Introducción a la Bioinformática

Alineamiento de secuencias

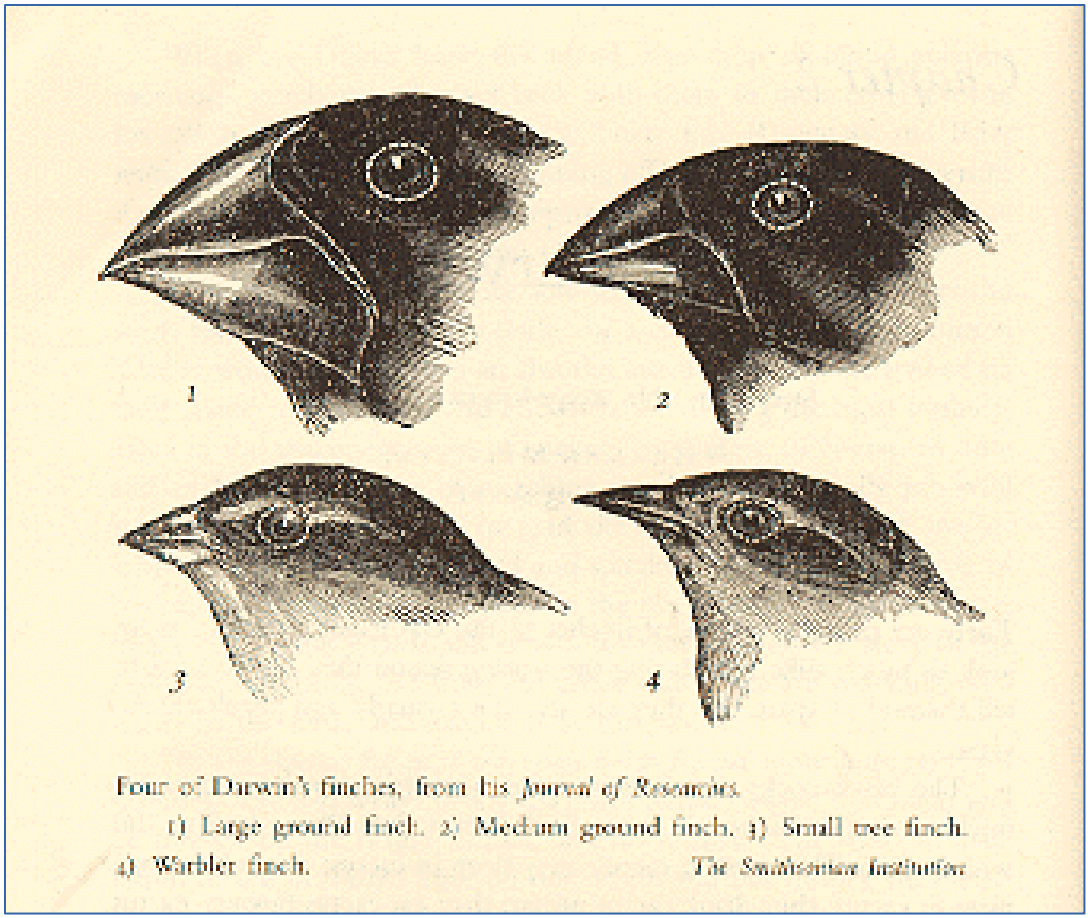
Búsqueda de secuencias en bases de datos

Fernán Agüero
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas
Universidad Nacional de San Martín

Análisis comparativo

El alineamiento de secuencias es similar a otros tipos de análisis comparativo.

En ambos es necesario cuantificar las similitudes y diferencias (scoring) entre un grupo relacionado de entidades.



Finches of the Galápagos Islands observed by Charles Darwin on the voyage of HMS *Beagle*

Alinear secuencias

- Para poder comparar secuencias, tenemos que sistematizar la manera en que lo hacemos
- Por donde empezamos?
- Comparamos las dos secuencias letra a letra, empezando por la primera? Tiene sentido?

GCTACTAGTTCGCTTAGC

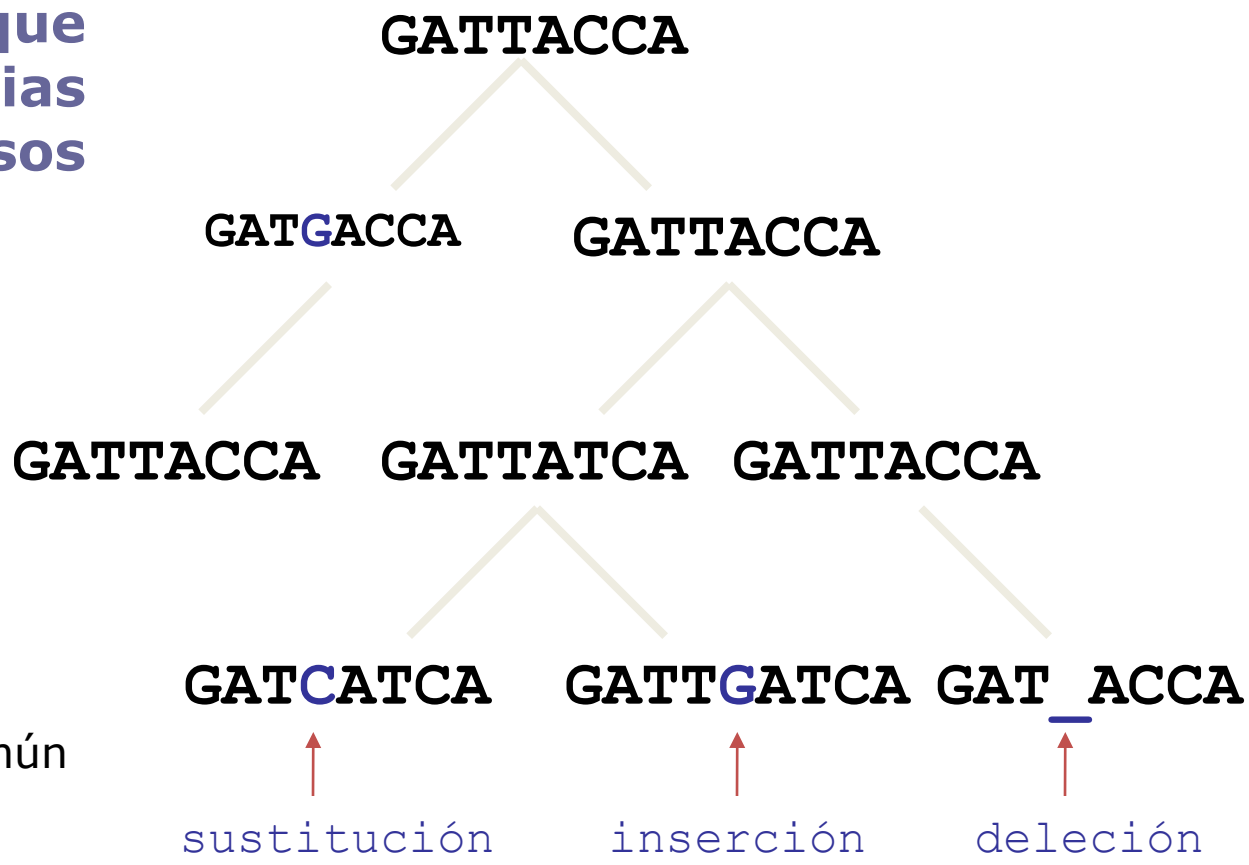
GCTACTAGCTCTAGCGCGTATAGC

Homología vs similitud

- **Homología entre dos entes biológicos implica una herencia compartida**
- **Homología es un término cualitativo**
- **Se es homólogo o no se es**
- **Similitud implica una apreciación cuantitativa o una cuantificación directa de algún caracter**
- **Podemos usar una medida de similitud para inferir homología**

Análisis comparativo

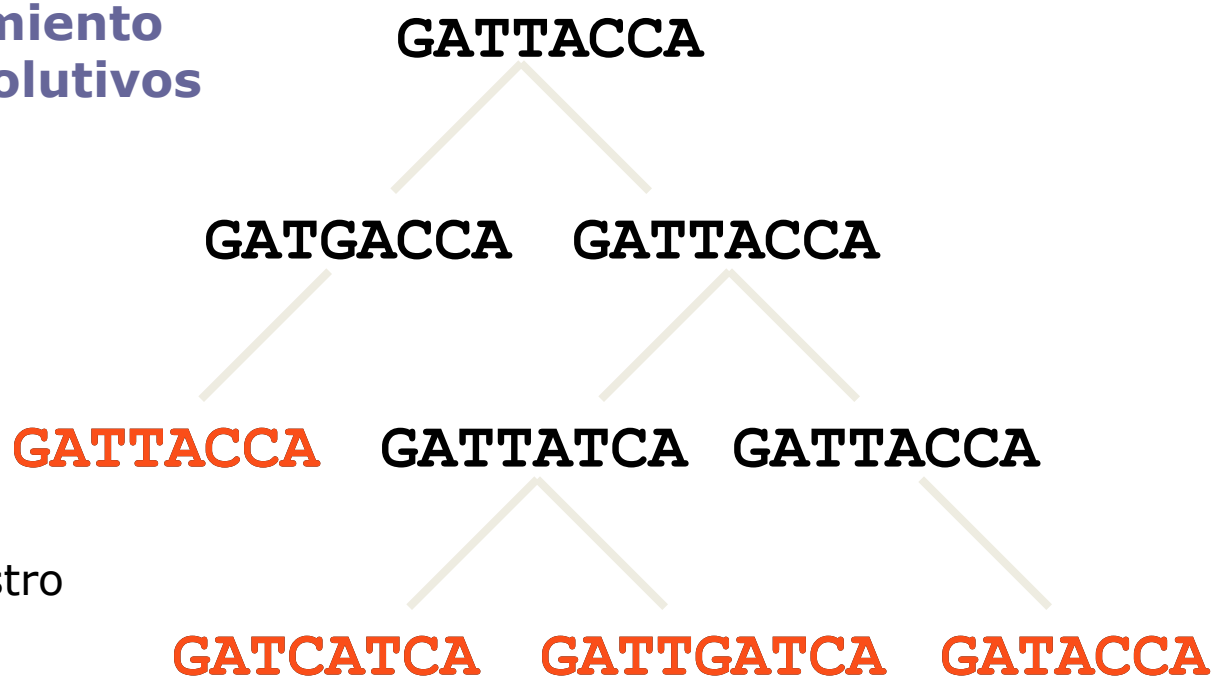
Los algoritmos que alinean secuencias modelan procesos evolutivos



Deriva de un ancestro común a través de cambios incrementales debido a errores en la replicación del DNA, mutaciones, daño o crossing-over desigual.

Análisis comparativo

Algoritmos de alineamiento modelan procesos evolutivos

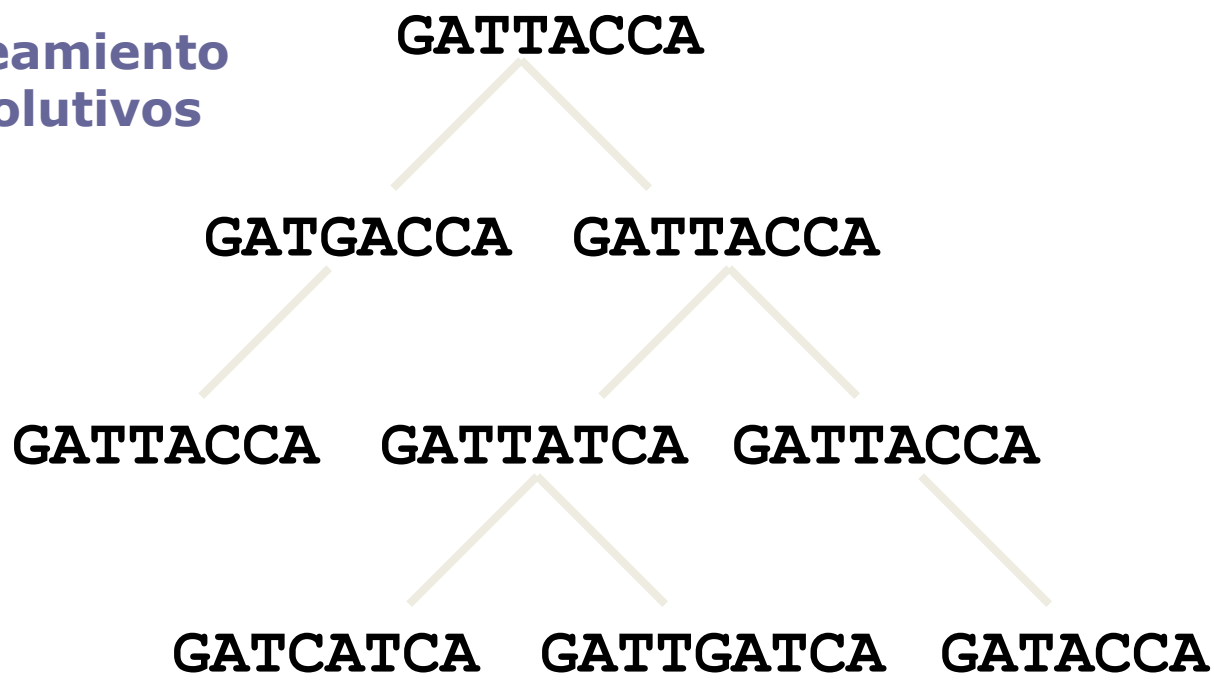


Deriva a partir de un ancestro común a través de cambio incremental.

Sólo las secuencias actuales son conocidas, las secuencias ancestrales se postulan.

Análisis comparativo

Algoritmos de alineamiento modelan procesos evolutivos



Deriva a partir de un ancestro común a través de cambio incremental. Mutaciones que no matan al individuo pueden pasar a la población.

La palabra **homología** implica una herencia común (un ancestro común), el cual puede ser inferido a partir de observaciones de **similitud** de secuencia.

Alineamientos

- **Qué es un alineamiento?**
  - **El procedimiento de comparación de dos (o más) secuencias que busca una serie de caracteres individuales o patrones de caracteres que se encuentren en el mismo orden en ambas secuencias**

- **Cómo alineamos dos secuencias?**
  - **Usando un método (algoritmo)**
    - a mano (como en los viejos tiempos)
    - usando una computadora

Definición de alineamiento: tipos

Alineamiento: Cada base se usa a lo sumo una vez

Alineamiento global: Todas las bases se alinean con otra base o con un gap ("-")

Alineamientos locales: No hay necesidad de alinear todas las bases

Align GATESLIKESCHEESE and GRATEDCHEESE

```
G-ATESLIKESCHEESE   or   G-ATES   & CHEESE
GRATED-----CHEESE        GRATED   & CHEESE
```

Alineamientos buenos y malos?

Cuál es el 'mejor' alineamiento?

```
GCTACTAG-T-T--CGC-T-TAGC
GCTACTAGCTCTAGCGCGTATAGC
```

0 mismatches, 5 gaps

```
GCTACTAGTT-------CGCTTAGC
GCTACTAGCTCTAGCGCGTATAGC
```

3 mismatches, 1 gap

Cómo decidir cuál es el mejor?

- Respuesta: el más significativo desde el punto de vista biológico
- Pero: necesitamos una medida objetiva

- sistemas de puntaje (scoring)
  - reglas para asignar puntos
  - el más simple: match, mismatch, gap

Un primer sistema de puntajes

Ejemplo de sistema de score

match = +1 **mismatch =** 0 **gap** = -1

```
G-ATESLIKESCHEESE
GRATED-----CHEESE
```

Score

(10 * 1) + (1 * 0) + (6 * (-1)) = **+4**

Cambiemos nuestro sistema de puntajes

Usando otro de sistema de puntajes?

match = +2 **mismatch =** 0 **gap** = -1

```
G-ATESLIKESCHEESE
GRATED-----CHEESE
```

Usando otro sistema de score

Score

```
(10 * 2) + (1 * 0) + (5 * (-1)) = +14
```

No se pueden comparar scores

- **Primera conclusión importante:**
  - **no tiene sentido comparar scores de distintos alineamientos**
  - **a menos que se especifique el sistema de scoring utilizado**

Gap penalties

gap opening penalty = -5
gap extension penalty = -1

1- Abrir un gap es costoso

GCTACTAG-T-T--CGC-T-TAGC
GCTACTAGCTCTAGCGCGTATAGC

Penalty = 5 * (-5) + 6 * (-1) = -31

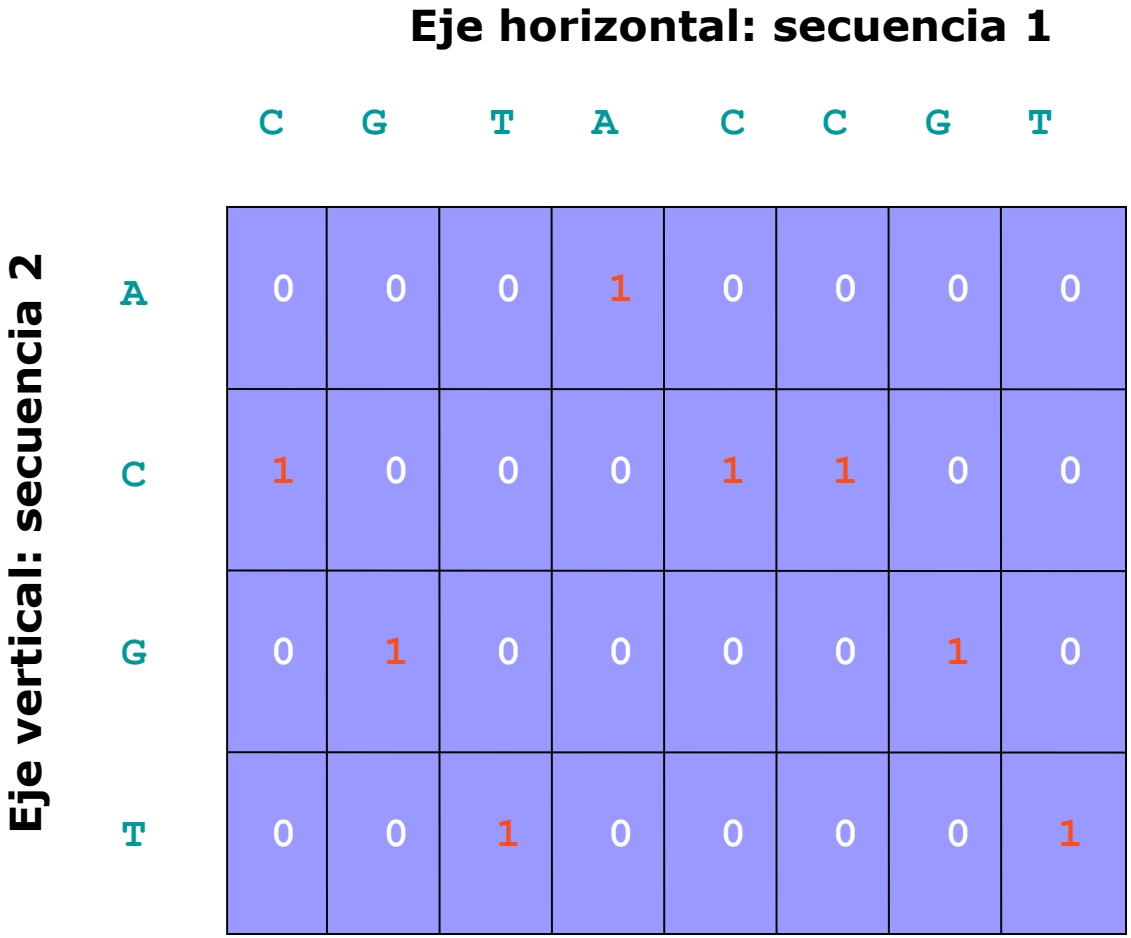
2 - Extender un gap es menos costoso

GCTACTAGTT------CGCTTAGC
GCTACTAGCTCTAGCGCGTATAGC

Penalty = 1 * (-5) + 6 * (-1) = -11

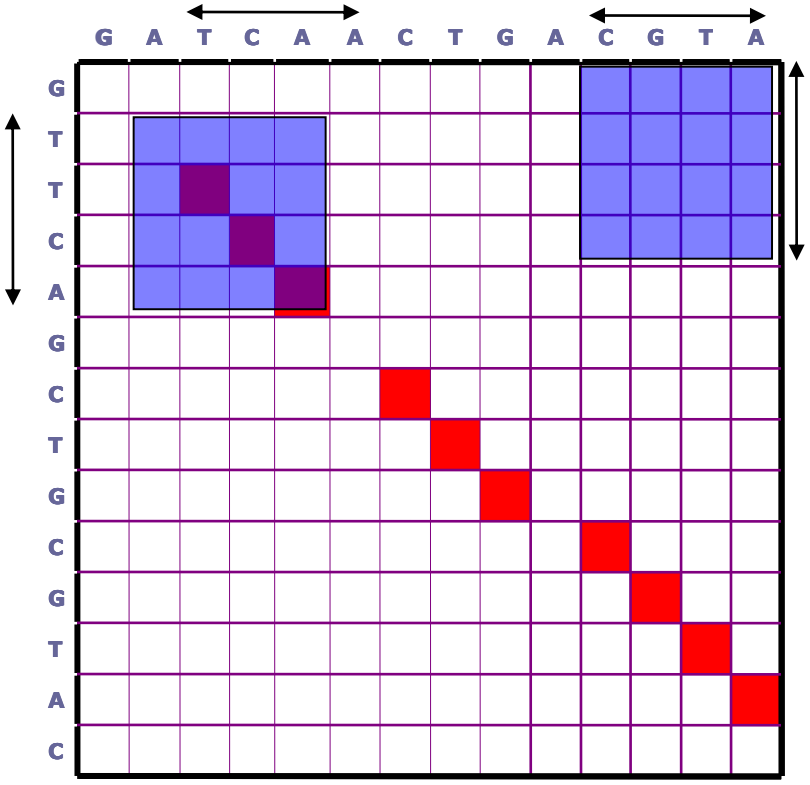
Dot plots: introducción

Dot-plot: Fitch, Biochem. Genet. (1969) 3, 99-108.

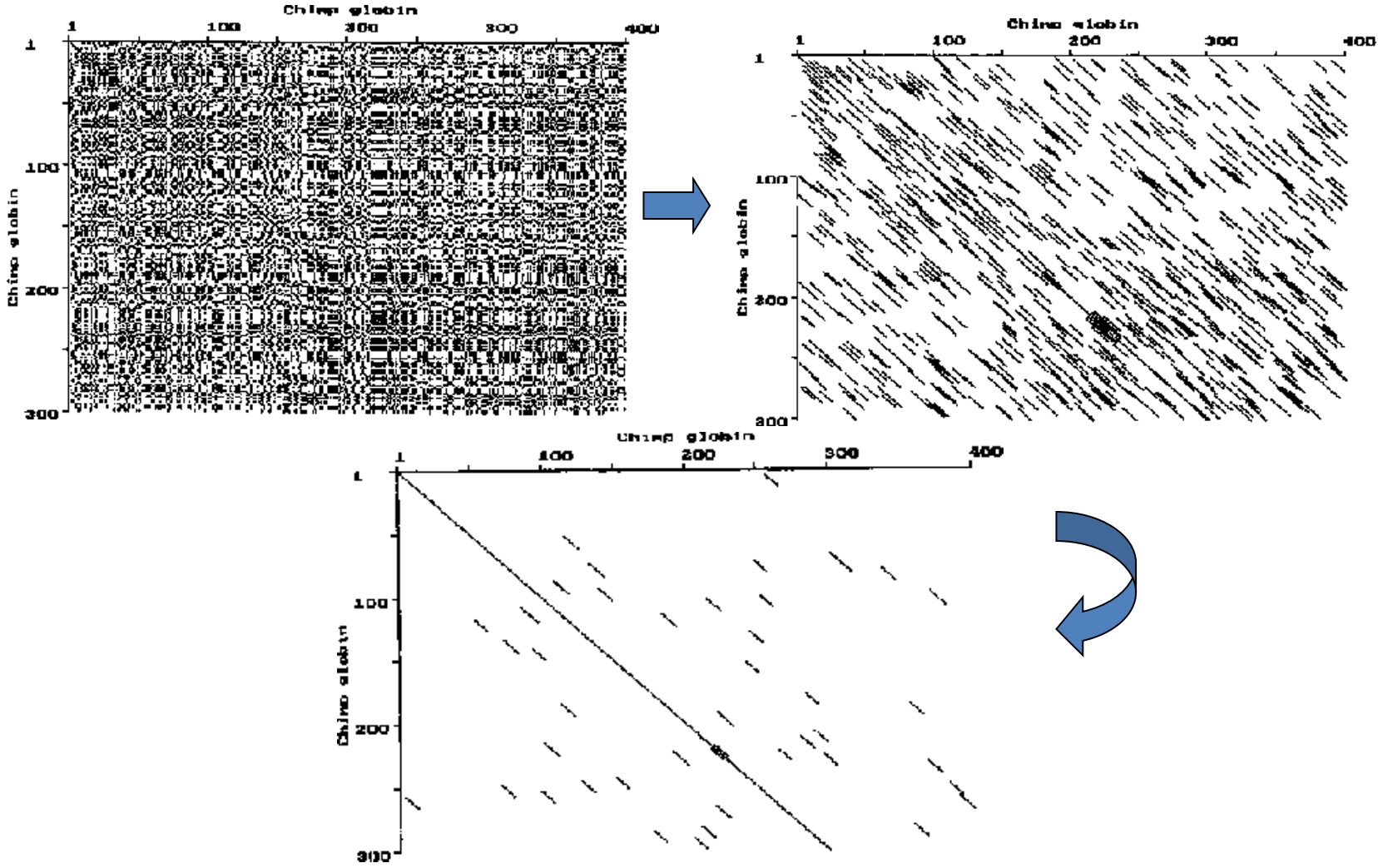


Dot Matrix Plot

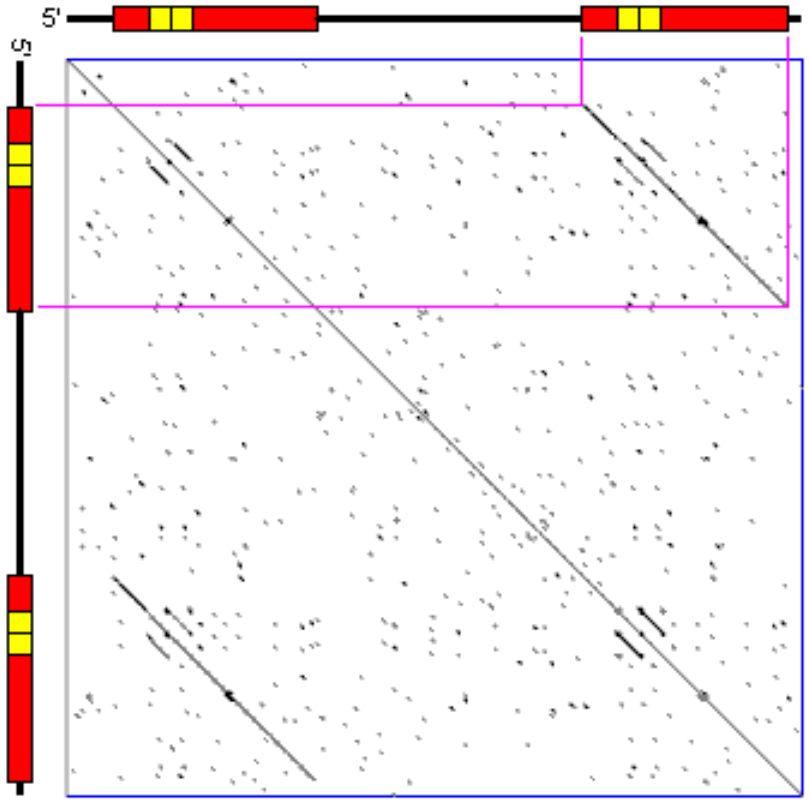
- Dos secuencias, una vertical y otra horizontal a los ejes del gráfico.
- Se colocan "puntos" en donde hay un match.
- Las líneas diagonales son regiones de identidad.
- Se aplican filtros para mejorar la comprensión del gráfico.



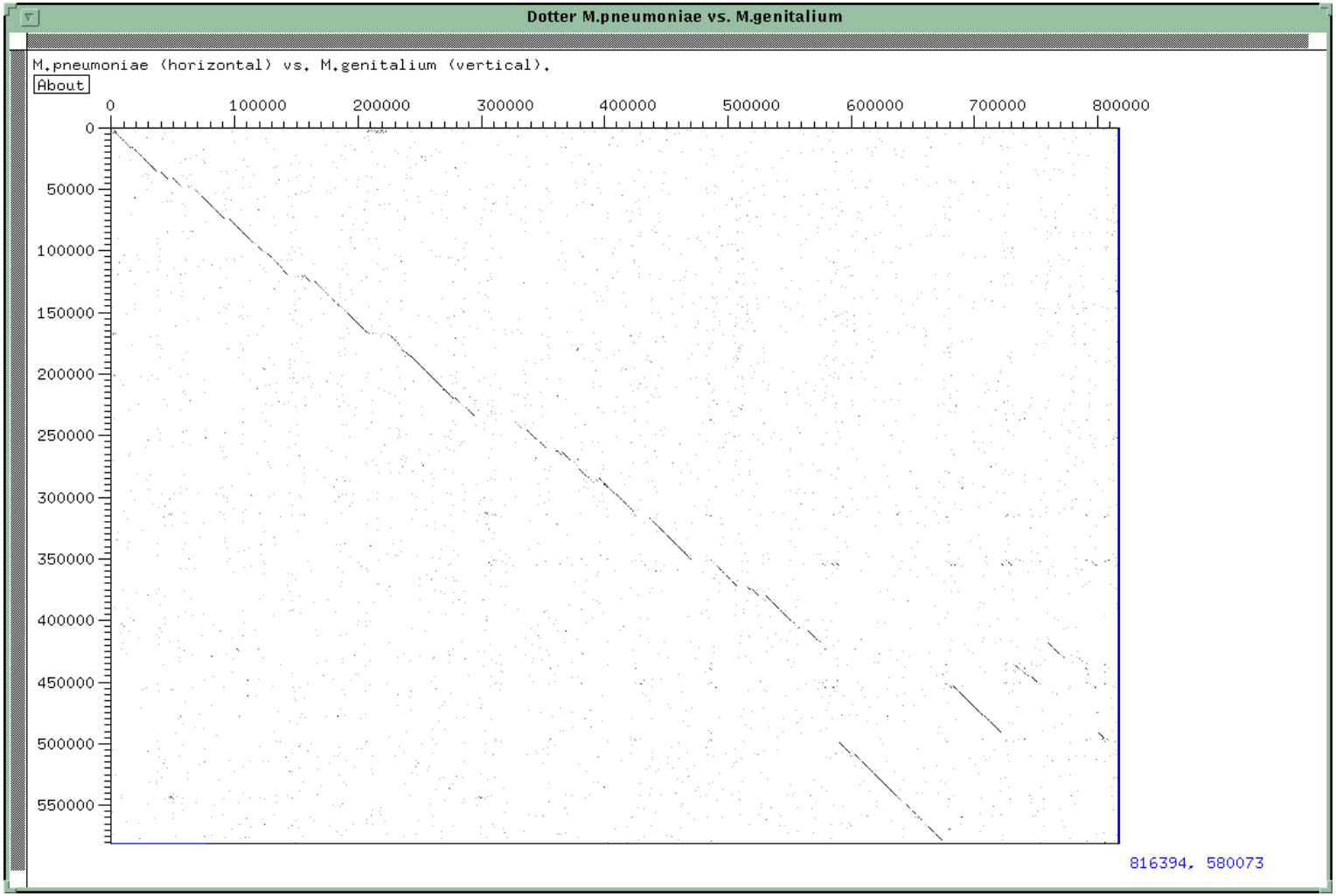
Dot Matrix Plot



Dot Matrix Plot



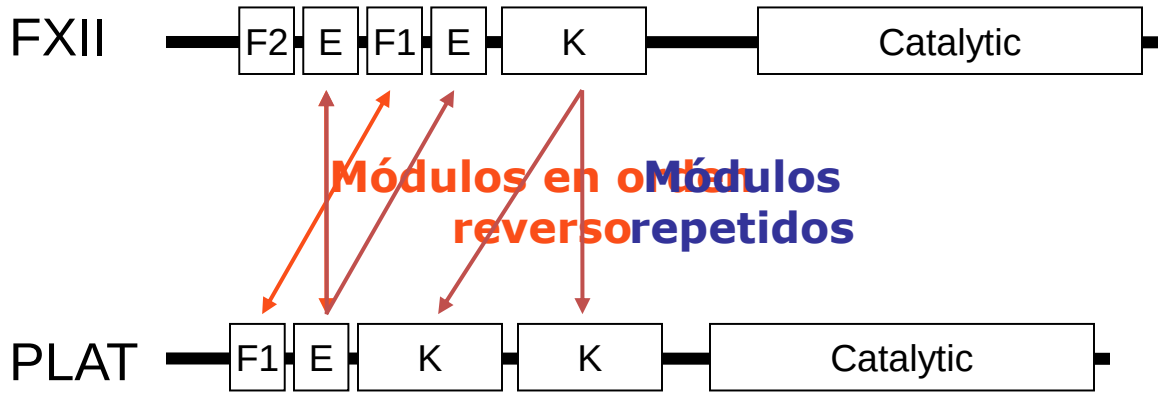
Dot Matrix Plot



Similitud local

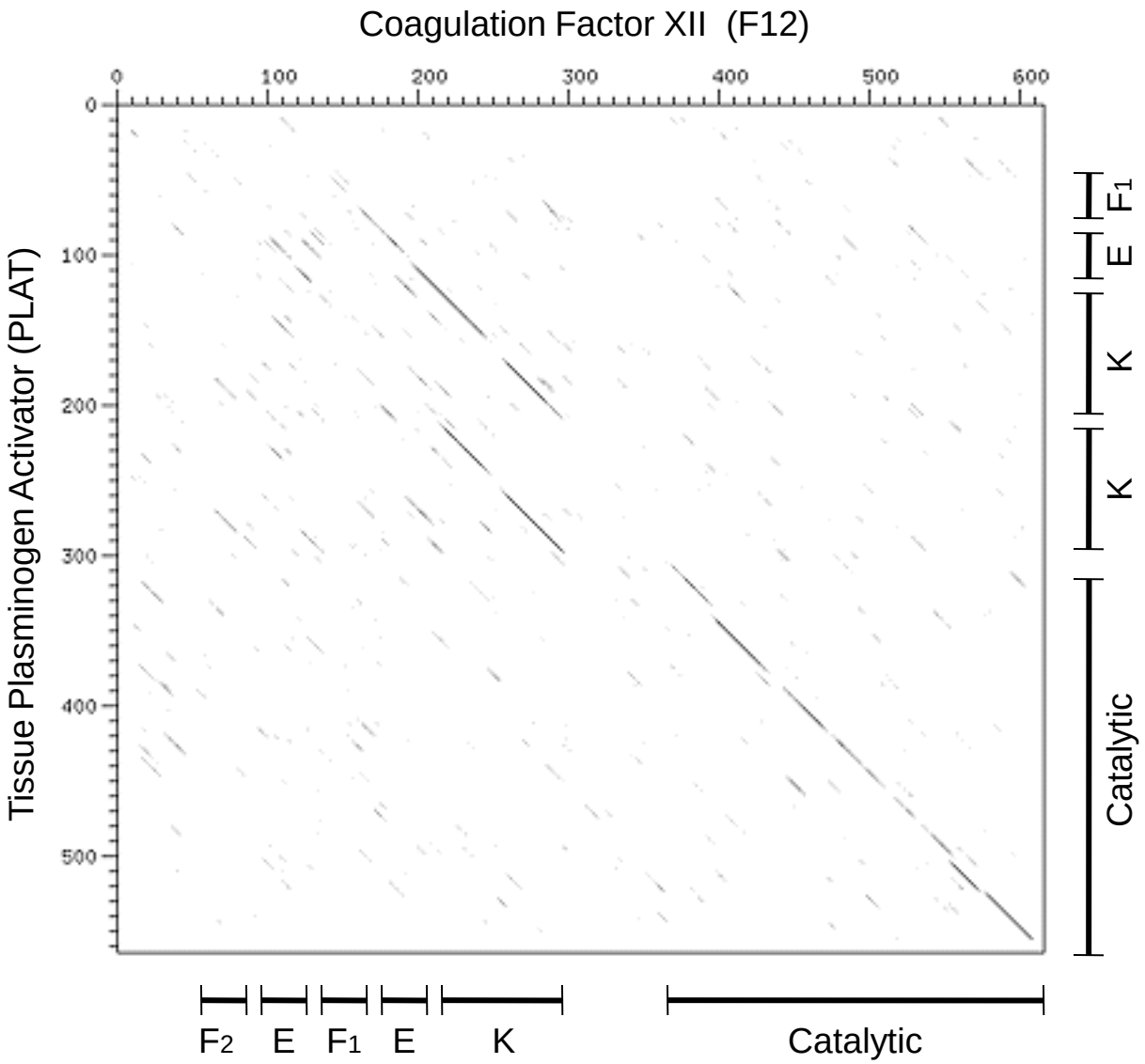
Dominios mezclados confunden a los algoritmos de alineamiento.

Módulos en el factor XII de coagulación y en el activador de plasminógneos – tissue plasminogen activator (PLAT)



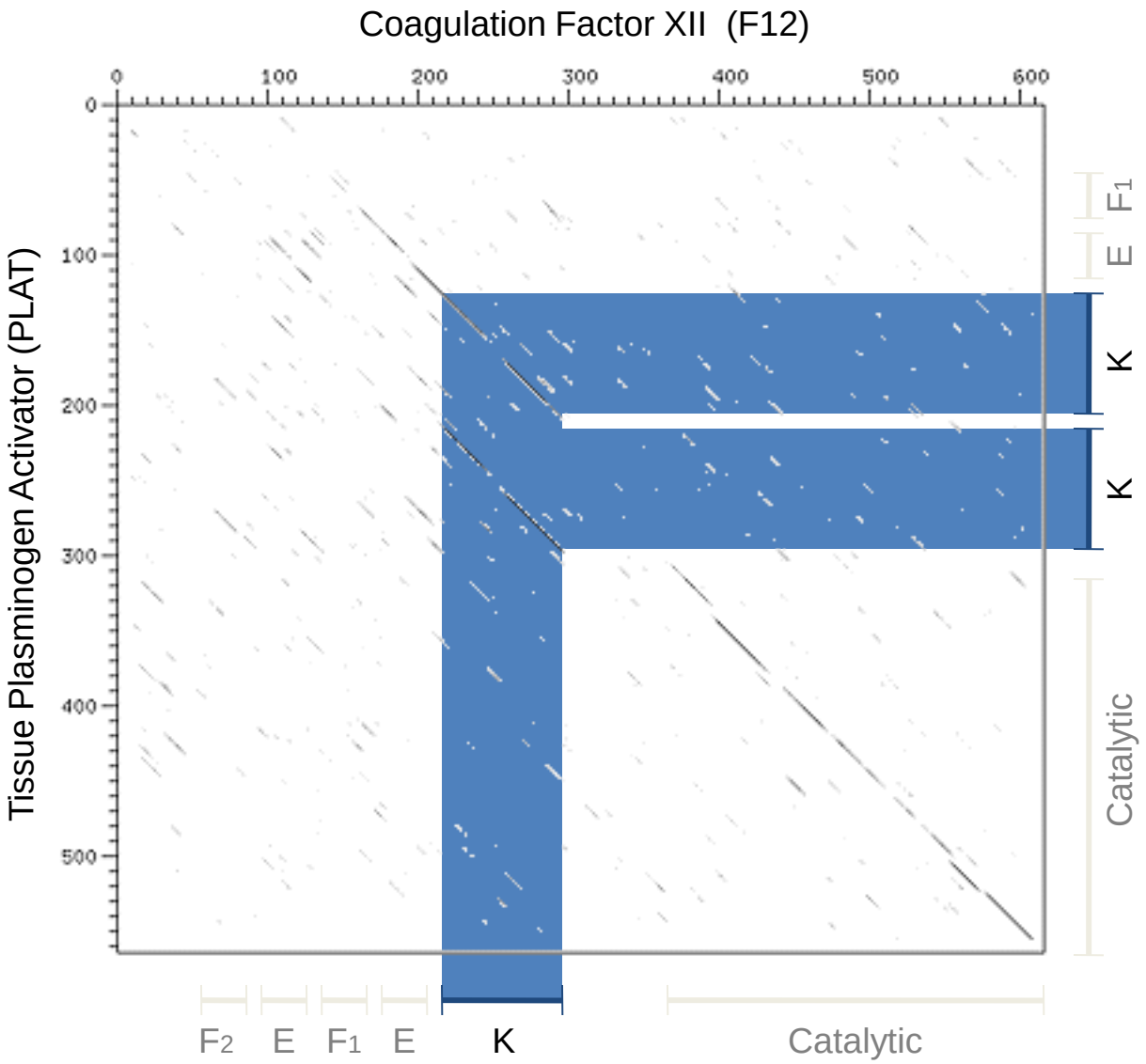
F1,F2	Fibronectin repeats
E	EGF similarity domain
K	Kringle domain
Catalytic	Serine protease activitiy

Dot plots: ejemplo



Dot plots: ejemplo (cont.)

Dominios repetidos muestran un patrón característico.



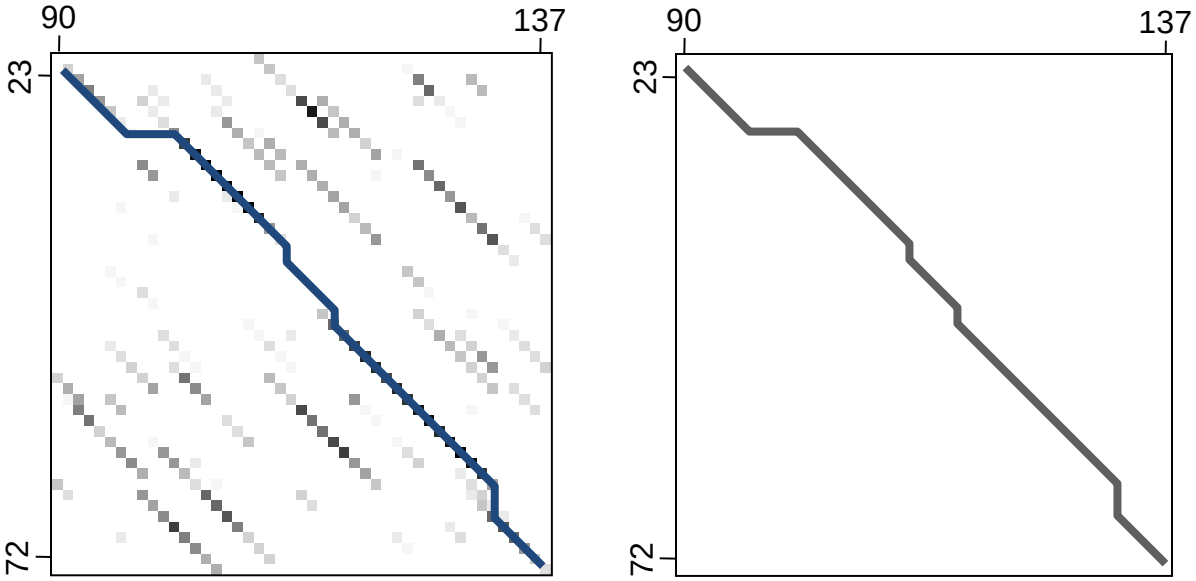
Dot plots: path graphs

Dot plots sugieren caminos (paths) a través del espacio de alineamientos posibles.

Path graphs son representaciones más explícitas de un alineamiento.

Cada path es un alineamiento único.

Dominios EGF conservados en la urokinse plasminogen activator (PLAU) y el tissue plasminogen activator (PLAT)



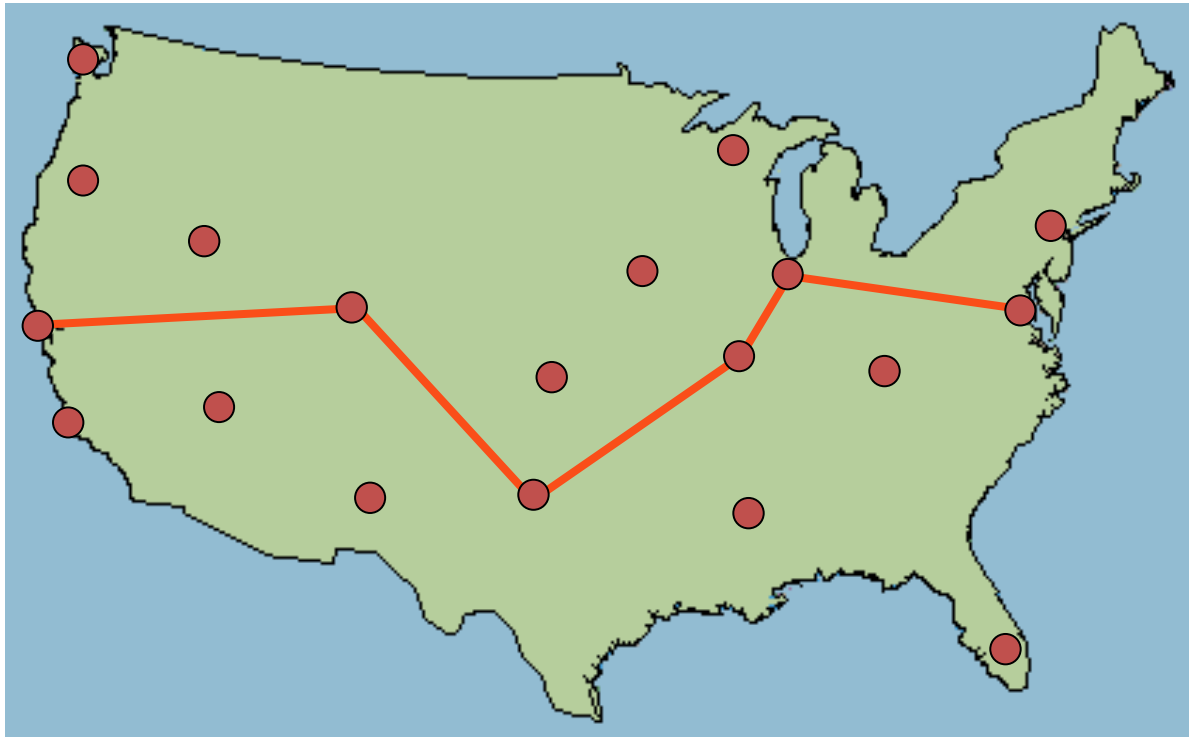

```
PLAU   90   EPKKVKDHCSKHSPCQKGGTCVNMP--SGPH-CLCPQHLTGNHCQKEK---CFE   137
PLAT   23   ELHQVPSNCD----CLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYE    72
```

Path graphs: encontrar el mejor camino

Los problemas que involucran encontrar la mejor ruta o camino (Best-path problems) son comunes en computación científica.

El algoritmo para encontrar el mejor camino entre dos extremos y pasando por varios puntos se llama 'dynamic programming'

Rutear una llamada telefónica desde NY a San Francisco



Dynamic programming: introducción

Un ejemplo:

Construir un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias

```
G A T A C T A
G A T T A C C A
```

Utilizando las siguientes reglas de scoring:

Match: +1

Mismatch: -1

Gap: -1

Dynamic programming: ejemplo

Ordenar las dos secuencias en una matriz bidimensional

Los vértices de cada celda se encuentran entre letras (bases).

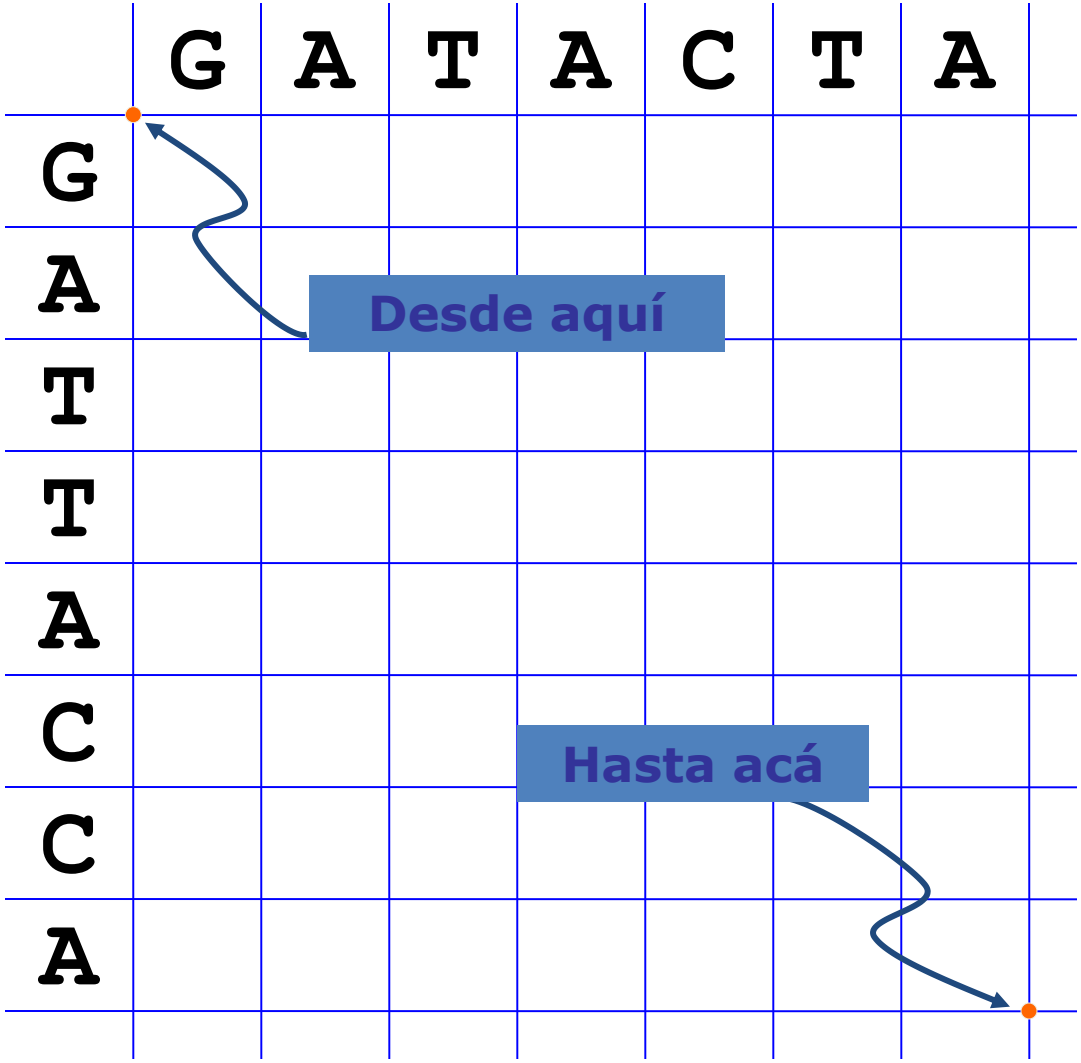
Needleman & Wunsch (1970)

		G	A	T	A	C	T	A	
	G								
	A								
	T								
	T								
	A								
	C								
	C								
	A								

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: ejemplo (cont.)

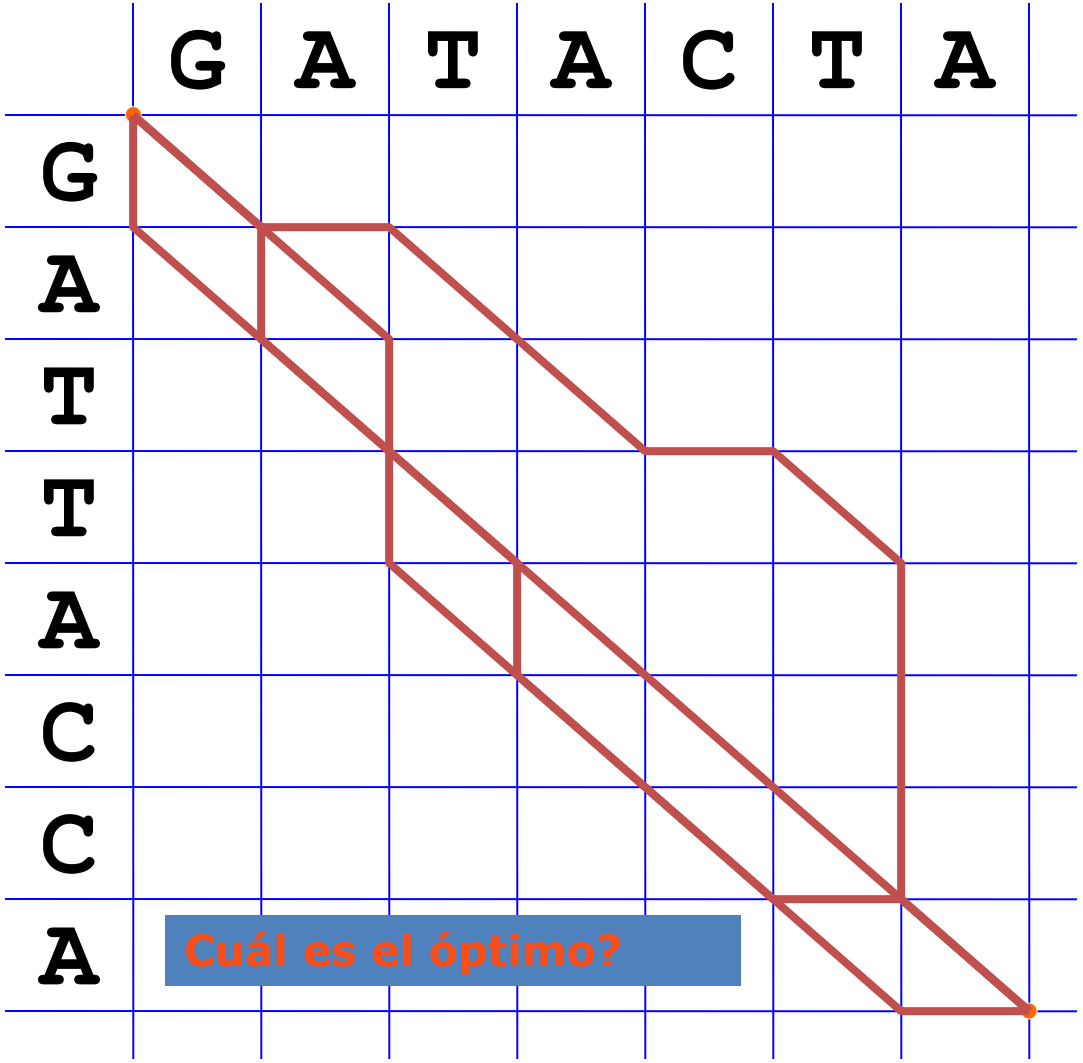
El objetivo es encontrar la ruta (path) óptimo



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paths posibles

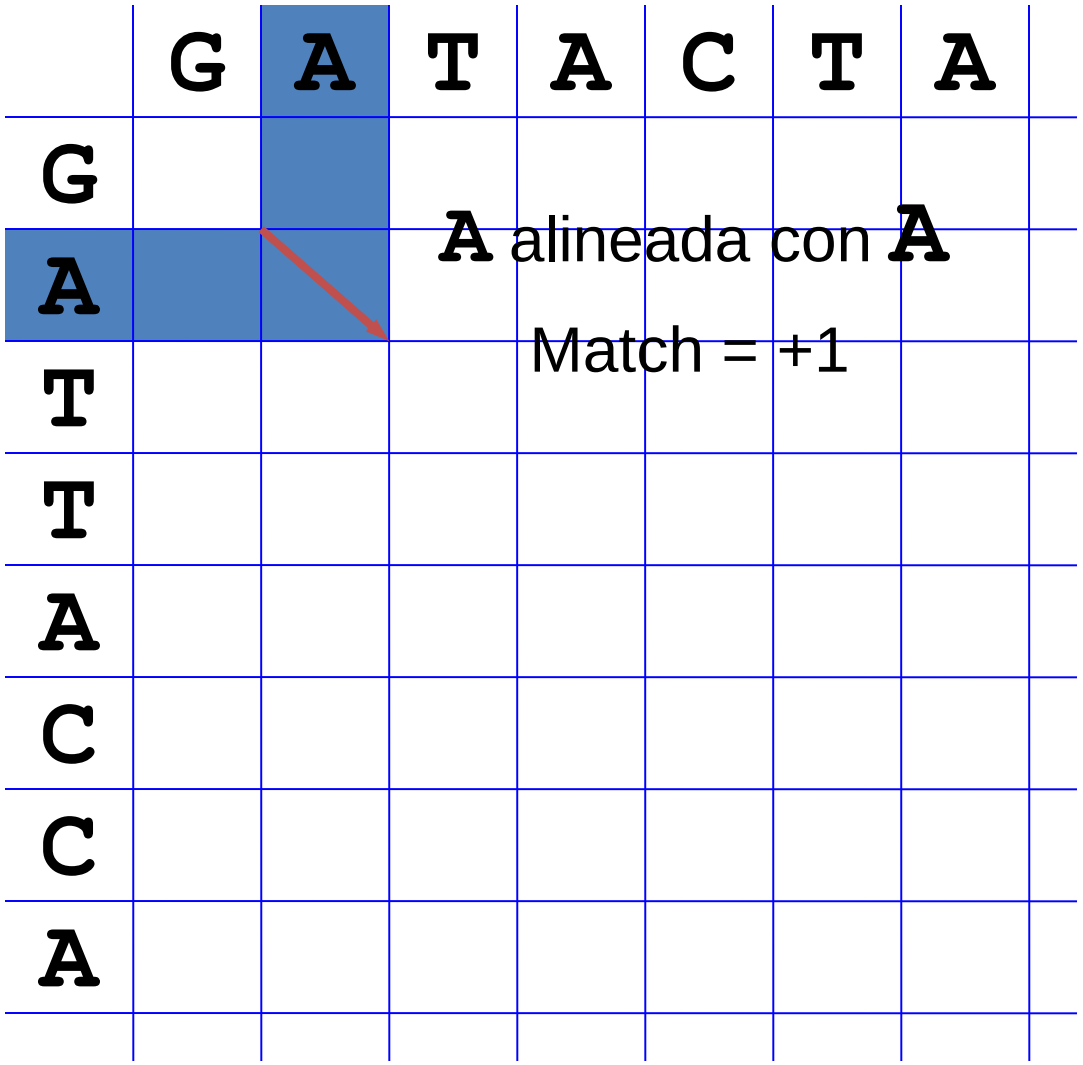
Cada path corresponde a un alineamiento único



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: scores: match

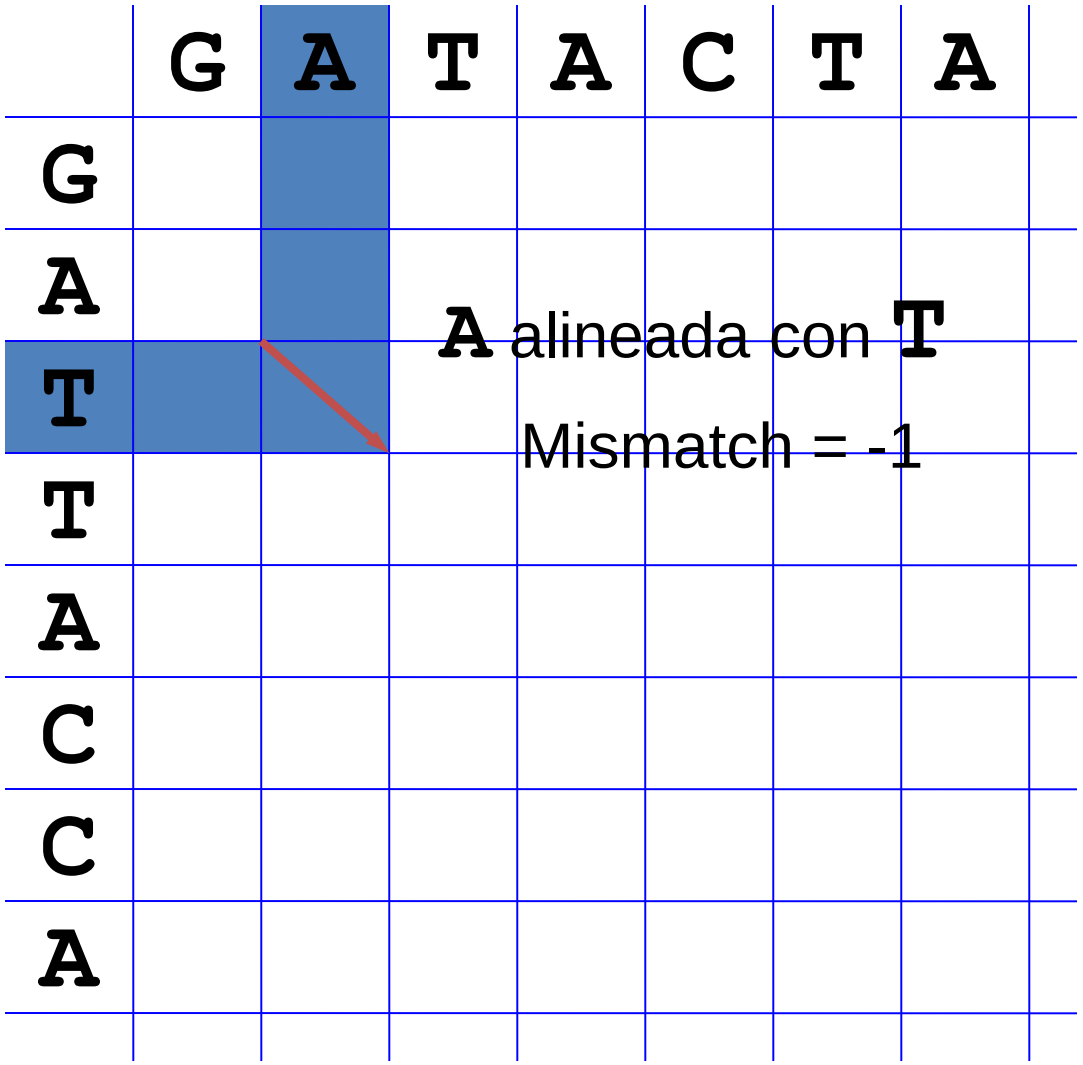
El score para una ruta (path) es la suma incremental de los scores de sus pasos (diagonales o lados).



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: scores: mismatch

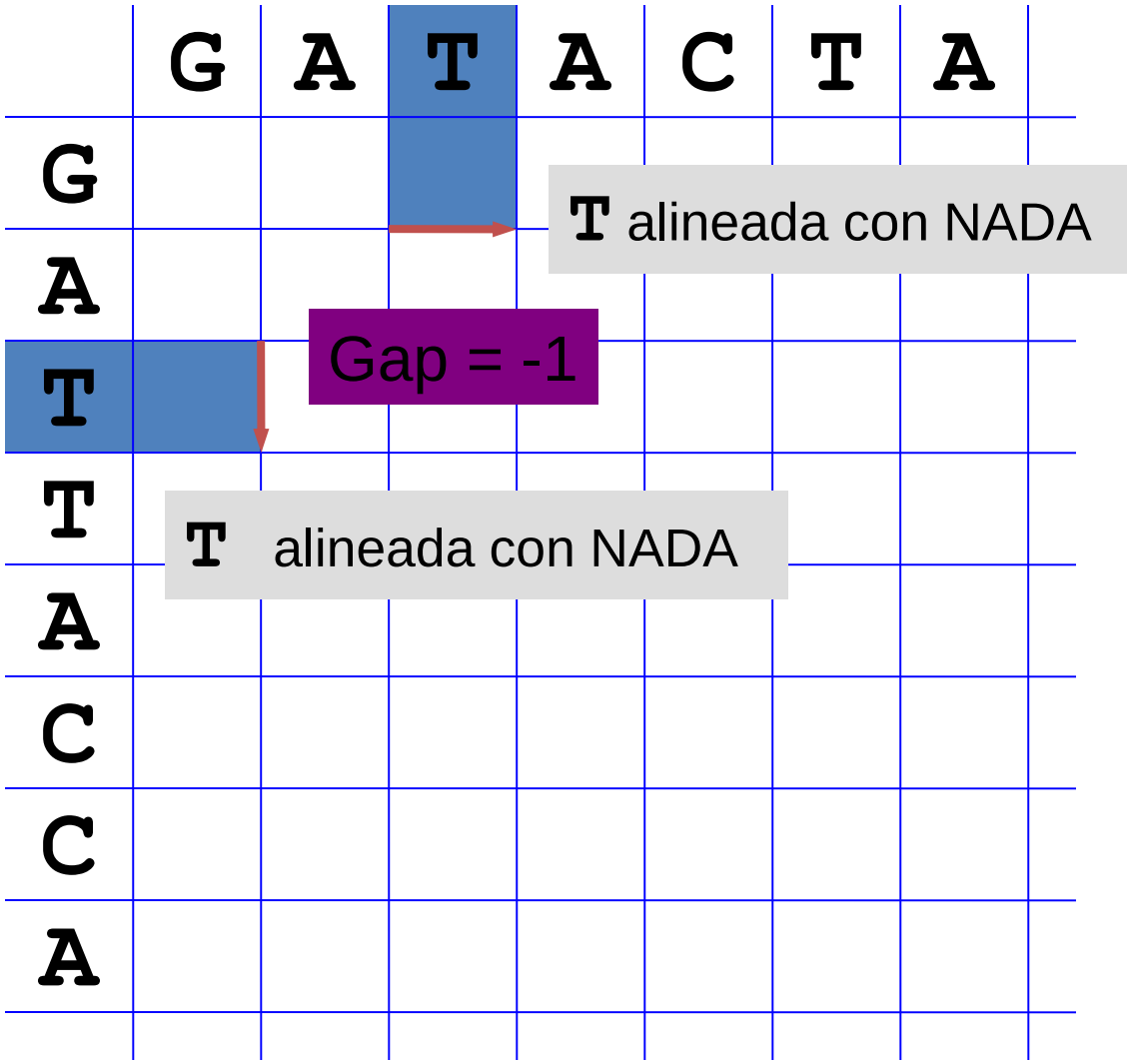
El score para una ruta (path) es la suma incremental de los scores de sus pasos (diagonales o lados).



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: scores: gaps

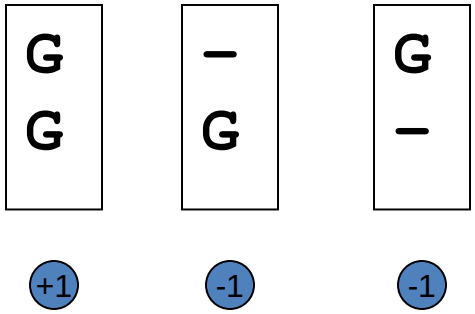
El score para una ruta (path) es la suma incremental de los scores de sus pasos (diagonales o lados).

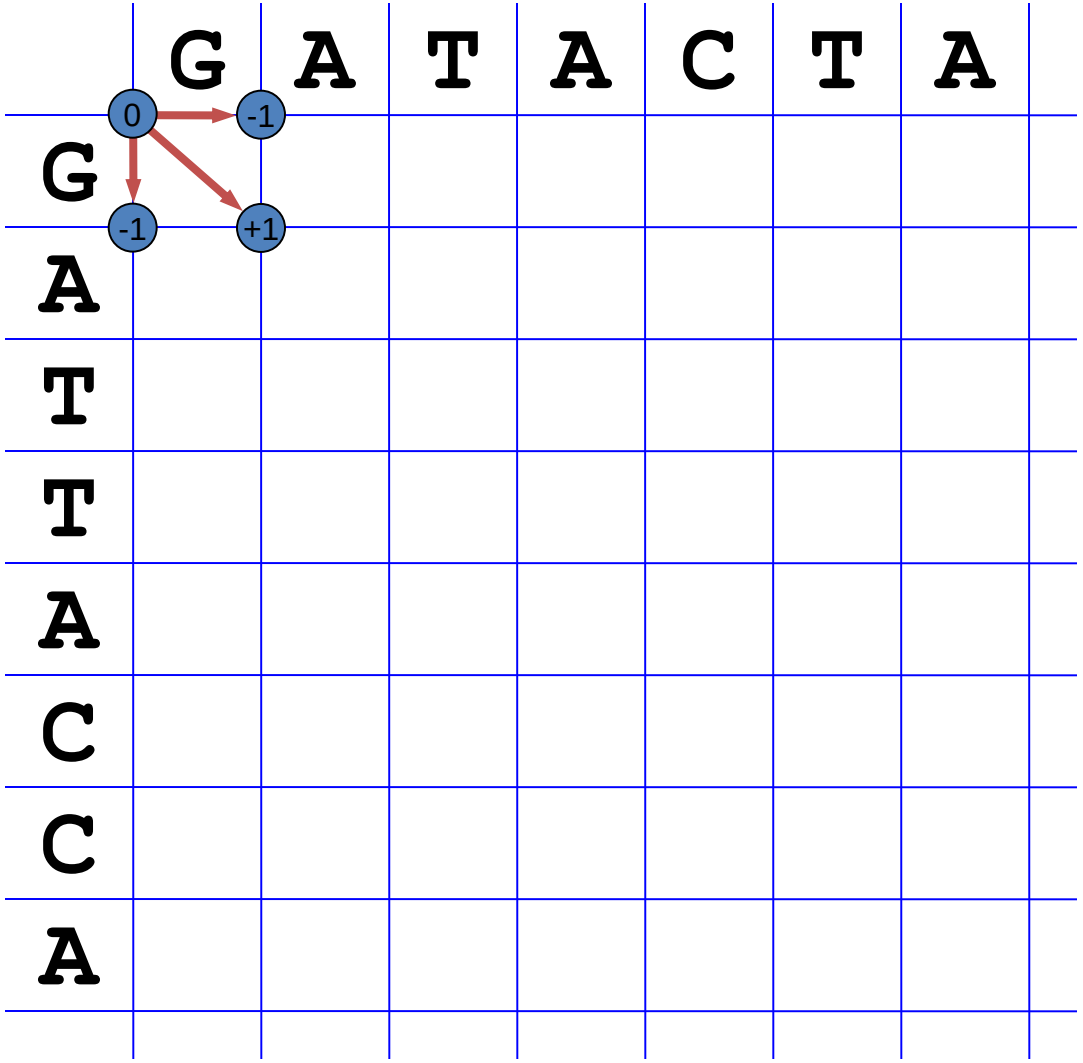


Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (1)

Extender el path paso por paso

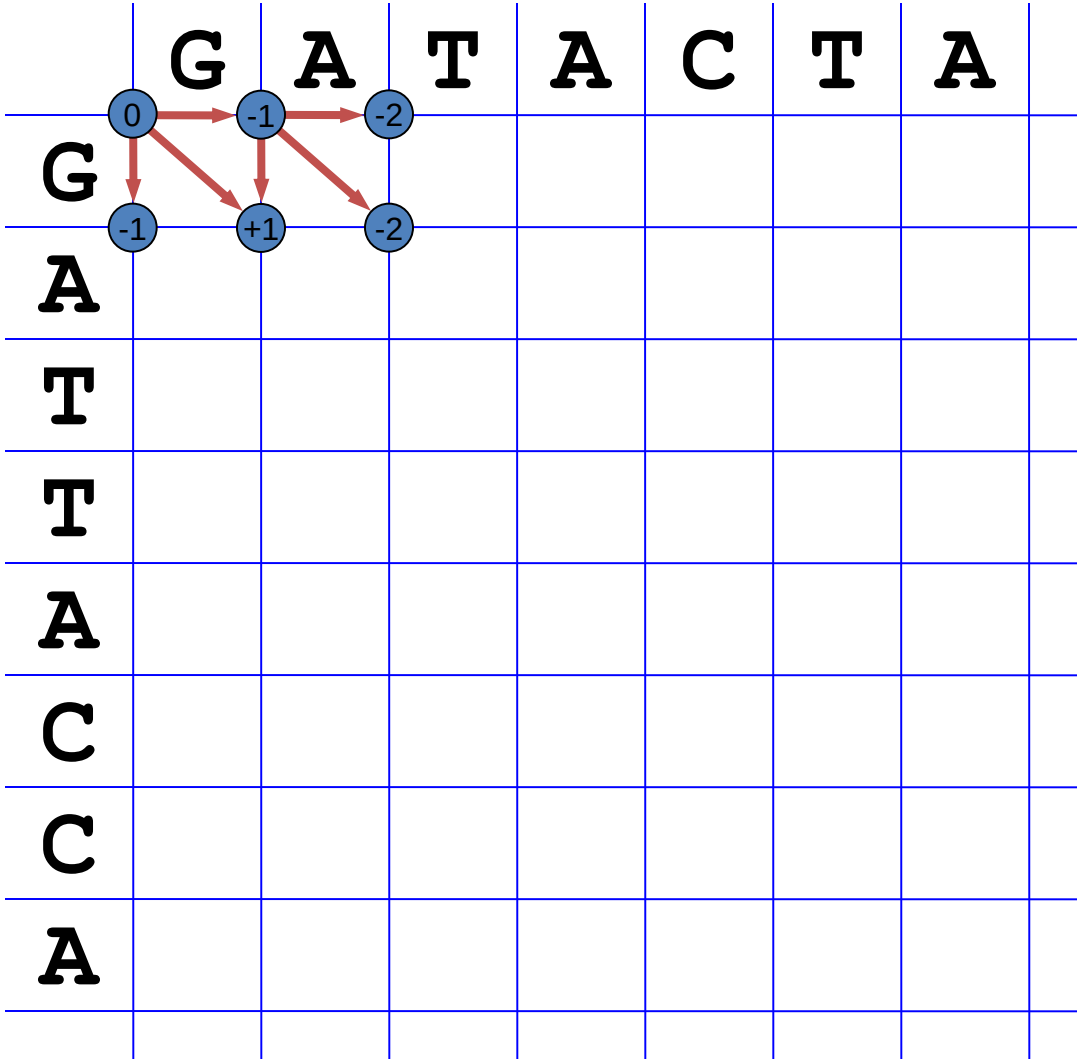




Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (2)

Incrementar el path paso a paso

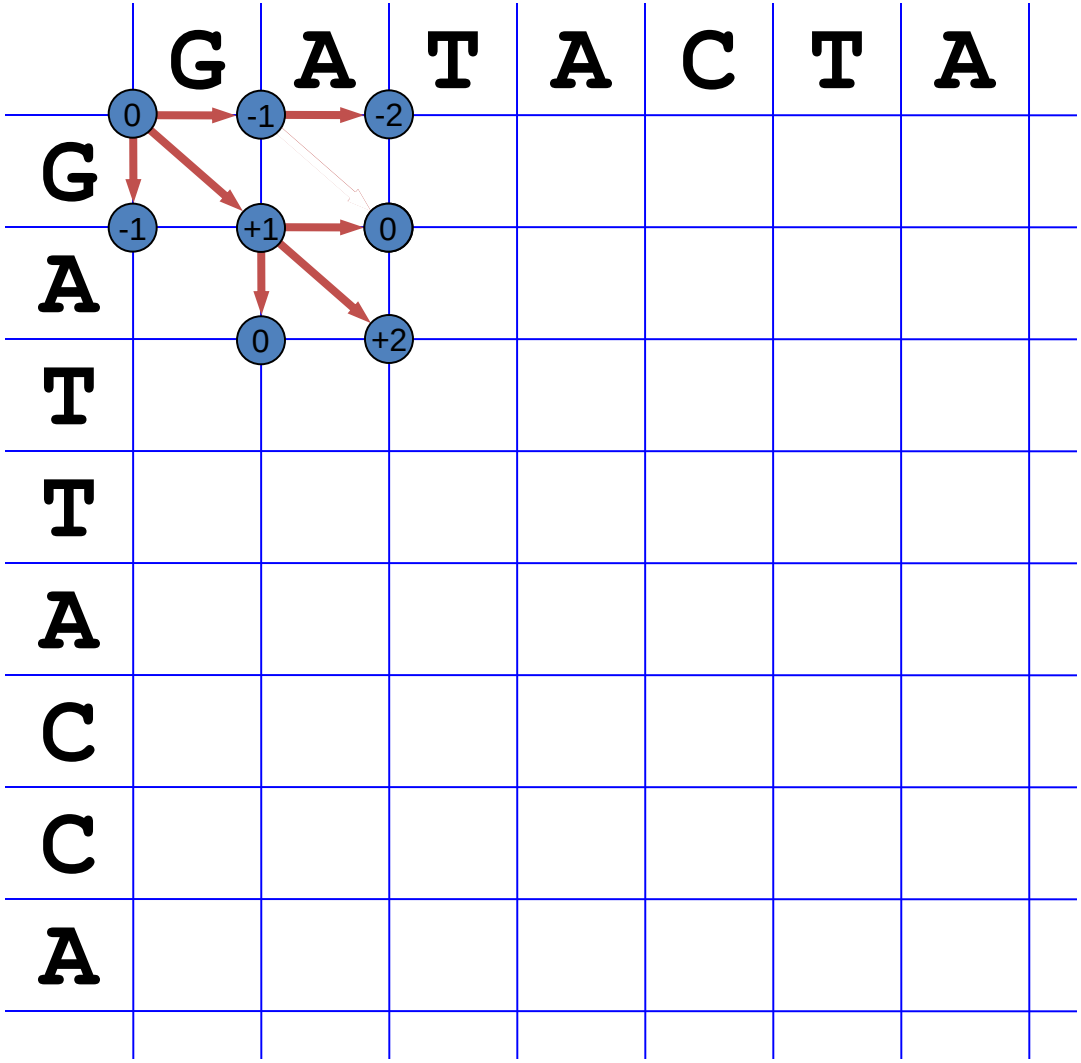


Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (3)

Incrementar el path paso a paso

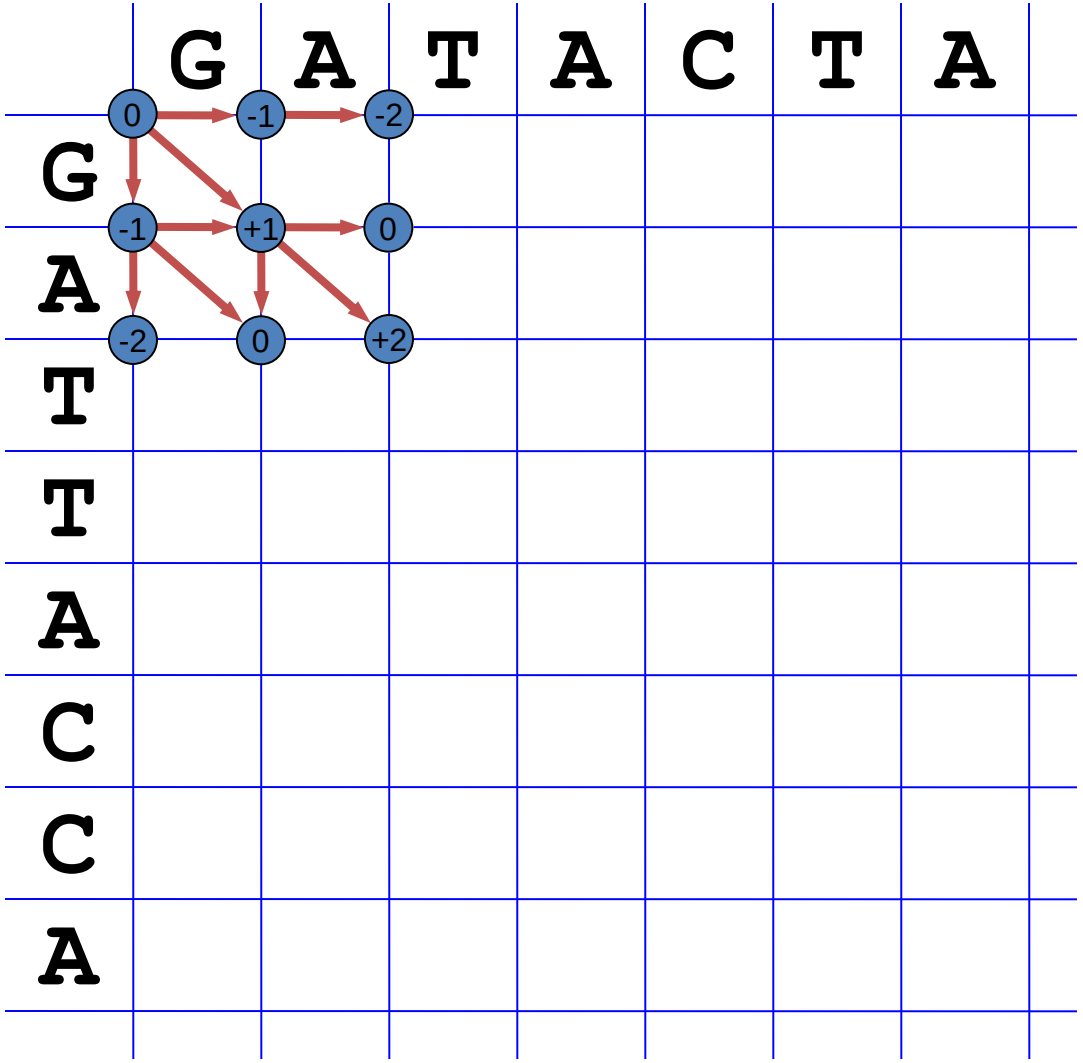


Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (4)

Incrementar el path paso a paso

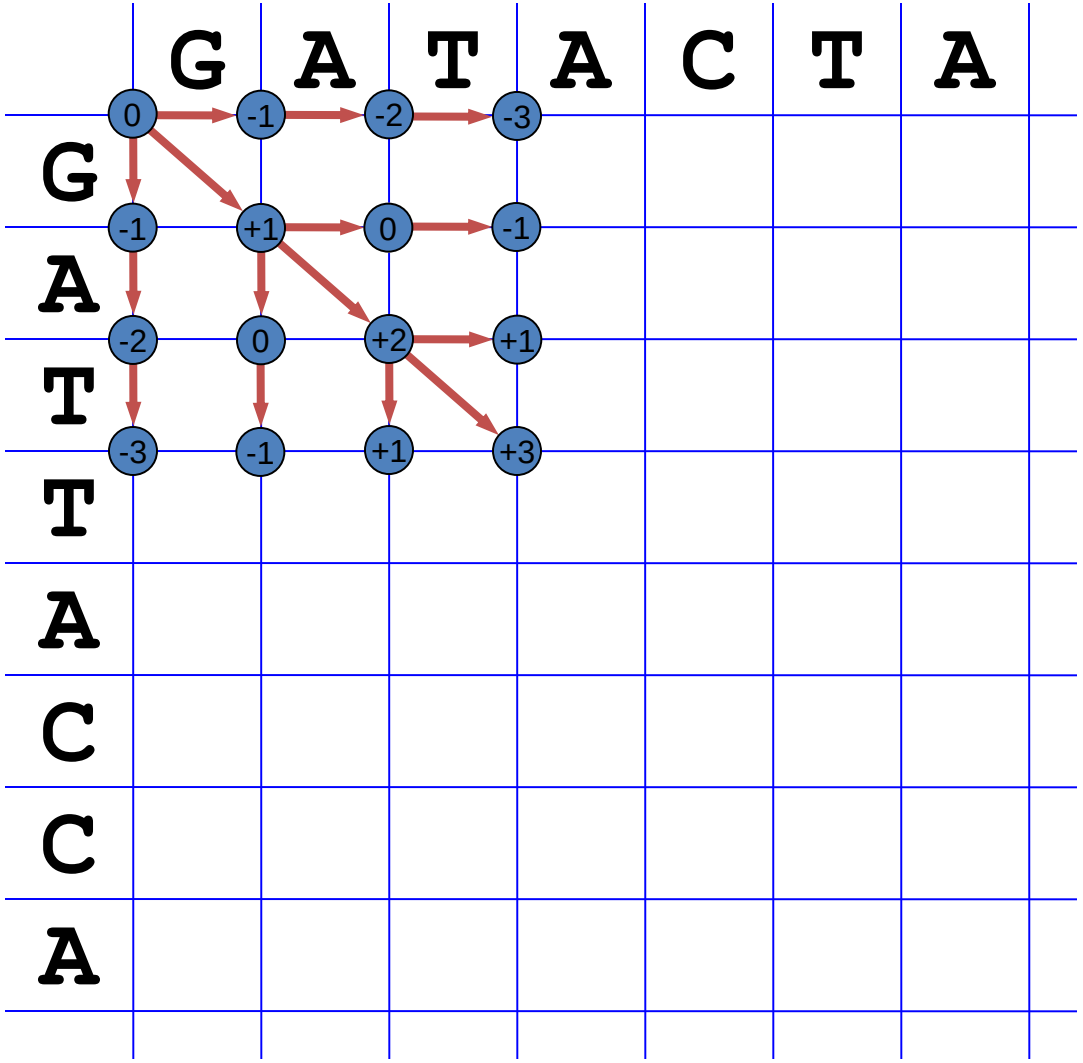


Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (5)

Incrementar el path paso a paso



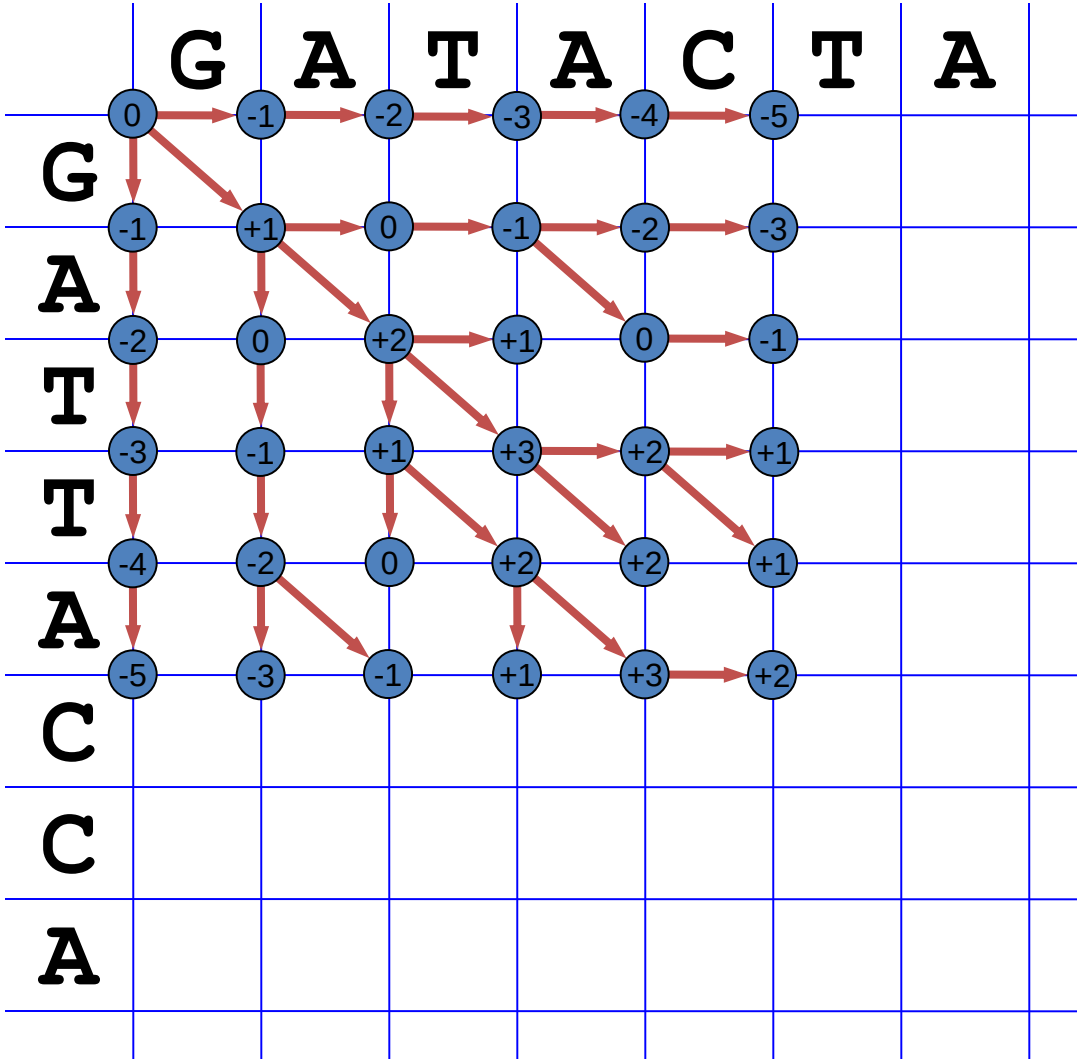
Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (6)

Incrementar el path paso a paso

Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.

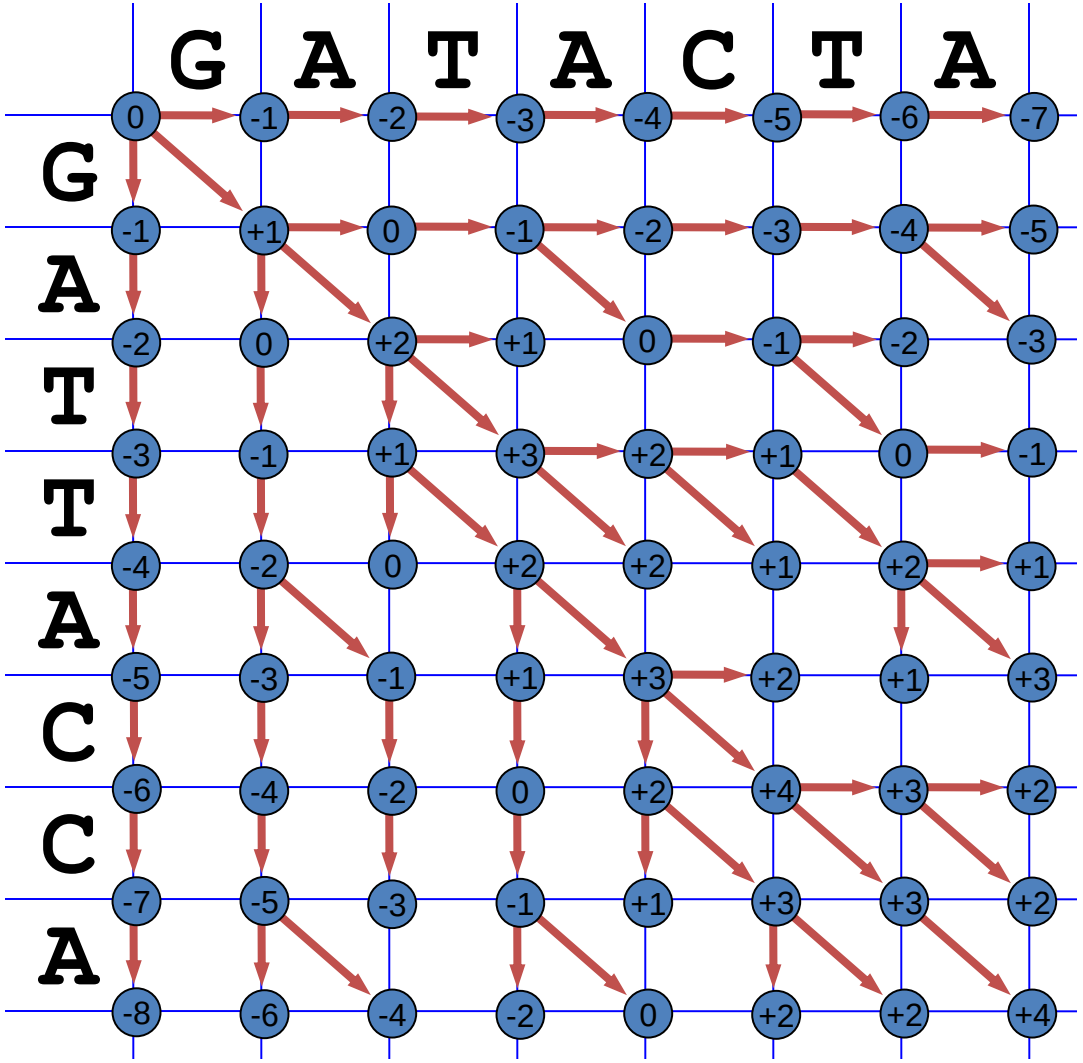


Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (7)

Incrementar el path paso a paso

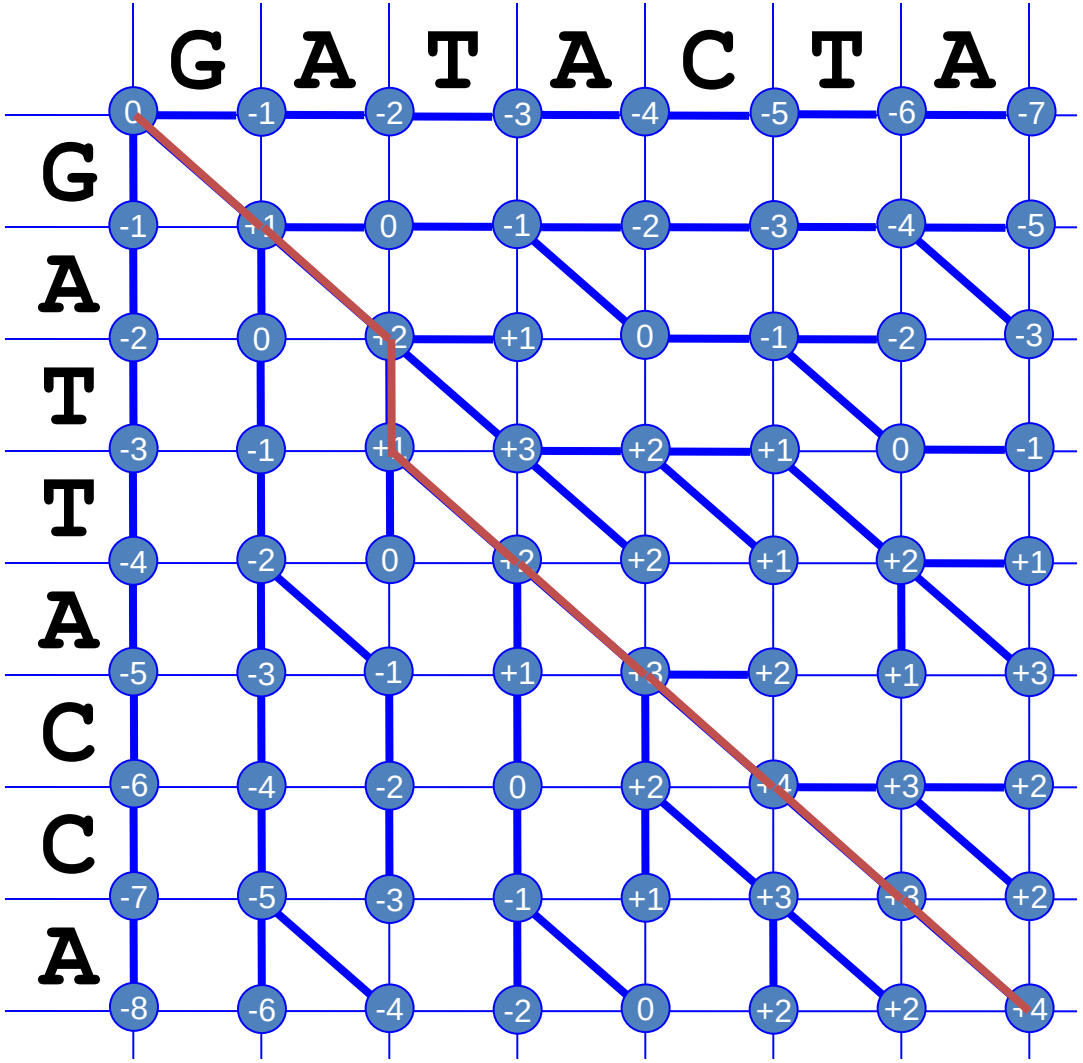
Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: best path

Recorrer el camino de atrás hacia adelante para obtener el mejor path y alineamiento.

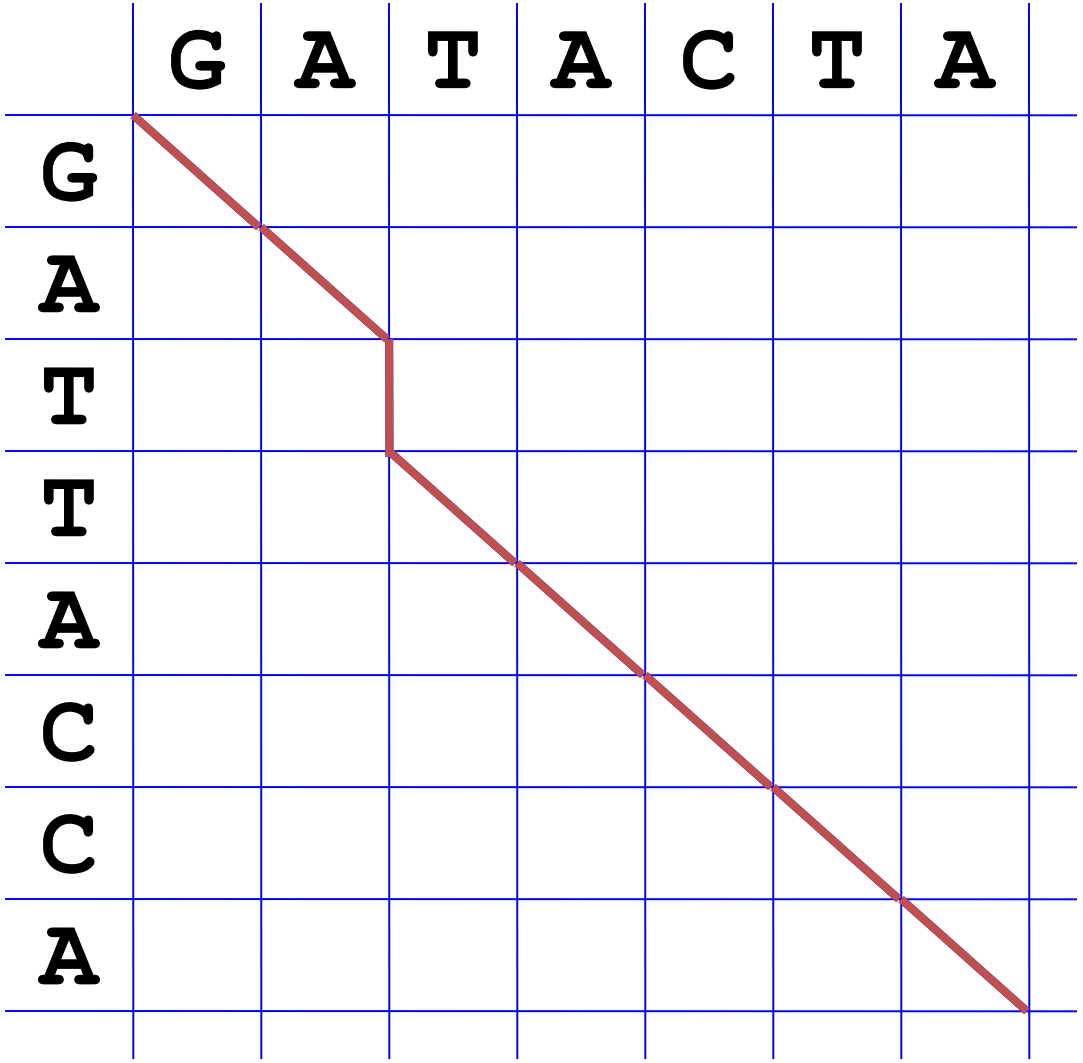


Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: alineamiento obtenido

Imprimir el alineamiento

```
GA-TACTA
GATTACCA
```



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: Smith-Waterman

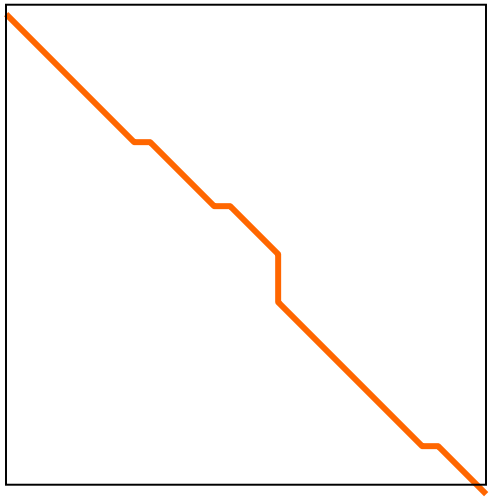
- El método fue modificado (Smith-Waterman) para obtener alineamientos locales
- El método garantiza la obtención de un alineamiento óptimo (cuyo score no puede ser mejorado)
- La complejidad es proporcional al producto de las longitudes de las secuencias a alinear

Similitud global y local

El algoritmo de programación dinámica puede ser implementado para alineamientos locales o globales.

Optimal global alignment

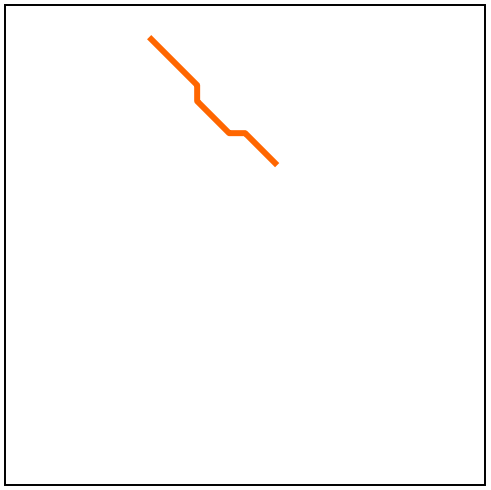
Needleman & Wunsch (1970)



Las secuencias se alinean esencialmente de un extremo a otro

Optimal local alignment

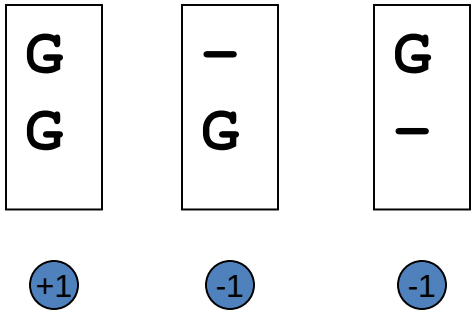
Smith & Waterman (1981)

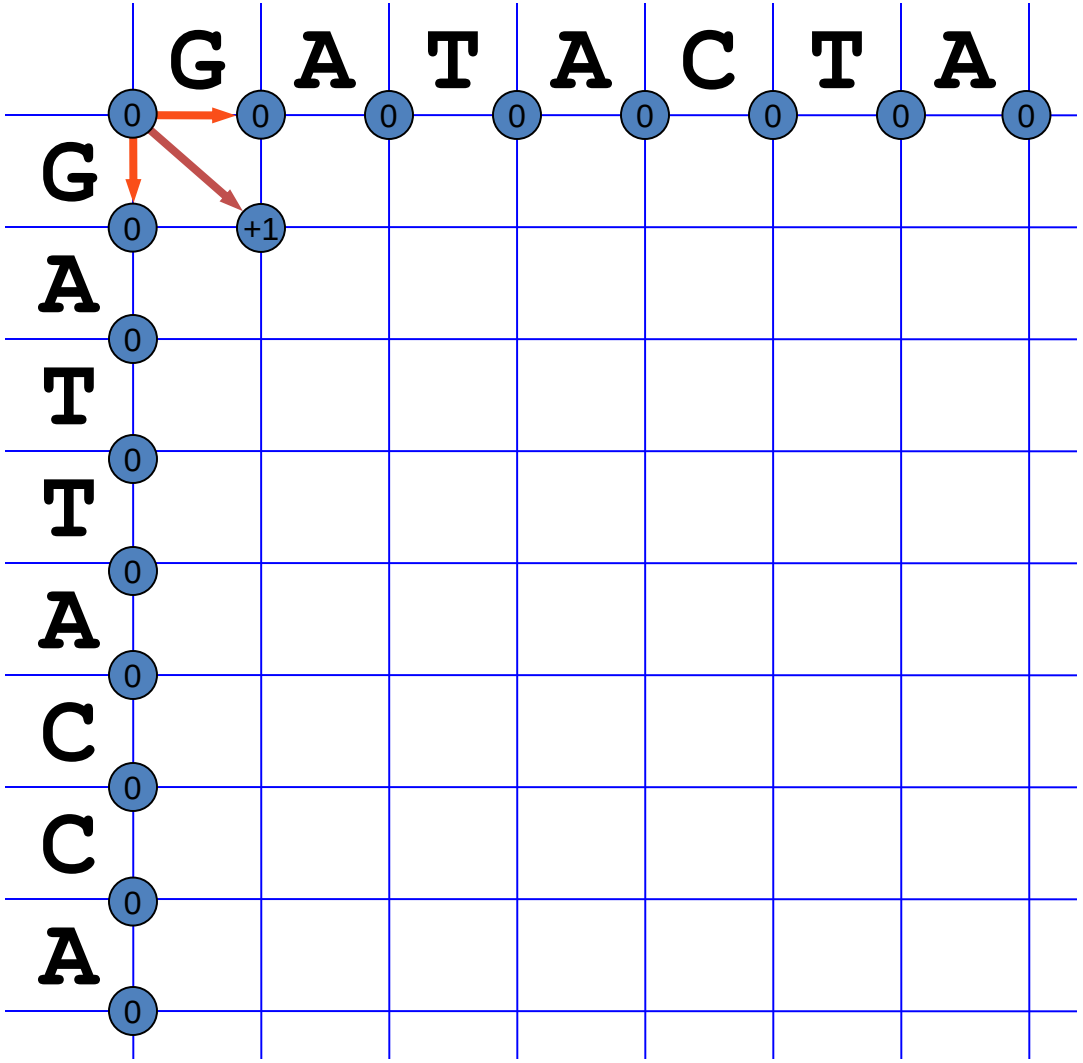


Las secuencias se alinean en regiones pequeñas y aisladas

Smith-Waterman: paso a paso

Extender el path paso por paso

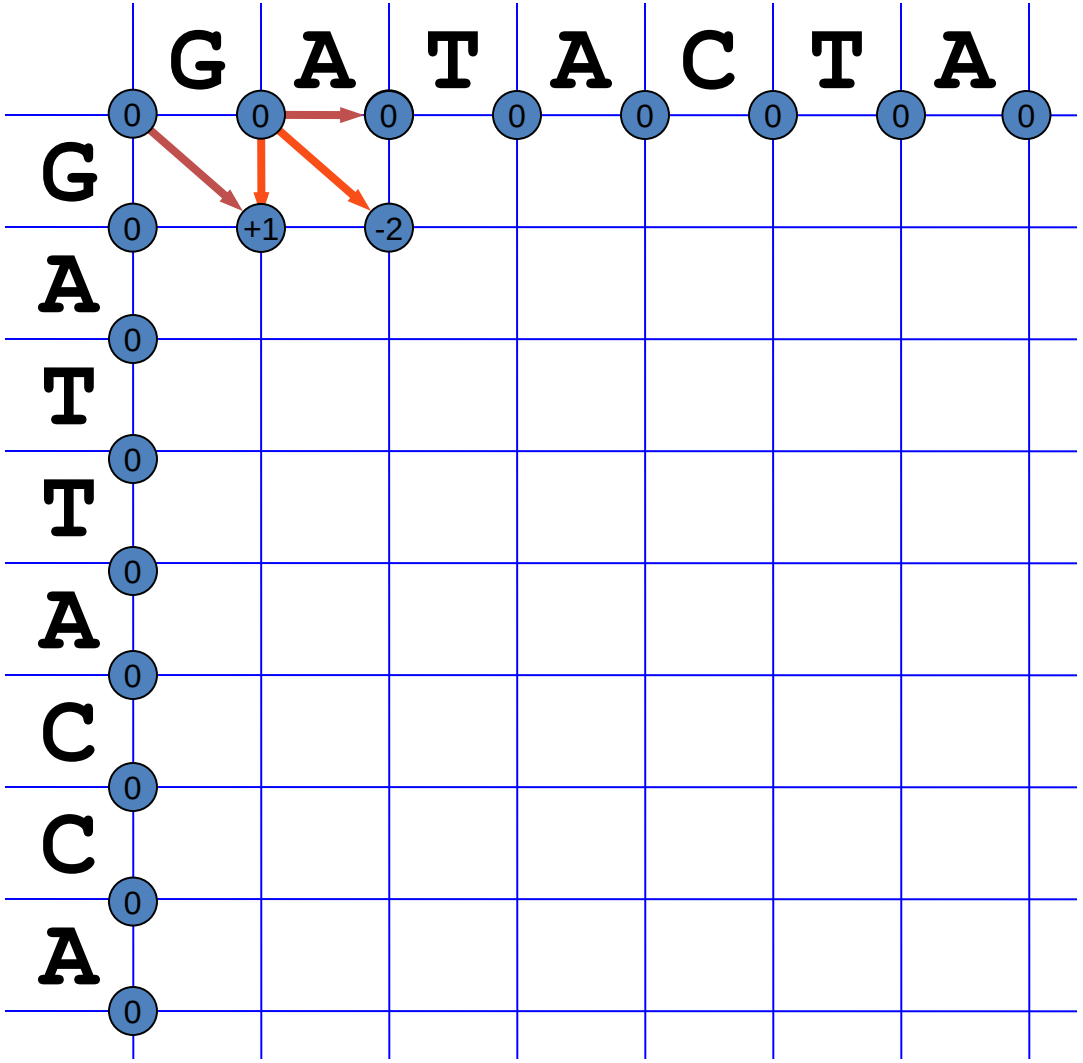




Smith-Waterman: paso a paso (2)

Incrementar el path paso a paso

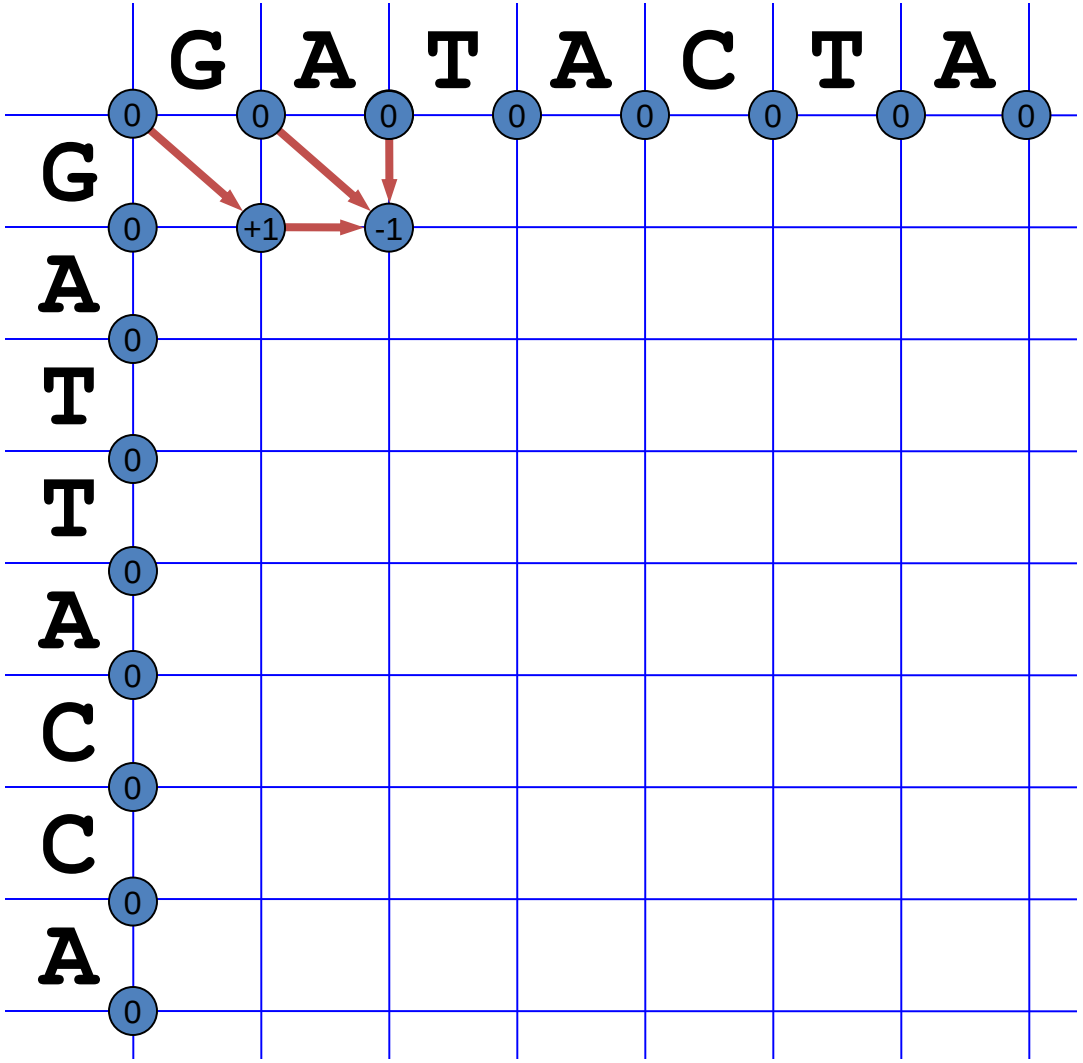
Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.



Smith-Waterman: paso a paso (3)

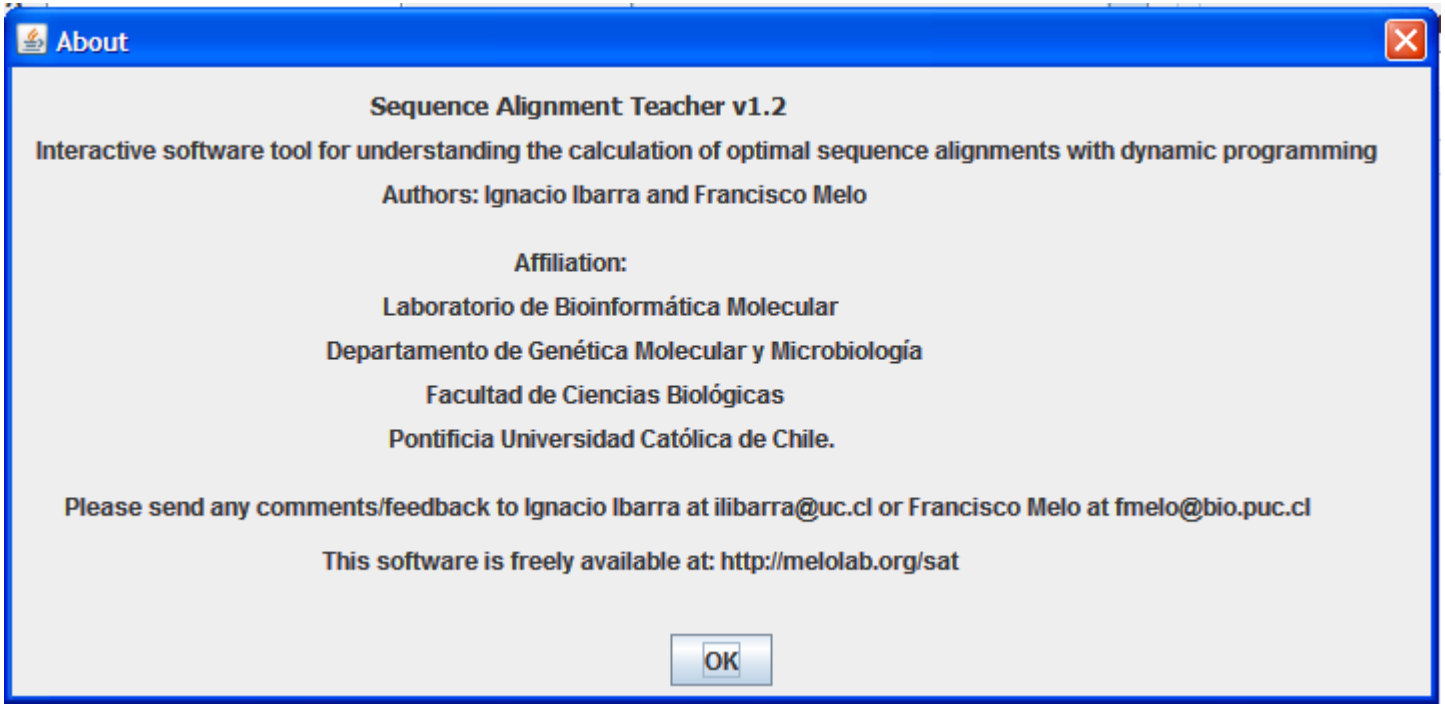
Incrementar el path paso a paso

Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.



Sequence Alignment Teacher (SAT)

- Java applet desarrollado para enseñanza



Global y local

- **Un algoritmo de alineamiento local, siempre produce alineamientos locales?**
- **Un algoritmo de alineamiento global siempre produce alineamientos globales?**

- **NO**
  - **dependiendo del sistema de scoring (scores para match/mismatch/gaps) SW puede producir alineamientos globales**
  - **dependiendo la penalidad asignada a los gaps en los extremos de un alineamiento global (o alterando significativamente el sistema de scoring) NW puede producir alineamientos locales**

Matrices

- **Un sistema de scoring simple, penaliza por igual cualquier mismatch**
- **Biológicamente tiene sentido penalizar ciertos cambios y ser más permisivo con otros**
  - **En proteínas: residuos hidrofóbicos reemplazados entre sí.**
  - **En DNA: transversiones vs transiciones**

- **Una matriz no es otra cosa que un sistema de scoring que permite asignar puntajes individuales a cada una de las letras del alfabeto en uso.**

Matrices

- **Un ejemplo de matriz de scoring podría ser el clásico ejemplo de penalizar más los cambios que alteran las propiedades químicas de un residuo (aa)**
  - **hidrofóbicos: Ile, Val, Leu, Ala**
  - **Polares (+): Lys, Arg**
  - **Polares (-): Glu, Asp**
  - **Aromáticos: Phe, Tyr, Trp**
  - **etc.**

```
Ile x Val = -1
Ile x Asp = -5
Phe x Tyr = -1
Phe x Gly = -8
```

Matrices derivadas por observación

- **PAM (Dayhoff, 1978)**
  - **proveen estimaciones de plausibilidad de cambio de un aminoácido en otro en proteínas homólogas**
  - **derivadas a partir de un grupo de secuencias > 85% similares**
  - **los cambios de aminoácidos observados son llamados "accepted mutations"**
  - **Se extrapolan matrices a períodos evolutivos más largos**

Matrices derivadas por observación

- **BLOSUM (Henikoff)**
  - **Blocks Amino Acid Substitution Matrices**
  - **Sustituciones de amino ácidos observadas en un conjunto grande de 'blocks'**
  - **Representan más de 500 familias de proteínas**

  - **Se agrupan los blocks de acuerdo a su identidad y se generan matrices**
  - **blocks 80% idénticos -> BLOSUM80**
  - **Blocks 60% idénticos -> BLOSUM60**
  - **etc**

Sistemas de scoring: BLOSUM62

Algunas sustituciones son más comunes que otras

Los scores provienen del la observación de los tipos y frecuencias de sustitución en distintas familias proteicas

BLOSUM62

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

Sistemas de scoring: BLOSUM62: identidades

Las identidades tienen scores positivos, pero algunas son más valoradas que otras.

BLOSUM62

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

Sistemas de scoring: BLOSUM62: sustituciones

Algunas sustituciones tienen scores positivos, pero la mayoría son negativos.

BLOSUM62

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

Más matrices

- **PAM**
- **BLOSUM**
- **Otras**
  - **Comparación simple de propiedades químicas de amino ácidos**
  - **Análisis complejos de sustituciones en estructura secundaria de proteínas, a partir de alineamientos estructurales**
  - **Gonnet (1994). Sustitución de dipéptidos**
  - **Jones (1994) matriz específica de proteínas transmembrana**
- **Algunas de estas matrices sirven para alinear proteínas en base a características estructurales y pueden no ser útiles para análisis evolutivos!**

Búsqueda de secuencias por similitud

- Tenemos un método (algoritmo) que nos garantiza un alineamiento óptimo entre dos secuencias

- Tenemos un sistema de scoring complejo que refleja mejor nuestras ideas biológicas acerca de lo que es un alineamiento
- Cómo usaríamos estas herramientas para implementar una búsqueda por similitude contra una base de datos?

Usemos la fuerza bruta

- Tenemos una base de datos con secuencias
- Tenemos una secuencia ‘query’ en la que estamos interesados
- Podemos encontrar secuencias similares al query en la base de datos?

- Tomar una por una las secuencias de la base de datos
- Calcular un alineamiento y su score
- Elegir los mejores alineamientos en base al score
- Finalmente usar nuestro criterio y evaluar si la/s secuencia/s encotradas son lo suficientemente similares

Heurísticas para reducir espacio de búsqueda

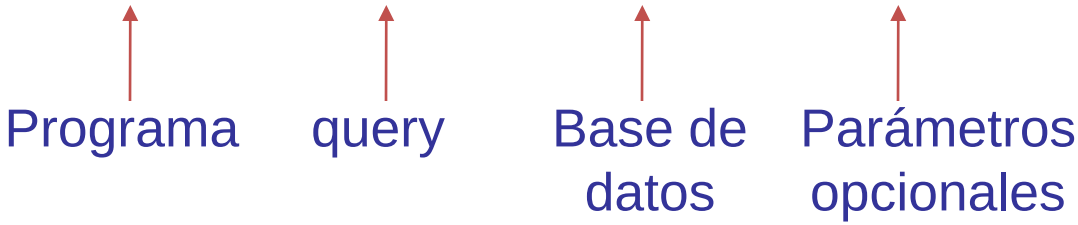
- Hay dos espacios de búsqueda reconocibles:
  - El espacio de todas las secuencias de la base de datos
  - El espacio de todos los alineamientos posibles entre dos secuencias
- Las búsquedas de secuencias por similitud son "exactas" si recorren completamente ambos espacios
  - Ej: Smith-Waterman sobre toda la base de datos
- A continuación vamos a introducir heurísticas para reducer estos espacios de búsqueda
  - Estrategias de hashing para filtrar la base de datos
  - Distintas heurísticas para reducir el espacio de alineamientos posibles que se explora efectivamente

Búsquedas en bases de datos

Compara una secuencia (query) contra una base de datos de secuencias

Una búsqueda típica tiene 4 elementos básicos.

```
> fasta  myquery  swissprot  -ktup 2
```



Búsqueda en bases de datos

Con el crecimiento exponencial de las bases de datos las búsquedas son cada vez más lentas ...

```
> fasta  myquery  swissprot  -ktup 2

searching ......
```

Database searching

La lista de hits provee los 'títulos' y scores de las secuencias que fueron seleccionadas por la secuencia 'query'.

```
> fasta  myquery  swissprot  -ktup 2

The best scores are:                                    initn init1 opt  z-sc E(77110)
gi|1706794|sp|P49789|FHIT_HUMAN BIS(5'-ADENOSYL)-  996 996  996 1262.1      0
gi|1703339|sp|P49776|APH1_SCHPO BIS(5'-NUCLEOSYL)  412 382  395 507.6 1.4e-21
gi|1723425|sp|P49775|HNT2_YEAST HIT FAMILY PROTEI  238 133  316 407.4 5.4e-16
gi|3915958|sp|Q58276|Y866_METJA HYPOTHETICAL HIT-  153  98  190 253.1 2.1e-07
gi|3916020|sp|Q11066|YHIT_MYCTU HYPOTHETICAL 15.7  163 163  184 244.8 6.1e-07
gi|3023940|sp|O07513|HIT_BACSU HIT PROTEIN         164 164  170 227.2 5.8e-06
gi|2506515|sp|Q04344|HNT1_YEAST HIT FAMILY PROTEI  130  91  157 210.3 5.1e-05
gi|2495235|sp|P75504|YHIT_MYCPN HYPOTHETICAL 16.1  125 125  148 199.7 0.0002
gi|418447|sp|P32084|YHIT_SYNP7 HYPOTHETICAL 12.4    42  42  140 191.3 0.00058
gi|3025190|sp|P94252|YHIT_BORBU HYPOTHETICAL 15.9  128  73  139 188.7 0.00082
gi|1351828|sp|P47378|YHIT_MYCGE HYPOTHETICAL HIT-   76  76  133 181.0 0.0022
gi|418446|sp|P32083|YHIT_MYCHR HYPOTHETICAL 13.1    27  27  119 165.2  0.017
gi|1708543|sp|P49773|IPK1_HUMAN HINT PROTEIN (PRO   66  66  118 163.0  0.022
gi|2495231|sp|P70349|IPK1_MOUSE HINT PROTEIN (PRO   65  65  116 160.5   0.03
gi|1724020|sp|P49774|YHIT_MYCLE HYPOTHETICAL HIT-   52  52  117 160.3  0.031
gi|1170581|sp|P16436|IPK1_BOVIN HINT PROTEIN (PRO   66  66  115 159.3  0.035
gi|2495232|sp|P80912|IPK1_RABIT HINT PROTEIN (PRO   66  66  112 155.5  0.057
gi|1177047|sp|P42856|ZB14_MAIZE 14 KD ZINC-BINDIN   73  73  112 155.4  0.058
gi|1177046|sp|P42855|ZB14_BRAJU 14 KD ZINC-BINDIN   76  76  110 153.8  0.072
gi|1169825|sp|P31764|GAL7_HAEIN GALACTOSE-1-PHOSP   58  58  104 138.5   0.51
gi|113999|sp|P16550|APA1_YEAST 5',5'''-P-1,P-4-TE   47  47  103 137.8   0.56
gi|1351948|sp|P49348|APA2_KLULA 5',5'''-P-1,P-4-T   63  63   98 131.3    1.3
gi|123331|sp|P23228|HMCS_CHICK HYDROXYMETHYLGLUTA   58  58   99 129.4    1.6
gi|1170899|sp|P06994|MDH_ECOLI MALATE DEHYDROGENA   70  48   91 122.9    3.7
gi|3915666|sp|Q10798|DXR_MYCTU 1-DEOXY-D-XYLULOSE   75  50   92 121.9    4.3
gi|124341|sp|P05113|IL5_HUMAN INTERLEUKIN-5 PRECU   36  36   85 121.3    4.7
gi|1170538|sp|P46685|IL5_CERTO INTERLEUKIN-5 PREC   36  36   84 120.0    5.5
gi|121369|sp|P15124|GLNA_METCA GLUTAMINE SYNTHETA   45  45   90 118.9    6.3
gi|2506868|sp|P33937|NAPA_ECOLI PERIPLASMIC NITRA   48  48   92 117.4    7.6
gi|119377|sp|P10403|ENV1_DROME RETROVIRUS-RELATED   59  59   89 117.0      8
gi|1351041|sp|P48415|SC16_YEAST MULTIDOMAIN VESIC   48  48   97 117.0      8
gi|4033418|sp|O67501|IPYR_AQUAE INORGANIC PYROPHO   38  38   83 116.8    8.3
```

Búsquedas en bases de datos

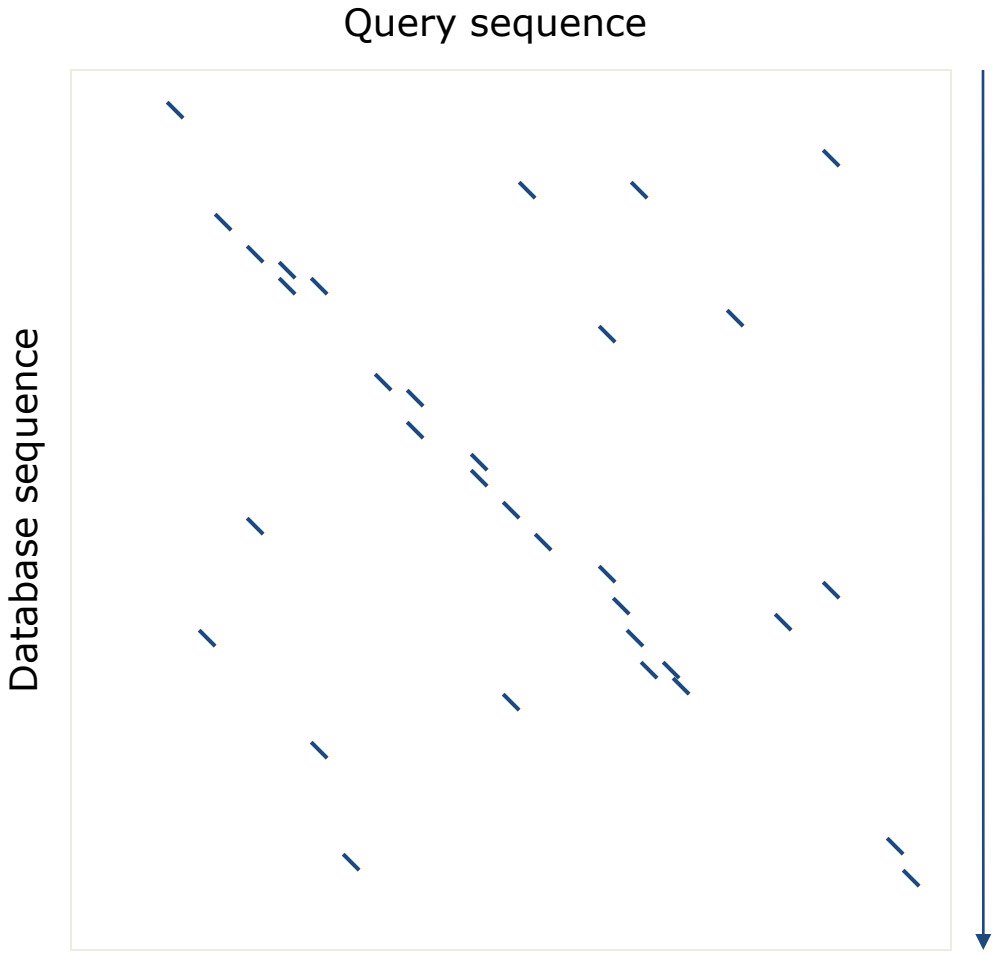
El detalle de los alineamientos se muestra más abajo

```
> fasta  myquery  swissprot  -ktup 2

>>gi|1703339|sp|P49776|APH1_SCHPO BIS(5'-NUCLEOSYL)-TETR (182 aa)
initn:  412  init1:  382  opt:  395 z-score: 507.6 E(): 1.4e-21
Smith-Waterman score: 395;    52.3% identity in 109 aa overlap


                10        20        30        40        50
gi|170  MSFRFGQHLIKPSVVFLKTELSFALVNRKPVVPGHVLVCPLRPVERFHDLRPDEVADLF
                    : X: .:.:: :.:: ::..:::::: : : : :..:: :.:..:::
gi|170 MPKQLYFSKFPVGSQVFYRTKLSAAFVNLKPILPGHVLVIPQRAVPRLKDLTPSELTDLF
               10        20        30        40        50        60


      60        70        80        90       100       110
gi|170 QTTQRVGTVVEKHFHGTSLTFSMQDGPEAGQTVKHVHVHVLPRKAGDFHRNDSIYEELQK
        ....:  :.:: : ... ....::: .:::::: ::::..::: .:: .:: .: :X.:
gi|170 TSVRKVQQVIEKVFSASASNIGIQDGVDAGQTVPHVHVHIIPRKKADFSENDLVYSELEK
               70        80        90       100       110       120


     120       130       140
gi|170 HDKEDFPASWRSEEEMAAEAAALRVYFQ
        ..
gi|170 NEGNLASLYLTGNERYAGDERPPTSMRQAIPKDEDRKPRTLEEMEKEAQWLKGYFSEEQE
              130       140       150       160       170       180


>>gi|1723425|sp|P49775|HNT2_YEAST HIT FAMILY PROTEIN 2 (217 aa)
initn:  238  init1:  133  opt:  316 z-score: 407.4 E(): 5.4e-16
Smith-Waterman score: 316;    37.4% identity in 131 aa overlap


                                  10        20        30        40
gi|170                  MSFRFGQHLIKPSVVFLKTELSFALVNRKPVVPGHVLVCPLRP-VERF
                        :... :.  .V^: ... ..... ..:::::::. ::X. :
```

Búsquedas en bases de datos: hashing methods

La búsqueda más simple es un gran ejemplo de dynamic programming. Para una secuencia query de **N** letras, contra una base de datos de **M** letras, se requieren **MxN** comparaciones.

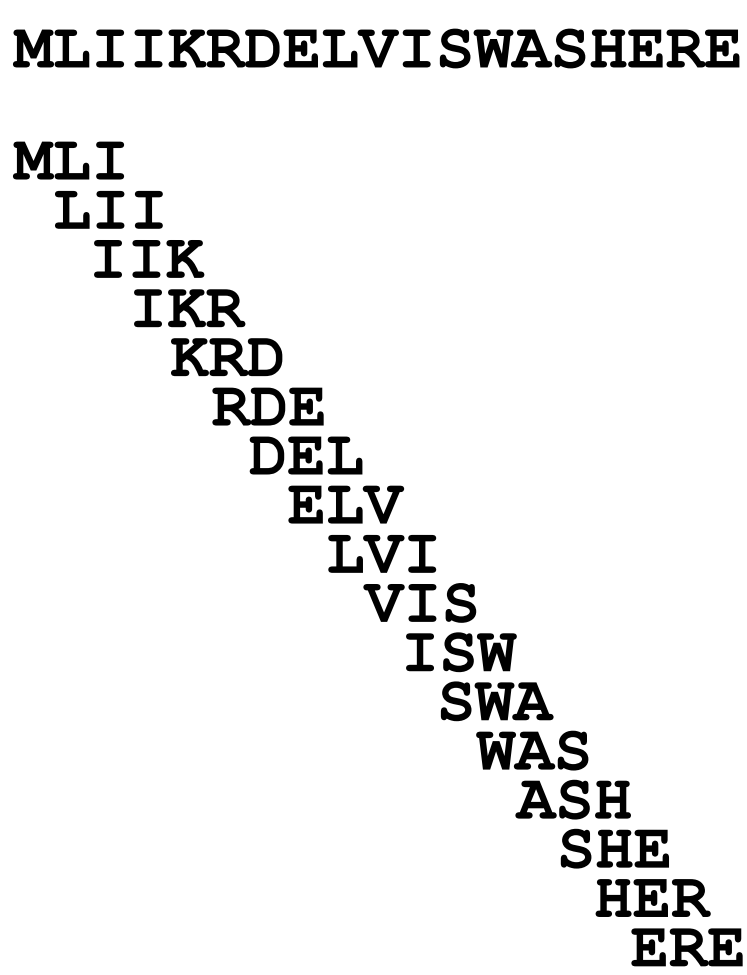
Cómo reducir este espacio de búsqueda?



Hashing methods

Hashing es un método común para acelerar búsquedas en bases de datos.

Compilar un "diccionario" de palabras a partir de la secuencia 'query'. Armar un índice con todas las palabras.



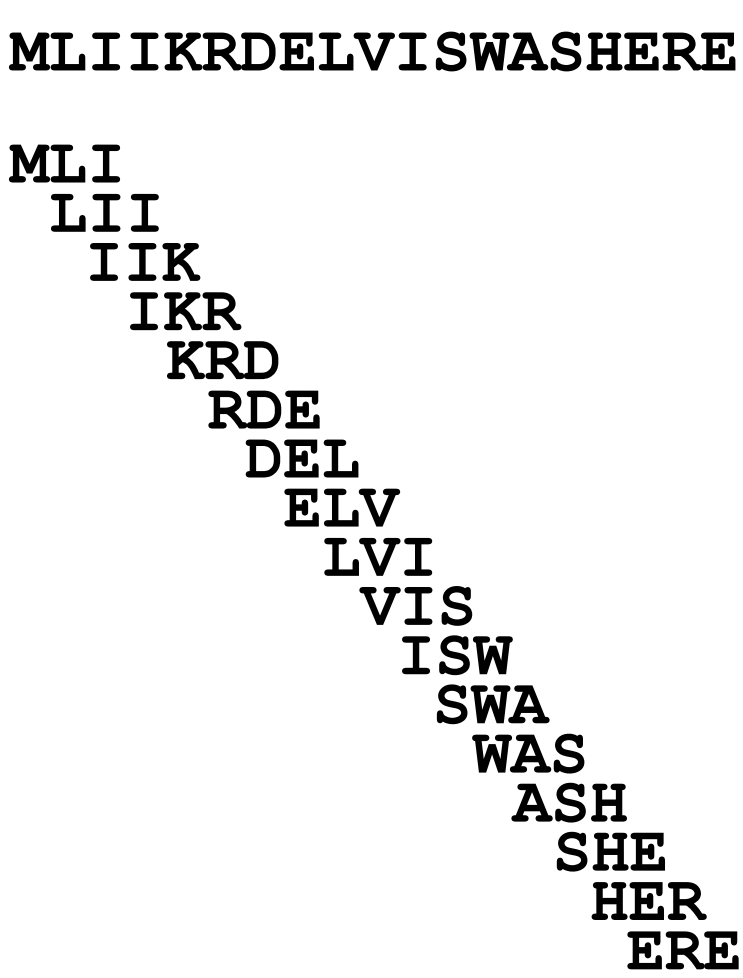
query sequence

Todas las palabras posibles de longitud **ktup**

ktup = 3

Hashing methods

Construir el diccionario de palabras para la secuencia 'query' requiere N-2 operaciones.

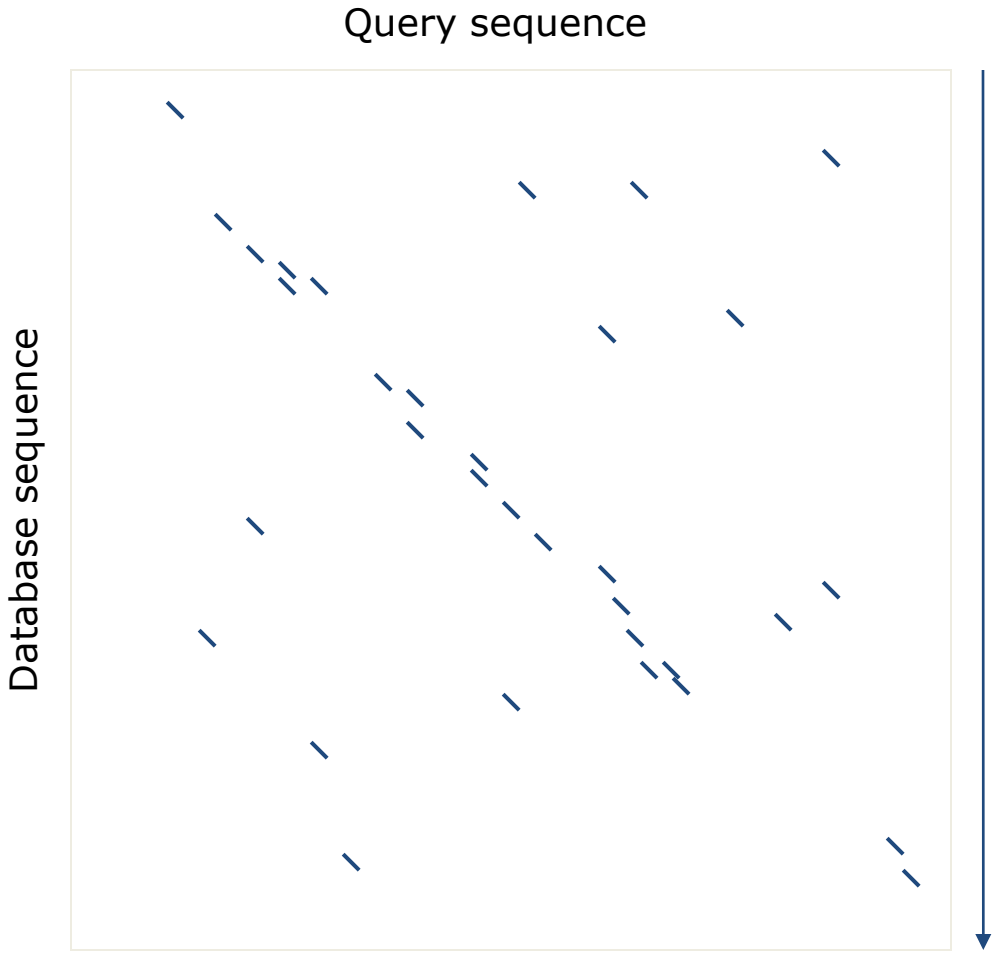


La base de datos contiene M-2 palabras y se requiere una sola operación para buscar ...

Hashing methods

Scan the database, looking up words in the dictionary

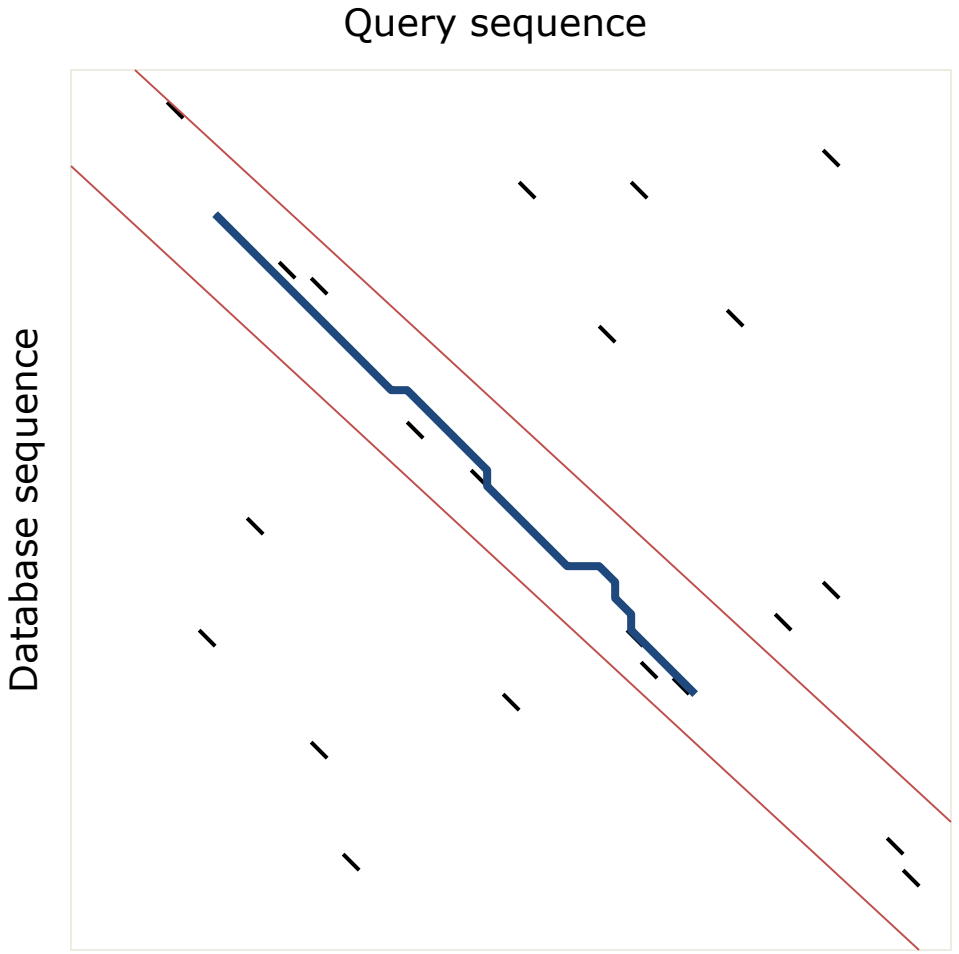
Use word hits to determine were to search for alignments
fills the dynamic programming matrix in (N-2)+(M-2) operations instead of MxN.



Hashing methods

Scan the database, looking up words in the dictionary

Use word hits to determine were to search for alignments

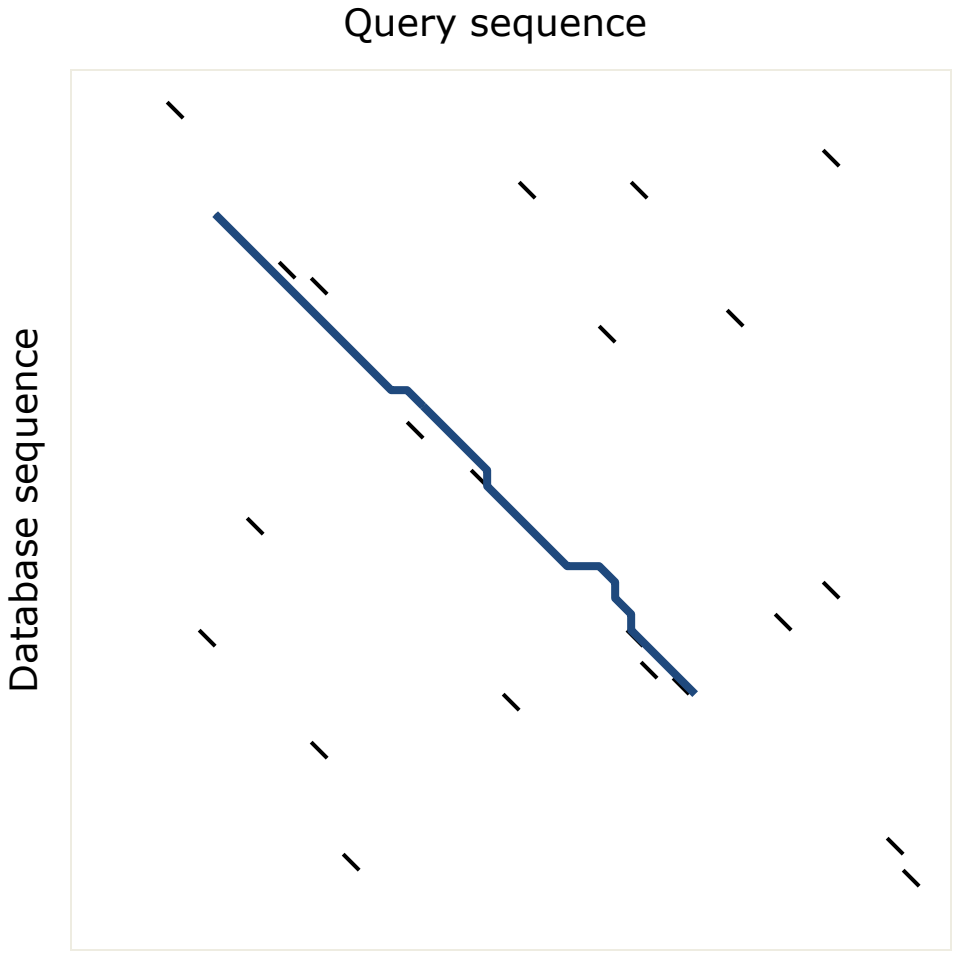


FASTA searches in a band

Hashing methods

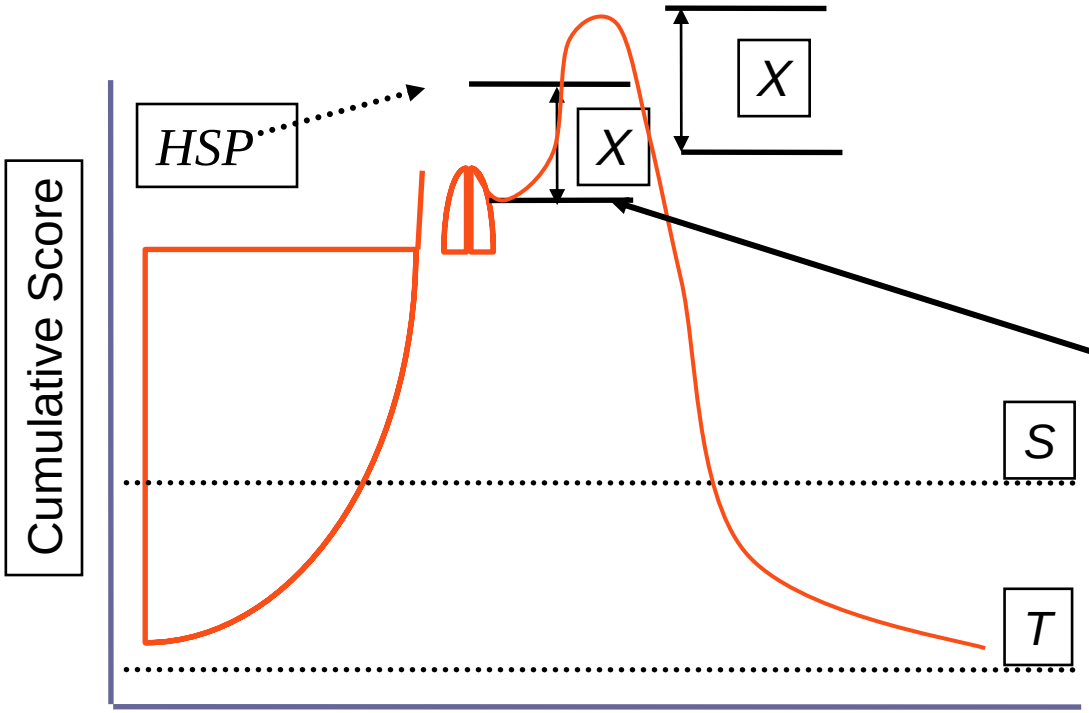
Scan the database, looking up words in the dictionary

Use word hits to determine were to search for alignments



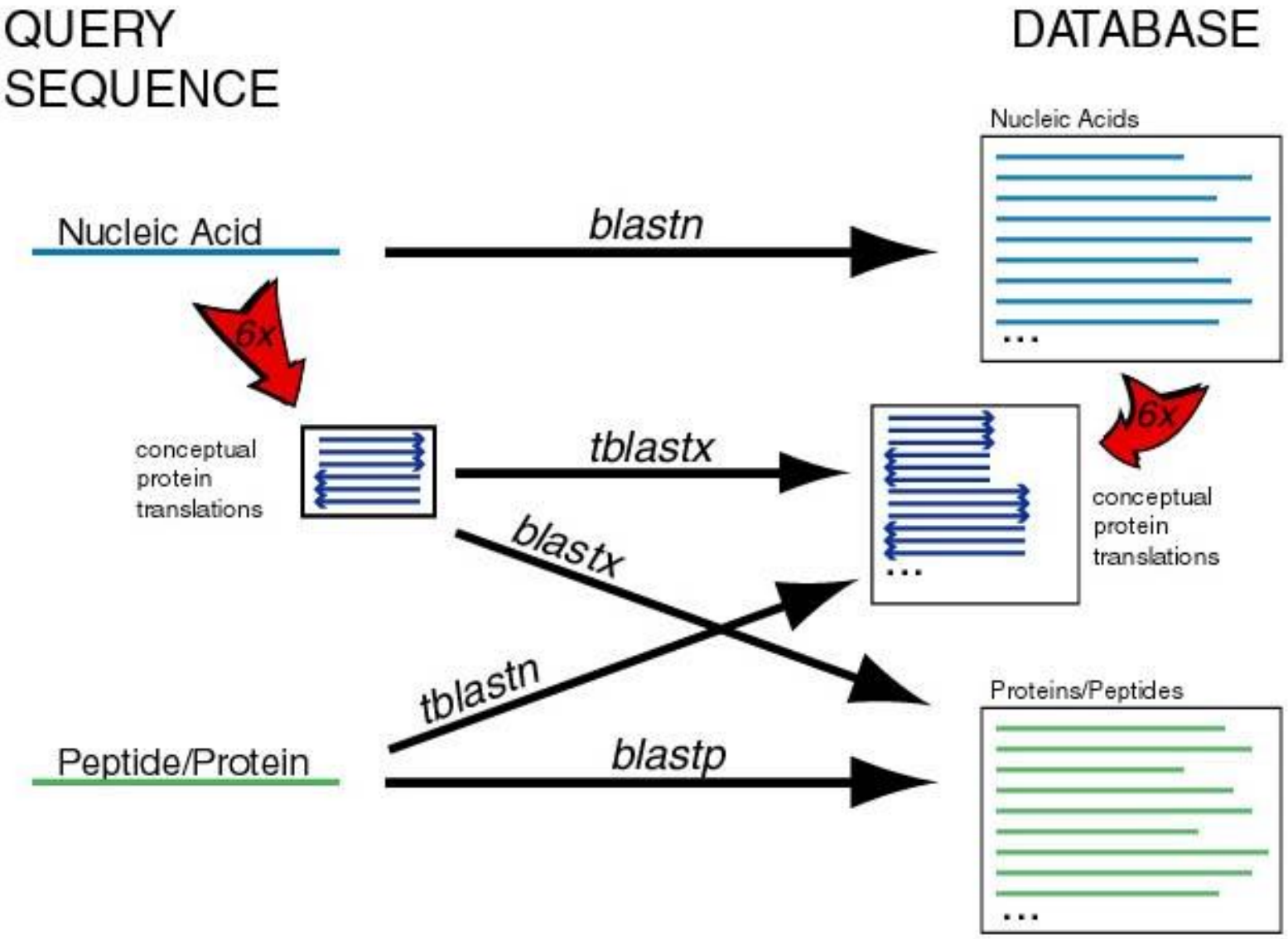
BLAST extends from word hits

BLAST: varios HSPs



Intenta extender el HSP, siempre que la caída del score sea menos que X (bits). Si lo logra, se repite con el próximo pico.

BLAST: algoritmos



FASTA: algoritmos

- **FASTA**
  - **protein-protein, DNA-DNA**
- **fastx, fasty**
  - **translated query, protein database**
  - **Permite frameshifts sólo entre codones (fastx) o dentro de un codón (fasty)**
- **Ssearch**
  - **Una implementación rigurosa del algoritmo de Smith-Waterman (sin heurísticas)**
- **Prss**
  - **Evalua el significado de un alineamiento por permutación de una secuencia**

- **Tfastx, tfasty**
  - **Protein sequence vs DNA database**

Evaluando alineamientos

- **Qué hacemos cuando estamos comparando dos secuencias que no son claramente similares, pero que muestran un alineamiento prometedor?**
- **Necesitamos un test de significancia**
- **Tenemos que responder a la pregunta:**
  - **Cuál es la probabilidad de que un alineamiento similar (con un score similar) ocurra entre proteínas no relacionadas?**

Estadística de los alineamientos

- **Generar secuencias al azar de la misma longitud y composición que la secuencia query y alinearlas**
  - Karlin & Altschul (1990); Altschul et al (1994); Altschul & Gish (1996)

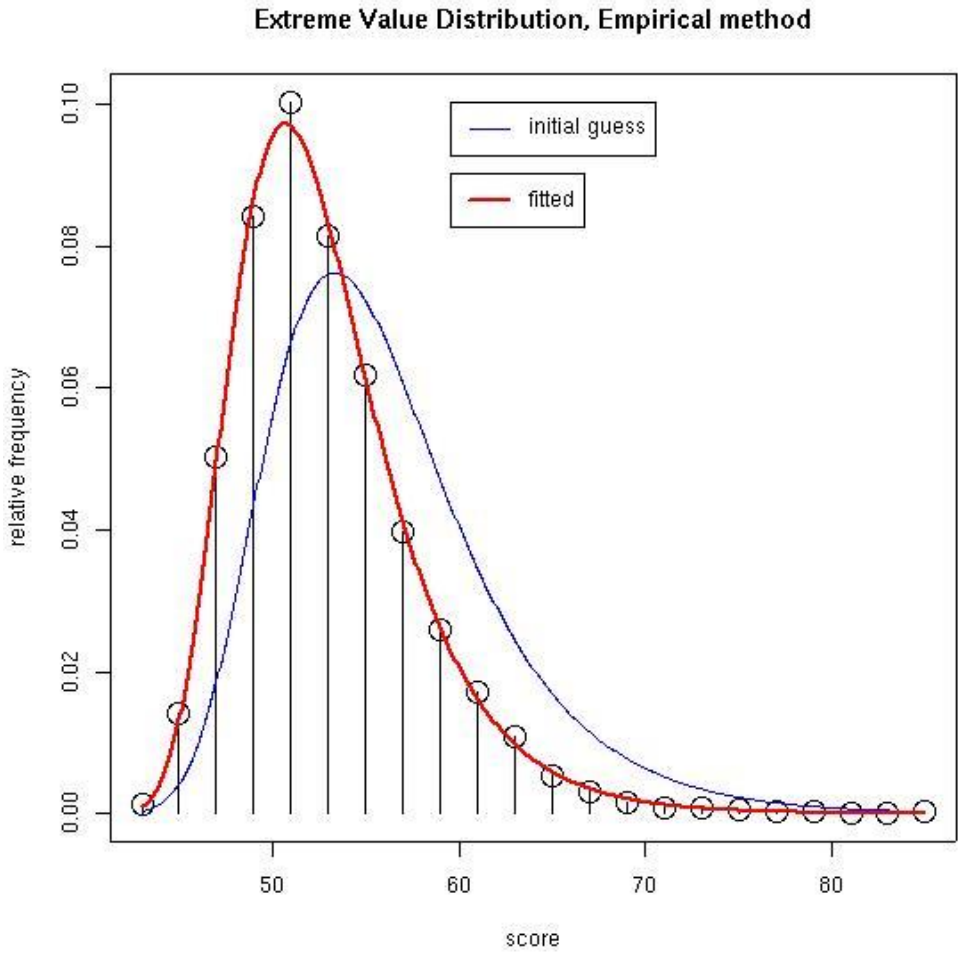
- **Analizar la distribución de scores que se obtiene**

The Gumbel/Extreme value distribution

- **In a database search (BLAST/FASTA) the alignment scores do not follow a normal/Gaussian distribution!**

$$E = K\,mn\,e^{-\lambda S}$$

E is the number of alignments with a score >= S
m,n: length of the sequences
K,λ: estimated parameters estimated (depend on the scoring matrix and the size of the database)

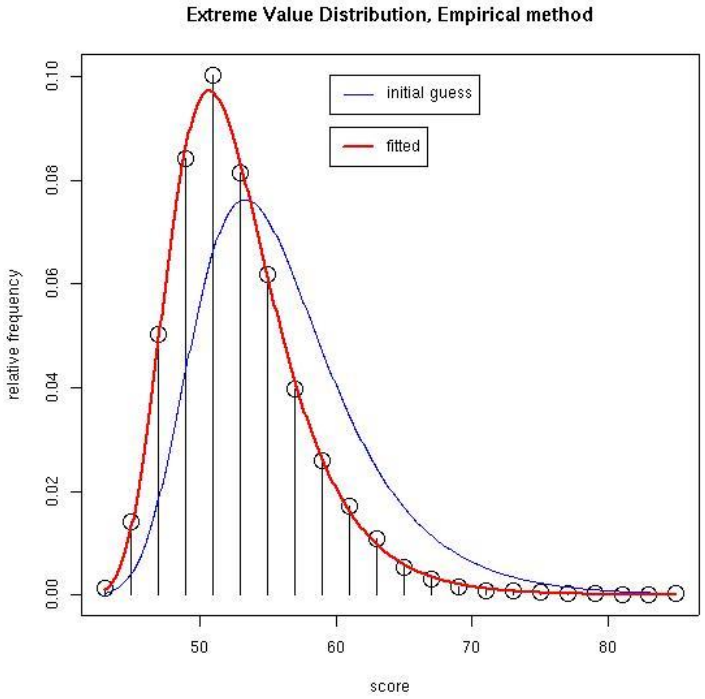


E-value

Los hits pueden ser ordenados de acuerdo a su E-value o a su Score.
El E-value – más conocido como **EXPECT** value – es una función del score, el tamaño de la base de datos y de la longitud de la secuencia 'query'.
E-value: Número de alineamientos con un score >=S que se espera encontrar si la base de datos es una colección de letras al azar.
Ejemplo: En el caso de un score=1 (un match o identidad) debería haber un número enorme de alineamientos. Uno espera encontrar menos alineamientos con un score de 5, 10, etc. Eventualmente, cuando el score es lo suficientemente alto, uno espera encontrar un número insignificante de alineamientos que sean debidos al azar.
Valores de E-value menores que 1e-6 ($1* 10^{-6}$) son generalmente muy buenos para proteínas, mientras que E<1e-2 puede considerarse significativo. Es posible que un hit cuyo E > 1 sea biológicamente importante, aunque es necesario analizarlo más detalladamente para confirmarlo.

Observed vs expected

- **Si la base de datos es suficientemente grande y contiene mayoritariamente secuencias no relacionadas la distribución de scores observados debería coincidir bastante con la distribución de scores esperados por azar (Pearson 1998)**



Tamaño de la base de datos

$$E(S > x) = p(S > x)\, D$$

- El número de alineamientos con un score > S se incrementa linealmente con el tamaño de la base de datos
- ⇒ una secuencia (un alineamiento con un score S) encontrada en una búsqueda contra un genoma bacteriano con 1000-5000 secuencias va a ser 50-250 veces más significativa que un alineamiento con exactamente el mismo score en una base de datos como OWL (250,000 secuencias)

- Sin embargo, vimos que la base de datos tiene que ser suficientemente grande como para poder estimar P y E
- ⇒ Compromiso

Tamaño de la base de datos: un ejemplo

- **Objetivo: encontrar el homólogo en *E. coli* de la DAHP synthase de *B.* subtilis**

- ***E. coli* proteome**
  - **kdsA, E(4283) < 0.00015**
- **Swissprot**
  - **kdsA, E(74417) < 0.0017**
- **OWL**
  - **kdsA, E(260784) < 0.0085**

- **El mismo alineamiento, con el mismo score es 50 veces más significativo en la base de datos más chica.**

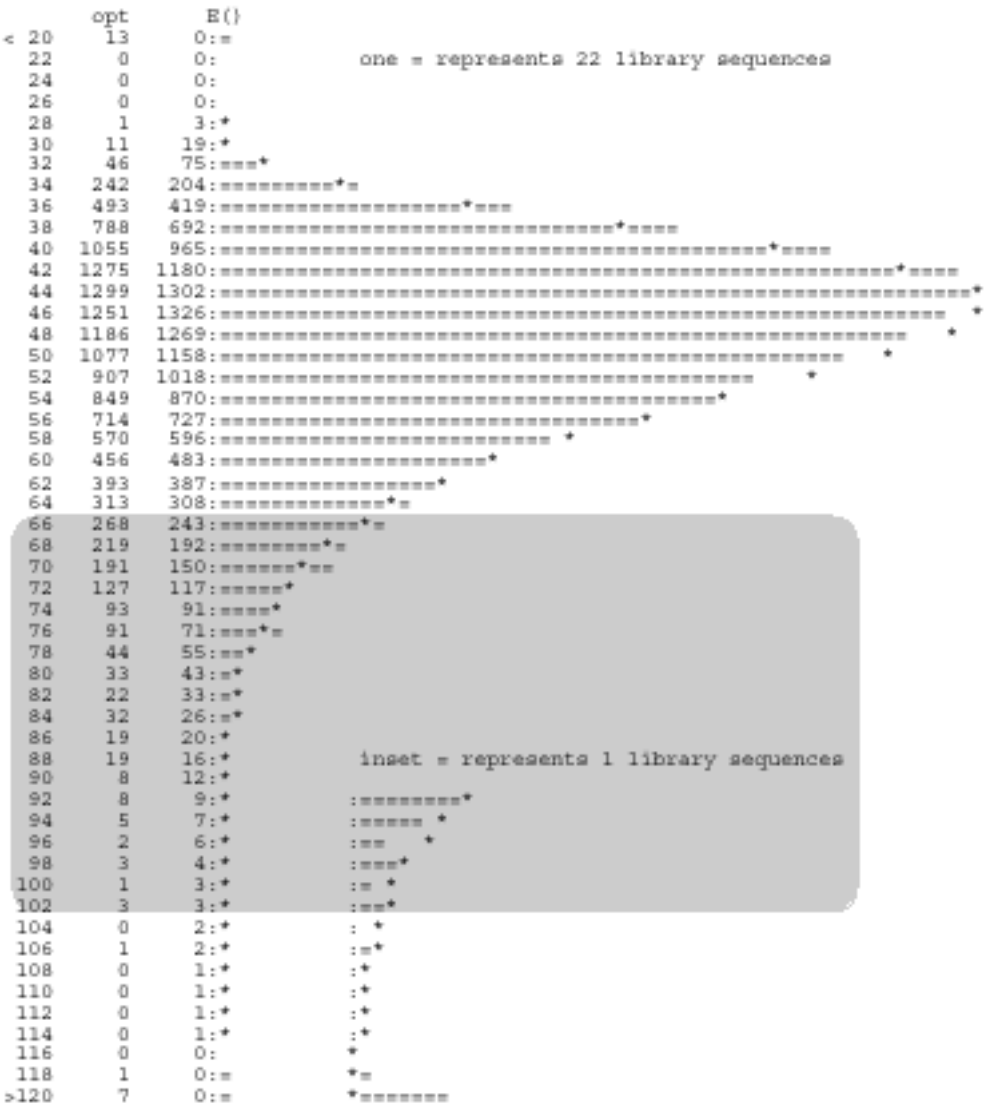
Identificar homólogos con eficiencia

- Buscar en bases de datos pequeñas primero
- Repetir la búsqueda en una base de datos pequeña con un algoritmo más sensible (fasta3 con ktup 1 o ssearch)
- Si no hay hits significativos, buscar bases de datos más grandes, como nr (GenPept, TrEMBL)

Límites de la estadística

- **En ciertos casos, la estadística de los alineamientos falla**
  - **Lo que falla son las suposiciones que hicimos para llegar al modelo estadístico que describe - en este caso - la distribución de scores entre secuencias no relacionadas**
- **En general se obtienen estimaciones incorrectas de E cuando**
  - **Se usan penalidades de gap incorrectas**
  - **Existen regiones de baja complejidad en la secuencia query**

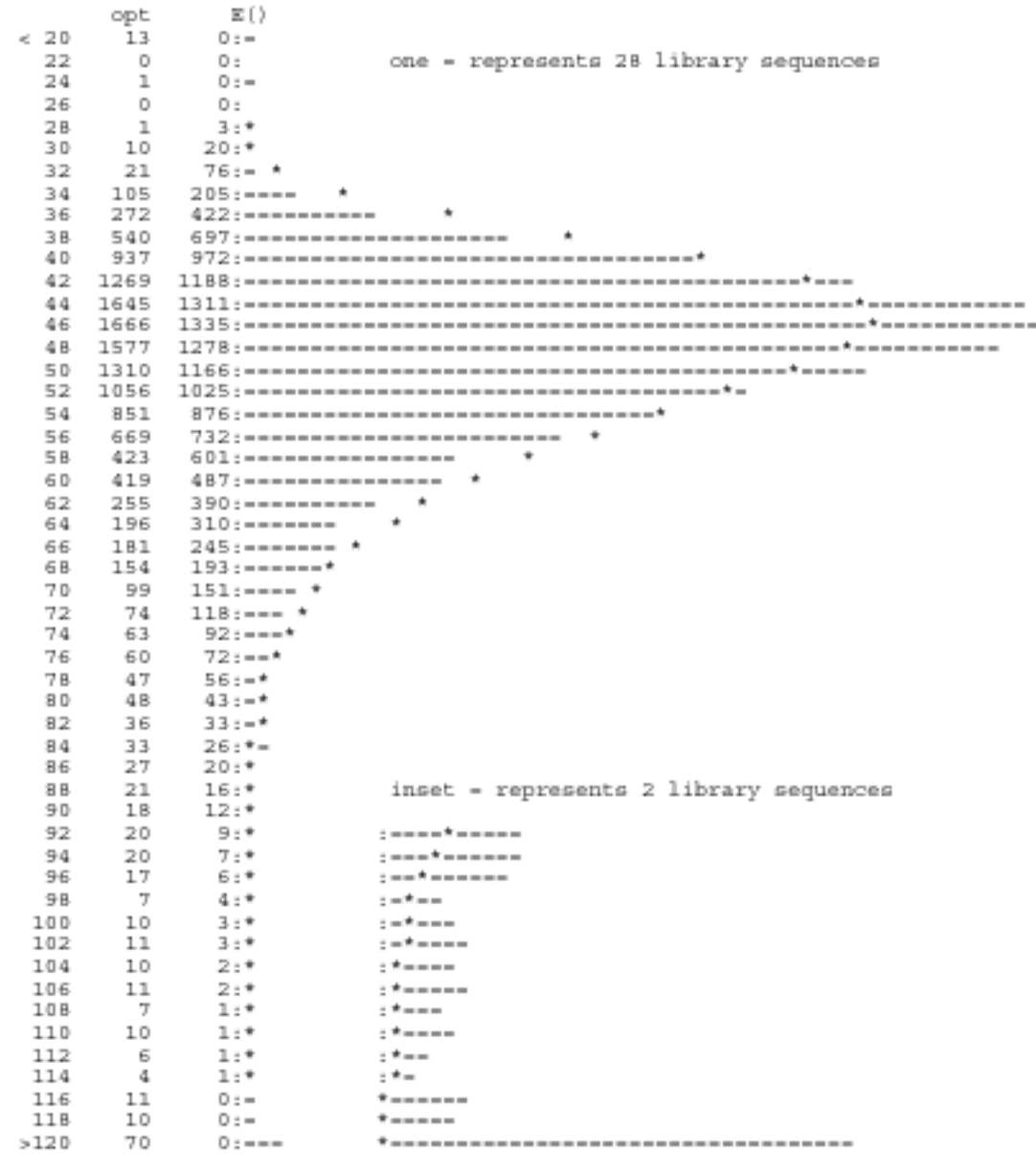
Evaluando la estadística



Mirar el histograma de scores esperados y observados

Mirar el E de la secuencia no relacionada con mayor score

Evaluando la estadística (cont)



Si los histogramas Obs vs Exp coinciden

Y si el E del mejor alineamiento no relacionado es ~1

La estimaciones estadísticas están funcionando bien

Buscando homólogos en los límites

- **Secuencias homólogas distantes a menudo no tienen similitud estadísticamente significativa**
- **Secuencias con regiones de baja complejidad pueden tener similitud estadísticamente significativas, aunque no sean homólogas**

- **Secuencias homólogas generalmente son similares sobre toda la longitud de la secuencia o de un dominio**

- **Secuencias homólogas comparten un ancestro común**
  - **Si hay homología entre A y B; entre B y C; y entre C y D, A y D deben ser homólogos, aun cuando no muestren similitud estadísticamente significativa**

Low complexity sequences

- **Secuencias (o sub-secuencias) con bajo contenido de información**
  - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  - CAACAACAACAACAACAACAA
- **Secuencias con sesgo en la composición de bases (nucleótidos) o residuos (aminoacidos)**
- **Por el bajo contenido de información y el sesgo en la composición, suelen dar falsos positivos en las búsquedas por similitud**
  - PolyQ: proteínas con tractos de polyglutamina no están relacionadas por ancestría
    - Ej OTX2 (Transcription factor); CREB-binding protein (connects proteins with different functions); MED15/GAL11 (Subunit of the RNA polymerase II mediator complex)

Low complexity sequences

```
                    /note= "Phosphoserine: {ECO:0000250|UniProtKB:P45481}."
ORIGIN
        1 maenlldgpp npkraklssp gfsandstdf gslfdlendl pdelipngge lgllnsgnlv
       61 pdaaskhkql sellrggsgs sinpgignvs asspvqqglg gqaqgqpnsa nmaslsamgk
      121 splsqgdssa pslpkqaast sgptpaasqa lnpqaqkqvg latsspatsq tgpgicmnan
      181 fnqthpglln snsghslinq asqgqaqvmn qslqaaqrqr qaqmpvptpa mqqasssvla
      241 etltqvspqm tghaglntaq aggma
      301 qsmvnslptf ptdikntsvt nvpnm
      361 llhahkcqrr eqangevrac slphc
      421 nctrhdcpvc lplknasdkr nqqti
      481 mqrayaalgl pymnqpqtql qpqvp
      541 qppnlisesa lptslgatnp lmndg
      601 rshlvhklvq aifptpdpaa lkdrr
      661 iqkeleekrr srlhkqgilg nqpal
      721 mnsfnpmslg nvqlpqapmg praaspmnhs vqmnsmgsvp gmaispsrmp qppnmmgaht
      781 nnmmaqapaq sqflpqnqfp sssgamsvgm gqppaqtgvs qgqvpgaalp nplnmlgpqa
      841 sqlpcppvtq splhptpppa staagmpslq httppgmtpp qpaaptqpst pvsssgqtpt
      901 ptpgsvpsat qtqstptvqa aaqaqvtpqp qtpvqppsva tpqssqqqpt pvhaqppgtp
      961 lsqaaasidn rvptpssvas aetnsqqpgp dvpvlemkte tqaedtepdp geskgeprse
     1021 mmeedlqgas qvkeetdiae qksepmevde kkpevkvevk eeeesssngt asqstspsqp
     1081 rkkifkpeel rqalmptlea lyrqdpeslp frqpvdpqll gipdyfdivk npmdlstikr
     1141 kldtgqyqep wqyvddvwlm fnnawlynrk tsrvykfcsk laevfeqeid pvmqslgycc
     1201 grkyefspqt lccygkqlct iprdaayysy qnryhfcekc fteiqgenvt lgddpsqpqt
     1261 tiskdqfekk kndtldpepf vdckecgrkm hqicvlhydi iwpsgfvcdn clkktgrprk
     1321 enkfsakrlq ttrlgnhled rvnkflrrqn hpeagevfvr vvassdktve vkpgmksrfv
     1381 dsgemsesfp yrtkalfafe eidgvdvcff gmhvqeygsd cpppntrrvy isyldsihff
     1441 rprclrtavy heiligyley vkklgyvtgh iwacppsegd dyifhchppd qkipkpkrlq
     1501 ewykkmldka faeriihdyk difkqatedr ltsakelpyf egdfwpnvle esikeleqee
     1561 eerkkeesta asettegsqg dsknakkknn kktnknkssi srankkkpsm pnvsndlsqk
     1621 lyatmekhke vffvihlhag pvintlppiv dpdpllscdl mdgrdafltl ardkhwefss
     1681 lrrskwstlc mlvelhtqgq drfvytcnec khhvetrwhc tvcedydlci ncyntkshah
     1741 kmvkwglgld degssqgepq skspqesrrl siqrciqslv hacqcrnanc slpscqkmkr
     1801 vvqhtkgckr ktnggcpvck qlialccyha khcqenkcpv pfclnikhkl rqqqiqhrlq
     1861 qaqlmrrrma tmntrnvpqq slpsptsapp gtptqqpstp qtpqppaqpq pspvsmspag
     1921 fpsvartqpp ttvstgkpts qvpappppaq pppaaveaar qiereaqqqq hlyrvninns
     1981 mppgrtgmgt pgsqmapvsl nvprpnqvsg pvmpsmppgq wqqaplpqqq pmpglprpvi
     2041 smqaqaavag prmpsvqppr sispsalqdl lrtlkspssp qqqqqvlnil ksnpqlmaaf
     2101 ikqrtakyva nqpgmqpqpg lqsqpgmqpq pgmhqqpslq nlnamqagvp rpgvppqqqa
     2161 mgglnpqgqa lnimnpghnp nmasmnpqyr emlrrqllqq qqqqqqqqqq qqqqqqgsag
     2221 maggmaghgq fqqpqgpggy ppamqqqqrm qqhlplqgss mgqmaaqmgq lgqmgqpglg
     2281 adstpnigqa lgqrilqqqq mkqqiqspqq pnpmspqqhm lsqqpqashl pqqqiatsls
```

```
ORIGIN
        1 mmsylkqppy avnglsltts gmdllhpsvg ypatprkqrr erttftraql dvlealfakt
       61 rypdifmree valkinlpes rvqvwfknrr akcrqqqqqq qnggqnkvrp akkksspare
      121 vssesgtsgq ftppsstsvp tiasssapvs iwspasispl sdplstsssc mqrsypmtyt
      181 qasgysqgya gstsyfggmd cgsyltpmhh qlpgpgatls pmgtnavtsh lnqspaslst
      241 qgygasslgf nsttdcldyk dqtaswklnf nadcldykdq tsswkfqvl
//
```

```
.19779198).

lmd intlnggssd tadkirihak nfeaalfaks
vta aaannnikpv eqhhinnlkn sgnsannmnv
qqq qqqqqqqqrr qltpqqqqlv nqmkvapipk
ltp qdmeaakevy kihqqllfka rlqqqqaqaq
mqp pnssannnpl qqqssqntvp nvlnqinqif
mte pvkqsfirky inqkalrkiq alrdvknnnn
nnn dtiatsatpn aaafsqqqna ssklyqmqqq
qaq aqaqaqaqaq aqaqaqaqaq aqaqaqaqaq
akd vevikqlsld asktnlrltd vtnslsneek
tkn enflkevfql rifvkeilek caegifvvkl
lrq qqqmannngn pgttstgnnn niatqqnmqq
qqq qqqqqqhiyp sstpgvanys amanapgnni
aat pslnktingk vngrtksnti pvtsipstnk
nps plktqtkngt pnpnnmktvq spmgaqpsyn
rfk hrqeifkdsp mdlfmstlgd clgikdeeml
ard qdsidisikd nklvmkskfn ksnrsysial
tss nmdvgnprkr kasvleispq dsiasvlspd
sek qevtneapfl tsgtsseqfn vwdwnnwtsa
```

Referencias

Bioinformatics. Sequence and Genome analysis. David W Mount, CSHL Press (2001)

Hugues Sicotte (NCBI). (slides DP)

Ignacio Ibarra, Francisco Melo. Sequence Alignment Teacher (SAT, Java). **http://melolab.org/sat**