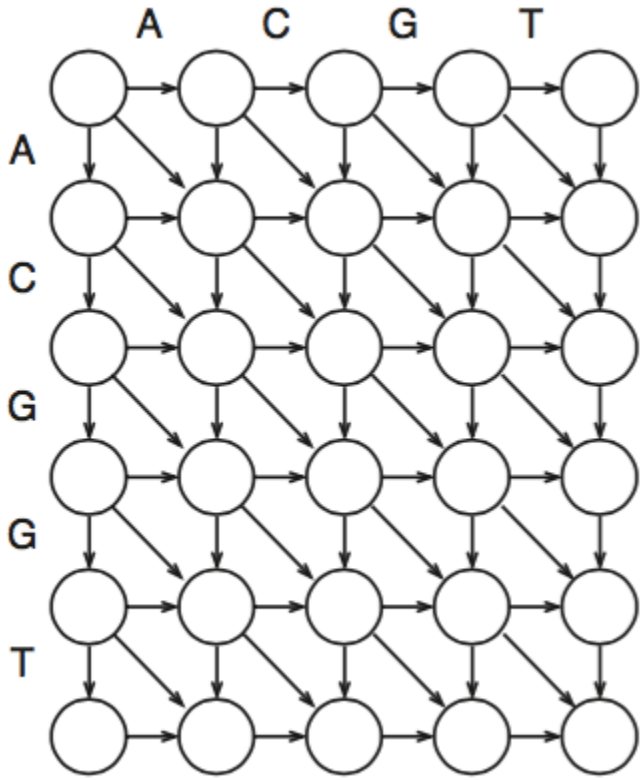
Introducción a la Bioinformática

Alineamiento de secuencias

Búsqueda de secuencias en bases de datos

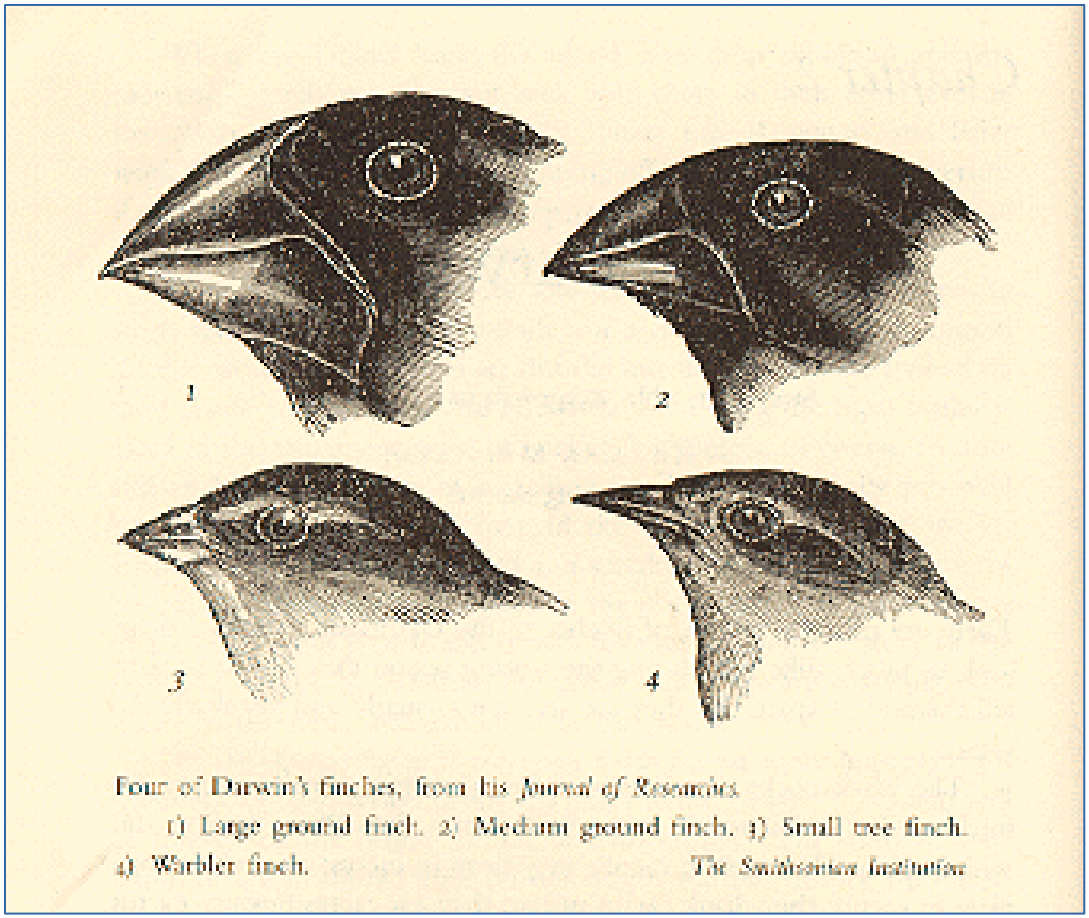


Fernán Agüero
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas
Universidad Nacional de San Martín

Análisis comparativo

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

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



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

Alinear secuencias

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

GCTACTAGTTCGCTTAGC

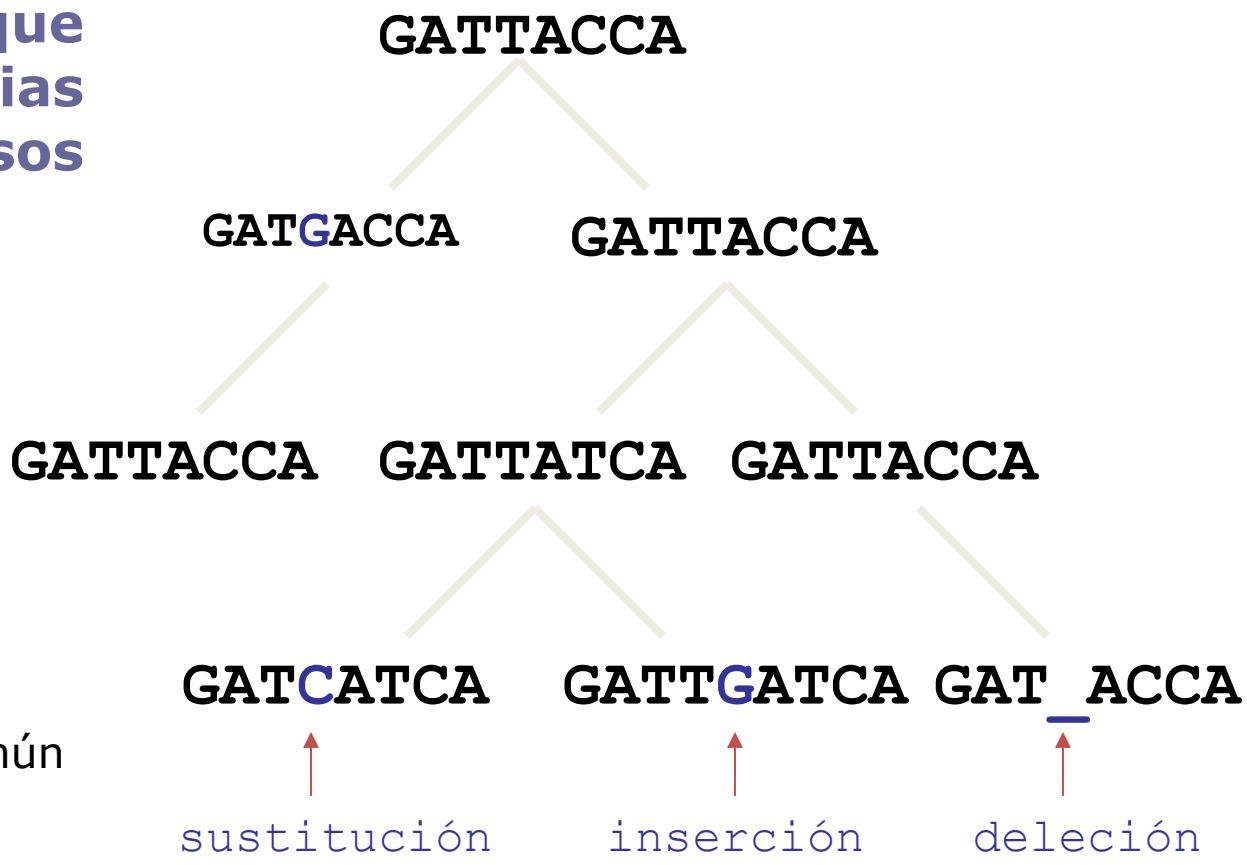
GCTACTAGCTCTAGCGCGTATAGC

Homología vs similitud

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

Análisis comparativo

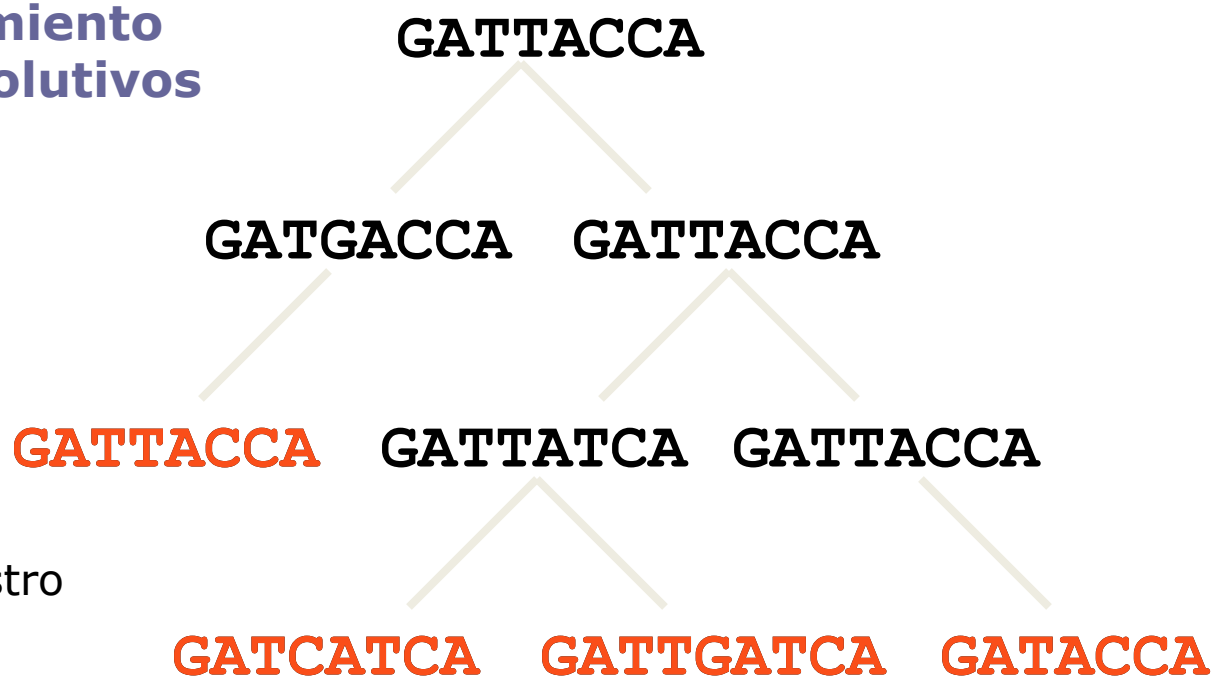
Los algoritmos que alinean secuencias modelan procesos evolutivos



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

Análisis comparativo

Algoritmos de alineamiento modelan procesos evolutivos

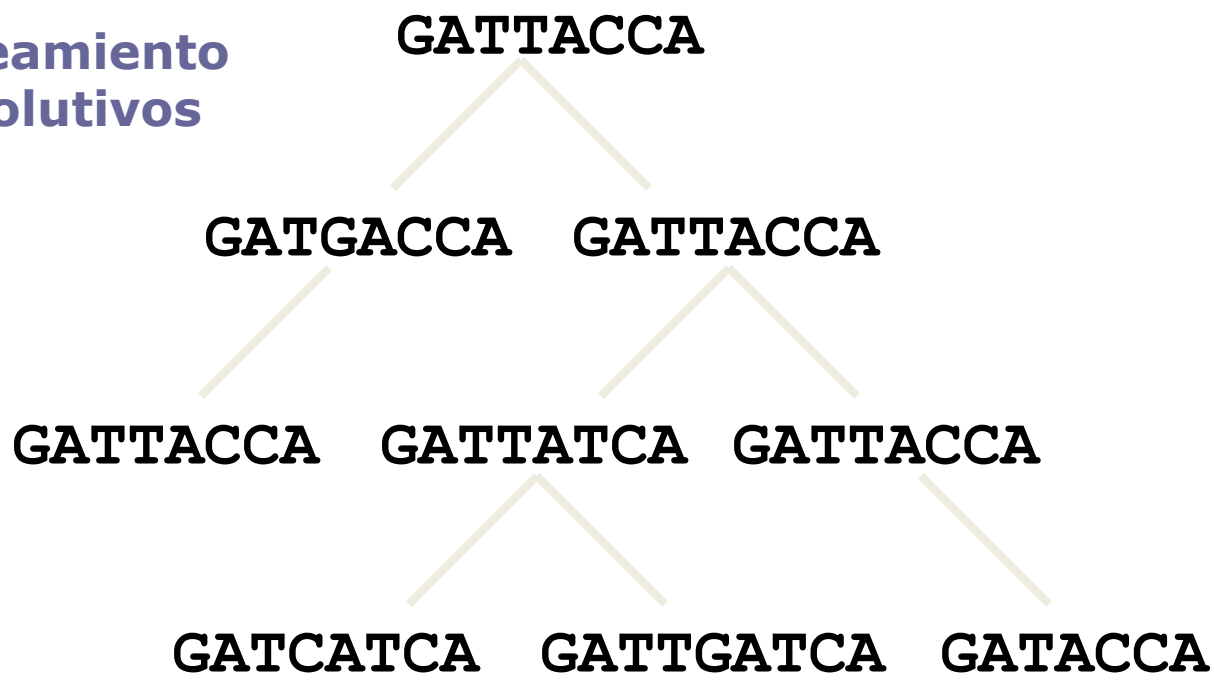


Deriva a partir de un ancestro común a través de cambio incremental.

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

Análisis comparativo

Algoritmos de alineamiento modelan procesos evolutivos



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

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

Alineamientos

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

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

Definición de alineamiento: tipos

Alineamiento: Cada base se usa a lo sumo una vez

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

Alineamientos locales: No hay necesidad de alinear todas las bases

Align GATESLIKESCHEESE and GRATEDCHEESE

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

Alineamientos buenos y malos?

Cuál es el 'mejor' alineamiento?

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

0 mismatches, 5 gaps

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

3 mismatches, 1 gap

Cómo decidir cuál es el mejor?

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

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

Un primer sistema de puntajes

Ejemplo de sistema de score

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

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

Score

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

Cambiemos nuestro sistema de puntajes

Usando otro de sistema de puntajes?

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

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

Usando otro sistema de score

Score

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

No se pueden comparar scores

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

Gap penalties

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

1- Abrir un gap es costoso

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

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

2 - Extender un gap es menos costoso

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

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

Dot plots: introducción

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

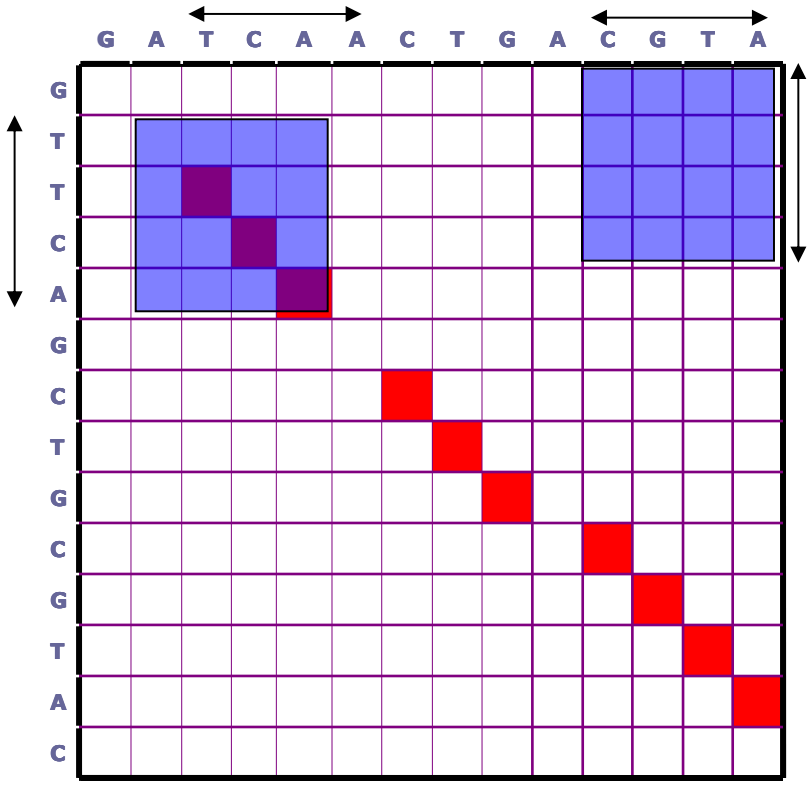
Eje horizontal: secuencia 1

Eje vertical: secuencia 2

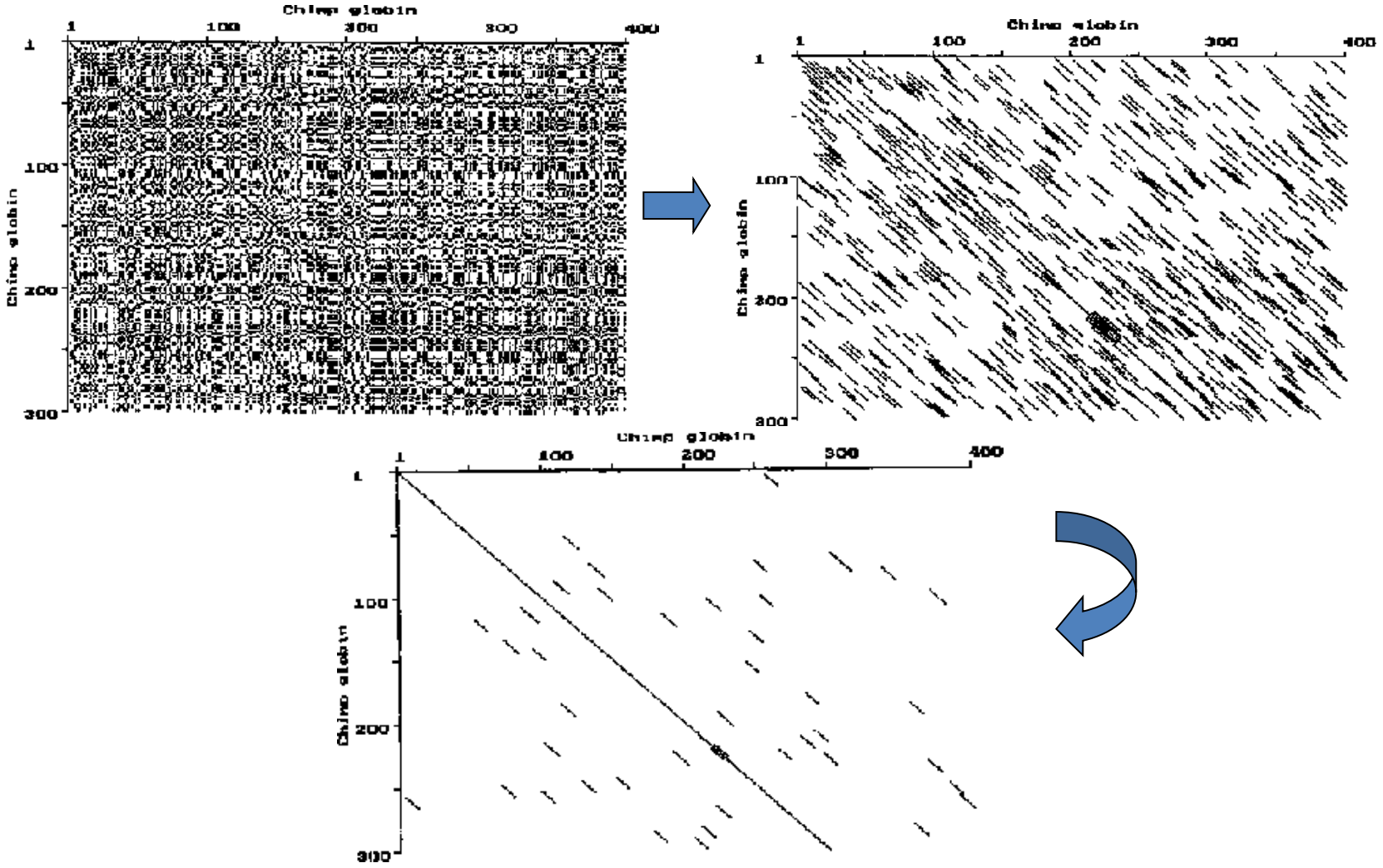
	C	G	T	A	C	C	G	T
A	0	0	0	1	0	0	0	0
C	1	0	0	0	1	1	0	0
G	0	1	0	0	0	0	1	0
T	0	0	1	0	0	0	0	1

Dot Matrix Plot

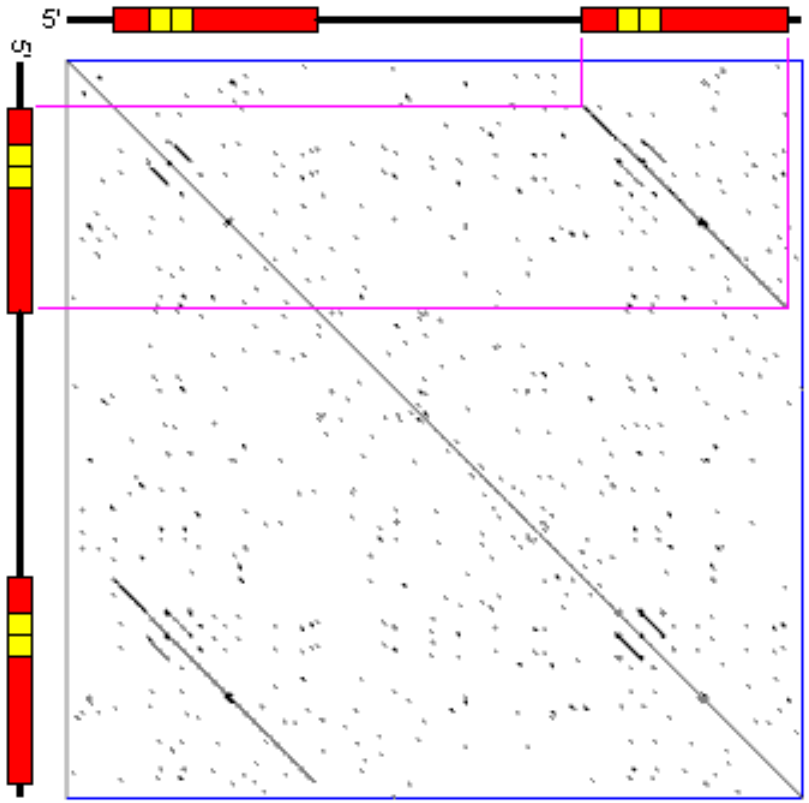
- Dos secuencias, una vertical y otra horizontal a los ejes del gráfico.
- Se colocan "puntos" en donde hay un match.
- Las líneas diagonales son regiones de identidad.
- Se aplican filtros para mejorar la comprensión del gráfico.



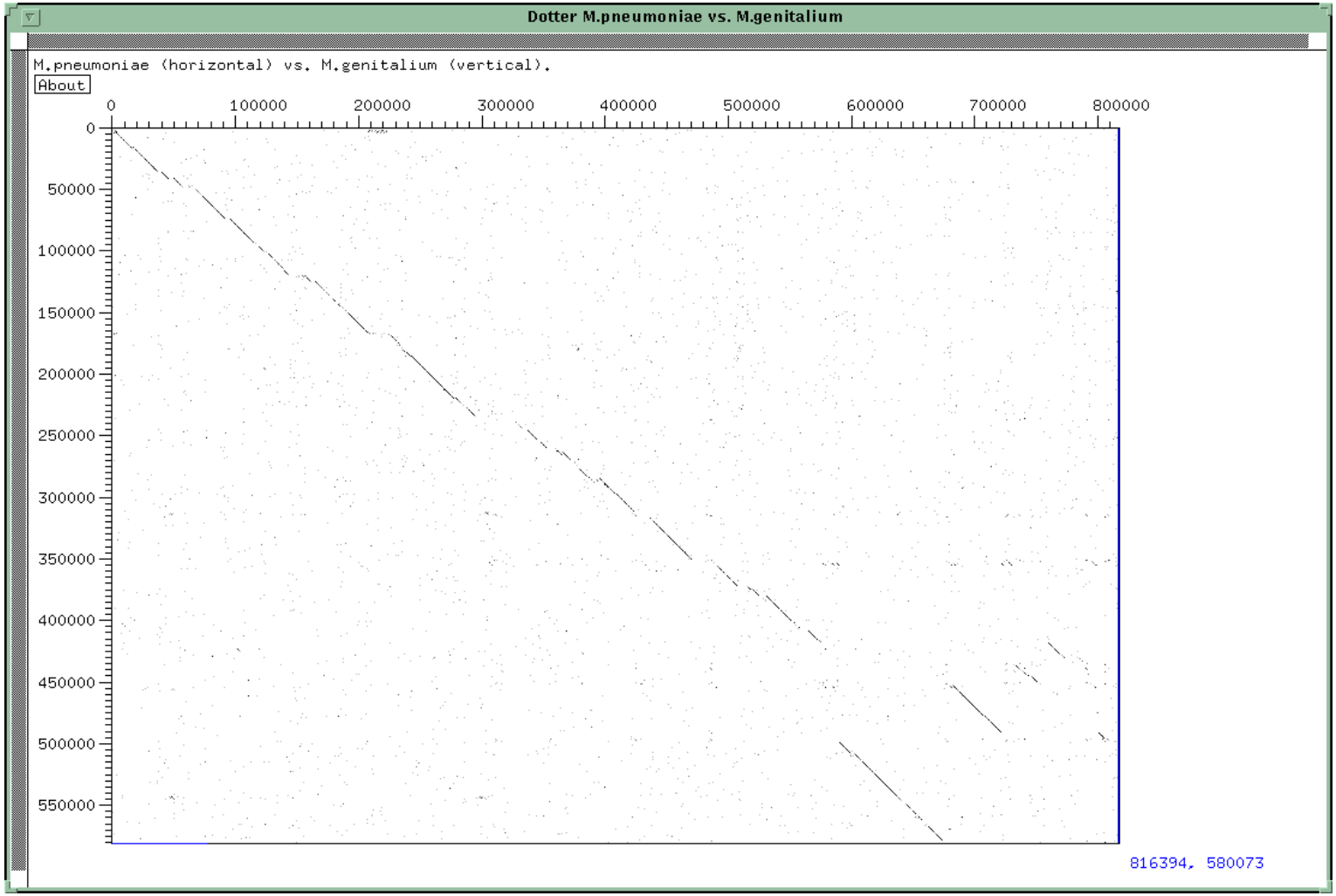
Dot Matrix Plot



Dot Matrix Plot



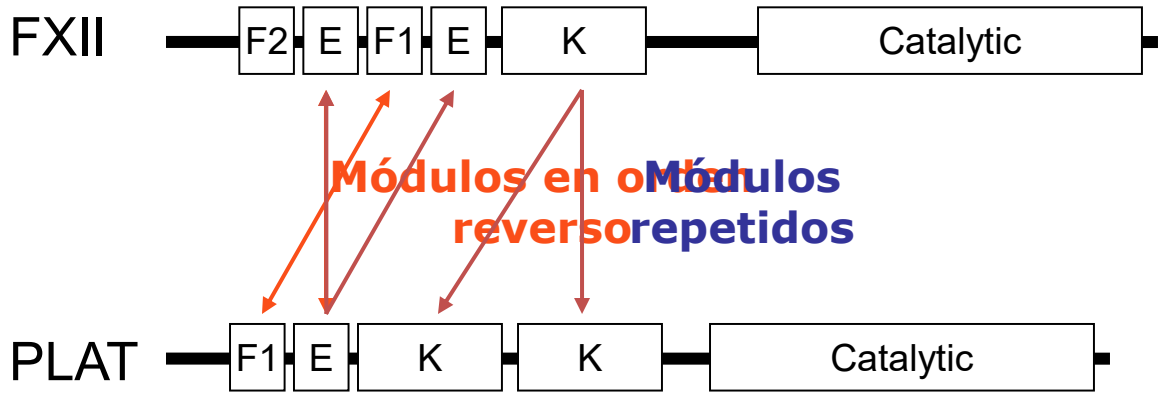
Dot Matrix Plot



Similitud local

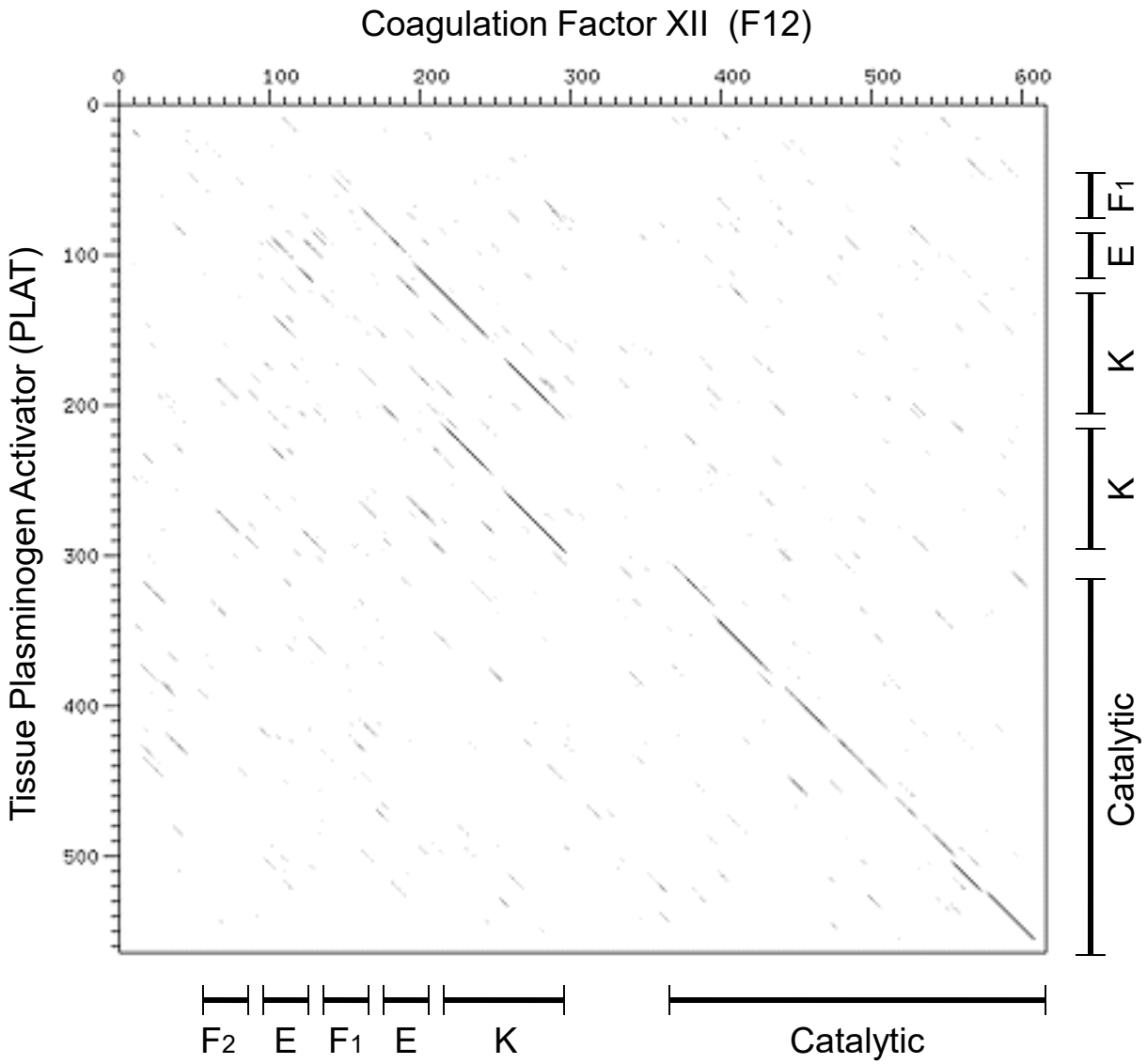
Dominios mezclados confunden a los algoritmos de alineamiento.

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



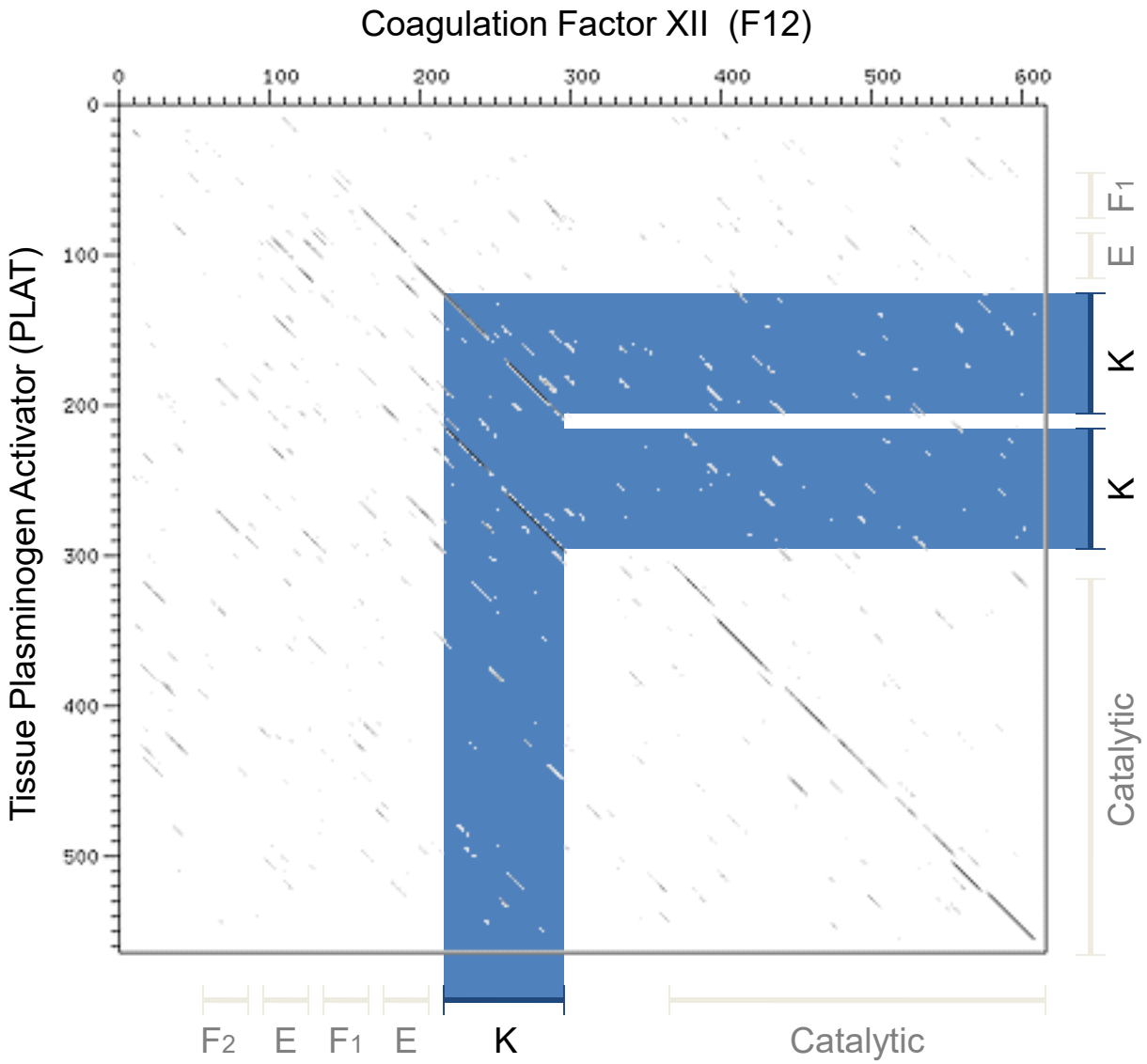
F1,F2	Fibronectin repeats
E	EGF similarity domain
K	Kringle domain
Catalytic	Serine protease activitiy

Dot plots: ejemplo



Dot plots: ejemplo (cont.)

Dominios repetidos muestran un patrón característico.



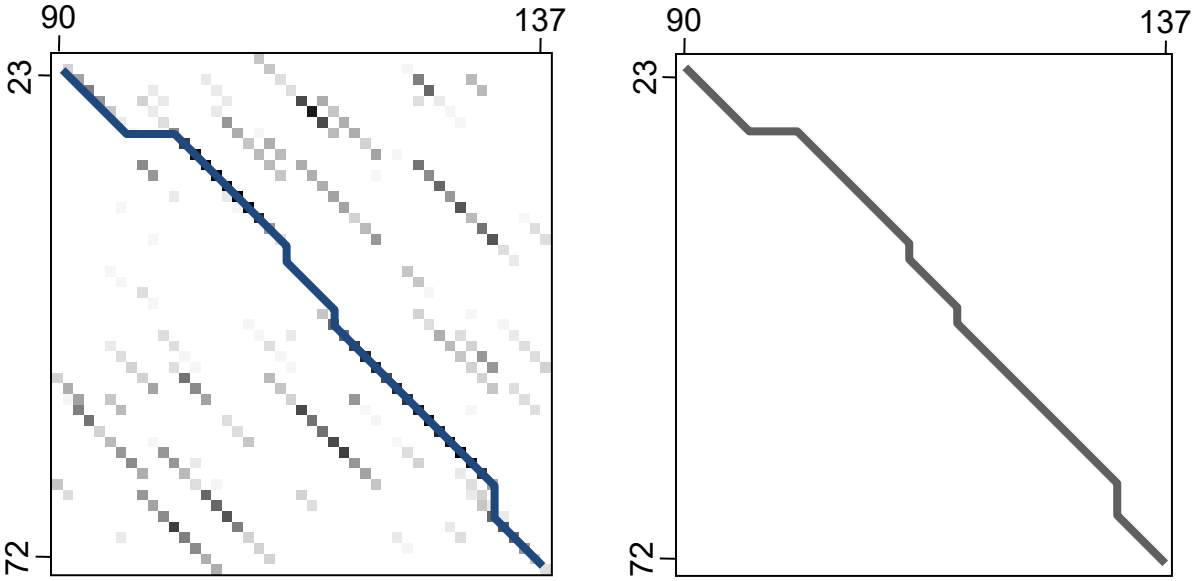
Dot plots: path graphs

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

Path graphs son representaciones más explícitas de un alineamiento.

Cada path es un alineamiento único.

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



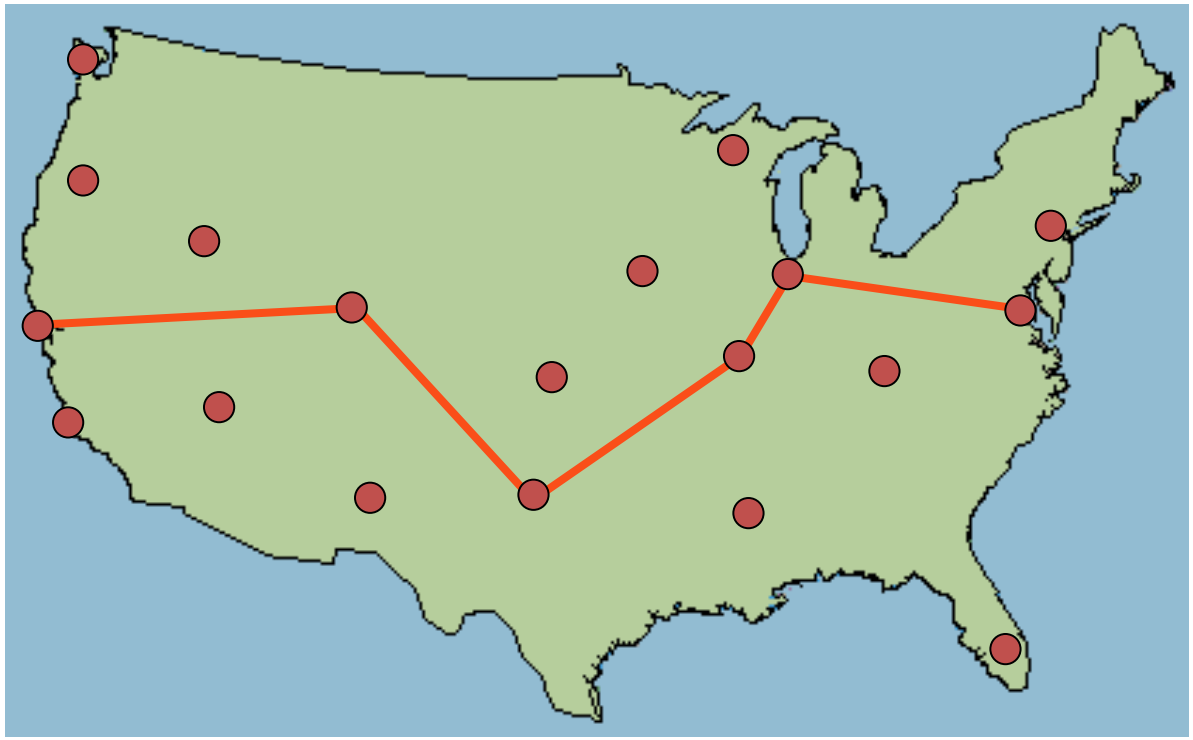

```
PLAU   90   EPKKVKDHCSKHSPCQKGGTCVNMP--SGPH-CLCPQHLTGNHCQKEK---CFE   137
PLAT   23   ELHQVPSNCD----CLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYE    72
```

Path graphs: encontrar el mejor camino

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

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

Rutear una llamada telefónica desde NY a San Francisco



Dynamic programming: introducción

Un ejemplo:

Construir un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias

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

Utilizando las siguientes reglas de scoring:

Match: +1

Mismatch: -1

Gap: -1

Dynamic programming: ejemplo

Ordenar las dos secuencias en una matriz bidimensional

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

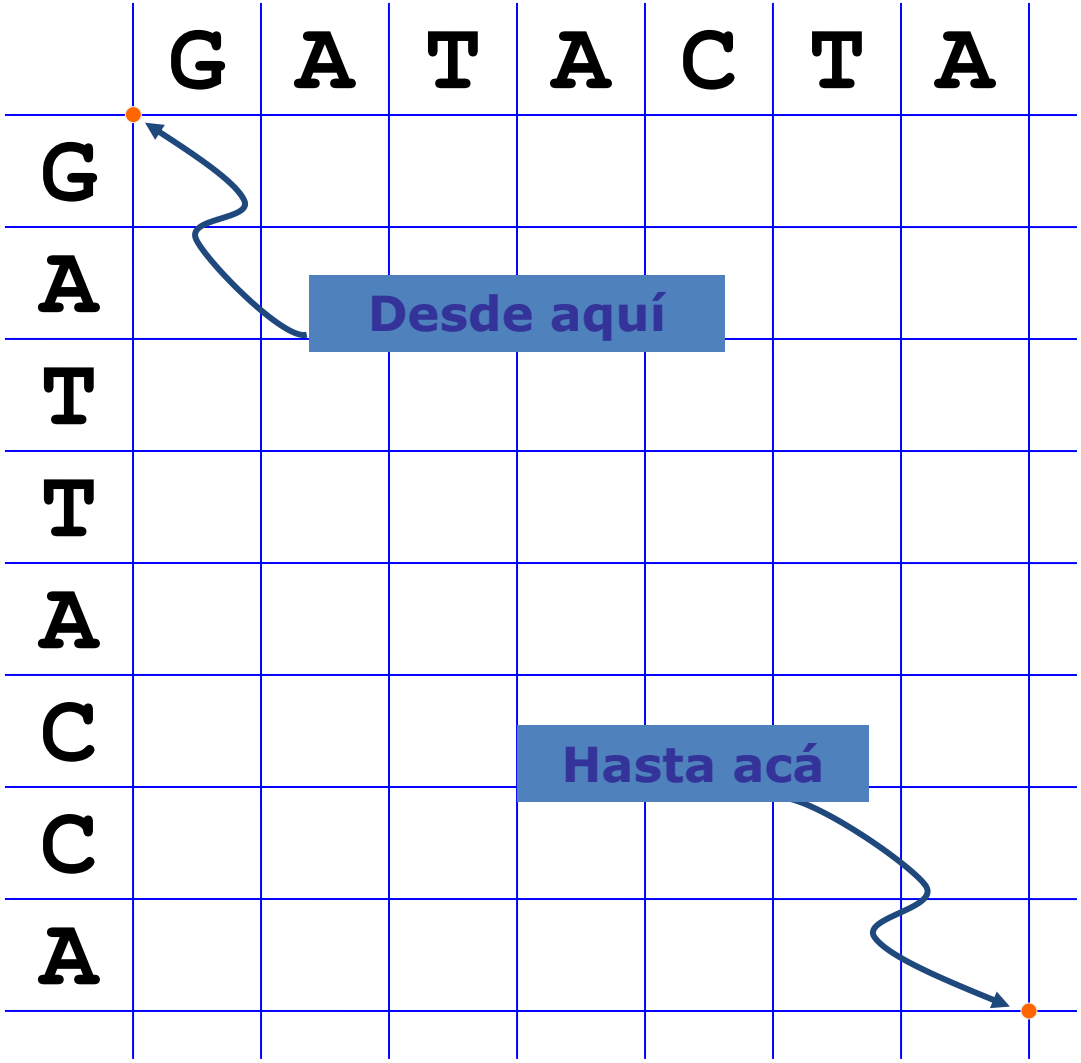
Needleman & Wunsch (1970)

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

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: ejemplo (cont.)

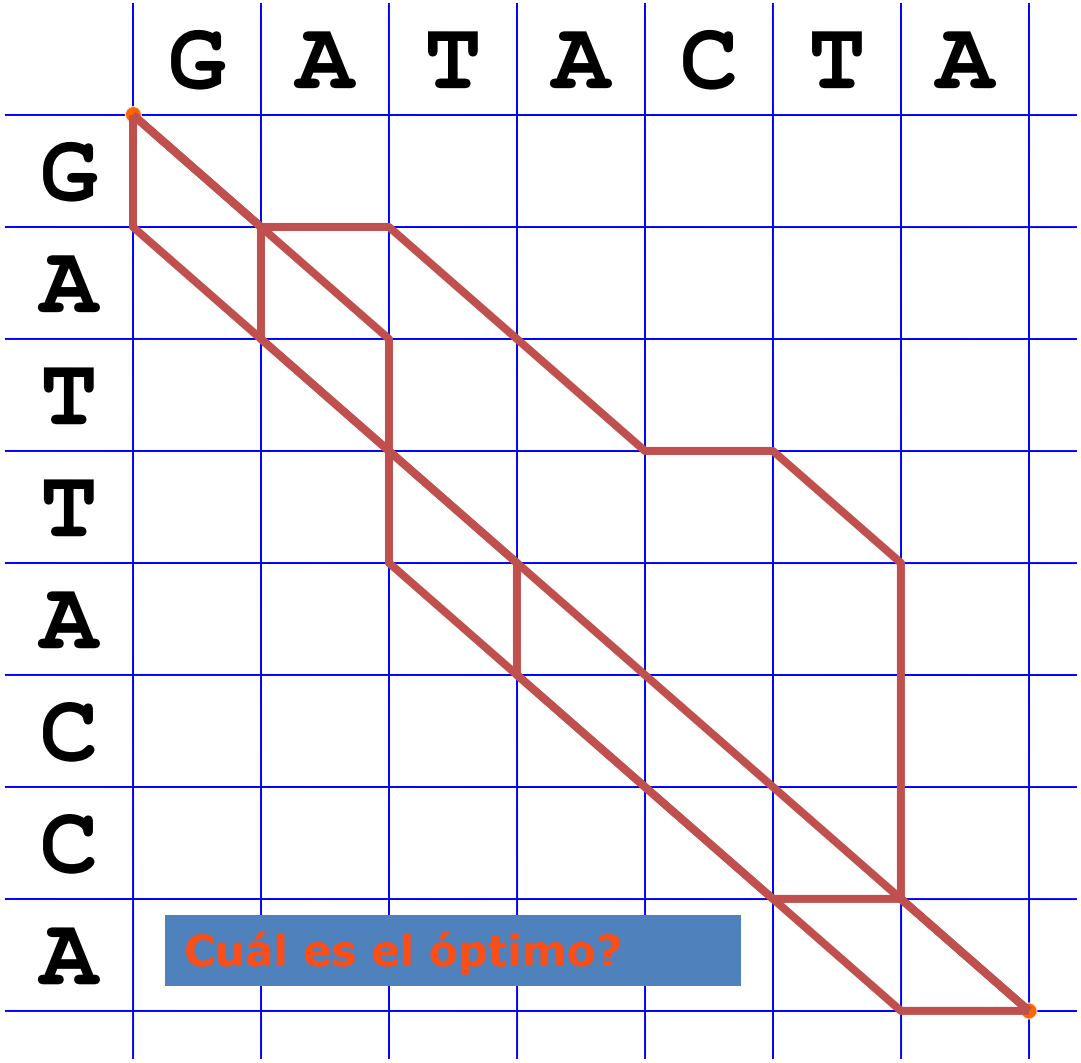
El objetivo es encontrar la ruta (path) óptimo



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paths posibles

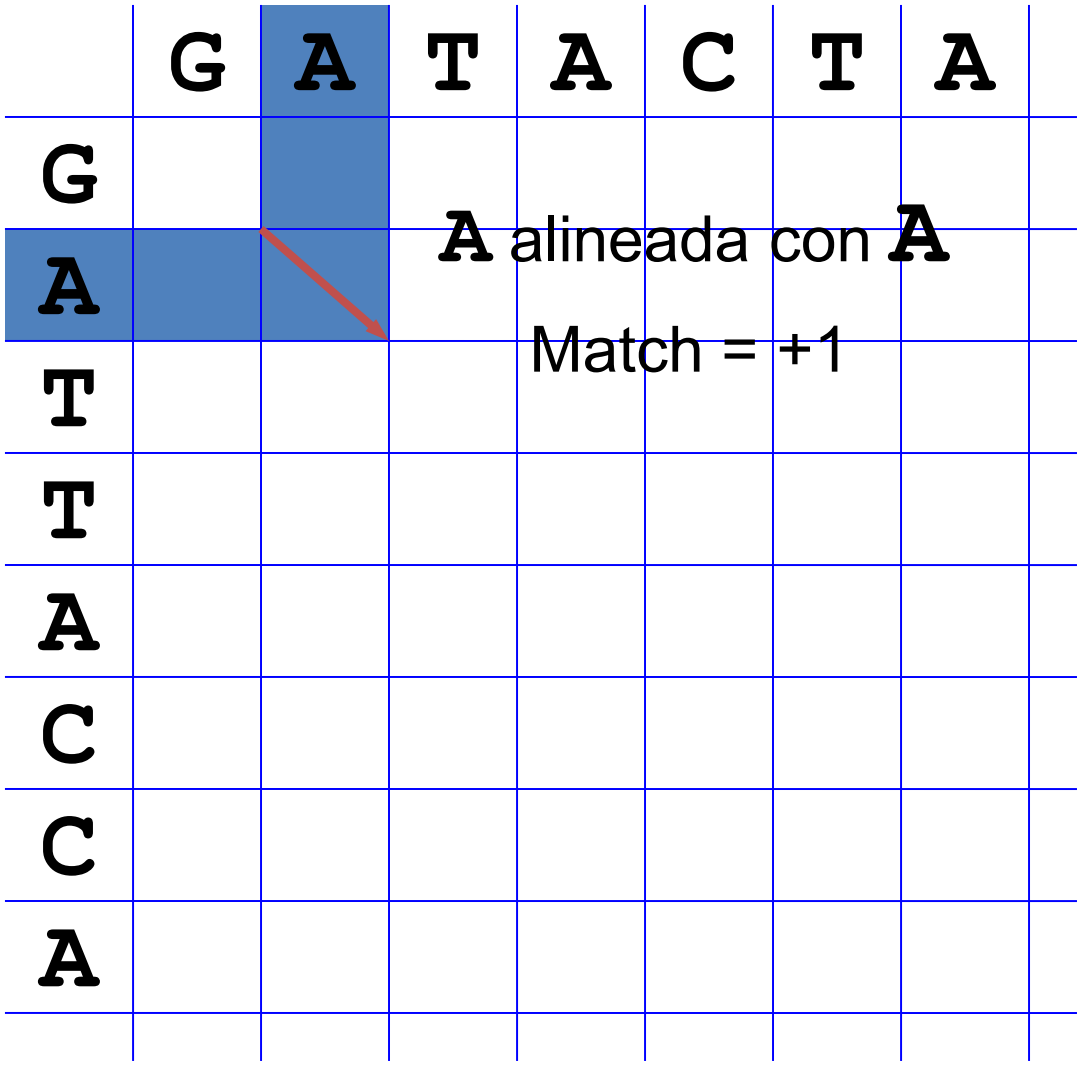
Cada path corresponde a un alineamiento único



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: scores: match

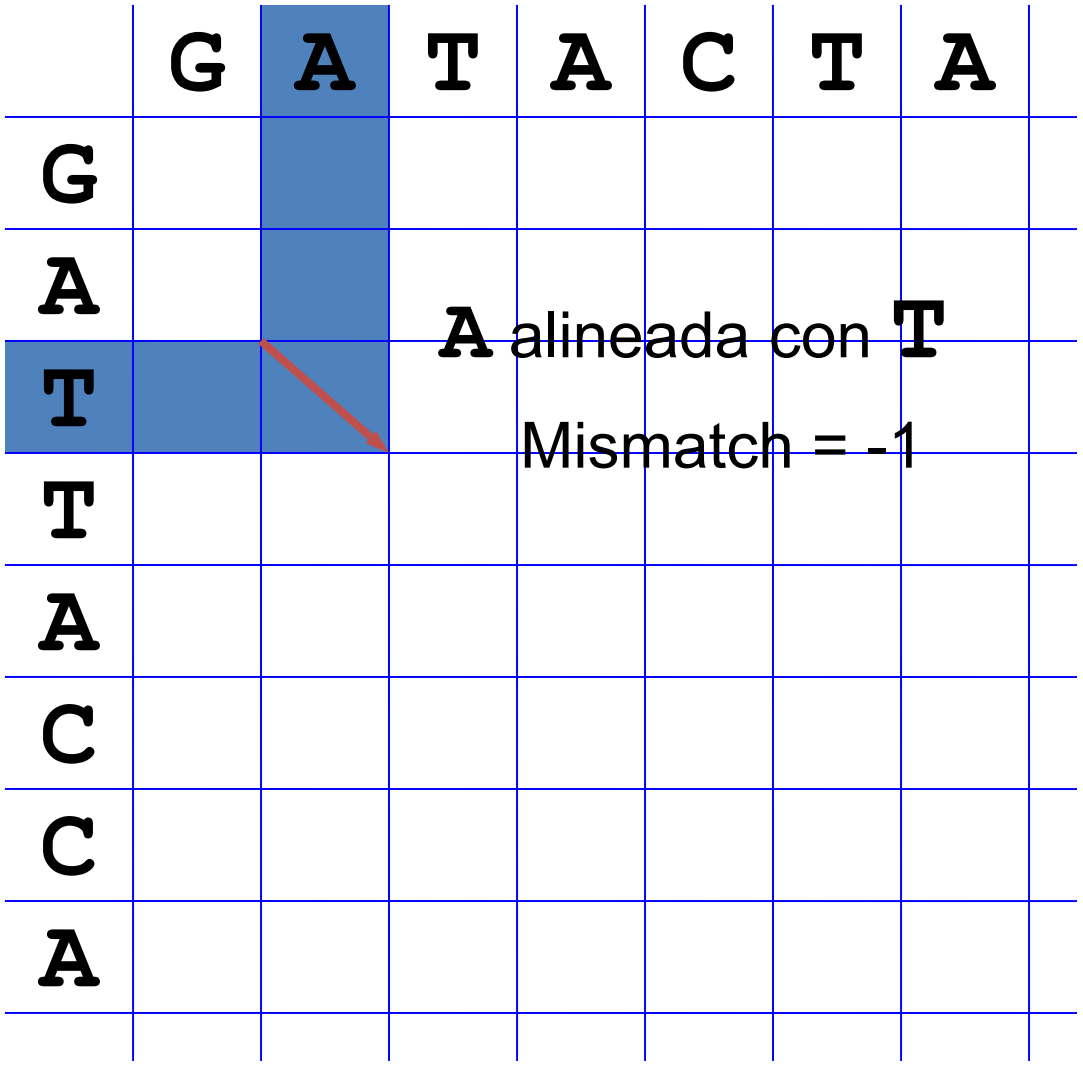
El score para una ruta (path) es la suma incremental de los scores de sus pasos (diagonales o lados).



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: scores: mismatch

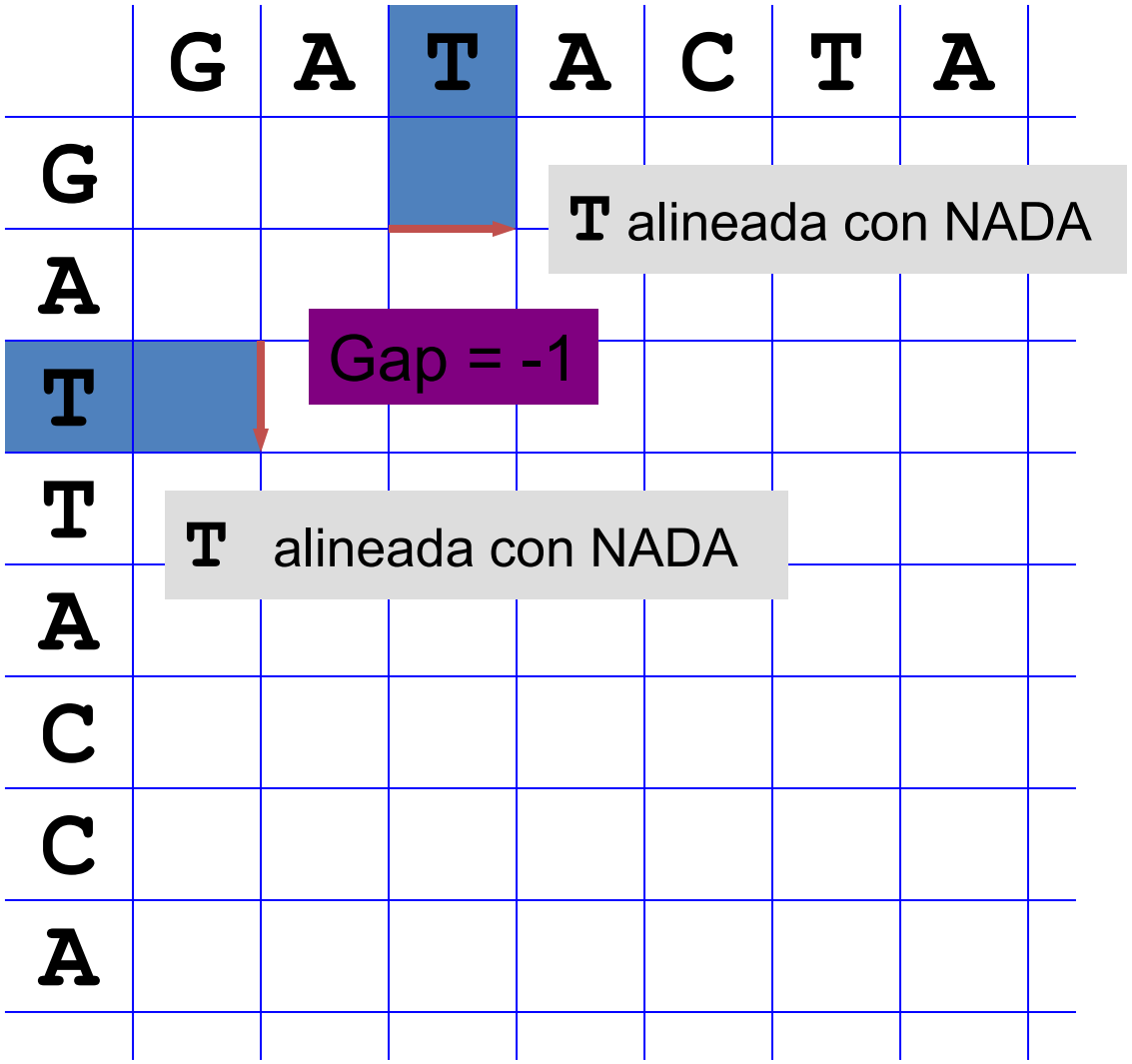
El score para una ruta (path) es la suma incremental de los scores de sus pasos (diagonales o lados).



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: scores: gaps

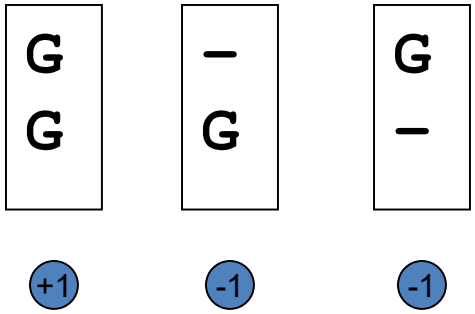
El score para una ruta (path) es la suma incremental de los scores de sus pasos (diagonales o lados).

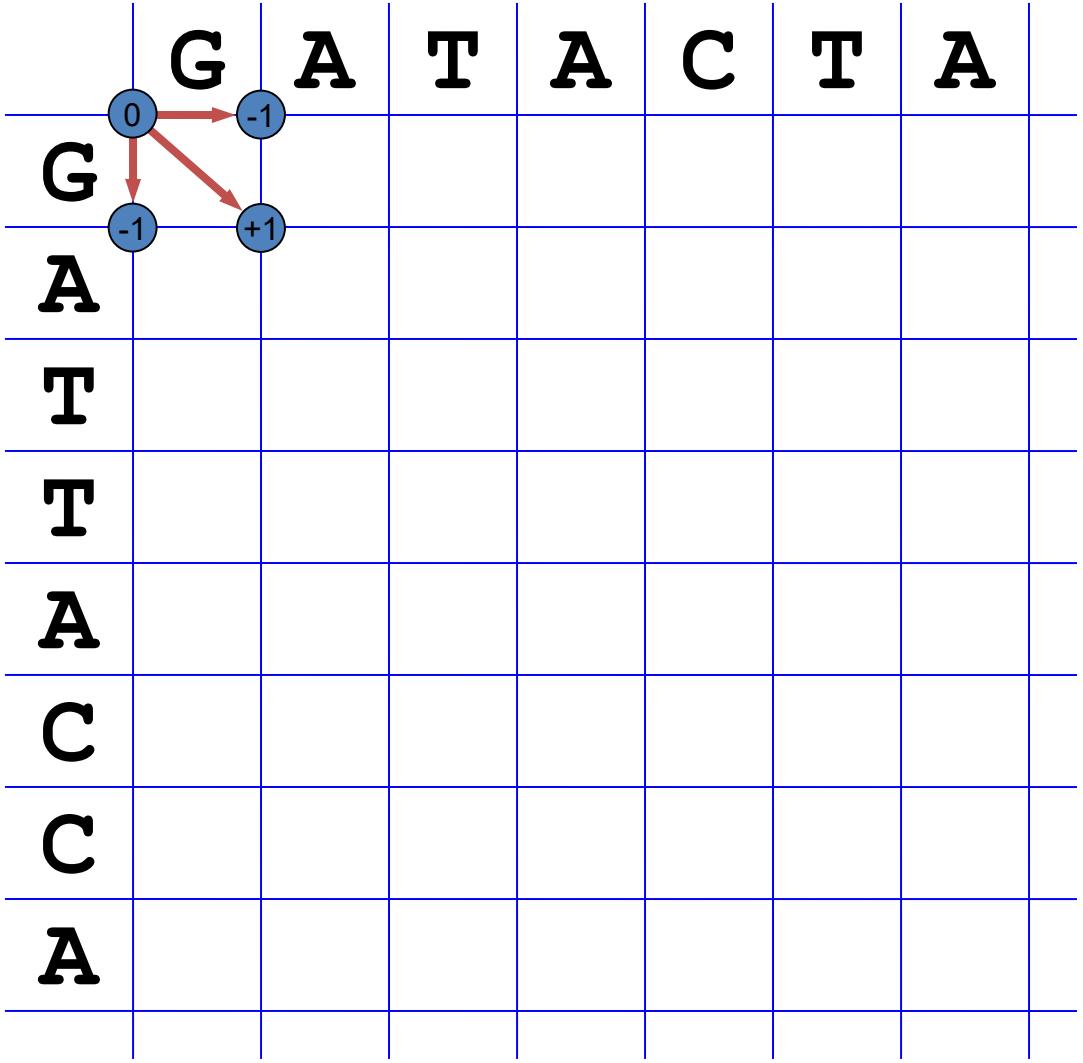


Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (1)

Extender el path paso por paso

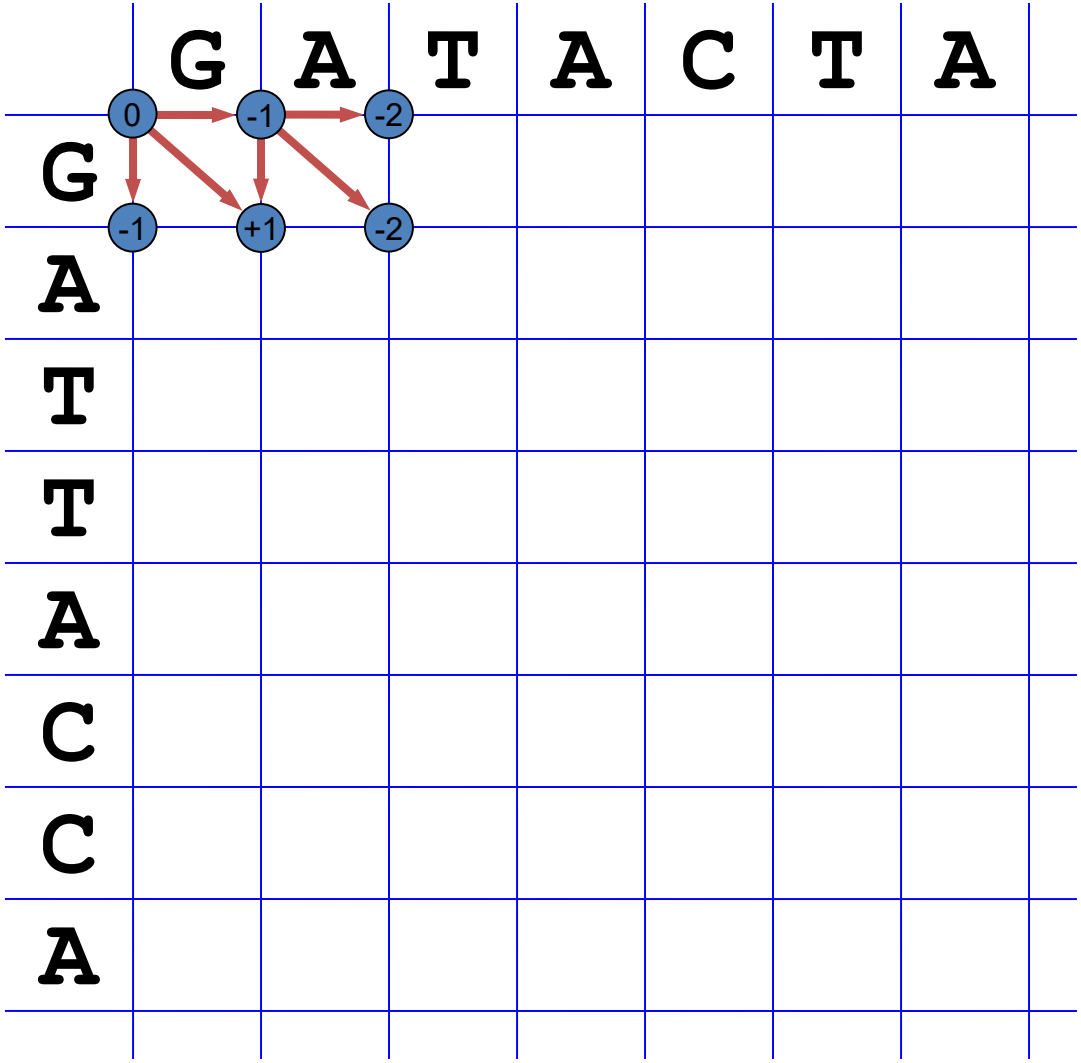




Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (2)

Incrementar el path paso a paso

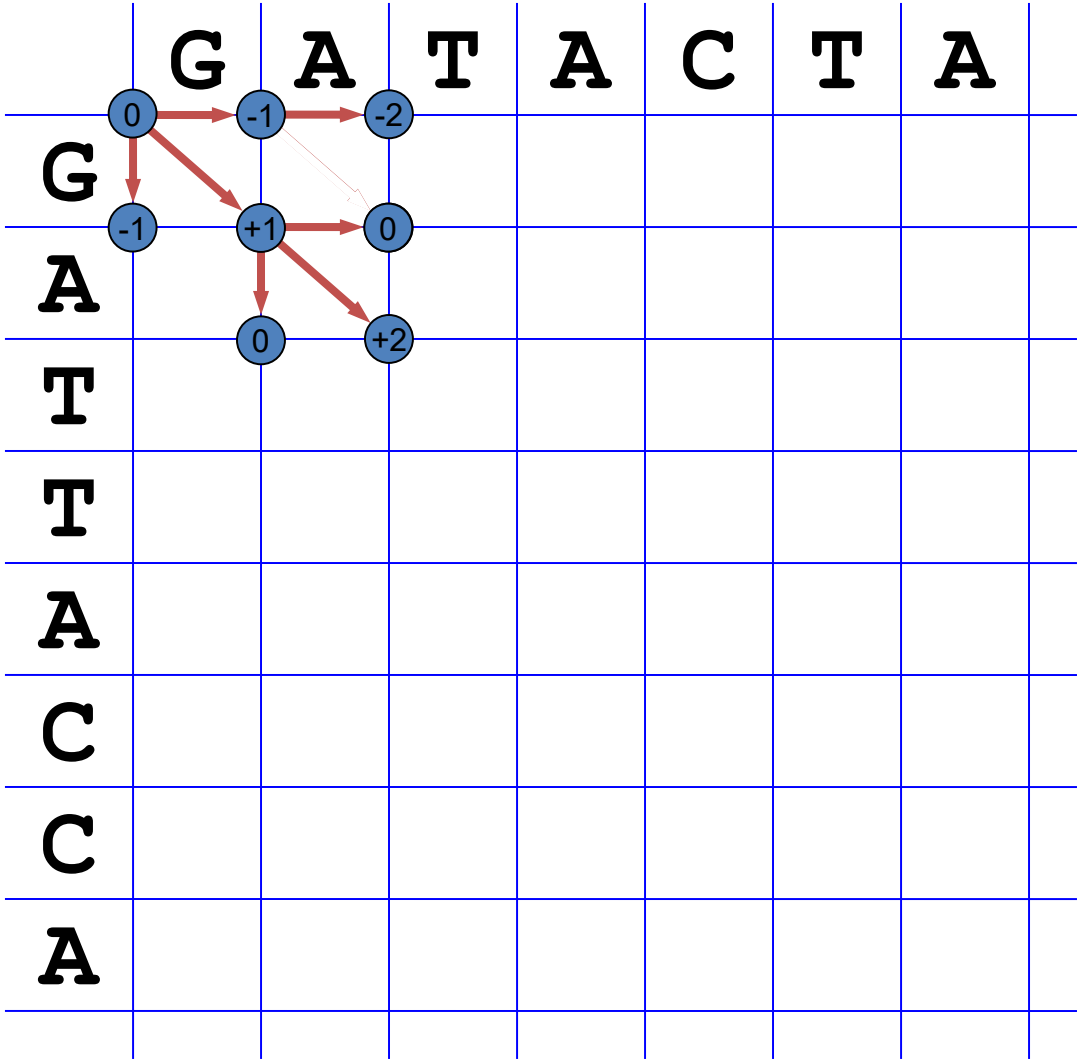


Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (3)

Incrementar el path paso a paso

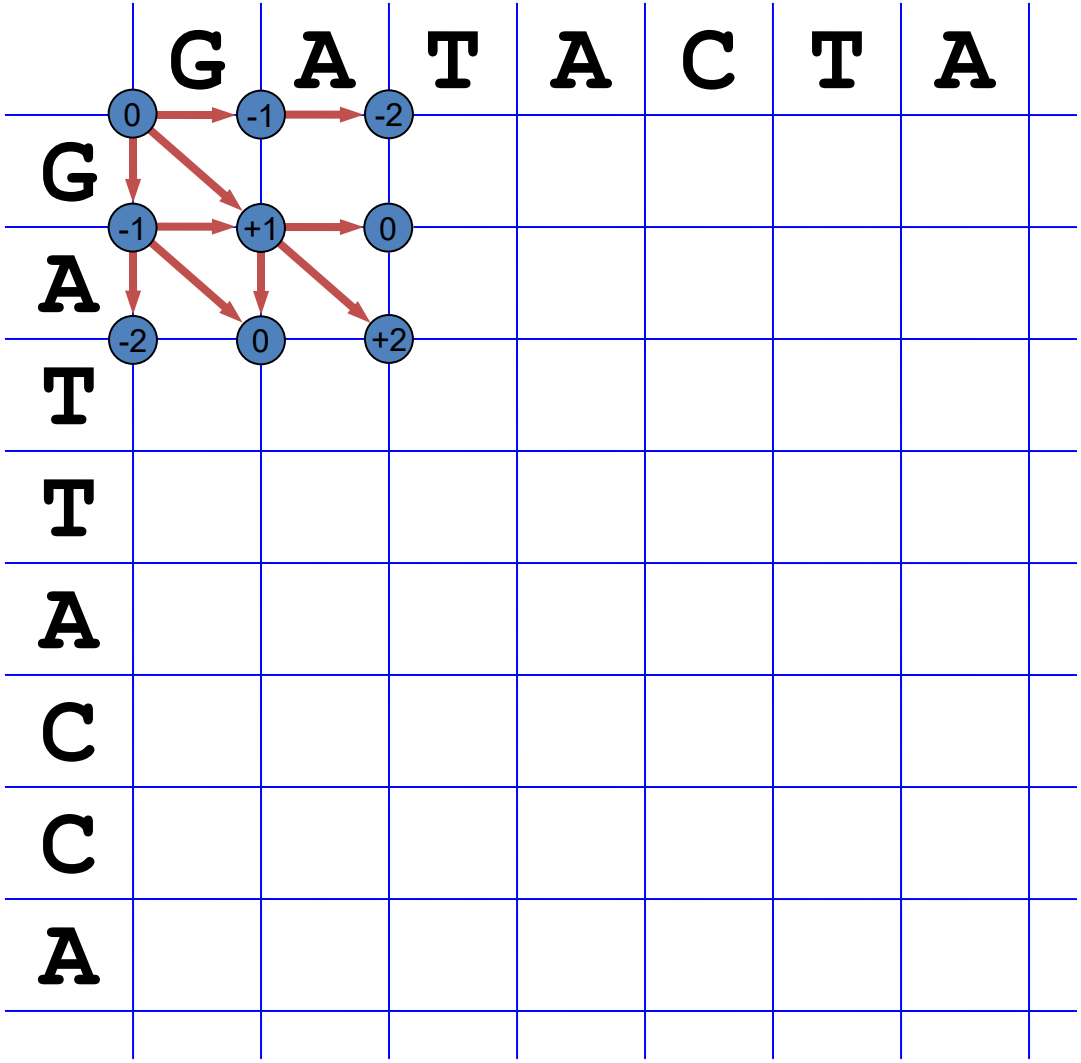


Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (4)

Incrementar el path paso a paso

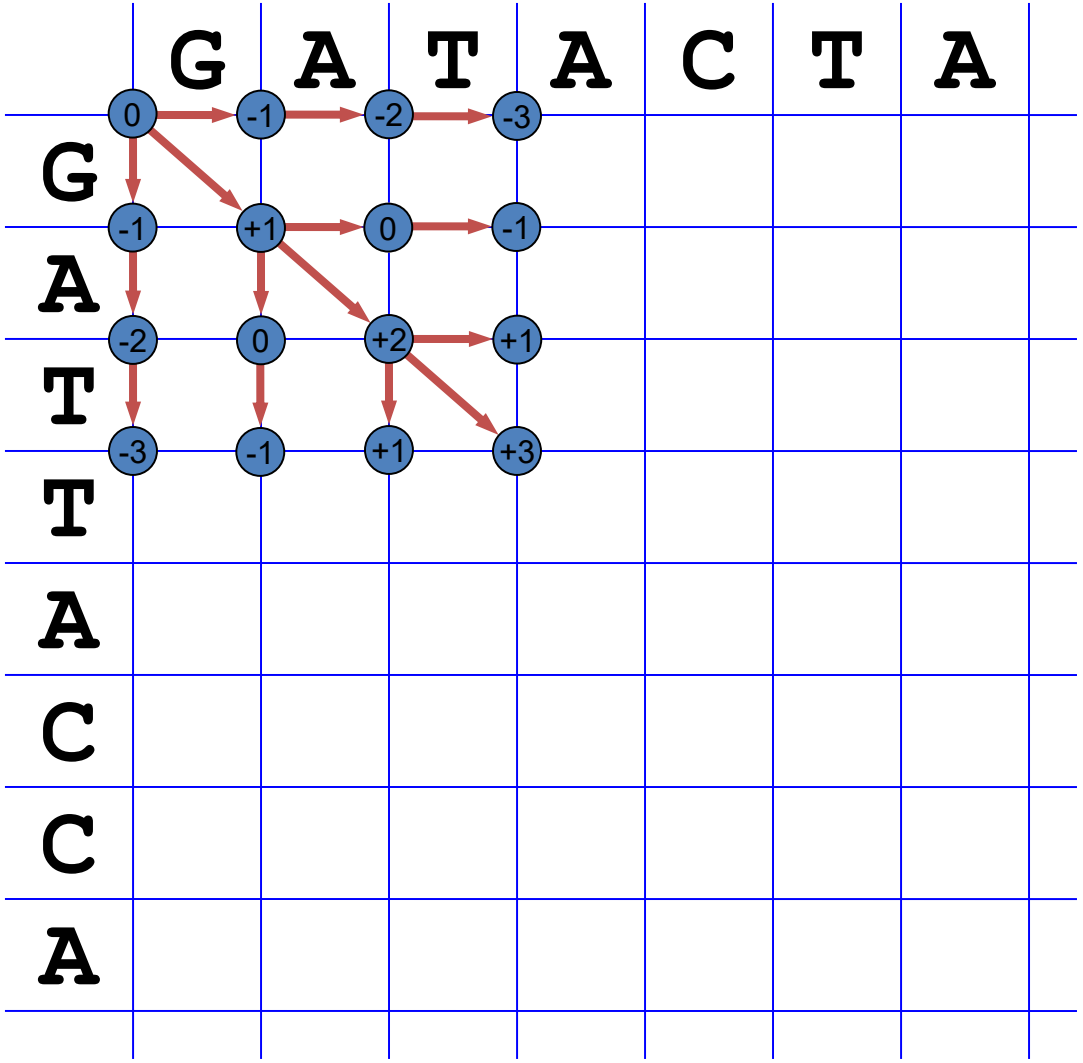


Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (5)

Incrementar el path paso a paso



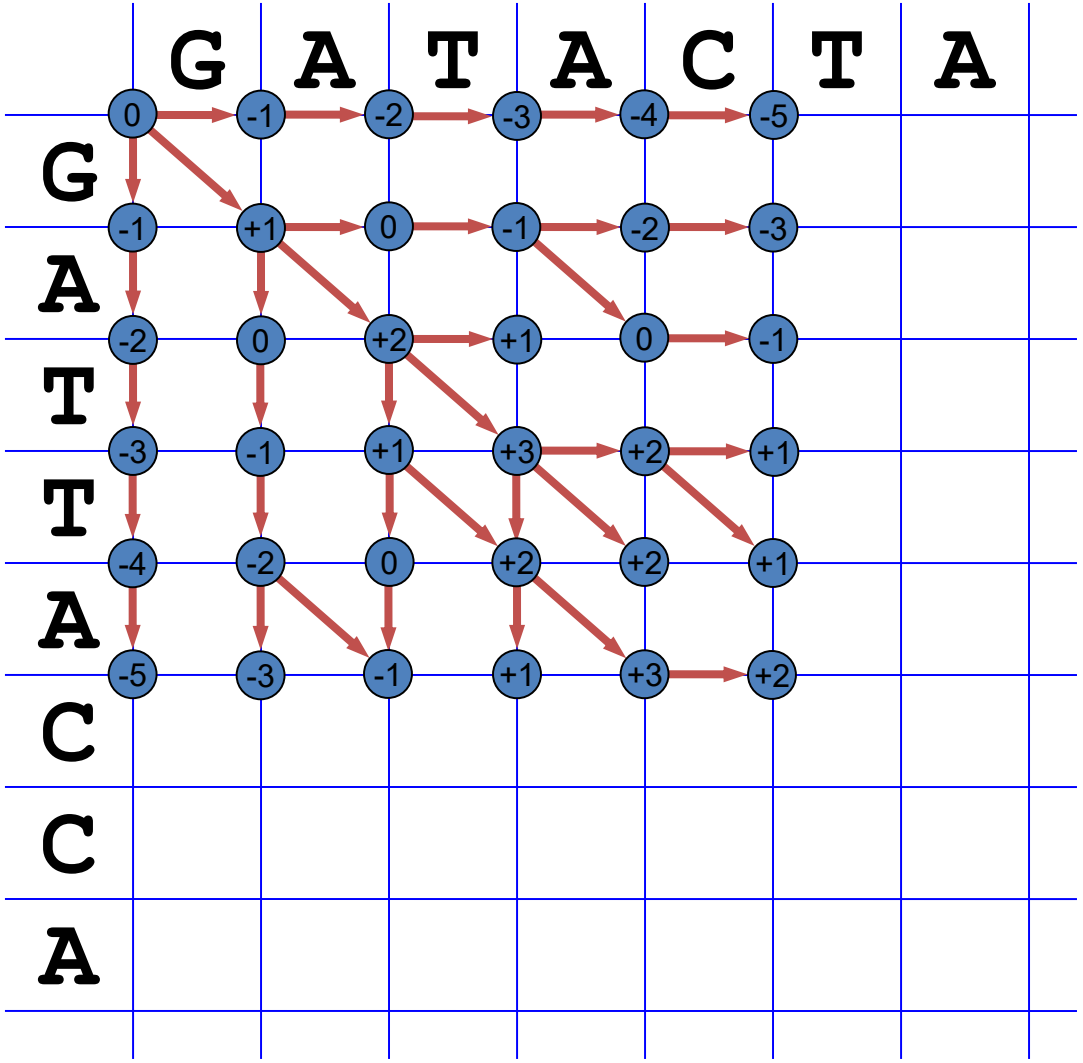
Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.

Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (6)

Incrementar el path paso a paso

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

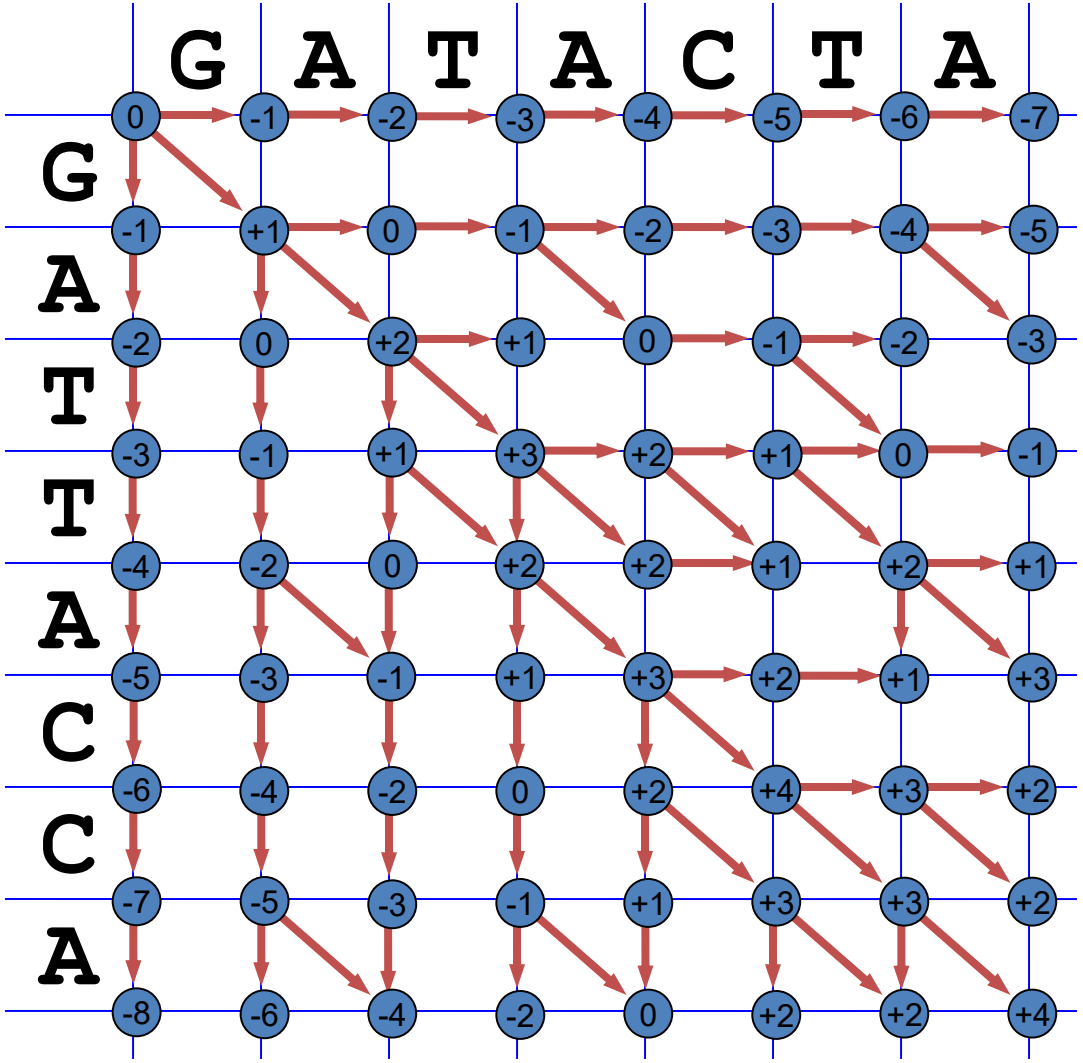


Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: paso a paso (7)

Incrementar el path paso a paso

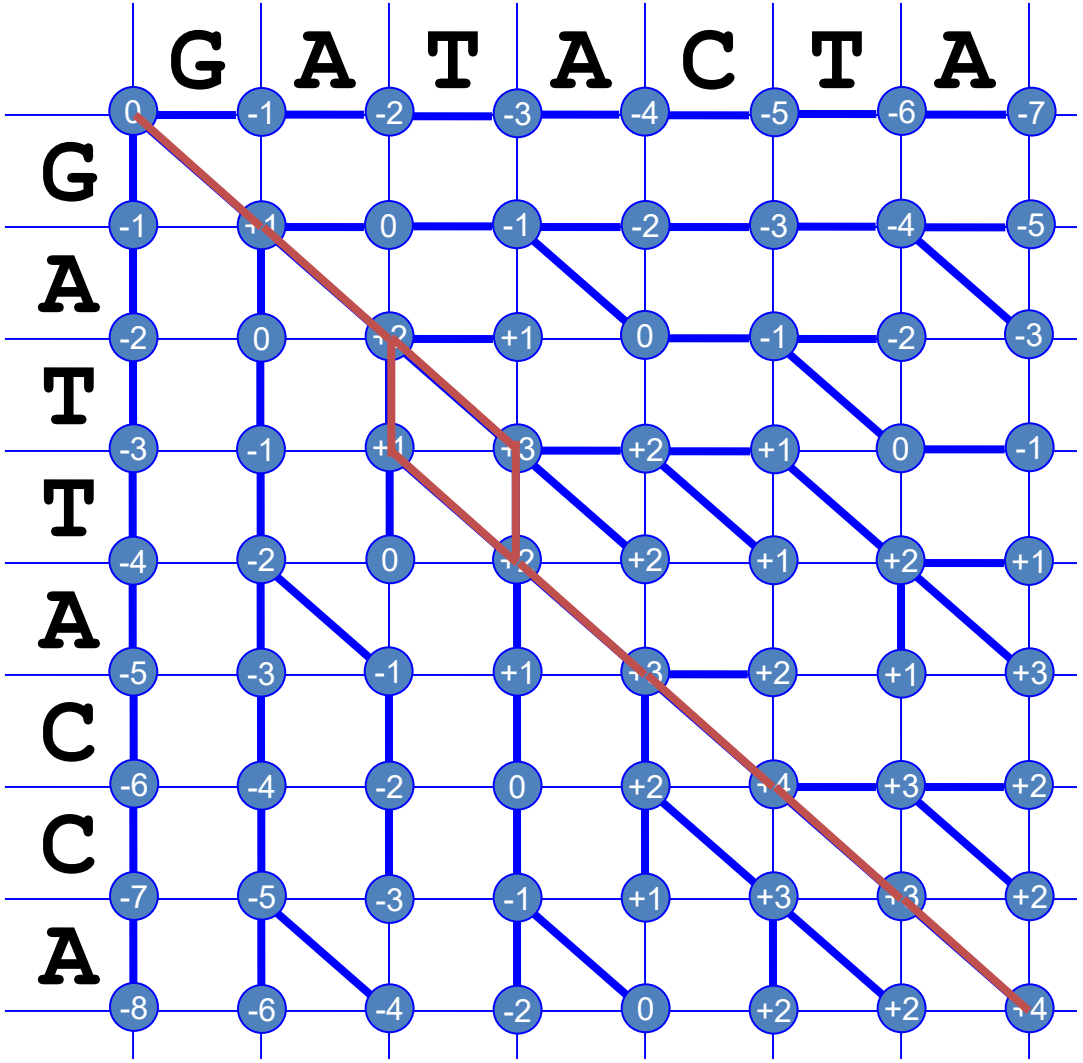
Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: best path

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

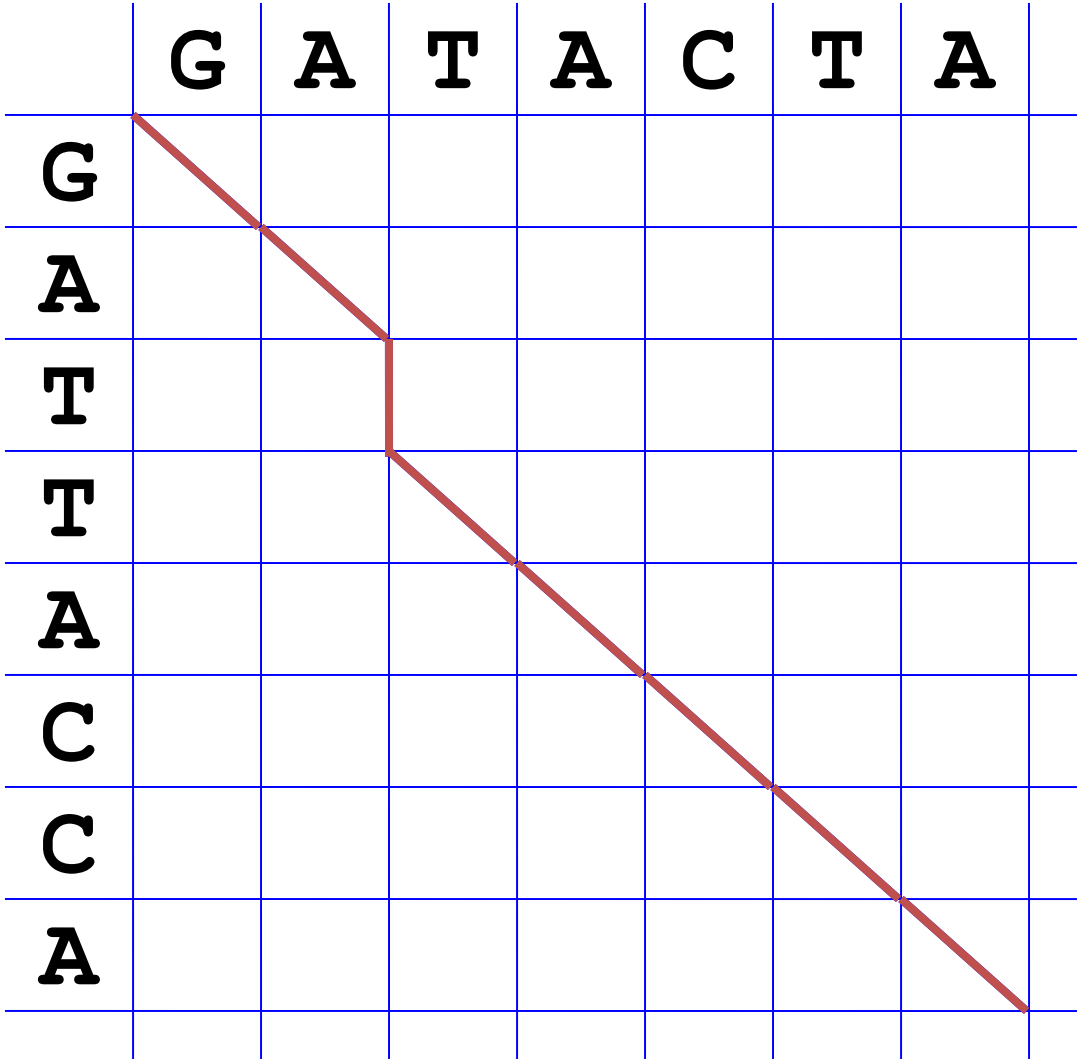


Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: alineamiento obtenido

Imprimir el alineamiento

```
GA-TACTA
GATTACCA
```

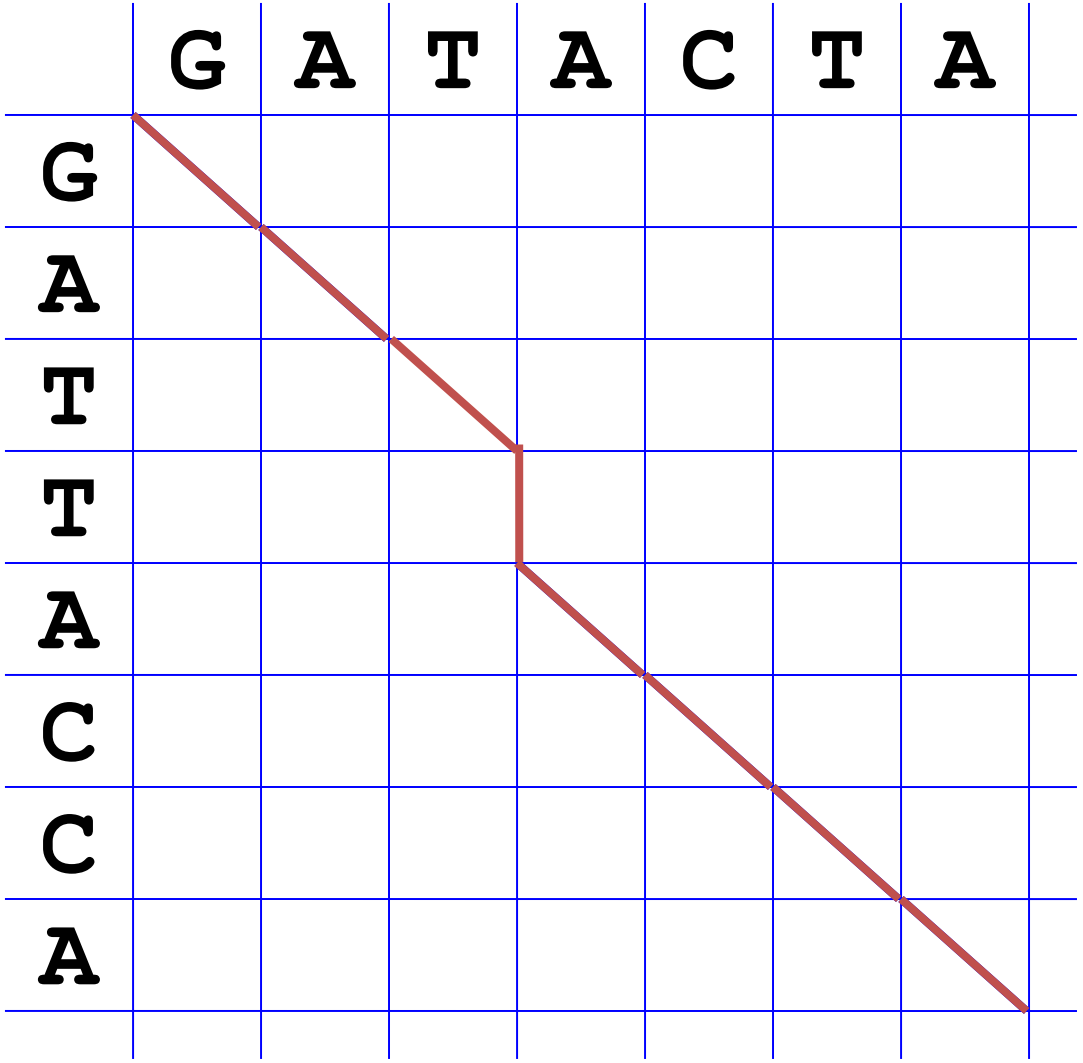


Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: alineamiento obtenido

Imprimir el alineamiento

```
GAT-ACTA
GATTACCA
```



Slides Dynamic Programming: Hugues Sicotte (NCBI)

Dynamic programming: Smith-Waterman

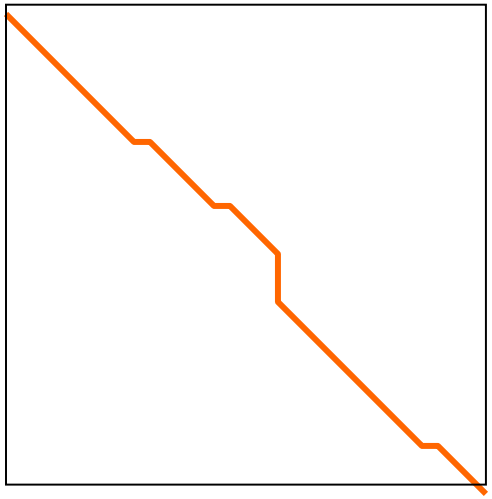
- El método fue modificado (Smith-Waterman) para obtener alineamientos locales
- El método garantiza la obtención de un alineamiento óptimo (cuyo score no puede ser mejorado)
- La complejidad es proporcional al producto de las longitudes de las secuencias a alinear

Similitud global y local

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

Optimal global alignment

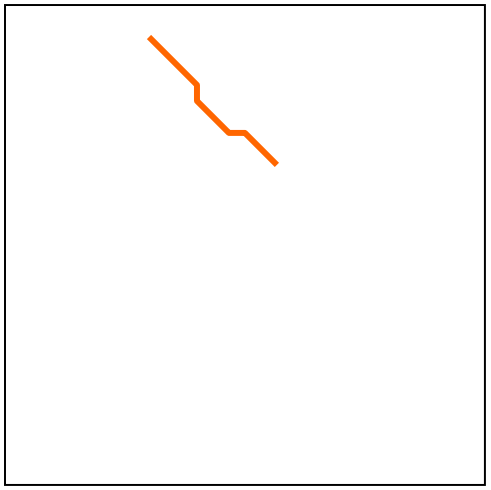
Needleman & Wunsch (1970)



Las secuencias se alinean esencialmente de un extremo a otro

Optimal local alignment

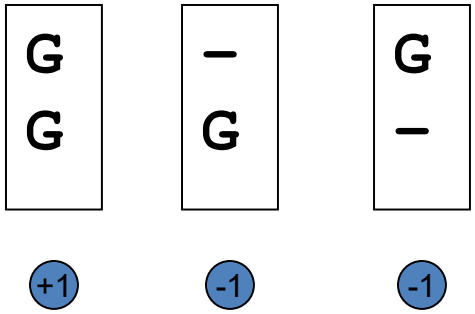
Smith & Waterman (1981)

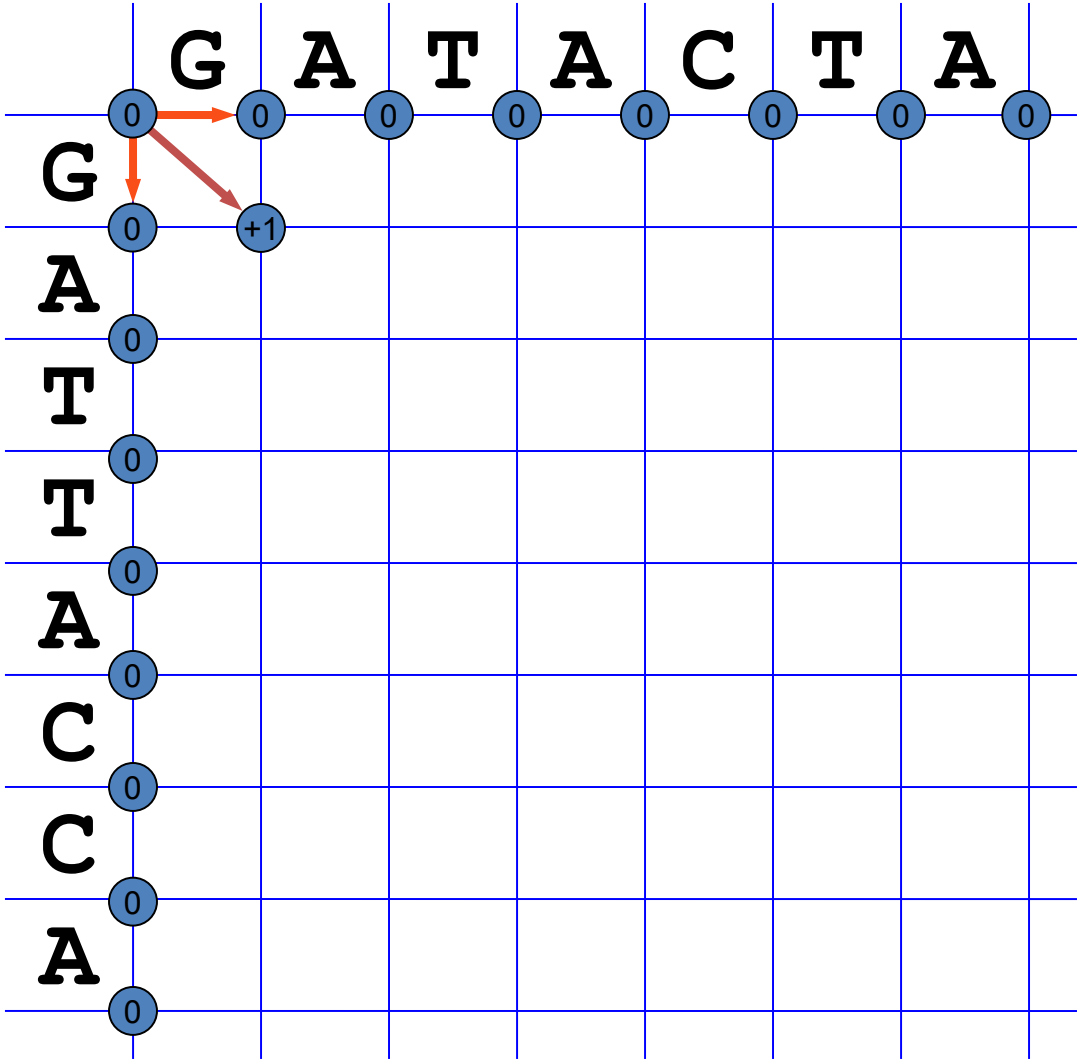


Las secuencias se alinean en regiones pequeñas y aisladas

Smith-Waterman: paso a paso

Extender el path paso por paso

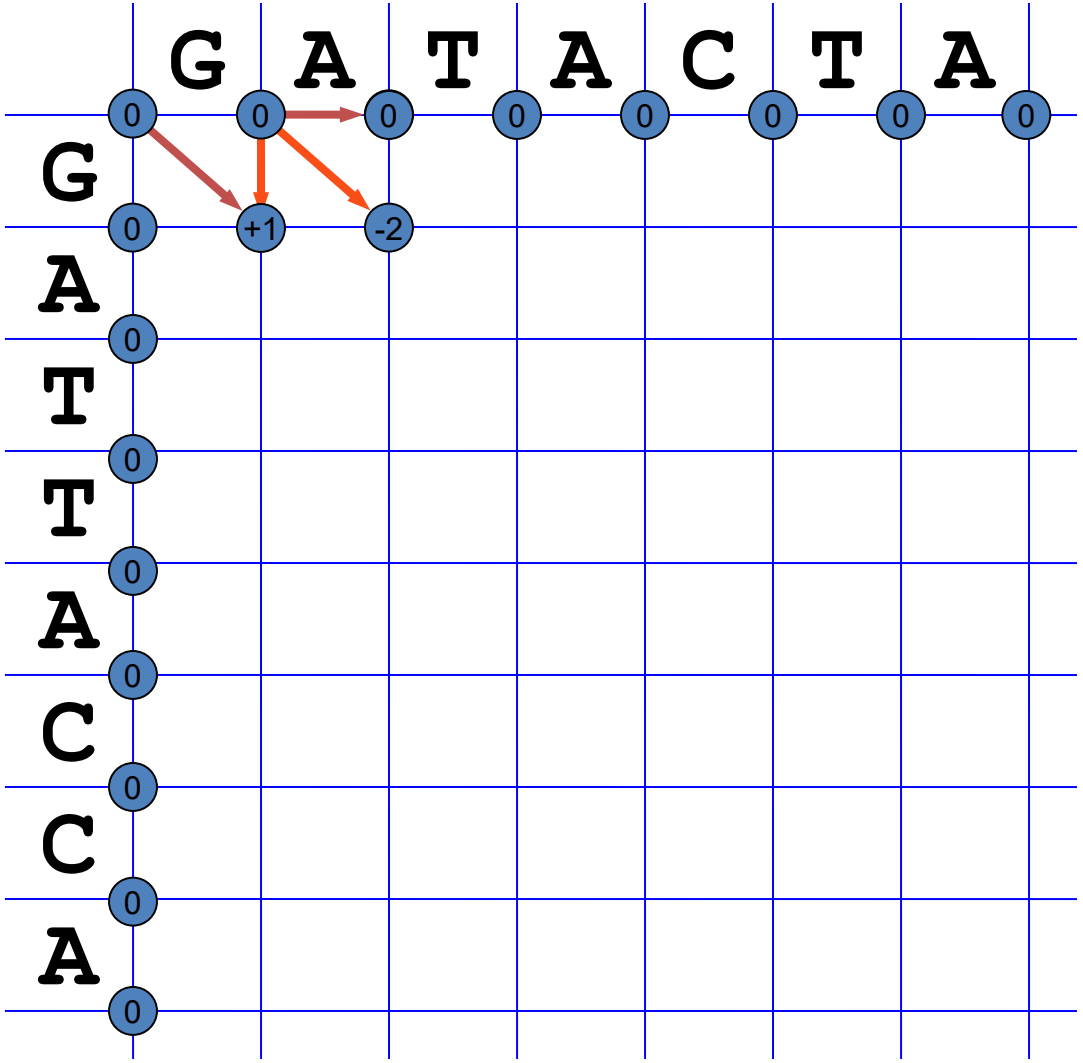




Smith-Waterman: paso a paso (2)

Incrementar el path paso a paso

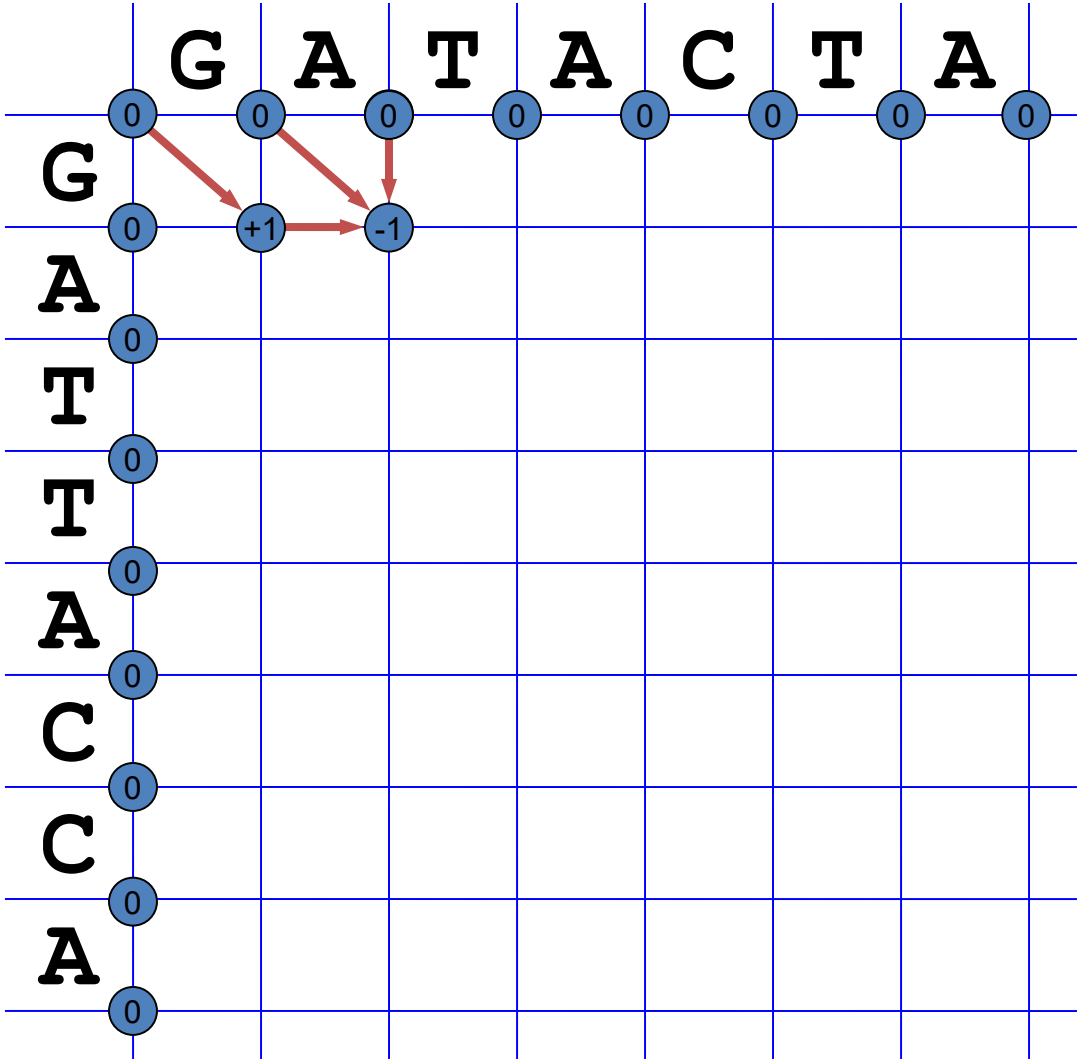
Recordar el mejor subpath que lleva a cada punto en la matriz.



Smith-Waterman: paso a paso (3)

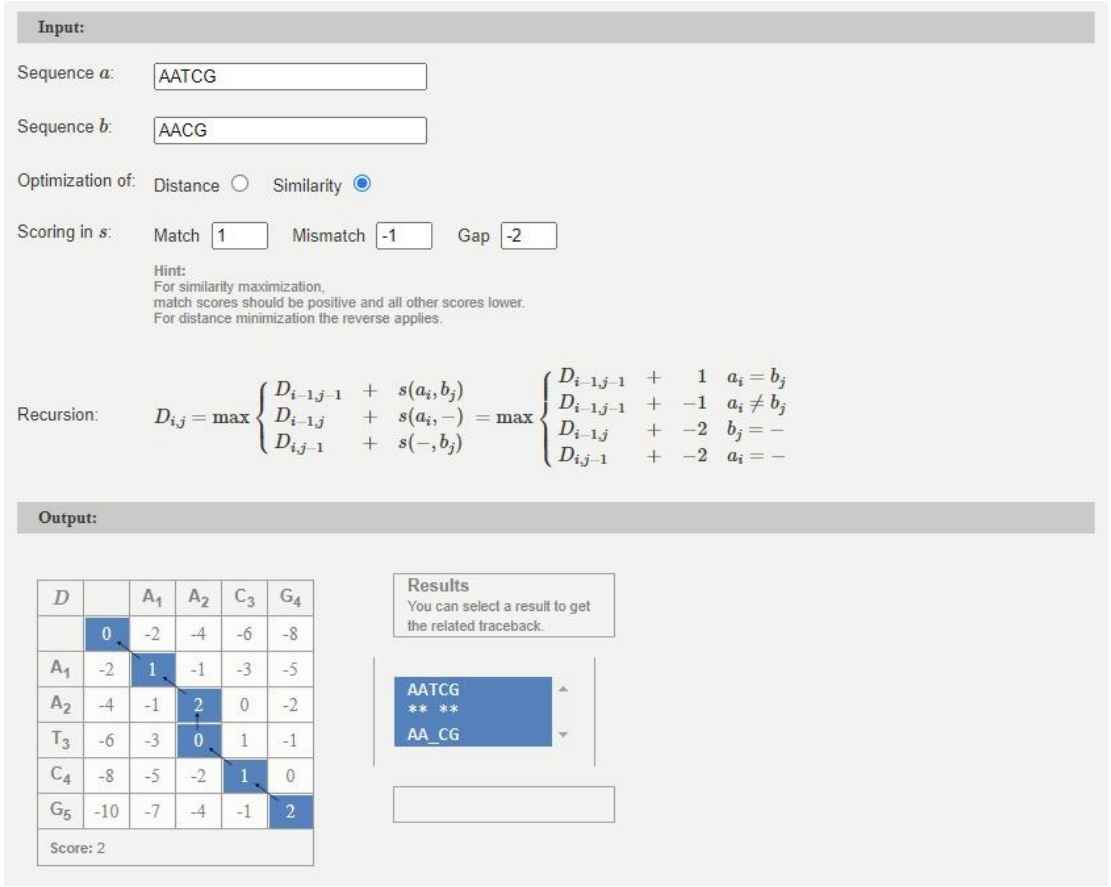
Incrementar el path paso a paso

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



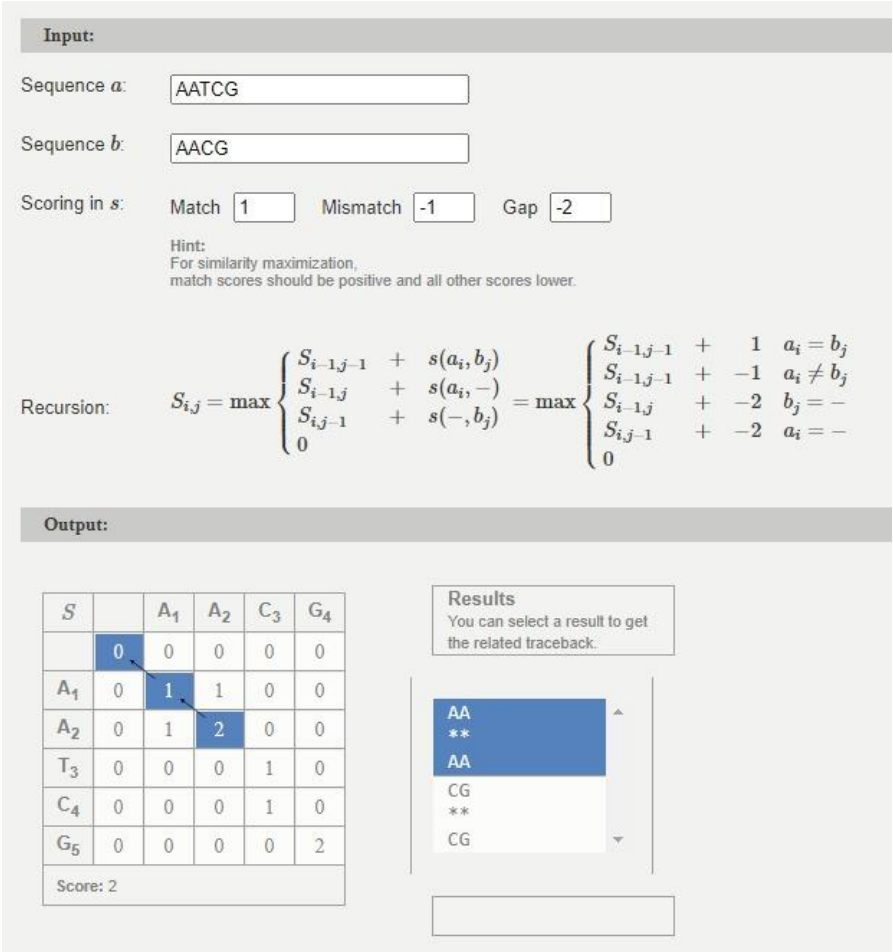
Dynamic programming demos

- **Needleman-Wunsch web app desarrollada para enseñanza**
  - **http://rna.informatik.uni-freiburg.de/Teaching/index.jsp?toolName=Needleman-Wunsch**



Dynamic programming demos

- Smith-Waterman web app desarrollada para enseñanza
  - http://rna.informatik.uni-freiburg.de/Teaching/index.jsp?toolName=Smith-Waterman



Global y local

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

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

Matrices

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

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

Matrices

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

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

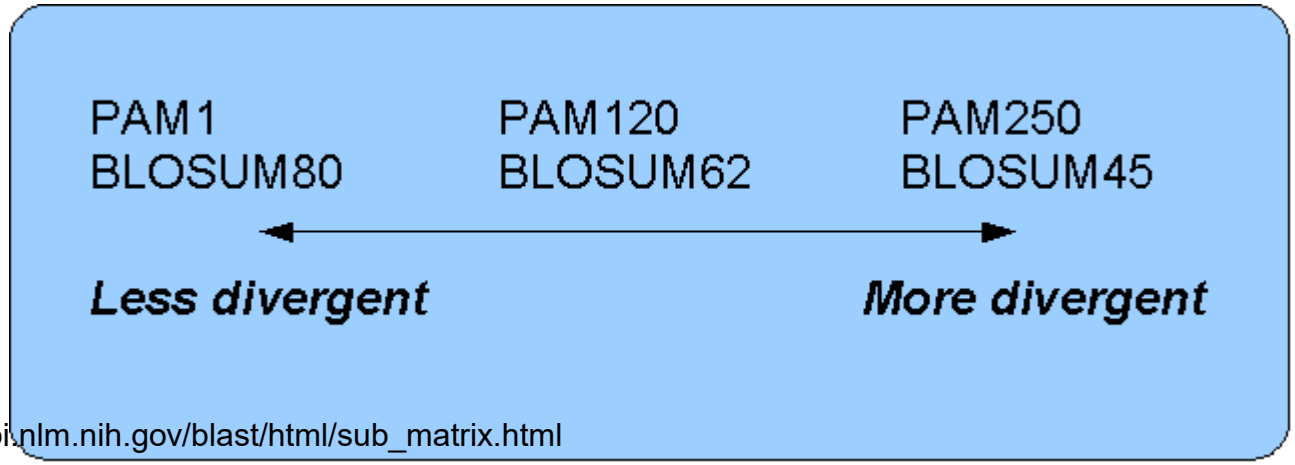
Matrices derivadas por observación

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

Matrices derivadas por observación

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

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



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/sub_matrix.html

Sistemas de scoring: BLOSUM62

Algunas sustituciones son más comunes que otras

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

BLOSUM62

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

Sistemas de scoring: BLOSUM62: identidades

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

BLOSUM62

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

Sistemas de scoring: BLOSUM62: sustituciones

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

BLOSUM62

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

Más matrices

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

Referencias

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

Introduction to Bioinformatics. Lesk, A. M. (2019). **Oxford University Press.**

Hugues Sicotte (NCBI). (slides DP)

Javascript-based implementations for various algorithms
http://rna.informatik.uni-freiburg.de/Teaching/