# Использование КС-грамматики для распознавания 16s рРНК

Семён Григорьев, Дмитрий Ковалёв

12 сентября 2017 г.

## 1 Введение

Одна из задач, возникающих в биоинформатике — задача поиска и классификации маркерных цепочек, использующихся для обнаружения и классификации организмов. При этом, многие маркерные цепочки обладают достаточно богатой вторичной структурой, что позволяет сделать предположение, что её можно использовать для решения данной задачи. Более того, известно, что некоторые участки обладают достаточно консервативной вторичной структурой. Напрмиер, центральный домен 16s [?]. Использование вторичной структуры при решении задач поиска и классификации цепочек не является новой идеей. Она используется как в широко распространённых инструментах, типа Infernal [?], так и во многих теоритических исследованиях [?, ?, ?].

Вторичная структура цепочек может быть описана с помощью грамматик. В зависимости от требуемой точности могут использоваться разные классы граммтик: регулярные, контекстно-свободные, конъюнктивные. В данной работе будут использоваться контекстно-свободные грамматики и соответствующий класс языков. В результате, по аналогии с поиском по регулярному выражению, задача поиска сведётся к поиску структурного шаблона, заданного контекстно-свободной граммтикой. Так как вторичная структура больших цепочек может быть достаточно сложной, потому соответствующая грамматика также оказывается сложной. При этом часто необходимо искать баланс между сложностью граммтики, которая непосредственно связана с детализацией описания вторичной структуры, и производительностью и точностью поиска.

Одна из маркерных цепочек, часто используемая в настоящее время — это 16s rRNA. Данный отчёт описывает эксперимент по распознованию 16s с исподльзованием информации только о её вторичной структуре, описанной контекстно-свободной граммтикой.

## 2 Описание вторичной структуры спомощью грамматики

Для спецификации грамматики был исользован язык YARD [?], основанный на ECFG [?] с различнвми расширениями. В правых частях можно использовать конструкции регулярных

выражений.

В таблице 1 представлены основные конструкции языка описания граммтики и примитивы, использовавшиеся при её написании, и дано их описание. Так как описание несовпадений в стеме в общем случае является сложной задачей (если вообще разрешимой в терминах контекстно-свободных граммтик), поэтому были использованы такие правила, как $stem\_e1<s>$, описывающие приближение множества стемов с несовпадениями.

| Грамматическая конструкция | Описание |
|---|---|
| $any$ | Один из нуклеотидов $A, U, C, G$. |
| $any^*[n..m]$ | Цепочка нуклеотидов длины от $n$ до $m$. |
| $stemN<s>$ | Стем высоты $N$ со свободной частью $s$ (последовательность любых конструкций грамматики). |
| $mk\_stem<s>$ | Стем произвольной высоты (от 0 до $N$) со свободной частью $s$. |
| $stem\_e1<s>$ | Стем позволяющий одно несовпадение, при этом требующий, чтобы подрят было не менее двух парных элементов. |

Таблица 1: Базовые конструкции грамматики

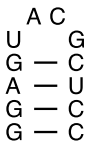
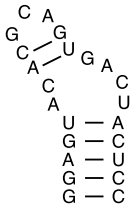
| | |
|---|---|
| $stem4<any^*[3..5]>$ | $mk\_stem<any^*[1..2]\ stem2<any^*[3..4]>\ any^*[2..5]>$ |
|  |  |

Таблица 2: Примеры описания структур

# 3 Эксперименты

Для проведения эксперимента прежде всего необходима контекстно-свободная грамматика, описывающая вторичную структуру искомой цепочки. Построение грамматики, задающей вторичную структуру в настоящий момент выполняется вручную, однако возможен и вывод грамматики, но это тема для отдельного исследования.

Построенная нами, используемая в эксперименте грамматика приведена в приложении А. В качестве образца была использована эталонная вторичная структура 16s E.Coli. Терминальный алфавит состоит из четырех символов-нуклеотидов: $A, U, C, G$. Для спецификации стемов активно используются параметризуемые правила, что позволяет сделать граммтику достаточно компактной. Ключевое слово `inline` является служебным и используется для того, чтобы подсказать генератору синтаксических анализаторов, как именно преобразовывать граммитку в ходе работы.

Всего было поставлено два эксперимента: обработка базы известных последовательностей 16s и поиск 16s в полноразмерных размеченных геномах. Целью первого эксперимента была оценка качества составленной нами граммитики на предмет полноты детектирования цепочек: вычислялся процент нераспознанных цепочек относительно всех обработанных. Цель второго — оценка количесва ложных срабатываний. Вместе с этим оценивалась и полнота поиска.

Для первого эксеримента была использована база цепочек проекта Silvia [**?**], которая содержит более 20 тысяч различных последовательностей. Результаты данного эксперимента приведены в таблице 3, где + — количество распознанных цепочек для соответствующей домене, - — количество нераспознанных. В итоге, при использовании граммтики для центрального домена распознанно 98.16% цепочек, являющихся 16s бактерий, а при спользовании граммтики для 5'M домена — 63.13%. Кроме этого, можно заметить, что 5'M домен лучше разделяет домены.

| Домен | Стартовый нетерминал | Бактерии | | Эукариоты | | Археи | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | + | - | + | - | + | - |
| Центральный | h19 | 17878 | 335 | 2153 | 3165 | 306 | 13 |
| 5'M | h3 | 11498 | 6715 | 64 | 5254 | 81 | 238 |

Таблица 3: Результаты анализа базы организмов

Для второго эксперимента использовались 100 размеченных геномов из базы NCBI. Поиск по центральному домену показал очень большое количество ложных срабатываний, поэтому резуьтаты здесь приводиться не будут. Часть результатов поиска поиска по 5'M домену приведены в таблице **??**. В таблице указан код организма в NCBI, его название, количество размеченных и правильно обнаруженных последовательностей 16s (Expected и Covered, соответственно), количество ложных срабатываний (FP-intervals), средняя длина и отклонение для цепочек, соответствующих ложным срабатваниям. Полседние два столбца могут помочь оценить объём работы по дополнительной фильтрации ложных срабатываний. В итоге, для 100 геномов получены следующие результаты:

- среднее количество ложных срабатываний на геном равно 299, отклонение равно 221,54;
- средняя доля правильно обнаруженных цепочек равна 0,98 при отклонении 0,11.

Также, в таблице **??** приведены результаты поиска по совмещённой граммтике для 5'M и центрального домена. Обращает на себя резкое снижение количества ложных срабатваний. При этом, однако, уменьшвется и количество положительных совпадений.

| NCBI ID | Name | Expected | Covered | FP-intervals | Length(avg.) | Length SD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NC_014640.1 | Achromobacter xylosoxidans A8 | 3 | 2 | 4261 | 430.9 | 234.8 |
| NZ_CP009448.1 | Achromobacter xylosoxidans C54 | 3 | 2 | 4157 | 446.6 | 241.6 |
| NZ_CP014060.1 | Achromobacter xylosoxidans strain FDAARGOS_147 | 3 | 1 | 4770 | 469.3 | 284.2 |
| NZ_CP012046.1 | Achromobacter xylosoxidans strain MN001 | 3 | 2 | 4114 | 457.5 | 270.7 |
| NZ_LN831029.1 | Achromobacter xylosoxidans genome assembly NCTC10807 | 3 | 2 | 4441 | 442.2 | 239.0 |
| NZ_CP007618.1 | Bacillus anthracis strain 2000031021 | 11 | 1 | 2384 | 665.6 | 485.8 |
| NZ_CP012475.1 | Bacillus clausii strain ENTPro | 7 | 0 | 1862 | 453.2 | 241.3 |
| NC_006582.1 | Bacillus clausii KSM-K16 DNA | 7 | 7 | 1744 | 451.9 | 230.0 |
| NZ_CP010052.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 | 10 | 9 | 1610 | 450.4 | 236.3 |
| NZ_CP016852.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168G | 10 | 9 | 1616 | 450.4 | 240.1 |
| NZ_CP017763.1 | Bacillus subtilis strain 29R7-12 | 10 | 1 | 1721 | 434.1 | 208.7 |
| NZ_CP010314.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3NA | 10 | 9 | 1596 | 448.9 | 238.2 |
| NC_020507.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis 6051-HGW | 10 | 9 | 1607 | 451.2 | 239.3 |
| NZ_CP008698.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis str. AG1839 | 10 | 9 | 1613 | 450.4 | 237.1 |
| NZ_CP009748.1 | Bacillus subtilis strain ATCC 13952 | 7 | 6 | 1427 | 427.7 | 224.4 |
| NZ_CP009749.1 | Bacillus subtilis strain ATCC 19217 | 7 | 6 | 1533 | 431.1 | 233.3 |
| NC_011835.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis AD011 | 2 | 1 | 1134 | 438.1 | 243.9 |
| NC_017834.1 | Bifidobacterium animalis subsp. animalis ATCC 25527 | 4 | 0 | 1044 | 436.0 | 237.1 |
| NC_022523.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis ATCC 27673 | 4 | 0 | 1076 | 427.4 | 226.4 |
| NC_017866.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis B420 | 4 | 0 | 1050 | 429.8 | 236.9 |
| NC_017214.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 | 4 | 0 | 1033 | 434.4 | 236.3 |
| NZ_CP009045.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis strain BF052 | 4 | 0 | 1051 | 430.0 | 236.9 |
| NC_017867.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bi-07 | 4 | 0 | 1049 | 429.9 | 237.3 |
| NC_021593.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bl12 | 4 | 0 | 1047 | 430.3 | 237.6 |
| NZ_CP017037.1 | Dialister pneumosintes strain F0677 | 5 | 2 | 570 | 721.2 | 542.6 |
| NZ_CP008740.1 | Haemophilus influenzae 2019 | 6 | 2 | 654 | 420.2 | 196.3 |
| NZ_CP007470.1 | Haemophilus influenzae strain 477 | 6 | 2 | 564 | 421.9 | 189.3 |
| NZ_CP007472.1 | Haemophilus influenzae strain 723 | 6 | 4 | 751 | 425.2 | 200.5 |
| NC_007146.2 | Haemophilus influenzae 86-028NP | 6 | 2 | 711 | 428.0 | 198.2 |
| NZ_AP012334.1 | Scardovia inopinata JCM 12537 DNA | 2 | 0 | 736 | 413.7 | 186.0 |
| NC_022238.1 | Streptococcus constellatus subsp. pharyngis C1050 | 4 | 2 | 784 | 541.9 | 349.8 |
| NC_022236.1 | Streptococcus constellatus subsp. pharyngis C232 | 4 | 2 | 767 | 531.3 | 342.6 |
| NC_022245.1 | Streptococcus constellatus subsp. pharyngis C818 | 4 | 2 | 765 | 532.5 | 341.9 |
| NC_022246.1 | Streptococcus intermedius B196 | 4 | 2 | 755 | 527.5 | 314.9 |
| NC_022237.1 | Streptococcus intermedius C270 | 4 | 2 | 733 | 524.3 | 308.4 |
| NZ_CP020433.1 | Streptococcus intermedius strain FDAARGOS_233 | 4 | 2 | 865 | 561.0 | 350.5 |
| NC_018073.1 | Streptococcus intermedius JTH08 DNA | 4 | 2 | 917 | 503.5 | 305.2 |
| NZ_AP013044.1 | Tannerella forsythia 3313 DNA | 2 | 0 | 1310 | 445.9 | 252.6 |
| NC_016610.1 | Tannerella forsythia 92A2 | 2 | 0 | 1398 | 442.5 | 246.2 |
| NZ_AP013045.1 | Tannerella forsythia KS16 DNA | 2 | 0 | 1537 | 448.5 | 258.1 |

Таблица 4: Результаты анализа полноразмерных геномов (центральный домен)

| NCBI ID | Name | Expected | Covered | FP-intervals | Length(avg.) | Length SD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NC_014640.1 | Achromobacter xylosoxidans A8 | 3 | 2 | 530 | 596.8 | 246.4 |
| NZ_CP009448.1 | Achromobacter xylosoxidans C54 | 3 | 1 | 732 | 630.2 | 273.1 |
| NZ_CP014060.1 | Achromobacter xylosoxidans strain FDAARGOS_147 | 3 | 0 | 952 | 673.1 | 361.3 |
| NZ_CP012046.1 | Achromobacter xylosoxidans strain MN001 | 3 | 0 | 722 | 664.4 | 414.9 |
| NZ_LN831029.1 | Achromobacter xylosoxidans genome assembly NCTC10807 | 3 | 1 | 752 | 624.2 | 266.1 |
| NZ_CP007618.1 | Bacillus anthracis strain 2000031021 | 11 | 1 | 662 | 663.9 | 287.4 |
| NZ_CP012475.1 | Bacillus clausii strain ENTPro | 7 | 0 | 101 | 548.6 | 153.9 |
| NC_006582.1 | Bacillus clausii KSM-K16 DNA | 7 | 7 | 112 | 567.0 | 182.2 |
| NZ_CP010052.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 | 10 | 9 | 85 | 531.1 | 161.0 |
| NZ_CP016852.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168G | 10 | 9 | 85 | 536.3 | 168.8 |
| NZ_CP017763.1 | Bacillus subtilis strain 29R7-12 | 10 | 1 | 82 | 509.4 | 93.0 |
| NZ_CP010314.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3NA | 10 | 9 | 80 | 534.8 | 175.0 |
| NC_020507.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis 6051-HGW | 10 | 9 | 85 | 530.7 | 161.2 |
| NZ_CP008698.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis str. AG1839 | 10 | 9 | 82 | 529.3 | 138.6 |
| NZ_CP009748.1 | Bacillus subtilis strain ATCC 13952 | 7 | 6 | 63 | 547.5 | 168.1 |
| NZ_CP009749.1 | Bacillus subtilis strain ATCC 19217 | 7 | 6 | 65 | 535.9 | 198.6 |
| NC_011835.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis AD011 | 2 | 1 | 139 | 613.9 | 242.0 |
| NC_017834.1 | Bifidobacterium animalis subsp. animalis ATCC 25527 | 4 | 0 | 101 | 658.5 | 287.7 |
| NC_022523.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis ATCC 27673 | 4 | 0 | 110 | 645.3 | 297.3 |
| NC_017866.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis B420 | 4 | 0 | 123 | 615.0 | 263.4 |
| NC_017214.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 | 4 | 0 | 115 | 627.9 | 279.6 |
| NZ_CP009045.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis strain BF052 | 4 | 0 | 116 | 631.0 | 281.4 |
| NC_017867.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bi-07 | 4 | 0 | 123 | 614.4 | 263.8 |
| NC_021593.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bl12 | 4 | 0 | 117 | 629.5 | 279.2 |
| NZ_CP017037.1 | Dialister pneumosintes strain F0677 | 5 | 2 | 178 | 648.5 | 300.3 |
| NZ_CP008740.1 | Haemophilus influenzae 2019 | 6 | 2 | 25 | 508.9 | 75.1 |
| NZ_CP007470.1 | Haemophilus influenzae strain 477 | 6 | 2 | 34 | 536.1 | 99.0 |
| NZ_CP007472.1 | Haemophilus influenzae strain 723 | 6 | 4 | 41 | 559.5 | 165.5 |
| NC_007146.2 | Haemophilus influenzae 86-028NP | 6 | 2 | 57 | 526.1 | 119.7 |
| NZ_AP012334.1 | Scardovia inopinata JCM 12537 DNA | 2 | 0 | 38 | 533.8 | 177.3 |
| NC_022238.1 | Streptococcus constellatus subsp. pharyngis C1050 | 4 | 2 | 102 | 558.1 | 165.7 |
| NC_022236.1 | Streptococcus constellatus subsp. pharyngis C232 | 4 | 2 | 84 | 589.2 | 172.0 |
| NC_022245.1 | Streptococcus constellatus subsp. pharyngis C818 | 4 | 2 | 91 | 582.0 | 169.4 |
| NC_022246.1 | Streptococcus intermedius B196 | 4 | 2 | 82 | 589.1 | 193.6 |
| NC_022237.1 | Streptococcus intermedius C270 | 4 | 2 | 105 | 558.8 | 160.1 |
| NZ_CP020433.1 | Streptococcus intermedius strain FDAARGOS_233 | 4 | 2 | 137 | 572.5 | 204.6 |
| NC_018073.1 | Streptococcus intermedius JTH08 DNA | 4 | 2 | 88 | 590.8 | 236.9 |
| NZ_AP013044.1 | Tannerella forsythia 3313 DNA | 2 | 0 | 93 | 597.5 | 250.1 |
| NC_016610.1 | Tannerella forsythia 92A2 | 2 | 0 | 107 | 580.6 | 209.0 |
| NZ_AP013045.1 | Tannerella forsythia KS16 DNA | 2 | 0 | 122 | 555.5 | 212.1 |

Таблица 5: Результаты анализа полноразмерных геномов (5'M домен)

## 4 Заключение

Данный эксперимент показал наличие возможности использовать вторичную структуру цепочки для предварительной фильтрации кандидатов, однако требуется существенная доработка используемых алгоритмов. В дальнейшем планируется выполнение работ по следующим направлениям.

- Поиск, разработка и применение алгоритмов автоматический вывод грамматик для построения граммтики, описывающей вторичную структуру цепочки.
- Анализ ложных срабатываний и пропущенных кандидатов, с целью выявить их особенности, и доработать соответствующим образом алгоритм поиска.
- Разработка методов ументшения количества ложных срабатываний.

# Приложение

## A Грамматика 16S на языке YARD, использовавшаяся в эксперименте

```
inline any: A | U | G | C
inline any_1_2: any*[1..2]
inline any_1_3: any*[1..3]
inline any_2_3: any any_1_2
inline any_2_4: any*[2..4]
inline any_3_4: any*[3..4]
inline any_3_5: any any_2_4
inline any_5_7: any any any_3_5
inline any_4_6: any any_3_5
inline any_6_8: any any_5_7
inline any_9_11: any*[9..11]
inline any_4 : any any any any

stem1<s>:
      A s U
    | U s A
    | C s G
    | G s C
    | G s U
    | U s G
    | A s G
    | G s A
```

```
stem2<s>: stem1<stem1<s>>
stem4<s>: stem2<stem2<s>>
stem6<s>: stem4<stem2<s>>
stem8<s>: stem4<stem4<s>>

mk_stem<s>:
      A mk_stem<s> U
    | U mk_stem<s> A
    | C mk_stem<s> G
    | G mk_stem<s> C
    | G mk_stem<s> U
    | U mk_stem<s> G
    | G mk_stem<s> A
    | A mk_stem<s> G
    | s

stem<s>: mk_stem<stem4<s>>
stem_2<s>: mk_stem<stem2<s>>

stem_e1<s> : stem_2<(any stem_2<s> | stem_2<s> any)> | stem<s>
stem_e2<s> : stem_2<(any stem_e1<s> any | any stem_e1<s>
             | stem_e1<s> any)> | stem<s>
stem_4: stem_2<any_4>

[<Start>]
full: middle_part_root

head_part_root: h3
middle_part_root:  h19
tail_part_root: h28 any_3_5 h44 any_3_5 h45

head_middle_folded: stem2<(any_6_8 h3 any_9_11 h19 any_1_2 h27 any_2_4)>
full_size_root: h3 any_9_11 h19 any_1_2 h27 any*[7..9] tail_part_root

(* 5'M domain *)
h3: stem_e2<(any_1_2 h4 any_1_3 h16 any_3_5
    (h17 | any*[1..6]) any*[2..5] h18 any_1_2)>
h4: stem_e1<(h5 h15 any?)>
h5: any_5_7 stem_e2<(any_1_3 h6 any_5_7
    stem_2<(any_5_7 h7 any? h11 any_1_3 h12 any?)>
    any_1_2 h13 any_1_2 h14 any_2_4)> any_3_5

h6: stem_e2<stem_e2<stem_e2<stem_e2<any_3_4>>>>
h7: stem_e2<(any_2_4 stem<(any_1_2 h8 any_4_6 h9 any_3_5 h10 any_1_2)>
```

```
             any_1_3)>
h8: stem_2<(any_3_5 stem_4 any_3_5)>
h9: stem_2<any_3_5>
h10: stem_e2<any_3_5>
h11: stem_2<(any_2_4 stem_e2<any_6_8> any_3_5)>
h12: stem<(any? stem_2<any_3_5> any_2_4)>
h13: stem<any_9_11>
h14: stem_2<any_3_5>

h15: stem_e1<(any_2_4 stem2<any_4> any?)>
h16: stem_2<(any_5_7 stem_2<any_2_4> any_4_6)>
h17: stem<(any*[6..9] stem_2<any*[7..11]> any_6_8)>
h18: stem<(any_5_7 stem<(any_4_6 stem_2<any_3_5> any_6_8)>)>

(* Central domain *)
h19: stem_2<(any_5_7 h20 any_3_5 h25 any*[9..12] h26 any_1_2)>
h20: stem_2<( any_3_4 stem_2<( any_1_2 h21 any_2_4 h22 any_2_4 )> any_3_4 )>
h21: stem_e2<( any_3_5 stem_e2<(any_3_5 stem_e1<any*[5..6]> any_2_4)> any_3_5 )>
h22: stem_e2<( any_1_3 stem<(any_3_4 h23 any*[10..12] stem_2<( any any A any )>
               any_1_2)> any_1_3 )>
h23: stem<(any_2_4 stem_2<any*[5..6]> any_5_7)>
h25: stem<(any*[7..11] stem<any*[8..10]> any*[4..7])>
h26: stem_e1<(any_1_2 stem_e2<any_4_6> any_3_5 stem_4 any_3_5 )>
h27: stem_2<(any_5_7 stem_4 any_3_5)>

(* 3'M domain *)
h28: stem_e2<(any h28_a any_2_4)>
h28_a: stem<(any_1_3 h29 any_4_6 h43 any_4_6)>
h29: stem<(h30 any_2_4 h41 any_5_7 h42 any_4_6)>
h30: stem_e1<(any_3_5 h31 any*[7..9] h32 any_2_4)>
h31: stem<any*[7..9]>
h32: stem<(any_4_6 h33 any_1_2 h34 any_3_5)>
h33: stem<(any_1_3 stem<any_4> any_1_3 stem<any_4> any_1_3)>
h34: stem_e1<(any_1_2 stem<(stem_e2<(any_2_4 h35
     any_4_6 h38 any_3_5)> any_2_4)>)>
h35: stem<(h36 any_2_3 h37 any_2_3)>
h36: stem<any_4>
h37: stem<any_5_7>
h38: stem<(any_1_2 h39 any_1_3 h40 any_4_6)>
h39: stem<(any_2_4 stem<(any_1_3 stem<any_4_6>)> any_2_4)>
h40: stem<any_4>
h41: stem<(any_4_6 stem<(any_1_3 stem<(any_2_4 stem<any_4> any_2_4)>
           any_3_5)> any_4_6)>
h42: stem<(any_3_4 stem<any*[7..9]> any_3_4)>
h43: stem<any*[7..9]>
```

```
(* 3'm domain *)
h44: stem<(any_1_3 stem<(any_2_4 stem<(any_1_3 stem<(any_3_5
     stem_e1<(any_1_3 stem<any_4>)> any_2_4)> any_1_3)> any_3_5)> any_2_3)>
h45: stem<any_4>
```