Bioinformatika

8. juni 2018.

Sadržaj

1 Gde u genomu počinje replikacija genoma? 1
1.1 Uvod . . . 1
1.2 Replikacija genoma . . . 2
1.2.1 DNK . . . 2
1.2.2 Replikacija genoma u ćeliji . . . 3
1.2.3 Pronalaženje početnog regiona replikacije . . . 9
1.3 Zadaci sa vežbi . . . 13
1.3.1 FrequentWords . . . 13
1.3.2 Faster FrequentWords . . . 13
1.3.3 Skew Diagram . . . 15
1.3.4 FrequentWords With Mismatches . . . 15

2 Koji DNK šabloni igraju ulogu molekularnog sata? 19
2.1 Biološki problem . . . 19
2.2 Informatički problem . . . 21
2.3 Problem ubačenog motiva . . . 21
2.3.1 Enumeracija motiva . . . 22
2.3.2 Najsličniji k-grami u parovima niski . . . 23
2.3.3 Matrice motiva . . . 24
2.3.4 Problem niske medijane . . . 27
2.3.5 Probabilistički pristup . . . 28
2.3.6 Koji princip odabrati? . . . 35
2.4 Zadaci sa vežbi . . . 35
2.4.1 *MedianString* . . . 35
2.4.2 *GreedyMotifSearch* . . . 37
2.4.3 *RandomizedMotifSearch* . . . 40
2.4.4 *GibbsSampler* . . . 42

3 Kako složiti genomsku slagalicu od milion delova? 47
3.1 Šta je sekvenciranje genoma? . . . 47
3.1.1 Kratka istorija sekvenciranja genoma . . . 47
3.1.2 Sekvenciranje ličnih genoma . . . 48
3.2 Eksplozija u štampariji . . . 49
3.3 Problem sekvenciranja genoma . . . 50
3.4 Rekonstrukcija niske kao problem Hamiltonove putanje . . . 52
3.4.1 Genom kao putanja . . . 52
3.5 Rekonstrukcija niske kao Ojlerove putanje . . . 53
3.6 De Brojnovi grafovi na osnovu kolekcije k-grama . . . 54
3.7 Ojlerova teorema . . . 55
3.7.1 Dokaz Ojlerove teoreme . . . 55
3.8 Sastavljanje parova očitavanja . . . 57

3.8.1 DNK sekvenciranje sa parovima očitavanja . . . 57
3.9 U realnosti . . . 59
3.10 Zadaci sa vežbi . . . 61
3.10.1 Maximal Non Branching Path . . . 61
3.10.2 All Euler Cycles . . . 63
3.10.3 String Spelled By Gapped Patterns . . . 66

4 Kako sekvenciramo antibiotike? 69
4.1 Otkriće antibiotika . . . 69
4.2 Kako bakterije prave antibiotike? . . . 70
4.3 Sekvenciranje antibiotika razbijanjem na komade . . . 73
4.3.1 Sekvenciranje ciklopeptida grubom silom . . . 74
4.3.2 *Branch-and-Bound* algoritam za sekvenciranje ciklopeptida . . . 75
4.4 Prilagođavanje sekvenciranja za spektre sa greškama . . . 76
4.4.1 Testiranje na spektru tirocidina B1 . . . 78
4.5 Od 20 do više od 100 aminokiselina . . . 78
4.6 Spektralna konvolucija . . . 78
4.7 Spektri u realnosti . . . 80
4.8 Zadaci sa vežbi . . . 81
4.8.1 Linear Spectrum . . . 81
4.8.2 Cyclic Spectrum . . . 81
4.8.3 Cyclopeptide Sequencing . . . 82
4.8.4 Leaderboard Cyclopeptide Sequencing . . . 84

5 Kako poredimo biološke sekvence? 89
5.1 Biološki uvid u poređenje sekvenci . . . 89
5.2 Igra poravnanja i najduža zajednička podsekvenca . . . 89
5.2.1 Najduža zajednička podsekvenca . . . 90
5.3 Problem turiste na Menhetnu . . . 90
5.4 Problem kusura . . . 93
5.4.1 Pohlepni algoritam . . . 93
5.4.2 Rekurzivni algoritam . . . 94
5.4.3 Vraćanje kusura dinamičkim programiranjem . . . 95
5.5 Dinamičko programiranje i putokazi za povratak . . . 96
5.5.1 Rekurentna relacija dinamičkog programiranja kod Menhetn grafa . . . 98
5.6 Od Menhetna do grafa poravnanja . . . 98
5.6.1 Rekurentna relacija dinamičkog programiranja kod grafa poravnanja . . . 98
5.6.2 Računanje putokaza za povratak . . . 100
5.6.3 Određivanje najduže zajedničke podsekvence (LCS – longest common subsequence) korišćenjem putokaza za povratak . . . 101
5.6.4 Topološko sortiranje . . . 101
5.7 Od globalnog do lokalnog poravnanja . . . 102
5.7.1 Globalno poravnanje . . . 103
5.7.2 Lokalno poravnanje . . . 104
5.8 Kažnjavanje insercija i delecija u poravnanju sekvenci . . . 107
5.8.1 Kažnjavanje praznina . . . 107
5.8.2 Adekvatnije kazne za praznine . . . 107
5.8.3 Izgradnja Menhetn grafa sa afinim kaznama za praznine . . . 107
5.9 Prostorno efikasno poravnanje sekvenci . . . 109
5.9.1 Prostorna složenost . . . 111
5.9.2 Vremenska složenost . . . 112
5.10 Višestruko poravnanje sekvenci . . . 113
5.10.1 Od dvostrukog do višestrukog poravnanja . . . 113

5.10.2 Poravnanje tri A-domena . . . 114
5.10.3 Generalizacija dvostrukog na višestroko poravnanje . . . 114
5.10.4 Poravnanja = 3-D putanje . . . 115
5.10.5 2-D poravnanje u odnosu na 3-D poravnanje . . . 115
5.10.6 Rekurentna relacija dinamičkog programiranja za višestruko poravnanje . 116
5.10.7 Vremenska složenost dinamičkog algoritma za višestruko poravnanje . . . 116
5.10.8 Da li se višestruko poravnanje može izgraditi iz dvostrukog? . . . 116
5.10.9 Profilna reprezentacija višestrukog poravnanja . . . 117
5.10.10 Višestruko poravnanje: pohlepni pristup . . . 117
5.11 Zadaci sa vežbi . . . 118
5.11.1 Manhattan Tourist . . . 118
5.11.2 LCS Backtrack . . . 119
5.11.3 Global Alignment . . . 120
5.11.4 Local Alignment . . . 121
5.11.5 Edit Distance . . . 122

6 Postoje li osetljivi delovi u ljudskom genomu? 125
6.1 Transformacija čoveka u miša . . . 125
6.2 Sortiranje po promenama . . . 129
6.3 Teorema u prekidnoj tački . . . 132
6.4 Preuređivanje u multihromozomalnim genomima . . . 134
6.4.1 Translokacije, fuzije i fizije . . . 134
6.5 Problem rastojanja 2-prekida . . . 135
6.5.1 Od linearnih do cirkularnih hromozoma . . . 135
6.5.2 Rastojanje 2-prekida . . . 138
6.6 Grafovi prekidnih tačaka . . . 139
6.7 Teorema o rastojanju 2-prekida . . . 144
6.8 Zadaci sa vezbi . . . 147
6.8.1 ChromosomeToCycle . . . 147
6.8.2 CycleToChromosome . . . 147
6.8.3 GreedySorting . . . 148
6.8.4 ShortestRearrangementScenario . . . 149

7 Zašto naučnici i dalje nisu razvili vakcinu za HIV 153
7.1 Uvod . . . 153
7.1.1 Klasifikacija HIV fenotipa . . . 153
7.2 Pronalaženje CG ostrva . . . 154
7.3 Nepoštena kockarnica . . . 155
7.3.1 Kockanje sa Jakuzama . . . 155
7.3.2 Dva novčića u krupijeovom rukavu . . . 156
7.4 Skriveni Markovljevi modeli . . . 157
7.4.1 Od bacanja novčića do Skrivenog Markovljevog Modela . . . 157
7.4.2 HMM dijagrami . . . 157
7.5 Problem dekodiranja . . . 159
7.5.1 Viterbi graf . . . 159
7.5.2 Viterbi algoritam . . . 160
7.5.3 Brzina Viterbi algoritma . . . 160
7.6 Računanje najverovatnijeg ishoda HMM-a . . . 161
7.7 Profilni algoritmi za poravnjanje sekvenci . . . 162
7.7.1 Kako su HMM povezani za poravnjanje sekvenci? . . . 162
7.7.2 Građenje profilnog HMM-a . . . 165
7.8 Zadaci sa vežbi . . . 169
7.8.1 HMM . . . 169

Predgovor

Tekst se sastoji od proširenih beleški sa predavanja na osnovu knjige Pavel A. Pevzner, Phillip Compeau: Bioinformatics Algorithms: An Active Learning Approach.
Tekst su sastavili studenti sa kursa održanog u školskoj 2017/2018 godini:

- Una Stanković 1095/2016
- Marina Nikolić 1055/2017
- Strahinja Milojević 1049/2017
- Anja Bukurov 1082/2016
- Nikola Ajzenhamer 1083/2016
- Vojislav Stanković 1080/2016
- Milica Đurić 1084/2016
- Ana Stanković 1096/2016
- Aleksandra Branković 1057/2017
- Ljubica Aćimović 1027/2016
- Jasmina Vasilijević 1067/2017
- Anđela Mijailović 1050/2017
- Milena Dukanac 1020/2017

Glava 1

Gde u genomu počinje replikacija genoma?

1.1 Uvod

Na samom početku, želimo da definišemo pojam bioinformatike i da pokušamo da shvatimo koji je njen osnovni cilj. Da bismo to postigli, pogledajmo tri definicije, iz različitih izvora:

- "Bioinformatika je nauka koja se bavi prikupljanjem i analizom kompleksnih bioloških podataka poput genetskih kodova." - Oksfordski rečnik (engl. *Oxford Dictionary*)
- "Bioinformatika predstavlja prikupljanje, klasifikaciju, čuvanje i analizu biohemijskih i bioloških informacija korišćenjem računara, a posebno se primenjuje u molekularnoj genetici i genomici." - Rečnik Meriam-Vebster (engl. *Merriam-Webster Dictionary*)
- "Bioinformatika je interdisciplinarno polje koje radi na razvoju metoda i softverskih alata za razumevanje bioloških podataka." - Vikipedija (engl. *Wikipedia*)

Na osnovu ove tri definicije možemo zaključiti da:
Bioinformatika predstavlja primenu računarskih tehnologija u istraživanjima u oblasti biologije i srodnih nauka.

Bioinformatika ima široku primenu i njene primene rastu zajedno sa razvojem discipline. Kao što možemo videti na slici ispod, primena bioinformatike se može sagledati kroz personalizovanu medicinu. Naime, na osnovu prikupljene veće količine podataka i njihove analize, uz pomoć različitih računarskih metoda, na primer metoda veštačke inteligencije, možemo doći do informacija potrebnih da na najbolji način lečimo pacijenta ili mu odredimo terapiju koja će mu na najbolji, najbrži i najbezbolniji način pomoći da prevaziđe određene zdravstvene probleme.

Bioinformatika je spoj više različitih disciplina, kao što su:

- Statistika
- Istraživanje podataka
- Računarstvo
- Računarska biologija
- Biologija
- Biostatistika

Prikaz preklapanja ovih disciplina možemo videti na slici 1.2.

Slika 1.1: Primena bioinformatike

1.2 Replikacija genoma

1.2.1 DNK

Dezoksiribonukleinska kiselina (akronimi DNK ili DNA, od engl. *deoxyribonucleic acid*), nukleinska kiselina koja sadrži uputstva za razvoj i pravilno funkcionisanje svih živih organizama. Zajedno sa RNK i proteinima, DNK je jedan od tri glavna tipa makromolekula koji su esencijalni za sve poznate forme života.

Sva živa bića svoj genetički materijal nose u obliku DNK, sa izuzetkom nekih virusa koji imaju ribonukleinsku kiselinu (RNK). DNK ima veoma važnu ulogu ne samo u prenosu genetičkih informacija sa jedne na drugu generaciju, već sadrži i uputstva za građenje neophodnih ćelijskih organela, proteina i RNK molekula. DNK segment koji sadrži ova važna uputstva se naziva gen.

DNK se sastoji iz dva polimerna lanca koji imaju antiparalelnu orijentaciju, i svaki od njih je sastavljen od azotnih baza:

- adenin (A)
- timin (T)
- guanin (G)
- citozin (C)

Lanci DNK su međusobno spojeni i to tako da se veze uspostavljaju isključivo između adenina i citozina ili između guanina i timina. Na osnovu toga, ako nam je poznat sastav jednog lanca, lako možemo zaključiti i sastav drugog lanca, zbog čega se kaže da su DNK lanci **međusobno komplementarni**.

Da bismo lakše manipulisali sa informacijama koje DNK nosi i približili sadržaj računarskoj struci, DNK ćemo posmatrati kao nisku nad azbukom A, C, G, T.

Slika 1.2: Preklapanjem različitih disciplina dobijamo bioinformatiku.

1.2.2 Replikacija genoma u ćeliji

Replikacija genoma je jedan od najvažnijih zadataka ćelije. Pre nego što se podeli, ćelija mora da najpre replicira svoj genom, tako da svaka od ćerki ćelija dobije svoju kopiju.

Dzejms Votson (engl. *James Watson*) i Fransis Krik (engl. *Fransis Crick*) su 1953. godine napisali rad u kome su primetili da postoji mehanizam za kopiranje genetskog materijala. Oni su uočili da se lanci roditeljskog DNK molekula odvijaju tokom replikacije i da se, potom, svaki lanac ponaša kao uzorak za sintezu novog lanca (na osnovu toga što se uvek spajaju iste aminokiseline A-C i G-T, rekreiranje lanca je moguće). Kao rezultat ovakvog ponašanja, proces replikacije počinje parom komplementarnih lanca i završava se sa dva para komplementarnih lanaca, kao što se može videti na slici ispod.

Replikacija počinje u regionu genoma koji se naziva **početni region replikacije** (skraćeno *oriC*), izvode je enzimi koje se nazivaju DNK polimeraze, koje predstavljaju mašine za kopiranje na molekularnom nivou.

Nalaženje početnog regiona replikacije predstavlja veoma važan problem, ne samo za razumevanje funkcionisanja kako se ćelije repliciraju, već je koristan i u raznim biomedicinskim problemima. Na primer, neki metodi genskih terapija uključuju genetski izmenjene mini genome, koji se zovu virusni vektori, zbog svoje sposobnosti da prodru kroz ćelijski zid (poput pravih virusa). Virusni vektori u sebi nose veštačke gene koji unapredjuju postojeći genom. Genska terapija je prvi put uspešno izvršena 1990. godine na devojčici koja je bila toliko otporna na infekcije da je bila primorana da živi isključivo u sterilnom okruženju.

Osnovna ideja genske terapije je da se pacijent, koji pati od nedostatka nekog bitnog gena, zarazi viralnim vektorom koji sadrži veštački gen koji enkodira terapeutski protein. Jednom kad

Slika 1.3: Prikaz DNK, slika preuzeta sa https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/dna

je unutar ćelije, vektor se replicira, što dovodi do lečenja bolesti pacijenta. Da bi moglo da dodje do ovoga, biolozima je neophodno da znaju gde je *oriC*.

Kako ćelija prepoznaje *oriC*?

Pitamo se kako ćelija prepoznaje oriC? Sigurno je da postoji neka niska aminokiselina koja označava oriC, ali kako ga prepoznati?

Ograničimo se na bakterijski genom, koji se sastoji od jednog kružnog hromozoma. Istraživanje je pokazalo da je region, koji predstavlja oriC kod bakterija, dug svega nekoliko stotina nukleotida.

Poznato je da DNKA utiče na početak replikacije. *DNKA* je protein koji se vezuje na kratki segment unutar oriC, poznatiji kao **DNKA boks**. Ona predstavlja poruku unutar sekvence DNK koja govori proteinu DNKA da se veže baš tu. Postavlja se pitanje kao pronaći taj region bez prethodnog poznavanja izgleda DNKA boks?

Da bismo bolje razumeli *problem skrivene poruke* uzmimo za primer priču Edgara Alana Poa - "Zlatni jelenak" (engl. "*The Gold-Bug*"). Naime, u toj priči jedan od likova, Vilijam Legrand (engl. *William Legrand*), treba da dešifruje poruku :

```
53++!305))6*;4826)4+.)4+);806*;48!8‘6 0))85;]8*:+*8!83(88)5*!;46(;88*96*?;8
)*+(;485);5*!2:*+(;4956*2(5*4)8‘8*;40 69285);)6!8)4++;1(+9;48081;8:8+1;48!8 5;4)
485!528806*81(+9;48;(88;4(+?34;48 )4+;161;:188;+?;
```

On uočava da se ";48" pojavljuje veoma često, i da verovatno predstavlja "THE", najčešću reč u engleskom jeziku. Znajući to, zamenjuje karaktere odgovarajućim slovima i postepeno dešifruje celu poruku.

Slika 1.4: Prikaz replikacije

Slika 1.5: Prikaz početka replikacije kod bakterija

```
53++!305))6*THE26)H+.)H+)806*THE !E‘60))E5;]E*:+*E!E3(EE)5*!TH6(T EE*96*?;E)*+
(THE5)T5*!2:*+(TH956 *2(5*H)E‘E*TH0692E5)T)6!E)H++T1( +9THE0E1TE:E+1
THE!E5T4)HE5!52880 6*E1(+9THET(EETH(+?34THE)H+T161T :1EET+?T
```

Želeli bismo da ovaj princip primenimo na naš problem nalaska *oriC*-a. Ideja je da uvidimo da li postoje reči koje se neuobičajeno često pojavljuju. Uvedimo termin k-gram da označimo string dužine k i COUNT(Text, Pattern) da označimo broj puta kojih se k-gram *Pattern* pojavio u tekstu *Text*. Osnovna ideja je da pomeramo prozor, iste dužine kao k-gram *Pattern*, niz tekst, usput proveravajući da li se pojavljuje *Pattern* u nekome od njih.

```
PATTERNCOUNT(Text, Pattern)
    count = 0
    for i = 0 to |Text| - |Pattern|
        if Text(i,|Pattern|) = Pattern
            count = count + 1
    return count
```

Za neki *Pattern* kažemo da je on *najčešći k-gram* u tekstu *Text*, ako je njegov *COUNT* najveći među svim k-gramima. Na primer, **ACTAT** je najčešći 5-gram u tekstu *Text* = ACA**ACTAT**GCA**ACTAT**CGGGACA**ACTAT**CCT, a **ATA** je najčešći 3-gram u *Text* = CG**ATATA**TCC**ATA**G.

Sada, problem pronalaska čestih reči možemo posmatrati kao računarski problem:

Problem čestih reči: Pronaći najčešće k-grame u niski karaktera.
Ulaz: Niska Text i ceo broj k.
Izlaz: Svi najčešći k-grami u niski Text.

Osnovni algoritam za pronalazak čestih k-grama u stringu *Text* proverava sve k-grame koji se pojavljuju u tom stringu (takvih k-grama ima $|Text| - k + 1$) i potom izračunava koliko puta se svaki k-gram pojavljuje. Da bismo implementirali ovaj algoritam, moramo da izgenerišemo niz *COUNT*, gde je $COUNT(i) = COUNT(Text, Pattern)$ za $Pattern = Text(i, k)$.

```
FrequentWords(Text, k)
    FrequentPatterns <- an empty set
    for i = 0 to |Text| - k
        Pattern <- the k-mer Text(i,k)
        COUNT(i) <- PatternCount(Text, Pattern)
    maxCount <- max value in array COUNT
    for i = 0 to |Text| - k
        if COUNT(i) = maxCount
            add Text(i,k) to FrequentPatterns
    remove duplicates from FrequentPatterns
    return FrequentPatterns
```

Pitamo se, sada, kolika je složenost ovakvog pristupa?
Ovaj algoritam, iako uspešno nalazi ono što se od njega traži, nije najefikasniji. S obzirom na to da svaki k-gram zahteva $|Text| - k + 1$ provera, svaki od njih zahteva i do k poređenja, pa je broj koraka izvršavanja funkcije $PatternCount(Text, Pattern)$ zapravo $(|Text| - k + 1) * k$. Osim toga, $FrequentWords$ mora pozvati $PatternCount$ $|Text| - k + 1$ puta (po jednom za svaki k-gram teksta), tako da je ukupan broj koraka $(|Text| - k + 1) * (|Text| - k + 1) * k$.
Iz navedenog, možemo zaključiti da je ukupna cena izvršavanja algoritma $FrequentWords$ $O(|Text|^2 * k)$.

Primer: Pronalazak čestih reči kod bakterije *Vibrio cholerae*

Posmatrajmo, najpre, tablicu najčešćih k-grama u *oriC* regionu bakterije *Vibrio cholerae*. Da li nam se čini da se neki k-grami pojavljuju neuobičajeno često?

Na primer, 9-gram **ATGATCAAG** se pojavljuje tri puta u *oriC* regionu, da li nas to iznenađuje?

Označili smo najčešće 9-grame, umesto nekih drugih k-grama, jer je eksperimentima pokazano da su DNKA boksovi kod bakterija dugi 9 nukleotida. Uočimo da postoje četiri različita 9-grama koji se ponavljaju tri ili više puta u ovom regionu, to su: ATGATCAAG, CTTGATCAT, TCTTGATCA i CTCTTGATC.

Slika 1.6: Tablica najčešćih k-grama u *oriC* regionu bakterije Vibrio cholerae

k	3	4	5	6	7	8	9
count	25	12	8	8	5	4	3
k-mers	tga	atga	gatca	tgatca	atgatca	atgatcaa	atgatcaag
			tgatc				cttgatcat
							tcttgatca
							ctcttgatc

Slika 1.7: Prikaz 9-grama ATGATCAAG i njegovog komplementa u *oriC* regionu Vibrio cholerae

```
atcaatgatcaacgtaagcttctaagcATGATCAAGgtgctcacacagtttatccacaacctgagtgg
atgacatcaagataggtcgttgtatctccttcctctcgtactctcatgaccacggaaagATGATCAAG
agaggatgatttcttggccatatcgcaatgaatacttgtgacttgtgcttccaattgacatcttcagc
gccatattgcgctggccaaggtgacggagcgggattacgaaagcatgatcatggctgttgttctgttt
atcttgttttgactgagacttgttaggatagacggtttttcatcactgactagccaaagccttactct
gcctgacatcgaccgtaaattgataatgaatttacatgcttccgcgacgatttacctCTTGATCATcg
atccgattgaagatcttcaattgttaattctcttgcctcgactcatagccatgatgagctCTTGATCA
TgtttccttaaccctctattttttacggaagaATGATCAAGctgctgctCTTGATCATcgtttc
```

Mala verovatnoća da se neki 9-gram toliko puta pojavi u *oriC*-u kolere, govori nam da neki od četiri 9-grama koje smo pronašli može biti potencijalni DNKA boks, koji započinje replikaciju. Ali, koji?

Podsetimo se da nukleotidi A i T, kao i C i G, su komplementarni. Ako imamo jednu stranu lanca DNK i neke slobodne nukleotide, možemo lako zamisliti sintezu komplementarnog lanca, kao što se vidi na slici ispod.

Posmatrajmo ponovo sliku 1.7. Na njoj možemo uočiti 6 pojavljivanja niski ATGATCAAG i CTTGATCAT, koji su zapravo komplementarni. Naći 9-gram koji se pojavljuje 6 puta u DNK nisci dužine 500 nukleotida, je još više iznenadjujuće, nego pronaći 9-gram koji se pojavljuje tri puta. Ovo posmatranje nas dovodi do toga da je ATGATCAAG (zajedno sa svojim komplementom) zaista DNKA boks Vibrio cholerae. Ovaj zaključak ima i smisla biološki, jer DNKA proteinu, koji se vezuje i započinje replikaciju, nije bitno za koji od dva lanca se vezuje.

Primer: Pronalazak čestih reči kod bakterije *Thermotoga petrophila*

Nakon što smo pronašli skrivenu poruku za Vibrio cholerae, ne bi trebalo da odmah zaključimo da je ta poruka ista kod svih bakterija. Najpre bi trebalo da proverimo da li se ona nalazi u *oriC* regionu drugih bakterija, možda različite bakterije, imaju drugačije DNKA boksove. Uzmimo, za primer, *oriC* region bakterije Thermotoga petrophila. Ona predstavlja bakteriju koja obitava u izrazito toplim regionima, na primer u vodi ispod rezervi nafte, gde temperature prelaze 80 stepeni Celzijusa. Pogledajmo kako izgleda *oriC* region ove bakterije.

Možemo lako uočiti da se u ovom regionu nigde ne javljaju niske ATGATCAAG ili CTTGATCAT, iz čega zaključujemo da različite bakterije mogu koristiti različite DNKA boksove, kako bi pružile skrivenu poruku DNKA proteinu. Odnosno, za različite genome imamo različite DNKA boksove.

Slika 1.8: Komplementarni lanci se "kreću" u suprotnim smerovima.

Slika 1.9: Prikaz *oriC* regiona Thermotoga petrophila

```
aactctatacctccttttgtcgaatttgtgtgatttatagagaaaatcttattaactgaaactaa
aatggtaggtttggtggtaggttttgtgtacattttgtagtatctgatttttaattacataccgta
tattgtattaaattgacgaacaattgcatggaattgaatatatgcaaaacaaacctaccaccaaac
tctgtattgaccattttaggacaacttcagggtggtaggtttctgaagctctcatcaatagactat
tttagtctttacaaacaatattaccgttcagattcaagattctacaacgctgttttaatgggcgtt
gcagaaaacttaccacctaaaatccagtatccaagccgatttcagagaaacctaccacttacctac
cacttacctaccacccgggtggtaagttgcagacattattaaaaacctcatcagaagcttgttcaa
aaatttcaatactcgaaacctaccacctgcgtcccctattatttactactactaataatagcagta
taattgatctgaaaagaggtggtaaaaaa
```

Najčešće reči u ovom *oriC* su:

- AACCTACCA,
- ACCTACCAC,
- GGTAGGTTT,
- TGGTAGGTT,
- AAACCTACC,
- CCTACCACC

Pomoću alata koji se zove Ori-Finder, nalazimo CCTACCACC i njegov komplement GGTGGTAGG kao potencijalne DNKA boksove naše bakterije. Ove dve niske se pojavljuju ukupno 5 puta.

Naučili smo da pronađemo skrivene poruke ako je *oriC* dat, ali ne znamo da pronađemo *oriC* u genomu.

Slika 1.10: Prikaz CCTACCACC i njenog komplementa u *oriC* regionu Thermotoga petrophila

```
aactctatacctccttttgtcgaatttgtgtgatttatagagaaaatcttattaactgaaactaa
aatggtaggtttGGTGGTAGGttttgtgtacattttgtagtatctgatttttaattacataccgta
tattgtattaaattgacgaacaattgcatggaattgaatatatgcaaaacaaaCCTACCACCaaac
tctgtattgaccattttaggacaacttcagGGTGGTAGGtttctgaagctctcatcaatagactat
tttagtctttacaaacaatattaccgttcagattcaagattctacaacgctgttttaatgggcgtt
gcagaaaacttaccacctaaaatccagtatccaagccgatttcagagaaacctaccacttacctac
cacttaCCTACCACCcgggtggtaagttgcagacattattaaaaacctcatcagaagcttgttcaa
aaatttcaatactcgaaaCCTACCACCtgcgtcccctattatttactactactaataatagcagta
taattgatctgaaaagaggtggtaaaaaa
```

1.2.3 Pronalaženje početnog regiona replikacije

Zamislimo da pokušavamo da nađemo *oriC* u novom sekvenciranom genomu bakterije. Ako bismo tražili niske poput ATGATCAAG/CTTGATCAT ili CCTACCACC/GGTGGTAGG to nam verovatno ne bi bilo puno od pomoći, jer novi genom može koristiti potpuno drugačiju skrivenu poruku. Posmatrajmo, zato, drugačiji problem: umesto da tražimo grupe određenog k-grama, pokušajmo da nađemo svaki k-gram koji formira grupu u genomu. Nadajmo se da će nam lokacije ovih grupa u genomu pomoći da odredimo lokaciju *oriC*-a.
Ideja je da pomeramo prozor fiksirane dužine L kroz genom, tražeći region u kome se k-gram pojavljuje više puta uzastopno. Za L ćemo uzeti vrednost 500, koja predstavlja najčešću dužinu *oriC*-a kod bakterija.

Definisali smo k-gram kao *grupu*, ako se pojavljuje više puta unutar kratkog intervala u genomu. Formalno, k-gram *Pattern* formira (L, t) grupu unutar niske *Genome* ako postoji interval genoma, dužine L, u kome se k-gram pojavljuje barem t puta.

Problem pronalaženja grupa. Naći k-grame koji formiraju grupe unutar niske karaktera.
Ulaz: Niska Genome i celi brojevi k (dužina podniske), L (dužina prozora) i t (broj podniski u grupi).
Izlaz: Svi k-grami koji formiraju (L, t)-grupe u niski Genome.

U genomu bakterije E.coli postoji 1904 različitih 9- grama koji formiraju $(500, 3)$-grupe. Koji od njih ukazuje na početni region replikacije?

Iskrivljeni dijagrami

S obzirom na to da imamo veliku količinu statističkih podataka, pitamo se kako ih možemo upotrebiti da bismo došli do lokacije *oriC*-a? U tome nam mogu pomoći **iskrivljeni dijagrami**(engl. *skew diagram*). Osnovna ideja je da prođemo kroz genom i da računamo razliku između količine guanina(G) i citozina(C). Ako ova razlika raste, onda možemo pretpostaviti da se krećemo niz polulanac koji ide na desno (u nastavku samo polulanac, smer $5' -> 3'$), a ako razlika počne da se smanjuje, onda pretpostavljamo da smo na obrnutom polulancu $(3' -> 5')$. Zbog procesa koji se naziva deaminacija (gubljenje aminokiselina), svaki polulanac ima manjak citozina u poređenju sa guaninom, a svaki obrnuti polulanac ima manjak guanina u odnosu na citozin.

Posmatrajmo iskrivljeni dijagram bakterije Ešerihija Koli. Lako uočavamo minimalnu vrednost skew dijagrama.

Minimalna vrednost iz iskrivljenog dijagrama ukazuje baš na ovaj region:

Slika 1.11: Prikaz kretanja.

Slika 1.12: Iskrivljeni dijagram genoma Genome = CATGGGCATCGGCCATACGCC.

Slika 1.14: Region na koji pokazuje minimalna vrednost iskrivljenog dijagrama Ešerihije koli.

```
aatgatgatgacgtcaaaaggatccggataaaacatggtgattgcctcgcataacgcggta
tgaaaatggattgaagcccgggccgtggattctactcaactttgtcggcttgagaaagacc
tgggatcctgggtattaaaaagaagatctatttatttagagatctgttctattgtgatctc
ttattaggatcgcactgccctgtggataacaaggatccggcttttaagatcaacaacctgg
aaaggatcattaactgtgaatgatcggtgatcctggaccgtataagctgggatcagaatga
ggggttatacacaactcaaaaactgaacaacagttgttctttggataactaccggttgatc
caagcttcctgacagagttatccacagtagatcgcacgatctgtatacttatttgagtaaa
ttaacccacgatcccagccattcttctgccggatcttccggaatgtcgtgatcaagaatgt
tgatcttcagtg
```

Uočimo da u ovom regionu nema čestih 9-grama (koji se pojavljuju 3 ili više puta). Iz toga zaključujemo da, iako smo uspeli da nađemo *oriC* bakterije Ešerihija koli, nismo uspeli da nađemo

Slika 1.13: Iskrivljeni dijagram Ešerihije koli.

DNKA boksove. Međutim, pre nego što odustanemo od potrage, osmotrimo još jednom *oriC* Vibrio colerae, kako bismo pokušali da nađemo način da izmenimo naš algoritam i uspemo da lociramo DNKA boksove u Ešerihiji koli. Veoma brzo, može se uvideti da osim tri pojavljivanja ATGATCAAG i tri pojavljivanja CTTGATCAT, *oriC* Vibrio cholerae sadrži i dodatna pojavljivanja ATGATCAAC i CATGATCAT koji se razlikuju samo u jednom nukleotidu od gornjih niski. Ovo još više povećava šanse da smo naišli na prave DNKA boksove, a ima i biološkog smisla. Naime, DNKA se može vezati i za nesavršene DNKA boksove, one koji se razlikuju u nekoliko nukleotida.

Slika 1.15: Prikaz pojavljivanja nesavršenih niski nukleotida.

```
atcaATGATCAACgtaagcttctaagcATGATCAAGgtgctcacacagtttatccacaac
ctgagtggatgacatcaagataggtcgttgtatctccttcctctcgtactctcatgacca
cggaaagATGATCAAGagaggatgatttcttggccatatcgcaatgaatacttgtgactt
gtgcttccaattgacatcttcagcgccatattgcgctggccaaggtgacggagcgggatt
acgaaagCATGATCATggctgttgttctgtttatcttgttttgactgagacttgttagga
tagacggtttttcatcactgactagccaaagccttactctgcctgacatcgaccgtaaat
tgataatgaatttacatgcttccgcgacgatttacctCTTGATCATcgatccgattgaag
atcttcaattgttaattctcttgcctcgactcatagccatgatgagctCTTGATCATgtt
tccttaaccctctattttttacggaagaATGATCAAGctgctgctCTTGATCATcgtttc
```

Cilj nam je da sada izmenimo algoritam čestih reči (*FrequentWords*) tako da možemo da pronađemo DNKA boksove koji su predstavljeni čestim k-gramima, sa mogućim izmenama na pojedinim nukleotidima. Ovaj problem nazvaćemo problem čestih reči sa propustima.

Problem čestih reči sa propustima. Pronaći najčešće k-grame sa propustima u niski karaktera.
Ulaz: Niska Text i celi brojevi k i d.
Izlaz: Svi najčešći k-grami sa najviše d propusta u niski Text.

Pokušajmo, još jednom, sa pronalaskom DNKA boksova kod Ešerihije koli, tako što ćemo naći najčešće 9-grame sa propustima i komplementima u regionu *oriC* koji nam je predložen minimalnom vrednošću iskrivljenog dijagrama. Pokušaćemo sa malim prozorom koji ili počinje ili se završava ili je centriran na poziciji najmanje iskrivljenosti. Ovakvim izvođenjem pronalazimo TTATCCACA/TGTGGATAA kao najčešći 9-gram. Međutim, ovo nije jedini 9-gram. Za ostale 9-grame još uvek ne znamo čemu služe, ali znamo da nose skrivene informacije, da se grupišu unutar genoma i da većina njih nema veze sa replikacijom.

Slika 1.16: Prikaz pronađenih niski sa propustima i komplementima u *oriC* regionu Ešerihije koli.

```
aatgatgatgacgtcaaaaggatccggataaaacatggtgattgcctcgcataacgcgg
tatgaaaatggattgaagcccgggccgtggattctactcaactttgtcggcttgagaaa
gacctgggatcctgggtattaaaaagaagatctatttatttagagatctgttctattgt
gatctcttattaggatcgcactgcccTGTGGATAAcaaggatccggcttttaagatcaa
caacctggaaaggatcattaactgtgaatgatcggtgatcctggaccgtataagctggg
atcagaatgaggggTTATACACAactcaaaaactgaacaacagttgttcTTTGGATAAC
taccggttgatccaagcttcctgacagagTTATCCACAgtagatcgcacgatctgtata
cttatttgagtaaattaacccacgatcccagccattcttctgccggatcttccggaatg
tcgtgatcaagaatgttgatcttcagtg
```

1.3 Zadaci sa vežbi

U nastavku će biti predstavljeni zadaci sa vežbi na kursu rađeni u programskom jeziku Python.

1.3.1 FrequentWords

```
#frequent_words
def pattern_count(text, pattern):
    count = 0
    k = len(pattern)
    for i in range(len(text) - k):
        if text[i:i+k] == pattern:
            count += 1
    return count

def frequent_words(text, k, min_count):
    frequent_patterns = set([])
    count = []
    n = len(text)-k
    for i in range(n):
        # Izvuci podnisku koji pocinje na $i$-toj poziciji i ima $k$ karaktera
        pattern = text[i:i+k]
        count.append(pattern_count(text, pattern))
    max_count = max(count)
    if max_count < min_count:
        return []
    for i in range(n):
        if count[i] == max_count:
            frequent_patterns.add(text[i:i+k])
    return frequent_patterns

def main():
    print(frequent_words('agctagatgctagctagctgatcgagctgatgcaggcagtgctagc', 4,
    ↪ 2))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

1.3.2 Faster FrequentWords

```
#faster frequent_words
def pattern_to_number(pattern):
    if len(pattern) == 0:
        return 0
    last = pattern[-1]
    prefix = pattern[:-1]
    return 4 * pattern_to_number(prefix) + symbol_to_number(last)

def number_to_pattern(n, k):
    if k == 1:
        return number_to_symbol(n)
    prefixIndex = n // 4 #celobrojno deljenje
    r = n  %  4
```

```
    symbol = number_to_symbol(r)
    prefix  = number_to_pattern(prefixIndex, k-1)
    return prefix + symbol

def symbol_to_number(c):
    pairs = {
        'a' : 0,
        't' : 1,
        'c' : 2,
        'g' : 3
    }
    return pairs[c]

def number_to_symbol(n):
    pairs = {
        0 : 'a',
        1 : 't',
        2 : 'c',
        3 : 'g'
    }
    return pairs[n]

def pattern_count(text, pattern):
    count = 0
    k = len(pattern)
    for i in range(len(text) - k):
        if text[i:i+k] == pattern:
            count += 1
    return count

def computing_frequencies(text,k):
    frequency_array = [0 for i in range(4**k)] #4 ^ k
    for i in range(len(text) - k):
        pattern = text[i:i+k]
        j = pattern_to_number(pattern)
        frequency_array[j] += 1
    return frequency_array

def faster_frequent_words(text, k, min_count):
    frequent_patterns = set([])
    frequency_array = computing_frequencies(text, k)
    max_count = max(frequency_array)
    if max_count < min_count:
        return []
    for i in range(4**k):
        if frequency_array[i] == max_count:
            pattern = number_to_pattern(i, k)
            frequent_patterns.add(pattern)
    return frequent_patterns

def main():
    print(faster_frequent_words('agctagatgctagctagctgatcgagctgatgcaggcagtgctagc
    ↪ ', 4, 2))
```

```
    #print(number_to_pattern(pattern_to_number('ta'),2))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

1.3.3 Skew Diagram

```
#GC-skew
import matplotlib.pyplot as plt

def draw_skew(skew):
    x = [i for i in range(len(skew))]
    ax = plt.subplot()
    ax.plot(x, skew)
    plt.show()

def calculate_skew(text):
    skew = [0 for c in text]
    last = 0
    for i in range(0, len(text)):
        if text[i] == 'g':
            skew[i] = last + 1
        elif text[i] == 'c':
            skew[i] = last - 1
        else:
            skew[i] = last
        last = skew[i]
    return skew


def main():
    text = "catgggcatcggccatacgcc"
    print(calculate_skew(text))
    draw_skew(calculate_skew(text))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

1.3.4 FrequentWords With Mismatches

```
# Prevodjenje nukleotida u brojeve
def symbol_to_number(c):
    pairs = {
        'a' : 0,
        't' : 1,
        'c' : 2,
        'g' : 3
    }

    return pairs[c]

# Prevodjenje nukleotida u brojeve
def number_to_symbol(n):
    pairs = {
```

```
        0 : 'a',
        1 : 't',
        2 : 'c',
        3 : 'g'
    }

    return pairs[n]

# Prevodjenje broja u odgovarajucu nukleotidnu sekvencu
def number_to_pattern(n, k):
    if k == 1:
        return number_to_symbol(n)

    prefix_index = n // 4
    r = n %  4
    c = number_to_symbol(r)
    prefix_pattern = number_to_pattern(prefix_index, k - 1)

    return prefix_pattern + c



# Prevodjenje nukleotidne sekvence u odgovarajuci broj
def pattern_to_number(pattern):
    if len(pattern) == 0:
        return 0

    last = pattern[-1:]
    prefix = pattern[:-1]

    return 4 * pattern_to_number(prefix) + symbol_to_number(last)



# Hamingova distanca, broj pozicija karaktera na kojima se tekstovi 1 i 2 razlikuju,
# podrazumeva se da je duzina obe niske jednaka
def hamming_distance(text1, text2):
    distance = 0

    for i in range(len(text1)):
        if text1[i] != text2[i]:
            distance += 1

    return distance



# Brojanje pojavljivanja podsekvenci u tekstu koje se od uzorka razlikuju na najvise d pozicija
def approximate_pattern_count(text, pattern, d):
    count = 0

```

```
    for i in range(len(text) - len(pattern)):
        pattern_p = text[i:i+len(pattern)]

        if hamming_distance(pattern, pattern_p) <= d:
            count += 1

    return count


# Pronalazenje svih niski susednih zadatom uzorku sa razlikama na najvise d pozicija
def neighbors(pattern, d):
    if d == 0: # Ako je dozvoljena greska jednaka nuli onda je samo uzorak svoj sused bez gresaka
        return set([pattern])

    # Izlaz iz rekurzije:
    if len(pattern) == 1: # Ako je duzina uzorka jednaka 1, a dozvoljena greska je veca od nule, onda je moguce iskoristiti bilo koji karakter
        return set(['a', 't', 'c', 'g'])

    neighborhood = set([])

    suffix_neighbors = neighbors(pattern[1:], d) # Pronalaze se svi susedi duzine n-1

    for text in suffix_neighbors:
        if hamming_distance(pattern[1:], text) < d: # Ako se sused razlikuje na manje od d pozicija od podniske uzorka bez prvog karaktera
            for x in ['a','t','c','g']:
                neighborhood.add(x + text) # Moguce je dodati bilo koji karakter na pocetak suseda i time dobiti najvise d razlika
        else: # U suprotnom, sused se vec razlikuje na d pozicija od uzorka pa je dozvoljeno samo dodavanje ispravnog karaktera kako se
            neighborhood.add(pattern[0] + text) # razlika ne bi povecala preko d

    return neighborhood



def frequent_words_with_mismatches(text, k, d):
    frequent_patterns = set([])

    close = [0 for i in range(4**k)] # Kandidati za proveru
    frequency_array = [0 for i in range(4**k)]

    # Za svaki uzorak duzine k u tekstu evidentiraju se kandidat susedi cija pojavljivanja treba uzeti u razmatranje (niske koje se razlikuju od uzorka na najvise d pozicija)
    for i in range(len(text) - k):
        neighborhood = neighbors(text[i:i+k], d) # Pronalaze se kandidati

```

```
        for pattern in neighborhood:
            index = pattern_to_number(pattern) # Svaka kandidat sekvenca se prevodi u svoj odgovarajuci indeks
            close[index] = 1 # i evidentira

    # Za svaku kandidat sekvencu (koja je do sada pronadjena u tekstu sa greskom d), broji se pojavljivanje njenih d-suseda
    for i in range(4**k):
        if close[i] == 1:
                pattern = number_to_pattern(i, k)
                frequency_array[i] = approximate_pattern_count(text, pattern, d)

    max_count = max(frequency_array)

    # Pronalaze se one sekvence duzine k cija su pojavljivanja najzastupljenija
    for i in range(4**k):
        if frequency_array[i] == max_count:
            pattern = number_to_pattern(i, k)
            frequent_patterns.add(pattern)

    return frequent_patterns




def main():
    print(frequent_words_with_mismatches('tgactatcatcgtagtatcgatgtgcacacacgtgcgcgcgcgcgccctgtacatgatc', 5, 2))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

Glava 2

Koji DNK šabloni igraju ulogu molekularnog sata?

2.1 Biološki problem

Bioritam svih živih bića kotroliše "unutrašnji časovnik"koji još zovemo i cirkadijalni. Ljudi koji često putuju avionom na drugi kraj sveta mogu to da osete kada pokušaju da zaspu nakon promene nekoliko vremenskih zona. Kao i svaki sat, i ovaj može da se pokvari, što rezultuje genetskom bolešću pod nazivom sindrom odložene faze spavanja. Njegova osnova je na molekularnom nivou. Mnogi procesi su kontrolisani ovim časovnikom, što ilustruje slika 2.1. Kao što vidimo, postoji tačno određeno vreme u toku dana kada telo ima najnižu temperaturu, kada kreće i prestaje lučenje hormona poput melatonina (neophodnog za kvalitetan san) i slično.

Slika 2.1: Cirkadijalni ritam

Naučnici su se pitali kako ćelije znaju kada treba da uspore ili ubrzaju proizvodnju određenih proteina. Ranih sedamdesetih, Ron Konopka i Sejmor Benzer su napravili prve korake ka

rešavanju ove misterije. Do danas je otkriveno mnogo cirkadijalnih gena koji koordiniraju ponašanje stotine drugih gena.

Kod čoveka, cirkadijalni ritam je promenljiv, tj. varira od osobe do osobe. Mi ćemo se u daljem tekstu fokusirati na biljke, jer je kod njih cirkadijalni ritam pitanje života i smrti, stoga ne sme biti promenljiv. Geni biljaka moraju znati kada sunce izlazi i zalazi kako bi znali kada treba vršiti fotosintezu, jer je ona od krucijalne važnosti za život biljke, a usko povezana sa količinom sunčeve svetlosti. Primeri specifičnih ponašanja nekih biljaka u zavisnosti od cirkadijalnog ritma dati su na slici 2.2.

Slika 2.2: Cirkadijalni ritam biljke

Ispostavlja se da svaka ćelija biljke čuva podatak o tome da li je dan ili noć nezavisno od drugih ćelija, kao i da su samo tri gena odgovorna za upravljanje satom. Oni kodiraju regulatorne proteine (transkripcione faktore)- to su LCY, CCA1 i TOC1. Spoljašnji faktori, kao što je količina sunčeve svetlosti, kontrolišu regulatorne gene i regulatorne proteine kako bi organizmi prilagodili svoju gensku ekspresiju, odnosno da li će se protein sintetisati u to vreme ili ne. Dakle, svaki metabolički proces je regulisan cirkadijalnim časovnikom kojim upravljaju regulatorni proteini, odlučujući kada će se koji protein u ćeliji biljke sintetisati. Regulatorni proteini upravljaju genskom ekspresijom tako što se vežu za DNK u trenucima kada je potrebno sintetisati neki protein važan za cirkadijalni ritam, kao što je prikazano na slici 2.3. Naravno, to vezivanje se ne može ostvariti bilo gde u okviru DNK, već postoje posebna mesta, kao što je prikazano na slici 2.4. Ta posebnost je neophodna iz više razloga. Regulatorni protein mora znati gde treba da se veže, a isto tako DNK mora znati kako da to protumači, odnosno, to za nju mora biti signal da je vreme započeti sintezu, kao i pružiti informaciju o kom se proteinu radi. Ta posebna mesta predstavljaju manje skupove nukleotida u DNK koji nazivamo **regulatorni motivi**. Naš zadatak je da ih pronađemo.

Slika 2.3: Regulatorni proteini na delu

Slika 2.4: Mesta vezivanja regulatornih proteina

2.2 Informatički problem

Kako bismo informatički rešili problem pronalaženja regulatornih motiva u DNK, moramo predstaviti sve gorepomenute biološke pojmove na način koji bi informatičar i njegov računar mogli razumeti i obraditi.

- Iz ove tačke gledišta, DNK predstavlja nisku karaktera nad azbukom: A, G, T, C.
- Kodirajuće sekcije DNK (one koje se prepisuju i prevode u proteine) za nas će biti podniske niske DNK.
- Regulatorni motiv je šablon koji se pojavljuje tačno jednom u svakoj kodirajućoj sekciji DNK.

Hajde da damo u računarskom smislu korektnu definiciju problema:

Informatička definicija problema nalaženja regulatornih motiva u DNK
Ulaz: N niski koje predstavljaju kodirajuće sekvence DNK.
Izlaz: Podniska dužine k koja predstavlja regulatorni motiv (skrivenu poruku, mesto vezivanja regulatornih proteina).

Ovaj problem nas podseća na problem pronalaženja *OriC*-a, koji smo rešavali svodeći ga na pronalaženje čestih reči u tekstu koristeći algoritam *FrequentWords*, detaljno opisan u prethodnom poglavlju. Da bismo taj algoritam primenili ovde, neophodno je da od niza niski dobijemo konkatenacijom jednu veliku nisku, na koju ćemo primeniti ovaj algoritam.

Međutim, ovaj algoritam nije primenljiv ako motivi mutiraju. Možemo pokušati da primenimo algoritam *FrequentWordsWithMissmatches*. To bi nas dovelo do tačnog rešenja, ali nakon previše vremena. Naime, kada smo nalazili *OriC*, tražili smo uzorke dužine 9 karaktera (DnaA box je bio te dužine). U ovom slučaju, tražimo motive koji su najčešće dužine 15 karaktera, pa nam ovaj algoritam ne radi dovoljno brzo. Dakle, potrebna nam je nova ideja.

2.3 Problem ubačenog motiva

I dalje pokušavamo da pronađemo skrivenu poruku u DNK koja kodira mesto vezivanja regulatornih proteina za DNK. Dali smo korektnu definiciju problema i, kao pravi matematičari, pokušali najpre da svedemo problem na neki drugi, koji smo već rešili. Međutim, to nas je

odvelo u veliku vremensku složenost, pa samim tim i neupotrebljivost pronađenog algoritma za rešavanje. Zaključili smo da nam je potreban novi pristup, tj. da moramo probati da problem rešimo direktno - bez pomoći algoritama za *OriC*. Za ovako nešto, neophodno je najpre definisati još nekoliko pojmova vezanih za šablone koje pokušavamo da pronađemo:

- Mutirani šablon predstavlja šablon u kome se na nekim mestima može pojaviti mutacija, odnosno odstupanje od početne niske.
- (k, d) motiv je k-gram koji se pojavljuje u svakoj sekvenci sa najviše d razlika.
- Kanonski motiv predstavlja motiv koji tražimo (bez uticaja mutacija).
- Instance su mutirani motivi - oni koji se pojavljuju u niskama sa najviše d grešaka, odnosno razlika u odnosu na kanonski motiv.

Sada, kada smo tačno i precizno definisali pojmove koji će nam igrati uloge regulatornih motiva, izmenićemo i samu definiciju problema, tj. malo promeniti scenario tako da se sve uloge lepo uklope, pazeći naravno da ne izgubimo na tačnosti definicije.

Problem ubačenog motiva: Pronalaženje (k, d) motiva u skupu niski
Ulaz: Skup niski *Dna* i celi brojevi k (dužina motiva) i d (maksimalni broj razlika).
Izlaz: Svi (k, d) motivi u skupu *Dna*.

Nova definicija problema izrodiće nekoliko novih ideja za njegovo rešavanje, a te ideje izrodiće nove algoritme. U daljem tekstu prikazaćemo nekoliko rešenja, uz osvrt na ideju koja nas je do njega dovela.

2.3.1 Enumeracija motiva

Početna ideja je zasnovana na gruboj sili - za svaki k-gram ćemo ispitati da li je (k, d) motiv za dati skup niski. Dakle, trebalo bi generisati 4^k kombinacija i za svaku ispitati da li je (k, d) motiv. Postavlja se pitanje da li je potrebno ispitati svih 4^k kandidata.
Pogledajmo na primer sledeći skup niski:
AAATTTAAATTTAAATTT
TTTAAATTTAAATTTAAA
Da li ima smisla proveravati 8-gram GGAAGGAA? Naravno da nema! Karakter G se ne pojavljuje ni u jednoj niski iz našeg skupa. Zato sigurno ne može biti traženi (k, d) motiv. Dakle, prvo možemo izbaciti kandidate koji se ne pojavljuju ni u jednoj niski iz skupa *Dna*. Takođe, možemo primetiti da je skup instanci jednog kandidata koje se pojavljuju u ostalim niskama (ceo skup *Dna*, bez niske u kojoj je dati kandidat podniska) prilično ograničen. Ograničenje nameće broj d. Dakle, jasno je da treba proveravati samo one instance koje se od kandidata razlikuju na najviše d pozicija. Ovako redukovana pravila potrage iznedriće algoritam koji se naziva *MotifEnumeration*, koji bismo u obliku pseudokoda predstavili na sledeći način:

```
1 MotifEnumeration(Dna, k, d)
2     for each k-mer a in Dna
3         generate all possible k-mers a1 differing from a by at most d mutations
4         for each such k-mer a1
5             if a1 is a (k, d)-mer in each sequence in Dna
6                 output a1
```

Ovaj algoritam je suviše spor kada su k i/ili d veliki brojevi. Hajde da malo analiziramo složenost ovog algoritma. Možemo videti da najveću (i jedinu) komponentu složenosti čini dvostruka for-petlja, koja zavisi od broja kandidata koje pretražujemo i broja njihovih instanci. Kada su k i/ili d veliki brojevi, instanci ima mnogo, i pretraga ide sporo. Zbog toga, u praksi, ovaj algoritam ne pokazuje dobre rezultate za velike vrednosti k i/ili d. Dakle, potrebna nam je nova ideja.

2.3.2 Najsličniji k-grami u parovima niski

Videli smo da pretraga grubom silom ima veliku složenost, usled (iako redukovanog ali i dalje ogromnog) broja kandidata i njihovih instanci. Pokušali smo da redukujemo broj provera i nismo postigli mnogo. To nas dovodi do razmišljanja da ključ rešenja optimalnog algoritma ne leži u broju, već možda u redosledu. Hajde da konstruišemo ovakav primer:
atcgtcagAAATTTAAAGGGgtcaactg
ggatcaagctAAATCTAAAGGGcttcag
gatctacccaAAACTTAAAGGGgtaaac
Velikim slovima predstavljen je (12,1)-motiv koji tražimo. Grubom silom pretraga bi počela na samom početku prve niske. Kako naš motiv počinje na 9. poziciji prve niske, vidimo da bi 8 puta naleteli na ćorsokak. To znači da bi se 8 velikih iteracija izvršilo uzalud. Ako bismo nekako mogli početi od devete pozicije, uštedeli bismo vreme. Ali, kako da znamo koja je tajna pozicija od koje treba krenuti? Primećujemo da se podniske atcgtcag i ggatcaag prilično razlikuju (7/8 pozicija razlike). Dakle, to sigurno ne može biti sastavni deo neke instance. Medutim, podniske AAATTTAAAGGG i AAATCTAAAGGG su prilično slične (1/12 pozicija razlike). To je svakako dobar kandidat. Ako bismo u prve dve niske pronašli kandidate sa dosta sličnosti, šanse da smo odmah pogodili (k, d) motiv bi bile velike. Sve i da nismo, ovim putem ćemo obilaziti prvo verovatnije kandidate, pa bi ukupan broj pretraga sa velikom verovatnoćom bio dosta manji. Dakle, možemo probati da poredimo parove niski iz *Dna*, da uočimo dva najsličnija k-grama u dve niske iz *Dna*, od njih napravimo kanonski, i za njega proveravamo da li je (k, d) motiv. Malo veći primer možete videti na slici 2.5 i probati sami da nađete ubačeni motiv.

Slika 2.5: Najsličniji k-grami u parovima niski - primer

Zvuči predobro da bi bilo istinito? Pa možda ste i u pravu. Sličnost para niski je takođe određena brojem d. One se od kanonskog motiva mogu razlikovati na d pozicija, što znači da se među sobom, mogu razlikovati na $2d$ pozicija. Na malom izolovanom primeru, gde je bilo $d = 1$, zaista su slične niske isplivale kao dobri kandidati. Međutim, u praksi, sa (15,4)-motivima, broj dozvoljenih razlika je malo veći, čak 8. Kako izgledaju takvi parovi, prikazano je na slici 2.6, gde se jasno vidi koliko je to zaista mnogo i kako ove dve niske više i nisu tako slične.

Slika 2.6: Najsličniji k-grami u parovima niski - problem

Primer koji pokazuje koliko je ovo zaista loše rešenje je eksperiment rađen nad 10 slučajno generisanih niski iz *Dna* dužine 600, sa ubačenim (15, 4) motivom. Pristupom pronalaženja parova niski iz *Dna*, pronađeno je nekoliko hiljada parova k-grama koji su se razlikovali na manje od 8 pozicija. Ovo sigurno nisu skrivene poruke, jer ih je previše.

Da bismo ih pretražili u nekom smislenom redosledu, potrebno nam je da ih nekako rangiramo. Dakle, potreban nam je novi pristup.

2.3.3 Matrice motiva

Dosadašnje pretrage skupa *Dna*, nisu dale dobre rezultate. Pokušavali smo da ubrzamo pretragu na razne načine, ali bez puno uspeha. Možda je vreme da probamo da potpuno promenimo pristup, da mislimo izvan kutije. Prednost nas informatičara je u tome što ne mislimo uvek linerano. Nekada je ključ u rešenju, a ne u početnim premisama. Zbog toga, pokušajmo da analiziramo jedan skup rešenja, i da malim koracima unazad dođemo do početnih uslova.

Pretpostavićemo da imamo neku kolekciju motiva i stavimo ih u matricu. Recimo da smo uradili jednom grubu pretragu i dobili neke rezultate. Da bismo olakšali komunikaciju, uvešćemo par pojmova koje ćemo koristiti u daljem tekstu.

- Najpopularniji nukleotid u nekoj koloni matrice je onaj koji se pojavljuje najveći broj puta.
- Konsenzus niska predstavlja nisku koja se dobija nadovezivanjem najpopularnijih nukleotida iz svake kolone.
- Skor predstavlja broj nepopularnih simbola (onih koji nisu najpopularniji u svojoj koloni) u matrici.

Za lakše usvajanje, ilustrovani primer ovih pojmova prikazan je na slici 2.7. Najpopularniji nukleotidi u svakoj koloni matrice motiva su napisani velikim slovima i boldovani. Oni su nadovezani u konsenzus nisku. Nepopularni simboli su napisani malim slovima, i njihov ukupan broj predstavlja skor.

Slika 2.7: Matrica motiva, konsenzus niska i skor

Motifs	T	C	G	G	G	G	g	T	T	T	t	t
	c	C	G	G	t	G	A	c	T	T	a	C
	a	C	G	G	G	G	A	T	T	T	t	C
	T	t	G	G	G	G	A	c	T	T	t	t
	a	a	G	G	G	G	A	c	T	T	C	C
	T	t	G	G	G	G	A	c	T	T	C	C
	T	C	G	G	G	G	A	T	T	c	a	t
	T	C	G	G	G	G	A	T	T	c	C	t
	T	a	G	G	G	G	A	a	c	T	a	C
	T	C	G	G	G	t	A	T	a	a	C	C
Consensus(Motifs)	T	C	G	G	G	G	A	T	T	T	C	C
Score(Motifs)	3+	4+	0+	0+	1+	1+	1+	5+	2+	3+	6+	4= 30

Analizirajmo malo našu matricu rešenja. Ako bismo pretpostavili da su ovo instance nekog (k, d) motiva, jasno, želeli bismo da one budu što sličnije, tj. da se razlikuju na što manje pozicija. Dakle, želimo da nam broj nepopularnih simbola bude što manji, odnosno želimo mali skor. Dakle, ako ovako postavimo problem, skor je zapravo "mera neuspeha", pa je ključ dobrog rešenja u minimizovanju ove veličine.

Novi pojmovi, novi pristup i nova ideja, zahtevaju i malo drugačiju definiciju problema:

Problem pronalaženja motiva: Za dati skup niski iz Dna naći skup k-grama (po jedan iz svake niske) sa minimalnim skorom među svim mogućim k-gramima iz datog skupa niski.
Ulaz: skup niski Dna i ceo broj k.
Izlaz: skup k-grama $Motifs$, po jedan iz svake niske Dna, tako da je vrednost skora matrice $Motifs$ minimalna.

Kada smo definisali problem, vreme je da krenemo da ga rešavamo. Prvo što nam svakako pada na pamet je gruba sila. To je obično najjednostavniji algoritam, sa ne tako dobrom brzinom. Ali, ako on da zadovoljavajuću brzinu, nema potrebe komplikovati dalje, zar ne?

Dakle, krećemo redom. Uzimamo po jedan k-gram iz svake niske skupa Dna i računamo skor. Tako redom obiđemo sve kombinacije k-grama, pamteći minimalni skor, i na kraju, proglasimo rešenjem onaj skup motiva sa najmanjim skorom.

Rešenje je dobro, pa hajde da pogledamo složenost. Neka je t broj niski i n dužina svake niske. Zaključujemo da je $(n-k+1)$ broj k-grama jedne niske, odnosno, $(n-k+1)^t$ broj kombinacija koje treba da proverimo. Vreme provere je konstantno (treba samo izračunati skor i ažurirati neku vrednost). Dakle, ukupna složenost je: $(n-k+1)^t$. Eksponencijalna složenost svakako nije dobra, tako da zaključujemo da je ovaj algoritam prespor. Moramo ga nekako unaprediti.

Vratimo se na našu matricu motiva i pokušajmo da primetimo nešto što bi nam pomoglo da malo ubrzamo stvari. Pogledajmo primer dat na slici 2.8.

Slika 2.8: Matrica motiva, konsenzus niska i skor - detaljnije

	T	C	G	G	G	G	g	T	T	T	t	t	3
	c	C	G	G	t	G	A	c	T	T	a	C	4
	a	C	G	G	G	G	A	T	T	T	t	C	2
	T	t	G	G	G	G	A	c	T	T	t	t	4
Motifs	a	a	G	G	G	G	A	c	T	T	C	C	3
	T	t	G	G	G	G	A	c	T	T	C	C	2
	T	C	G	G	G	G	A	T	T	c	a	t	3
	T	C	G	G	G	G	A	T	T	c	C	t	2
	T	a	G	G	G	G	A	a	c	T	a	C	4
	T	C	G	G	G	t	A	T	a	a	C	C	3
													=30
Consensus(Motifs)	T	C	G	G	G	G	A	T	T	T	C	C	
Score(Motifs)	3+	4+	0+	0+	1+	1+	1+	5+	2+	3+	6+	4=30	

Izračunali smo skor po vrstama i primetili da je isti kao skor po kolonama. Da li je to slučajnost? Ispostavlja se da nije. Suština veličine skor leži u tome da broji nepopularne simbole. Nije važno kako ih prebrajamo, ako su svi na broju. Pojam brojanja definisaćemo na malo formalniji način. Definisaćemo veličinu koja se zove Hamingonovo rastojanje.

Hamingovo rastojanje između dve niske istih dužina predstavlja broj pozicija na kojima se one razlikuju. Npr. Hamingonovo rastojanje niski AACCTTGG i ATCCATGG je 2:
AACCTTGG
ATCCATGG
-1–1— = 2

Kada imamo Hamingovo rastojanje, možemo reći da je skor po kolonama suma Hamingovih rastojanja k-grama iz matrice od konsenzus niske.

Vreme je da pokušamo da unapredimo naš algoritam. Želimo nekako da nađemo način da uradimo suprotno - da od konsenzus niske i niza Dna dobijemo matricu $Motifs$. Koristićemo sledeće osobine koje smo primetili na matrici $Motifs$:

1. Kako skor predstavlja sumu rastojanja od k-grama iz matrice do konsenzus niske, minimalni skor predstavlja minimizovanu sumu tih rastojanja.

2. Kako je skor po kolononama i vrstama isti, možemo rastojanje računati i po vrstama. Tako dolazimo do reforomulacije našeg problema, tj. njegovog ekvivalenta koji koristi naša nova zapažanja.

Iskoristićemo ove osobine kako bismo još jednom predefinisali naš problem tako da odražava sliku iz novog pristupa.

Problem pronalaženja motiva - reformulacija: Naći k-gram $Pattern$ i skup k-grama $Motifs$ iz skupa niski Dna koji minimizuju rastojanje između svih mogućim k-grama $Pattern$ i svih mogućih skupova k-grama $Motifs$.
Ulaz: skup niski iz Dna i ceo broj k.
Izlaz: k-gram $Pattern$ i skup k-grama $Motifs$ iz skupa niski Dna koji minimizuju $d(Pattern, Motifs)$.

Ovo je ekvivalentno našem prethodnom problemu jer smo primetili da $d(Pattern, Motifs)$ predstavlja skor ukoliko je $Pattern$ konsenzus niska. Postavlja se pitanje da li smo ovim otežali naš problem. Ispostaviće se da nismo, jer ne moramo ispitivati sve skupove k-grama $Motifs$, već je dovoljno da iskoristimo problem niske medijane koji ispituje sve k-grame $Pattern$.

2.3.4 Problem niske medijane

Prethodnom definicijom problema, nameće se zaključak da je sledeći prirodni korak proći kroz sve kombinacije skupa k-grama $Motifs$ i k-grama $Pattern$, kako bismo našli kombinaciju sa najmanjim rastojanjem. Međutim, videli smo i da algoritmi zasnovani na gruboj sili, tj. iscrpnoj pretrazi kombinacija u potrazi za pravom, vode ka ogromnoj složenosti i lošoj praktičnoj primeni.

Zato ćemo ovaj put preskočiti taj korak i odmah krenuti da modifikujemo algoritam tako da dobijemo manju složenost. Primetićemo da imamo dve dimenzije pretrage (računarski bi to bile dve ugnježdene for petlje). Jedna je po svim k-gramima $Pattern$ a druga po skupovima $Motifs$. Jasno je da bi se složenost prepolovila (tj. korenovala) ako bismo imali samo jednu dimenziju. Zvuči neverovatno, ali je moguće, ako primetimo da nam unutrašnja for petlja nije potrebna, jer možemo uzeti cele niske umesto motiva. Tačnije, želimo da računamo rastojanje jednog k-grama od celog skupa Dna. Računanjem rastojanja od samih niski iz Dna umesto od njihovim podniski dužine k, štedimo dosta vremena, a postižemo isti efekat. Međutim, da bismo to učinili, najpre moramo definisati nekoliko pojmova, na prvom mestu jer još uvek nismo rekli kako se računa rastojanje sem ako imamo dve niske i to iste dužine. Dakle, definisaćemo najpre sledeće pojmove:

- Hamingovo rastojanje izmedu dve niske različitih dužina predstavlja minimum Hamingovih rastojanja između kraće niske i svih podniski duže niske odgovarajuće dužine.
- Definišemo rastojanje između k-grama i skupa (dužih) niski kao sumu rastojanja između tog k-grama i svih niski iz skupa.
- Niska medijana za skup niski Dna predstavlja onaj k-gram koji minimizuje rastojanje izmedu tog k-grama i skupa Dna - $d(k-gram, Dna)$.

Novi pojmovi i nova ideja, prirodno vode i do nove definicije problema. Moramo dobro definisati problem koji rešavamo ako želimo da nas to dovede do dobrog algoritma za njegovo rešavanje.

Problem niske medijane: pronaći nisku medijanu.
Ulaz: skup niski Dna.
Izlaz: k-gram $k-mer$ koji minimuzuje rastojanje d($k-mer$, Dna).

Sada imamo sav potreban alat da rešimo problem. Eliminišući jednu dimenziju, pretragu ćemo vršiti samo po svim mogućim kombinacijama k-grama $Pattern$ (njih 4^k) i kao rezultat vratiti onaj k-gram koji ima najmanje ratojanje od skupa Dna. Ovaj algoritam se naziva *MedianString* i prikazan je sledećim pseudokodom:

```
1 MedianString(Dna, k)
2     best-k-mer ← AAA...AA
3     for each k-mer from AAA...AA to TTT...TT
4         if d(k-mer, Dna) < d(best-k-mer, Dna)
5             best-k-mer ← k-mer
6     return best-k-mer
```

Hajde da analiziramo složenost i vidimo da li smo zaista napredovali. Neka je t dužina niza Dna i n dužina niske iz Dna. Tada nam je za izračunavanje rastojanja između jednog k-grama i jedne niske iz skupa Dna potrebno $k \cdot (n - k + 1)$ poređenja. Kako imamo t niski, za

izračunavanje rastojanja k-grama od skupa potrebno nam je $t \cdot k \cdot (n - k + 1)$, odnosno približno $t \cdot k \cdot n$, jer je n daleko veće od k pa čini primarnu komponentu složenosti u $(n - k + 1)$. Ceo taj postupak moramo izvršiti za svaki k-gram, odnosno 4^k puta, pa imamo, dakle, da ukupna složenost algoritma iznosi: $4^k \cdot n \cdot t \cdot k$. Primećujemo da je ovo dobar napredak u odnosu na $n^t \cdot k \cdot t$, ali i dalje imamo eksponencijalnu složenost. Dakle, iako je *MedianString* algoritam mnogo brži od grube sile, za velike k je i dalje prespor.

2.3.5 Probabilistički pristup

Uopšteno o pristupu

Analizirali smo nekoliko determinističkih algoritama i videli da, iako uvek daju tačno rešenje, troše preveliku količinu vremena. Čak i najbolji među njima, *MedianString*, imao je eksponencijalnu složenost. To nas navodi na razmišljanje da je možda ponovo došlo vreme da uradimo veliki zaokret u pristupu samom problemu i pokušamo da nađemo kompromis između tačnosti i utroška vremena. Algoritmi koji ovo omogućavaju se nazivaju probabilistički algoritmi. Oni daju tačno rešenje sa određenom verovatnoćom, ali za dosta manje vremena, i oni su naša sledeća stanica u potrazi za ubačenim motivima. Kao i svaki put kada menjamo pristup, upoznaćemo se najpre sa nekoliko osnovnih pojmova:

- *Count* matrica neke matrice motiva prikazuje koliko se puta koji nukleotid ponavlja u svakoj koloni matrice motiva.
- Profilna matrica neke matrice motiva prikazuje učestalost pojavljivanja nukleotida u svakoj koloni matrice motiva.

Ilustrovani primer ovih pojmova prikazan je na slici 2.9.

Slika 2.9: *Count* i profilna matrica

	T	C	G	G	G	G	g	T	T	T	t	t
	c	C	G	G	t	G	A	c	T	T	a	C
	a	C	G	G	G	G	A	T	T	T	t	C
	T	t	G	G	G	G	A	c	T	T	t	t
Motifs	a	a	G	G	G	G	A	c	T	T	C	C
	T	t	G	G	G	G	A	c	T	T	C	C
	T	C	G	G	G	G	A	T	T	c	a	t
	T	C	G	G	G	G	A	T	T	c	C	t
	T	a	G	G	G	G	A	a	c	T	a	C
	T	C	G	G	G	T	A	T	a	a	C	C

	A:	2	2	0	0	0	0	9	1	1	1	3	0
	C:	1	6	0	0	0	0	0	4	1	2	4	6
Count(Motifs)	G:	0	0	10	10	9	9	1	0	0	0	0	0
	T:	7	2	0	0	1	1	0	5	8	7	3	4

	A:	.2	.2	0	0	0	0	.9	.1	.1	.1	.3	0
	C:	.1	.6	0	0	0	0	0	.4	.1	.2	.4	.6
Profile(Motifs)	G:	0	0	1	1	.9	.9	.1	0	0	0	0	0
	T:	.7	.2	0	0	.1	.1	0	.5	.8	.7	.3	.4

Osnovna ideja ovog pristupa može se ilustrovati bacanjem k četvorostranih kockica sa otežanim stranama. Svaka kockica pretstavlja jednu poziciju u motivu dužine k, i na stranama ima simbole A, C, T i G. Strane kockica su otežane, tako da svaka strana pada sa onom verovatnoćom koja je zapisana u profilnoj matrici, u preseku kolone rednog broja pozicije u motivu i reda karaktera koji je na toj strani kockice. Na primer, ukoliko imamo profilnu matricu kao na slici 2.10, bacali bismo 6 četvorostranih kockica, gde bi recimo druga kockica bila otežana tako da simbol A pada sa verovatnoćom 7/8, simbol C sa verovatnoćom 0, simbol T sa verovatnoćom 1/8 i simbol G sa verovatnoćom 0. Naravno da u praksi ne možemo imati verovatnoću nula, ali sa našim zamišljenim kockicama, to je legitimna situacija. Zašto ovo nije dobro i kako se to popravlja, diskutovaćemo malo kasnije. Za sada ćemo prihvatiti ovu metaforu takvu kakva jeste i baciti naše zamišljene kockice. Neka su redom pali karakteri: A, T, A, C, A i G. Verovatnoću podniske koju oni čine možemo izračunati na osnovu profilne matrice, pretpostavljajući da su bacanja nezavisni događaji. Dakle, pročitaćemo iz profilne matrice verovatnoću karaktera A na prvoj poziciji (1/2), verovatnoću karaktera T na drugoj (1/8), ... , i pomnožićemo sve te vrednosti. Proizvod verovatnoća iznosi 0.001602.

Slika 2.10: Računanje verovatnoće k-grama

Neka je data profilna matrica *Profile*:

A	1/2	7/8	3/8	0	1/8	0
C	1/8	0	1/2	5/8	3/8	0
T	1/8	1/8	0	0	1/4	7/8
G	1/4	0	1/8	3/8	1/4	1/8

Pr(ATACAG |*Profile*) =
1/2 x 1/8 x 3/8 x 5/8 x 1/8 x 1/8 = 0.001602

Ako se setimo kako smo definisali matricu motiva, konsenzus nisku i profilnu matricu, lako možemo zaključiti da je ova verovatnoća zapravo verovatnoća da je niska ATACAG konsenzus niska. Sada nam same kockice više nisu potrebne, već možemo uzeti realne k-grame iz niski skupa *Dna* i za njih računati. Na primer, za nisku CTATAAACCTTACAT iz nekog skupa *Dna*, možemo izračunati verovatnoće svih njenih podniski dužine 6 (rezultate možete videti na slici 2.11) i potražiti onaj sa najvećom verovatnoćom (u primeru sa slike 2.11 to je AAACCT). On je svakako dobar kandidat za ubačeni motiv. U ovome leži sama suština svih probabilističkih algoritama za traženje ubačenih motiva.

U daljem tekstu, predstavićemo nekoliko probabilističkih algoritama za rešavanje problema ubačenih motiva. Opisaćemo same algoritme, ali i diskutovati o njihovim dobrim i lošim stranama. **Važna napomena**: Kao što smo već napomenuli, cenu malog vremena ovi algoritmi plaćaju tačnošću. Dakle, rešenje može malo odstupati od traženog. Zbog toga, za postizanje najbolje tačnosti, probabilističke algoritme treba pokretati više puta i uzeti najbolji rezultat.

Algoritam *Greedy motif search*

Prvi algoritam koji ćemo predstaviti je pohlepni algoritam. Kao ulaz, on prima skup niski *Dna*, broj njegovih elemenata t i dužinu ubačenog šablona k, a kao izlaz daje matricu ubačenih motiva $BestMotifs$. Suština algoritma leži u njegovom imenu: grabi k-mere iz jedne niske redom, na osnovu svakog od njih nađi najbolju matricu u koju se on uklapa, i uzmi onu koja ima najmanji skor. Na početku $BestMotifs$ se inicijalizuje na t podniski dužine k, od kojih svaka predstavlja prvih k karakera jedne niske iz skupa *Dna*. Iterira se kroz prvu nisku skupa *Dna*, i iteracija ima onoliko koliko ima podniski dužine k u njoj. U svakoj iteraciji, računa se po jedna matrica motiva. Građenje te matrice je jedan vid pohlepe ovog algoritma. Grabimo već izračunate vrednosti, kako bismo što bolje odredili sledeće. Prvi red čini tekuća podniska iteracije (podniska prve niske skupa *Dna* koja počinje od karaktera na poziciji rednog broja iteracije). Za

Slika 2.11: Primer: najverovatniji 6-gram

6-mer	Pr (6-mer|*Profile*)	
CTATAAACCTTACAT	1/8 x 1/8 x 3/8 x 0 x 1/8 x 0	0
CTATAAACCTTACAT	1/2 x 7/8 x 0 x 0 x 1/8 x 0	0
CTATAAACCTTACAT	1/2 x 1/8 x 3/8 x 0 x 1/8 x 0	0
CTATAAACCTTACAT	1/8 x 7/8 x 3/8 x 0 x 3/8 x 0	0
CTATAAACCTTACAT	1/2 x 7/8 x 3/8 x 5/8 x 3/8 x 7/8	.0336
CTATAAACCTTACAT	1/2 x 7/8 x 1/2 x 5/8 x 1/4 x 7/8	.0299
CTATAAACCTTACAT	1/2 x 0 x 1/2 x 0 1/4 x 0	0
CTATAAACCTTACAT	1/8 x 0 x 0 x 0 x 0 x 1/8 x 0	0
CTATAAACCTTACAT	1/8 x 1/8 x 0 x 0 x 3/8 x 0	0
CTATAAACCTTACAT	1/8 x 1/8 x 3/8 x 5/8 x 1/8 x 7/8	.0004

svaki sledeći red se pravi profilna matrica prethodno izračunatih redova i na osnovu nje računa najverovatnija podniska iz one niske skupa *Dna*, koja ima redni broj isti kao redni broj reda matrice koji računamo. Dakle, svaki sledeći motiv u matrici se sve lepše poklapa sa ostatkom matrice. Sledeći korak u iteraciji je da izračunamo skor i ako je manji, da ažuriramo vrednost $BestMotifs$. Dakle, ona matrica koja ima najmanji skor je tražena matrica $BestMotifs$. Sam algoritam ilustrovan je sledećim pseudokodom:

```
1  GreedyMotifSearch(Dna, k, t)
2      BestMotifs ← motif matrix formed by first k-mers in each string from Dna
3      for each k-mer Motif in the first string from Dna
4          Motif_1 ← Motif
5          for i = 2 to t
6              form Profile from motifs Motif_1, ..., Motif_{i-1}
7              Motif_i ← Profile - most probable k-mer in the i-th string in Dna
8         Motifs ← (Motif_1, ..., Motif_t)
9         if Score(Motifs) < Score(BestMotifs)
10             BestMotifs ← Motifs
11     return BestMotifs
```

GreedyMotifSearch je brži od *Median string* algoritma. Povoljan je i za veće k, ali cena toga je manja tačnost. Tačnost se može poboljšati primenom Laplasovog pravila, o kojem će biti nešto više reči malo kasnije.

Randomized motif search

Posmatrajući algoritam *GreedyMofifSearch*, možemo primetiti da nismo postigli pun potencijal po pitanju prelaska na probabilistički pristup. Broj iteracija je i dalje fiksan (zavisi isključivo od dužine niski iz skupa *Dna* i dužine ubačenog motiva), a i sam njihov redosled je nametnut deterministički. Kako uvek krećemo od istog skupa motiva, i pratimo iste utabane korake, pokretanjem ovog algoritma više puta nećemo poboljšati ni tačnost ni vreme konvergencije. Hajde da pokušamo da potpuno izbacimo determinizam iz priče i da pustimo da izgled same niske *Dna* i zakon verovatnoće igraju glavne uloge u konvergenciji algoritma. Prva ideja o poboljšanju probabilizma bi mogla biti vezana za sam početak algoritma. Hajde da umesto kretanja od početnih pozicija, krećemo od nekih nasumično odabranih. To sasvim sigurno donosi malo probabilizma u našu priču. Međutim, i dalje imamo iteriranje po jednoj od niski, što fiksira i broj iteracija

i njihov redosled. To je ono što nam najviše i smeta. Na početku sekcije o probabilističkim algoritmima, naučili smo da pravimo profilnu matricu od matrice motiva, a u algoritmu *GreedyMofifSearch* smo videli da je moguće i obrnuto. To je dobra ideja za osnovu iteracije. Od matrice motiva bismo mogli praviti profilnu matricu, a od profilne matrice ponovo matricu motiva. Ponavljanjem tog postupka, mogli bismo iterirati bez potrebe da se vezujemo za bilo kakav redosled podniski u nekoj od niski iz *Dna*. Ostalo je još da razmislimo kako bismo znali kada da stanemo. Pretpostavljajući da krećemo od neke nasumične matrice motiva sa lošim, tj. velikim skorom, pretpostavljajući da se krećemo ka dobrom rešenju koje ima mali skor, kao i da to činimo postepeno gradeći sve bolja, tj. verovatnija rešenja pomoću profilnih matrica, prirodno je da pomislimo da će se skor smanjivati iz iteracije u iteraciju. Dakle, iteriraćemo dokle god nam se skor smanjuje. Ova ideja je zapravo osnova algoritma *RandomizedMotifSearch*. Njegova suština leži u tome da u velikom broju iteracija ažuriramo matricu motiva i profilnu matricu tako da dobijamo sve verovatniji skup motiva, zaustavljajući se kada postignemo najniži skor. Ovaj algoritam je ilustrovan sledećim pseudokodom:

```
1  RandomizedMotifSearch(Dna, k, t)
2      randomly select k-mers Motifs = (Motif_1, ..., Motif_t) in each string from
       ↪ Dna
3      bestMotifs ← Motifs
4      while forever
5          Profile ← Profile(Motifs)
6          Motifs ← Motifs(Profile, Dna)
7          if Score(Motifs) < Score(bestMotifs)
8              bestMotifs ← Motifs
9          else
10             return bestMotifs
```

Radi lakšeg razumevanja, hajde da ilustrujemo rad ovog algoritma na jednom primeru. Jedan takav, dosta uprošćen primer možemo videti na slici 2.12. Prikazan je algoritam *RandomizedMotifSearch* koji konvergira u jednoj iteraciji. Neka je dat skup *Dna* od 5 niski dužine 10 karaktera, sa ubačenim (4,1) motivom. Na slici 2.12. u gornjem levom uglu, prikazan je skup *Dna*, tako što su velikim slovima ispisani karakteri instanci ubacenog motiva: ACCT, ATGT, GCGT, ACGA i AGGT, crnom bojom označene mutacije na motivima, a plavom nemutirani karakteri motiva. Prvi korak jeste određivanje početne vrednosti matrice *Motifs*. Odabraćemo slučajno 5 pozicija (u opsegu od 1 do 7) na kojima će početi 4-grami kojima ćemo inicijalizovati matricu *Motifs*, i neka su to pozicije 7, 5, 1, 2 i 7. 4-grami koji počinju na ovim pozicijama: taac, GTct, ccgG, acta i AGGT, čine početnu matricu *Motifs*, koja je prikazana na slici 2.12. u gornjem centralnom delu. Sledeći korak jeste izgradnja profilne matrice na osnovu matrice *Motifs*. Prebrajanjem svakog karaktera u svakoj koloni matrice *Motifs* možemo odrediti *count* matricu, a zatim deljenjem svakog broja iz *count* matrice sa brojem niski, tj. 5 u našem primeru, dobijamo profilnu matricu. Kako izgleda profilna matrica u našem primeru, može se videti na slici 2.12 u gornjem desnom uglu. Sada kada imamo profilnu matricu, možemo izračunati nove najverovatnije motive u niskama iz *Dna*, i ažurirati matricu *Motifs*. Postupak računanja matrice motiva prikazan je na slici 2.12 u središnjem delu. Za svaku nisku iz skupa *Dna*, odredićemo verovatnoće svih njenih podniski, na osnovu profilne matrice, i iz svake niske odabrati po jednu koja ima najveću verovatnoću (na slici su prikazane ljubičastom bojom). Sledeći korak bi bio da ponovo napravimo profilnu matricu itd. Međutim, u našem primeru, vidimo da je to kraj. Dobili smo traženo rešenje. Treba napomenuti da je ovo veštački kreiran primer i da je u praksi broj iteracija dosta veći.

Slika 2.12: Primer rada algoritma *RandomizedMotifSearch*

Velika prednost ovog algoritma je u nasumičnom izboru početnog skupa motiva, što nam omogućava da ga pokrećemo iznova i izaberemo najbolje rešenje.

Gibsovo sempliranje

Algoritam *RandomizedMotifSearch* je dobar i efikasan, ali ima jednu malu manu. Matrica motiva se potpuno menja iz iteracije u iteraciju, što može dovesti do toga da se izmene i neki dobro izračunati redovi. To svakako ne želimo. Ako bismo u svakoj iteraciji menjali samo po jedan motiv iz matrice, tj. posle manjih izmena pravili novu profilnu matricu i proveravali skor, mogli bismo bolje da kontrolišemo to kvarenje već nameštenih motiva. Ova modifikacija algoritma *RandomizedMotifSearch* se naziva Gibsovo sempliranje. Na prvi pogled deluje kao da povećava broj iteracija i usporava konvergenciju, ali to što su promene manje, nikako ne znači da su manje i efikasne. Ako idemo pravo sitnijim koracima, stižemo brže i lakše na cilj, nego ako krupnim koracima idemo levo-desno. Osnovna razlika Gibsovog sempliranja u odnosu na algoritam *RandomizedMotifSearch* se nalazi u sadržaju iterativnog koraka. Umesto da od cele matrice motiva pravimo profilnu matricu i na osnovu nje ažuriramo celu matricu motiva, sada ćemo nasumično odabrati jedan motiv koji ćemo izbaciti, profilnu matricu praviti od ostatka matrice, a ažuriranje matrice motiva vršiti samo nad izbačenim redom u matrici. Postupak kreiranja same profilne matrice i ažuriranja motiva je potpuno isti kao u algoritmu *RandomizedMotifSearch*. Umesto pseudokodom, ovaj put ćemo algoritam prikazati u koracima:

1. Formirati *Motifs* izborom jednog k-grama iz svake sekvence **na slučajan način**
2. **Na slučajan način** odabrati jedan od k-grama i ukloniti ga iz *Motifs* ; označimo sekvencu kojoj taj k-gram pripada sa *RemovedSequence*
3. Kreirati profilnu matricu *Profile* od preostalih k-grama u *Motifs*
4. Za svaki k-gram iz *RemovedSequence*, izračunati $Pr(k-mer|Profile)$; na taj način dobijamo $n-k+1$ verovatnoća: $p_1, p_2, ..., p_{n-k+1}$
5. **Bacimo kockicu** sa $n-k+1$ strana kod koje je verovatnoća da će pasti na i-tu stranu proporcionalna verovatnoći p_i

6. Odredimo k-gram iz sekvence *RemovedSequence* kao onaj koji ima najveću verovatnoću i dodamo ga u *Motifs*

7. Ponavljamo korake 2-6

Radi lakšeg razumevanja, prikazaćemo i ovaj algoritam na istom primeru kao i *RandomizedMotifSearch*. Skica rada algoritma je prikazana na slici 2.13.

Neka je ponovo dat isti skup *Dna* od 5 niski dužine 10 karaktera, sa ubačenim (4,1) motivom. Na slici 2.13. u gornjem levom uglu, prikazan je skup *Dna*, tako što su velikim slovima ispisani karakteri instanci ubačenog motiva: ACCT, ATGT, GCGT, ACGA i AGGT, crnom bojom označene mutacije na motivima, a plavom nemutirani karakteri motiva. Prvi korak je isti kao i u algoritmu *RandomizedMotifSearch*: određivanje početne vrednosti matrice *Motifs*. Odabraćemo slučajno 5 pozicija (u opsegu od 1 do 7) na kojima će početi 4-grami kojima ćemo inicijalizovati matricu *Motifs*, i neka su to pozicije 7, 5, 1, 2 i 7. 4-grami koji počinju na ovim pozicijama: taac, GTct, ccgG, acta i AGGT, čine početnu matricu *Motifs*. Sledeći korak jeste izbacivanje jednog motiva. Nasumičnim izborom jednog broja iz opsega (1,5), odredili smo motiv iz reda 3 da bude izbačen. Matrica *Motifs* sada izgleda kao na slici 2.13 u gornjem desnom uglu. Naredni korak je izgradnja profilne matrice na osnovu matrice *Motifs*. Ovaj postupak je takođe isti kao u algoritmu *RandomizedMotifSearch*, samo je skup nad kojim radimo za jedan 4-gram manji. Prebrajanjem svakog karaktera u svakoj koloni matrice *Motifs* možemo odrediti *count* matricu (slika 2.13, centar-desno), a zatim deljenjem svakog broja iz *count* matrice sa brojem motiva, tj. 4 u našem primeru, dobijamo profilnu matricu. Kako izgleda profilna matrica u našem primeru, može se videti na slici 2.13 u donjem desnom uglu. Sada kada imamo profilnu matricu, možemo izračunati novi najverovatniji motiv u trećoj niski iz *Dna*, i ponovo popuniti treći red u matrici *Motifs*. Vidimo da je podniska GCGT jedina sa pozitivnom verovatnoćom, pa samim tim i najvećom, tako da njome popunjavamo treći red matrice *Motifs*. Sledeći korak bi bio da ponovo izbacimo nasumično odabrani motiv, napravimo profilnu matricu itd. Iterirali bismo sve dok skor ne prestane da se smanjuje.

Slika 2.13: Primer rada algoritma Gibsovo sempliranje

Međutim, sada ćemo se ovde zaustaviti kako bismo primetili nešto mnogo važno. Kada smo računali verovatnoće podniski kandidata za zamenu trećeg motiva, dobili smo samo jednu nenula vrednost od 7. To nije dobro. Jedna nula u profilnoj matrici može anulirati verovatnoće

koje su sve do množenja sa njom bile prilično velike. Zbog toga one nisu baš poželjne. Ako zastanemo malo i razmislimo, shvatićemo da nisu previše ni realne, tj. da ne odražavaju realnu verovatnoću, već da su u velikom broju slučajeva uzrokovane malim obimom skupa nad kojim računamo. Zbog toga, modifikicija nula u profilnoj matrici predstavlja vrlo dobru i poželjnu modifikaciju ovog algoritma, a ta modifikacija se sprovodi korišćenjem Laplasovog pravila.

Mala napomena: Setimo se da smo već pominjali Laplasovo pravilo kao dobro poboljšanje i *GreedyMofifSearch* i *RandomizedMotifSearch* algoritama. Zapravo, ovo je korisna modifikacija svakog algoritma koji se zasniva na računanju profilne matrice i korišćenju njenih vrednosti.

Pre nego pređemo na modifikaciju, naglasićemo još da se prednost Gibsovog algoritma ogleda u najmanjem skoru, kao i to da je mana ovog algoritma zaglavljivanje u lokalnom minimumu usled pretrage ograničenog skupa rešenja.

Laplasovo pravilo kao poboljšanje Gibsovog semplera

Davne 1650. godine, Oliver Kromvel je napisao: "Molim Vas, tako Vam Hrista, mislite da je moguće da grešite". Ovu izjavu, je uobličio Denis Lindli i nazvao Kromvelovo pravilo: "Traba da ostavimo malu mogućnost da Sunce sutra neće izaći". Nešto novija replika bi se mogla naći u seriji Smolvil i rečima Leksa Lutora: "Uvek ostavljam malu mogućnost da nisam u pravu. Tako me ništa ne može iznenaditi.Šuština Kromvelog pravila leži u tome da, ukoliko potpuno odbacimo mogućnost nekog događaja, sasvim sigurno ostavljamo mogućnost pogreške. Zbog toga, treba izbegavati verovatnoće 0 i 1.

Za poboljšanje Gibsovog semplera (zapravo se može primeniti na bilo koji algoritam koji računa profilnu matricu), izvršićemo malu modifikaciju algoritma primenom Laplasovog pravila. Primenjujemo Laplasovo a ne Kromvolevo pravilo, samo iz razloga notacije i matematičkog zapisa. Laplasovo pravilo je samo preciznija (matematička) formulacija Kromvelovog pravila, sa istom suštinom.

Laplasovo pravilo: U malim skupovima podataka uvek postoji šansa da se događaj koji je moguć ne desi. Slučajni algoritmi uvode pseudovrednosti koje povećavaju verovatnoće retkih događaja i eliminišu frekvencije jednake nuli zabeležene na osnovu iskustva.

Suština Laplasovog pravila leži u tome da, ukoliko znamo da se događaj nekada u prošlosti desio, on ne može imati verovatnoću nula. Stoga u računanje, pored vrednosti dobijenih u našem eksperimentu, ubacujemo i dve pseudovrednosti: događaj se desio i događaj se nije desio.

Računanje uslovne verovatnoće bez primene Laplasovog pravila bi bilo:

Ako su $X_1, ..., X_{n+1}$ uslovno nezavisne slucajne logičke promenljive (neuspeh 0, uspeh 1), tada: $Pr(X_{n+1} = 1|X_1 + ... + X_n = s) = s/n$

Računanje uslovne verovatnoće sa primenom Laplasovog pravila bi bilo:

Ako su $X_1, ..., X_{n+1}$ uslovno nezavisne slučajne logičke promenljive (neuspeh 0, uspeh 1), tada: $Pr(X_{n+1} = 1|X_1 + ... + X_n = s) = (s + 1)/(n + 2)$

Modifikacija Gibsovog algoritma primenom Laplasovog pravila je sadržana u dva mala koraka. Prva izmena je u okviru računanja *count* matrice, gde se vrednost svakog polja uvećava za 1. To je zapravo pseudovrednost: događaj se desio. Pod događaj, podrazumeva se pojava određenog karaktera na određenoj poziciji u matrici motiva. Druga izmena je u okviru računanja profilne matrice, zato što *count* matrica izgleda nešto drukčije.

Modifikaciju Gibsovog algoritma ćemo prikazati samo na primeru, jer je skup koraka u suštini isti i ne prikazuje najbolje samu modifikaciju. Koristićemo isti primer na kome smo već demonstrirali rad Gibsovog semplera. Na slici 2.14. prkazan je rad modifikovanog Gibsovog semplera.

Možemo primetiti da *count* i profilna matrica izgledaju nešto drukčije (dodate su pseudovrednosti), kao i da je rezultat 7 ne-nula verovatnoća.

Slika 2.14: Primer rada Gibsovog sempliranja sa primenom Laplasovog pravila

2.3.6 Koji princip odabrati?

Odgovor na ovo pitanje je - nema pravila. Nekada će se bolje pokazati jedan, a nekada drugi. Najbolje je da isprobamo više algoritama i vidimo koji se najbolje ponaša u našem slučaju. Možemo koristiti već zapažene prednosti i mane u izboru, kao na primer biranje *Median string* algoritma pri malim vrednostima k, ali isprobavanje je ipak najpouzdaniji pristup.

2.4 Zadaci sa vežbi

U nastavku će biti predstavljeni zadaci sa vežbi na kursu rađeni u programskom jeziku *Python*.

2.4.1 *MedianString*

```
def number_to_symbol(n):
    pairs = {
            0: 'A',
            1: 'T',
            2: 'C',
            3: 'G'
        }

    return pairs[n]


def number_to_pattern(n, k):
    if k == 1:
        return number_to_symbol(n)

```

```
    prefix_index = n // 4
    r = n - n // 4
    symbol = number_to_symbol(r)

    return number_to_pattern(prefix_index, k - 1) + symbol


def hamming_distance(pattern_p, pattern):
    k = len(pattern_p)

    distance = 0

    for i in range(k):
        if pattern_p[i] != pattern[i]:
            distance += 1

    return distance


# Sumiranje hamingovih rastojanja izmednju pattern niske i svih DNK sekvenci
def d(pattern, dna):
    k = len(pattern)
    distance = 0

    for dna_string in dna:

        h_dist = float('inf')

        for i in range(len(dna_string) - k):

            pattern_p = dna_string[i:i+k]
            dist = hamming_distance(pattern_p, pattern)

            if dist < h_dist:
                h_dist = dist

        distance += h_dist
    return distance

# Pronalazenje median niske
def median_string(dna, k):
    distance = float('inf')
    median = ''

# Za svaku od 4^k niski pretpostavimo da je median niska i proverimo kolika
# je njena udaljenost od DNK sekvenci
    for i in range(4**k):
        pattern = number_to_pattern(i, k)

        current_distance = d(pattern, dna)

    # Ako je tekuca kandidat median niska bolja od dosadasnje najbolje
    # vrednosti se azuriraju i pamti se najbolja
```

```
        if distance > current_distance:
            distance = current_distance
            median = pattern

    return median


def main():
    dna = [
            'GTAGATGTCATTAGCATGCAC',
            'CCTAGCCACTCTGCCATGTCG',
            'AACTCGTGCATTCTACGACTG',
            'AAACTTTCCGGATCTTCATAC',
            'CTACATCATCGAAGGCTACGC'
        ]

    print(median_string(dna, 4))


if __name__ == "__main__":
    main()
```

2.4.2 *GreedyMotifSearch*

```
import copy

def symbol_to_number(n):
    pairs = {
            'A': 0,
            'T': 1,
            'C': 2,
            'G': 3
        }

    return pairs[n]

# Formiranje profil matrice za zadati skup motiva
def profile_from_motifs(motifs, k, t):
    profile = [[1 for i in range(k)] for x in range(4)]

    for j in range(k):
        for i in range(t):
            index = symbol_to_number(motifs[i][j])
            profile[index][j] += 1

    for j in range(k):
        for i in range(4):
            profile[i][j] /= (t+2)

    return profile


# Izracunavanje verovatnoce pojave pattern sekvence u odnosu na zadati profil
```

```
30 def probability(pattern, profile):
31     prob = 1
32
33     for j in range(len(pattern)):
34         c = pattern[j]
35         index = symbol_to_number(c)
36
37         prob *= profile[index][j]
38
39     return prob
40
41 # Pronalazenje najverovatnijeg podstringa duzine k iz zadate DNK sekvence
42 # koji je najverovatniji u odnosu na zadati profil
43 def most_probable_k_mer(dna_string, profile, k):
44
45     best_k_mer = ''
46     best_probability = -1
47
48     for i in range(len(dna_string) - k):
49         pattern = dna_string[i:i+k]
50         pattern_prob = probability(pattern, profile)
51
52         if pattern_prob > best_probability:
53             best_probability = pattern_prob
54             best_k_mer = pattern
55
56     return best_k_mer
57
58 # Izracunavanje ukupnog skora za skup motiva
59 def score(motifs, k):
60     t = len(motifs)
61
62     total_score = 0
63
64     for j in range(k):
65
66         counts = [0, 0, 0, 0]
67
68         for i in range(t):
69             c = motifs[i][j]
70             index = symbol_to_number(c)
71             counts[index] += 1
72
73         max_index = 0
74
75         for i in range(1,4):
76             if counts[i] > counts[max_index]:
77                 max_index = i
78
79         total_score += t - counts[max_index]
80
81     return total_score
82
```

```python

# Pohlepno pronalazenje motiv niski
def greedy_motif_search(dna, k, t):

# Pretpostavimo da najbolji skup motiv sekvenci predstavljaju
# prefiksi duzine k svih niski
    best_motifs = [dna_string[0:k] for dna_string in dna]

# i izracunamo njihov ukupan skor
    best_score = score(best_motifs, k)

    first_string = dna[0]

    for i in range(len(first_string) - k):

        motifs = []

    # Za svaku podnisku duzine k iz prve DNK sekvence kazemo da u tekucoj
    # iteraciji predstavlja prvi motiv

        motifs.append(first_string[i:i+k])

    # Iz svake od preostalih t-1 DNK sekvenci izdvajamo podstring duzine k
    # koji je najverovatniji u odnosu na profil dobijen od motiva dobijenih iz
    # prethodnih iteracija. Taj podstring dodajemo u skup motiva kako bi se
    # koristio u narednoj iteraciju za pronalazenje sledeceg motiva

        for j in range(1, t):
            profile = profile_from_motifs(motifs, k, j)
            motifs.append(most_probable_k_mer(dna[j], profile, k))

    # Sa svaki izgenerisami skup motiva proveravamo da li daje bolji skor
    # u odnosu na do sada najbolji pronadjen
        current_score = score(motifs, k)

    # Ako je trenutni skup motiva bolji od dosadasnjeg azuriraju se vrednosti
        if current_score < best_score:
            best_motifs = copy.deepcopy(motifs)
            best_score = current_score

    return best_motifs

def main():
    dna = [
            'GTAGATGTCATTAGCATGCAC',
            'CCTAGCCACTCTGCCATGTCG',
            'AACTCGTGCATTCTACGACTG',
            'AAACTTTCCGGATCTTCATAC',
            'CTACATCATCGAAGGCTACGC'
        ]

    print(greedy_motif_search(dna, 4, len(dna)))

```

```python

if __name__ == "__main__":
    main()
```

2.4.3 *RandomizedMotifSearch*

```python
import copy
import random

def symbol_to_number(n):
    pairs = {
            'A': 0,
            'T': 1,
            'C': 2,
            'G': 3
        }

    return pairs[n]

def probability(pattern, profile):
    prob = 1

    for j in range(len(pattern)):
        c = pattern[j]
        index = symbol_to_number(c)

        prob *= profile[index][j]

    return prob

# Izdvajanje pseudoslucajno odabranih podniski iz DNK sekvenci u skupu
def random_k_mers(dna, k, t):
    k_mers = []

    for i in range(t):
        start = random.randrange(0, len(dna[i]) - k)
        dna_string = dna[i]
        k_mers.append(dna_string[start:start+k])

    return k_mers


def profile_from_motifs(motifs, k, t):
    profile = [[1 for i in range(k)] for x in range(4)]

    for j in range(k):
        for i in range(t):
            index = symbol_to_number(motifs[i][j])
            profile[index][j] += 1

    for j in range(k):
        for i in range(4):
            profile[i][j] /= (t+2)
```

```
48
49      return profile
50
51  # Pronalazenje podniski DNK sekvenci iz skupa koje su najverovatnije u
52  # odnosu na zadati profil i one zajedno cine skup motiva
53  def motifs_from_profile(profile, dna):
54      motifs = []
55      k = len(profile[0])
56
57      for dna_string in dna:
58          motifs.append(most_probable_k_mer(dna_string, profile, k))
59
60      return motifs
61
62
63  def score(motifs, k):
64      t = len(motifs)
65
66      total_score = 0
67
68      for j in range(k):
69
70          counts = [0, 0, 0, 0]
71
72          for i in range(t):
73              c = motifs[i][j]
74              index = symbol_to_number(c)
75              counts[index] += 1
76
77          max_index = 0
78
79          for i in range(1,4):
80              if counts[i] > counts[max_index]:
81                  max_index = i
82
83          total_score += t - counts[max_index]
84
85      return total_score
86
87  def most_probable_k_mer(dna_string, profile, k):
88
89      best_k_mer = ''
90      best_probability = -1
91
92      for i in range(len(dna_string) - k):
93          pattern = dna_string[i:i+k]
94          pattern_prob = probability(pattern, profile)
95
96          if pattern_prob > best_probability:
97              best_probability = pattern_prob
98              best_k_mer = pattern
99
100     return best_k_mer
```

```python

# Pronalazenje motiva koriscenjem algoritma za pseudoslucajni izbor
def randomized_motif_search(dna, k, t):

# Pretpostavimo da najbolji skup motiva cine slucajno odabrane podniske
# iz skupa DNK sekvenci
    motifs = random_k_mers(dna, k, t)
    best_motifs = copy.deepcopy(motifs)
    best_score = score(best_motifs, k)

# Dok se skor popravlja svakom iteracijom:
    while True:

    # Formiramo profil od tekucih motiva
        profile = profile_from_motifs(motifs, k, t)

    # A zatim motive od dobijenog profila
        motifs = motifs_from_profile(profile, dna)

        current_score = score(motifs, k)

        if current_score < best_score:
            best_score = current_score
            best_motifs = copy.deepcopy(motifs)
        else:
            return best_motifs


def main():
    dna = [
            'GTAGATGTCATTAGCATGCAC',
            'CCTAGCCACTCTGCCATGTCG',
            'AACTCGTGCATTCTACGACTG',
            'AAACTTTCCGGATCTTCATAC',
            'CTACATCATCGAAGGCTACGC'
        ]

    print(randomized_motif_search(dna, 4, len(dna)))


if __name__ == "__main__":
    main()
```

2.4.4 *GibbsSampler*

```python
import copy
import random

def symbol_to_number(n):
    pairs = {
            'A': 0,
            'T': 1,
            'C': 2,
```

```
            'G': 3
        }

    return pairs[n]

def probability(pattern, profile):
    prob = 1

    for j in range(len(pattern)):
        c = pattern[j]
        index = symbol_to_number(c)

        prob *= profile[index][j]

    return prob

def random_k_mers(dna, k, t):
    k_mers = []

    for i in range(t):
        start = random.randrange(0, len(dna[i]) - k)
        dna_string = dna[i]
        k_mers.append(dna_string[start:start+k])

    return k_mers

def profile_from_motifs(motifs, k, t):
    profile = [[1 for i in range(k)] for x in range(4)]

    for j in range(k):
        for i in range(t):
            index = symbol_to_number(motifs[i][j])
            profile[index][j] += 1

    for j in range(k):
        for i in range(4):
            profile[i][j] /= (t+2)

    return profile

def score(motifs, k):
    t = len(motifs)

    total_score = 0

    for j in range(k):

        counts = [0, 0, 0, 0]

        for i in range(t):
            c = motifs[i][j]
            index = symbol_to_number(c)
            counts[index] += 1
```

```
62
63          max_index = 0
64
65          for i in range(1,4):
66              if counts[i] > counts[max_index]:
67                  max_index = i
68
69          total_score += t - counts[max_index]
70
71      return total_score
72
73  def most_probable_k_mer(dna_string, profile, k):
74
75      best_k_mer = ''
76      best_probability = -1
77
78      for i in range(len(dna_string) - k):
79          pattern = dna_string[i:i+k]
80          pattern_prob = probability(pattern, profile)
81
82          if pattern_prob > best_probability:
83              best_probability = pattern_prob
84              best_k_mer = pattern
85
86      return best_k_mer
87
88  # Pronalazenje skupa motiva nakon N iteracija koriscenjem Gibs sampler-a
89  def gibbs_sampler(dna, k, t, N):
90      motifs = random_k_mers(dna, k, t)
91      best_motifs = copy.deepcopy(motifs)
92      best_score = score(best_motifs, k)
93
94      for j in range(N):
95
96          # Biramo slucajno i iz skupa [0,t)
97          i = random.randrange(0,t)
98
99          # Formiramo skup motiva koji se sastoji od svih dosadasnjih motiva osim
    ↪       i-tog
100         selected_motifs = copy.deepcopy(motifs)
101         del selected_motifs[i]
102
103         # Pravimo profil od odabranih motiva (bez i-tog)
104         profile = profile_from_motifs(selected_motifs, k, t-1)
105
106         # Za i-ti motiv postavljamo najverovatniji podstring duzine k iz i-te
    ↪       DNK sekvence, u odnosu na dobijeni profil
107         motifs[i] = most_probable_k_mer(dna[i], profile, k)
108         del selected_motifs
109
110         # Ako dobijeni motiv ima skor bolji od do sada najboljeg, vrednosti se
    ↪       azuriraju
111         current_score = score(motifs, k)
```

```
112
113         if current_score < best_score:
114             best_motifs = copy.deepcopy(motifs)
115             best_score = current_score
116
117     return best_motifs
118
119 def main():
120     dna = [
121             'GTAGATGTCATTAGCATGCAC',
122             'CCTAGCCACTCTGCCATGTCG',
123             'AACTCGTGCATTCTACGACTG',
124             'AAACTTTCCGGATCTTCATAC',
125             'CTACATCATCGAAGGCTACGC'
126         ]
127
128     print(gibbs_sampler(dna, 4, len(dna), 500))
129
130
131 if __name__ == "__main__":
132     main()
```

Glava 3

Kako složiti genomsku slagalicu od milion delova?

U ovom poglavlju predstavićemo dati problem i prikazati kako možemo primeniti grafovske algoritme nad problemom slaganja genomske slagalice. Poglavlje ćemo započeti pričom o sekvenciranju genoma. Do sada smo videli šta za nas znači pojam DNK – da se podsetimo, to je niska karaktera nad azbukom $\Sigma = \{A, C, G, T\}$. Biološki posmatrano, DNK je molekul koji se nalazi u svakoj ćeliji svakog organizma i da je u njemu zapisan način pravilnog razvoja i funkcionisanja svakog organizma.

3.1 Šta je sekvenciranje genoma?

Sa biološke strane, genom jednog organizma predstavlja njegov genetski materijal. Pod genetskim materijalom podrazumevamo delove genoma koji se nasleđuju koji se nasleđuje i koji svi predstavnici jedne vrste dele u velikoj meri. Kod većine organizama, genetski materijal je sadržan u DNK, odnosno, genom je ekvivalentan sa DNK molekulima. Kod nekih drugih organizama koji su u manjini, kao što su, na primer, virusi, važi da oni ne sadrže DNK i njihov genetski materijal se nalazi u ribonukleinskoj kiselini – RNK – o kojoj će biti reči u nastavku.

Kod čoveka, genom sadrži oko tri milijarde nukleotida. Dakle, sa računarske strane posmatrano genom je niska karaktera nad azbukom $\Sigma = \{A, C, G, T\}$. Kompleksnost organizma nije u relaciji sa veličinom genoma. Genomi nekih organizama su i stotinu puta veći od humanog genoma. Na primer, jedna vrsta amebe ima 670 milijardi nukleotida ili jedna vrsta kaktusa koja raste u Japanu ima 150 milijardi nukleotida.

Sekvenciranje genoma podrazumeva otkrivanje sastava genoma. U pitanju je eksperimentalan proces – da bismo saznali šta se nalazi u sastavu jednog genoma, potreban nam je uzorak tkiva odgovarajuće vrste. U nastavku dajemo kratak pregled razvoja sekvenciranja genoma.

3.1.1 Kratka istorija sekvenciranja genoma

Kao što smo videli, sekvenciranje genoma je eksperimentalan proces, za koji je neophodna veoma sofisticirana tehnologija. Pre svega možemo govoriti o razvoju fizičko-hemijskih tehnika koje bi dovele do mogućnosti saznavanja sastava genoma. Walter Gilbert i Frederick Sanger su 1977. godine razvili nezavisne metode sa sekvenciranje genoma, za koje su, 1980. godine, podelili Nobelovu nagradu. Međutim, iako su njihovi metodi bili pionirski u ovoj oblasti, njihove metode za sekvenciranje su bile veoma skupe – za sekvenciranje humanog genoma je bilo potrebno 3 milijarde dolara.

Krajem 2000-ih Sanger metodom je sekvencioniran veliki broj genoma. Visoka cena je bila ograničavajući faktor i za dalji napredak je bila neophodna nova tehnologija sekvencioniranja.

NGS (skr. *Next Generation Sequencing*) predstavlja metode nove generacije sekvencioniranja, odnosno, novu generaciju mašina sekvencera koji vrše sekvencioniranje. *Illumina*, jedan od proizvođača sekvencera, smanjuje trošak sekvencioniranja humanog genoma sa 3 milijarde na 10 hiljada dolara. Kompanija *Complete Genomics* otvara genomsku fabriku u Silikonskoj dolini koja sekvencionira stotine genoma mesečno. Pekinški genomski institut (*Beijing Genome Institute*, skr. *BGI*) preuzima Complete Genomics 2013. godine i postaje najveći svetski centar za sekvenciranje genoma. Na slici 3.1 prikazano je kako se cena sekvencioniranja menjala godinama.

Slika 3.1: Cena sekvencioniranja kroz istoriju.

3.1.2 Sekvenciranje ličnih genoma

Prirodno je zapitati se o značaju poznavanja sastava genoma. Što je tiče biljaka, neke od primena sekvenciranja su: razvoj novih biljnih vrsta u poljoprivredi, određivanje pogodnog podneblja za neku biljnu vrstu, u farmaciji, i dr. Međutim, najznačajnija primena je u sekvenciranju ličnih genoma.

Genomi se kod različitih ljudi razlikuju na malom broju pozicija (u proseku sadrže jednu mutaciju na hiljadu nukleotida). Ova razlika je odgovorna za, na primer, različite visine kod ljudi, da li će imati sklonost ka visokom holesterolu ili ne, za veliki broj genetskih bolesti, itd.

Godine 2010. Nicholas Volker je postao prvo ljudsko biće čiji je život spašen zahvaljujući genomskom sekvencioniranju. Lekari nisu mogli da postave tačnu dijagnozu i morali su da ga podvrgnu velikom broju operacija pokušavajući da je utvrde. Sekvenciranje je otkrilo retku mutaciju na jednom genu (XIAP) koja je bila povezana sa oštećenjem njegovog imunog sistema. Ovo otkriće je navelo lekare na adekvatnu terapiju koja je rešila problem.

3.2 Eksplozija u štampariji

Razmotrimo sledeći primer. Neka imamo hiljadu kopija istog izdanja novina na jednoj gomili, a ispod njih postavljen je dinamit. Upalimo fitilj i zamislimo da nije sve samo izgorelo već da se raspršilo u milione delića papira. Kako možemo da iskoristimo te deliće da bismo saznali koje su bile vesti iz tog izdanja? Ovaj problem nazvaćemo *Problem novina* (videti sliku 3.2).

Slika 3.2: Problem novina poslužiće nam u razumevanju problema slaganja genoma.

Problem novina je mnogo teži nego što izgleda. Kako smo imali više kopija istog izdanja, i kako smo izgubili neki deo informacija prilikom eksplozije, ne možemo samo da prilepimo deliće novina kao da su slagalica. Umesto toga, potrebno je da preklopimo delove različitih novina kako bismo rekonstruisali jedan primerak.

Slika 3.3: Spajanje delova različitih novina koji se jednim delom preklapaju.

Određivanje redosleda nukleotida u genomu, odnosno sekvenciranje genoma, predstavlja bitan problem u bioinformatici. Već smo pomenuli da dužine genoma variraju – humani genom je dugačak oko 3 milijarde nukleotida, dok je genom jednoćelijskog organizma *Amoeba dubia* čak 200 puta duži.

Razmotrimo sada povezanost problema novina i sekvenciranja genoma. Kopije izdanja u problemu novina odgovaraju ono predstavlja ulaz u sekvencerima – uzorak tkiva. Moderne

mašine za sekvenciranje ne mogu da pročitaju ceo genom nukleotid po nukleotid od početka do kraja (kao što bismo pročitali knjigu). Mogu samo da iseckaju genom i generišu njegova kratka *očitavanja* (engl. *reads*). Kako to zapravo funkcioniše?

Na slici 3.4 ilustrovan je proces sekvenciranja. Sekvencer dobija milione kopija istog genoma. Zatim vrši očitavanja čime dobijamo deliće odnosno kratke podniske. Neki delovi odnosno očitavanja biće izgubljena (kao delići novina u eksploziji, dakle gubimo deo informacija). Očitavanja su izmešana i ono što nam sekvencer daje je zapravo kolekcija podniski koje treba spojiti u jednu. Sastavljanje genoma nije isto kao i slaganje slagalice – moramo da koristimo preklapajuća očitavanja da bismo rekonstruisali genom.

Slika 3.4: Ilustracija problema.

3.3 Problem sekvenciranja genoma

Do sada smo videli šta predstavlja sekvenciranje genoma, koja je njegova biološka podloga i kako se on definiše kao biološki problem. Pređimo sada na formulisanje računarskog problema sekvenciranja genoma kao problem rekonstrukcije niske.

Problem sekvencioniranja genoma: Rekonstruisati genom na osnovu očitavanja.
Ulaz: Kolekcija niski *Reads*.
Izlaz: Niska *Genome* rekonstruisana na osnovu *Reads*.

Ovo nije dobro definisan problem. Potrebno je uvesti dodatne pojmove kako bismo uspeli da problem sekvencioniranja genoma predstavimo kao problem rekonstrukcije niske.

Definišemo pojam *k-gramski sastav niske* na sledeći način. k-gramski sastav niske $Text$, u oznaci $Composition_k(Text)$, predstavlja kolekciju podniski dužine k niske $Text$, pri čemu su u kolekciju uključeni duplikati. Na primer, neka je $Text = TAATGCCATGGGATGTT$. Njen 3-gramski sastav niske $Text$ izgleda:

```
Composition_3(TAATGCCATGGGATGTT) =
              TAA
               AAT
                ATG
                 TGC
                  GCC
                   CCA
                    CAT
                     ATG
                      TGG
                       GGG
                        GGA
                         GAT
                          ATG
                           TGT
                            GTT
```

odnosno, ako kolekciju uredimo po leksikografskom poređenju:

```
Composition_3(TAATGCCATGGGATGTT) =
AAT ATG ATG ATG CAT CCA GAT GCC GGA GGG GTT TAA TGC TGG TGT
```

Sada možemo malo bolje da definišemo problem.

Problem rekonstrukcije niske: Rekonstruisati nisku na osnovu njenog k-gramskog sastava.
Ulaz: Kolekcija k-grama.
Izlaz: Niska *Genome* takva da je $Composition_k(Genome)$ ekvivalentno kolekciji k-grama.

Započnimo prvo sa naivnim pristupom rešavanju ovog problema. Odaberimo jedan k-gram za početni. Zatim nižemo ostale tako da se sufiks poslednjeg odabranog poklopi sa prefiksom nekog od preostalih k-grama. Pri tome, ako ima više takvih k-grama, biramo proizvoljan jedan. Na ovaj način možemo doći do rešenja, ali je veoma skupo. Pri tome, velika je šansa da ćemo se negde zaglaviti (tj. nijedan od preostalih k-grama neće biti kandidat za nadovezivanje na tekuću nisku) ili zbog izbora početnog k-grama ili zbog izbora nekog od preostalih k-grama kada je postojalo više odgovarajućih. Sledeći primer ilustruje ovaj problem.

Neka nam je dat sledeći 3-gramski sastav: `AAT ATG ATG ATG CAT CCA GAT GCC GGA GGG GTT TAA TGC TGG TGT`. Treba rekonstruisati nisku koja ima takav sastav. Biramo početni 3-gram, neka to bude na primer `TAA`. Zatim na njega treba nadovezati 3-gram koji počinje njegovim sufiksom dužine 2, odnosno onaj 3-gram koji ima prefiks `AA`. U našem slučaju, postoji jedan takav 3-gram i njega nadovezujemo na tekuću nisku, tako da sada imamo `TAAT`. Zatim biramo 3-gram čiji je prefiks `AT`. Ovog puta imamo 3 kandidata, ali, na našu sreću, sva tri su isti 3-grami, `ATG`. U takvom slučaju nije bitno koji smo odabrali, jer su svi jednaki. Nadovezujemo ga na tekuću nisku i dobijamo `TAATG`. Tražimo 3-grame sa prefiksom `TG`, koji do sad nisu upotrebljeni. Ponovo pronalazimo 3 kandidata. Međutim, u ovom slučaju, svi kandidati predstavljaju različite 3-grame, a to su `TGC`, `TGG` i `TGT`. Naivni pristup kaže da biramo jedan od njih, i recimo da smo odabrali `TGT` i dobili nisku `TAATGT`. Sada nam je potreban 3-gram sa prefiksom `GT` i tu dolazi do zaglavljivanja. Imamo još 3-grama koji nisu iskorišćeni za rekonstrukciju niske, ali nijedan ne možemo da iskoristimo u ovom trenutku. U takvim situacijama treba se vratiti u nazad do koraka u kom je bilo više kandidata.

3.4 Rekonstrukcija niske kao problem Hamiltonove putanje

Videli smo da nam naivni pristup ne odgovara i moramo smisliti bolje rešenje. Mogli bismo da iskoristimo znanja iz teorije grafova za rešavanje ovakvog problema. U tom slučaju, prvi zadatak je da našu nisku predstavimo u vidu grafa.

3.4.1 Genom kao putanja

Vratimo se na prethodni primer. Dat nam je naredni 3-gramski sastav:

```
Composition_3(TAATGCCATGGGATGTT) =
              TAA
               AAT
                ATG
                 TGC
                  GCC
                   CCA
                    CAT
                     ATG
                      TGG
                       GGG
                        GGA
                         GAT
                          ATG
                           TGT
                            GTT
```

Ovakav 3-gramski sastav možemo predstaviti kao graf na sledeći način. Svakom čvoru u grafu odgovara jedan od k-grama. Zatim, potrebne su nam grane koje će povezati te čvorove. Dva čvora su povezana usmerenom granom ako izlazni čvor ima sufiks koji je jednak prefiksu ulaznog čvora te grane, kao što je prikazano na slici 3.5.

Slika 3.5: Graf koji odgovara 3-gramskom sastavu niske $TAATGCCATGGGATGTT$.

Jasno je da postoji više puteva u ovom grafu. Postavlja se pitanje – da li možemo da pronađemo genomsku putanju u ovom grafu, od svih koje postoje?

Podsetimo se šta je Hamiltonova putanja. Hamiltonova putanja je putanja koja posećuje svaki čvor u grafu tačno jednom. To je upravo ono što nam je potrebno za rešavanje problema. Svaki čvor predstavlja jedan k-gram i potrebno nam je da svi k-grami budu uključeni u rekonstruisanu nisku tačno jednom.

Problem Hamiltonove putanje: Naći Hamiltonovu putanju u grafu.
Ulaz: Graf.
Izlaz: Putanja koja posećuje svaki čvor u grafu tačno jednom.

Iako deluje kao da smo rešili sve probleme, zapravo smo naišli na još jednu veliku prepreku. Naime, pronalaženje Hamiltonovog puta u grafu je NP-kompletan problem, što znači da ne postoji algoritam koji ga rešava u polinomijalnom vremenu. U tom slučaju, moramo da se vratimo na početak, a to je predstavljanje k-gramskog sastava grafom.

3.5 Rekonstrukcija niske kao Ojlerove putanje

U prethodnoj sekciji, k-grame smo predstavili čvorovima u grafu i u njemu tražili Hamiltonov put, odnosno, put koji obilazi svaki čvor tačno jednom. Videli smo da za taj problem još uvek nije poznat efikasan algoritam pa se sada pitamo kako možemo izmeniti graf tako da ne zahteva traženje Hamiltonove putanje.

Ono što se javlja kao ideja jeste obeležavanje grana umesto čvorova. Dakle, svaka grana biće obeležena jednim k-gramom. Izlazni čvor biće obeležen prefiksom k-grama te grane, dok će ulazni čvor biti obeležen sufiksom istog tog k-grama. Slika 3.6 ilustruje ovaj postupak za nisku $TAATGCCATGGGATGTT$.

Slika 3.6: Graf koji odgovara 3-gramskom sastavu niske $TAATGCCATGGGATGTT$. Grane su obeležene 3-gramima, a čvorovi 2-gramima koji predstavljaju prefikse i sufikse.

Primećujemo da su neki čvorovi obleženi identično (na primer, imamo tri čvora sa oznakom AT). Sve čvorove koji imaju istu oznaku treba spojiti u jedan, pri čemu zadržavamo sve grane koje su ulazile u taj čvor ili su izlazile iz njega. Ponavljamo postupak dokle god imamo čvorove koji imaju istu oznaku i na kraju dobijamo graf koji nazivamo *De Brojnov graf*. Slika 3.7 ilustruje De Brojnov graf dobijen ovom procedurom od polaznog grafa sa slike 3.6.

Ovime smo dobili novu reprezentaciju niske pomoću grafa. Prirodno se postavlja naredno pitanje – gde se nalazi niska *Genome* u ovoj reprezentaciji grafa? Kako nam se 3-grami sada nalaze na granama, a ne u čvorovima, potrebno je da pronađemo putanju u grafu koja prolazi sve grane tačno jednom. Takav put nazivamo *Ojlerova putanja*. Srećom, algoritam za pronalaženje Ojlerove putanje u grafu nije NP-kompletan i možemo efikasno da je pronađemo.

Problem Ojlerove putanje: Pronaći Ojlerovu putanju u grafu.
Ulaz: Graf.
Izlaz: Putanja koja posećuje svaku granu u grafu tačno jednom.

Sada znamo kako možemo da dobijemo nisku kada znamo De Brojnov graf koji odgovara njenom k-gramskom sastavu. Međutim, konstruisali smo De Brojnov graf na osnovu genoma, ali u realnim primenama, genom je nepoznat.

Slika 3.7: De Brojnov graf koji odgovara niski $TAATGCCATGGGATGTT$.

3.6 De Brojnovi grafovi na osnovu kolekcije k-grama

Videli smo kako možemo od zadate niske pronaći De Brojnov graf. Nažalost, u primenama nije nam poznata niska, ali znamo njen k-gramski sastav. Postavlja se pitanje kako možemo konstruisati De Brojnov graf od k-gramskog sastava niske.

Za svaki k-gram pravimo dva čvora i jednu granu – oznaka grane je upravo taj k-gram, oznaka izlaznog čvora je prefiks, a ulaznog čvora je sufiks datog k-grama. Time dobijamo nepovezani graf kao na slici 3.8. Zatim lepimo identične čvorove sve dok ne dobijemo graf čiji svi čvorovi imaju različite oznake. Na slici 3.9 dat je jedan korak ovog postupka, međutim, tu nije kraj jer i dalje postoje čvorovi sa istim oznakama.

Slika 3.8: Svaki k-gram prestavljen je pomoću dva čvora i jedne grane.

Slika 3.9: Prvi korak u postupku lepljenja čvorova. Napomenimo da postupak nije završen jer treba zalepiti čvorove sa identičnim oznakama (na primer, AT).

Po završetku postupka dobijamo de Brojnov graf koji je isti kao onaj koji smo dobili kada smo znali nisku, odnosno, graf na slici 3.7. Svaka grana je označena jednim k-gramom, a svaki čvor je označen prefiksom, odnosno, sufiksom odgovarajuće izlazne, odnosno, ulazne grane, redom. Naravno, čvovori koji imaju identične oznake su zalepljeni.

3.7 Ojlerova teorema

Za rešavanje problema Ojlerove putanje koji smo predstavili u prethodnoj sekciji možemo iskoristiti rešenje narednog problema. Ovaj problem je značajan jer postoji teorema koja ga prati, a koja određuje uslove za njegovo rešavanje.

Problem Ojlerovog ciklusa: Pronaći Ojlerov ciklus u grafu.
Ulaz: Graf.
Izlaz: Ciklus koji posećuje svaku granu u grafu tačno jednom.

Kažemo da je graf Ojlerov ako sadrži Ojlerov ciklus. Ispostavlja se da postoje određene karakteristike koje određuju da li je graf Ojlerov. Uvedimo pojmove povezan graf i balansiran graf. Kažemo da je graf *povezan* ako za ma koja dva čvora postoji putanja koja ih povezuje. Graf je *balansiran* ako za svaki čvor važi da mu je izlazni stepen jednak ulaznom. Naredna teorema govori o potrebnim i dovoljnim uslovima da graf bude Ojlerov.

Teorema 3.1 (Ojlerova teorema)**.** *Svaki Ojlerov graf je balansiran. Svaki povezan graf i balansiran graf je Ojlerov.*

3.7.1 Dokaz Ojlerove teoreme

Neka nam je dat povezan balansiran graf. Da bismo pokazali da graf sadrži Ojlerov ciklus, postavićemo mrava na bilo koji od čvorova tog grafa, kao na slici 3.10. Zašto baš mrav? Poznato je da mravi nikada ne idu istim putem dva puta pa smo sigurni da će naš mrav proći svaku granu tačno jednom.

Puštamo mrava da slučajno odabira grane kojima će se kretati. Ako je veoma pametan, obići će svaku granu jednom i vratiće se u početni čvor. Međutim, velike su šanse da nije veoma pametan i da će se u nekom čvoru zaglaviti, odnosno, neće imati granu koju već nije obišao.

Da li mrav može da se zaglavi u bilo kom čvoru? Ispostavlja se da može da se zaglavi samo u početnom čvoru (jer je graf balansiran). U trenutku kada se zaglavio on je napravio ciklus. Samo, taj ciklus nije Ojlerov jer još uvek nije obišao sve grane. Ideja je da odabere drugačiji početni čvor iz kog će krenuti obilazak. Koji čvor će izabrati? Treba da izabere čvor iz ciklusa koji ima izlaznih grana koje još uvek nije obišao (slika 3.11).

Slika 3.10: Mrav je postavljen u crveni čvor i odatle kreće obilazak povezanog balansiranog grafa.

Slika 3.11: Mrav se zaglavio i pokušava ponovo iz drugog čvora koji pripada ciklusu i ima izlazne grane koje nisu posećene.

Sada, mrav pokušava ispočetka iz novog čvora. Prvo obilazi ciklus koji je već pronašao u prethodnom pokušaju, a zatim nastavlja obilazak preko neposećenih grana. Na taj način, ciklus se uvećava dok se ne dođe do Ojlerovog. Ukoliko se ponovo zaglavi (slika 3.12) ponovo bira novi početni čvor, obilazi pronađeni ciklus (koji i dalje nije Ojlerov) i tako sve dok ne uspe da obiđe sve grane (slika 3.13).

Dokaz Ojlerove teoreme daje primer konstruktivnog dokaza, koji ne dokazuje samo željeni rezultat, već pruža metod za konstrukciju onoga što nam je potrebno. Ukratko, pratili smo kretanje mrava dok nije pronašao Ojlerov ciklus u povezanom balansiranom grafu, što je sumirano u algoritmu `EulerianCycle`.

Slika 3.12: Mrav se ponovo zaglavio i pokušava od novog čvora.

Slika 3.13: Mrav je konačno uspeo da pronađe dobar početni čvor i Ojlerov ciklus. Grane su obeležene redosledom kojim su posećene.

```
EulerianCycle(BalancedGraph)
begin
    form a Cycle by randomly walking in BalancedGraph (avoiding already visited
    ↪ edges)
    while Cycle is not Eulerian
        select a node newStart in Cycle with still unexplored outgoing edges
        form a Cycle' by traversing Cycle from newStart and randomly walking
    ↪ afterwards
        Cycle ← Cycle'
    return Cycle
end
```

Ovaj algoritam radi u linearnom vremenu. Da bi se zaista postigla ta efikasnost, potrebne su efikasne struktutre podataka za održavanje ciklusa koje mrav pronalazi kao i za liste neiskorišćenih grana za svaki čvor i lista čvorova u trenutnom ciklusu koji imaju neiskorišćene grane.

3.8 Sastavljanje parova očitavanja

Predstavimo kao da su svi naši problemi rešeni. Međutim, može se javiti više Ojlerovih putanja u grafu. Srećom, i za ovo imamo jednostavno rešenje.

3.8.1 DNK sekvenciranje sa parovima očitavanja

Imamo više identičnih kopija genoma i na slučajnim pozicijama sečemo genom na fragmente iste dužine *InsertLength*. Zatim generišemo *parove očitavanja* – dva očitavanja sa krajeva svakog fragmenta na jednakoj, fiksiranoj udaljenosti. Pod *uparenim k-gramom* podrazumevamo par k-grama na fiksiranom rastojanju d u genomu. *Upareni k-gramski sastav*, u oznaci $PairedComposition_k(Text)$, sastoji se od svih k-grama niske $Text$ i njihovih parova.

Slika 3.14: `TCA` i `TCC` na rastojanju $d = 11$ čine jedan upareni 3-gram.

Dajmo jedan primer. Neka imamo nisku `TAATGCCATGGGATGTT`, i upareni 3-gram `TAA` i `GCC`. Upareni k-gramski sastav date niske prikazan je na slici 3.15.

Slika 3.15: *PairedComposition* niske `TAATGCCATGGGATGTT` i njegov leksikografski poredak.

Sada možemo formulisati naredni problem.

Problem rekonstrukcije niske na osnovu parova očitavanja: Rekonstruisati nisku na osnovu njenih uparenih k-grama.
Ulaz: Kolekcija uparenih k-grama.
Izlaz: Niska $Text$ takva da je $PairedComposition_k(Text)$ jednak kolekciji uparenih k-grama.

Kako konstruisati upareni De Brojnov graf na osnovu uparenog k-gramskog sastava? Postupak je sličan prethodnom slučaju, kada nismo imali parove. Pretpostavimo da je dat genom (niska *Genome*). Posmatrajmo genom kao putanju u grafu obeleženom na osnovu njegovog uparenog k-gramskog sastava (videti sliku 3.16). Svaka grana obeležena je uparenim k-gramom, a svaki čvor uparenim prefiksom, odnosno, sufiksom k-grama.

Slika 3.16: Graf koji odgovara uparenom 3-gramskom sastavu niske `TAATGCCATGGGATGTT`.

Potrebno je zalepiti čvorove sa istom oznakom, tako da svi čvorovi budu jedinstveno obeleženi. Postupak je identičan prethodnom slučaju, odnosno, kada nismo imali parove. Primetimo da sada imamo mnogo manje lepljenja jer imamo samo dva čvora sa istom oznakom (`TG AT`), (videti sliku 3.17).

Slika 3.17: Dva čvora sa oznakom (`TG AT`) spajaju se u jedan pri čemu su sve grane, incidentne sa tim čvorovima, očuvane.

Kao i u prethodnom slučaju, pretpostavili smo da je dat genom (niska *Genome*), što često nije slučaj. Posmatrali smo genom kao putanju u grafu obeleženom na osnovu njegovog uparenog k-gramskog sastava. Sada pretpostavimo da nije dat genom već samo upareni k-gramski sastav. Za svaki upareni k-gram pravimo dva čvora i jednu granu, zatim lepimo identične čvorove (videti 3.18), i na kraju dobijamo upareni De Brojnov graf, kao onaj na slici 3.17.

Slika 3.18: Konstrukcija uparenog De Brojnovog grafa na osnovu uparenih k-grama.

Dakle, upareni De Brojnov graf, na osnovu kolekcije uparenih k-grama, dobijamo tako što svaku granu označavamo jednim uparenim k-gramom. Zatim, svaki čvor označavamo prefiksima, odnosno, sufiksima odgovarajuće izlazne, odnosno, ulazne grane, redom. Na kraju, lepimo čvorove sa identičnim oznakama.

3.9 U realnosti

Ovde smo imali neke nerealne pretpostavke:

- Savršena pokrivenost genoma očitavanjima (svaki k-gram iz genoma je očitan). Očitavanja dužine 250 nukleotida dobijena *Illumina* tehnologijom predstavljaju samo mali deo 250-grama unutar genoma. Rešenje je u razbijanju dobijenih očitavanja na kraće k-grame (kao na slici 3.19).
- Očitavanja ne sadrže greške. U ovom slučaju, ako bismo razbili na manje k-grame, onda bismo dobili više niski koje imaju pogrešno očitavanje. Postavljamo pitanje kako se ovakvi

slučajevi manifestuju u konstrukciji DeBrojnovog grafa. Dolazi do stvaranja *balončića* (engl. *bubble*) u grafu (videti sliku 3.20). Jednostavan je slučaj kada govorimo o grešci na jednom očitavanju, međutim, ukoliko postoji više grešaka, onda dolazi do *eksplozije balončića* (videti sliku 3.21).

- Rastojanja između očitavanja u okviru parova očitavanja su egzaktna.

- itd.

```
atgccgtatggacaacgact
atgccgtatg
  gccgtatgga
     gtatggacaa
          gacaacgact
```

```
atgccgtatggacaacgact
atgcc
 tgccg
  gccgt
   ccgta
    cgtat
     gtatg
      tatgg
       atgga
        tggac
         ggaca
          gacaa
           acaac
            caacg
             aacga
              acgac
               cgact
```

Slika 3.19: Primer razbijanja dobijenih očitavanja na manje k-grame.

Slika 3.20: Primer pojave balončića u De Brojnovom grafu usled pojave greške u očitavanju nukleotida `T` nukleotidom `C`.

Slika 3.21: Eksplozija balončića.

3.10 Zadaci sa vežbi

U nastavku će biti predstavljeni zadaci sa vežbi na kursu rađeni u programskom jeziku Python.

3.10.1 Maximal Non Branching Path

```
from collections import deque
import copy

# Secenje DNK niske na k-mere
def string_to_k_mers(dna_string, k):
    k_mers = []

    for i in range(len(dna_string) - (k-1)):
        k_mer = dna_string[i:i+k]
        k_mers.append(k_mer)

    return k_mers

# Konstruisanje Debruijn grafa od k-mera
def debruijn_graph_from_k_mers(k_mers):
    G = {}

    for k_mer in k_mers:
        u = k_mer[:-1]
        v = k_mer[1:]

        if u in G:
            if v not in G[u]:
                G[u].append(v)
        else:
            G[u] = [v]

        if v not in G:
            G[v] = []

    return G
```

```
32
33
34 # Izracunavanje ulaznog i izlaznog stepena za zadati cvor
35 def degree(G, v):
36     out_deg = len(G[v])
37     in_deg = 0
38
39     for u in G:
40         if v in G[u]:
41             in_deg += 1
42
43     return (in_deg, out_deg)
44
45 # Pronalazenje izolovanih 1 in 1 out ciklusa u grafu polazeci od zadatog cvora
46 def isolated_cycle(G, v):
47     cycle = []
48
49     (in_deg, out_deg) = degree(G, v)
50
51     while in_deg == 1 and out_deg == 1:
52         u = G[v][0]
53         cycle.append((v,u))
54         if cycle[0][0] == cycle[-1][1]:
55             return cycle
56
57         v = u
58         (in_deg, out_deg) = degree(G, v)
59
60     return None
61
62
63 # Pronalazenje maksimalnih nerazgranatih putanja u grafu
64 def maximal_non_branching_paths(G):
65     paths = []
66     visited = {}
67
68     for v in G:
69
70         (v_in_deg, v_out_deg) = degree(G, v)
71         if v_in_deg != 1 or v_out_deg != 1:
72
73             visited[v] = True
74
75             if v_out_deg > 0:
76
77                 for w in G[v]:
78                     non_branching_path = [(v,w)]
79
80                     visited[w] = True
81                     (w_in_deg, w_out_deg) = degree(G, w)
82
83                     while w_in_deg == 1 and w_out_deg == 1:
84                         u = G[w][0]
```

```
                        non_branching_path.append((w,u))
                        w = u
                        visited[w] = True
                        (w_in_deg, w_out_deg) = degree(G, w)

                    paths.append(non_branching_path)

    for v in G:
        if v not in visited:
            c = isolated_cycle(G, v)
            if c != None:
                paths.append(c)

    return paths


# Konstruisanje DNK niske od dobijene putanje
def create_string_from_path(path):

    dna_string = path[0][0]

    for i in range(len(path)):
        dna_string += path[i][1][-1]

    return dna_string


def main():
    dna_string = "AATCGTGACCTCAACT"
    #               TCGTGAC
    #             AATC
    #                           ACT
    #                     ACCT
    #                          AAC
    #                       TCAAC
    k = 3
    k_mers = string_to_k_mers(dna_string, k)
    g = debruijn_graph_from_k_mers(k_mers)
    paths = maximal_non_branching_paths(g)

    print(paths)

if __name__ == "__main__":
    main()
```

3.10.2 All Euler Cycles

```
from collections import deque
import copy

# Izracunavanje ulaznog i izlaznog stepena za zadati cvor
def degree(G, v):
    out_deg = len(G[v])
```

```
    in_deg = 0

    for u in G:
        if v in G[u]:
            in_deg += 1

    return (in_deg, out_deg)

# Pronalazenje izolovanih 1 in 1 out ciklusa u grafu polazeci od zadatog cvora
def isolated_cycle(G, v):
    cycle = []

    (in_deg, out_deg) = degree(G, v)

    while in_deg == 1 and out_deg == 1:
        u = G[v][0]
        cycle.append((v,u))
        if cycle[0][0] == cycle[-1][1]:
            return cycle

        v = u
        (in_deg, out_deg) = degree(G, v)

    return None

# Konstruisanje DNK niske od dobijene putanje
def create_string_from_path(path):

    dna_string = path[0][0].replace("'",'')

    for i in range(len(path)):
        dna_string += path[i][1].replace("'",'')[-1]

    return dna_string


# Pronalazenje cvorova od kojih postoje grane ka zadatom cvoru v
def incoming(G, v):
    in_list = []

    for u in G:
        if v in G[u]:
            in_list.append(u)

    return in_list

# Pronalazenje cvorova do kojih postoje grane od zadatog cvora v
def outgoing(G, v):
    return G[v]


# Pravljenje (u,v,w) "zaobilaznice" u zadatom grafu G
def bypass(G, u, v, w):
```

```
    G_p = copy.deepcopy(G)
    G_p[u].remove(v)
    G_p[v].remove(w)
    G_p[u].append(v+"'")  #v'
    G_p[v+"'"] = [w]
    return G_p


def DFS(G, v, visited):
    visited[v] = True

    for w in G[v]:
        if w not in visited:
            DFS(G, w, visited)


# Provera da li je graf povezan u odnosu na DFS obilazak iz zadatog cvora
def is_connected(G):

    visited = {};
    for v in G:
        DFS(G,v,visited)
        break;

    for v in G:
        if v not in visited:
            return False

    return True

# Pronalazenje svih Ojlerovih ciklusa u zadatom grafu G
def all_eulerian_cycles(G):
    all_graphs = deque([copy.deepcopy(G)])
    cycles = []

    while len(all_graphs) > 0:
        G_p = all_graphs.popleft()
        v_p = None
        for v in G_p:
            (in_deg, out_deg) = degree(G_p, v)

            if in_deg > 1:
                v_p = v
                break

        if v_p != None:
            for u in incoming(G_p, v_p):
                for w in outgoing(G_p, v_p):
                    new_graph = bypass(G_p, u, v, w)
                    if is_connected(new_graph):
                        all_graphs.append(copy.deepcopy(new_graph))
        else:
            for k in G_p:
```

```
                cycle = isolated_cycle(G_p, k)
                if cycle != None:
                    path = create_string_from_path(cycle)
                    if path not in cycles:
                        cycles.append(path);

    return cycles




def main():
    G = {'AT' : ['TC'], 'TC' : ['CG'], 'CG': ['GA','GG'], 'GA':['AT','AC'], 'AC
    ↪ ':['CG'], 'GG':['GA']}

    print(all_eulerian_cycles(G))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

3.10.3 String Spelled By Gapped Patterns

```
# Sastavljanje DNK niske pomocu k-mera
def string_spelled_by_patterns(patterns, k):
    dna_string = patterns[0][:-1]

    for i in range(0, len(patterns)):
        dna_string += patterns[i][-1]

    return dna_string

# Sastavljanje DNK niske pomocu parova k-mera na udaljenosti d
def string_spelled_by_gapped_patterns(gapped_patterns, k, d):
    first_patterns = [s[0] for s in gapped_patterns]
    second_patterns = [s[1] for s in gapped_patterns]

    prefix_string = string_spelled_by_patterns(first_patterns, k)
    suffix_string = string_spelled_by_patterns(second_patterns, k)

    print(prefix_string)
    print(suffix_string)

    for i in range(k+d, len(prefix_string)):
        if prefix_string[i] != suffix_string[i-k-d]:
            print('There is no string spelled by the gapped patterns')
            return ''
    return prefix_string + suffix_string[-k-d:]


def main():
    gapped_patterns = [('CTG','CTG'),('TGA','TGA'),('GAC','GAC'),('ACT','ACT')]

    print(string_spelled_by_gapped_patterns(gapped_patterns, 3, 1))
```

```
32
33 if __name__ == "__main__":
34     main()
```

Glava 4

Kako sekvenciramo antibiotike?

U ovom poglavlju i dalje govorimo o sekvenciranju, ali ćemo proširiti pogled i pokazati različite načine za sekvenciranje peptida.

4.1 Otkriće antibiotika

Pre svega, krenućemo sa biološkim uvodom. Šta su to antibiotici? Sama reč antibiotik znači ,,onaj koji ubija život", a tačnije, on predstavlja supstancu koja ubija bakterije. Kada ostavimo pomorandžu dugo negde gde je toplo, ona će da razvije čudne osobine kao što je buđ. Šta to znači? Buđ jeste jedna vrsta antibiotika što znači da se antibiotici nalaze u prirodi i da ih proizvode organizmi iz porodice gljiva (npr. buđi) i bakterija.

Mi ćemo posmatrati antibiotike na molekularnom nivou koji nam govori od čega su oni zapravo izgrađeni. Od svih antibiotika posmatraćemo ***tirocidin B1***, antibiotik koji proizvodi bakterija *Bacillus Brevis*. Tirocidin B1 na molekulskom nivou pripada *peptidima*, kratkim niskama aminokiselina, odnosno malim proteinima. Ovo je skok u odnosu na ono što smo do sada posmatrali – nukleotidne niske nad četvorostrukom azbukom $\Sigma = \{A, C, G, T\}$, odnosno DNK. Za DNK smo govorili da se pojavljuje u svakoj ćeliji svakog živog bića i da je veoma značajna supstanca jer sadrži recept (tačnije, nosi informaciju) za pravilno funkcionisanje i razvoj svakog živog bića. Da bi se svako živo biće pravilno razvijalo, neophodno je da njegove ćelije proizvode (sintetišu) u tačno određeno vreme određene supstance koje se nazivaju *proteini*. DNK nosi informaciju o tome kako treba neki protein da izgleda, od čega treba da se sastoji. Zašto je to bitno? Na primer, kada je dan, neke biljke treba da vrše fotosintezu, a za vršenje fotosinteze treba u samim ćelijama biljaka da se sintetišu određeni proteini.

Proteini su, nakon nukleinskih kiselina, druga značajna grupa molekula koja sa računarske tačke gledišta takođe predstavlja dugačke niske, ali ne nad azbukom od 4 karaktera, nego nad azbukom od 20 karaktera, a svaki karakter predstavlja molekul koji se naziva *aminokiselina*. Kao i nukleinske kiseline, aminokiseline se predstavljaju velikim latiničnim slovima $\{V, K, L, F, P, W, N, Q, Y, G, A, I, M, D,$ a pored toga postoje i troslovne oznake $\{Val, Lys, Leu, Phe, Pro, Trp, Asn, Gln, Tyr, Gly, Ala, Ile, Met, Asp, Glu, Ser$ U prirodi postoji mnogo više od 20 aminokiselina, ali 20 njih najčešće učestvuje u sastav proteina. DNK upravlja time kada će nastati protein u okviru ćelije. Recept za nastajanje svakog proteina je zapisan u DNK. Kako je taj recept zapisan, videćemo u nastavku.

Proteini se još nazivaju i *polipeptidi*. Dužina proteina je obično od 100 aminokiselina do nekoliko hiljada (proteini su kraći od genomske sekvence). Tirocidin B1 je peptid jer se sastoji iz malog broja aminokiselina, svega deset – $V, K, L, F, P, W, F, N, Q, Y$. Problem sekvenciranja antibiotika jeste problem određivanja aminokiselina koje ulaze u sastav tog antibiotika. U prethodnom poglavlju smo sekvencirali genom, ali tehnike iz prethodnog poglavlja nećemo moći da koristimo u sekvenciranju tirocidina B1, što će biti objašnjeno u poglavlju 4.2.

4.2 Kako bakterije prave antibiotike?

Pre rešavanja problema sekvenciranja antibiotika, govorićemo o zanimljivoj i kompleksnoj temi, a to je tema – kako se prave proteini? Već je pomenuto da se u okviru DNK nalazi recept za pravljenje proteina. Sada je vreme da se zapitamo kako je sve to zapisano u DNK pomoću A, C, G, T.

Znamo da je DNK dvostruki lanac čiji su krajevi označeni sa 5' i 3' (uvek čitamo lanac od 5' ka 3'). DNK jeste jedna vrsta nukleinskih kiselina koje postoje u ćeliji živih bića. Pored nje, postoje i različite vrste **ribonukleinskih kiselinina**, odnosno **RNK**. Ribonukleinske kiseline nisu predstavljene dvostrukim lancem, već jednostrukim. One se sastoje od nukleotida A, C, G, U. Umesto timina, kod RNK se pojavljuje nukleotid uracil koji se označava sa U.

DNK se ***prepisuje*** u RNK. Šta to znači? Da bi nastali proteini, neophodno je da se na osnovu dva lanca od DNK konstruiše RNK molekul. Pošto se RNK molekul sastoji od istih nukleotida kao i DNK, osim timina, onda kažemo da formiranje RNK na osnovu DNK predstavlja jednostavno *prepisivanje* nukleotida iz oba lanca DNK, uz zamenu nukleotida T sa nukleotidom U. Drugi naziv za prepisivanje jeste *transkripcija*. Ovo je prvi korak, i dalje nismo došli do aminokiseline, i dalje smo u azbuci nukleotida. RNK predstavlja jedan međukorak između DNK i samog proteina.

Drugi korak jeste *prevođenje*, odnosno *translacija*, prepisanog RNK u proteine. Imamo 4 nukleotida A, C, G, U i treba njih da prevedemo u nisku od 20 mogućih aminokiselina. To znači da mora da postoji neko preslikavanje, nekakav kod koji prevodi neke k-grame nukleotida u aminokiseline. Nad azbukom od 4 nukleotida postoji 16 različitih 2-grama, tj. bigrama. Da li možemo tih 16 bigrama da preslikamo u 20 aminokiselina? Tačnije, da li dva nukleotida možemo da preslikamo u jednu aminokiselinu? Ne možemo, jer moramo za svaku aminokiselinu da znamo koji je bigram označava. Pošto ne možemo to da uradimo sa bigramima, da li možemo sa 3-gramima? Svih mogućih 3-grama nad azbukom od 4 nukleotida ima 64. To znači da će svaka od aminokiselina imati svoj kod, a neke od njih će možda imati i više kodova, tj. više trigrama može da ukazuje na jednu aminokiselinu. To je u redu, bitno je da je naša funkcija „*na*", ne mora da bude „$1 - 1$". Ali kako napraviti funkciju? Ne možemo svojevoljno da dodelimo trigramima određene aminokiseline. Ta funkcija je unapred utvrđena, odnosno, prirodom determinisana i dokazana. U nastavku, koristićemo drugačiji naziv za naše 3-grame.

Definicija 4.1. ***Kodon*** *predstavlja jedan 3-gram (triplet) nukleotida.*

Preslikavanje o kojem je do sada bilo reči se naziva *genetski kod* i on je prikazan na slici 4.1.

Definicija 4.2. ***Genetski kod*** *predstavlja preslikavanje skupa kodona u skup aminokiselina.*

Vidimo da se, na primer, kodon UGG preslikava u aminokiselinu $Trp(W)$, dok se više kodona, $CUA, CUC, CUG, CUU, UUA, UUG$, preslikava u jednu aminokiselinu $Lys(L)$.

Redom, kodone iz RNK preslikavamo u aminokiseline. Ali, kako znamo da je kraj nekog proteina? U genetskom kodu je i tako nešto kodirano. Postoje tzv. **stop kodoni** koji označavaju da iza njih nema više aminokiselina koje čine taj protein. Ti stop kodoni su UAA, UAG, UGA.

0	AAA	K	16	CAA	Q	32	GAA	E	48	UAA	*
1	AAC	N	17	CAC	H	33	GAC	D	49	UAC	Y
2	AAG	K	18	CAG	Q	34	GAG	E	50	UAG	*
3	AAU	N	19	CAU	H	35	GAU	D	51	UAU	Y
4	ACA	T	20	CCA	P	36	GCA	A	52	UCA	S
5	ACC	T	21	CCC	P	37	GCC	A	53	UCC	S
6	ACG	T	22	CCG	P	38	GCG	A	54	UCG	S
7	ACU	T	23	CCU	P	39	GCU	A	55	UCU	S
8	AGA	R	24	CGA	R	40	GGA	G	56	UGA	*
9	AGC	S	25	CGC	R	41	GGC	G	57	UGC	C
10	AGG	R	26	CGG	R	42	GGG	G	58	UGG	W
11	AGU	S	27	CGU	R	43	GGU	G	59	UGU	C
12	AUA	I	28	CUA	L	44	GUA	V	60	UUA	L
13	AUC	I	29	CUC	L	45	GUC	V	61	UUC	F
14	AUG	M	30	CUG	L	46	GUG	V	62	UUG	L
15	AUU	I	31	CUU	L	47	GUU	V	63	UUU	F

Slika 4.1: Genetski kod.

Dolazimo do jednog veoma značajnog biološkog aksioma – **centralne dogme molekularne biologije**. Ona govori da se transkripcijom na osnovu DNK može dobiti RNK, a translacijom se iz RNK, na osnovu genetskog koda, dobijaju proteini. Ovu teoriju je predstavio Fransis Krik (eng. *Francis Crick*) i prikazana je na slici 4.2.

Slika 4.2: Centralna dogma molekularne biologije.

Ono što želimo da saznamo jeste koje aminokiseline i kojim redom ulaze u sastav našeg malog peptida tirocidina B1. Pošto se on sastoji iz 10 aminokiselina, to znači da ga čine 30 nukleotida u genomu bakterije *Bacillus Brevis* koje će da se prepišu u RNK i da se prevedu iz RNK u tirocidin B1. Hiljade različitih 30-grama se može prevesti u tirocidin B1 jer se u genetskom kodu različiti kodoni mogu prevesti u istu aminokiselinu. Na slici 4.3 su prikazani neki od takvih 30-grama. Vidimo da oni nisu previše slični.

Treba uzeti u obzir da translacija može početi na bilo kojoj poziciji u genomu. To znači

GTTAAATTATTTCCTTGGTTTAATCAATAT

GTCAAGCTTTTCCCCTGGTTCAACCAGTAC

GTAAAACTATTTCCGTGGTTCAATCAATAT

Slika 4.3: Neki od 30-grama koji se mogu prevesti u tirocidin B1.

da bismo za datu poziciju, ako gledamo 30-gram, mogli da imamo 6 različitih tzv. **čitajućih okvira**, tj. 6 varijanti prepisivanja u RNK i onda prevođenja. Tri čitajuća okvira potiču iz tri nukleotida iz jednog kodona iz jednog prevedenog RNK lanca (ako krenemo da čitamo od prvog nukleotida, to je jedan čitajući okvir, iz drugog nukleotida je drugi čitajući okvir, iz trećeg nukleotida je treći čitajući okvir, a ako pročitamo od četvrtog nukleotida, to je već isti čitajući okvir kao prvi jer tu kreće novi kodon), a isto tako za drugi RNK lanac imamo tri čitajuća okvira sa druge strane.

Naš peptid tirocidin B1 jeste *cikličan*. Tih 10 aminokiselina koje ga čine idu nekim redom, ali su one povezane u krug, tako da imamo ukupno 10 različitih **linearnih reprezentacija** za tirocidin B1 u zavisnosti od toga koja nam je prva aminokiselina bila u samom receptu DNK. Koju god linearnu reprezentaciju pronađemo, rešili smo problem.

Ne odustajemo od pronalaženja 30-grama u genomu bakterije *Bacillus Brevis* koji kodira bar jednu linearnu reprezentaciju od svih 10 koje čine tirocidin B1. Pretpostavimo da imamo na raspolaganju veoma moćan računar i neograničeno vreme. Doći ćemo do jednog čudnog rezultata. Nećemo uspeti da pronađemo nijedan 30-gram u genomu bakterije *Bacillus Brevis* koji kodira bar jednu linearnu reprezentaciju proteina tirocidina B1. Zašto? Stvari se komplikuju. Na ovom primeru je pokazano da centralna dogma ne važi uvek, odnosno ne važi da svaki protein u ćeliji nastaje na osnovu recepta koji je zapisan u DNK. Centralna dogma govori da se proces transkripcije izvršava pod uticajem enzima koji se zove *RNK polimeraza*, a translacija RNK u protein se vrši u ćelijskoj organeli koja se naziva *ribozom*. Postoje neki proteini koji ne nastaju na ovaj način, nego na specijalan način gde obično sekvenciranje genoma ne može da nam pomogne. Moramo da predložimo novi metod kako možemo da pronađemo odgovarajuću sekvencu aminokiselina.

Edvard Tejtum (eng. *Edward Tatum*), jedan od poznatih američkih genetičara, je 1963. godine inhibirao ribozom bakterije *Bacillus Brevis*. Šta ovo znači? S obzirom da se znalo da se u ribozomu vrši translacija RNK u protein, on je onemogućio da se bilo šta desi u ribozomu, isključio je funkcionisanje te organele u ćeliji i očekivao je da se neće stvoriti nijedan protein, pa ni tirocidin B1. Međutim, suprotno očekivanjima, nastavljena je proizvodnja nekih peptida, uključujući i tirocidine. Ovo je bilo izuzetno iznenađujuće otkriće.

Fric Lipman (eng. *Fritz Lipmann*), američko-nemački biohemičar, je 1969. godine pokazao da tirocidini spadaju u grupu **ne-ribozomalnih peptida (NRP-ova)**. To su peptidi za čiju sintezu nisu odgovorni ribozomi i RNK polimeraza već enzimi poznati pod nazivom **NRP sintetaze**, molekuli koji se takođe nalaze u ćeliji i utiču na različite procese koji se dešavaju u njoj. To znači da se stvaranje tirocidina razlikuje od većeg broja proteina u živim bićima.

Kako izgleda sinteza tirocidina B1 pomoću NRP sintetaze? Postoji veliki broj različitih NRP sintetaza, nije samo jedna odgovorna za stvaranje svih mogućih NRP-ova, nego za svaki ne-ribozomalni peptid postoji odgovarajuća NRP sintetaza. Ona NRP sintetaza koja je odgov-

orna za stvaranje tirocidina B1 se sastoji od 10 različitih podjedinica koje nazivamo *moduli*. Svaki modul je odgovoran za nadovezivanje jedne aminokiseline na budući molekul tirocidina B1. Svaki od modula privuče jednu aminokiselinu i spoji je sa prethodnom, a poslednji korak jeste cirkularizacija – spajanje aminokiselina nastalih uz pomoć prvog i poslednjeg modula radi kreiranja cikličnog peptida.

4.3 Sekvenciranje antibiotika razbijanjem na komade

Pošto nam sekvenciranje genomske sekvence i pronalaženje odgovarajuće podniske koja je zadužena za translaciju u aminokiseline odgovarajućeg peptida ne može pomoći u sekvenciranju tirocidina B1 (jer on ne nastaje na osnovu informacije zapisane u DNK), postavljamo pitanje da li postoji način na koji možemo da sekvenciramo antibiotike. Moramo direktno da sekvenciramo peptid. Jedan od načina jeste **sekvenciranje razbijanjem na komade** i biće predstavljen u ovoj sekciji.

U sekvenciranju antibiotika može nam pomoći mašina koja se naziva **maseni spektrometar** i koju možemo opisati kao skupu molekularnu vagu. Šta on radi? Za početak ćemo da se zapitamo kako možemo da merimo težinu, tačnije masu molekula.

Pošto se molekuli sastoje od atoma, prvo treba da govorimo o masi pojedinačnog atoma. U atomima postoje protoni, neutroni i elektroni. Protoni i neutroni su približno iste mase, dok su elektroni izuzetno mali i gotovo zanemarljive mase. Zato masu jednog atoma možemo svesti na masu protona, odnosno neutrona koji učestvuju u izgradnji konkretnog atoma koji posmatramo, pa se i masa molekula može izračunati kao suma masa atoma koji ga čine. Maseni spektrometar vraća masu molekula izračunatu u **Daltonima**.

$$1 \quad Dalton(Da) \approx masa \quad jednog \quad protona/neutrona$$
$$Masa \quad molekula \approx suma \quad masa \quad protona/neutrona$$

Posmatrajmo masu jedne aminokiseline, recimo glicina. Glicin ima hemijsku formulu C_2H_3ON. Ugljenik ima masu 12, vodonik ima masu 1, kiseonik 16, a azot 14. Na osnovu ovih masa računamo masu celog molekula glicina.

$$masa(C_2H_3ON) = 12 * 2 + 1 * 3 + 16 * 1 + 14 * 1 \approx 57Da$$

Simbol $\approx$ koristimo jer nam je stvarna masa nešto malo drugačija od celobrojne mase koju dobijamo ovde. Stvarna masa glicina iznosi $57.02Da$. Podrazumevaćemo da je masa celog molekula upravo celobrojna masa koju smo dobili.

Tabela masa svih aminokiselina data je u tabeli 4.1.

Tabela 4.1: Tabela masa 20 aminokiselina poređanih rastuće prema celobrojnim masama.

G	A	S	P	V	T	C	I,L	N	D	K,Q	E	M	H	F	R	Y	W
57	71	87	97	99	101	103	113	114	115	128	129	131	137	147	156	163	186

Primećujemo da neke aminokiseline imaju iste mase, npr. I i L, K i Q, pa za 20 aminokiselina imamo 18 celobrojnih masa.

Kada imamo mase aminokiselina, možemo da se zapitamo koja je masa tirocidina B1. Znajući da se tirocidin B1 sastoji iz 10 aminokiselina ovim redom: $VKLFPWFNQY$, masu računamo koristeći tabelu 4.1.

$$masa(tirocidina \quad B1) = 99 + 128 + 113 + 147 + 97 + 186 + 147 + 114 + 128 + 163 = 1322$$

Vratimo se na maseni spektrometar o kojem smo govorili ranije. Zamislimo da imamo kratak peptid koji se sastoji od samo 4 aminokiseline $NQEL$. Uzorak ovog peptida ubacimo u maseni spektrometar. Šta se u njemu dešava? U njemu se nekim hemijskim procesima, u čije detalje nećemo ulaziti, generišu svi podpeptidi ulaznog peptida. Sa računarske tačke gledišta, maseni spektrometar generiše od zadate niske $NQEL$ sve moguće podniske, podrazumevajući da je ulazni peptid cikličan. Tako se generišu podniske dužine jedan: N, Q, E, L, podniske dužine dva: NQ, QE, EL, LN i podniske dužine tri: NQE, QEL, ELN, LNQ. Maseni spektrometar za svaki od dobijenih podpeptida može da odredi molekulsku masu. Ono što mi dobijemo kao izlaz iz masenog spektrometra nisu podpeptidi, mi ne znamo koje podpeptide je dobio, niti kojim podpeptidima je prudružena koja masa. Izlaz iz masenog spektrometra jeste samo niz masa! Taj izlazni niz može da sadrži i dva ista broja jer neki podpeptidi mogu da imaju istu masu.

Kako bismo formulisali računarski problem, moramo da definišemo šta je to *teorijski spektar*.

Definicija 4.3. ***Teorijski spektar peptida*** *predstavlja niz masa svih mogućih podpeptida tog peptida, uključujući nulu kao masu praznog peptida i masu samog peptida.*

Poznajući sastav peptida, lako možemo da izračunamo teorijski spektar. Suprotan smer je težak, odnosno teško je da na osnovu teorijskog spektra zaključimo kako je izgledao peptid. Upravo ovo jeste problem sekvenciranja ciklopeptida.

Problem 1 (Problem sekvenciranja ciklopeptida)**.** *Rekonstruisati ciklični peptid na osnovu njegovog teorijskog spektra.*

4.3.1 Sekvenciranje ciklopeptida grubom silom

Kada dobijemo spektar iz masenog spektrometra, najveća masa će označavati masu celog peptida. Želimo prvo da generišemo sve peptide sa masom jednakom masi celog peptida, zatim da za svaki tako generisan peptid formiramo teorijski spektar i uporedimo ga sa datim spektrom. Algoritam grube sile za problem sekvenciranje ciklopeptida dat je u nastavku.

```
BFCyclopeptideSequencing(Spectrum)
begin
    // ParentMass(Spectrum) jeste najveca masa u spektru Spectrum
    for every Peptide with Mass(Peptide) equal to ParentMass(Spectrum)
        if Spectrum == CycloSpectrum(Peptide)
            output Peptide
end
```

Vidimo da u ovom algoritmu ispitujemo sve kandidate (peptide sa istom masom kao dati peptid). Koliko imamo takvih kandidata? Grafik koji oslikava odgovor na ovo pitanje dat je na slici 4.4.

Vidimo da je ovaj algoritam grube sile eksponencijalne složenosti. Pod uslovom da imamo dovoljno brz računar, ovako nešto bismo i mogli da izračunamo. Ali, šta bi bili nedostaci ovog algoritma grube sile? Možemo da imamo dva peptida sa istom masom, a da su potpuno različiti. Na primer, peptid $NQEL$ i peptid $TMDH$ imaju masu 484. Kako možemo da isključimo pogrešan peptid? Za oba ova peptida možemo da generišemo teorijski spektar. Ispostavlja se da su njihovi spektri potpuno različiti. Želimo da ovu informaciju iskoristimo u sledećem pristupu rešavanja problema sekvenciranja ciklopeptida. Cilj nam je da ne idemo grubom silom već da ogroman broj kandidata od samog početka odstranimo.

Slika 4.4: Broj peptida sa zadatom masom.

4.3.2 *Branch-and-Bound* algoritam za sekvenciranje ciklopeptida

U ovom pristupu postepeno konstruišemo kandidate za rešenja od manjih linearnih peptida za razliku od prethodnog pristupa u kome smo odmah generisali ceo peptid koji postaje kandidat. Na taj način ćemo smanjiti ukupan broj linearnih peptida koje posmatramo. Ovakav pristup se koristi kod ***Branch-and-Bound* algoritama** koji će biti opisani u nastavku.

Kod *Branch-and-Bound* algoritama u celokupnom prostoru svih mogućih rešenja vršimo nekakva odsecanja. Počnemo od kratkog peptida dužine jedan, pa ga proširimo na sve moguće načine, odnosno, dodamo po jednu aminokiselinu i od toga napravimo sve moguće kandidate dužine dva. To je *branch grana* i predstavljena je na slici 4.5. *Bound grana* bi od postojećih kandidata, nastalih u *branch* granama, isključila neke potencijalne kandidate. *Bound* grana je predstavljena na slici 4.6. Postupak proširivanja i odsecanja ponavljamo sve dok ne dođemo do odgovarajućih vrednosti. Na ovaj način će nam ostati mnogo manje kandidata za rešenja nego u prethodnom pristupu grube sile.

Slika 4.5: *Branch* grane algoritma *Branch-and-Bound*.

Slika 4.6: *Bound* grane algoritma *Branch-and-Bound*.

Primenimo ovaj algoritam na konkretan problem. Recimo da nam je dat spektar

0 97 97 99 101 103 196 198 198 200 202 295 297 299 299 301 394 396 398 400 400 497.

Vidimo da se u datom spektru nalaze mase nekih aminokiselina, što nam govori koje aminokiseline ulaze u sastav traženog peptida. Te aminokiseline su P, V, T, C sa masama $97, 99, 101, 103$. Ovo znači da možemo da počnemo ne sa svih 20 aminokiselina, nego sa 4 unigrama P, V, T, C. Ovo je unapred jedna *bound* grana jer smo 20 aminokiselina sveli na 4 kandidata aminokiselina. Zatim idemo na branch granu, širimo unigrame u sve moguće bigrame: PA, PC, PD,..PY, VA, VC, VD,...,VY, TA, TC, TD,..., TY, CA, CC, CD,..., CY. Proširujemo sa svih 20 aminokiselina jer ćemo kasniji videti da ovako zadati spektar jeste čisto teorijski spektar, a maseni spektrometar skoro nikada u praksi ne vraća teorijski spektar već spektar sa nekakvim greškama. Kako možemo

da skratimo ovu listu, kako možemo da izvršimo korak *bound* u ovom trenutku? Posmatramo da li postoje odgovarajući bigrami koji se takođe pojavljuju u spektru. Zbog toga uvodimo pojam **konzistentnosti**.

Definicija 4.4. *Za proizvoljan podpeptid $p_1, .., p_n$ kažemo da je* ***konzistentan*** *sa spektrom S ukoliko se svaka masa iz teorijskog spektra podpeptida $p_1, .., p_n$ nalazi u spektru S.*

Na primer, PV je **konzistentno** sa spektrom ukoliko se masa od P, masa od V i masa od PV nalaze u spektru.

Konzistentnost ćemo koristiti u *bound* koraku, tačnije, izbacićemo sve bigrame koji nisu konzistentni sa spektrom. Tako dobijemo listu konzistentnih bigrama PV, PT, PC, VP, VT, VC, TP, TV, CP, CV koju proširujemo u sve moguće 3-grame, a zatim svodimo na listu samo konzistentnih 3-grama. Postupak ponavljamo. Kada dođemo do liste konzistentnih pentagrama $PVCPT$, $PTPVC$, $PTPVC$, $PCVPT$, $VPTPC$, $VCPTP$, $TPVCP$, $TPCVP$, $CPTPV$, $CVPTP$ vidimo da zapravo svi oni pokazuju na jedan isti ciklični peptid.

Pseudokod opisanog algoritma dat je u nastavku.

```
1  CyclopeptideSequencing(Spectrum)
2  begin
3      Peptides = a set containing only the empty peptide
4      while Peptides is non-empty
5          // prosirujemo sve peptide u skupu sa svim mogucim aminokiselinama
6          Peptides = Expand(Peptides)
7          for each Peptide in Peptides
8              // ParentMass(Spectrum) jeste najveca masa u spektru
9              if Mass(Peptide) = ParentMass(Spectrum)
10                 if Cyclospectrum(Peptide) = Spectrum
11                     output Peptide
12                 remove Peptide from Peptides
13             else if Peptide is not consistent with Spectrum
14                 remove Peptide from Peptides
15 end
```

Podsetimo se da je složenost algoritma grube sile, koji ovde pokušavamo da poboljšamo, eksponencijalna. Ispostavlja se da *Branch-and-Bound* algoritam takođe može biti eksponencijalne složenosti za neke peptide, ali je u praksi veoma brz.

4.4 Prilagođavanje sekvenciranja za spektre sa greškama

Spektar koji smo do sada definisali jeste teorijski spektar. Za razliku od njega, spektar koji izlazi iz masenog spektrometra, **eksperimentalni spektar**, često sadrže greške. O kakvim greškama se govori biće prikazano pomoću slike 4.7.

teorijski:	0		113	114	128	129	227	242	242	257		355	356	370	371	484
eksperimentalni:	0	99	113	114	128		227			257	299	355	356	370	371	484

Slika 4.7: Primer teorijskog i eksperimentalnog spektra za $NQEL$.

Lažne mase jesu mase koje su na slici 4.7 prikazane zelenom bojom. To su mase koje su prisutne u eksperimentalnom spektru, ali nisu prisutne u teorijskom spektru.

Nedostajuće mase jesu mase koje su na slici 4.7 prikazane plavom bojom. To su mase koje se nalaze u okviru teorijskog spektra, ali ne i u okviru eksperimentalnog spektra.

Zbog pojave ovih otežavajućih okolnosti, tj. grešaka u spektru, neophodan je novi algoritam jer se kod dva predložena algoritma teorijski spektar peptida morao u potpunosti poklapati sa spektrom peptida koji je predstavljao rešenje problema. Sada moramo da olabavimo taj uslov pa uvodimo pojam **skor peptida**.

Definicija 4.5. ***Skor peptida*** *pokazuje koliko masa njegov teorijski spektar deli sa eksperimentalnim spektrom.*

Tako, za sliku 4.7, skor iznosi 11. Želimo da skor bude što veći.

S obzirom da imamo nov način upoređivanja, moramo da unapredimo naš *Branch-and-Bound* algoritam, konkretno korak odsecanja.

Uzmimo primer golfa. U golfu, kada igrači prođu prvi krug takmičenja, u sledeći krug prolaze dalje samo igrači koji su konkurentni, oni koji imaju šanse da nešto osvoje. To znači da možemo da kažemo da nam je odsecanje takvo da, na primer, prva tri igrača sa najboljim skorom idu dalje, a ukoliko imamo još neke igrače koji imaju isti skor kao poslednji igrač, onda i oni prolaze dalje. Znači, zadržavaju se tri najbolja igrača *„with ties"*. Ovakav sistem primenjen na *Branch-and-Bound* algoritam prikazan je u sledećem pseudokodu.

```
1  LeaderboardCyclopeptideSequencing(Spectrum, N)
2  begin
3      Leaderboard = set containing only the empty peptide
4      LeaderPeptide = empty peptide
5
6      while Leaderboard is non-empty
7          // prosirujemo sve elemente koji se nalaze u okviru skupa Leaderboard
8          Leaderboard = Expand(Leaderboard)
9          for each Peptide in Leaderboard
10             // ParentMass(Spectrum) predstavlja najvecu masu u spektru Spectrum
11             if Mass(Peptide) == ParentMass(Spectrum)
12                 if Score(Peptide, Spectrum) > Score(LeaderPeptide, Spectrum)
13                     LeaderPeptide = Peptide
14             else if Mass(Peptide) > ParentMass(Spectrum)
15                 remove Peptide from Leaderboard
16         // odsecamo kandidate iz Leaderboard na osnovu njihovog skora
17         Leaderboard = Trim(Leaderboard, Spectrum, N)
18
19     output LeaderPeptide
20 end
21
22 Trim(Leaderboard, Spectrum, N, AminoAcid, AminoAcidMass)
23 begin
24     for j=1 to |Leaderboard|
25         Peptide = j-th peptide in Leaderboard
26         // LinearScore jeste skor nad linearnim spektrom
27         LinearScores[j] = LinearScore(Peptide, Spectrum)
28
29     sort Leaderboard according to the dec order of scores in LinearScores
30     sort LinearScores in dec order
31
32     for j=N+1 to |Leaderboard|
33         if LinearScores[j] < LinearScores[N]
34             remove all peptides starting from the j-th peptide from Leaderboard
35             return Leaderboard
36
```

```
    return Leaderboard
end
```

Leaderboard pristup omogućava da bolje definišemo za esperimentalni spektar kod *Branch-and-Bound* algoritma onu bound fazu kada treba da izbacimo neke kandidate.

4.4.1 Testiranje na spektru tirocidina B1

U ovom delu razmatraćemo rezultate testiranja na $Spectrum_{10}$, spektru sa 10% lažnih/nedostajućih masa.

Kada primenimo *LeaderboardCyclopeptideSequencing* na spektar sa 10% loših vrednosti, tada zaista dobijemo peptid sa najvišim skorom $VKLFPWFNQY$ koji odgovara tirocidinu B1. Međutim, ukoliko uzmemo spektar $Spectrum_{25}$ koji ima 25% lažnih i nedostajućih vrednosti, spektar koji se još više udaljava od teorijskog spektra, onda se peptid sa najvišim skorom $VKLFPADFNQY$ razlikuje od peptida $VKLFPWFNQY$ koji želimo da dobijemo.

Ovo znači da *LeaderboardCyclopeptideSequencing* algoritam radi dobro kada nam je eksperimentalni spektar malo različit od teorijskog.

4.5 Od 20 do više od 100 aminokiselina

U ovoj sekciji biće reči o poboljšanju našeg algoritma uz uvođenje premisa koje postoje u stvarnosti, a koje smo do sada zanemarivali da bismo dali neke početne načine za rešavanje.

Kada smo govorili o proteinima, rekli smo da 20 aminokiselina najčešće učestvuje u njihovoj izgradnji i da su za nas, sa računarske tačke gledišta, proteini niske nad azbukom od 20 karaktera i da postoji još veliki broj aminokiselina nezavisno od izgradnje proteina u ćelijama živih bića. U gentskom kodu postoje kodovi samo za tih 20 aminokiselina, i u tabeli celobrojnih masa aminokiselina postoje mase samo za iste te aminokiseline. S obzirom da u ovom poglavlju razmatramo NRP peptide, peptide koji ne nastaju prema pravilima centralne dogme, onda ovi peptidi mogu da sadrže i neke nestandardne aminokiseline, one aminokiseline koje se ne nalaze među standardnih 20 aminokiselina. Na primer, tirocidin B sadrži nestandardnu aminokiselinu *Ornitin (Orn)*. Za Ornitin ne postoji nukleotidni triplet u okviru genetskog koda na osnovu koga se ova aminokiselina dobija i ne postoji celobrojna masa u tabeli celobrojnih masa za aminokiseline. S ozbirom na to, možemo da pretpostavimo da bilo koji ceo broj između 57 i 200 (koliko nam iznosi najmanja i najveća masa standardnih aminokiselina) može biti masa neke nestandardne aminokiseline. Ovako nešto može da izgleda kao grubo ograničenje, ali je eksperimentalno potvrđeno da većina masa svih mogućih aminokiselina pripada ovom intervalu.

Spektar u kome nismo ograničeni na tabelu od samo 18 celobrojnih masa, već uzimamo u obzir da bilo koji celi broj između 57 i 200 može da označava neku aminokiselinu, nazivamo **prošireni spektar**. Kada primenimo Leaderboard algoritam na prošireni spektar sa 10% lažnih i nedostajućih masa, peptid koji dobijemo $VKLFPWFN-98-65$ sadrži neke vrednosti za mase koje ne odgovaraju nijednoj aminokiselini. Pošto Leaderboard algoritam ovde ne daje ispravne vrednosti, moramo da primenimo jedan sasvim novi princip.

4.6 Spektralna konvolucija

Kod algoritma sa proširenim spektrom podrazumeva se da svi celi brojevi između 57 i 200 odgovaraju masama aminokiselina. To znači da razmatramo 144 ili više (znamo da jednoj masi može da odgovara više aminokiselina, a sa druge strane postoje vrednosti kojima ne odgovara nijedna) aminokiselina u koje spadaju i standardne i nestandardne aminokiseline. Želimo da smanjimo broj aminokiselina koje razmatramo.

Posmatrajmo eksperimentalni spektar za $NQEL$

$$0\ 99\ 113\ 114\ 128\ 227\ 257\ 299\ 355\ 356\ 370\ 371\ 484.$$

Mi znamo da je $Mass(E) = 129$ i vidimo da u spektru ne postoji ta vrednost. Sa druge strane, u spektru postoji $Mass(QE) = 257$ i $Mass(Q) = 128$. Razlika ove dve mase daje vrednost 129. Ova vrednost već deluje kao dobra vrednost za nedostajuću masu. U spektru postoji još ovakvih slučajeva. Recimo, $Mass(ELN) - Mass(LN) = 356 - 227 = 129$ i $Mass(NQEL) - Mass(LNQ) = 484 - 355 = 129$. Obe ove razlike ukazuju na masu od E koja nedostaje.

Uvodimo tabelu koja se naziva **spektralna konvolucija**.

Definicija 4.6. ***Spektralna konvolucija*** *je tabela koja pokazuje apsolutnu vrednost razlike između svake dve mase u spektru.*

Primer spektralne konvolucije za spektar čije su lažne vrednosti označene sa ,,false" prikazan je na slici 4.8.

	"" 0	false 99	L 113	N 114	Q 128	LN 227	QE 257	false 299	LNQ 355	ELN 356	QEL 370	NQE 371
0												
99	99											
113	113	14										
114	114	15	1									
128	128	29	15	14								
227	227	128	114	113	99							
257	257	158	144	143	129	30						
299	299	200	186	185	171	72	42					
355	355	256	242	241	227	128	98	56				
356	356	257	243	242	228	129	99	57	1			
370	370	271	257	256	242	143	113	71	15	14		
371	371	272	258	257	243	144	114	72	16	15	1	
484	484	385	371	370	356	257	227	185	129	128	114	113

Slika 4.8: Primer spektralne konvolucije.

Na preseku svake vrste i kolone u spektralnoj konvoluciji upisana je apsolutna vrednost razlike celobrojnih masa. Kako iskoristiti spektralnu konvoluciju? Tražimo vrednosti razlika koje se pojavljuju najveći broj puta, a da se nalaze između 57 i 200. Obojene vrednosti na slici 4.8 se pojavljuju veći broj puta. To su vrednosti 99, 113, 114, 128 i 129. Ove vrednosti odgovaraju masama aminokiselina, redom, V, L, N, Q, E. Od 5 najčešćih aminokiselina u konvoluciji 4 čine peptid $NQEL$.

Kako bi izgledao unapređeni algoritam za sekvenciranje ciklopeptida ukoliko uzmemo u obzir i nestandardne aminokiseline, odnosno proširenu tabelu celobrojnih masa aminokiselina? Pseudokod je dat u nastavku.

```
ConvolutionCyclopeptideSequencing(Spectrum, N, M)
begin
    Formirati spektralnu konvoluciju spektra Spectrum.
    Uzeti M najcescih elemenata u konvoluciji (izmedju 57 i 200).
    Primeniti LeaderboardCyclopeptideSequencing, formirajuci peptide samo na
    ↪ osnovu ovih M celih brojeva.
end
```

Algoritam *ConvolutionCyclopeptideSequencing* daje tačan rezultat i za spektre sa šumom od 10% i za spektre sa šumom od 25%, što pokazuje da je spektralna konvolucija odgovorila na sve izazove koji su postavljeni.

4.7 Spektri u realnosti

Kao što znamo, realnost je obično drugačija. Neke poteškoće iz realnosti smo zanemarivali. Koje?

- $Spectrum_{25}$ je mnogo manje šumovit nego spektri dobijeni u praksi iz masenog spektrometra.

- Maseni spektrometar ne meri jednostavno fragmente podpeptida, već su postupci merenja mnogo komplikovaniji. Najpre se zaista vrši razbijanje datog peptida na fragmente. Zatim se oni sortiraju, korišćenjem elektromagnetnog polja, prema svojoj masi. Ono što maseni spektrometar meri jeste zapravo **odnos mase i naelektrisanja** za svaki fragment (znači nije baš masa) i određuje **intenzitet** (kao broj jona) u svakom odnosu mase i naelektrisanja. Šta to znači? To znači da kao izlaz iz masenog spektrometra ne dobijamo eksperimentalni spektar koji smo do sada imali prilike da vidimo, nego grafik intenziteta prema odnosu mase i naelektrisanja sa vrhovima na određenim mestima. Primer ovakvog grafika dat je na slici 4.9. Na osnovu vrhova na grafiku, određivaćemo sam sastav peptida. Ovaj grafik se

Slika 4.9: Primer grafika intenziteta prema odnosu mase i naelektrisanja.

naziva **realni spektar**. Rekonstrukcija peptida na osnovu realnog spektra biće obrađena u poglavlju 11.

4.8 Zadaci sa vežbi

U nastavku će biti predstavljeni zadaci sa vežbi na kursu rađeni u programskom jeziku Python.

4.8.1 Linear Spectrum

```python

# Formiranje linearnog spektra zadatog peptida
def linear_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass):
    prefix_mass = [0]
    current_mass = 0
    for i in range(len(peptide)):
        for j in range(20):
            if amino_acid[j] == peptide[i]:
                prefix_mass.append(current_mass + amino_acid_mass[j])
                current_mass += amino_acid_mass[j]

    linear_spectrum = [0]
    for i in range(len(prefix_mass)):
        for j in range(i+1, len(prefix_mass)):
            linear_spectrum.append(prefix_mass[j] - prefix_mass[i])

    linear_spectrum.sort()
    return linear_spectrum


def main():

    # Lista aminokiselina
    amino_acid = ['G', 'A', 'S', 'P', 'V', 'T', 'C', 'I', 'L', 'N', 'D', 'K', '
    ↪ Q', 'E', 'M', 'H', 'F', 'R', 'Y', 'W']

    # Lista masa odgovarajucih aminokiselina
    amino_acid_mass = [57, 71, 87, 97, 99, 101, 103, 113, 113, 114, 115, 128,
    ↪ 128, 129, 131, 137, 147, 156, 163, 186]

    # Zadati peptid
    peptide = "NQEL"

    spectrum = linear_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass)
    print(spectrum)

if __name__ == "__main__":
    main()
```

4.8.2 Cyclic Spectrum

```python

# Formiranje ciklicnog spektra zadatog peptida
def cyclic_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass):
    prefix_mass = [0]
    current_mass = 0
    for i in range(len(peptide)):
```

```
        for j in range(20):
            if amino_acid[j] == peptide[i]:
                prefix_mass.append(current_mass + amino_acid_mass[j])
                current_mass += amino_acid_mass[j]

    peptide_mass = prefix_mass[-1]
    cyclic_spectrum = [0]
    for i in range(len(prefix_mass)):
        for j in range(i+1, len(prefix_mass)):
            cyclic_spectrum.append(prefix_mass[j] - prefix_mass[i])
            if i > 0 and j < len(prefix_mass)-1:
                cyclic_spectrum.append(peptide_mass - (prefix_mass[j] - prefix_mass[i]))

    cyclic_spectrum.sort()
    return cyclic_spectrum


def main():
    amino_acid = ['G', 'A', 'S', 'P', 'V', 'T', 'C', 'I', 'L', 'N', 'D', 'K', 'Q', 'E', 'M', 'H', 'F', 'R', 'Y', 'W']
    amino_acid_mass = [57, 71, 87, 97, 99, 101, 103, 113, 113, 114, 115, 128, 128, 129, 131, 137, 147, 156, 163, 186]

    peptide = "NQE"

    spectrum = cyclic_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass)
    print(spectrum)

if __name__ == "__main__":
    main()
```

4.8.3 Cyclopeptide Sequencing

```
import copy

# Formiranje ciklicnog spektra peptida
def cyclic_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass):
    prefix_mass = [0]
    current_mass = 0
    for i in range(len(peptide)):
        for j in range(20):
            if amino_acid[j] == peptide[i]:
                prefix_mass.append(current_mass + amino_acid_mass[j])
                current_mass += amino_acid_mass[j]

    peptide_mass = prefix_mass[-1]
    cyclic_spectrum = [0]
    for i in range(len(prefix_mass)):
        for j in range(i+1, len(prefix_mass)):
            cyclic_spectrum.append(prefix_mass[j] - prefix_mass[i])
            if i > 0 and j < len(prefix_mass)-1:
                cyclic_spectrum.append(peptide_mass - (prefix_mass[j] -
```

```
    ↪ prefix_mass[i]))

    cyclic_spectrum.sort()
    return cyclic_spectrum

# Prosirivanje liste peptida dodavanjem svih mogucih amino kiselina na kraj
    ↪ lanca
def expand(peptides, amino_acid):
    extension = []

    for peptide in peptides:
        for aa in amino_acid:
            extension.append(peptide + aa)

    return extension

# Izracunavanje ukupne mase peptida kao sume svih aminokiselina u lancu
def mass(peptide, amino_acid, amino_acid_mass):
    total_mass = 0

    for i in range(len(peptide)):
        for j in range(len(amino_acid)):
            if peptide[i] == amino_acid[j]:
                total_mass += amino_acid_mass[j]

    return total_mass

# Izdvajanje sume celog peptida iz spektra
def parent_mass(spectrum):
    return spectrum[-1]

# Formiranje linearnog spektra
def linear_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass):
    prefix_mass = [0]
    current_mass = 0
    for i in range(len(peptide)):
        for j in range(20):
            if amino_acid[j] == peptide[i]:
                prefix_mass.append(current_mass + amino_acid_mass[j])
                current_mass += amino_acid_mass[j]

    linear_spectrum = [0]
    for i in range(len(prefix_mass)):
        for j in range(i+1, len(prefix_mass)):
            linear_spectrum.append(prefix_mass[j] - prefix_mass[i])

    linear_spectrum.sort()
    return linear_spectrum


# Provera da li je dati peptid konzistentan sa zadatim spektrom
def consistent(peptide, target_spectrum, amino_acid, amino_acid_mass):
    peptide_linear_spectrum = linear_spectrum(peptide, amino_acid,
```

```
    ↪ amino_acid_mass)

    for aa in peptide_linear_spectrum:
        found = False
        for aa_p in target_spectrum:
            if aa_p == aa:
                found = True
        if found == False:
            return False

    return True


# Sekvenciranje ciklopeptida
def cyclopeptide_sequencing(spectrum, amino_acid, amino_acid_mass):
    peptides = ['']
    i = 1;
    while len(peptides) > 0:
        next_peptides = []
        peptides = expand(peptides, amino_acid)
        next_peptides = copy.copy(peptides)
        for peptide in peptides:
            if mass(peptide, amino_acid, amino_acid_mass) == parent_mass(
    ↪ spectrum):
                if cyclic_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass) ==
    ↪ spectrum:
                    print(peptide)
                next_peptides.remove(peptide)
            elif not consistent(peptide, spectrum, amino_acid, amino_acid_mass)
    ↪ :
                next_peptides.remove(peptide)
        peptides = next_peptides


def main():
    amino_acid = ['G', 'A', 'S', 'P', 'V', 'T', 'C', 'I', 'L', 'N', 'D', 'K', '
    ↪ Q', 'E', 'M', 'H', 'F', 'R', 'Y', 'W']
    amino_acid_mass = [57, 71, 87, 97, 99, 101, 103, 113, 113, 114, 115, 128,
    ↪ 128, 129, 131, 137, 147, 156, 163, 186]

    peptide = "SPQR"

    spectrum = cyclic_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass)

    cyclopeptide_sequencing(spectrum, amino_acid, amino_acid_mass)

if __name__ == "__main__":
    main()
```

4.8.4 Leaderboard Cyclopeptide Sequencing

```
import copy

```

```
3  # Formiranje ciklicnog spektra peptida
4  def cyclic_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass):
5      prefix_mass = [0]
6      current_mass = 0
7      for i in range(len(peptide)):
8          for j in range(20):
9              if amino_acid[j] == peptide[i]:
10                 prefix_mass.append(current_mass + amino_acid_mass[j])
11                 current_mass += amino_acid_mass[j]
12
13     peptide_mass = prefix_mass[-1]
14     cyclic_spectrum = [0]
15     for i in range(len(prefix_mass)):
16         for j in range(i+1, len(prefix_mass)):
17             cyclic_spectrum.append(prefix_mass[j] - prefix_mass[i])
18             if i > 0 and j < len(prefix_mass)-1:
19                 cyclic_spectrum.append(peptide_mass - (prefix_mass[j] -
       ↪ prefix_mass[i]))
20
21     cyclic_spectrum.sort()
22     return cyclic_spectrum
23
24 # Prosirivanje liste peptida dodavanjem svih mogucih amino kiselina na kraj
       ↪ lanca
25 def expand(peptides, amino_acid):
26     extension = []
27
28     for peptide in peptides:
29         for aa in amino_acid:
30             extension.append(peptide + aa)
31
32     return extension
33
34 # Izracunavanje ukupne mase peptida kao sume svih aminokiselina u lancu
35 def mass(peptide, amino_acid, amino_acid_mass):
36     total_mass = 0
37
38     for i in range(len(peptide)):
39         for j in range(len(amino_acid)):
40             if peptide[i] == amino_acid[j]:
41                 total_mass += amino_acid_mass[j]
42
43     return total_mass
44
45 # Izdvajanje sume celog peptida iz spektra
46 def parent_mass(spectrum):
47     return spectrum[-1]
48
49 # Formiranje linearnog spektra
50 def linear_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass):
51     prefix_mass = [0]
52     current_mass = 0
53     for i in range(len(peptide)):
```

```
        for j in range(20):
            if amino_acid[j] == peptide[i]:
                prefix_mass.append(current_mass + amino_acid_mass[j])
                current_mass += amino_acid_mass[j]

    linear_spectrum = [0]
    for i in range(len(prefix_mass)):
        for j in range(i+1, len(prefix_mass)):
            linear_spectrum.append(prefix_mass[j] - prefix_mass[i])

    linear_spectrum.sort()
    return linear_spectrum


# Provera da li je dati peptid konzistentan sa zadatim spektrom
def consistent(peptide, target_spectrum, amino_acid, amino_acid_mass):
    peptide_linear_spectrum = linear_spectrum(peptide, amino_acid,
    ↪ amino_acid_mass)

    for aa in peptide_linear_spectrum:
        found = False
        for aa_p in target_spectrum:
            if aa_p == aa:
                found = True
        if found == False:
            return False

    return True


def score(peptide, spectrum_2, amino_acid, amino_acid_mass):
    p1 = 0
    p2 = 0
    score = 0

    spectrum_1 = cyclic_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass)

    while p1 < len(spectrum_1) and p2 < len(spectrum_2):
        if spectrum_1[p1] == spectrum_2[p2]:
            score += 1
            p1 += 1
            p2 += 1
        elif spectrum_1[p1] < spectrum_2[p2]:
            p1 += 1
        else:
            p2 += 1

    return score

def linear_score(peptide, spectrum_2, amino_acid, amino_acid_mass):
    p1 = 0
    p2 = 0
    score = 0
```

```
    spectrum_1 = linear_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass)

    while p1 < len(spectrum_1) and p2 < len(spectrum_2):
        if spectrum_1[p1] == spectrum_2[p2]:
            score += 1
            p1 += 1
            p2 += 1
        elif spectrum_1[p1] < spectrum_2[p2]:
            p1 += 1
        else:
            p2 += 1

    return score

# Sekvenciranje ciklopeptida
def leaderboard_cyclopeptide_sequencing(spectrum, N, amino_acid, amino_acid_mass):
    leaderboard = ['']
    leader_peptide = ''
    while len(leaderboard) > 0:
        next_peptides = []
        leaderboard = expand(leaderboard, amino_acid)
        next_leaderboard = copy.copy(leaderboard)
        for peptide in leaderboard:
            if mass(peptide, amino_acid, amino_acid_mass) == parent_mass(spectrum):
                if score(peptide, spectrum, amino_acid, amino_acid_mass) > score(leader_peptide, spectrum, amino_acid, amino_acid_mass):
                    leader_peptide = peptide
            elif mass(peptide, amino_acid, amino_acid_mass) > parent_mass(spectrum):
                next_leaderboard.remove(peptide)
        leaderboard = trim(next_leaderboard, spectrum, N, amino_acid, amino_acid_mass)
    return leader_peptide


def trim(leaderboard, spectrum, N, amino_acid, amino_acid_mass):
    linear_scores = []
    for j in range(len(leaderboard)):
        peptide = leaderboard[j]
        linear_scores.append(linear_score(peptide, spectrum, amino_acid, amino_acid_mass))

    leaderboard_zipped = list(zip(linear_scores, leaderboard))
    leaderboard_zipped.sort(reverse=True)

    leaderboard = [el[1] for el in leaderboard_zipped]
    for j in range(N, len(leaderboard_zipped)):
        if leaderboard_zipped[j][0] < leaderboard_zipped[N-1][0]:
            leaderboard = [el[1] for el in leaderboard_zipped[:j]]
            return leaderboard
```

```
    return leaderboard




def main():
    amino_acid = ['G', 'A', 'S', 'P', 'V', 'T', 'C', 'I', 'L', 'N', 'D', 'K', '
    ↪ Q', 'E', 'M', 'H', 'F', 'R', 'Y', 'W']
    amino_acid_mass = [57, 71, 87, 97, 99, 101, 103, 113, 113, 114, 115, 128,
    ↪ 128, 129, 131, 137, 147, 156, 163, 186]

    peptide = "SPQR"

    spectrum = cyclic_spectrum(peptide, amino_acid, amino_acid_mass)

    print(leaderboard_cyclopeptide_sequencing(spectrum, 10, amino_acid,
    ↪ amino_acid_mass))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

Glava 5

Kako poredimo biološke sekvence?

5.1 Biološki uvid u poređenje sekvenci

Kako su biološke sekvence podložne promeni, umetanju i brisanju, čest je slučaj da i-ti simbol jedne sekvence odgovara simbolu na drugoj poziciji druge sekvence. U tom slučaju, cilj je postići najbolje poklapanje simbola. Na primer, $ATGCATGC$ i $TGCATGCA$ nemaju delove koji se poklapaju, pa je njihova Hamingova udaljenost 8:

$$\begin{array}{c} ATGCATGC \\ TGCATGCA \end{array}$$

Ali ako ih malo drugačije poravnamo, ove dve niske imaju 6 poklapajucih pozicija:

$$\begin{array}{c} ATGCATGC- \\ -TGCATGCA \end{array}$$

Stringovi ATGCTTA i TGCATTAA imaju manje uocljive slicnosti:

$$\begin{array}{c} ATGC-TTA- \\ -TGCATTAA \end{array}$$

Ovi primeri navode nas da definisemo dobro poravnanje kao ono koje ima najveći mogući broj poklapanja. Povećanje broja poklapanja simbola možemo posmatrati kao igricu u kojoj u svakom potezu imamo dva izbora. Možemo da uklonimo oba simbola i osvojimo poen ako su oni isti ili mozemo ukloniti simbol iz jedne od niski, ne osvojimo poene, ali omogućimo da u daljem igranju osvojimo više poena. Cilj je da maksimizujemo broj poena.

5.2 Igra poravnanja i najduža zajednička podsekvenca

Kod **Igre poravnanja** cilj je ukloniti sve simbole iz sekvenci tako da pritom sakupimo što više poena :

- Uklanjanje prvog simbola iz svake sekvence
- 1 poen ako se simboli poklapaju, 0 ako se simboli ne poklapaju
- Uklanjanje prvog simbola iz jedne sekvnce
  - 0 poena

Slika 5.1: Igra poravnanja

Poravnanje dve sekvence predstavlja matricu koja ima dva reda:

1. red: simboli prve sekvence (redom) eventualno sa ubačenim "-"
2. red: simboli druge sekvence (redom) eventualno sa ubačenim "-"

Slika 5.2: Poravnanje

5.2.1 Najduža zajednička podsekvenca

Poklapanja (matches) u poravnanju dve sekvence (u primeru 5.2 to je ATGT) formiraju njihovu zajedničku podsekvencu.

Problem 2 (Problem najduže zajedničke podniske)**.** *Naći najdužu zajedničku podsekvencu dve niske.*
Ulaz: Dve niske.
Izlaz: Najduža zajednička podsekvenca ovih niski

5.3 Problem turiste na Menhetnu

Pre svega postavimo problem:

Problem 3 (Problem turiste na Menhetnu)**.** *Naći najdužu putanju u pravougaonoj mreži gradskih ulica.*

Ulaz: Usmeren težinski mrežni graf.
Izlaz: Najduža putanja od početnog (source) do krajnjeg čvora (sink) u mrežnom grafu.

Slika 5.3: Problem turiste na Menhetnu

Na slici 5.3 grafički je prikazan problem turiste na Menhetnu. Cilj je stići od plavog do crvenog kruga i pri tom sakupiti što više poena. Dozvoljeno kretanje je dole i desno. Možemo koristiti pohlepni algoritam i tako doći do cilja, ali da li smo tako sakupili najviše poena? Dodatna izmena grafa bi bila da imamo i dijagnalne grane (5.4).
Time dolazimo do sledećeg problema:

Problem 4 (Problem najduže putanje u usmerenom grafu)**.** *Naći najdužu putanju između dva čvora u težinskom usmerenom grafu.*
Ulaz: Usmereni težinski graf sa označenim čvorovima source i sink.
Izlaz: Najduža putanja od čvora source do čvora sink u usmerenom težinskom grafu.

Ako se prisetimo igre poravnanja, videćemo da postoji veza između ova dva problema (igre).

Pitamo se kako izgraditi graf za igru poravnanja i za problem najduže podsekvence. To ćemo uraditi na sledeći način:

- Vrste označimo aminokiselinama iz prve niske
- Kolone označimo aminokiselinama iz druge niske
- U svaku presečnu tačku postavimo jedan čvor
- Gde god je moguće, postaviti vertikalne (insercija), horizontalne (delecija) i dijagonalne grane (match ili mismatch)
- Dijagonalne grane otežati koeficijentom 1, ostale koeficijentom 0

Slika 5.4: Nepravilna mreža

Slika 5.5: Poravnanje → Putanja

- Problem najduže zajedničke podsekvence se svodi na problem nalaženja najduže putanje između dva data čvora u usmerenom grafu

Kada nađemo poravnanje najvišeg skora našli smo i najdužu putanju u mrežnom grafu. Dijagonalne crvene grane odgovaraju poklapanju simbola i imaju skor 1 (5.6)

Slika 5.6: Poravnanje → Putanja

5.4 Problem kusura

Upoznajmo se sa sledećim problemom:

Problem 5 (Problem vraćanja kusura)**.** *Naći minimalan broj novčića neophodnih za vraćanje kusura.*
Ulaz: Ceo broj money i niz pozitivnih celih brojeva $(coin_1, coin_2, ..., coin_d)$.
Izlaz: Minimalan broj novčića $(coin_1, coin_2, ..., coin_d)$ *u apoenima koji rasitnjava sumu money.*

5.4.1 Pohlepni algoritam

Najzastupljeniji način vraćanja kusura širom sveta podrazumeva iterativno traženje sledećeg najvećeg novčića.
To bi značilo da bismo za kusur od 42 dinara dobili sledeće novčiće: 20 + 10 + 10 + 2.
Ovakav način vraćanja kusura opisuje takozvani pohlepni algoritam.

```
GreedyChange(money)
begin
```

```
    change ← empty collection of coins
    while money > 0
        coin ← largest denomination that does not exceed money
        add coin to change
        money ← money - coin
    return change
end
```

Međutim, ako malo bolje razmislimo ovo rešenje zapravo nije najbolje.
Kusur bismo mogli vratiti i sa manje novčića na sledeći način: 42 = 20 + 20 + 2

Zaključak: **GreedyChange ne daje optimalno rešenje!**

5.4.2 Rekurzivni algoritam

Pokušajmo sada da problem rešimo na drugačiji način koristeći rekurziju.
Za zadate apoene 6, 5, 1, koji je najmanji broj novčića neophodnih za vraćanje kusura od 9 centi?

Slika 5.7: Vracanje kusura - rekurzija

Problem resavamo tako sto prvo od 9 oduzmemo 6 i dobijemo 3 kao ostatak kusura. Dakle, 9 se može vratiti od jednog novčića od 6 apoena i jos plus broj novčiča koji je potreban za preostali deo kusura od 3 centa.
U istoj iteraciji analogno računamo za preostale apoene.

Na slici 5.7 crvenim znakom pitanja označeno je traženo rešenje koje dobijemo rešavanjem manjih problema za kusure 3, 4 i 8.

$$\text{MinNumCoins}(9) = \min \begin{cases} MinNumCoins(9-6)+1 = MinNumCoins(3)+1 \\ MinNumCoins(9-5)+1 = MinNumCoins(4)+1 \\ MinNumCoins(9-1)+1 = MinNumCoins(8)+1 \end{cases}$$

Na osnovu prethodnog, moguće je izvesti opštu formulu:

$$\text{MinNumCoins(money)} = \min \begin{cases} MinNumCoins(money - coin_1)+1 \\ \dots \\ MinNumCoins(money - coin_d)+1 \end{cases}$$

Hajde sada da vidimo kako bismo to isprogramirali:

```
RecursiveChange(money, coins)
begin
    if money = 0
        return 0
```

```
    MinNumCoins ← infinity
    for i ← 1 to |coins|
        if money ≥ coin_i
            NumCoins ← RecursiveChange(money - coin_i, coins)
            if numCoins + 1 < MinNumCoins
                MinNumCoins ← numCoins + 1
    return MinNumCoins
end
```

Reklo bi se da smo sada dobili odgovarajuci algoritam za naš problem, hajde to da proverimo. Postavlja se pitanje, koliko je brz RecursiveChange?

Pokušajmo na konkretnom primeru da dođemo do rešenja. Neka naš problem sada bude vraćanje kusura od 76 centi. Pomoću rekurzivnog stabla demonstrirajmo ponašanje našeg algoritma:

Slika 5.8: Vracanje kusura - ponašanje rekurzivnog algoritma

Ono što se odmah može primetiti jeste višestruko pozivanje algoritma za vrednost od 69 centi, čak 6 puta!
Daljim procenama možemo doći do zaključka da se optimalna kombinacija novčića za 30 centi izračunava milijardama puta!

Sada je očigledno da nam rekurzija ne rešava problem na najbolji mogući način.

5.4.3 Vraćanje kusura dinamičkim programiranjem

Cilj nam je da izbegnemo višestruka izračunavanja vraćanja kusura za istu vrednost, tako da bi ideja bila da imamo objekat koji će pamtiti sva računanja i iz koga ćemo čitati već izračunate vrednosti.
Dakle, umesto vremenski zahtevnih poziva

$$\text{RecursiveChange(money - } coin_i\text{, coins)}$$

jednostavno bismo potražili vrednosti iz unapred izračunate tabele

MinNumCoins(money - $coin_i$).

```
DPChange(money, coins)
begin
    MinNumCoins(0) ← 0
    for m ← 1 to money
        MinNumCoins(m) ← infinity
        for i ← 1 to |coins|
            if m ≥ coin_i
                if MinNumCoins(m - coin_i) + 1 < MinNumCoins(m)
                    MinNumCoins(m) ← MinNumCoins(m - coin_i) + 1
    return MinNumCoins(money)
end
```

5.5 Dinamičko programiranje i putokazi za povratak

Posmatramo jednostavniji, Menhetn graf: Pretpostavimo da do čvora sink možemo doći samo na dva načina: kretanjem južno ↓ ili kretanjem istočno →

Slika 5.9: Južno ili istočno?

Prvo probamo da rešimo problem rekurzivno:

```
SouthOrEast(n, m)
if n=0 and m=0
    return 0
x ← -infinity, y ← -infinity
```

```
if n > 0
x ← SouthOrEast(n-1,m)+weight of edge "↓" into (n, m)
if m > 0
y ← SouthOrEast(n,m-1)+ weight of edge "→" into (n,m)
return max{x, y}
```

Ovaj algoritam se poziva za svaki čvor u grafu veličine $m \times n$, a pri tom se dešava da za jedan isti čvor računamo više puta. Zbog toga je ovaj pristup previše spor, pa prelazimo na dinamičko programiranje. Krenućemo od početnog čvora. Zatim, u čvor (i, j) upisujemo dužinu maksimalne putanje od (0,0) do (i,j). Prvo izračunamo za čvorove na obodu grafa a zatim, kolonu po kolonu, za preostale čvorove.

Slika 5.10: Južno ili istočno?

Slika 5.11: Južno ili istočno?

Slika 5.12: Južno ili istočno?

Na slici 5.12 prikazane su podebljane grane koje predstavljaju putokaze za povratak od čvora sink do čvora source.

5.5.1 Rekurentna relacija dinamičkog programiranja kod Menhetn grafa

$s_{i,j}$: the length of a longest path from (0,0) to (i,j)

$$s_{i,j} = \max \begin{cases} s_{i-1,j} + weightofedge" \downarrow "into(i,j) \\ s_{i,j-1} + weightofedge" \rightarrow "into(i,j) \end{cases}$$

```
ManhattanTourist(n, m, Down, Right)
s_{0,0} ← 0
for i ← 1 to n
    s_{i,0} ← s_{i-1,0} + down_{i,0}
for j ← 1 to m
    s_{0,j} ← s_{0,j-1} + right_{0,j}
for i ← 1 to n
    for j ← 1 to m
        s_{i,j} ← max { s_{i-1,j} + down_{i,j}, s_{i,j-1} + right_{i,j} }
return s_{n,m}
```

5.6 Od Menhetna do grafa poravnanja

5.6.1 Rekurentna relacija dinamičkog programiranja kod grafa poravnanja

Najduži put (slika 5.13) od (0,0) do (i,j) se računa:

$$s_{i,j} = \max \begin{cases} s_{i-1,j} + weight\ of\ edge\ "\downarrow"\ into\ (i,j) \\ s_{i,j-1} + weight\ of\ edge\ "\rightarrow"\ into\ (i,j) \\ s_{i-1,j-1} + weight\ of\ edge\ "\searrow"\ into\ (i,j) \end{cases}$$

Što dalje daje :

$$s_{i,j} = \max \begin{cases} s_{i-1,j} + 0 \\ s_{i,j-1} + 0 \\ s_{i-1,j-1} + 1, v_i = w_j \\ s_{i-1,j-1} + 0, v_i \neq w_j \end{cases}$$

Slika 5.13: Crvene grane težina 1, ostale grane težina 0, v_i i w_j oznake vrste i kolone

U slici 5.14 se vide boldovane grane koje su nastale primenom pravila rekurentne relacije. One predstavljaju putokaze za povratak (backtrack) kod grafa za najdužu zajedničku podsekvencu.

Slika 5.14: Putokazi za povratak (backtrack)

5.6.2 Računanje putokaza za povratak

$$s_{i,j} \leftarrow \max \begin{cases} s_{i-1,j} + 0 \\ s_{i,j-1} + 0 \\ s_{i-1,j-1} + 1, v_i = w_j \\ s_{i-1,j-1} + 0, v_i \neq w_j \end{cases}$$

$$backtrack_{i,j} \leftarrow \max \begin{cases} " \rightarrow ", s_{i,j} = s_{i,j-1} \\ " \downarrow ", s_{i,j} = s_{i-1,j} \\ " \searrow ", otherwise \end{cases}$$

Podsetimo se sada kako bismo rekontruisali putanju preko putokaza kod Menhetn grafa? Krenuli bismo od krajnjeg čvora (sink) i pratili putokaze u obrnutom smeru do početnog čvora (source) 5.15.

Slika 5.15: Rekonstrukcija putanje preko putokaza kod Menhetn grafa

Slika 5.16: Backtracking

Sada na slici 5.16 možemo videti povratak (backtracking) kod grafa za najdužu zajedničku podsekvencu.

5.6.3 Određivanje najduže zajedničke podsekvence (LCS – longest common subsequence) korišćenjem putokaza za povratak

```
OutputLCS (backtrack, v, i, j)
if i = 0 or j = 0
    return
if backtrack_{i,j} = "→"
    OutputLCS (backtrack, v, i, j-1)
else if backtrack_{i,j} = "↓"
    OutputLCS (backtrack, v, i-1, j)
else
    OutputLCS (backtrack, v, i-1, j-1)
    output  v_i
```

Do sada smo pretpostavljali da graf u kom tražimo najdužu putanju ima samo tri vrste grana. Da li se OutputLCS može generalizovati tako da važi i za grafove koji nemaju tako specifičnu topologiju?
Kako se rekurentna relacija dinamičkog programiranja menja za ovakav graf? 5.17

Slika 5.17

$$s_a = max_{all\ predecessors\ b\ of\ node\ a}\{s_b + \textit{weight of edge from } b \textit{ to } a\}$$

Računanje skora za SVE prethodnike 5.18.

- Kod ovakve rekurentne relacije, važno je da pri računanju s_a imamo izračunate s_b za sve čvorove prethodnike b (čvorovi za koje postoji grana do čvora a) Da li je to moguće u bilo kom usmerenom težinskom grafu? Odgovor je **nije**. Da bismo kod svakog čvora mogli da mogli da izračunamo skor za sve njegove prethodnike, usmereni težinski graf mora biti acikličan. DAG (Directed Acyclic Graph)

- Ako je dat usmereni aciklični graf, da li njegove čvorove možemo poređati u niz tako da njihov redosled u nizu osigurava uslov da pri računanju s_a imamo izračunate s_b za sve čvorove prethodnike b (čvorovi za koje postoji grana do čvora a)? Odgovor je **da**, moguće je poređati sve čvorove grafa u niz i taj niz topološki sortirati

5.6.4 Topološko sortiranje

- **Topološko sortiranje** : Sortiranje čvorova DAG-a u nizu tako da sve grane u takvom nizu idu s leva na desno.

- **Teorema**: Svaki DAG se može topološki sortirati.

- Topološko sortiranje svakog DAG-a se obavlja za O(#edges) koraka.

Slika 5.18: Začarani krug

Algoritam za nalaženje najduže putanje u DAG-u¿ :

```
LongestPath(Graph, source, sink)
for each node a in Graph
      s_a ← -∞
s_source ← 0
topologically order Graph
for each node a (from source to sink in topological order)
s_a ← max_all predecessors b of node a {s_b + weight of edge from b to a}
return s_sink
```

- Pošto svaka grana učestvuje tačno jednom, složenost je O(#edges)
- LongestPath vraća dužinu najdužeg zajedničkog podniza ali ne rekonstruiše putanju

5.7 Od globalnog do lokalnog poravnanja

Uvedimo sledeće:

- Skor poravnanja do sada - $\#matches$
- Skor sa mismatch i indel kaznama - $\#matches - \mu * \#mismatches - \sigma * \#indels$

Primer na slici 5.19.

A T - G T T A T A
A T C G T - C - C
+1+1-2+1+1-2-3-2-3=-7

	A	C	G	T	-
A	+1	$-\mu$	$-\mu$	$-\mu$	$-\sigma$
C	$-\mu$	+1	$-\mu$	$-\mu$	$-\sigma$
G	$-\mu$	$-\mu$	+1	$-\mu$	$-\sigma$
T	$-\mu$	$-\mu$	$-\mu$	+1	$-\sigma$
-	$-\sigma$	$-\sigma$	$-\sigma$	$-\sigma$	

Matrica skora

	A	C	G	T	-
A	+1	-3	-5	-1	-3
C	-4	+1	-3	-2	-3
G	-9	-7	+1	-1	-3
T	-3	-5	-8	+1	-4
-	-4	-2	-2	-1	

Još generalnija matrica skora

Slika 5.19

Navedimo rekurentnu relaciju dinamičkog programiranja kod grafa poravnanja. Počinjemo od:

$$s_{i,j} = \max \begin{cases} s_{i-1,j} + weight\ of\ edge\ "\downarrow"\ into\ (i,j) \\ s_{i,j-1} + weight\ of\ edge\ "\rightarrow"\ into\ (i,j) \\ s_{i-1,j-1} + weight\ of\ edge\ "\searrow"\ into\ (i,j) \end{cases}$$

Odnosno,

$$s_{i,j} = \max \begin{cases} s_{i-1,j} - \sigma \\ s_{i,j-1} - \sigma \\ s_{i-1,j-1} + 1, v_i = w_j \\ s_{i-1,j-1} - \mu, v_i \neq w_j \end{cases}$$

A uz pomoc funkcije $score()$ može se zapisati i kao:

5.7.1 Globalno poravnanje

Problem 6 (Problem globalnog poravnanja)**.** *Naći poravnanje sa najvišim skorom između dve niske za datu matricu skora.*
Ulaz: Niske v i w, kao i matrica skora score
Izlaz: Poravnanje niski v i w čiji je skor poravnanja (prema matrici skora) maksimalan od svih mogućih poravnanja v i w.

Šta bi bili homeobox geni?

- Dva gena u različitim vrstama mogu biti slična u kratkim, konzervativnim regionima, a različita u ostalim delovima.

$$s_{i,j} = \max \begin{cases} s_{i-1,j} + score(v_i, -) \\ s_{i,j-1} + score(-, w_j) \\ s_{i-1,j-1}\ score(v_i, w_j) \end{cases}$$

	A	C	G	T	–
A	+1	−3	−5	−1	−3
C	−4	+1	−3	−2	−3
G	−9	−7	+1	−1	−3
T	−3	−5	−8	+1	−4
–	−4	−2	−2	−1	

Slika 5.20

- Homeobox geni sadrže kratak region homeodomen koji je čvrsto konzerviran među različitim vrstama.
- Globalno poravnanje može da propusti nalaženje homeodomena jer pokušava da poravna sekvence u celosti.

Uporedimo sledeća dva poravnanja:

```
GCC-C-AGT--TATGT-CAGGGGGCACG--A-GCATGCAGA-
GCCGCC-GTCGT-T-TTCAG----CA-GTTATG--T-CAGAT
```

Slika 5.21
score = 22(matches) - 2(indent) = 2

```
---G----C-----C--CAGTTATGTCAGGGGGCACGAGCATGCAGA
GCCGCCGTCGTTTTCAGCAGTTATGTCAG-----A------T-----
```

Slika 5.22
score = 17 (matches) - 30(indent) = -13

Slika 5.23

Slika 5.24

Ako se zapitamo koje od njih je bolje, iz priloženog zaključujemo da je to lokalno poravnanje.

5.7.2 Lokalno poravnanje

Lokalno poravnanje računamo kao globalno poravnanje u pravougaoniku, pogledajmo sliku 5.26.

Slika 5.25

Slika 5.26

Da bismo dobili lokalno poravnanje potrebno je da izračunamo globalno poravnanje u okviru svakog pravougaonika.
Algoritam globalnog poravnanja ponovićemo između svaka dva čvora, ne samo između početnog (source) i krajnjeg (sink).
Stoga, broj ponavljanja algoritma će biti $\#nodes^2$ puta.

Problem 7 (Problem lokalnog poravnanja)**.** *Naći lokalno poravnanje najvećeg skora između dve niske.*
Ulaz: Niske v i w, kao i matrica skora score
Izlaz: Podniske niski v i w čije je globalno poravnanje (prema matrici skora) maksimalno među svim globalnim poravnanjima svih podniski niski v i w.

Zamislimo da postoji taksi koji bi nas besplatno vozio do tačke početka lokalnog poravnanja, i od tačke završetka lokalnog poravnanja pa do kraja. Na taj način ne bismo skupili negativne poene, već samo pozitivne. Ovakva vožnja nam daje samo skor lokalnog poravnanja kao što smo i želeli. 5.27

Slika 5.27: Besplatne taksi vožnje

Konstruišimo Menhetn graf za problem lokalnog poravnanja:

Kako bi izgledao Menhetn graf za nas problem?
Dodamo grane težine 0 od (0,0) do svakog čvora, i od svakog čvora do (n,m).
Ukupan broj dodatih grana je $O(|v| + |w|)$, pa algoritam ostaje brz.

Slika 5.28: Menhetn graf za lokalno poravnanje

Problem rešavamo dinamičkim programiranjem:

$$s_{i,j} = \max \begin{cases} s_{i-1,j} + \textit{weight of edge "}\downarrow\textit{" into } (i,j) \\ s_{i,j-1} + \textit{weight of edge "}\rightarrow\textit{" into } (i,j) \\ s_{i-1,j-1} + \textit{weight of edge "}\searrow\textit{" into } (i,j) \end{cases}$$

Slika 5.29: weight of (0,0) into (i,j) = 0

5.8 Kažnjavanje insercija i delecija u poravnanju sekvenci

5.8.1 Kažnjavanje praznina

- U globalnom poravnanju je fiksna kazna σ bila dodeljena svakom indelu
- Međutim, ova fiksna kazna može biti preoštra kod lokalnog poravnanja kada možemo imati 100 uzastopnih indela.
- Niz od k uzastopnih indela često predstavlja jedan isti evolucioni događaj, ne k različitih, slika 5.30

dve praznine (niži skor) **GATCCAG** **GA-C-AG**

GATCCAG **GA--CAG** jedna praznina (viši skor)

Slika 5.30

5.8.2 Adekvatnije kazne za praznine

Afina kazna za praznine za prazninu dužine k: $\sigma + \epsilon * (k-1)$

- σ kazna za **otvaranje** praznine
- ϵ kazna za **proširenje** praznine
- $\sigma > \epsilon$, jer otvaranje praznine treba kazniti više nego njeno proširenje

U slici 5.31 prikayano je modelovanje afinih kazni za praznine pomoću dugih grana.

5.8.3 Izgradnja Menhetn grafa sa afinim kaznama za praznine

- Vremenska složenost je direktno proporcionalna broju grana, zbog čega želimo da smanjimo broj grana u grafu (trenutno je $O(n^3)$ 5.32)
- Jedan način za smanjivanje broja grana je povećanje broja čvorova u grafu

Slika 5.31: Modelovanje afinih kazni za praznine pomoću dugih grana

Slika 5.32: Dodali smo $O(n^3)$ grana

Slika 5.33: Podela Menhetna grafa na 3 nivoa

- Zato delimo Menhetn graf na tri nivoa 5.33

Ako imamo putanju poput one na slici 5.34, kako da je predstavimo pomoću Menhetn grafa na 3 nivoa? Rešenje je prikazano na slici 5.35

Slika 5.34: Kako predstaviti pomoću Menhetn grafa na 3 nivoa?

Slika 5.35: Simulacija Menhetn grafa na 3 nivoa

5.9 Prostorno efikasno poravnanje sekvenci

Zapitajmo se sledeće:
Da li možemo poravnati NPR sintetaze iz dve različite bakterije?

Uzmimo u obzir sledeće činjenice:

- NPR sintetaze su obično veoma dugi proteini, približno 20 000 aminokiselina
- Vremenska složenost poravnanja je probližno jednaka broju ivica (#edges), odnosno kvadratna
- Prostorna složenost poravnanja je probližno jednaka broju čvorova (#nodes), odnosno kvadratna
- **Memorija je često usko grlo pri poređenju dugih sekvenci**

Iz prethodnog zaključujemo da nam prostorna složensot pravi problem i da bi za prosečan racunar ovo bilo nemoguće da izračuna. Stoga, potreban nam je drugi pristup koji će nam rešiti problem. Potreban nam je algoritam koji zahteva linearnu prostornu složenost i udvostručenu vremensku složenost. U te svrhe najčešće se koristi algoritam koji radi po principu podeli-pa-vladaj.

Uvedimo nove pojmove:

- Srednja kolona poravnanja (middle) = $\#columns/2$, slika 5.36
- Srednji čvor poravnanja - čvor u preseku putanje optimalnog poravnanja i srednje kolone, slika 5.37

Slika 5.36: Srednja kolona poravnanja

Koristeći navedene pojmove, demonstrirajmo algoritam **Podeli-pa-vladaj** za poravnanje sekvenci, slika 5.38:

```
AlignmentPath(source, sink)
    find middleNode
    AlignmentPath(source, middleNode)
    AlignmentPath(middle, sink)
```

Slika 5.37: Srednji čvor poravnanja

Slika 5.38: Srednja kolona poravnanja

5.9.1 Prostorna složenost

Za nalaženje najduže putanje u grafu poravnanja traži se čuvanje svih putokaza za - $O(nm)$ prostora.
Međutim, za nalaženje dužine najduže putanje u grafu poravnanja ne traži se čuvanje svih putokaza - $O(n)$ prostora, slika 5.39

Dobijamo da je prostor potreban za algoritam $2 * n \sim O(n)$, odnosno, linearan.

Slika 5.39: Recikliranje prostora za kolone u grafu poravnanja

5.9.2 Vremenska složenost

Neka je **i-putanja** najduža putanja od svih putanja koja posećuje i-ti čvor u srednjoj koloni i neka je $length(i)$ dužina i-putanje.

Na slici 5.41 vidimo da je $length(0) = 2$ i $length(4) = 4$.

Slika 5.40: Računanje length(i)

$length(i)$ možemo računati na sledeći način:

$$length(i) = fromSource(i) + toSink(i)$$

Na slici 5.42 vidimo koliko je potrebno vremena za nalaženje srednjeg čvora - čak $O(nm)$

Slika 5.41: Računanje length(i)

vremena za nalaženje samo jednog čvora!

Slika 5.42: Računanje vremena za nalaženje srednjeg čvora

Svaki problem se može rešiti u vremenu proporcionalnom broju grana tj. površini koju zauzima.
Vreme potrebno za rešavanje naredna dva potproblema: $area/4 + area/4 = area/2$, znači $O(nm + nm/2)$ vremena za nalaženje 3 čvora.
Dakle, vreme potrebno za nalaženje svih čvorova je: $area + area/2 + area/4 + area/8 + \cdots < 2 * area$! Slika 5.43 vizuelno prikazuje vreme potrebno za nalaženje 7 tačaka.

Pokazali smo da je vremenska složenost $2 * n * m \sim O(n * m)$.

5.10 Višestruko poravnanje sekvenci

5.10.1 Od dvostrukog do višestrukog poravnanja

- Do sada su u poravnanju učestvovale samo dve sekvence.

Slika 5.43: Računanje vremena za nalaženje 7 tačaka

- Slaba sličnost između dve sekvence postaje značajna ako je prisutna i u drugim sekvencama
- Višestruka poravnanja mogu otkriti suptilne sličnosti koje dvostruka poravnanja ignorišu

5.10.2 Poravnanje tri A-domena

Na slici 5.44 je prikazano poravnanje tri A-domena

Slika 5.44: Poravnavanja 3 A-domena

5.10.3 Generalizacija dvostrukog na višestroko poravnanje

- Poravnanje 2 sekvence je matrica od 2 reda

- Poravnanje 3 sekvence je matrica od 3 reda (slika 5.45)

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

Slika 5.45

- Funkcija skora treba da dodeljuje visok skor poravnanjima sa konzerviranim kolonama

5.10.4 Poravnanja = 3-D putanje

Poravnanje sekvenci ATGC, AATC i ATGC 5.46

Slika 5.46: Poravnanje sekvenci ATGC, AATC i ATGC

5.10.5 2-D poravnanje u odnosu na 3-D poravnanje

Slika 5.47

2-D poravnanje u odnosu na 3-D poravnanje prikazano na slici 5.47.

5.10.6 Rekurentna relacija dinamičkog programiranja za višestruko poravnanje

$$s_{i,j,k} = \max \begin{cases} s_{i-1,j-1,k-1} + \delta(v_i, w_j, u_k) \\ s_{i-1,j-1,k} + \delta(v_i, w_j, -) \\ s_{i-1,j,k-1} + \delta(v_i, -, u_k) \\ s_{i,j-1,k-1} + \delta(-, w_j, u_k) \\ s_{i-1,j,k} + \delta(v_i, -, -) \\ s_{i,j-1,k} + \delta(-, w_j, -) \\ s_{i,j,k-1} + \delta(-, -, u_k) \end{cases}$$

δ(x, y, z) - element 3-D matrice skora

5.10.7 Vremenska složenost dinamičkog algoritma za višestruko poravnanje

- Kao kod dvostrukog poravnanja, vremenska složenost je proporcionalna broju grana O(#edges)
- Za 3 sekvence n, vremenska složenost je proporcionalna $7n^3$
- Za poravnanje k sekvenci, potrebno je izgraditi kdimenzionalni Menhetn graf sa:
  - n^k čvorova
  - većina čvorova će imati 2^k–1 ulaznih grana
  - Vremenska složenost: O($2^k n^k$)

Višestruko poravnanje uključuje i dvostruko poravnanje, slika 5.48

```
AC-GCGG-C
AC-GC-GAG
GCCGC-GAG
    ↓
ACGCGG-C   AC-GCGG-C   AC-GCGAG
ACGC-GAC   GCCGC-GAG   GCCGCGAG
```

Slika 5.48

5.10.8 Da li se višestruko poravnanje može izgraditi iz dvostrukog?

Za dati skup proizvoljnih dvostrukih poravnanja, možemo li konstruisati višestruko poravnanje iz kog su izvedeni (slika 5.49)?

```
AAAATTTT----     ----AAAATTTT     TTTTGGGG----
----TTTTGGGG     GGGGAAAA----     ----GGGGAAAA
```

Slika 5.49

	-	A	G	G	C	T	A	T	C	A	C	C	T	G
	T	A	G	-	C	T	A	C	C	A	-	-	-	G
	C	A	G	-	C	T	A	C	C	A	-	-	-	G
	C	A	G	-	C	T	A	T	C	A	C	-	G	G
	C	A	G	-	C	T	A	T	C	G	C	-	G	G
A	0	1	0	0	0	0	1	0	0	.8	0	0	0	0
C	.6	0	0	0	1	0	0	.4	1	0	.6	.2	0	0
G	0	0	1	.2	0	0	0	0	0	.2	0	0	.4	1
T	.2	0	0	0	0	1	0	.6	0	0	0	0	.2	0
-	.2	0	0	.8	0	0	0	0	0	0	.4	.8	.4	0

Slika 5.50

5.10.9 Profilna reprezentacija višestrukog poravnanja

Na slici 5.50 prikazana profilna reprezentacija višestrukog poravnanja.

- Do sada smo poravnavali **sekvencu u odnosu na sekvencu.**
  - Možemo li poravnati **sekvencu u odnosu na profil**?
  - Možemo li poravnati **profil u odnosu na profil**?

5.10.10 Višestruko poravnanje: pohlepni pristup

- Izabrati najsličnije sekvence i kombinovati ih u profil
- Tako bismo smanjili broj sekvenci sa k na k-2 i jedan profil
- Iterirati

Primer pohlepnog pristupa:

- Sekvence: GATTCA, GTCTGA, GATATT, GTCAGC
- 6 dvostrukih poravnanja (match+1, indels i mismatches -1) slika 5.51

```
s2  GTCTGA                  s1  GATTCA--
s4  GTCAGC   (score = 2)    s4  G-T-CAGC (score = 0)

s1  GAT-TCA                 s2  G-TCTGA
s2  G-TCTGA (score = 1)     s3  GATAT-T  (score = -1)

s1  GAT-TCA                 s3  GAT-ATT
s3  GATAT-T (score = 1)     s4  G-TCAGC  (score = -1)
```

Slika 5.51

- Pošto su s_2 i s_4 najbliže, od njih pravimo profil

$$\left.\begin{array}{ll} s2 & \text{GTCTGA} \\ s4 & \text{GTCAGC} \end{array}\right\} s_{2,4} = \text{GTCt/aGa/c}$$

Slika 5.52

- Novi skup od 3 sekvence za poravnanje:
  s_1 GATTCA
  s_3 GATATT
  $s_{2,4}$ GTCt/aGa/c

5.11 Zadaci sa vežbi

U nastavku će biti predstavljeni zadaci sa vežbi na kursu rađeni u programskom jeziku Python.

5.11.1 Manhattan Tourist

```
def manhattan_tourist(n, m, down, right):
    s = [[0 for j in range(m)] for i in range(n)]

    backtrack = [[(0,0) for j in range(m)] for i in range(n)]

    backtrack[0][0] = (-1, -1)

    for i in range(1,n):
        s[i][0] = s[i-1][0] + down[i][0]
        backtrack[i][0] = (i-1, 0)

    for j in range(1,m):
        s[0][j] = s[0][j-1] + right[0][j]
        backtrack[0][j] = (0, j-1)

    for i in range(1, n):
        for j in range(1, m):

            to_down = s[i-1][j] + down[i][j]
            to_right = s[i][j-1] + right[i][j]

            if to_down > to_right:
                backtrack[i][j] = (i-1, j)
                s[i][j] = to_down
            else:
                backtrack[i][j] = (i, j-1)
                s[i][j] = to_right

    i = n-1
    j = m-1
    while backtrack[i][j] != (-1,-1):
        print(backtrack[i][j])
        i = backtrack[i][j][0]
        j = backtrack[i][j][1]

    return s[n-1][m-1]

def main():
    down = [[0, 0, 0, 0],
            [0, 1, 2, 1],
            [0, 1, 1, 1],
            [0, 1, 1, 1]]

    right = [[0, 0, 0, 1],
             [0, 3, 5, 1],
             [0, 1, 0, 1],
             [0, 1, 0, 1]]
```

```python

    print(manhattan_tourist(3, 3, down, right))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

5.11.2 LCS Backtrack

```python
def LCSBacktrack(v, w):
    n = len(v)
    m = len(w)
    s = [[0 for j in range(m + 1)] for i in range(n + 1)]

    backtrack = [[(-1,-1) for j in range(m + 1)] for i in range(n + 1)]

    for i in range(1, n + 1):
        backtrack[i][0] = (i-1, 0)

    for j in range(1, m + 1):
        backtrack[0][j] = (0, j-1)

    for i in range(1, n + 1):
        for j in range(1, m + 1):

            s[i][j] = max(s[i-1][j], s[i][j-1], s[i-1][j-1] + int(v[i-1] == w[j-1]))

            if s[i][j] == s[i-1][j]:
                backtrack[i][j] = (i-1, j)
            elif s[i][j] == s[i][j-1]:
                backtrack[i][j] = (i, j-1)
            else:
                backtrack[i][j] = (i-1, j-1)

    i = backtrack[n][m][0]
    j = backtrack[n][m][1]

    lcs = ""

    if i == n-1 and j == m - 1:
        lcs = v[n-1]

    while not (i == 0 and j == 0):
        if backtrack[i][j] == (i-1, j-1):
            lcs = v[i-1] + lcs

        i = backtrack[i][j][0]
        j = backtrack[i][j][1]

    print(lcs)

    return s[n][m]

```

```
45 def main():
46     v = "abcd"
47     w = "dabe"
48
49     print(LCSBacktrack(v,w))
50
51 if __name__ == "__main__":
52     main()
```

5.11.3 Global Alignment

```
1  GAP_PENALTY = -2
2  MISSMATCH = 0
3  MATCH = 1
4
5  def match_score(c1, c2):
6      if c1 == c2:
7          return MATCH
8      else:
9          return MISSMATCH
10
11 def global_alignment(v, w):
12     n = len(v)
13     m = len(w)
14
15     backtrack = [[(-1, -1) for j in range(m + 1)] for i in range(n + 1)]
16     s = [[0 for j in range(m + 1)] for i in range(n + 1)]
17
18     for i in range(1, n + 1):
19         s[i][0] = s[i-1][0] + GAP_PENALTY
20         backtrack[i][0] = (i-1, 0)
21
22     for j in range(1, m + 1):
23         s[0][j] = s[0][j-1] + GAP_PENALTY
24         backtrack[0][j] = (0, j-1)
25
26     for i in range(1, n + 1):
27         for j in range(1, m + 1):
28             s[i][j] = max(
29                             s[i-1][j] + GAP_PENALTY,
30                             s[i][j-1] + GAP_PENALTY,
31                             s[i-1][j-1] + match_score(v[i-1], w[j-1])
32                         )
33
34             if s[i][j] == s[i-1][j] + GAP_PENALTY:
35                 backtrack[i][j] = (i-1, j)
36
37             elif s[i][j] == s[i][j-1] + GAP_PENALTY:
38                 backtrack[i][j] = (i, j-1)
39             else:
40                 backtrack[i][j] = (i-1, j-1)
41
42     v_p = ""
```

```
    w_p = ""

    i = n
    j = m

    while (i,j) != (0,0):
        if backtrack[i][j] == (i-1, j-1):
            v_p = v[i-1] + v_p
            w_p = w[j-1] + w_p

        elif backtrack[i][j] == (i-1, j):
            v_p = v[i-1] + v_p
            w_p = '-' + w_p

        else:
            v_p = '-' + v_p
            w_p = w[j-1] + w_p

        (i,j) = backtrack[i][j]

    print(v_p)
    print(w_p)

    return s[n][m]

def main():
    v = "AAATTTGGGCCCGGGAAATTTCCC"
    w = "GGGCCCTT"

    print(global_alignment(v, w))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

5.11.4 Local Alignment

```
def local_alignment(string_1, string_2):
    DP = [[0 for j in range(len(string_2) + 1)] for i in range(len(string_1) +
    ↪ 1)]

    for i in range(len(string_1) + 1):
        DP[i][0] = 0

    for j in range(len(string_2) + 1):
        DP[0][j] = 0

    for i in range(1, len(string_1) + 1):
        for j in range(1, len(string_2) + 1):
            DP[i][j] = max(0, DP[i-1][j] - 2, DP[i][j-1] - 2, DP[i-1][j-1] +
    ↪ int(string_1[i-1] == string_2[j-1]))


    maximum = 0
```

```
16
17      for i in range(len(DP)):
18          for j in range(len(DP[i])):
19              if DP[i][j] > maximum:
20                  maximum = DP[i][j]
21
22      return maximum
23
24
25
26  def main():
27      string_1 = 'ACGTGCTCG'
28      string_2 = 'AATGCTCT'
29
30      print(local_alignment(string_1, string_2))
31
32  if __name__ == "__main__":
33      main()
```

5.11.5 Edit Distance

```
1   def edit_distance(v, w):
2       n = len(v)
3       m = len(w)
4
5       s = [[0 for j in range(m + 1)] for i in range(n + 1)]
6       backtrack = [[(-1, -1) for j in range(m + 1)] for i in range(n + 1)]
7
8       for i in range(1, n + 1):
9           s[i][0] = i
10          backtrack[i][0] = (i-1, 0)
11
12      for j in range(1, m + 1):
13          s[0][j] = j
14          backtrack[0][j] = (0, j-1)
15
16      for i in range(1, n + 1):
17          for j in range(1, m + 1):
18              s[i][j] = min(s[i-1][j] + 1, s[i][j-1] + 1, s[i-1][j-1] + int(v[i
    ↪ -1] != w[j-1]))
19
20              if s[i][j] == s[i-1][j] + 1:
21                  backtrack[i][j] = (i-1, j)
22
23              elif s[i][j] == s[i][j-1] + 1:
24                  backtrack[i][j] = (i, j-1)
25              else:
26                  backtrack[i][j] = (i-1, j-1)
27
28      v_p = ""
29      w_p = ""
30
31      i = n
```

```
32      j = m
33
34      while (i,j) != (0,0):
35          if backtrack[i][j] == (i-1, j-1):
36              v_p = v[i-1] + v_p
37              w_p = w[j-1] + w_p
38
39          elif backtrack[i][j] == (i-1, j):
40              v_p = v[i-1] + v_p
41              w_p = '-' + w_p
42
43          else:
44              v_p = '-' + v_p
45              w_p = w[j-1] + w_p
46
47          (i,j) = backtrack[i][j]
48
49      print(v_p)
50      print(w_p)
51
52      return s[n][m]
53
54  def main():
55      v = "AAATTTGGGCCCGGGAAATTTCCC"
56      w = "AAACCCTTTGGGCCCTTTAAACCC"
57
58      print(edit_distance(v, w))
59
60  if __name__ == "__main__":
61      main()
```

Glava 6

Postoje li osetljivi delovi u ljudskom genomu?

6.1 Transformacija čoveka u miša

Koji blokovi genoma su slični i kako da ih nađemo?

Kakav bi bio evolucioni scenario za transformisanje jednog genoma u drugi?

Slika 6.1: X hromozom miša i čoveka

Kada je Šarl Pero opisao transformaciju čoveka u miša u delu "Mačak u čizmama", jedva je mogao očekivati da će 3 veka kasnije istraživanje pokazati da su ljudski i mišiji genom iznenađujuće slični. Na slici 6.1 možemo videti X hromozom miša i čoveka.

Zapravo, ako bismo isekli 23 ljudska hromozoma na 280 delova i pomerali ove fragmente DNK, a zatim zalepili delove zajedno u novom redosledu, formiralo bi se 20 mišijih hromozoma. Međutim, evolucija nije koristila samo operaciju *cut-and-paste*, već manju promenu poznatu kao **preuređenje genoma**, što će biti naš fokus u ovom poglavlju.

Blokovi sintenije

Slika 6.2: Blokovi sintenije

Slika 6.3: Blokovi sintenije

Svaki od jedanaest obojenih segmenata na slici 6.2 predstavlja blok sličnih gena i naziva se **blok sintenije** (pogledati i sliku 6.3). U nastavku će biti objašnjeno kako se izgrađuju blokovi sintenije i šta označavaju levi i desni pravac blokova.

Slika 6.2 prikazuje niz 7 promena koje transformišu mišiji X hromozom u ljudski X hromozom. Nažalost, ovaj niz od 7 promena predstavlja samo jedan od 1.070 različitih scenarija od 7 promena koji transformišu X hromozom miša u X hromozom čoveka.

Možemo li pretvoriti X hromozom miša u ljudski X hromozom koristeći samo šest promena?

Bez obzira na to koliko promena razdvaja mišije i ljudske X hromozome, promene moraju biti *retki genomski događaji*. Zapravo, obično preuređeni genomi uzrokuju smrt ili sterilnost mutiranog organizma, čime se sprečava prenošenje preuređenja

na narednu generaciju. Međutim, mali deo preuređenja genoma moze imati pozitivan efekat na preživljavanje i propagirati se kroz vrstu kao rezultat prirodne selekcije. Kada stanovništvo postane izolovano od ostatka njene vrste dovoljno dugo, preuređenja mogu čak stvoriti i novu vrstu.

Promenu mozemo zamisliti kao prekid genoma sa obe strane hromozomskog intervala, pomeranje intervala, a zatim lepljenje rezultujućih segmenata u novom redosledu.

Na slikama 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8 i 6.9 vidimo pojedinačino svaku od promena.

Slika 6.4: Promena 1

Slika 6.5: Promena 2

Slika 6.6: Promena 3

Slika 6.7: Promena 4

Slika 6.8: Promena 5

Slika 6.9: Promena 6

Slika 6.10: Završena transformacija

Slika 6.10 predstavlja transformaciju mišijeg X hromozoma u ljudski X hromozom sa sedam promena. Svaki blok sintenije je jedinstveno obojen i označen celim brojem između 1 i 11. Pozitivni ili negativni znak svakog celog broja ukazuje na smer sintenog bloka (pokazivanje desno ili levo, respektivno). Dva kratka vertikalna segmenta obeležavaju krajnje tačke obrnutog intervala u svakom preokretu.

Pretpostavimo da je evolucijski scenario tačan i recimo peti blok sintenije od vrha predstavlja uređenje hromozoma pretka. Zatim su se desile prve četiri promene na evolucionom putu od miša do zajedničkog pretka, a poslednje tri promene su se desile na evolucionom putu od zajedničkog pretka ka coveku.

6.2 Sortiranje po promenama

Glavni problem je, kao sto je pomenuto u uvodu, nalaženje minimalnog broja promena koje omogućavaju transformaciju X hromozona miša u X hromozom čoveka.

Možemo posmatrati niz blokova sintenije numerisanih kao na slici 6.11.

Slika 6.11: Blokovi sintenije

Slika 6.12

Slika 6.13

Nakon izvršene promene, dobijamo preuređen niz blokova sintenije u genomu to vidimo na slikama 6.12 i 6.13.

Slika 6.14: 2 tačke prekida

Promene u genomu su dovele do stvaranja dve tačke prekida koje predstavljaju poremećaj u redosledu gena u genomu (slika 6.14).

Posmatraćemo 2 scenarija sa različitim brojem promena. Na slici 6.15 vidimo scenario sa 5 promena, a na slici 6.16 sa 4 promene.

Step 0:	2	-4	-3	5	-8	-7	-6	1
Step 1:	2	3	4	5	-8	-7	-6	1
Step 2:	2	3	4	5	6	7	8	1
Step 3:	2	3	4	5	6	7	8	-1
Step 4:	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
Step 5:	1	2	3	4	5	6	7	8

Slika 6.15: Scenario sa 5 promena

Step 0:	2	-4	-3	5	-8	-7	-6	1
Step 1:	2	3	4	5	-8	-7	-6	1
Step 2:	-5	-4	-3	-2	-8	-7	-6	1
Step 3:	-5	-4	-3	-2	-1	6	7	8
Step 4:	1	2	3	4	5	6	7	8

Slika 6.16: Scenario sa 4 promene

Definicija 6.1. ***Rastojanje premutacija*** *je najmanji broj promena potrebnih za transformisanje jedne premutacije u drugu.*

Naredni problem koji posmatramo je **problem sortiranja po promenama** koji predstavlja izračunavanje rastojanja između date permutacije i identične permutacije (+1 +2 ... +n)

Ulaz: permutacija P

Izlaz: rastojanje između permutacije P i identične permutacije

Pohlepno sortiranje po promenama

Prva aproksimacija rastojanja između 2 permutacije je **pohlepno sortiranje po promenama**(primer je dat na slici 6.17).

```
(+1 -7 +6 -10 +9 -8 +2 -11 -3 +5 +4)
(+1 -2 +8 -9 +10 -6 +7 -11 -3 +5 +4)
(+1 +2 +8 -9 +10 -6 +7 -11 -3 +5 +4)
(+1 +2 +3 +11 -7 +6 -10 +9 -8 +5 +4)
(+1 +2 +3 -4 -5 +8 -9 +10 -6 +7 -11)
(+1 +2 +3 +4 -5 +8 -9 +10 -6 +7 -11)
(+1 +2 +3 +4 +5 +8 -9 +10 -6 +7 -11)
(+1 +2 +3 +4 +5 +6 -10 +9 -8 +7 -11)
(+1 +2 +3 +4 +5 +6 -7 +8 -9 +10 -11)
(+1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 -9 +10 -11)
(+1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +10 -11)
(+1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +10 +11)
```

Slika 6.17: Pohlepno sortiranje

Prvi korak je da se izvrši promena koji postavlja +1 na pravo mesto (na prvu poziciju), a zatim slede promene koji postavljaju +2 na drugu poziciju, i tako dalje. Na primer, element 1 je već na pravom mestu i ima ispravan znak (+) u X hromozomu miša, ali element 2 nije na ispravnom položaju. Element 1 možemo zadržati fiksiran i premestiti element 2 na pravi položaj jednom promenom. Još jedna promena je potrebna da bi element 2 imao ispravan znak.

Daljim iteriranjem postupka dovodimo sve veće elemente na njihove ispravne pozicije.

Definicija 6.2. *Element k u permutaciji $P = (p_1, p_2, ..., p_n)$ je* ***sortiran****, ako je $p_k = k$, a u suprotnom je* ***nesortiran****.*

Definicija 6.3. *Permutacija P je* ***k-sortirana****, ako je prvih k-1 elemenata sortirano, a k-ti element nesortiran.*

Sledeći primer pokazuje da je pohlepno sortiranje loša aproksimacija rastojanja između dve permutacije(slika 6.18) jer je ponekad moguće naći mnogo jednostavniji način (slika 6.19).

```
(-6 +1 +2 +3 +4 +5)
(-1 +6 +2 +3 +4 +5) step 1
(+1 +6 +2 +3 +4 +5) step 2
(+1 -2 -6 +3 +4 +5) step 3
(+1 +2 -6 +3 +4 +5) step 4
…
(+1 +2 +3 +4 + -6 +5) step 9
(+1 +2 +3 +4 + -5 +6) step 10
(+1 +2 +3 +4 + +5 +6)
```

Slika 6.18: Pohlepno sortiranje

```
(-6 +1 +2 +3 +4 +5)
(-5 -4 -3 -2 -1 +6)
(+1 +2 +3 +4 +5 +6)
```

Slika 6.19: Kraći način

6.3 Teorema u prekidnoj tački

Uočimo da su uzastopni elementi (npr. (+12 +13)) poželjni, jer se javljaju u istom redosledu kao i u identičnoj permutaciji. Takodje, i (-11 -10) su poželjni, jer se mogu inverzijom postaviti u pravi redosled. Ova dva para elemenata imaju zajedničku osobinu da je drugi element za 1 veci od prvog. Stoga, definišemo pojam suseda.

Definicija 6.4. *(p_i, p_{i+1}) u permutaciji $P = (p_1, p_2, ..., p_n)$ predstavljaju* ***susede****, ako je $p_{i+1} - p_i = 1$, a u suprotnom čine* ***prekid*** *(primere vidimo na slici 6.20).*

Važi:

$$adjacencies(P) + breakpoints(P) = |P| + 1.$$

Slika 6.20: Susedi i prekidi

Sortiranje po promenama eliminacijom prekidnih tacaka

Slika 6.21

Koliko prekidnih tačaka može biti eliminisano u jednoj promeni?

Teorema u prekidnoj tački: Rastojanje između permutacija nije manje od polovine broja prekidnih tačaka.

$$\text{rastojanje između permutacija} \geq \text{breakpoints(P)}/2$$

- Nema garancije da će svaka promena eliminisati 2 prekidne tačke (step 2) (slika 6.21)
- Najveći broj promena bi bio za permutaciju (+n +(n - 1) ... +1) i iznosi n+1 (gornja granica)
- Donja granica: (n + 1)/2

Velika razlika između donje i gornje granice nam sugeriše da moramo preći na drugi način za rešavanje ovog problema.

6.4 Preuređivanje u multihromozomalnim genomima

Umesto što posmatramo preuređivanje gena u okviru jednog hromozoma (hromozom X kod čoveka i miša), generalizujemo problem i posmatramo sve hromozome genoma.

U ovoj generalizaciji će biti više oblika preuređivanja blokova u genomu (do sada su bila samo obrtanja).

Problem je naizgled komplikovaniji, u nastavku će se ispostaviti da nije tako.

6.4.1 Translokacije, fuzije i fizije

Slika 6.22: Translokacije, fuzije i fizije

Za modeliranje translokacija posmatramo multihromozomalni genom sa k hromozoma kao permutaciju koja je podeljena na k delova.

Na primer, genom (+1 +2 +3 +4 +5 +6) (+7 +8 +9 +10 +11) je sastavljen od dva hromozoma (+1 +2 +3 +4 +5 +6) i (+7 +8 +9 +10 +11).

Translokacija razmenjuje segmente različitih hromozoma, npr. translokacija dva hromozoma (+ 1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6) (+ 7 + 8 + 9 +10 +11) može dovesti do sledeća 2 hromozoma (+ 1 + 2 + 3 + 4 + 9 +10 +11) (+ 7 + 8 + 5 + 6). Možemo zamišljati translokaciju kao prvo cepanje svakog od hromozoma (+ 1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6) (+ 7 + 8 + 9 + 1 0 + 1 1) na 2 dela, (+ 1 + 2 + 3 + 4) (+ 5 + 6) (+ 7 + 8) (+ 9 + 1 0 + 1 1) , a zatim lepljenje rezultujućih segmenata u 2 nova hromozoma, (+ 1 + 2 + 3 + 4 + 9 +10 +11) (+ 7 + 8 + 5 + 6) .

Preuređenja u multihromozomalnim genomima nisu ograničena na promene i translokacije. Ona takođe uključuju hromozomske fuzije, koje spajaju 2 hromozoma u 1, kao i fisije, koje dele 1 hromozom na 2 hromozoma (slika 6.22).

Na primer, 2 hromozoma (+ 1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6) (+ 7 + 8 + 9 + 1 0 + 1 1) mogu biti fuzionisani (spojeni) u 1 hromozom (+ 1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6 + 7 + 8 + 9 +10 + 1 1). Sledeća fisija ovog hromozoma moze dovesti do 2 hromozoma (+ 1 + 2 + 3 + 4) (+5+6+7+8+9+10+11).

Pre pet miliona godina, ubrzo nakon razdvajanja čoveka i šimpanze, fuzija dva hromozoma (nazvana 2A i 2B) u jednom od naših predaka stvorila je ljudski hromozom 2 i smanjila broj hromozoma sa 24 na 23.

6.5 Problem rastojanja 2-prekida

6.5.1 Od linearnih do cirkularnih hromozoma

Sada se fokusiramo na jedan od hromozoma u multihromozomalnom genomu i razmotrimo transformacije promene kružnog hromozoma P = (+ a -b -c + d) u Q = (+ a -b -d + c).

Uvodimo pojam crnih usmerenih i crvenih neusmerenih grana. Posmatraćemo hromozome P i Q sa slike 6.23.

Slika 6.23: Hromozomi P i Q

Crne usmerene grane predstavljaju blokove sintenije.
Crvene neusmerene grane povezuju susedne blokove sintenije.

Možemo nacrtati Q na različite načine, zavisno od toga kako se odlučimo da uredimo crne grane. Slika 6.24 prikazuje dve takve ekvivalentne reprezentacije.

Slika 6.24: Ekvivalentne reprezentacije hromozoma Q

Iako je prvi crtež Q na slici njegova najprirodnija reprezentacija, koristićemo drugu reprezentaciju, jer su joj crne grane raspoređene kružno u potpuno istom redosledu kako se pojavljuju u prirodnoj reprezentaciji P = (+a -b -c +d).

Kao što je prikazano na slici 6.25, fiksiranje crnih grana omogućava nam da vizualizujemo efekat promena. Kao sto možemo videti, promena briše dve crvene grane iz P (povezivanje b sa c i d sa a) i zamenjuje ih sa dve nove crvene grane (povezivanje b sa d i c sa a). Ova promena se naziva **obrtanje**.

Slika 6.25: Obrtanje

Slika 6.26 ilustruje fiziju P = (+ a -b -c + d) u Q = (+ a -b) (- c + d). Inverzna operacija fiziji odgovara fuziji dva hromozoma iz Q u hromozom P. Operacije fuzije i fizije, kao i promene, odgovaraju brisanju dve grane u jednom genomu i njihovim zamenjivanjem sa 2 nove grane u drugom genomu.

Slika 6.26: Fizija i fuzija

Translokacija koja uključuje dva linearna hromozoma takođe se može simulirati cirkularizacijom ovih hromozoma, a zatim zamenjivanjem dve crvene grane sa dve različite crvene grane, kao što je prikazano na slici 6.27. Zbog toga se mogu objediniti ova 4 različita tipa preuređenja (slika 6.28). Svi oni se mogu posmatrati kao cepanje 2 crvene grane grafa genoma i zamena sa dve nove crvene grane na ista 4 cvora.
Iz tog razloga definišemo opštu operaciju na grafu genoma koja zamenjuje crvenu granu sa dve nove crvene grane pri čemu čvorovi ostaju isti i nazivamo je **2-prekid**.

Slika 6.27: 2-prekid

Slika 6.28: Objedinjavanje sva 4 preuredjenja

6.5.2 Rastojanje 2-prekida

Definicija 6.5. *Rastojanje 2-prekida d(P,Q): Minimalni broj 2-prekida koji transformišu genom P u genom Q.*

Definicija 6.6. *Problem rastojanja 2-prekida: Naći rastojanje 2-prekida između dva genoma.*

Ulaz. Dva genoma nad istim skupom blokova sintenije.

Izlaz. Rastojanje 2-prekida između ovih genoma.

6.6 Grafovi prekidnih tačaka

Za izračunavanje rastojanja 2-prekida konstruisaćemo graf za upoređivanje dva genoma.

Posmatrajmo genome P (slika 6.29) i Q (slika 6.30).

Slika 6.29: Slika 29: Genom P

Slika 6.30: Genom Q

Genom Q mozemo predstaviti i na drugi nacin (slika 6.31).

Slika 6.31: Drugačija reprezentacija genoma Q

Nadgradnjom genoma P i Q dobijamo $BreakpointGraph(P, Q)$ (slika 6.32).

Slika 6.32: Nadgradnja genoma P i Q

Crvene i crne grane u grafu prekidnih tačaka formiraju genom P.

Plave i crne grane u grafu prekidnih tačaka formiraju genom Q.

Crvene i plave grane formiraju **alternirajuće crveno-plave cikluse** (slika 6.33).

Slika 6.33: Alternirajući crveno-plavi ciklusi

Koristimo oznaku **cycle(P, Q)**: broj alternirajućih crveno-plavih ciklusa.

Šta predstavlja cycle(P, Q)?

Posmatraćemo grafove genoma P i Q na slici 6.34.

Slika 6.34: Grafovi genoma P i Q

1. korak: Poređamo crne grane genoma Q u isti redosled kao u genomu P
2. korak: Nadgradnja genoma P i Q u jedan
3. korak: Uklanjanje crnih grana

Čitav postupak je prikazan na slici 6.35.

Slika 6.35: cycle(P,Q)

Za dato P (slika 6.36), koje Q maksimizuje cycle(P, Q)?

Slika 6.36: Genom P

U slučaju da P i Q imaju isti broj blokova sintenije, označimo taj broj sa **Blocks(P, Q)**. Ako su P i Q identični, njihov graf prekidnih tačaka se sastoji od Blocks(P, Q) ciklusa dužine 2 od kojih svaki sadrži jednu crvenu i jednu plavu granu. Cikluse dužine 2 nazivamo **identičkim ciklusima**, a graf prekidnih tačaka formiran na osnovu identičkih genoma nazivamo **identičkim grafom prekidnih tačaka** (slika 6.37).

Slika 6.37: Identički graf prekidnih tačaka

Preuređenje genoma utiče na crveno-plave cikluse.

Svaka transformacija $P \to Q$ (slika 6.38) odgovara transformaciji:

Slika 6.38: Trasnformacija $P \to Q$

Preuređenja genoma takođe utiču i na cycle(P, Q) (slika 6.39):

Slika 6.39: Uticaj preuređenja na cycle(P,Q)

6.7 Teorema o rastojanju 2-prekida

Posmatramo problem sortiranja po 2-prekidima (slika 6.40):

2-prekidi

$P \rightarrow \ldots \rightarrow Q$

BreakpointGraph(P,Q) → ... → BreakpointGraph(Q,Q)

cycle(P,Q) → ... → cycle(Q,Q)=blocks(Q,Q)

blocks(P,Q) – broj blokova koji učestvuje u izgradnji P i Q

broj `crveno-plavih` ciklusa se uvećava za
blocks(P,Q) - cycle(P,Q)

Slika 6.40: Sortiranje po 2-prekidima

Koliko može svaki 2-prekid da doprinese ovom uvećanju?

2-prekid može izmeniti cycle(P, Q) za 1. Posmatrajmo sliku 6.41.

Slika 6.41

Postoji 2-prekid povećanje veličine cycle(P, Q) za 1 (slika 6.42).

Slika 6.42

Teorema o rastojanju 2-prekida

- Svaki 2-prekid povećava broj ciklusa najviše za 1
- Za svaki 2-prekid postoji povećanje broja ciklusa za tačno 1
- Svako sortiranje po 2-prekidima mora povećati broj ciklusa za $blocks(P, Q) - cycle(P, Q)$
- 2-prekid rastojanje između genoma P i Q:

$$d(P, Q) = blocks(P, Q) - cycle(P, Q)$$

Rastojanje 2-prekida između genoma čoveka i miša

- Genomi čoveka i miša se mogu rastaviti na 280 blokova sintenije (dužine bar pola miliona nukleotida)
- Graf prekidnih tačaka nad ovim blokovima ima ukupno 35 ciklusa
- Na osnovu teoreme o rastojanju 2-prekida:

$$d(H, M) = blocks(H, M) - cycle(H, M) = 280 - 35 = 245$$

- Postoje različite verzije scenarija sa 245 koraka.
- Pravi evolutivni scenario je možda imao i više od 245 koraka.

Shortest rearrangement scenario

Slika 6.43: Shortest rearrangement scenario

ShortestRearrangementScenario(P, Q)
  output P
  $RedEdges \leftarrow ColoredEdges(P)$
  $BlueEdges \leftarrow ColoredEdges(Q)$
  $BreakpointGraph \leftarrow$ the graph formed by $RedEdges$ and $BlueEdges$
  while $BreakpointGraph$ has a non-trivial cycle Cycle
    $(j, i') \leftarrow$ an arbitary edge from $BlueEdges$ in a nontrivial red blue cycle
    $(i, j) \leftarrow$ an edge from $RedEdges$ originating at node j
    $(i', j') \leftarrow$ an edge from $RedEdges$ originating at node i'
    $RedEdges \leftarrow RedEdges$ with edges (i, j) and (i', j') removed
    $RedEdges \leftarrow$ RedEdges with edges (j, i') and (j', i) added
    $BreakpointGraph \leftarrow$ the graph formed by $RedEdges$ and $BlueEgdes$
    $P \leftarrow$ **2-BreakOnGenome(P, i, i', j, j')**
    output P

$2-BreakOnGenome(P, i, i', j, j')$ - uklanja grane (i, i') i dodaje grane (i, j) i (i', j') (genom predstavljen grafom prekidnih tačaka) (pogledati sliku 6.43).

6.8 Zadaci sa vezbi

6.8.1 ChromosomeToCycle

```
def chromosome_to_cycle(chromosome):

    nodes = [0 for i in range(2*len(chromosome))]

    for j in range(len(chromosome)):
        i = chromosome[j]
        if i > 0:
            #dodajemo cvorove
            nodes[2*j] = 2*i - 1
            nodes[2*j + 1] = 2*i
        else:
            nodes[2*j] = -2*i
            nodes[2*j + 1] = -2*i - 1

    return nodes

def main():
    print(chromosome_to_cycle([1, -2, -3, 4]))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

6.8.2 CycleToChromosome

```
def cycle_to_chromosome(nodes):

    chromosomes = [0 for i in range(len(nodes)//2)]

    for j in range(len(nodes)//2):
        if nodes[2*j] < nodes[2*j + 1]:
            chromosomes[j] = nodes[2*j +1] // 2
        else:
            chromosomes[j] = -nodes[2*j] // 2

    return chromosomes

def main():
    nodes = [1, 2, 4, 3, 6, 5, 7, 8]
    print(cycle_to_chromosome(nodes))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

6.8.3 GreedySorting

```
def find(P, start, n):
    for i in range(start, len(P)):
        if P[i] == n or P[i] == -n:
            return i

def reversal(P, start, stop):
    rev = [-i for i in P[start:stop+1]]
    rev.reverse()
    P[start:stop+1] = rev

    return P

def greedy_sorting(P):
    approx_reversal_distance = 0

    print(P)

    for k in range(len(P)):
        if P[k] !=  k+1:
            i = find(P, k, k+1)
            P = reversal(P, k, i)
            approx_reversal_distance += 1

            print(P)

            if P[k] < 0:
                P[k] = -P[k]
                approx_reversal_distance += 1

                print(P)

    return approx_reversal_distance

def main():
   # P = [+1, -7, +6, -10, +9, -8, +2, -11, -3, +5, +4]
   # P = [+6, -7, +1, -10, +9, -8, +2, -11, -3, +5, +4]
    P = [-2, -5, +3, +4, +1]

    print(greedy_sorting(P))

if __name__ == "__main__":
    main()
```

6.8.4 ShortestRearrangementScenario

```
import copy

def cycle_to_chromosome(nodes):

    chromosomes = [0 for i in range(len(nodes)//2)]

    for j in range(len(nodes)//2):
        if nodes[2*j] < nodes[2*j+1]:
            chromosomes[j] = nodes[2*j+1] // 2
        else:
            chromosomes[j] = -nodes[2*j] // 2

    return chromosomes

def colored_edges(P):
    edges = []
    for chromosome in P:
        nodes = chromosome_to_cycle(chromosome)
        for j in range(len(chromosome)):
            # Obojene grane su neusmerene, pa dodajemo oba smera
            edges.append((nodes[2*j+1], nodes[(2*j+2)
    len(nodes)]))edges.append((nodes[(2*j+2)
     len(nodes)],nodes[2*j+1]))

    return edges

def chromosome_to_cycle(chromosome):

    nodes = [0 for i in range(2*len(chromosome))]

    for j in range(len(chromosome)):
        i = chromosome[j]
        if i > 0:
            nodes[2*j] = 2*i - 1
            nodes[2*j + 1] = 2*i
        else:
            nodes[2*j] = -2*i
            nodes[2*j + 1] = -2*i - 1
    return nodes


def graph_to_genome(genome_graph):
    P = []
```

```
    nodes = []

    for (i,j) in genome_graph:
        nodes.append(i)
        nodes.append(j)


    prvi = [nodes[-1]]
    ostatak = copy.copy(nodes[:-1])
    nodes = prvi + ostatak

    chromosome = cycle_to_chromosome(nodes)
    P.append(chromosome)

    return P

def two_break_on_genome_graph(genome_graph, i, ip, j, jp):

    new_edges = []

    for edge in genome_graph:
        if (edge[0] == i and edge[1] == ip) or (edge[0] == j and
    ↪ edge[1] == jp):
            continue
        new_edges.append(edge)

    new_edges.append((i,j))
    new_edges.append((ip,jp))

    return new_edges

def black_edges(P):
    nodes = chromosome_to_cycle(P)
    edges = []
    i = 0;

    while i < len(nodes):
        if nodes[i] < nodes[i+1]:
            edges.append((nodes[i], nodes[i+1]))
        else:
            edges.append((nodes[i+1], nodes[i]))

        i = i + 2

    return edges
```

```python

def two_break_on_genome(P, i, ip, j, jp):
    genome_graph = black_edges(P) + colored_edges([P])
    genome_graph = two_break_on_genome_graph(genome_graph, i, ip, j, jp)

    P = graph_to_genome(genome_graph)

    return P

def has_nontrivial_cycle(P, Q):
    for (v,w) in P:
        if (v,w) not in Q and (w,v) not in Q:
            return True

    return False

def select_edge_from_nontrivial_cycle(P, Q):
    for (v,w) in Q:
        if (v,w) not in P and (w,v) not in P:
            return (v,w)


def shortest_rearrangement_scenario(P, Q):
    red_edges = colored_edges([P])
    blue_edges = colored_edges([Q])

    num_of_breaks = 0

    while has_nontrivial_cycle(red_edges, blue_edges):
        (j,i_p) = select_edge_from_nontrivial_cycle(red_edges, blue_edges)

        i = -1
        j_p = -1

        for (v,w) in red_edges:
            if v == j:
                i = w
            if w == j:
                i = v
            if v == i_p:
                j_p = w

        red_edges.remove((j, i))
```

```
129         red_edges.remove((i, j))
130
131         red_edges.remove((i_p, j_p))
132         red_edges.remove((j_p, i_p))
133
134         red_edges.append((j, i_p))
135         red_edges.append((i_p, j))
136
137         red_edges.append((j_p, i))
138         red_edges.append((i, j_p))
139
140         num_of_breaks += 1
141     return num_of_breaks
142
143 def main():
144     P = [1,-2,-3,4]
145     Q = [1, 2, 3, -4]
146
147     print(shortest_rearrangement_scenario(P,Q))
148
149 if __name__ == "__main__":
150     main()
```

Glava 7

Zašto naučnici i dalje nisu razvili vakcinu za HIV

7.1 Uvod

7.1.1 Klasifikacija HIV fenotipa

1984. godine, američka ministarka zdravlja Margaret Hekler je objavila da će vakcina za HIV biti dostupna u narednih 2 godine. 1997. godine, Bil Klinton je otvorio novi centar za istraživanje na Nacionalnom institutu zdravlja, sa ciljem da se razvije vakcina za HIV. Kompanija Merck je 2005. počela kliničko ispitivanje vakcine za HIV, ali je odustala posle 2 godine, jer su rezultati pokazali da je vakcina zapravo povećala rizik od dobijanja HIV-a kod nekih primalaca vakcine.

Danas, uprkos ogromnim investicijama i istraživanjima, daleko smo od razvijanja vakcine za HIV, a 35 miliona ljudi žive s tom bolešću. Naučnici su napravili ogroman napredak u razvoju antiretroviralne terapije, koja predstavlja mešavinu lekova koji stabilizuju simptome zaraženog pacijenta. Međutim, ova terapija ne leči sidu i ne može da zaustavi širenje HIV-a tako da ne predstavlja pravu vakcinu za sidu.

Klasične vakcine protiv virusa su često napravljene od proteina virusa. Ove vakcine stimulišu čovekov imuni sistem da prepozna virusne omotače proteina kao strane, da ih uništi i da sačuva podatke o njima, da bi imuni sistem mogao kasnije da ih identifikuje i iskoreni.

Međutim, virusni omotači proteina HIV virusa mogu biti ekstremno promenljivi, zato što virus mora da mutira brzo da bi preživeo. Virus HIV-a kod neke osobe evoluira vrlo brzo da bi izbegao imuni sistem čoveka. Takođe, uzorci HIV-a uzeti od različitih pacijenata su pokazali da oni imaju podtipove koji se veoma razlikuju. Dakle, uspešna vakcina za HIV mora biti dovoljno širokog spektra da pokrije sve ove različitosti.

HIV ima samo devet gena i u ovom poglavlju se fokusiramo na *env* gen koji brzo mutira. Protein koji kodira *env* gen ulazi u **glycoprotein gp120** i **glycoprotein gp41**.

S obzirom da HIV mutira tako brzo, različiti izolati HIV-a mogu imati različite fenotipe, koji onda zahtevaju različite mešavine lekova. HIV virusi se mogu podeliti

na brzo replicirajuće (SI) izolate i sporo replicirajuće NSI izolate. Tokom infekcije, proteini virusa kao što je gp120 koje HIV koristi da uđe u ćelije se prenose do površine ćelije, gde mogu da prouzrokuju da se ta ćelija spoji sa susednom ćelijom. To uzrokuje da desetine ljudskih ćelije spoje svoje ćelijske membrane u jedan veliki, nefunkcionalni syncytium ili u abnormalnu multinukleaturnu ćeliju. Na ovaj način, inficirajući samo jednu ćeliju, biće ubijene mnoge ljudske ćelije.

Ograničenja u poravnanju sekvenci

Pre nego što biologičari uopšte mogu da počnu da proučavaju pitanje predviđanja HIV fenotipa koristeći gp120 sekvence, oni se suočavaju sa problemom konstrukcije preciznog poravnanja ovih sekvenci. Čak i jedna pogrešno poravnanje, koje postavlja amino kiselinu na poziciju utičući na SI/NSI fenotip, može prouzrokovati pogrešnu klasifikaciju HIV fenotipa. Iz poglavlja 5, već znamo da je konstrukcija višestrukog poravnanja sekvenci koje divergiraju težak algoritamski problem.

Problem formulacije višestrukog poravnanja uveden u poglavlju 5 ne pruža adekvatnu translaciju biološkog problema PHV klasifikacije u algoritamski problem. Zbog toga moramo smisliti novu formulaciju problema poravnanja sekvenci koja će dovesti statistički solidne analize gp120 proteina.

7.2 Pronalaženje CG ostrva

Početkom dvadesetog veka, Phoebus Levene je otkrio četiri nukleotida od kojih se sastoji DNK. U to vreme, vrlo malo se znalo o DNK. Zbog toga, Levene je sumnjao da DNK može da čuva genetstke informacije koristeći samo četiri slova i postavio je hipotezu da se u DNK nalazi gotovo jednak broj adenina, citozina, guanina i timina. Jedan vek kasnije, znamo da komplementarni nukleotidi na suprotnim obalama DNK imaju jednaku frekvenciju osnovnog uparivanja, ignorišući ekstremno retke greške osnovnog uparivanja. Međutim, nije tačno da su frekvencije nukleotida približno iste na jednoj obali DNK. Različite vrste imaju različite **CG-sadržaje**, ili procenat citozina i guanina u genomu.

Mogli bismo očekivati da se svaki od dinukleotida CC, CG, GC, GG u ljudskom genomu javlja sa frekvencijom od 0.21 * 0.21 + 4.41%. Međutim, frekvencija CG u ljudskom genomu je samo 1%. Ovaj dinukleotid je toliko redak zbog **metilacije**.

Definicija 7.1. *Metilacija je dodavanje metil (CH3) grupe na citozin (često u okviru CG dinukleotida).*

Rezultujući metilovani citozin ima tendenciju da deaminuje u timin. Kao rezultat metilacije, CG je najređi dinukleotid u mnogim genomima. Metilacija je često izostavljena u genima u regionima pod nazivom **CG-ostrva** (CG se često pojavljuje).

U prvom pokušaju za nalaženje ovakvih gena, kako bismo tražili CG-ostrva? Naivan pristup traženju CG-ostrva bi bio da se pomera prozor kroz genom, proglašavajući prozore sa većom frekvencijom CG, potencijalnim CG-ostrvima. Mane ovog pristupa bi bile iste kao i pri pomeranju prozora da bi se odredio koji novčić je krupije

koristio u kom trenutku. Ne znamo koliki će prozor biti i zato nije jasno kako odabrati veličinu prozora za detekciju CG-ostrva. Takođe, različiti prozori mogu klasifikovati iste pozicije u genomu različito.

7.3 Nepoštena kockarnica

7.3.1 Kockanje sa Jakuzama

Japanska kriminalna organizacija pod nazivom jakuza potiče iz od grupe putujućih kockara iz 18. veka koji su se nazivali bakut ("jakuza"je naziv za gubitničku ruku u Japanskoj kartaškoj igri). Jedna od najpopularnijih igara koju su bakuto organizovali u svojim kazinoima se zvala Čo-Han. U ovoj igri, koja se bukvalno prevodi kao "jednake šanse", krupije baca dve kockice, a igrač se kladi na to dali će suma kockica biti paran ili neparan broj.

Iako je igranje Čo-Han igre u jakuzinim kockarnicama veoma zanimljivo, možemo takođe igrati i igru koja se zove "glava ili pismo", tako što se baca novčić u vazduh i pogađa se ishod. Pretpostavimo da se iz nekog razloga više ljudi kladi na pismo nego na glavu u ovoj igri. U tom slučaju bi nepošten krupije mogao da iskoristi otežani novčić koji ima veću verovatnoću da padne na glavu nego na pismo. Mi ćemo pretpostaviti da otežani novčić ima verovatnoću da padne na glavu 3/4.

Pitanje: Recimo da igramo igru pismo ili glava 100 puta, i novčić padne na glavu 63 puta. Da li možemo da kažemo da krupije vara? Da li je korišćen fer ili otežan novčić? **Nagoveštaj**: 63 je bliže 75 nego 50!

Pitanje nije dobro formulisano, jer bilo koji novčić može da proizvede bilo koji niz bacanja. Da li možemo da utvrdimo koji novčić je verovatnije korišćen? Zapišimo verovatnoću padanja pisma ("T") i glave ("H") za fer novčić (F) kao:

$$Pr_F("H") = 1/2 Pr_F("T") = 1/2 \tag{7.1}$$

i verovatnoća otežanog novčića (B):

$$Pr_B("H") = 3/4 Pr_B("T") = 1/4 \tag{7.2}$$

Kako su bacanja novčića nezavisni događaji, verovatnoća da će n bacanja fer novčića proizvesti dati niz $x = x_1x_2...x_n$ sa k pojavljivanja glave je:

$$Pr(x|F) = \prod_{i=1}^{n} Pr_F(x_i) = (1/2)^n. \tag{7.3}$$

Verovatnoća da će otežani novčić da proizvede isti niz je:

$$Pr(x|B) = \prod_{i=1}^{n} Pr_B(x_i) = (1/4)^{(n-k)} \cdot (3/4)^k = 3^k/4^n. \tag{7.4}$$

Ako je Pr(x|F) > Pr(x|B), onda je veća verovatnoća da je krupije koristio fer novčić, a ako je Pr(x—F) < Pr(x—B), onda je obrnuto. Kada su jednaki Pr(x|F) = Pr(x|B) tada je:

$$(1/2)^n = (1/4)^{(n-k)} \cdot (3/4)^k \to 2^n = 3^k \to k = \log_2 3 \cdot n \to k \approx 0.632 \cdot n \tag{7.5}$$

Dakle ukoliko je mera odnosa $k/n < 1/\log_2 3$, tada je i Pr(x|F) > Pr(x—B). Iako je 63 bliže 75 nego 50, fer novčić će sa većom verovatnoćom dati 63 glave u 100 bacanja.

7.3.2 Dva novčića u krupijeovom rukavu

U bakuto kockarnicama, Čo-Han krupije bi skinuo svoju majicu u toku igre, kako bi skinuo sa sebe sumnju da mulja sa kockicama. Mi ćemo ipak pretpostaviti da u igri glava ili pismo, nepošteni krupije nosi majicu i drži oba novčića u svom rukavu i može da ih neprimetno menja u bilo kom trenutku. Pošto ne želi da bude uhvaćen kako zamenjuje novčiće, on ih menja samo povremeno, pretpostavimo sa verovatnoćom 0.1 nakon svakog bacanja.

Pitanje: Nakon niza bacanja novčića, možemo li reći kada je krupije koristio fer coin a kada otežani novčić?

Problem 8 (Kazino problem.)**.** *Za dati niz bacanja novčića, odrediti kada je krupije koristio fer a kada otežani novčić.*

- *Ulaz: Niz* $x = x_1x_2 \dots x_n$ *bacanja dobijenih od novčića F (fer) i B (otežani).*
- *Izlaz: Niz* $\pi = \pi_1\pi_2 \dots \pi_n$*, gde je svako* π_i *jednako ili F ili B što znači da je* x_i *dobijeno bacanjem fer ili otežanog novčića, redom.*

Nažalost, ni ovo nije dobro definisan problem. Svaki ishod bacanja novčića može biti dobijen bilo kojom permutacijom fer i otežanog novčića! HHHHH je moglo biti dobijeno od BBBBB, FFFFF, FBFBF, itd.

Neophodan je način za ocenjivanje različitih scenarija: BBBBB, FFFFF, FBFBF, itd. zavisno od toga koliko je svaki od njih verovatan.

Kako da ispitamo i ocenimo 2^n mogućih scenarija?

Jedan pristup ovom problemu da pogodimo koji novčić je verovatnije krupije koristio u svakom bacanju je da uzmemo "okvir prozora"(dužine $t < n$) duž niza bacanja $x = x_1...x_n$ i da izračunamo meru odnosa fer i otežanog novčića (kao u gornjem primeru) u okviru svakog prozora. Ukoliko je mera odnosa u okviru prozora manja od nule, onda je veća verovatnoća da krupije koristi otežani novčić u okviru prozora, inače je obrnuto.

Postoji dva problema sa metodom "okvira prozora". Prvo je da nemamo vidan način da odaberemo dužinu okvira prozora. Drugo, okviri prozora koji se preklapaju mogu klasifikovati isti ishod uzrokovan i otežanim i fer novčićem. Na primer, ako je $x =$ "HHHHHTTHHHTTTTT", onda prozor $x_1...x_{10} =$ "HHHHHTTHHH"ima negativnu meru odnosa, a onda prozor $x = x_6...x_{15} =$ "TTHHHTTTTT"ima pozitivnu meru odnosa. Koji je novčić krupije koristio na bacanjima $x_6...x_{10}$?

7.4 Skriveni Markovljevi modeli

7.4.1 Od bacanja novčića do Skrivenog Markovljevog Modela

Naš cilj je razvijemo koncept koji modeluje nepoštenog krupijea i potragu za CG-ostrvima u genomu. Krupijea možemo posmatrati kao mašinu koja ima k skrivenih stanja (F i B). U svakom koraku, emituje simbol (H ili T) iz jednog od svojih skrivenih stanja. Dok je u određenom stanju, mašina donosi dve odluke:

- Koji simbol ću emitovati?
- U koje skriveno stanje ću nakon toga preći?

Mašina odgovara na prvo pitanje tako što izabere proizvoljan broj između stanja F i B, sa verovatnoćom 0.9 da će ostati u trenutnom stanju i verovatnoćom 0.1 da će promeniti stanje. Mašina odgovara na drugo pitanje tako što bira između simbola H i T sa verovatnoćama koje zavise od toga u kom stanju je trenutno. Naš cilj je da zaključimo koja je najverovatnija sekvenca stanja mašine analizirajući sekvence simbola koje emituje.

Na ovaj način smo pretvorili krupijea u apstraktnu mašinu koja se zove **Skriveni Markovljev Model** (HMM). Razlika između mašine za bacanje novčića i generalnog koncepta HMM-a je što će HMM kasnije imati proizvoljan broj stanja i može da ima proizvoljnu distribuciju verovatnoća, odlučujući u koje stanje da pređe i koje simbole da emituje.

7.4.2 HMM dijagrami

HMM se definiše kao skup četiri objekta:

- azbuka emitovanih simbola Σ (H i T)
- skup skrivenih stanja (F i B)
- Matrica verovatnoće prelaska: $Transition = (transition_{l,k})$: $|States| \times |States|$ matrica **verovatnoća prelaska** (iz stanja l u stanje k)
- Matrica emisionih verovatnoća: $Emision = (emision_k(b))$: $|States| \times |\Sigma|$ matrica **emisionih verovatnoća** (emitovanje simbola b u stanju k)

Kao što je prikazano na slici 7.1, HMM se može prikazati kao HMM dijagram, graf gde je svako stanje predstavljeno jednim punim čvorom. Usmerene pune grane povezuju svaki par čvorova, kao i svaki čvor sa sobom. Svaka takva grana je obeležena verovatnoćom prelaska iz jednog stanja u drugo. HMM dijagram takođe ima i isprekidane čvorove koji predstavljaju simbole azbuke Σ i isprekidanje grane koje povezuju svako stanje sa svojim isprekidanim čvorom. Svaka takva grana je obeležena verovatnoćom da će HMM emitovati taj simbol dok je u tom stanju.

Transition

	F	B
F	0.9	0.1
B	0.1	0.9

Emission

	H	T
F	0.50	0.50
B	0.75	0.25

Slika 7.1: HMM dijagram

Definicija 7.2. ***Skrivena putanja*** *je niz* $\pi = \pi_1, ..., \pi_n$ *stanja kroz koje HMM prolazi.*

Slika 7.1 prikazuje primer gde nepošteni krupije HMM proizvodi sekvencu $x =$ "THTHHHTHTTH" sa skrivenom putanjom $n = FFFBBBBBFFF$. Fer novčić je korišćen za prva tri bacanja i za poslednja tri bacanja, a otežani novčić se koristi za pet bacanja između.

Uvedimo sledeće jednakosti:

- $Pr(x, \pi)$: zajednička verovatnoća da dati HMM polazi kroz stanja π i emituje nisku $x = x_1x_2...x_n$.
- $Pr(x|\pi)$: uslovna verovatnoća da HMM emituje nisku x nakon prolaska kroz skrivenu putanju π.
- $Pr(x, \pi) = Pr(x|\pi) * Pr(\pi)$

Da bi se izračunalo $Pr(x, \pi)$, prvo moramo da izračunamo $PR(\pi)$. Neka $Pr(\pi_i \rightarrow \pi_{i+1})$ označava verovatnoću prelaska HMM-a iz stanja π_i u stanje π_{i+1}. Verovatnoća za π je jednaka proizvodu verovatnoća prelaska

$$Pr(\pi) = \prod_{i=1}^{n} Pr(\pi_{i-1} \rightarrow \pi_i) = \prod_{i=1}^{n} transition_{\pi_{i-1},\pi_i} \tag{7.6}$$

Problem 9 (Problem verovatnoće skrivene putanje.). *Izračunati verovatnoću skrivene putanje HMM-a.*
Ulaz: Skrivena putanja π *i model HMM* $(\Sigma, States, Transition, Emission)$.
Izlaz: Verovatnoća date putanje, $Pr(\pi)$.

Da bismo izračunali $Pr(x|\pi)$ za neki HMM, označićemo sa $Pr(x_i|\pi_i)$ verovatnoću emitovanja $emission_{\pi_i}(x_i)$ da je x_i emitovan kada je HMM bio u stanju π_i. Ko rezultat toga, za neku putanju π, HMM emituje string x sa verovatnoćom jednakom proizvodu verovatnoća emitovanja na toj putanji,

$$Pr(x, \pi) = \prod_{i=1}^{n} Pr(x_i|\pi_i) = \prod_{i=1}^{n} emission_{\pi_i}(x_i) \tag{7.7}$$

Problem 10 (Problem verovatnoće ishoda za datu skrivenu putanju)**.** *Izračunati verovatnoću da dati HMM emituje datu nisku za datu skrivenu putanju.*
Ulaz: Niska $x = x_1, ..., x_n$ *koju emituje dati HMM(*$\Sigma, States, Transition, Emission$*) i skrivena putanja* $\pi = \pi_1, ..., \pi_n$.
Izlaz: Uslovna verovatnoća $Pr(x|\pi)$ *da će dati HMM emitovati nisku* x *prateći skrivenu putanju* π.

7.5 Problem dekodiranja

7.5.1 Viterbi graf

Problem 11 (Problem dekodiranja)**.** *Naći optimalnu skrivenu putanju sa kojom je dati HMM emitovao datu nisku.*
Ulaz: Niska $x = x_1...x_n$ *koju emituje HMM(*$\Sigma, States, Transition, Emission$*).*
Izlaz: Putanja π *koja maksimizuje verovatnoću* $Pr(x, \pi)$ *po svim mogućim putanjama* π *za ovaj HMM.*

Da bi rešio problem dekodiranja, Andrew Viterbi je koristio Menhetn graf inspirisan HMM-om. Za HMM koji emituje string od n simbola $x = x_1...x_n$, čvorovi HMM-ovog Viterbi grafa se dele na —States— vrsta i n kolona (slika 7.2). Dakle, čvor (k, i) reprezentuje stanje k i i-ti emitovani simbol. Svaki čvor je povezan sa svim čvorovima iz kolone s njegove desne strane; grana koja povezuje $(l, i-1)$ sa (k, i) odgovara prelasku iz stanja l u stanje k (sa verovatnoćom $transition_{l,k}$) i zatim emitovanju simbola x (sa verovatnoćom $emission_k(x_i)$).Kao rezultat toga, sve putanje koja povezuje čvor u prvoj koloni Viterbi grafa sa čvorom u poslednjoj koloni, odgovara skrivenoj putanji $\pi = \pi_1...\pi_n$.

Slika 7.2: Menhetn graf za problem dekodiranja

Težina grane koja povezuje $(l, i-1)$ i (k, i) u Viterbi grafu je jednaka

$$Weight_i(l,k) = transition_{\pi_i,\pi_{i-1}} * emission_{\pi_i}(x_i) \tag{7.8}$$

Zatim, definišemo **proizvod težina** putanja u Viterbi grafu, kao proizvod težina njegovih grana. Za putanju od najlevlje kolone do najdesnije(da li se ovo kaže ovako ili sam nepismen?) kolone u Viterbi grafu koja odgovara skrivenoj putanji n, ovaj proizvod je jednak proizvodu $n-1$ članova,

$$\prod_{i=2}^{n} transition_{\pi_i,\pi_{i-1}} * emission_{\pi_i}(x_i) = \prod_{i=1}^{n-1} Weight_i(l,k). \tag{7.9}$$

7.5.2 Viterbi algoritam

Primenićemo algoritam dinamičkog programiranja da bismo rešili problem dekodiranja. Prvo, definišimo $s_{k,i}$, što predstavlja proizvod težina optimalne putanje (putanje sa najvećom težinom proizvoda) od *izvora* do čvora (k, i). Viterbi algoritam je zasnovan na činjenici da prvih $i-1$ grana optimalne putanje od izvora do (k, i) moraju formirati optimalnu putanju od izvora do $(l, i-1)$ za neko (nepoznato) stanje l. Ovo zapažanje proizvodi sledeću jednačinu:

$$\begin{aligned} s_{k,i} &= \max_{all\ states\ l} \{s_{l,i-1} \cdot (weight\ of\ edge\ between\ nodes\ (l, i-1)\ and\ (k,i))\} \\ &= \max_{all\ states\ l} \{s_{l,i-1} \cdot Weight_i(l,k)\} \\ &= \max_{all\ states\ l} \{s_{l,i-1} \cdot transition_{\pi_{i-1},\pi_i} \cdot emission_{\pi_i}(x_i)\} \end{aligned} \tag{7.10}$$

7.5.3 Brzina Viterbi algoritma

Možemo da posmatramo problem dekodiranja kao još jednu isntancu problema najduže putanje u DAG problemu iz 5. poglavlja, zato što putanja π koja maksimizira proizvod težina $\prod_{i=1}^{n} Weight_i(\pi_{i-1}, \pi_i)$ takođe maksimizira logaritam ovog proizvoda, koji je jednak $\sum_{i=1}^{n} log(Weight_i(\pi_{i-1}))$. Prema tome, možemo da zamenimo težine svih grana u Viterbi grafu njihovim logaritmima. Nalaženje najdužeg puta u rezultujućem grafu će odgovarati putanji maksimalnih težina proizvoda u originalnom Viterbi grafu. Iz ovog razloga, vreme izvršavanja Viterbi algporitma je linearno u odnosu na broj grana u Viterbi grafu. Broj ovih grana je $|States|^2 \cdot n$ gde je n broj emitovanih simbola.

U praksi, mnogo HMM-ova ima **zabranjene prelaze** između nekih stanja. Za takve prelaze, možemo da obrišemo odgovarajuće grane iz HMM dijagrama (slika 7.3). Ova operacija dovodi do ređeg Viterbi grafa (slika 7.4), što dovodi do smanjenja vremena izvršavanja Viterbi algoritma, s obzirom da je vreme izvršavanja

algoritma za pronalaženje najduže putanje u DAG-u linearno u odnosu na broj grana u tom DAG-u.

Slika 7.3: HMM dijagram sa nekim zabranjenim stanjima kao npr. od A do D ili od C do samog sebe

Slika 7.4: Viterbi graf za HMM sa prethodne slike koji emituje string dužine 6

7.6 Računanje najverovatnijeg ishoda HMM-a

Dinamičko programiranje nam pomaže da odgovorimo na pitanje proširivanja HMM-a i preko najverovatnije skrivene putanje. Mi možemo da izračunamo verovatnoću $Pr(\pi)$ skrivene putanje π. Ali šta je sa $Pr(x)$, koja je verovatnoća da HMM emituje string x?

Problem 12 (Problem verovatnoće ishoda)**.** *Izračunati verovatnoću da HMM emituje datu nisku.*
Ulaz: Niska $x = x_1...x_n$ *koju emituje HMM(*$\Sigma, States, Transition, Emission$*).*
Izlaz: Verovatnoća $Pr(x)$ *da model HMM emituje nisku* x*.*

Već smo zaključili da je $Pr(x)$ jednak sumi $Pr(x, \pi)$ za sve skrivene putanje π. Međutim, broj putanja u Viterbi grafu je eksponencijalan u odnosu na broj

emitovanih stringova x, tako da možemo da koristuimo dinamičko programiranje kao brži način da izračunamo $Pr(x)$.

Neka je $forward_{k,i}$ proizvod svih putanja od *izvora* do čvora (k, i) u Viterbi grafu; treba uočiti da je $forward_sink$ jednak $Pr(x)$. Da bismo izračunali $forward_{k,i}$, podelićemo sve putanje koje povezuju *izvor* i čvor (k, i) na $|States|$ podskupova, gde svaki podskup sadrži one putanje koje prolaze kroz čvor $(l, i-1)$ (sa težinom proizvoda $forward_{l,i-1}$), dok ne dođemo do (k, i) za neko l između 1 i $|States|$. Dakle, $forward_{k,i}$ je suma $|States|$ članova,

$$\begin{aligned} forward_{k,i} &= \sum_{all\,states\,l} forward_{l,i-1} \cdot \textit{težina grane koja povezuje}\,(l, i-1)\,i\,(k, i) \\ &= \sum_{all\,states\,l} forward_{l,i-1} \cdot Weight_i(l, k) \end{aligned} \tag{7.11}$$

Treba primetiti da je jedina razlika između ove jednačine i Viterbi jednačine,

$$s_{k,i} = \max_{all\,states\,l} \{s_{l,i-1} \cdot Weight_i(l, k)\}, \tag{7.12}$$

je da se maksimizacija u Viterbi algoritmu menja u sumaciju. Sada možemo rešiti problem verovatnoće ishoda računajući $forward_sink$, što je jednako

$$\sum_{all\,states\,k} forward_{k,n} \tag{7.13}$$

Sada možemo da izračunamo $Pr(x)$ za emitovani string x, logično pitanje je pronaći najverovatniji takava string. Za problem nepoštenog krupijea, ovo odgovara pronalasku najverovatnije sekvence bacanja novčića za sve moguće sekvence, za fer i otežani novčic koji krupije može koristiti.

Problem 13 (Problem najverovatnijeg ishoda)**.** *Naći najverovatniji string koji emituje HMM.*
Ulaz: HMM($\Sigma, States, Transition, Emission$) i ceo broj n.
Izlaz: Najverovatniji string $x = x_1...x_n$ koji emituje HMM, odnosno, string koji maksimizira verovatnoću $Pr(x)$ da će HMM emitovati x.

7.7 Profilni algoritmi za poravnjanje sekvenci

7.7.1 Kako su HMM povezani za poravnjanje sekvenci?

Za datu familiju povezanih proteina, možemo proveriti da li nova sekvenca proteina pripada ovoj familiji, konstruišući parno poravnanje između novo sekvenciranog proteina i svakog člana familije. Ako jedno od rezultujućih poravnanja da rezultat iznad nekog strogog praga, onda možemo pretpostaviti da novi protein pripada familiji. Međutim, ovaj pristup može neuspešno da identifikuje proteine koji su udaljeno povezani.Ako sekvenca ima slabe povezanosti sa velikim

brojem članova familije, onda ona najverovatnije pripada toj familiji. Problem je poravnati novi protein sa *svim* članovima familije odjednom. Da bismo ovo postigli, moramo da pretpostavimo da već imamo konstruisano višestruko poravnanje familije proteina. Srećom, često će biti očigledno da dva proteina dolaze iz iste familije. Shodno tome, biolozi često počinju konstruišući poravnanje proteina koji su nesumnjivo povezani, koje je obično lako poravnati, cak i koristeći jednostavne metode poravnanja koje smo predstavili u poglavlju 5. Slika 7.5 (prvi deo) prikazuje 5x10 poravnanje *Alignment* koje predstavlja hipotetičku familiju proteina. Primetimo da 6. i 7. kolona ovog poravnanja sadrže mnogo praznih "-" simbola, i verovatno ne predstavljaju značajne karakteristike familije. Shodno tome, biolozi često ignorišu kolone za koje je deo ovih praznih "-" simbola veći ili jednak **pragu brisanja kolone** θ. Brisanje kolona rezultuje semenom poravnanju *Alignment** 5x8 predstavljenom na slici 7.5 (drugi deo). Dato semeno poravnanje *Alignment** predstavlja familiju povezanih proteina i naš cilj je da izgradimo HMM koji realisticčno modelira sklonosti simbola u *Alignment** koji je predstavljen profilnom matricom PROFILE(Alignment*) na slici 7.5 (treći deo). Umesto da razmišljamo o poravnavanju postojećeg semenog poravnanja do datog *Text-a* (koji predstavlja novi protein), mi ćemo umesto da razmišljamo o tome da izračunamo verovatnoću

		1	2	3	4	5		6	7	8
		A	C	D	E	F	A C	A	D	F
		A	F	D	A	–	– –	C	C	F
Alignment		A	–	–	E	F	D –	F	D	C
		A	C	A	E	F	– –	A	–	C
		A	D	D	E	F	A A	A	D	F
		A	C	D	E	F		A	D	F
		A	F	D	A	–		C	C	F
*Alignment**		A	–	–	E	F		F	D	C
		A	C	A	E	F		A	–	C
		A	D	D	E	F		A	D	F
	A	1	0	0	1/5	0		3/5	0	0
	C	0	2/4	0	0	0		1/5	1/4	2/5
PROFILE(*Alignment**)	D	0	1/4	3/4	0	0		0	3/4	0
	E	0	0	0	4/5	0		0	0	0
	F	0	1/4	0	0	1		1/5	0	3/5

$M_1 \longrightarrow M_2 \longrightarrow M_3 \longrightarrow M_4 \longrightarrow M_5 \longrightarrow M_6 \longrightarrow M_7 \longrightarrow M_8$

Slika 7.5: 5x10 višestruko poravnanje (prvi deo). Uklanjamo kolone ukoliko broj praznina "-" prelazi θ. 5x8 semeno poravnanje (drugi deo). Izbacili smo kolone. Profilna matrica semenog poravnanje (treći deo) i jednostavni HMM dijagram koji modelira gornji PROFIL. Semeni algoritam je dobijen od originalnog poravnanja ignorisanjem kolona (osenčenih sivom bojom). U ovom slučaju ignorišemo kolone čiji je deo praznih "-" simbola veći ii jednak pragu $\theta = 0.35$. Kako bismo jasnije prikazali vezu između poravnanja i semenog poravnanja, razdvojili smo prvih 5 kolona u semenom poravnanju od poslednje 3 kolone i numerisali te kolone iznad originalnog poravnanja. Stanja pogotka MATCH(i) su skraćena kao M_i. HMM ima samo jednu moguću putanju; u svom početnom stanju MATCH(1), verovatnoća prelaska iz stanja MATCH(i) do stanja MATCH(i+1) je jednaka 1 za svako i svi drugi prelasci su zabranjeni. Emisione verovatnoće su jednake frekvencijama u profilu, npr. emisione verovatnoće za M_2 su 0 za A, 2/4 za C, 1/4 za D, 0 za E i 1/4 za F.

da HMM emituje *Text*. Ako je HMM dobro dizajniran, onda što je sličiji *Text* nizu u *Alignement**, to će verovatnije biti emitovan od strane HMM-a.

Prvo ćemo konstruisati jednostavan HMM koji tretira kolone *Alignement*-a* kao k sekvencijalno povezanih stanja koja ćemo nazvati **stanja pogotka** (slika 7.5 četvrti deo), označeni MATCH(1),...,MATCH(k). Kada HMM uđe u stanje MATCH(i), tada emituje simbol x_i sa verovatnoćom jednakom frekvenciji ovog simbola u i-toj koloni PROFIL(*Alignment**). HMM se onda prebacuje u stanje MATCH(i+1) sa prelaznom verovatnoćom jednakom 1.

Slicnost pogotka između *Alignment**-a i *Text*-a je verovatnoća Pr(*Text*) da HMM za *Alignment** emituje *Text*. Ovaj rezultat je jednak proizvodu frekvencija u PROFILE(*Alignment**) koji odgovaraju svakom simbolu iz *Text*-a. Na primer, verovatnoća da HMM na slici 7.5 emituje ADDAFFDF je:

$$1 \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{3}{4} \cdot \frac{1}{5} \cdot 1 \cdot \frac{1}{5} \cdot \frac{3}{4} \cdot \frac{3}{5} = 0.003375. \tag{7.14}$$

HMM koji smo prikazali rezultuje svaku kolonu na slici 7.5 drugačije i do određenog stepena, što je sličniji *Text Alignment**-u, to je veći rezultat sličnosti.

Međutim, ovaj HMM ima samo jednu skrivenu putanju, i nudi jednostavan pogled višestrukih poravnanja zato što ne uracunava inserciju i brisanja. Na kraju, *Text* se može "poravnati" u odnosu na *Alignment** ako je dužina *Text*-a tačno jednaka broju kolona u *Alignment**-u (slika 7.6). Ipak mi ćemo iskoristiti ovaj ograničeni HMM kao temelj za moćnije HMM-ove.

	A	C	D	E	F	A	D	F
	A	F	D	A	–	C	C	F
*Alignment**	A	–	–	E	F	F	D	C
	A	C	A	E	F	A	–	C
	A	D	D	E	F	A	D	F
Text	A	D	D	A	F	F	D	F
emission probability	1	1/4	3/4	1/5	1	1/5	3/4	3/5

Slika 7.6: Poravnanje Text = ADDAFFDF u odnosu na semeno poravnanje *Alignment** predstavljeno kao jednostavan HMM na slici 7.5. Ovaj HMM je ograničen zato što nismo u mogućnosti da poravnamo nizove dužine različite od 8.

7.7.2 Građenje profilnog HMM-a

Poboljšani HMM koji cemo predstaviti se zove **profilni HMM**. Sa datim višestrukim poravnanjem *Alignment* i pragom brisanja kolona θ koji koristimo da dođemo do *Alignment**-a, označićemo ovaj profilni HMM kao HMM(*Alignment*, θ). Za dati niz *Text* da se poravna u odnosu na postojeće semeno poravnanje, naš cilj je da pronađemo optimalni skriveni put u profilnom HMM-u tako što ćemo rešiti Problem Dekodiranja za ovaj HMM i emitovani niz *Text*.

Prvo dodajemo k+1 **insercionih stanja**, označenih kao INSERTION(0),...,INSERTION(k) (slika 7.7). Ulaženje u INSERTION(i) dopušta profilnom HMM-u da emituje dodatni simbol nakon posećivanja i-te kolone PROFILE(*Alignment**)-a i pre ulaženja u $(i+1)$-tu kolonu. Povezujemo MATCH(i) sa INSERTION(i) i INSERTION(i) sa MATCH($i+1$). Kako bismo dopustili višestruke insertovane simbole između kolona PROFILE(*Alignment**)-a, povezaćemo INSERTION(i) samu sa sobom.

Slika 7.7: HMM dijagram za semeno poravnanje sa slike 7.5 sa pogotcima i insercionim stanjima, skraćeni kao M i I, redom. Stanja I_0 i I_8 modeluju insercije simbola koje se dešavaju pre početka i kraja *Alignment**-a, redom.

Pitanje: Da li možemo da iskoristimo HMM na slici 7.7 da poravnamo niz *Text*

dužine manje od 8?

Nakon modelovanja insercija novih simbola u PROFILE(*Alignment**), treba da modelujemo i "delecije" koja omogućavaju profilnom HMM-u da preskoči kolone PROFILE(*Alignment**)-a. Jedan način modeliranja ovih delecija je da dodamo ivice koje povezuju svako stanje u profilnom HMM-u sa svakim stanjem desno od njega (slika 7.8).

Slika 7.8: Dodavanjem ivica koje povezuju svako stanje u profilnom HMM-u sa slike 7.7 sa svakim stanjem desno od njega, možemo preskočiti kolone *Alignment*-a kada poredimo *Text* u odnosu na ovo poravnanje. Gornji HMM dijagram označava da sve ivice vode u i iz MATCH(4).

Slika 7.9: Dodavanje stanja deleciji (skraceno kao D_i) profilnom HMM dijagramu.

Slika 7.10: Dodavanje prelaza od insercionih stanja do delecionih stanja i obrnuto upotpunjava profilni HMM dijagram za profilnu matricu na slici 7.5. Početno i završno stanje su označeno kao S i E, redom.

Problem 14 (Problem profilnog HMM-a). *Konstruisati profilni HMM na*

osnovu višestrukog poravnanja.
Ulaz: Višestruko poravnanje Alignment i parametar θ (maksimalni udeo insercija po koloni).
Izlaz: Emisiona i tranziciona matrica profilnog HMM HMM(Alignment,θ).

Slika 7.11: Tri putanje kroz profilni HMM koje odgovaraju trima redovima i poravnanju na slici 7.5. Prazni simboli "-" ispod HMM dijagrama koji odgovaraju delecionim stanjima su prikazani u zagradama da naznače da se ne emituju od strane HMM-a

Slika 7.12: Verovatnoće prelaska u profilnom HMM

Slika 7.13: Emisione verovatnoće u profilnom HMM

	S	I_0	M_1	D_1	I_1	M_2	D_2	I_2	M_3	D_3	I_3	M_4	D_4	I_4	M_5	D_5	I_5	M_6	D_6	I_6	M_7	D_7	I_7	M_8	D_8	I_8	E
S			1																								
I_0																											
M_1						.8	.2																				
D_1																											
I_1																											
M_2									1																		
D_2																											
I_2																											
M_3												1															
D_3																											
I_3												1															
M_4															.8	.2											
D_4																											
I_4																											
M_5																	.25	.75									
D_5																	.33	.67									
I_5																		1									
M_6																					.8	.2					
D_6																											
I_6																											
M_7																								1			
D_7																											
I_7																								1			
M_8																											1
D_8																											
I_8																											
E																											

Slika 7.14: Zabranjeni prelasci. **Sive ćelije**: grane u HMM dijagramu. **Prazne ćelije**: zabranjeni prelasci.

7.8 Zadaci sa vežbi

U nastavku će biti predstavljeni zadaci sa vežbi na kursu rađeni u programskom jeziku Python.

7.8.1 HMM

```
def HMM(strings_pos, strings_neg):

    HMM = {}
    # HMM['0']['A+'] = 0.125
    # HMM['0']['T+'] = 0.125
    # HMM['0']['C+'] = 0.125
    # HMM['0']['G+'] = 0.125
    # HMM['0']['A-'] = 0.125
    # HMM['0']['T-'] = 0.125
```

```
10      # HMM['0']['C-'] = 0.125
11      # HMM['0']['G-'] = 0.125
12
13      for string in strings_pos:
14          for i in range(1, len(string)):
15              c_prev_state = string[i-1] + '+'
16              c_curr = string[i]
17
18              if c_prev_state not in HMM:
19                  HMM[c_prev_state] = {}
20                  HMM[c_prev_state]['state'] = 1
21                  HMM[c_prev_state]['nucleotide'] = string[i-1]
22                  HMM[c_prev_state]['transitions'] = {}
23
24              if c_curr not in HMM[c_prev_state]['transitions']:
25                  HMM[c_prev_state]['transitions'][c_curr] = 0
26
27              HMM[c_prev_state]['transitions'][c_curr] += 1
28
29      for string in strings_neg:
30          for i in range(1, len(string)):
31              c_prev_state = string[i-1] + '-'
32              c_curr = string[i]
33
34              if c_prev_state not in HMM:
35                  HMM[c_prev_state] = {}
36                  HMM[c_prev_state]['state'] = 0
37                  HMM[c_prev_state]['nucleotide'] = string[i-1]
38                  HMM[c_prev_state]['transitions'] = {}
39
40              if c_curr not in HMM[c_prev_state]['transitions']:
41                  HMM[c_prev_state]['transitions'][c_curr] = 0
42
43              HMM[c_prev_state]['transitions'][c_curr] += 1
44
45      for source in HMM:
46          output_sum = 0
47          for dest in HMM[source]['transitions']:
48              output_sum += HMM[source]['transitions'][dest]
49
50          for dest in HMM[source]['transitions']:
51              HMM[source]['transitions'][dest] = (HMM[source]['
    ↪ transitions'][dest] / output_sum) * 0.98
52
53          HMM[source]['0'] = 0.02
```

```
54
55
56      return HMM
57
58  def viterbi(HMM, string):
59      i = 1
60
61      matrix = [{} for i in range(len(string))]
62      path = ""
63
64      for i in range(len(string)):
65          nucleotide = string[i]
66
67          state_number = 0
68
69          if i > 0:
70              path += max_transition_state
71
72          max_transition_prob = -1
73          max_transition_state = ''
74
75          for state in HMM:
76
77              if HMM[state]['nucleotide'] != nucleotide:
78                  matrix[i][state] = 0
79
80              elif i == 0:
81                  if HMM[state]['nucleotide'] == nucleotide:
82                      matrix[i][state] = 0.125
83
84              else:
85                  max_prev = -1
86                  max_prev_state = ''
87
88                  for prev_state in matrix[i-1]:
89                      if HMM[prev_state]['state'] == HMM[state]['
    ↪ state']:
90                          state_change_prob = 0.99
91                      else:
92                          state_change_prob = 0.01
93
94                      if HMM[state]['nucleotide'] in HMM[prev_state][
    ↪ 'transitions']:
95                          transition_prob = HMM[prev_state]['
    ↪ transitions'][HMM[state]['nucleotide']]
```

```
                    else:
                        transition_prob = 0

                    curr_state = matrix[i-1][prev_state] * transition_prob * state_change_prob
                    # print('{} -> {}'.format(prev_state, state))
                    # print('{} = {} * {} * {}'.format(curr_state, matrix[i-1][prev_state], transition_prob, state_change_prob ))

                    if curr_state > max_prev:
                        max_prev = curr_state
                        max_prev_state = prev_state

                matrix[i][state] = max_prev

                if max_prev > max_transition_prob:
                    max_transition_prob = max_prev
                    max_transition_state = max_prev_state

        # print(matrix)
        # print('-------------------------')

    max_end = -1
    max_end_state = ''

    n = len(string)
    for state in matrix[n-1]:
        if matrix[n-1][state] > max_end:
            max_end = matrix[n-1][state]
            max_end_state = state

    path += max_end_state

    return path




def main():
    strings_pos = ['ACACAGACGCACA','CACATAGACAGGCATACACA', 'AAATACAGTATCTTTGCACTCCCGGAGTGCGG']
    strings_neg = ['CGAGCGTGTGAGTGAGAGATGAG', 'GTGGAACAGTAGGTAGGAGAGTG', 'AAATACAGTATCTTTGCACTCCCGGAGTGCGG']
```

```
136
137     model = HMM(strings_pos, strings_neg)
138     print(viterbi(model, 'CTCACGAGAGCCACAC'))
139
140 if __name__ == "__main__":
141     main()
```