют определенную функцию (не всегда известна)
  DUF – Domain of Unknown Function
- Часто совпадают со структурными доменами
  (но не всегда)

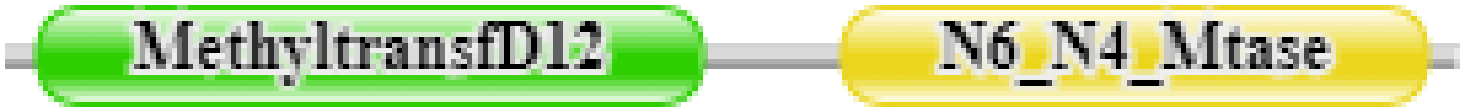
Гомеодомен – ДНК связывающий домен

Homeodomain proteins regulate gene expression and cell differentiation during early embryonic development, thus mutations in homeobox genes can cause developmental disorders.[1]

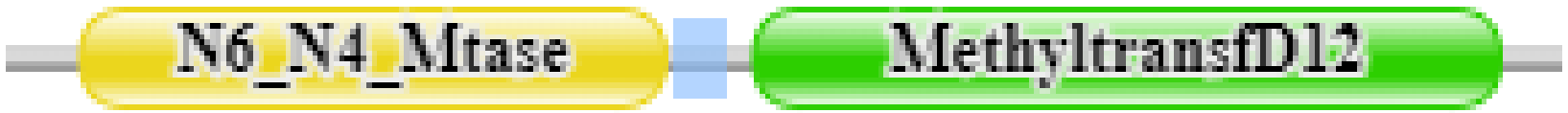


Как выровнять эти две последовательности?

There are 9 sequences with the following architecture:
MethyltransfD12, N6_N4_Mtase
A0A2Z5QVW5_9MICC [**D12-N6_N4**]

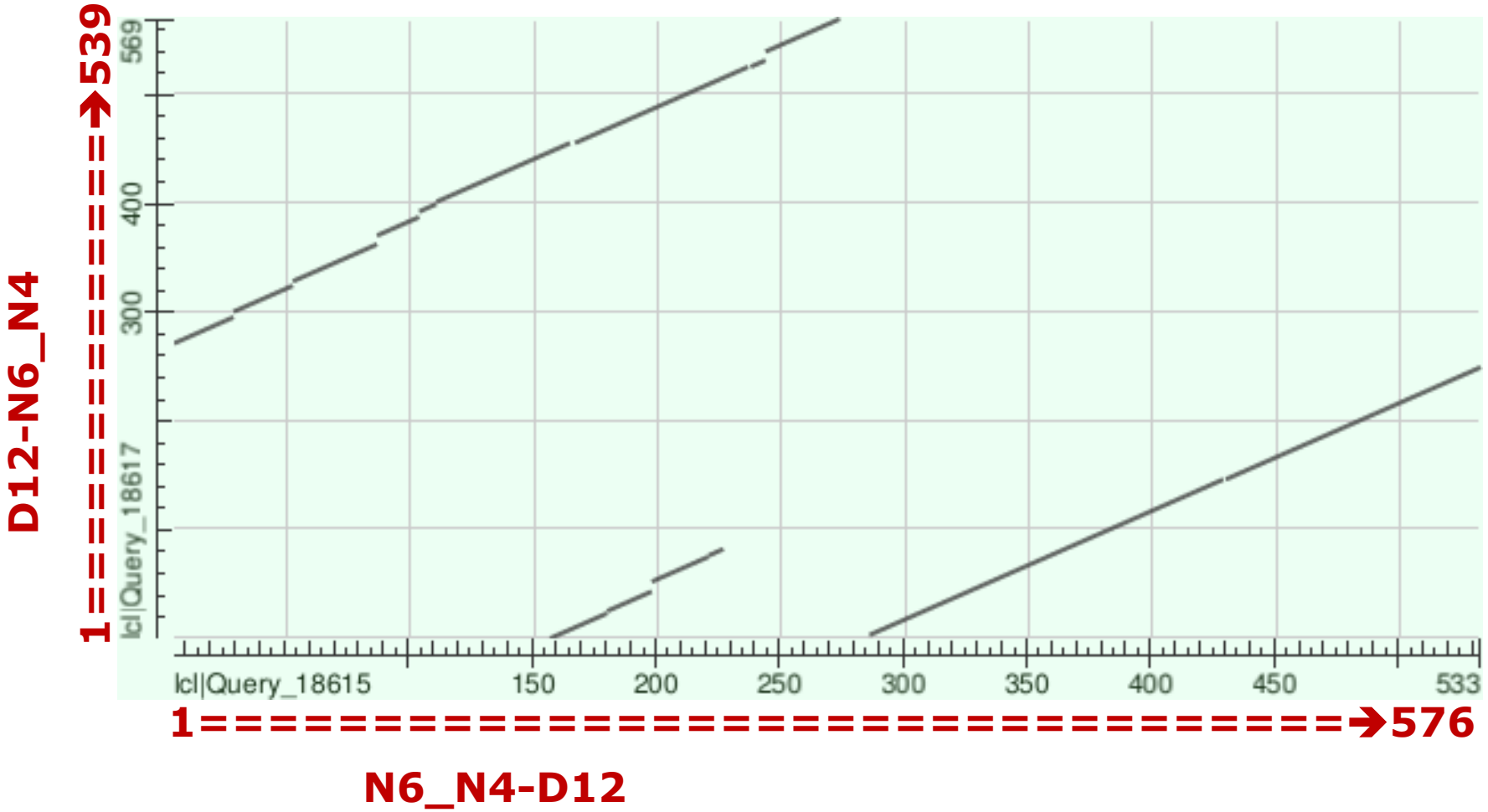


There are 5 sequences with the following architecture:
N6_N4_Mtase, MethyltransfD12
A0A1I7GYG0_9CLOT [**N6_N4-D12**]



Как такое может возникнуть?

Лучшее парное выравнивание: алгоритм множественных локальных выравниваний.



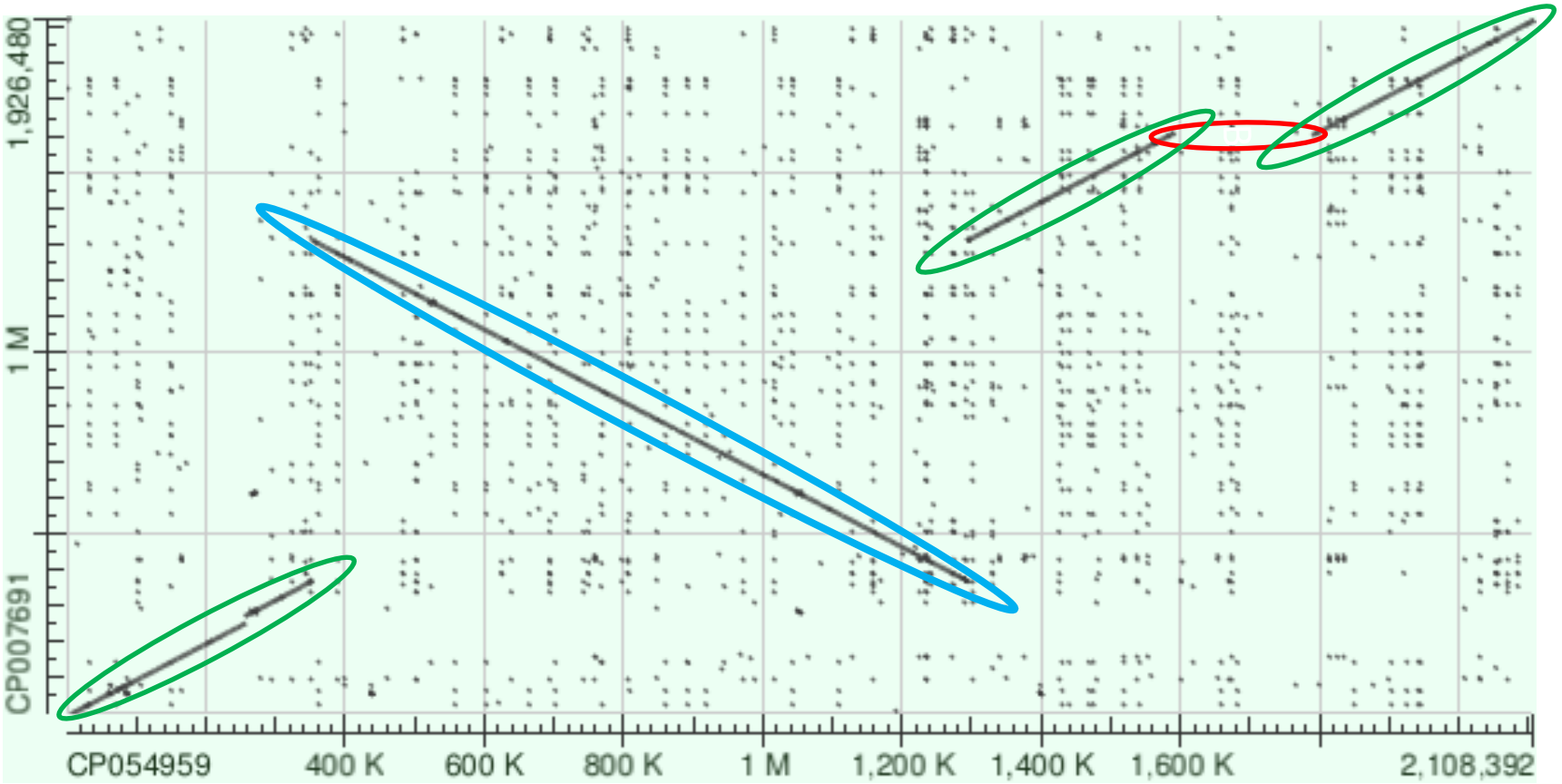
Программа BLASTp. Визуализация Dot Plot

Эволюция геномов бактерий

Крупные - единовременные изменения в геномах:

- Делеция большого участка (многие сотни, тысячи и миллионы пар нуклеотидов)
- Дупликация большого участка
- Горизонтальный перенос, т.е. вставка большого участка из чужого генома
- Инверсия большого участка
- Транслокация большого участка

Карта локального сходства двух геномов родственных штаммов бактерий

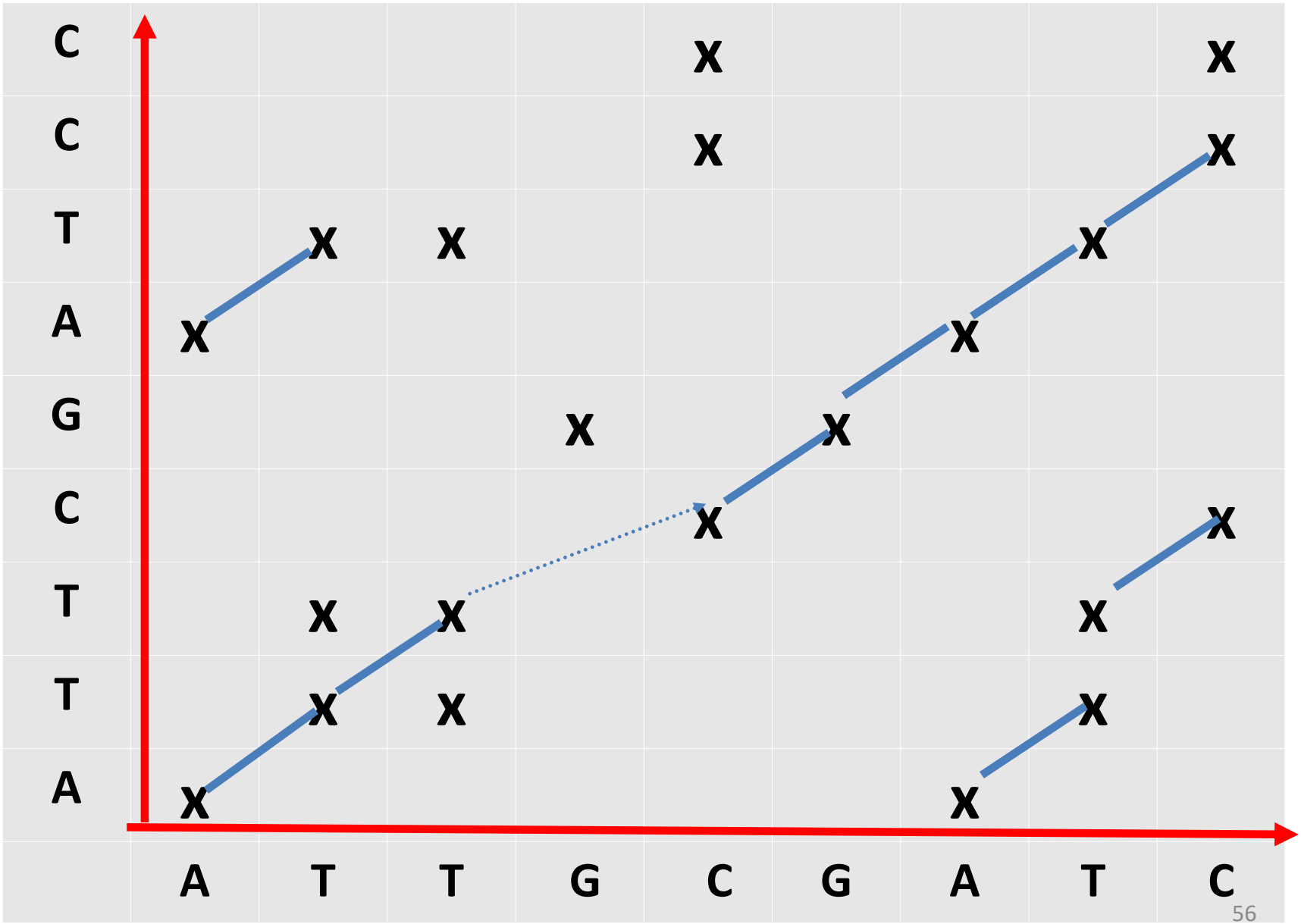


Сходство прямых цепочек

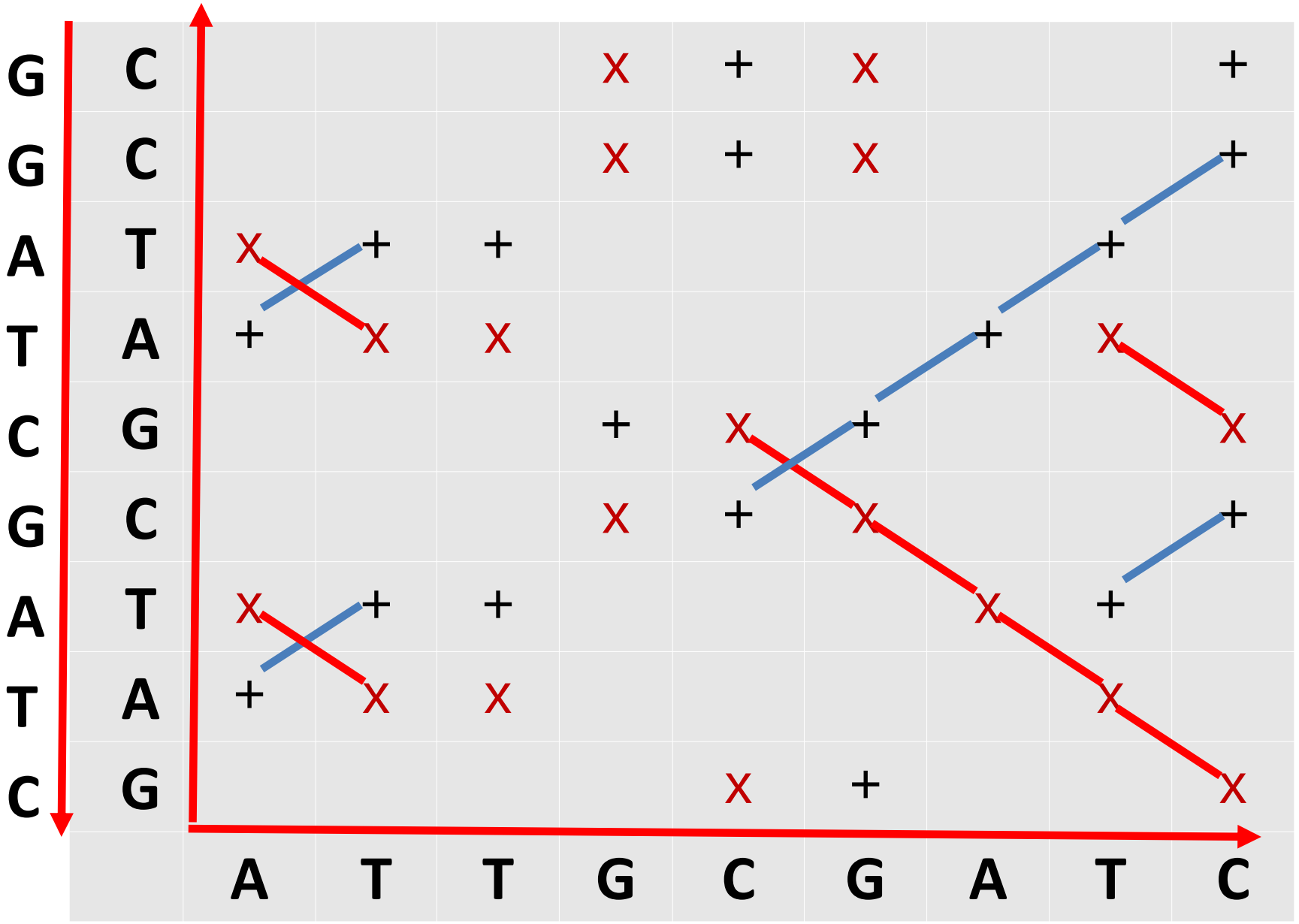
Инверсия - сходство прямой цепочки с комплементарной второго генома

Делеция / вставка

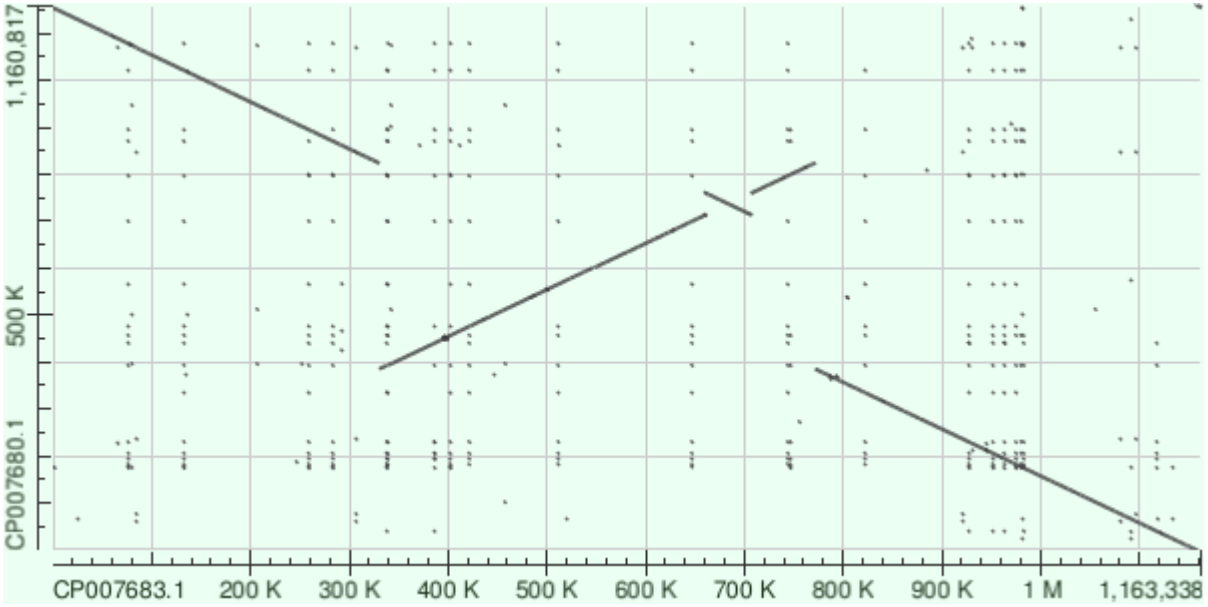
Объяснение Карты локального сходства



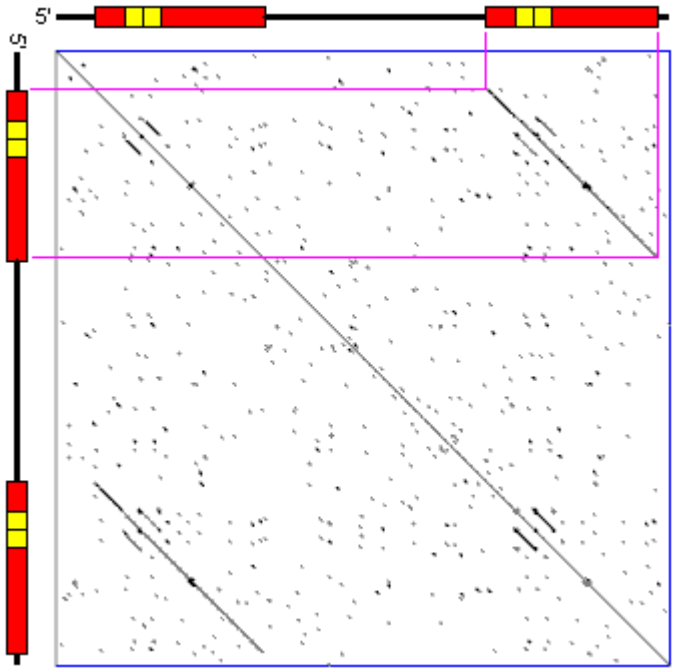
Карта сходства с учетом комплементарной цепочки



Что видим на этой карте?

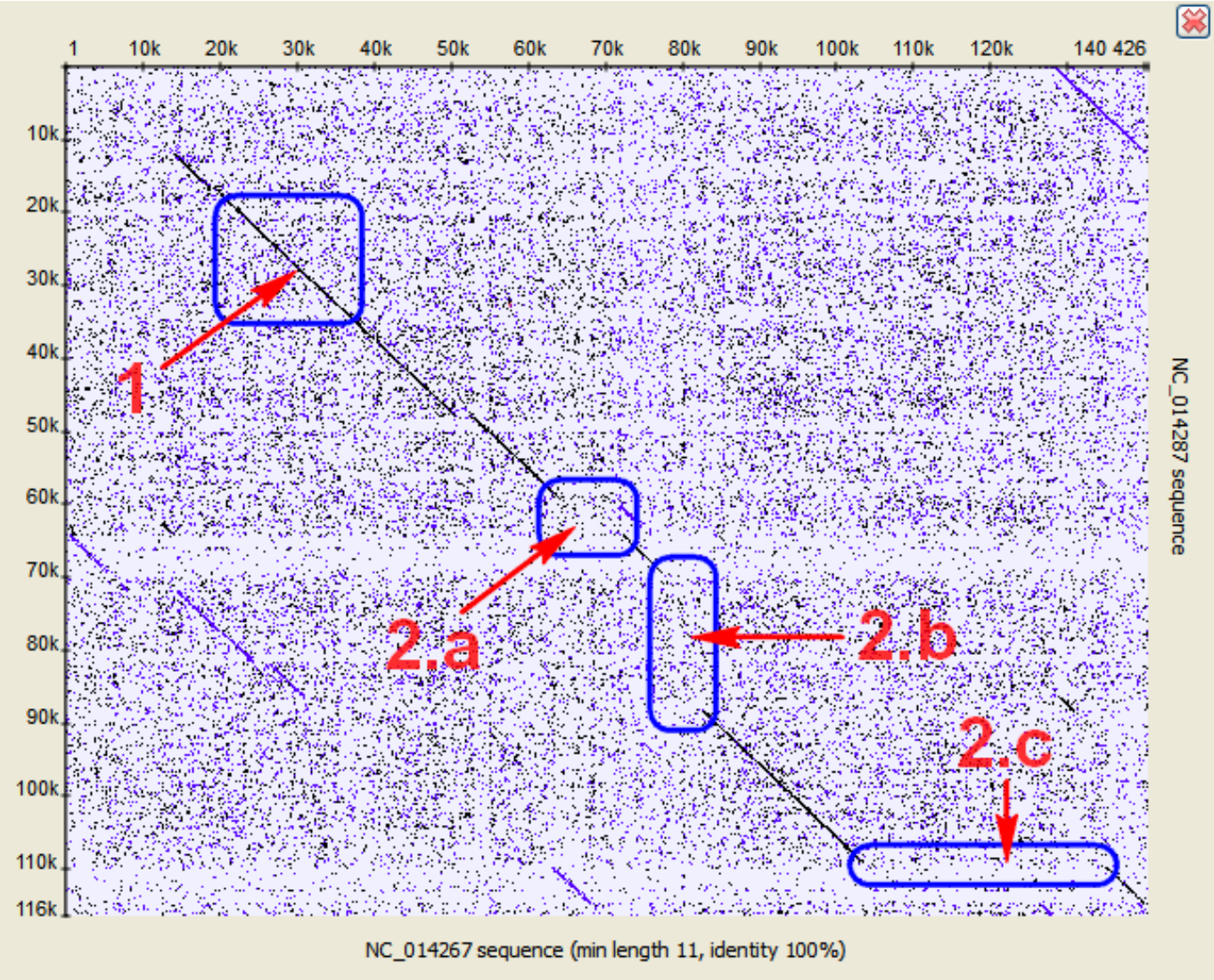


Дупликация



КОНЕЦ ПРЕЗЕНТАЦИИ

Interpreting Dotplot: Identifying Matches, Mutations, Invertions, etc Создатель Yuliya Algaer, 2014



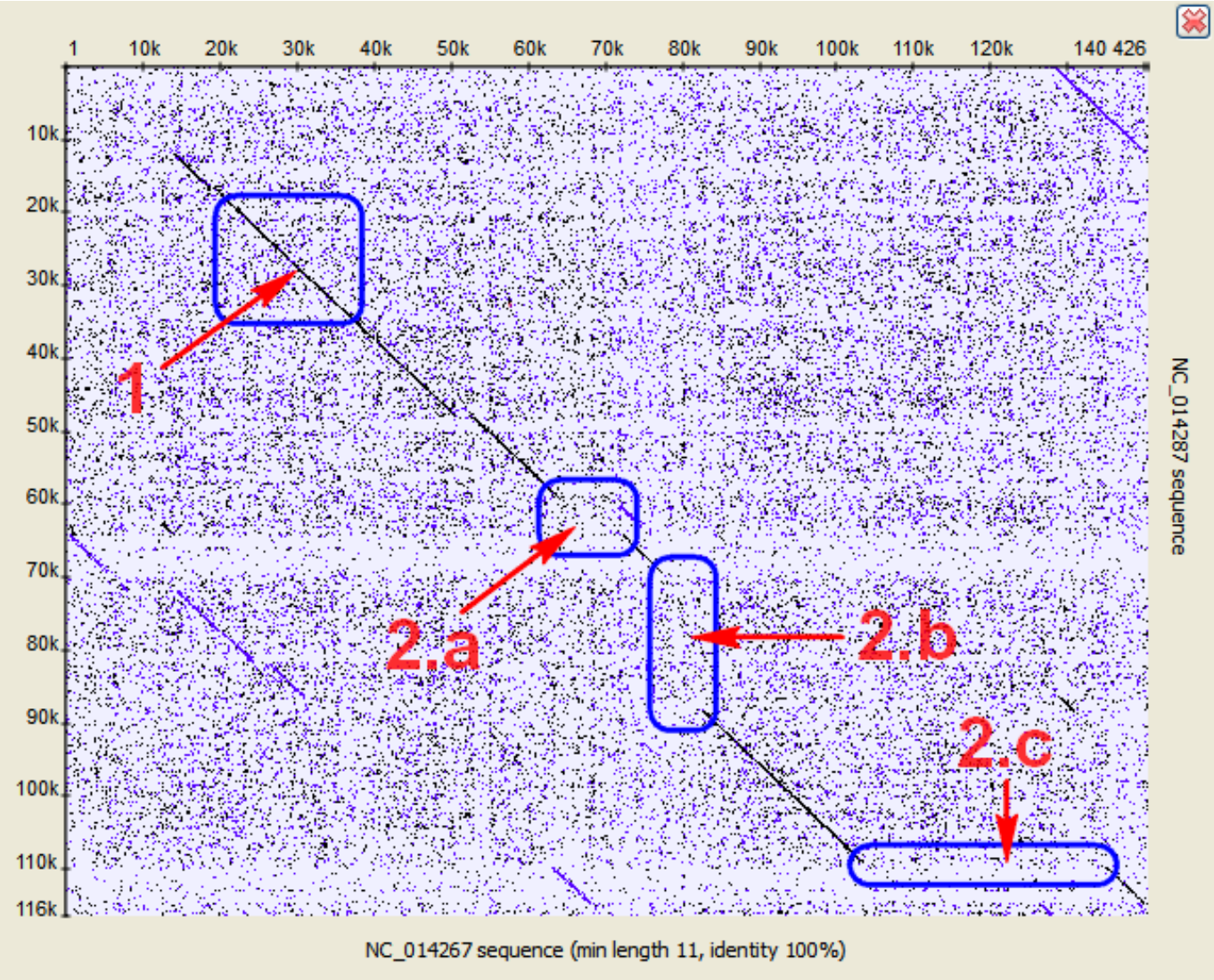
Эволюция белков

Локальная - небольшие изменения в гене
(Замены а.к. Делеции Вставки)

Большие изменения:

1) Накопленные небольшие изменения
2) Небольшие изменения гена ведущие к большим изменениям белка
    1) Мутация стоп кодона => удлинение последовательности белка
    2) Мутация кодона на стоп кодон
        1) гибель белка = псевдогенизация или
        2) Укорочение последовательности белка
        3) Программруемый сдвиг рамки считывания
    3) Мутация в сайте инициации (начала) трансляции
3) Крупные перестройки генома, затрагивающие гены!

Interpreting Dotplot: Identifying Matches, Mutations, Invertions, etc Создатель Yuliya Algaer, 2014



ВЫРАВНИВАНИЕ