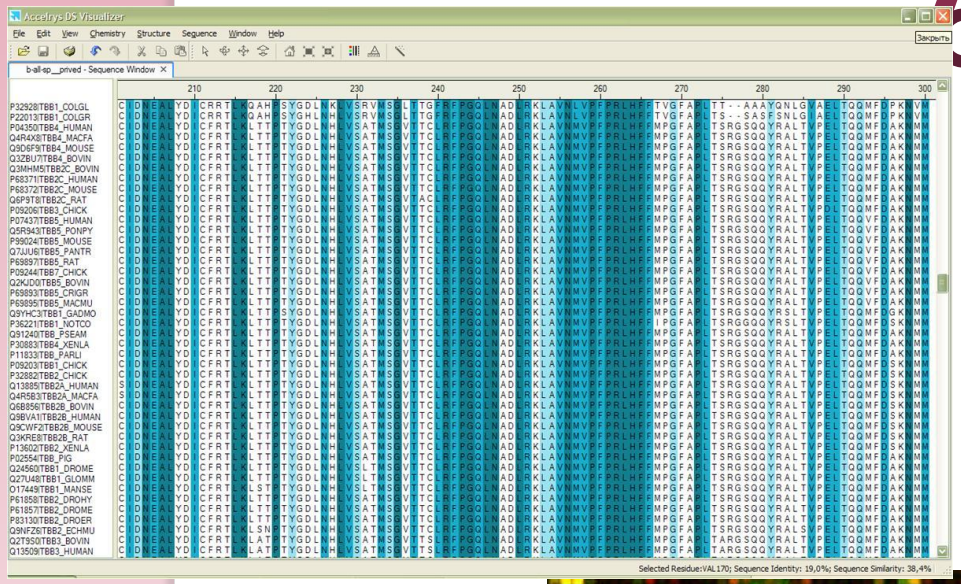
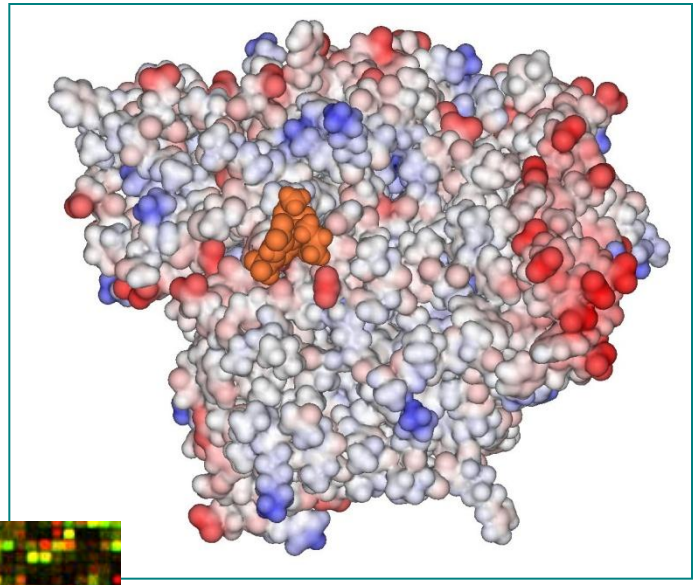
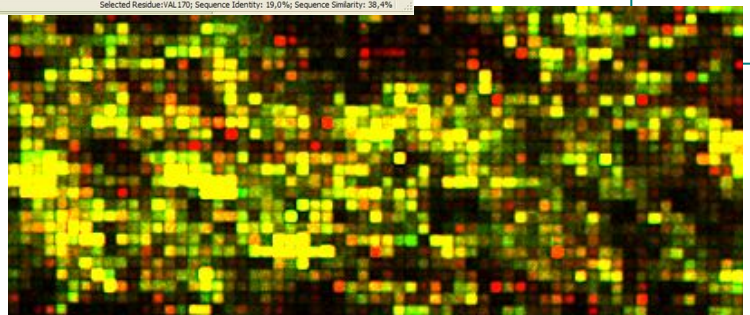
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка
Інститут високих технологій

БІОІНФОРМАТИК А

к.б.н. Нилорко О.
5.







Основний спосіб визначити схожість двох послідовностей - вирівняти їх

```
>EC_Tr  :  MQNRLTIKDIARLSGVGKSTVSRVLNNEYR
>EC_Fr  :  MKLDEIARLAGVSRTTASYVINGKAKQYR
```

- При аналізі первинних структур процедура вирівнювання виявляє сходство між послідовностями (**sequence similarity**), яке може свідчити про гомологію **(homology)**, тобто еволюційну спорідненість макромолекул.

Геп – пропуск в послідовності

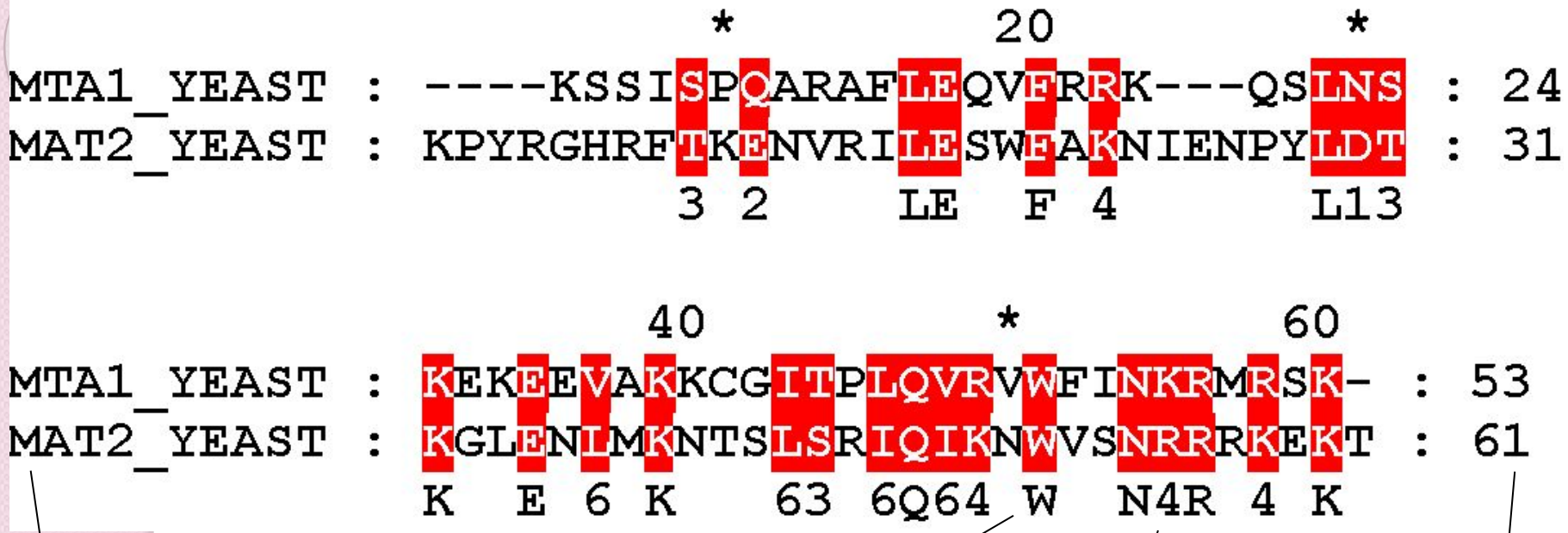
```
>EC_Tr  :  MQNRLTIKDIARLSGVGKSTVSRVLNNE---YR
>EC_Fr  :  ----MKLDEIARLAGVSRTTASYVINGKAKQYR
```

Гомологичные последовательности – последовательности, имеющие общее происхождение (общего предка).

Признаки гомологичности белков

- **сходная 3D-структура**
- **в той или иной степени похожая аминокислотная последовательность**
- **разные другие соображения…**

Что изображено?



Номер столбца выравнивания

Название последовательности

Консервативный остаток

Функционально консервативная позиция

Номер последнего в строке остатка ИЗ ЭТОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

«Идеальное» выравнивание – запись последовательностей одна под другой так, чтобы гомологичные фрагменты оказались друг под другом.

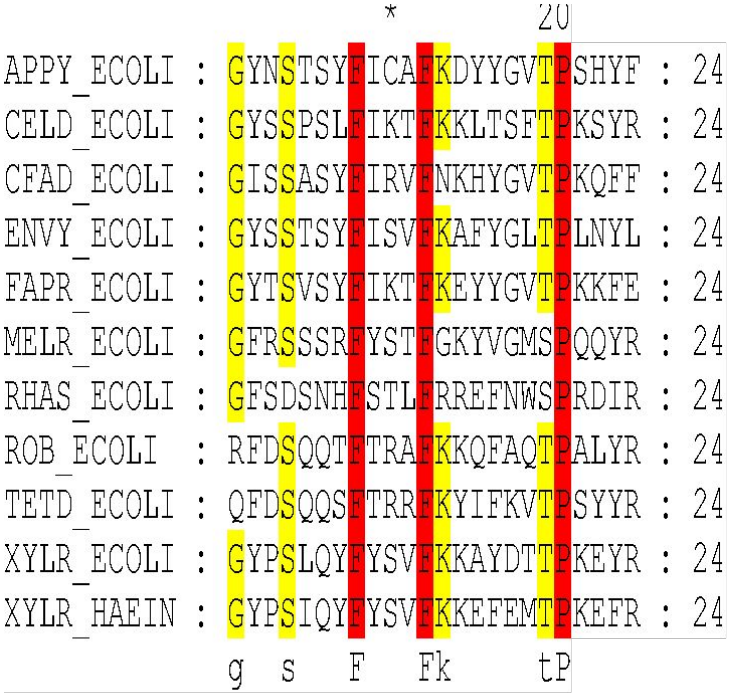
```
      домовой
скупидом
    водомерка ?
```

```
лесовоз        ?--лесо---воз
ледоход         лед---оход---
```

Гэп – пропуск в последовательности

Попарное выравнивание:

Множественное выравнивание:



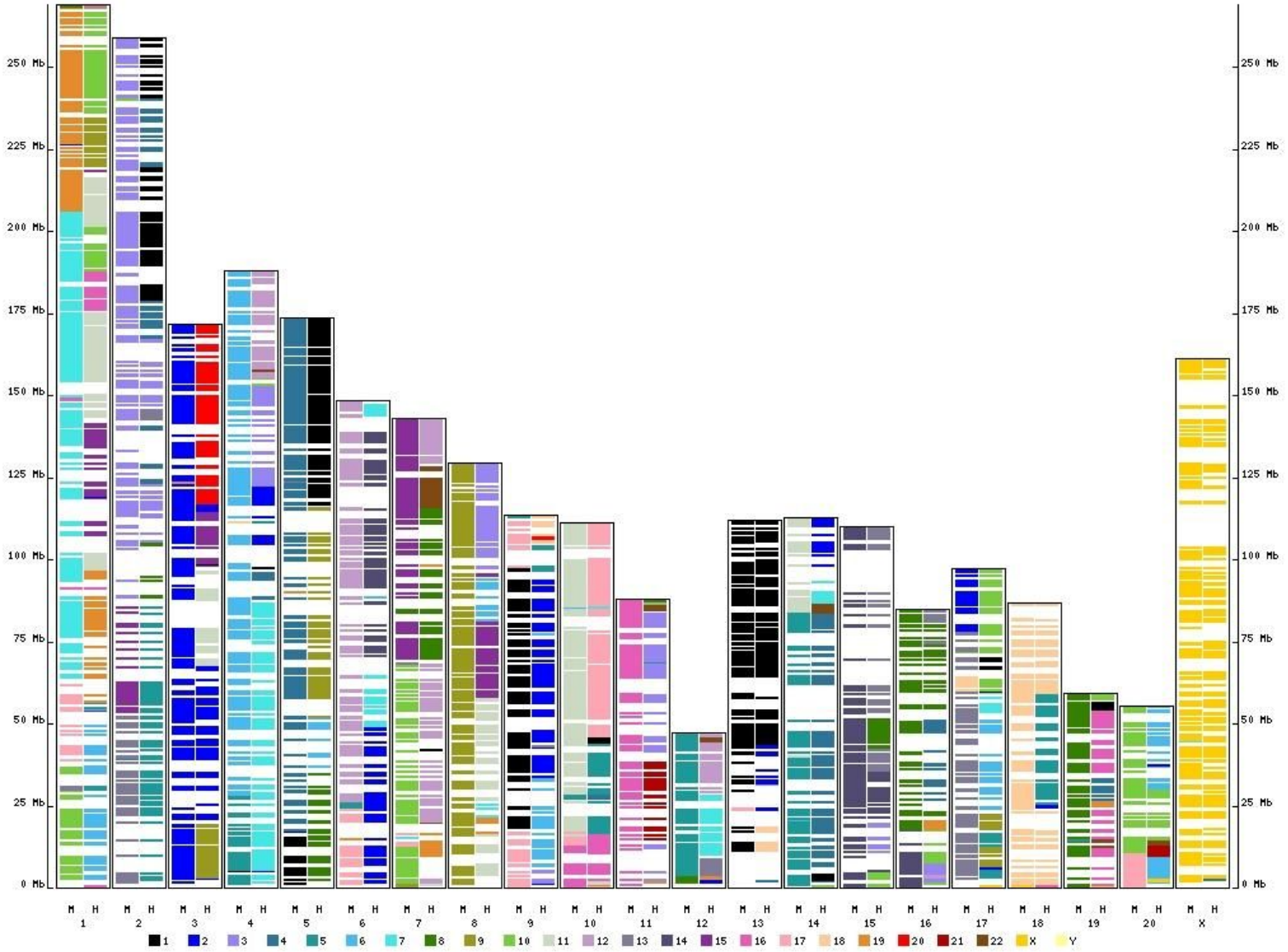
Ортологи и паралоги

- Ортологи – гени з різних організмів, що розійшлися при видоутворенні.
  - Мається на увазі, що ортологи мають спільного «предка» і однакову функцію (якщо тиск відбора слабкий, то функція может «плисти»).
- Паралоги – гени, що розійшлися при дуплікації («копіюванні»).
  - Копії гена не зазнавали тиска відбора, а значить, могли змінити функцію.

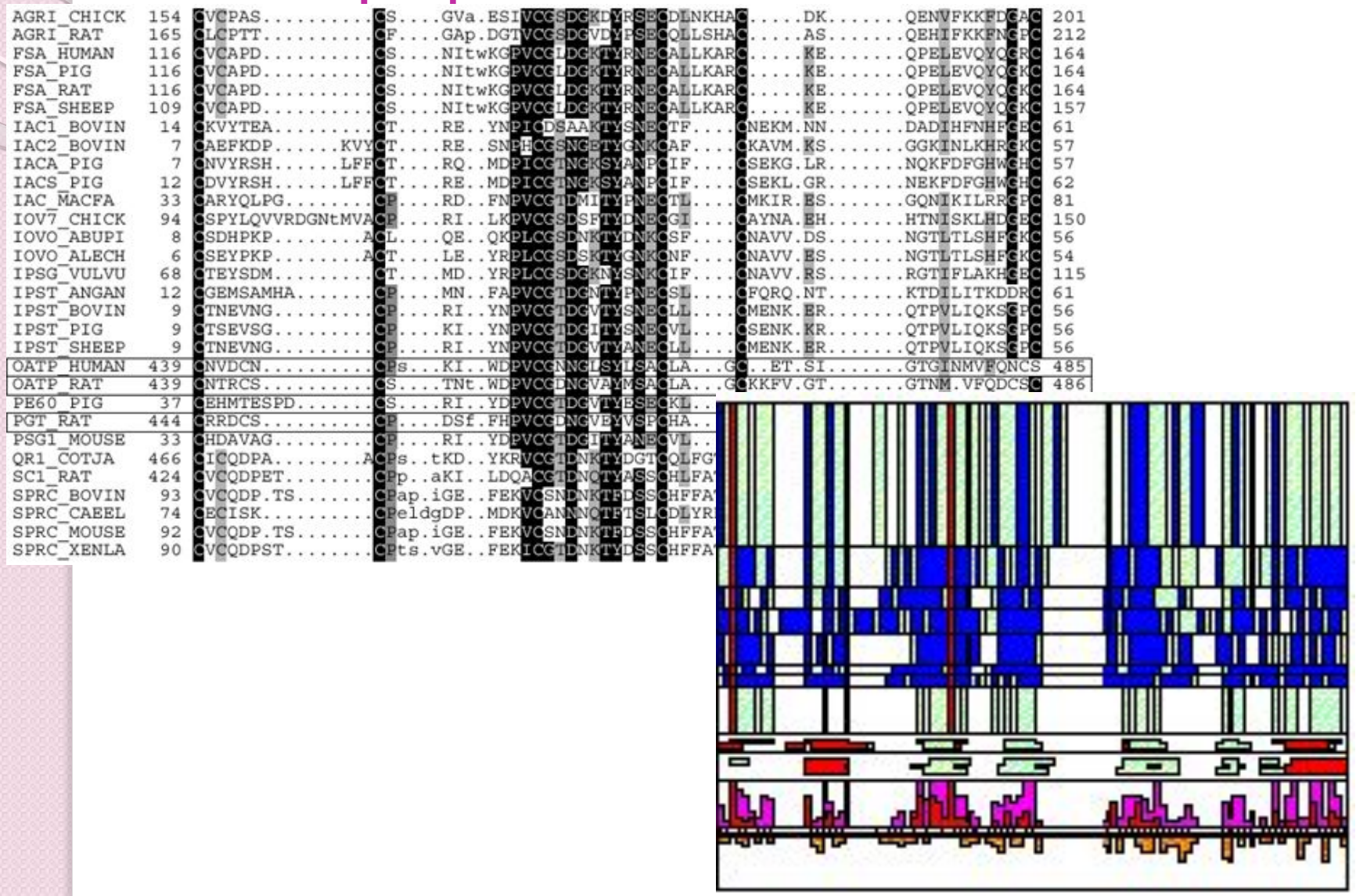
Множественное выравнивание: содержание

- Определение, разновидности, решаемые задачи, общие проблемы
- Глобальное выравнивание
- Прогрессивное выравнивание
- Итерационные методы
- Локальные множественные выравнивания
- Вероятностно-статистические методы множественного выравнивания
- Оценка качества выравнивания
- Структурное выравнивание

Выравнивание полных геномов: крыса – мышь – человек



Множественное выравнивание: иллюстрации



Множественное выравнивание: определение и проблемы

- **Определение:** найти оптимальное соответствие между несколькими последовательностями, если заданы
  - Матрица соответствия
  - Штраф за делецию
  - Функция веса выравнивания
- **Проблемы:**
  - Множество делеций, замен,…
  - Ограниченное обобщение метода динамического программирования
  - Подсчет суммарного веса замен в колонке
  - Размещение делеций в разных пос-стях и штрафы за них

Множественное выравнивание: проблемы (прод.)

- **Проблемы:**
  - Локальные минимумы
    - накопление первоначальных ошибок в иерархических алгоритмах
    - лучшее дерево соответствует лучшему выравниванию
  - Выбор параметров
    - один набор параметров не может быть пригодным на все случаи жизни
- Сложности выравнивания нарастают с ростом различий между последовательностями

Множественное выравнивание: решаемые задачи

- Поиск **мотивов (блоков)** – коротких сигнатур, идентифицируемых в консервативных участках множественного выравнивания
  - отсутствие вставок и делеций
- Построение **профилей (матриц весов)**: оценка частоты встречаемости каждой АК в каждой позиции
- Построение **скрытых марковских моделей** (HMM) – обобщенных профилей, описываемых строго математически

Паттерн – регулярное выражение UNIX'а:

[AC]-x-V-x(4)-{ED}

Ala или Cys- x-Val- x- x- x - x- (любой, но не Glu и не Asp)

Seq1	F	K	L	L	S	H	C	L	L	V
Seq2	F	K	A	F	G	Q	T	M	F	Q
Seq3	Y	P	I	V	G	Q	E	L	L	G
Seq4	F	P	V	V	K	E	A	I	L	K
Seq5	F	K	V	L	A	A	V	I	A	D
Seq6	L	E	F	I	S	E	C	I	I	Q
Seq7	F	K	L	L	G	N	V	L	V	C

Паттерн:
F-[KP]-x(3)-[EQ]-x(4)

Не найдем!

A	-18	-10	-1	-8	8	-3	3	-10	-2	-8
C	-22	-33	-18	-18	-22	-26	22	-24	-19	-7
D	-35	0	-32	-33	-7	6	-17	-34	-31	0
E	-27	15	-25	-26	-9	23	-9	-24	-23	-1
F	60	-30	12	14	-26	-29	-15	4	12	-29
G	-30	-20	-28	-32	28	-14	-23	-33	-27	-5
H	-13	-12	-25	-25	-16	14	-22	-22	-23	-10
I	3	-27	21	25	-29	-23	-8	33	19	-23
K	-26	25	-25	-27	-6	4	-15	-27	-26	0
L	14	-28	19	27	-27	-20	-9	33	26	-21
M	3	-15	10	14	-17	-10	-9	25	12	-11
N	-22	-6	-24	-27	1	8	-15	-24	-24	-4
P	-30	24	-26	-28	-14	-10	-22	-24	-26	-18
Q	-32	5	-25	-26	-9	24	-16	-17	-23	7
R	-18	9	-22	-22	-10	0	-18	-23	-22	-4
S	-22	-8	-16	-21	11	2	-1	-24	-19	-4
T	-10	-10	-6	-7	-5	-8	2	-10	-7	-11
V	0	-25	22	25	-19	-26	6	19	16	-16
W	9	-25	-18	-19	-25	-27	-34	-20	-17	-28
Y	34	-18	-1	1	-23	-12	-19	0	0	-18

Позиционно-специфичная матрица весов аминокислот

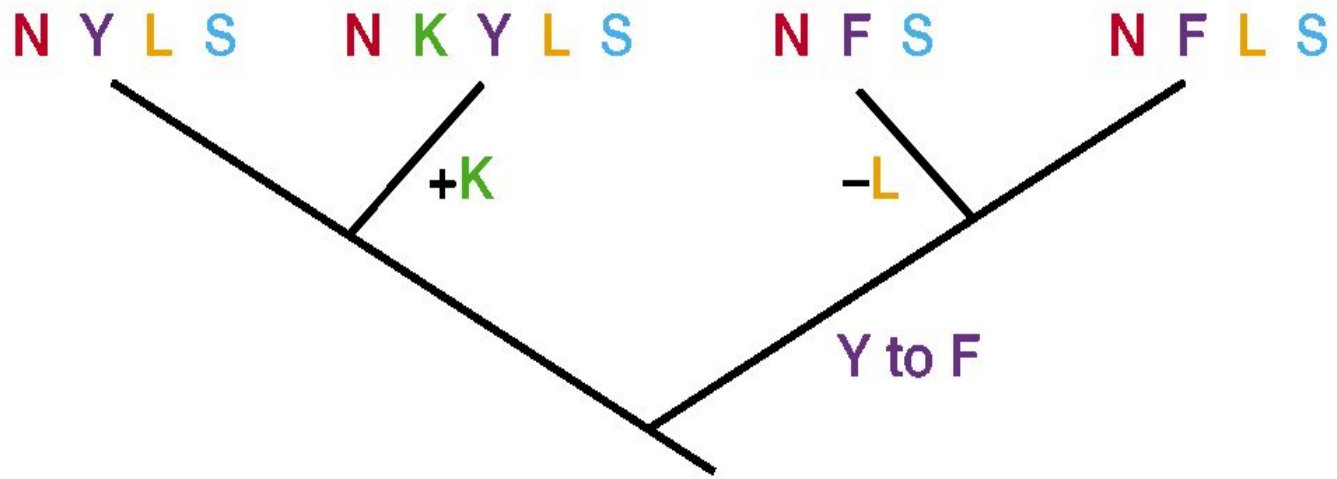
Профиль или весовая матрица (PSSM)

Множественное выравнивание: области применения

- Один из ключевых методов в современной молекулярной биологии
- Сферы применения
  - Филогенетический анализ, «эволюция» пос-сти
  - Предсказание вторичной/третичной структуры белков
  - Выявление АК-остатков (*консервативных участков*)
    - экспонированных на поверхности белка
    - формирующих активный центр
    - обеспечивающих субстратную специфичность
    - критичных для стабилизации втор./трет. структуры
  - Выявление характерных фрагментов для описания белковых семейств
  - Выявление неизвестных ранее гомологий между генами и последовательностями
  - Длинные пос-сти из случайных коротких фрагментов

Множественное выравнивание и филогенетический анализ

seqA	N	•	F	L	S
seqB	N	•	F	–	S
seqC	N	K	Y	L	S
seqD	N	•	Y	L	S



- Идея – минимизация числа мутаций
- Что сначала: выравнивание или дерево?
- Решение не единственно !

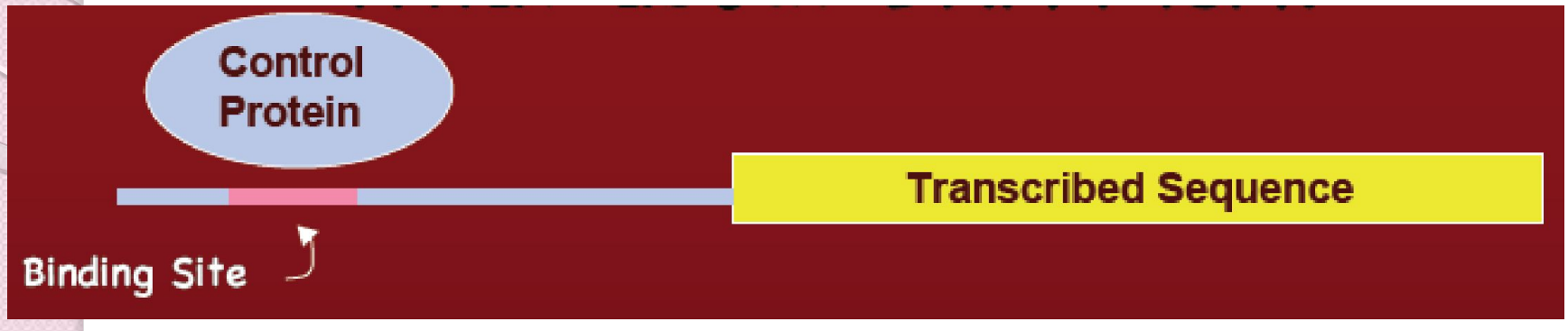
Множественное выравнивание: консервативные участки во многих пос-стях

Консервативный – не значит «совпадающий» !

Множественное выравниваsние: белки vs. ДНК

- Выравнивание белковых семейств
  - В алфавите много «букв»
  - Эволюционная близость белковых молекул, основа для филогенетических деревьев
    - какие события привели к возникновению данного семейства?
  - Идентификация функционально важных областей
  - Данные для предсказания структуры
- Выравнивание некодирующих участков ДНК
  - Консервативные участки, отвечающие за регуляцию экспрессии
  - Установление эволюционной близости
  - Идентификация функционально важных областей

Множественное выравнивание ДНК



- Сайты связывания TFs = мотивы ДНК-последовательностей
- Консерватизм
  - внутривидовой (синергичная регуляция транскрипции нескольких генов)
  - межвидовой (близкие механизмы регуляции транскрипции)
- Дивергенция
  - внутривидовая («специальные» цели, завязанные на метаболизм)
  - межвидовая (эволюционный дрейф)

Множественное выравнивание ДНК: проблемы и варианты решения

- Гораздо сложнее выравнивания белков
  - всего 4 «буквы»
- Отсутствие «золотого стандарта»
- Необходимость оценить
  - способность связывать белки
  - влияние на функцию
- Смысл – тестирование гипотез
  - об общем предке
  - об общих механизмах связывания белков
  - о близости функций

Множественное выравнивание: четыре группы методов

- **Прогрессивное** глобальное выравнивание
  - начать с наиболее близких пос-стей
- **Итерационные** процедуры
  - выравнивание групп пос-стей с последующей оптимизацией
- Выравнивание **по локальным консерватив-ным участкам**
  - построение профилей (разновидности матрицы весов)
  - поиск блоков в пос-стях (выравниваний без делеций)
- **Статистические** методы и вероятностные модели
  - поиск шаблонов (patterns)
  - скрытые марковские модели

Множественное выравнивание: история

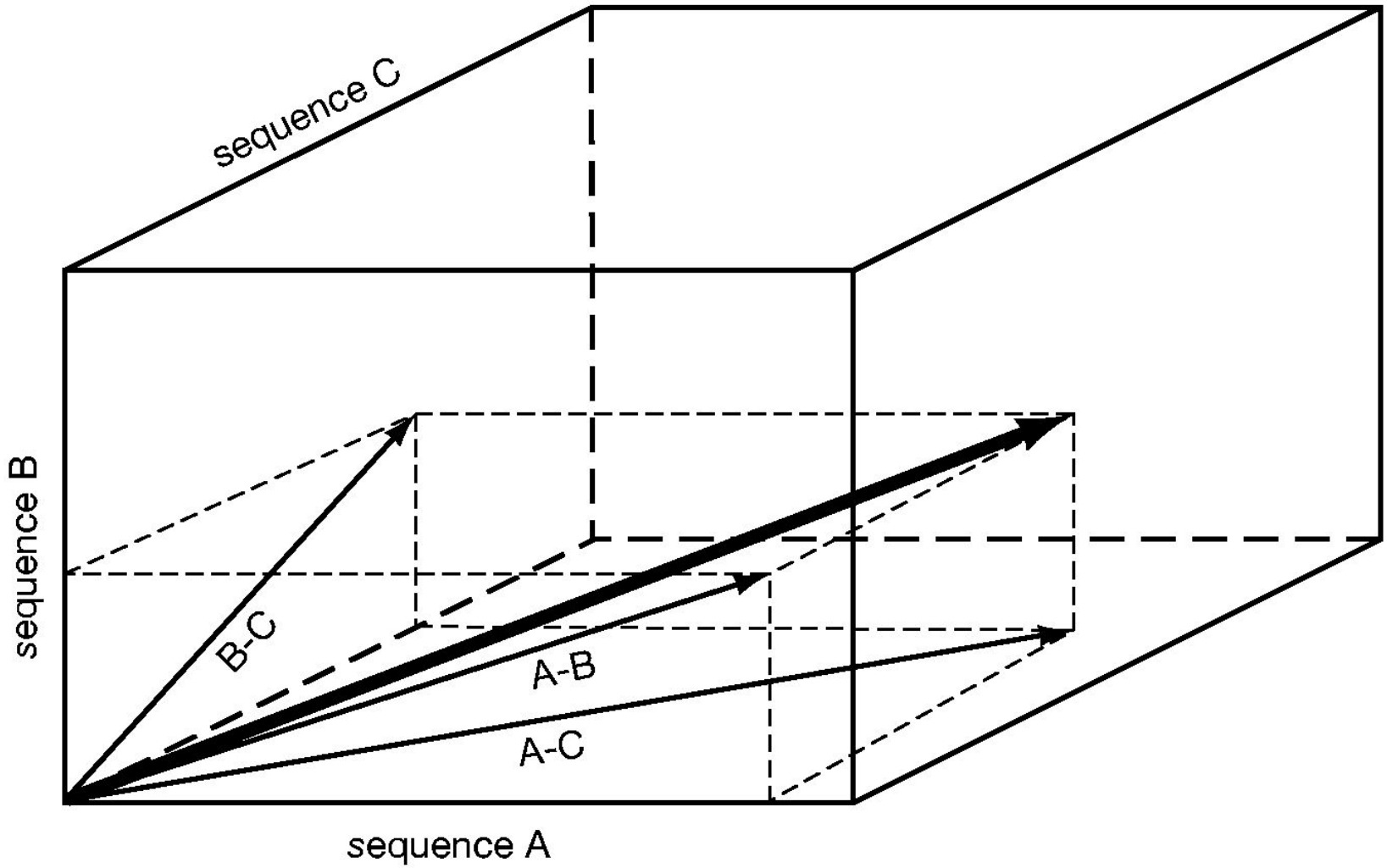
- До 1987 г. множественные выравнивания строились вручную
- Sankoff (1975 и 1987) – первый программно реализованный алгоритм
  - основа – филогенетический анализ
- Barton (1990) – оценка качества выравнивания методом рандомизации, **AMPS**
- Russel & Barton (1992) – структурное выравнивание, **STAMP**
- Thomson et al. (1994) – **ClustalW**
- Altshul et al. (1997) – **PSI-BLAST**
- Notredame et al. (2000) – неиерархическое выравнивание, **T-Coffee**
- Clamp (2004) - **JalView**

Глобальное выравнивание (обобщение ДП)

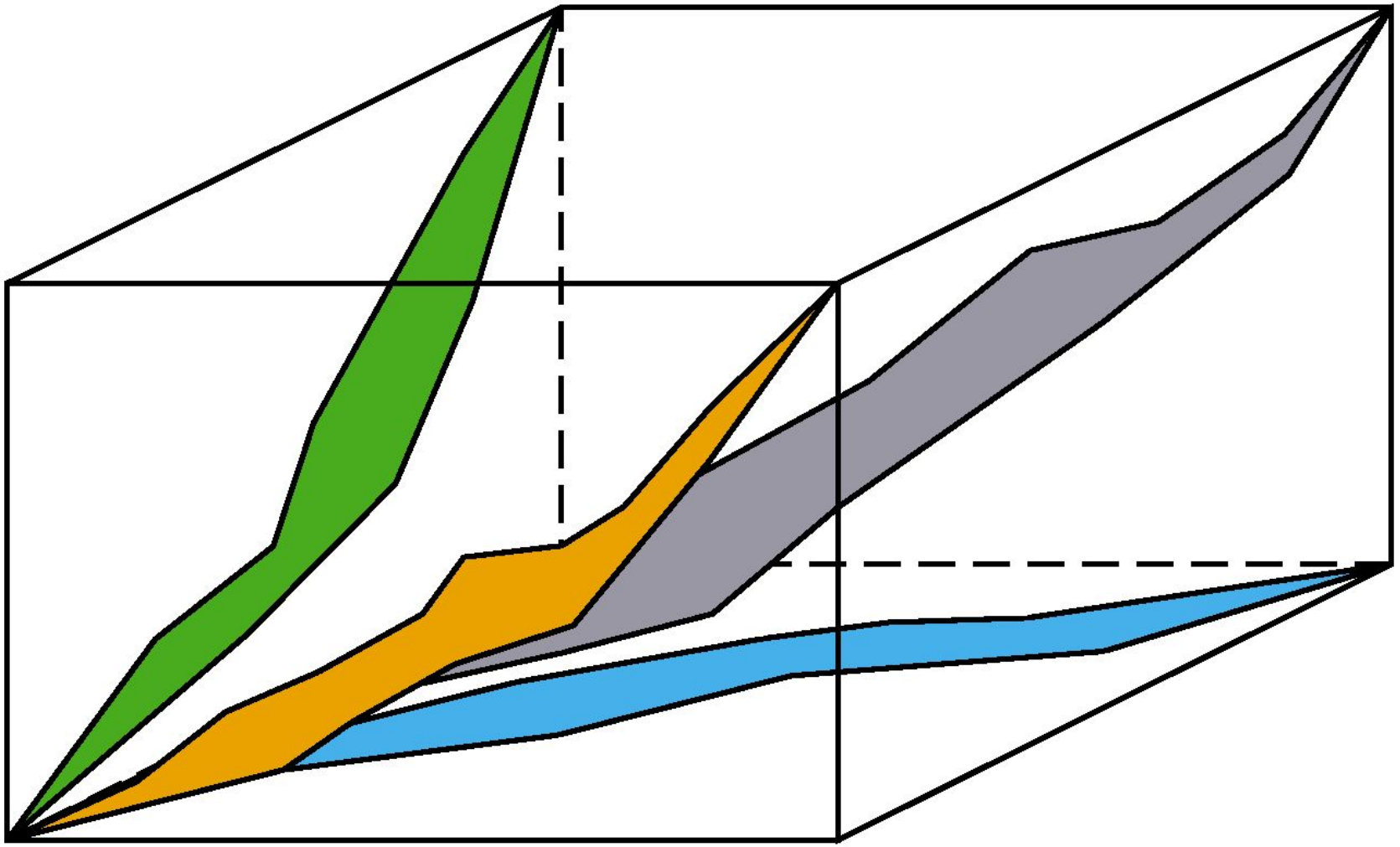
Глобальное выравнивание

- Обобщение метода динамического программирования
  - программа MSA (Lipman et al., 1989)
  - результат далек от оптимального (Gupta et al., 1995)
  - ресурсы: N^m сравнений для m пос-стей длины N
- Развитие MSA
  - метод суммирования пар (sum of pairs, SP) – Carrillo & Lipman (1988)
    - попарные выравнивания
    - филогенетическое дерево
    - выравнивание в ограниченной области куба
    - эвристическое выравнивание ≠ оптимальному
    - реализация в ClustalW / ClustalX
  - сокращение необходимых ресурсов – Gupta et al. (1995)

Множественное выравнивание: трехмерное динамическое программирование



Множественное выравнивание: трехмерное динамическое программирование (прод.)



Глобальное выравнивание (прод.)

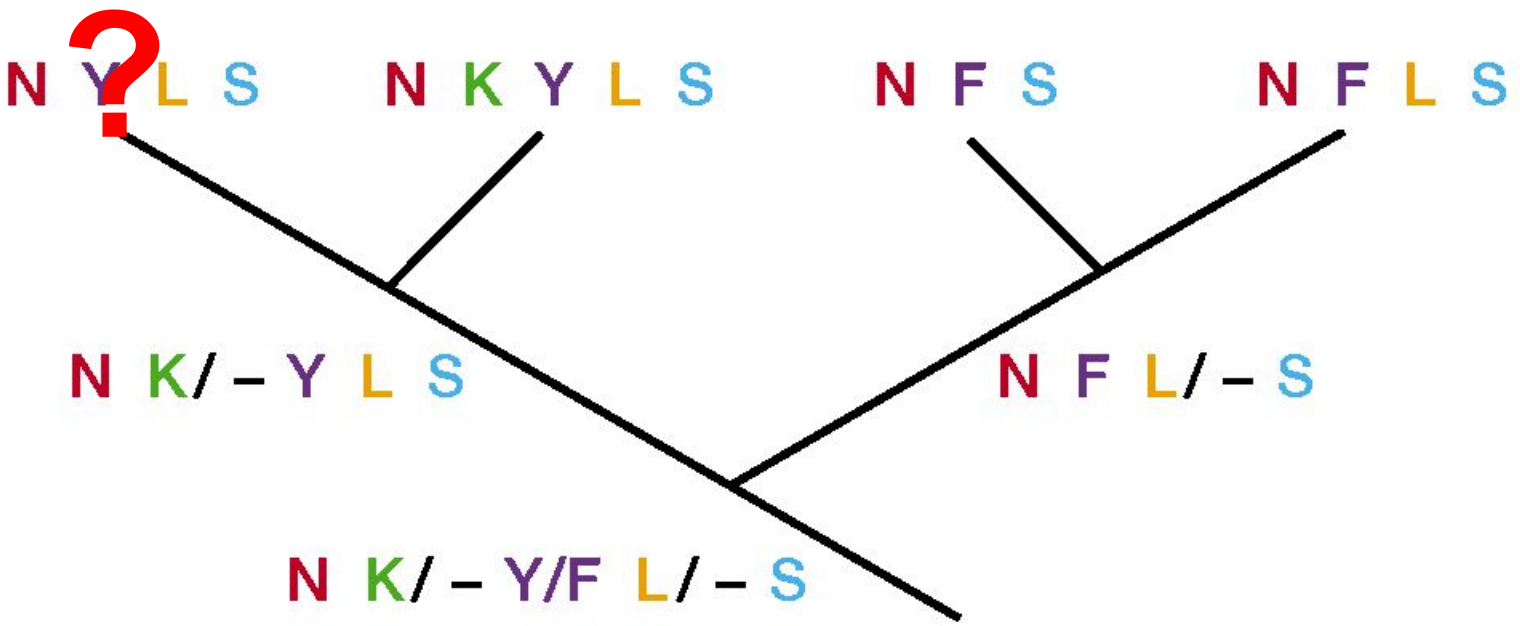
- Оценка качества
  - веса множественных выравниваний (SP score) = сумме весов попарных выравниваний
  - поиск набольшего суммарного веса
  - взвешивание весов (опционально)
    - по филогенетическому дереву
    - учет эволюционно близких пос-стей
    - «дифференц.» вес ε для каждой пары = (вес пары в MSA) – (вес при оптимальн. парном вырав-нии)
    - степень дивергенции пос-стей в выравнивании $\delta = \Sigma \varepsilon_i$ (чем больше δ, тем сильнее дивергенция)
  - MSA: матрица замен PAM250, постоянный штраф за любую делецию
- Возможность применения к большему числу (6-8) **коротких** последовательностей

Прогрессивное выравнивание

Прогрессивное выравнивание: идея

- Сначала – эволюционно наиболее близкие пос-сти
- Постепенное добавление новых пос-стей / групп пос-стей
  - Waterman & Perlwitz (1984)
  - Feng & Doolittle (1987, 1996)
  - Higgins *et al.* (1996)
  - …
- Отображение близости на филогенетическом дереве
  - методы попарного сравнения пос-стей
- Проблема: **неопределенность отдельных замен**

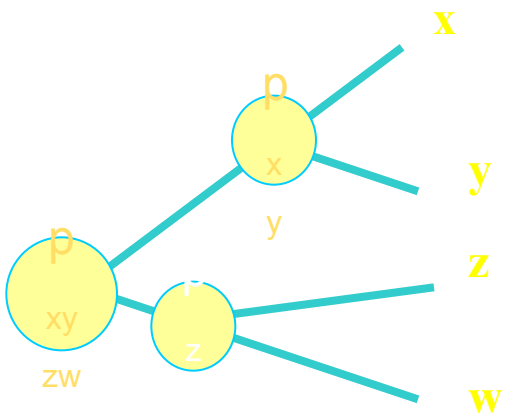
Филогенетический анализ – не панацея



- Проблемы
  - неопределенность в порядке замен / делеций
  - взвешивание ветвей (пос-стей)
  - подбор матрицы замен
  - назначение штрафов за делеции
- Реализация: ClustalW/X и PILEUP

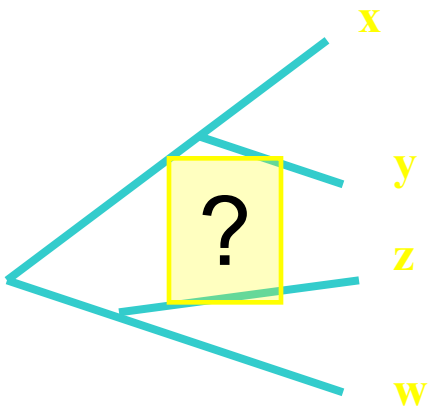
} Отражение эволюции ?

Прогрессивное выравнивание



- Если эволюционное дерево известно
  - сначала выравниваются элементы, самые близкие на эволюционном дереве
  - на каждом шаге выравниваются пос-сти x и y, или профили P_x и P_y для построения нового выравнивания с профилем P_{result}
- Версия со взвешиванием
  - ветви дерева имеют веса, пропорциональные степени расхождения
  - новый профиль – взвешенное среднее двух предыдущих

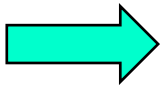
Прогрессивное выравнивание (прод.)



- Если эволюционное дерево неизвестно:
  - построить всевозможные парные выравнивания
  - определить матрицу расстояний D, элементы которой $D(x, y)$ соответствуют эволюционному расстоянию, определенному по парным выравниваниям
  - реконструировать эволюционное дерево
  - построить выравнивание на основе реконструированного дерева

Прогрессивное выравнивание: детали алгоритма

- Три этапа
  - попарные выравнивания «каждая с каждой»
  - филогенетическое дерево по весам парных выравниваний (по генетическим расстояниям)
  - последовательное построение множественного выравнивания
    - от похожих – к непохожим
- **Генетическое расстояние** = (число замен) / (полное число соответствий)
  - делеции не учитываются



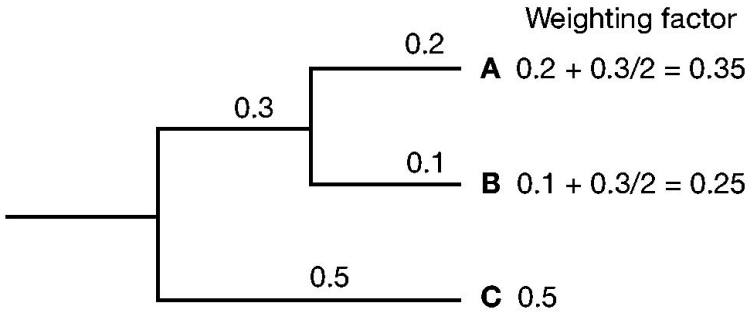
Дерево

Прогрессивное выравнивание: детали алгоритма (прод.)

- Взвешивание пос-стей (ветвей дерева)
  - мультипликативная модель
- Штрафы за делеции
  - предыдущие делеции влияют на последующие выравнивания
  - местоположение делеций (учет вторичной структуры)
  - таблица встречаемости делеций
  - штраф за открытие делеции и ее продолжение на каждую позицию
  - штрафы во множественном выравнивании модифицируются с учетом матрицы замен, степени сходства и длины пос-стей
- Схема назначения штрафов в Clustal противоположна таковой в MSA
  - чем уникальнее пос-сть, тем больше вес

Прогрессивное выравнивание: взвешивание ветвей дерева

A. Calculation of sequence weights



B. Use of sequence weights

Column in alignment 1

Sequence A (weight a) .....K.....

Sequence B (weight b) .....I.....

Column in alignment 2

Sequence C (weight c) .....L.....

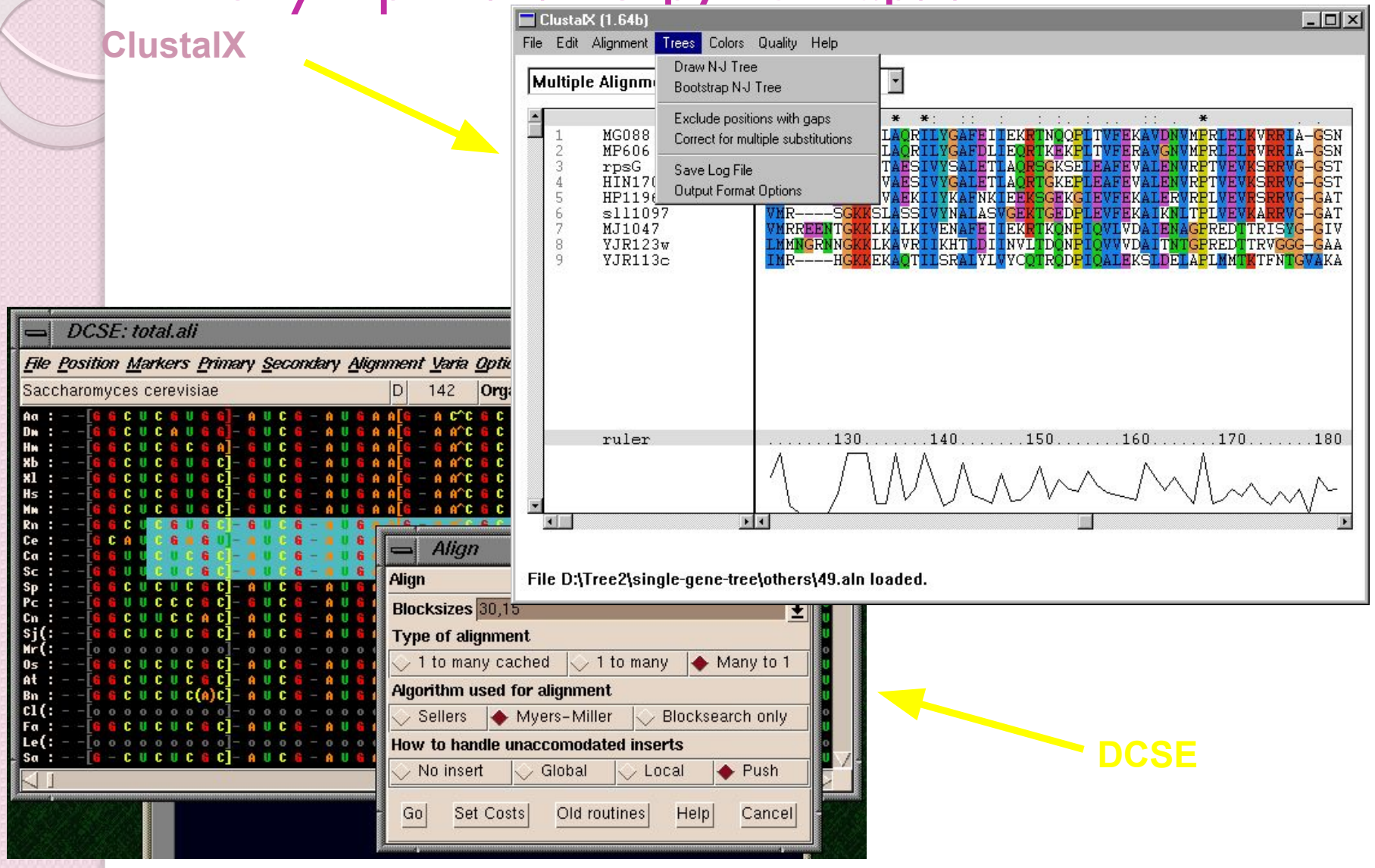
Sequence D (weight d) .....V.....

Score for matching these two column in an msa =

[a x c x score (K,L) +
a x d x score (K,V) +
b x c x score (I,L) +
b x d x score (I,V)] / 4

Множественное выравнивание: популярный инструментарий

ClustalX



DCSE

Прогрессивное выравнивание: штрафы за делеции

- Существующие делеции влияют на выравнивание следующих пос-стей
  - их позиции фиксируются
- ClustalW: размещение делеций между консервативными доменами
  - Pascarella & Argos (1992): частоты встречаемости делеций после каждой АК в неконсервативных участках структурно близких белков
- Штрафы
  - за открытие делеции
  - за продолжение делеции
  - та же схема за делеции внутри существующих делеций

Прогрессивное выравнивание: штрафы за делеции (прод.)

- Компенсационная модификация штрафов
  - средний вес соответствий по матрице замен
  - уровень гомологии между пос-стями
  - длины пос-стей
- Таблица делеций для каждой группы выравниваемых пос-стей
- Другие варианты модификаций
  - ↓ штрафов для областей с существующими делециями
  - ↑ штрафов для областей, соседствующих с делециями
  - ↑ штрафов для областей с гидрофильными АК

Прогрессивное выравнивание: проблемы

- Результат зависит от начальных парных выравниваний
  - ошибки первых выравниваний накапливаются
  - выравнивание непохожих пос-стей Байесовские методы (e.g. HMM)
- Матрица замен и штрафы за делеции должны отражать специфику всего набора пос-стей

Итерационное выравнивание

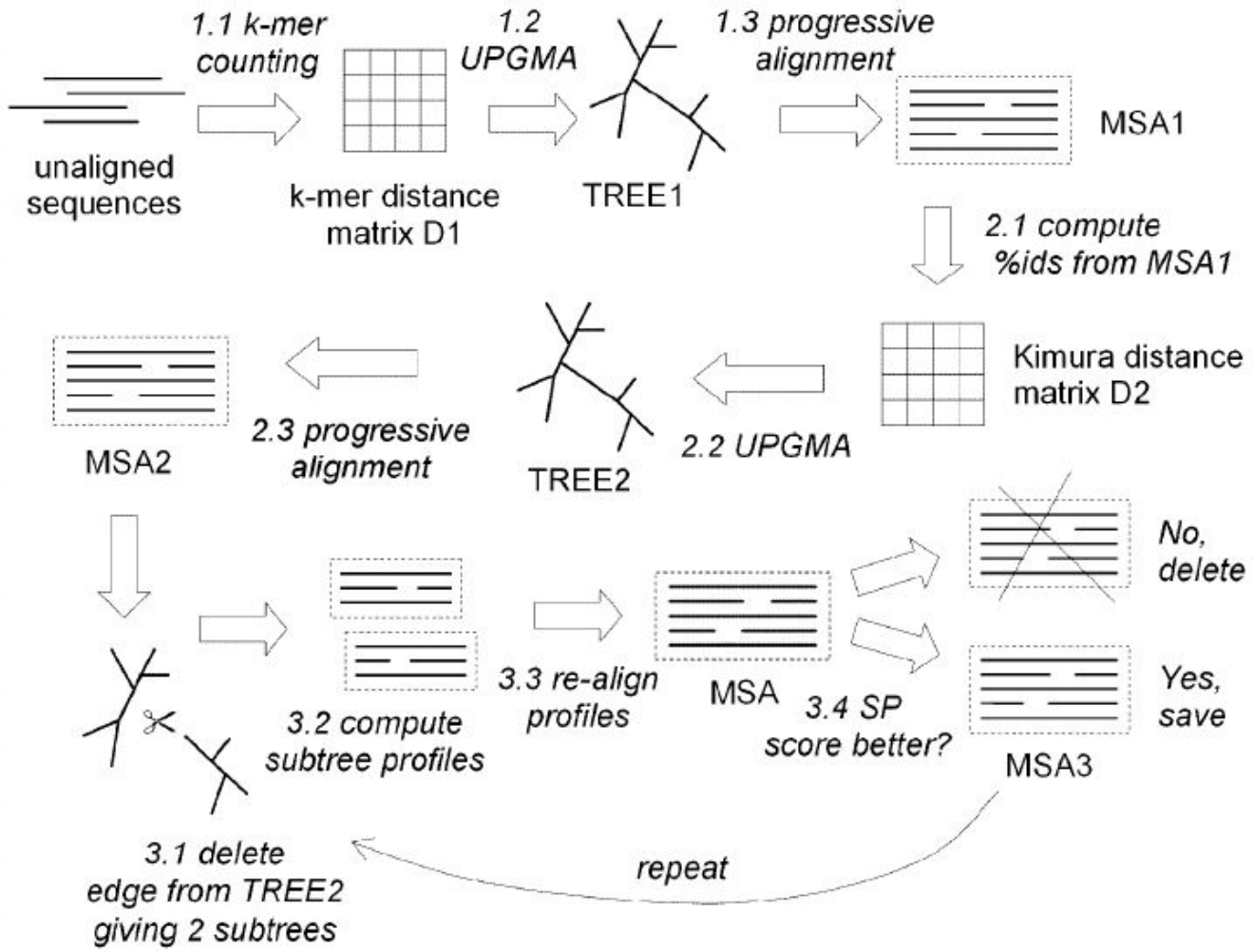
Итерационное выравнивание: идея метода

- Задача
  - избежать накопления ошибок начальных выравнива-ний, свойственных прогрессивным методам
- Вариант решения
  - многократные итерационные выравнивания подгрупп последовательностей
  - построение общего глобального выравнивания
  - оптимизация общего веса выравнивания (суммы парных весов)

Итерационное выравнивание: варианты реализации

- MultAlin (Corpet, 1998)
  - пересчет весов парных выравниваний в прогрессивном алгоритме
  - использование весов для пересчета дерева
  - улучшение множественного выравнивания
- PRRP (1994)
  - построение дерева по начальным парным выравниваниям
  - вычисление весов по дереву и построение выравниваний по аналогии с MSA (но: локальные участки вместо глобального выравнивания + возможны делеции)
  - итерационный пересчет локально выровненных участков для повышения веса выравнивания
  - выравнивание с наибольшим весом новое дерево, новые веса и новые выравнивания
  - повторение, пока суммарный вес не перестанет меняться

Muscle или как исправить ClustalW



Локальные множественные выравнивания

Локальные множественные выравнивания: виды алгоритмов

- Анализ профилей
- Блочное выравнивание
- Поиск мотивов
- Статистические методы

Анализ профилей: введение

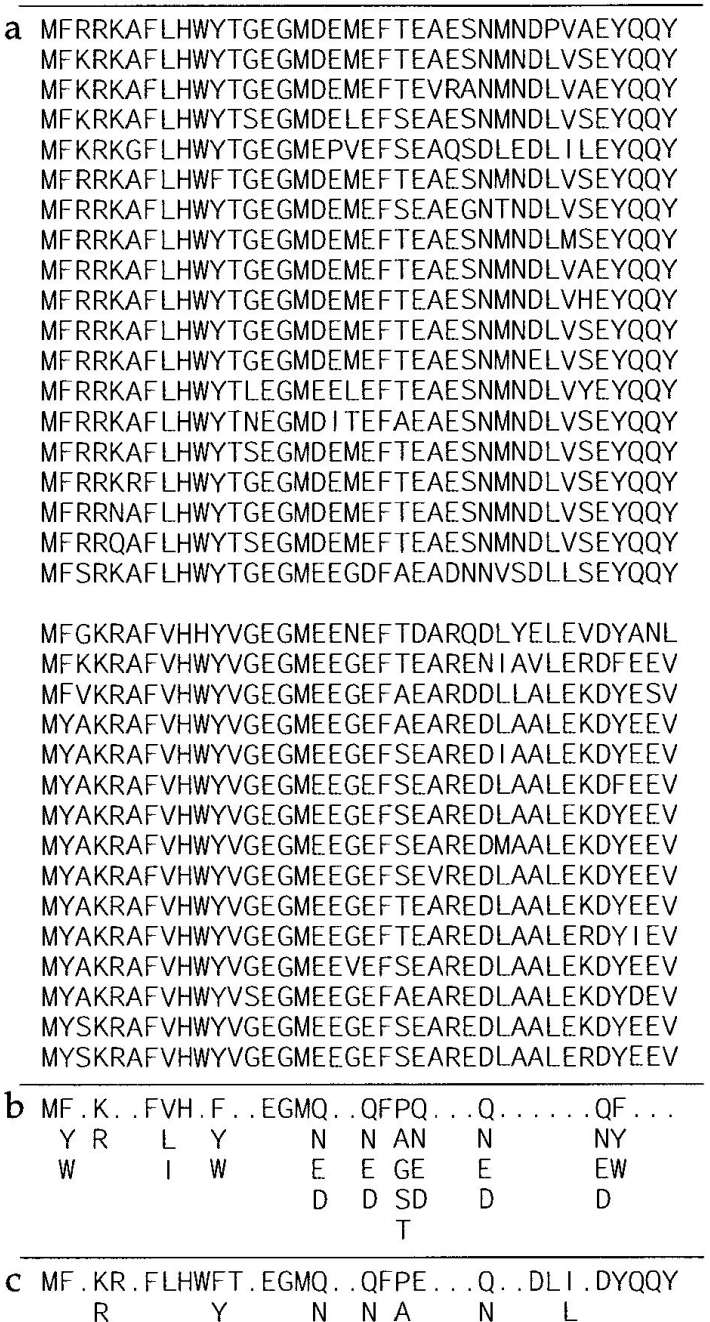
- Идея:
  - MSA для группы пос-стей
  - Выделение высоко консервативных участков в мини-MSA
  - **Профиль - матрица весов для мини-MSA**
  - Профиль допускает соответствия, замены, делеции и вставки
- Применения
  - поиск соответствий профилю в последовательности-мишени (программа Profilesearch)
  - в качестве матрицы замен для построения выравниваний (программа Profilegap)

Анализ профилей: идентификация в семействе белков теплового шока (hsp70)

Cons	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Z	Gap	Len
I	8	3	-2	5	4	5	5	-4	24	0	15	13	1	1	1	-7	2	22	21	-18	-6	4	100	100
T	13	19	-5	24	18	-18	19	7	1	7	-7	-4	14	11	10	-1	9	29	3	-28	-14	15	100	100
L	5	5	-5	3	4	13	4	2	8	-4	14	12	8	-5	0	-10	0	10	10	-1	5	2	22	22
S	17	14	17	13	10	-12	29	-5	-5	6	-14	-9	12	10	0	-2	34	19	1	-8	-15	4	100	100
T	15	3	22	0	-1	-5	12	-2	7	-3	-8	-6	5	7	-8	-7	16	29	9	-22	6	-4	100	100
T	8	-1	12	-2	0	5	6	-4	19	-4	8	5	-1	2	-8	-8	7	22	19	-15	4	-3	100	100
C	17	0	24	-1	-3	11	8	-1	7	-10	1	-2	1	-3	-8	-14	8	5	9	-5	14	-7	100	100
V	11	0	18	-1	-2	2	14	-10	26	-4	9	7	-3	7	-7	-7	21	10	31	-19	-5	-5	100	100
C	10	-8	15	-11	-11	6	8	-7	11	-10	4	3	-7	0	-11	-4	11	5	15	-22	14	-11	100	100
V	7	7	-3	8	8	-3	11	1	20	-1	14	10	4	2	8	-5	0	5	26	-24	-6	8	100	100

Матрица весов (профиль) содержит вероятности встречаемости АК в разных позициях

Блочное выравнивание: семейство из 34 тубулиновых белков



Анализ профилей: ограничения

- Профиль отражает вариабельность в данном MSA
  - смещение в сторону похожих пос-стей
    - вариант коррекции: Gribskov & Veternik, 1996
    - взвешивание пос-стей по удаленности на филогенетическом дереве: чем меньше расстояние, тем меньше вес
- Недостаточное число пос-стей в MSA
  - некоторые АК на некоторых позициях не представлены

Профиль – позиционно-специфическая матрица замен

- 21 столбец и *N* строк
  - *N* – длина последовательностей в выравнивании

2hhb	Human Alpha Hemoglobin	R	V	D	C	V	A	Y	K	
	HAHU	R	V	D	C	V	A	Y	K	100
	HADG	R	V	D	C	V	A	Y	K	89
	HTOR	R	V	D	C	A	A	Y	Q	76
	HBA_CAIMO	R	V	D	P	V	A	Y	K	73
	HBAT_HORSE	R	V	D	P	A	A	Y	Q	62
1mbd	**Whale Myoglobin**	A	I	C	A	P	A	Y	E	
	MYWHP	A	I	C	A	P	A	Y	E	100
	MYG_CASFI	R	I	C	A	P	A	Y	E	85
	MYHU	R	I	C	V	C	A	Y	D	75
	MYBAO	R	I	C	V	C	A	Y	D	71

Eisenberg Profile Freq. A	1	0	0	2	2	9	0	0	↑
Eisenberg Profile Freq. C	0	0	4	3	2	0	0	0	Identity
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	
Eisenberg Profile Freq. V	0	5	0	2	3	0	0	0	
Eisenberg Profile Freq. Y	0	0	0	0	0	0	9	0	

Consensus = Most Typical A.A.	R	V	D	C	V	A	Y	E
Better Consensus = Freq. Pattern (PCA)	R	iv	cd	š	š	A	Y	µ

š = (A,2V,C,P); µ=(4K,2Q,3E,2D)

Entropy => Sequence Variability	**3**	**7**	**7**	**14**	**14**	**0**	**0**	**14**

Множественное выравнивание на базе вероятностно-статистических методов

- Максимизация математического ожидания
- Сэмплирование Гиббса
- Скрытые марковские модели
  - see Russ Altman, Lecture 4-27-06, pp. 8-20

Наиболее известные программы множественного выравнивания:

1. MSA => оптимальное выравнивание, если дождаться результата

2. ClustalW (реализации − ClustalX, emma из EMBOSS) − до сих пор самый популярный алгоритм, в сложных случаях может ошибиться.

3. Muscle − итеративный прогрессивный алгоритм, точнее и быстрее ClustalW

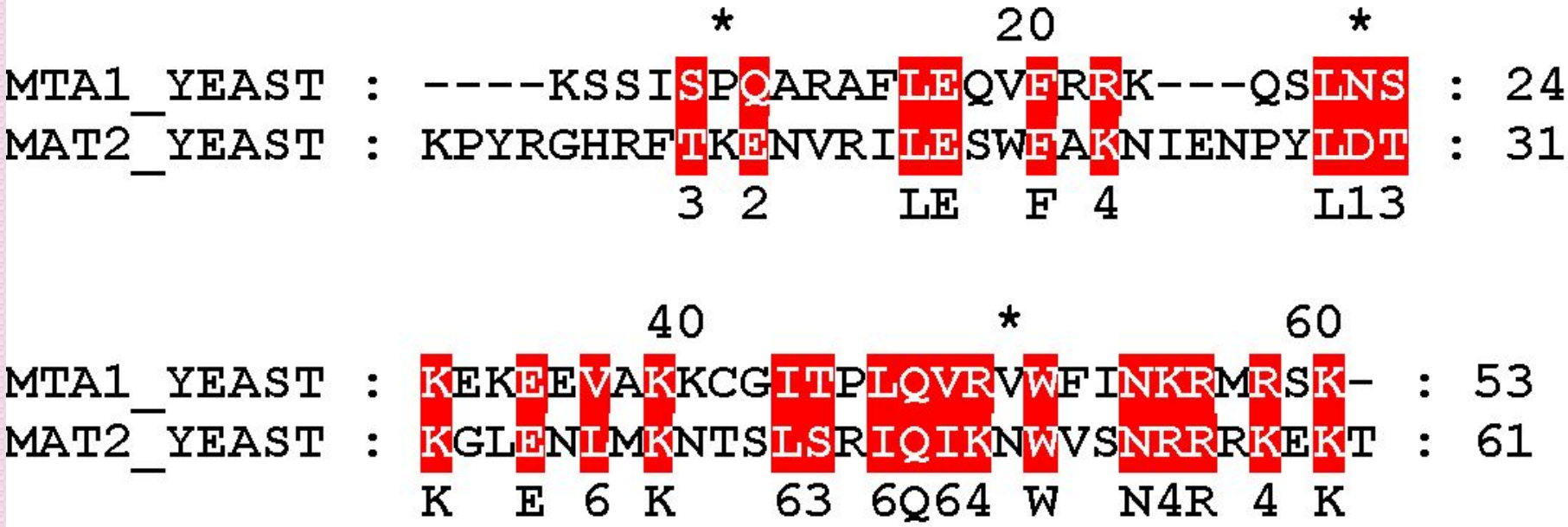
4. T-COFFEE – немного точнее, но существенно медленнее

5. HMMER – часто ошибается, но хорошо строит профили

6. .....

Структурное выравнивание

Правильно ли выровнены последовательности?



В чем *биологический* смысл выравнивания?

- *Буквы в одной колонке определяют сопоставление аминокислотных остатков двух белков*
- Сопоставленные остатки, по идее, должны иметь что-то общее в молекулах белка; что???

Предложение: биологический смысл имеет сопоставление одинаковых или функционально сходных остатков белка.
Эти остатки играют сходную роль.
Сопоставление непохожих остатков не имеет смысла.

Какое выравнивание “правильнее”?

```
                          *          20           *
MTA1_YEAST  :  ----KSSISPQARAFLEQVFRRK---QSLNS  : 24
MAT2_YEAST  :  KPYRGHRFTKENVRILESWFAKNIENPYLDT  : 31
                        3 2     LE   F 4       L13

                        40          *          60
MTA1_YEAST  :  KEKEEVAKKCGITPLQVRVWFINKRMRSK-  : 53
MAT2_YEAST  :  KGLENLMKNTSLSRIQIKNWVSNRRRKEKT  : 61
               K   E 6 K    63  6Q64 W  N4R 4 K
```

12 консервативных остатков

```
                    *         20         *         4
MTA1_YEAST  :  K----SSISPQA-R------A------F-----LEQVFR  : 17
MAT2_YEAST  :  KPYRGHRFTKENVRILESWFAKNIENPYLDTKGLENLMK  : 39
               K       3 2  R      A      5     LE 6 4

               0         *         60         *
MTA1_YEAST  :  RKQSLNSKEKEEVAKKCGITPLQVRVWFINKRMRSK-  : 53
MAT2_YEAST  :  NT-SL-SR------------IQIKNWVSNRRRKEKT  : 61
                  SL S4             6Q64 W  N4R 4 K
```

13 “консервативных” остатков

Чтобы понять смысл выравнивания, вернемся к тому, что такое последовательность аминокислотных остатков и что такое белок

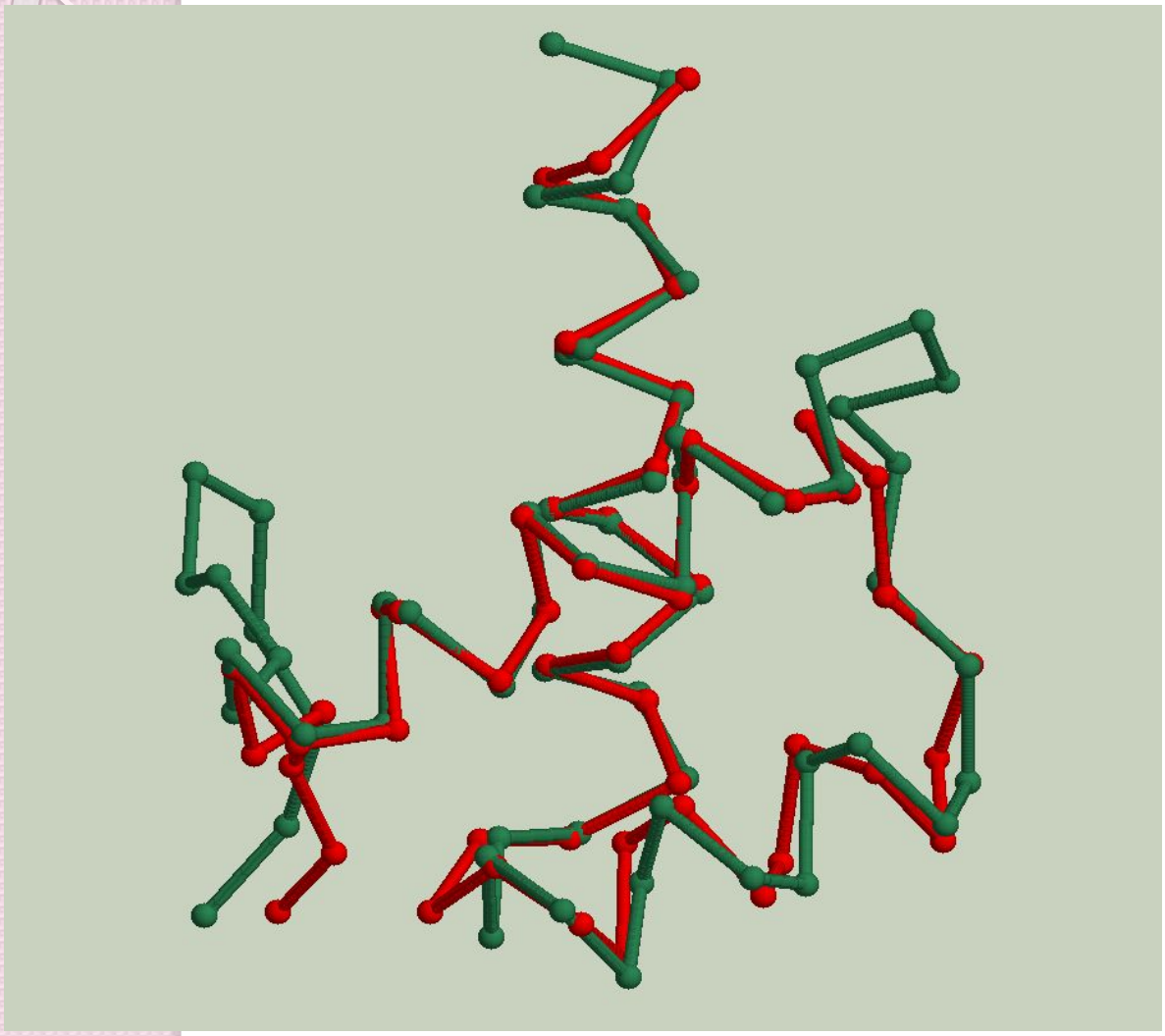
(i)Последовательность – удобный способ закодировать структурную (химическую) формулу молекулы белка (до посттрансляционных модификаций)

(ii) Белок – это большая молекула, сохраняющая в живой клетке постоянную пространственную структуру, т.е.- взаимное расположение ковалентно связанных атомов (конформацию)

(**iii) Последовательность однозначно определяет** в какую пространственную **структуру** свернется белок в клетке

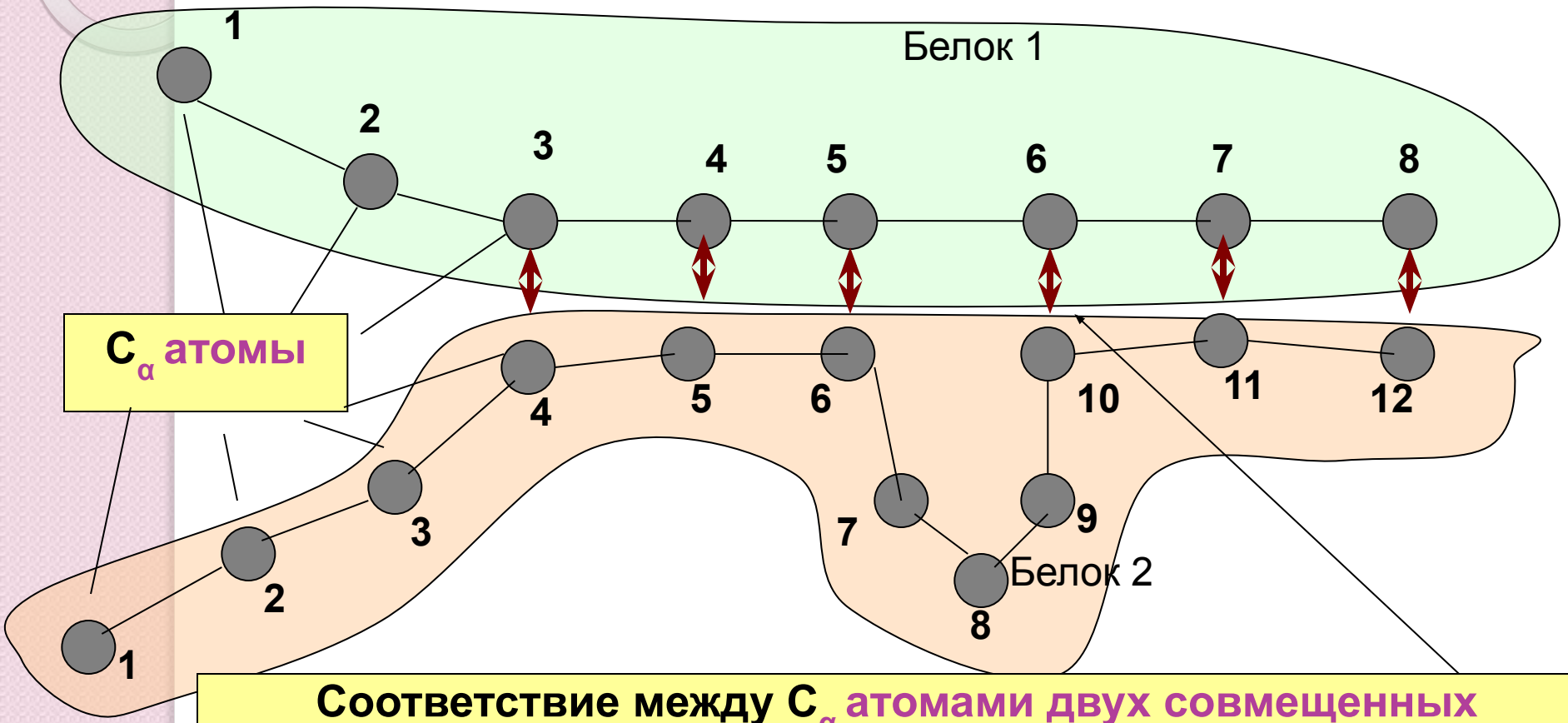
(iv) Функция белка в клетке **проявляется** только при сохранении **уникальной пространственной структуры**

Пространственное совмещение полипептидных цепей белков mta1_yeast и mat2_yeast



На плоской картинке видно плохо ☹

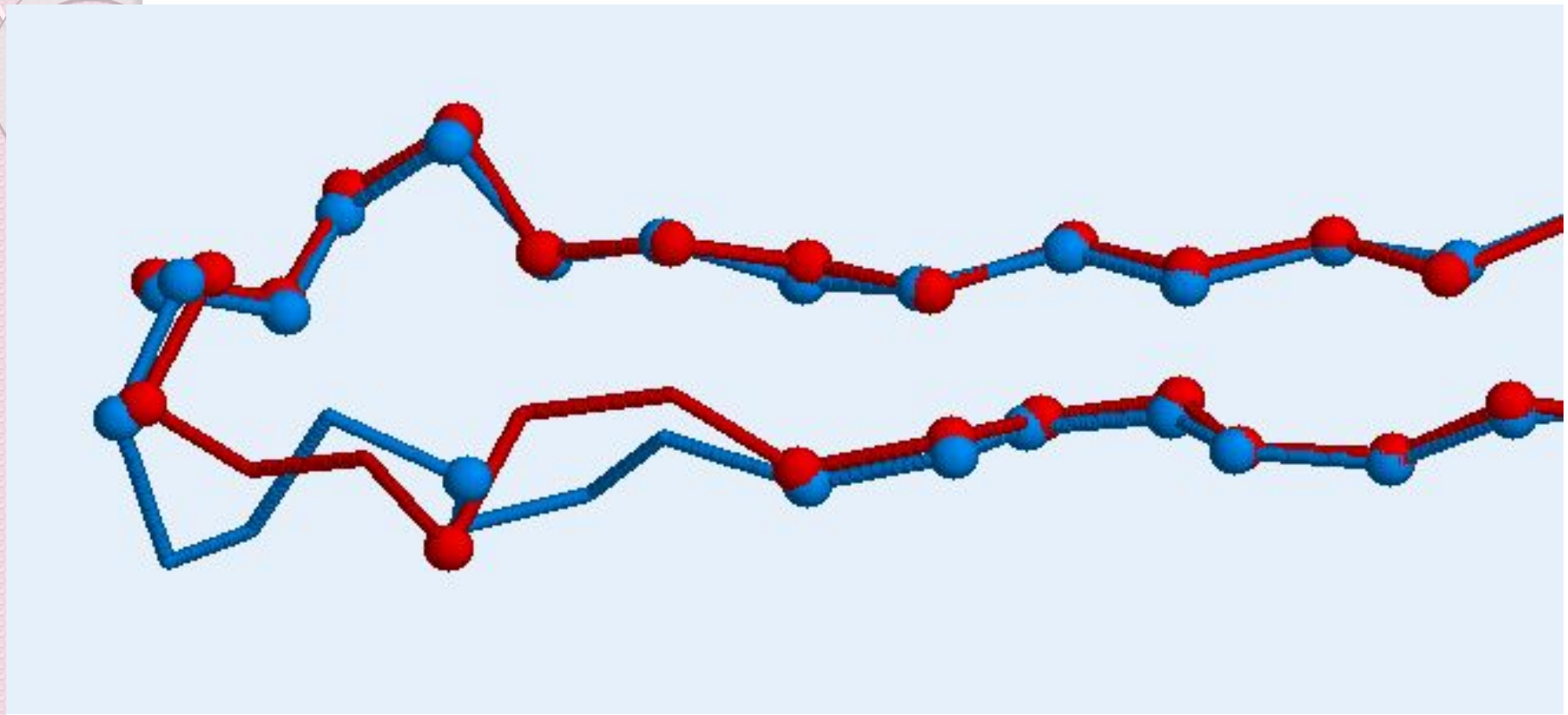
Схематическое изображение совмещенных структур



Соответствие между C_α атомами двух совмещенных структур,
основанное на близости в пространстве

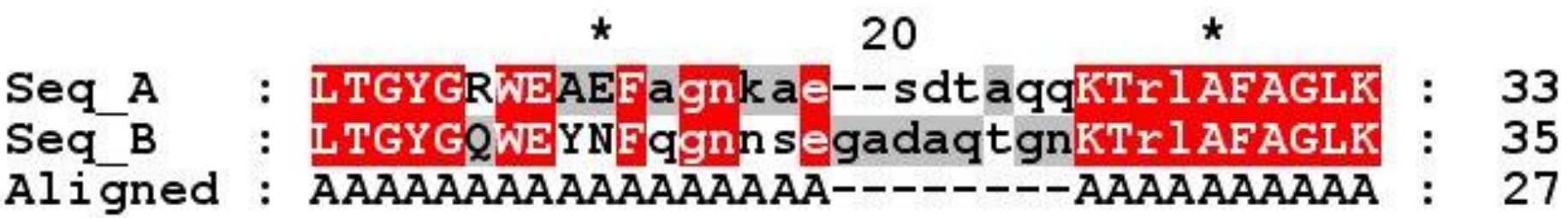
Другой способ отобразить совмещение полипептидных цепей называется структурным выравниванием последовательностей

Совмещение структур и выравнивание последовательностей

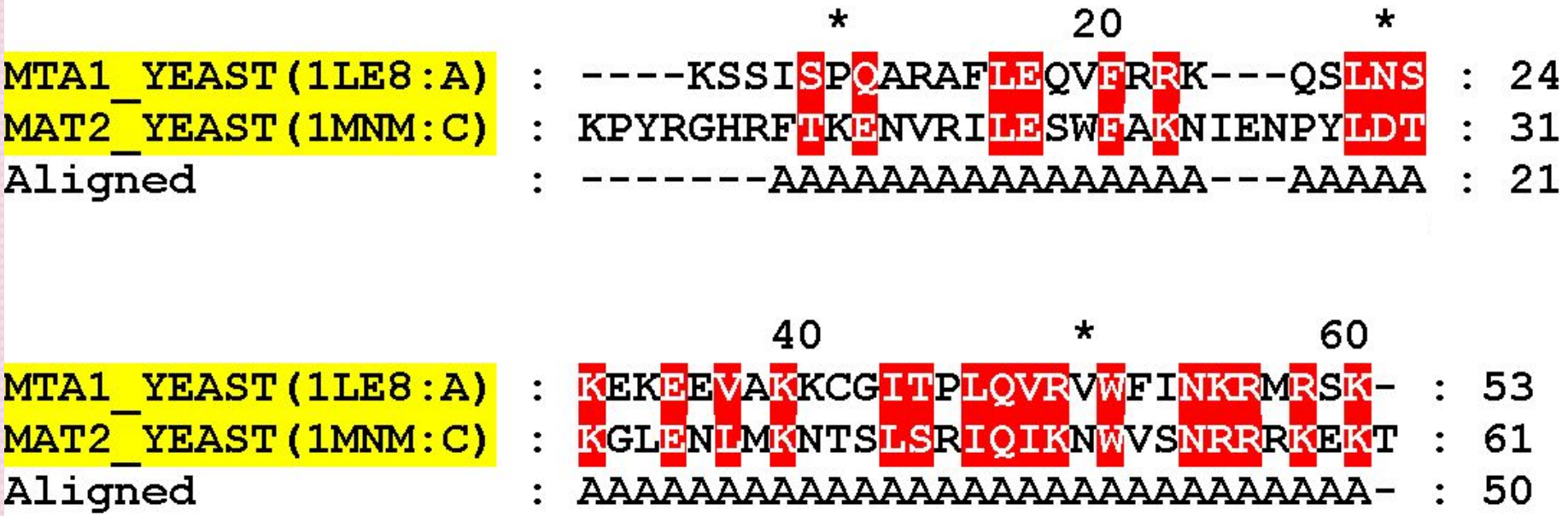


```
                          *          20          *
Seq_A    :  LTGYGRWEAEFagnkae--sdtaqqKTrlAFAGLK  :  33
Seq_B    :  LTGYGQWEYNFqgnnsegadaqtgnKTrlAFAGLK  :  35
Aligned  :  AAAAAAAAAAAAAAAAA--------AAAAAAAAAA  :  27
```

Еще раз: разметка по совмещенным структурам

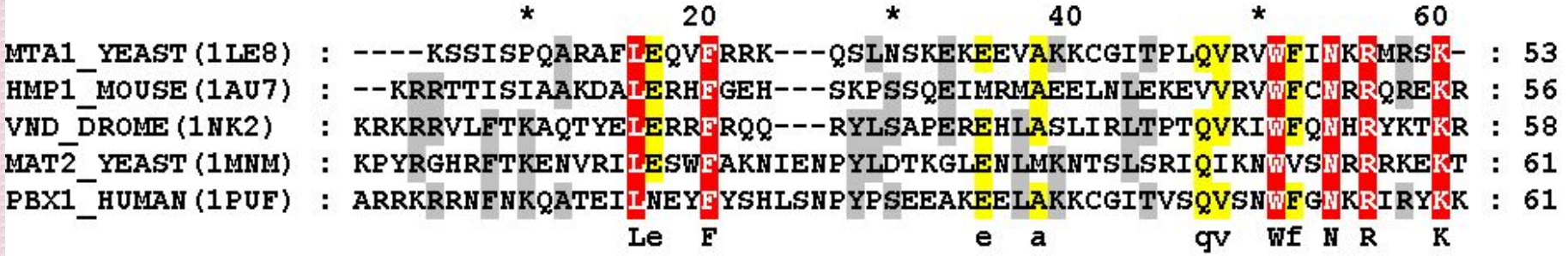


Биологически обоснованное выравнивание гомеодоменов

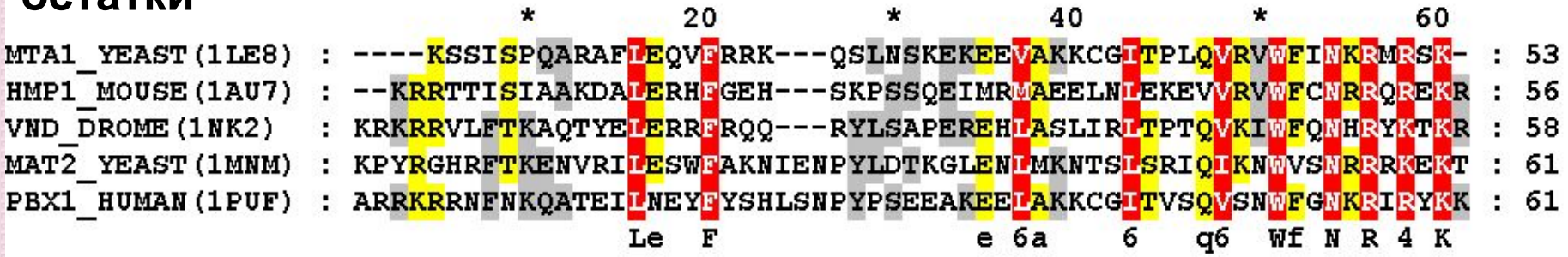


Совмещение 5-и гомеодоменов

Множественное выравнивание гомеодоменов

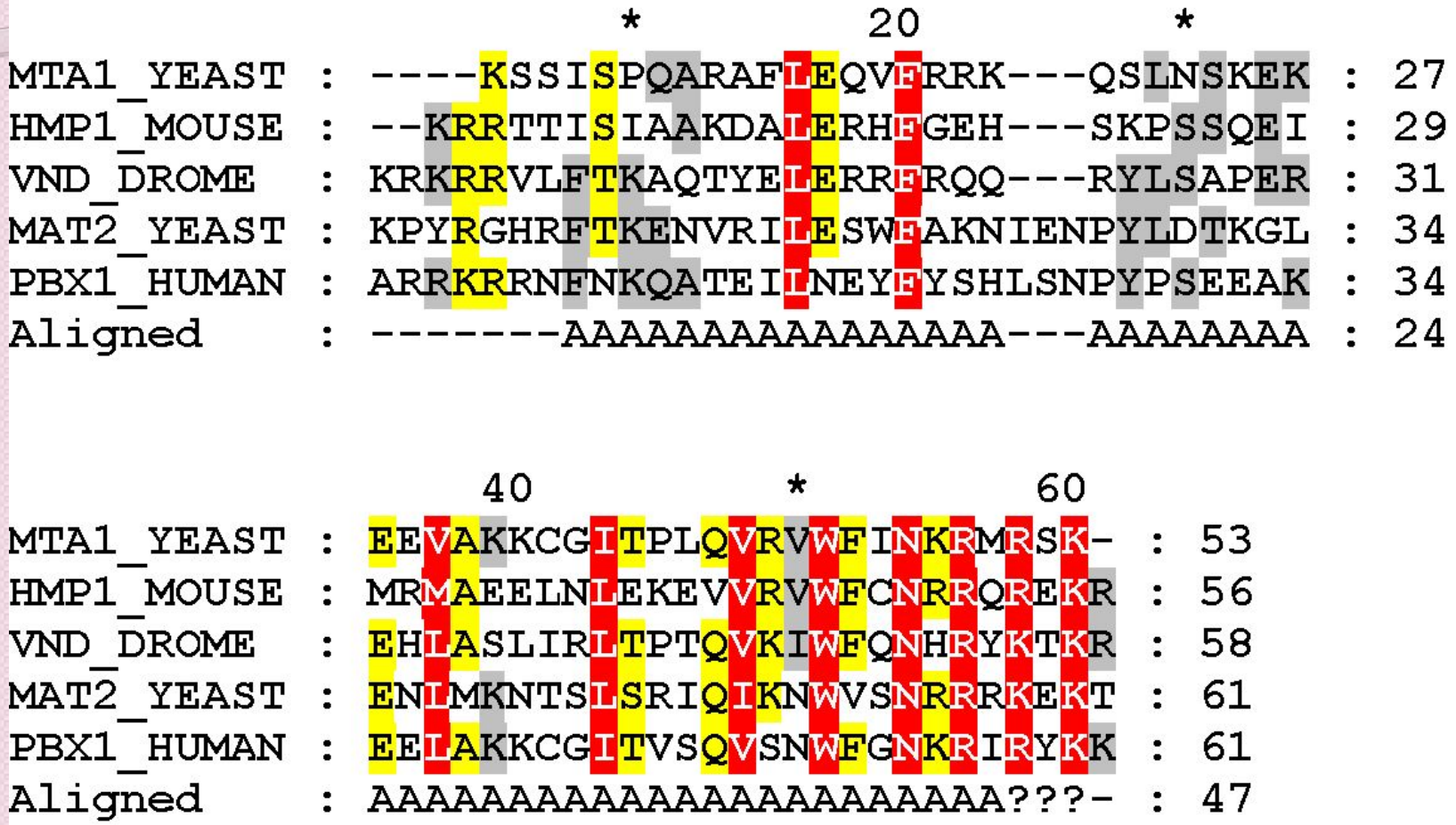


Красным выделены консервативные (одинаковые у всех) остатки;
желтым – на 80% консервативные (одинаковые почти у всех) остатки

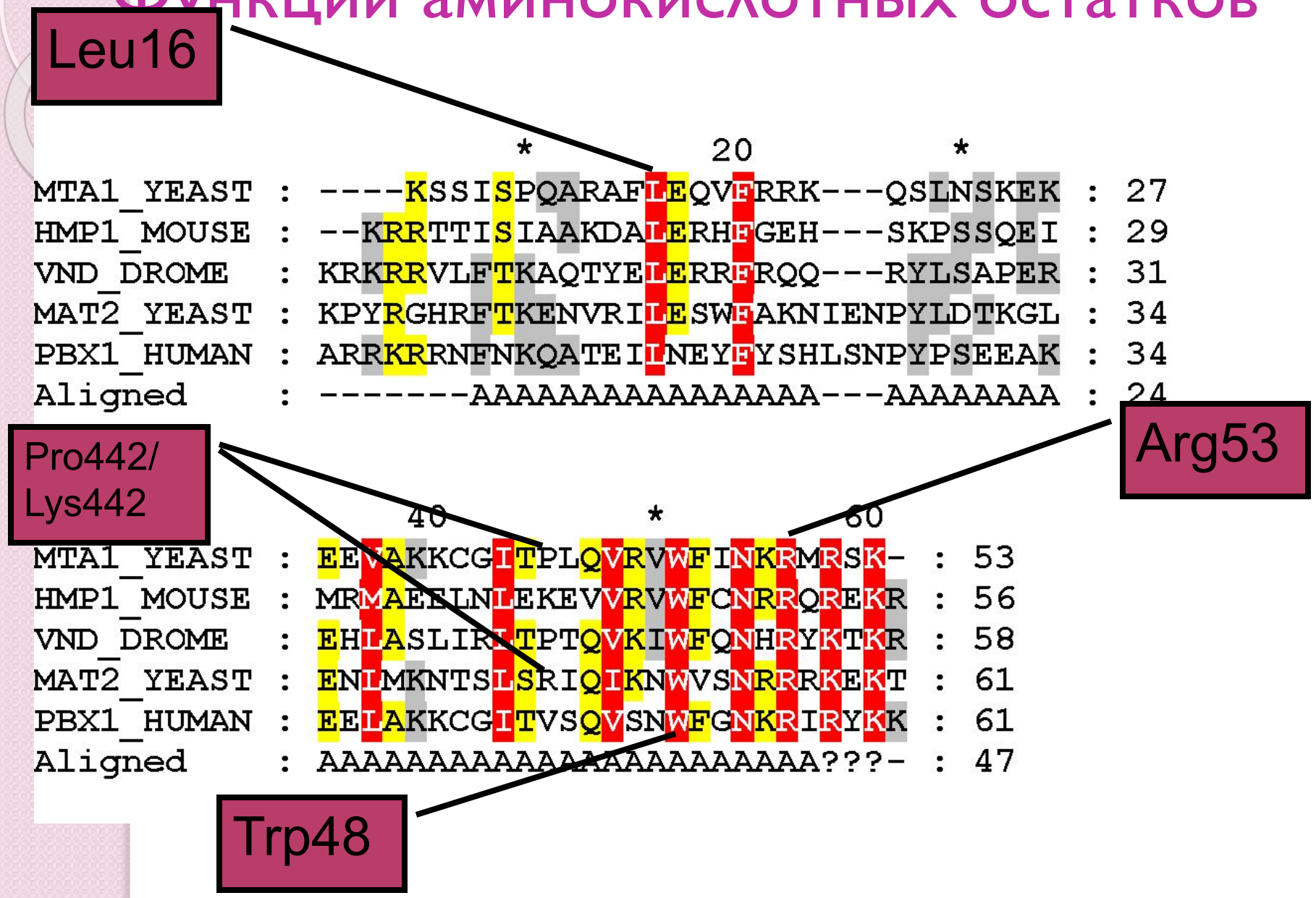


Красным выделены консервативные и функционально консервативные остатки

Размеченное множественное выравнивание



Функции аминокислотных остатков



В “правильном” выравнивании много консервативных аминокислотных остатков и функционально консервативных позиций

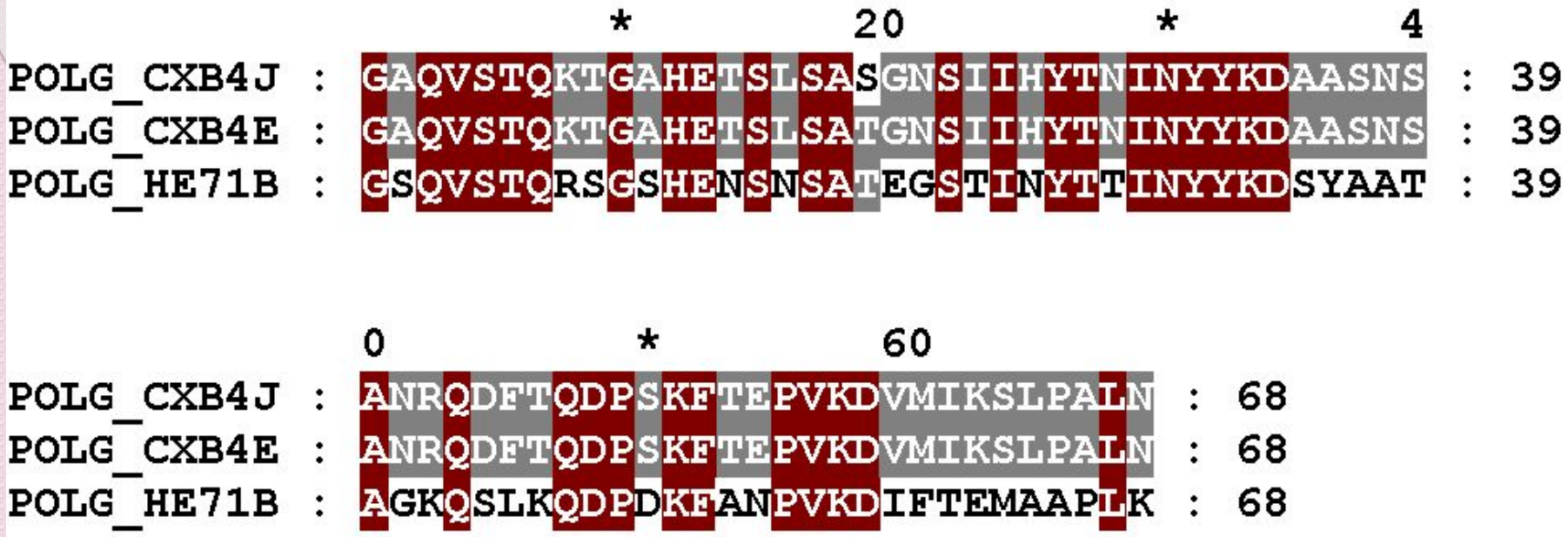
Выравнивание и эволюция

```
                          *         20          *          4
POLG_CXB4J  :  GAQVSTQKTGAHETSLSASGNSIIHYTNINYYKDAASNS  :  39
POLG_CXB4E  :  GAQVSTQKTGAHETSLSATGNSIIHYTNINYYKDAASNS  :  39

               0          *         60
POLG_CXB4J  :  ANRQDFTQDPSKFTEPVKDVMIKSLPALN  :  68
POLG_CXB4E  :  ANRQDFTQDPSKFTEPVKDVMIKSLPALN  :  68
```

Последовательности белка оболочки из двух штаммов вируса Коксаки

..



Последовательности белка оболочки из двух штаммов вируса Коксаки и энтеровируса человека

Аминокислотные остатки в одной колонке биологически обоснованного выравнивания, как правило, "произошли" из одного и того же остатка - их общего предка

Алгоритмические решения проблемы воплощены в программах

Программы выравнивания последовательностей тестируются путем сравнения с биологически обоснованными – построенными по совмещению структур – выравниваниями

Существуют базы данных структурных выравниваний последовательностей (BAliBAse и др.)

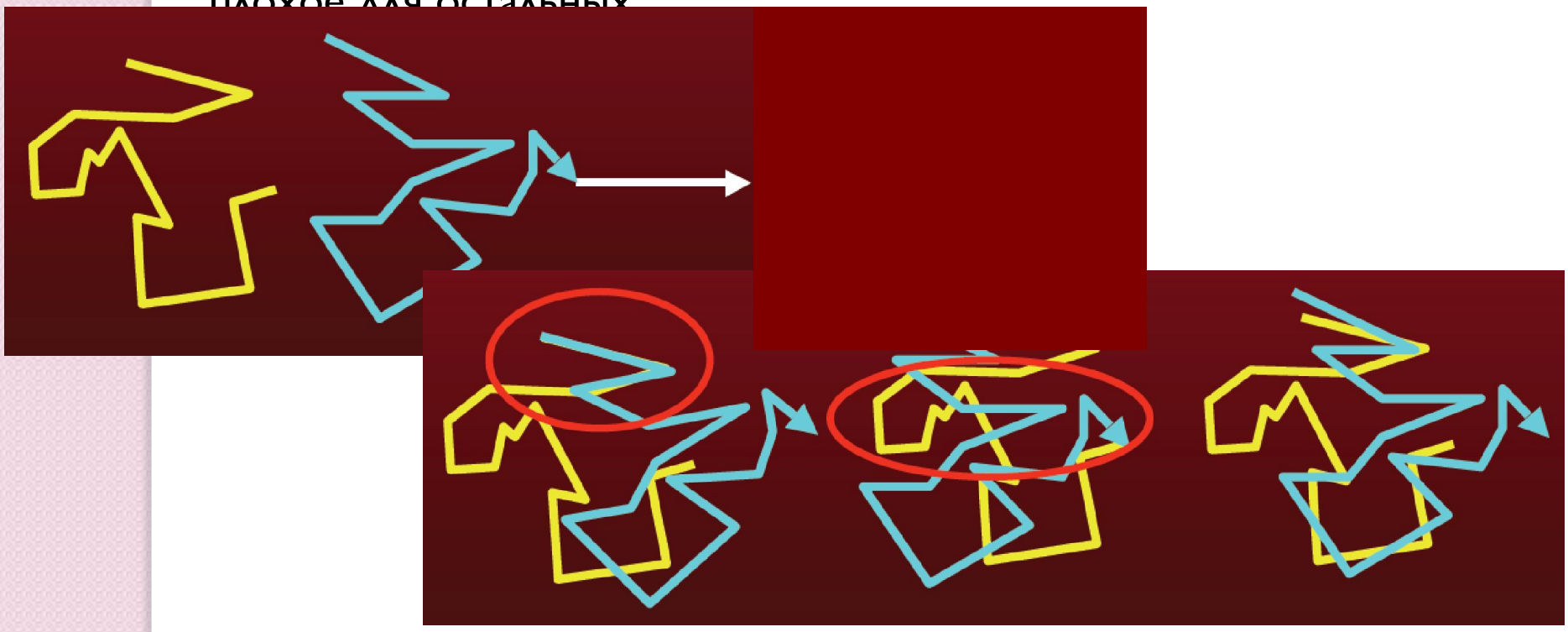
Предположим, известны структуры родственных белков и, значит, *биологически обоснованное выравнивание последовательностей*

- При > 60% совпадающих букв любая современная программа даст *(почти)* правильный результат
- При < 20% совпадающих букв (такие примеры существуют) ни одна программа не даст правильного выравнивания
- Между 20% и 60% , обычно, результат программы частично правилен

- Применения
  - «золотой стандарт» для выравнивания высоко гомологичных белков – выявление общего предка
  - идентификация общих значимых элементов структуры для негомологичных белков
  - кластеризация белков (разбиение на белковые семейства) на основе структурной близости
- Выравнивание должно отражать сходство структур
  - совпадение общих структурных и функциональных элементов
- Проблема: оптимум в вычислениях
  ≠
  оптимуму в биологии

Структурное выравнивание: постановка задачи

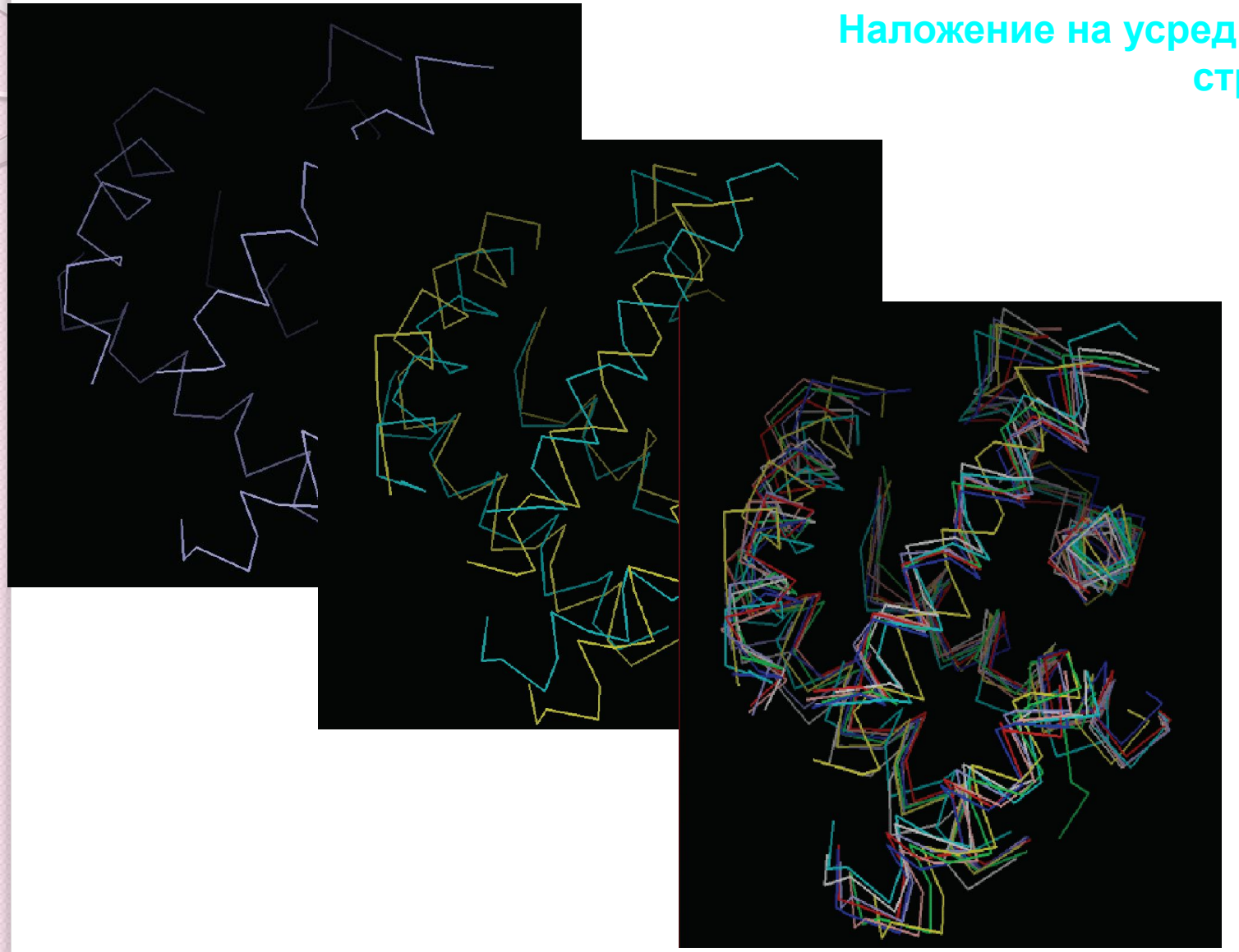
- Для двух пространственных структур найти соответствие между атомами, обеспечивающее наилучшее «выравнивание»
  - для большинства атомов достигается минимум с.к.о.
  - **проблема:** «идеальное» выравнивание для нескольких атомов и плохое для остальных



Структурное выравнивание: оценка результата

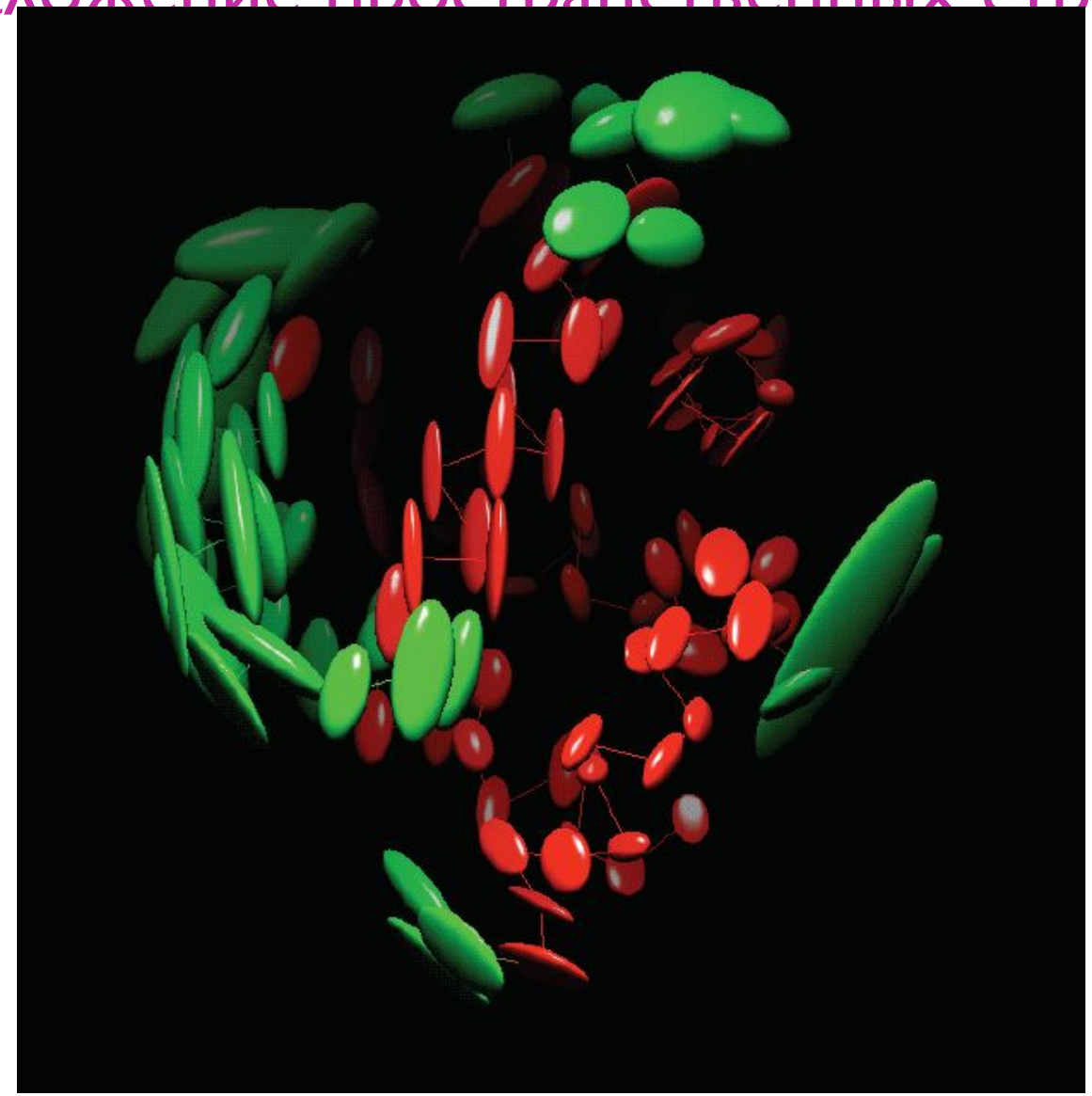
- Критерии
  - число соответствий между АК
  - суммарное евклидово расстояние между выровненными АК
  - доля идентичных АК среди выровненных
  - число введенных делеций
  - размер сравниваемых белков
  - консерватизм окружения известных активных центров
- **Универсальных критериев не существует**
- !! Замечание
  - отличие от поиска минимума евклидова расстояния при известном соответствии атомов
  - с.к.о. используется только в качестве метрики

Структурное выравнивание: наложение пространственных структур

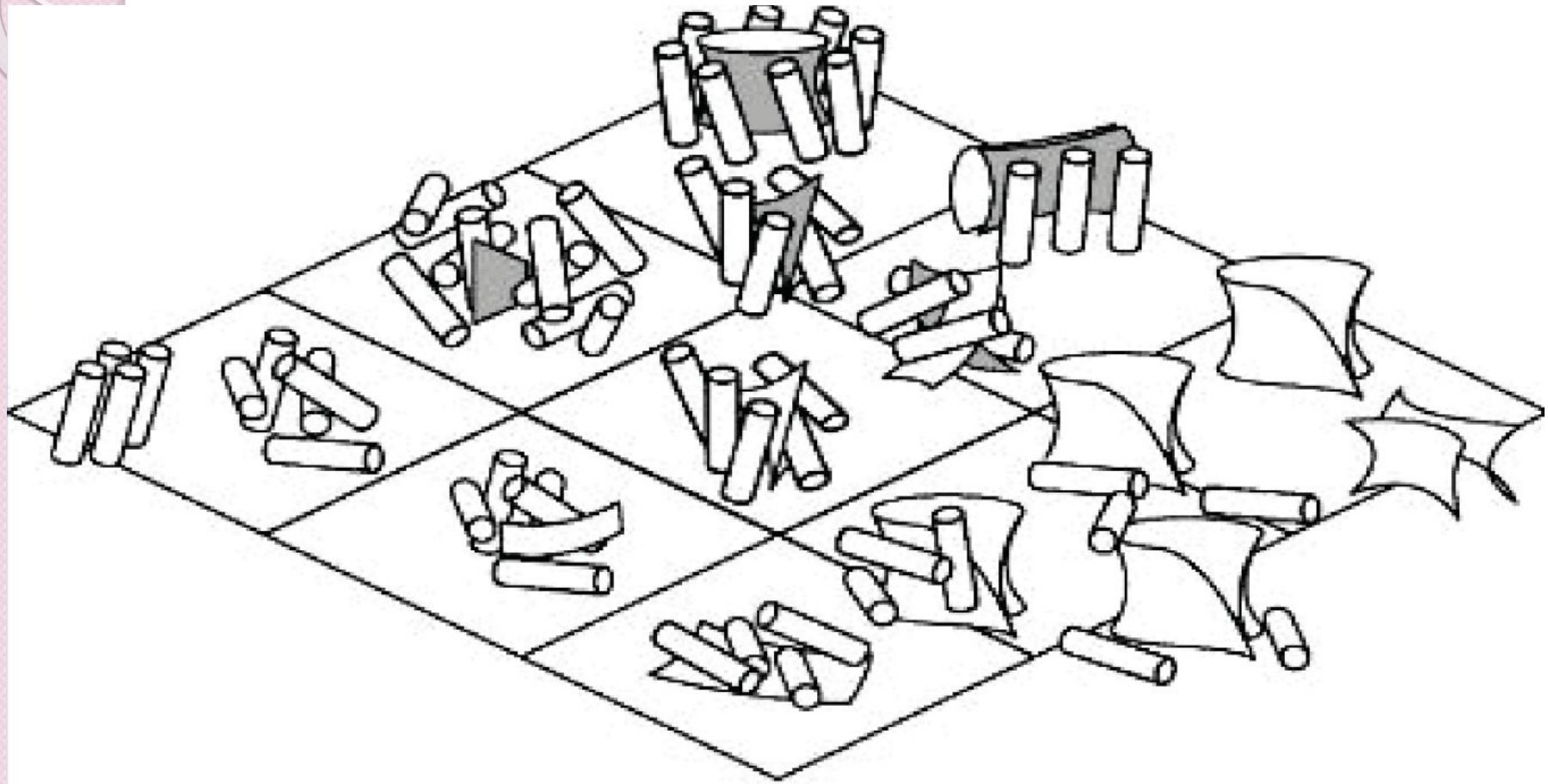


Наложение на усредненную структуру

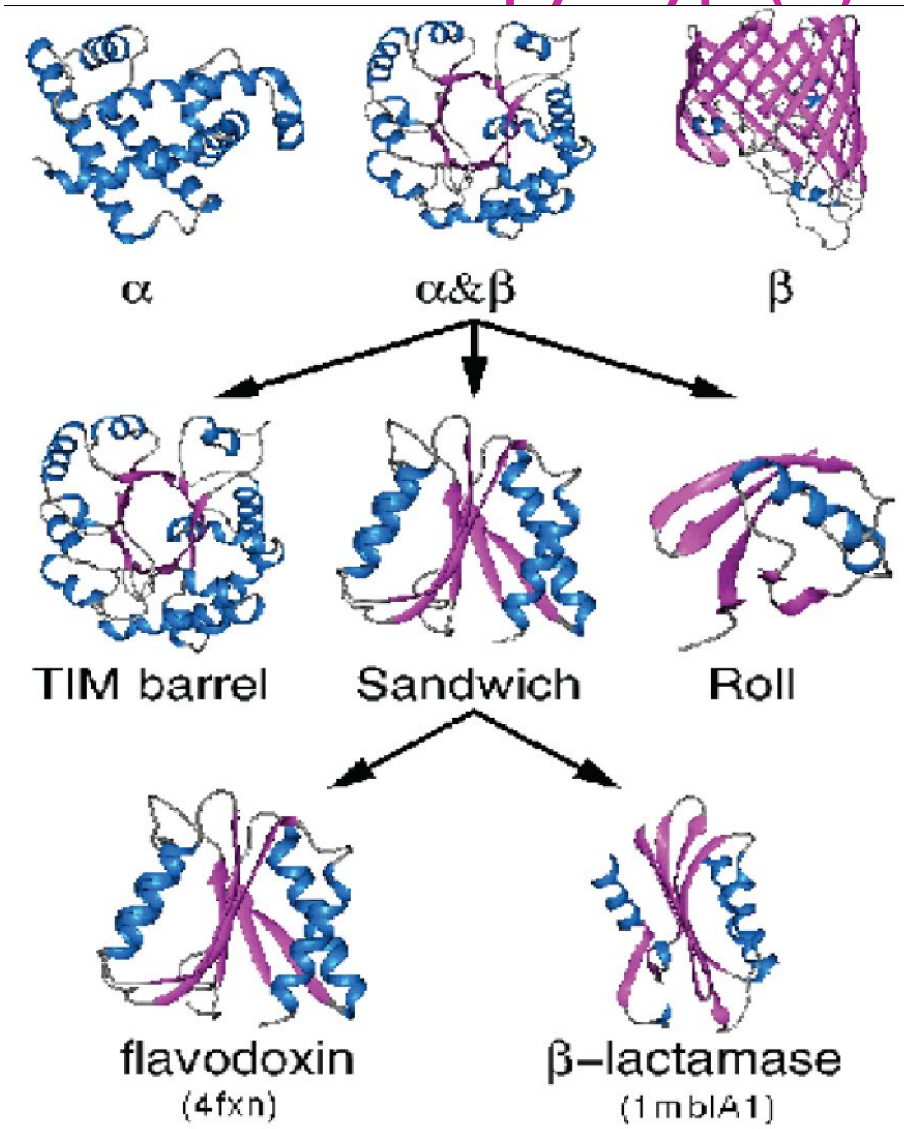
Структурное выравнивание: наложение пространственных структур



Структурное выравнивание: различные классы белковых структур (1)

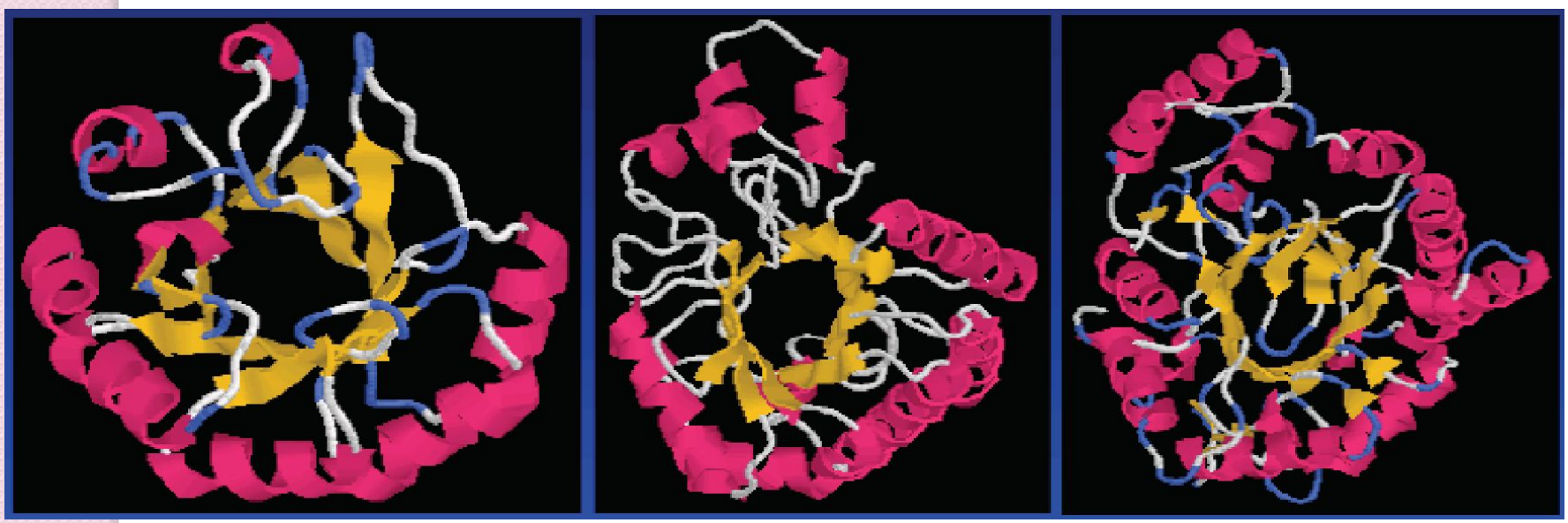


Структурное выравнивание: различные классы белковых структур (2)



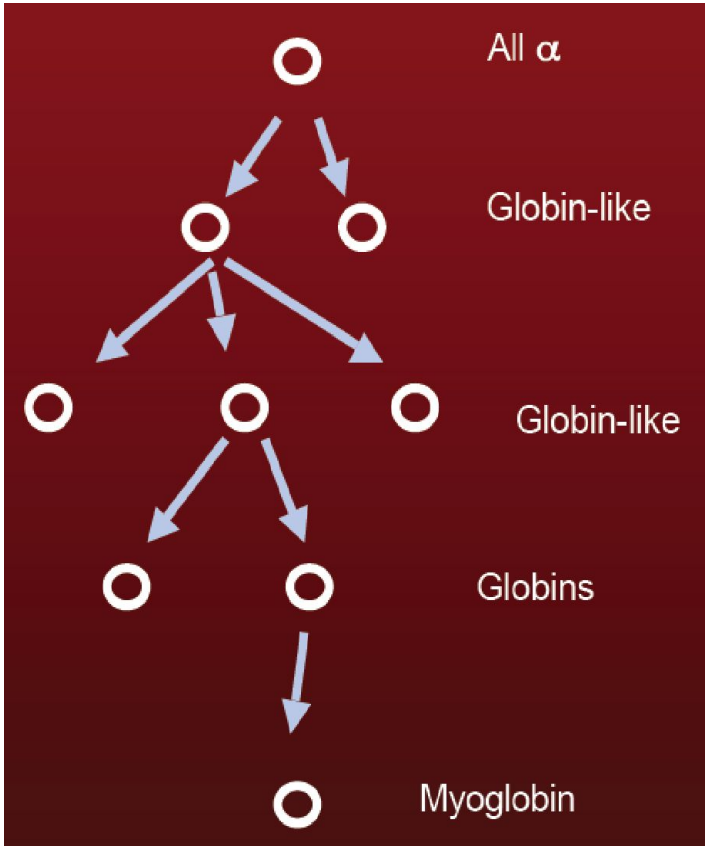
Структурное выравнивание: различные классы белковых структур (3)

Разные суперсемейства «бочонков»



Поиск структурного выравнивания «вручную»

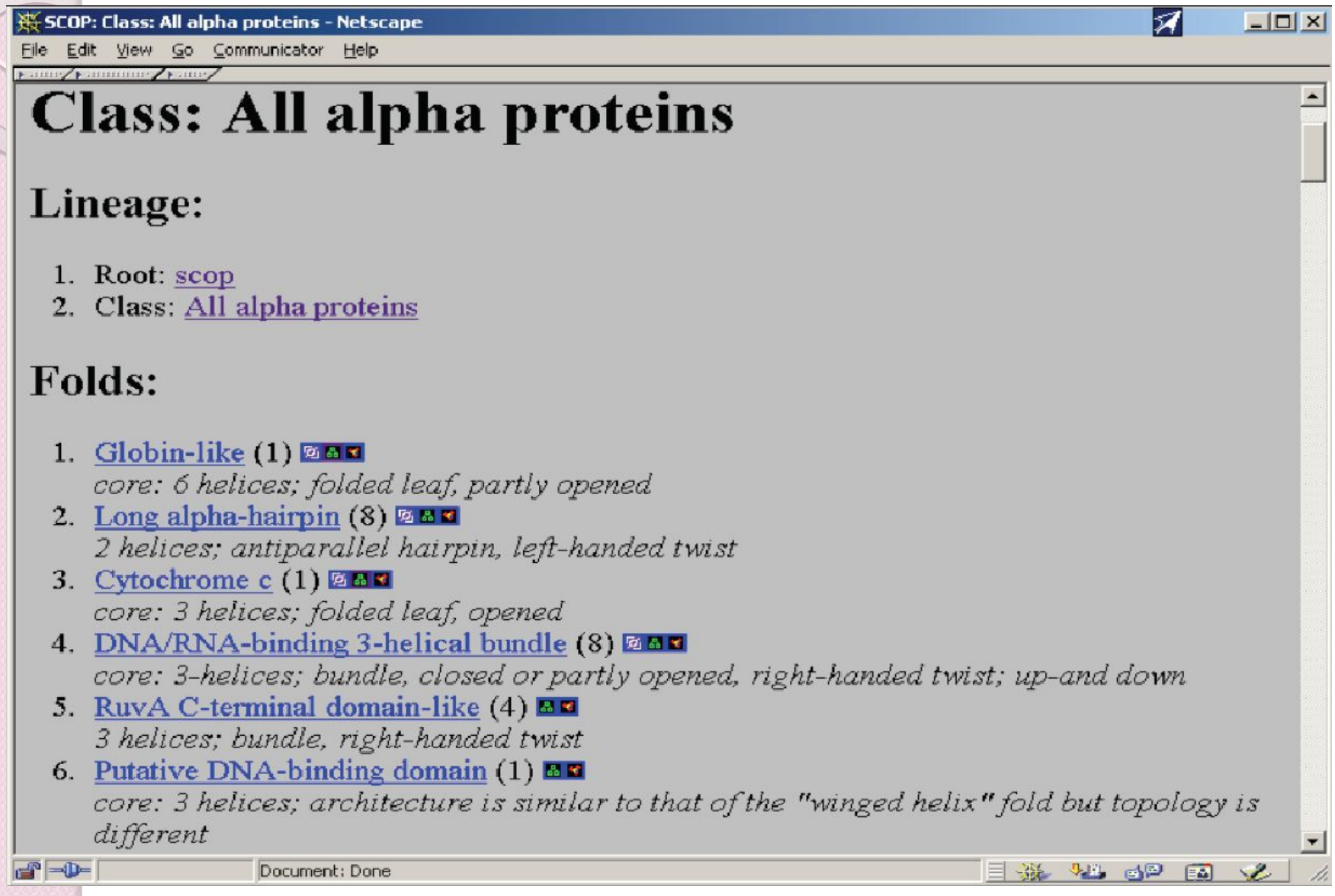
- Класс
  - похожие вторич. структуры
  - все α, все β, α + β, α/β
- Слой (fold)
  - значительное структурное сходство
  - сходная организация вторичной структуры
- Суперсемейство (топология)
  - предположительный общий предок



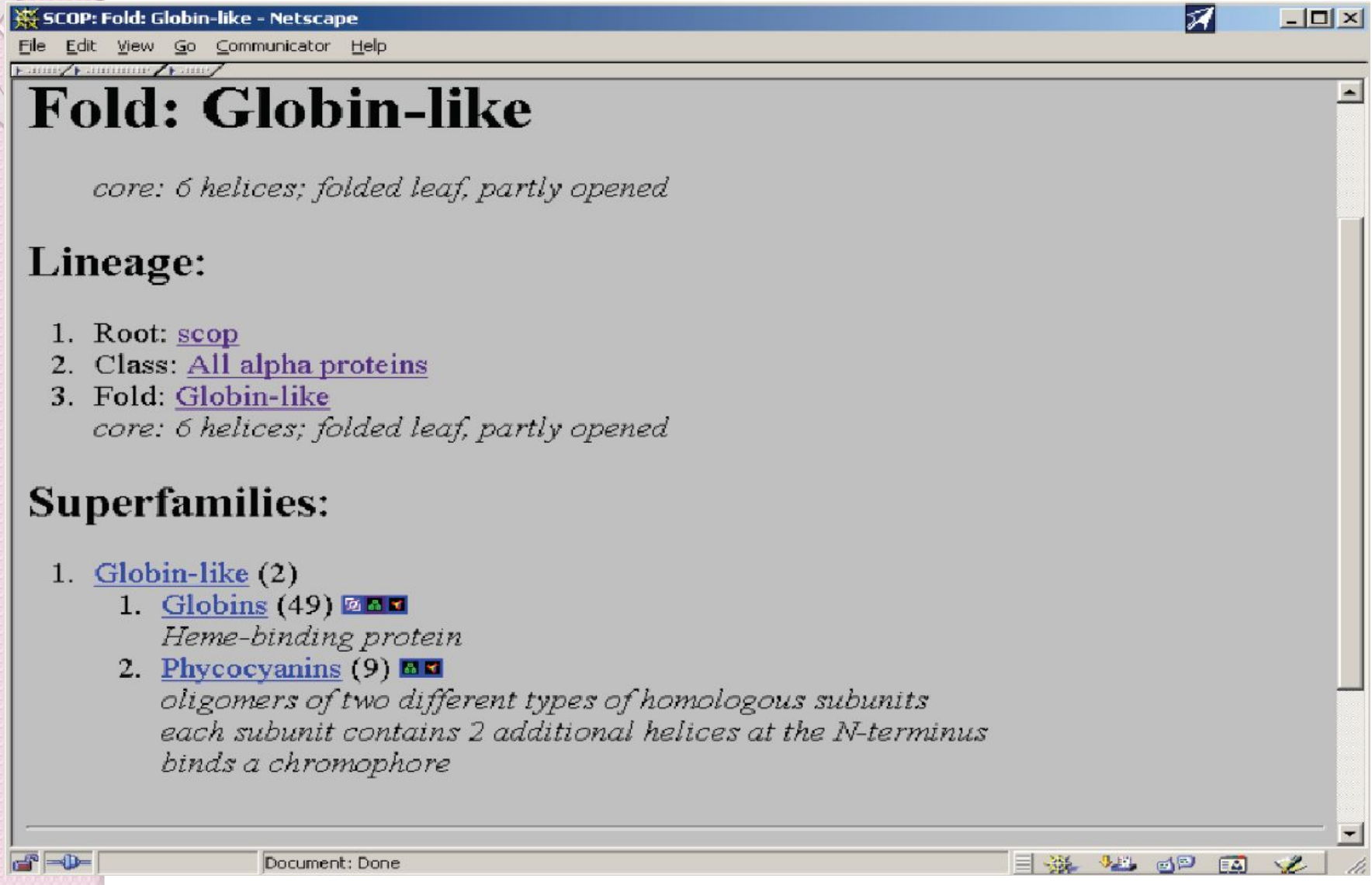
- Семейство
  - очевидные эволюционные отношения
  - гомологичность последовательностей > 25%
- Конкретный белок

Пример инструментария: Structural Classification Of Proteins (SCOP)

Пример инструментария: SCOP (прод.)



Пример инструментария: SCOP (прод.)



Пример инструментария: SCOP (прод.)

http://scop.stanford.edu

http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/

Как распознать близость структур?

- На глаз
- Алгоритмически
  - точечные методы: установление соответствий по точечным свойствам (расстояниям)
  - анализ вторичной структуры: установление соответствий по векторам, изображающим элементы вторичной структуры
- Четыре метода, оперирующих прототипами
  - **STRUCTAL** (Levitt, Subbiah, Gerstein)
  - **DALI** (Holm, Sander)
  - **LOCK** (Singh, Brutlag)

Структурное выравнивание при помощи прототипов: STRUCTAL

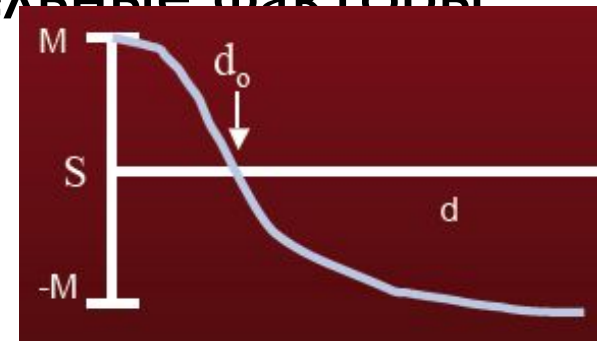
- Итерационное динамическое программирование для улучшения случайно выбранного начального выравнивания
- Шаги алгоритма

1) начать с произвольного **набора соответствий** между двумя структурами (выравнивание пос-стей, вторичных структур, на глаз, случайное)
2) **выровнять две структуры**, исходя из текущего набора соответствий
3) построить **матрицу весов** (Нидлмана-Вунша), исходя из расстояний между всевозможными парами точек
4) **ДП**: обратное движение по матрице весов для нахождения выравнивания с наибольшим суммарным весом
5) повторение шагов 2-4, пока суммарный вес не перестанет меняться

- Метод эвристический, не гарантирует результата, зависит от выбора начального выравнивания

Структурное выравнивание при помощи прототипов: STRUCTAL (прод.)

- Оценка выравнивания: чем лучше выравнивание, тем выше суммарный вес
  - возможность учесть дополнительные факторы
- Вес

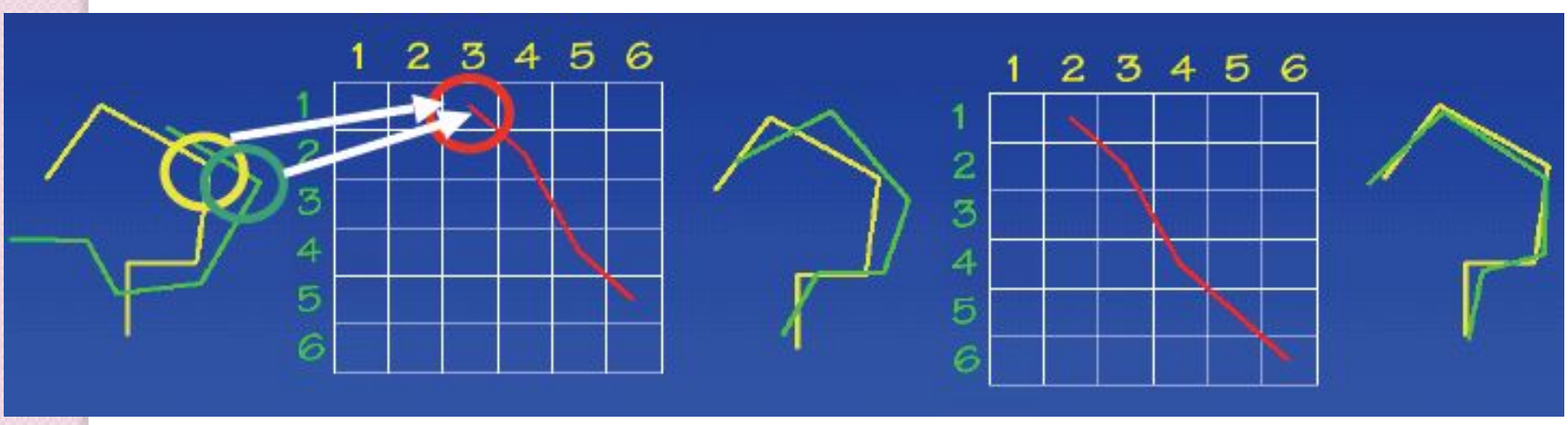


$$S(d) = M\{ 2 / [1 + (d/d_0)^2] - 1\}$$

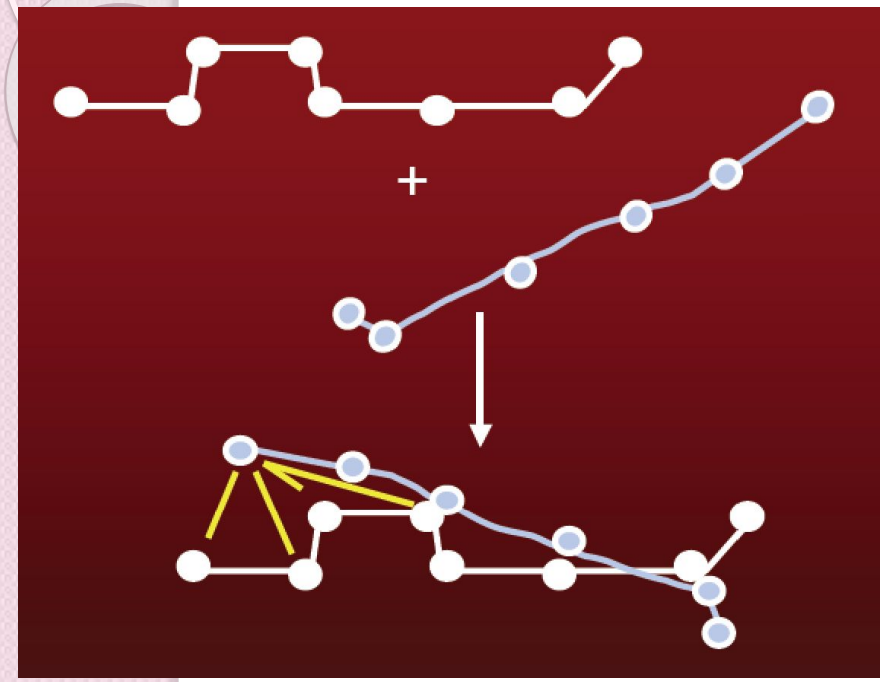
где M – максимальный ожидаемый вес, d – измеряемая величина (e.g. расстояние между точками), d_0 – значение d, соответствующее $M = 0$

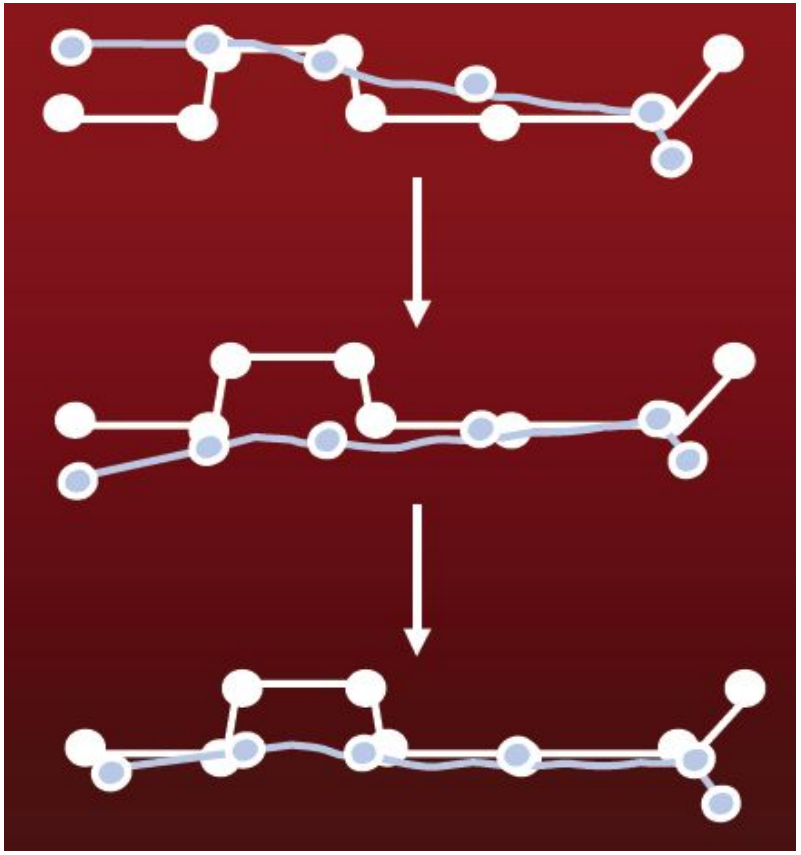
Структурное выравнивание при помощи прототипов: STRUCTAL (прод.)

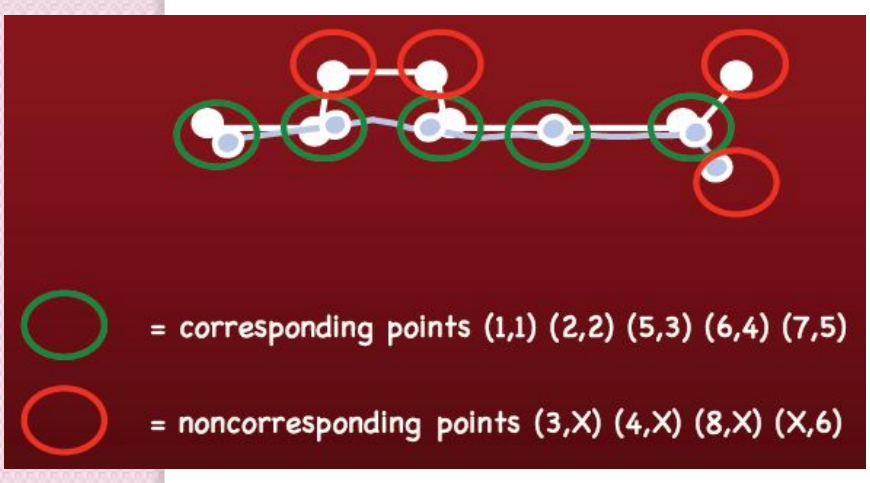
Итерационное динамическое программирование



Структурное выравнивание при помощи прототипов: STRUCTAL (прод.)

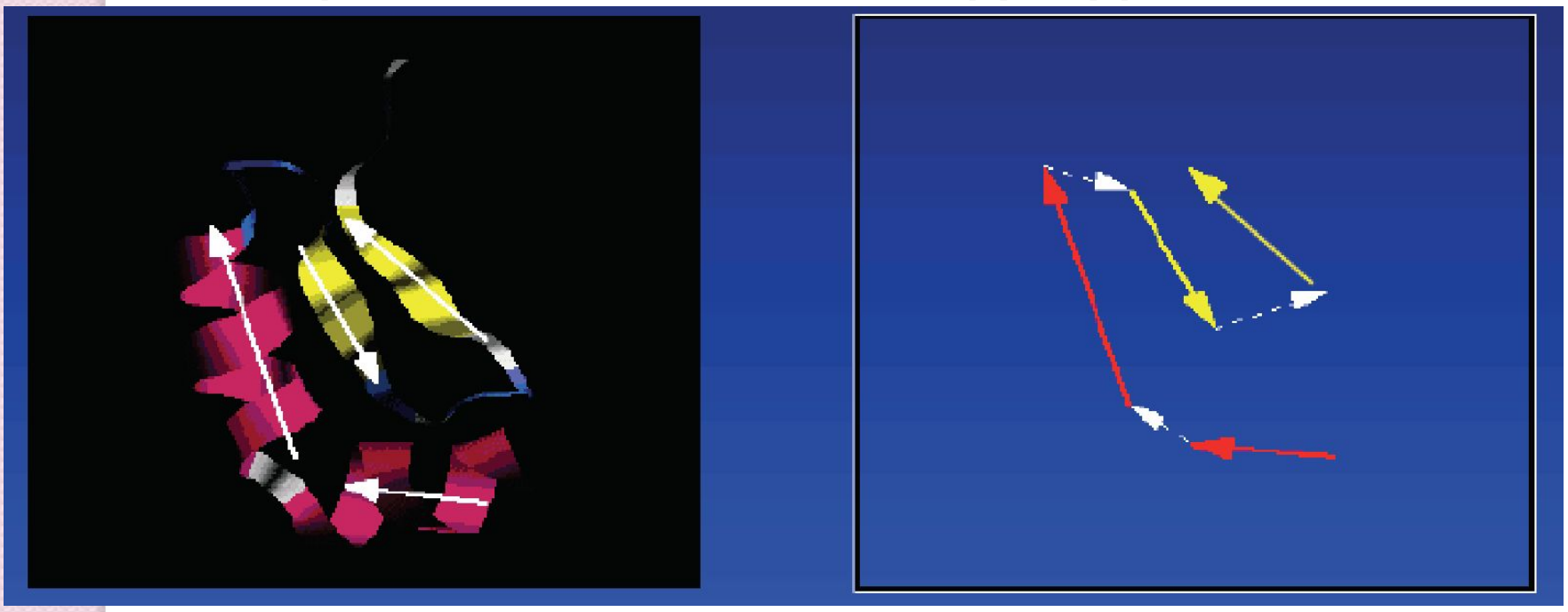






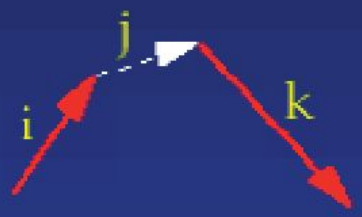
Структурное выравнивание при помощи прототипов: LOCK

- Основная идея:
  - элементы вторичной структуры представляются при помощи векторов
  - быстрый поиск похожих структур



Структурное выравнивание при помощи прототипов: LOCK (прод.)

Сравнение «векторов вторичной структуры»



Orientation Independent Scores:

S = S(|angle(i,k) - angle(p,r)|)

S = S(|distance(i,k) - distance(p,r)|)

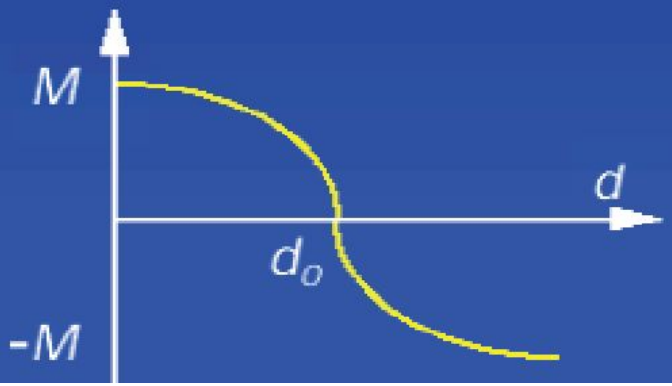
S = S(|length(k) - length(r)|)

Orientation Dependent Scores:

S = S(angle(k,r))

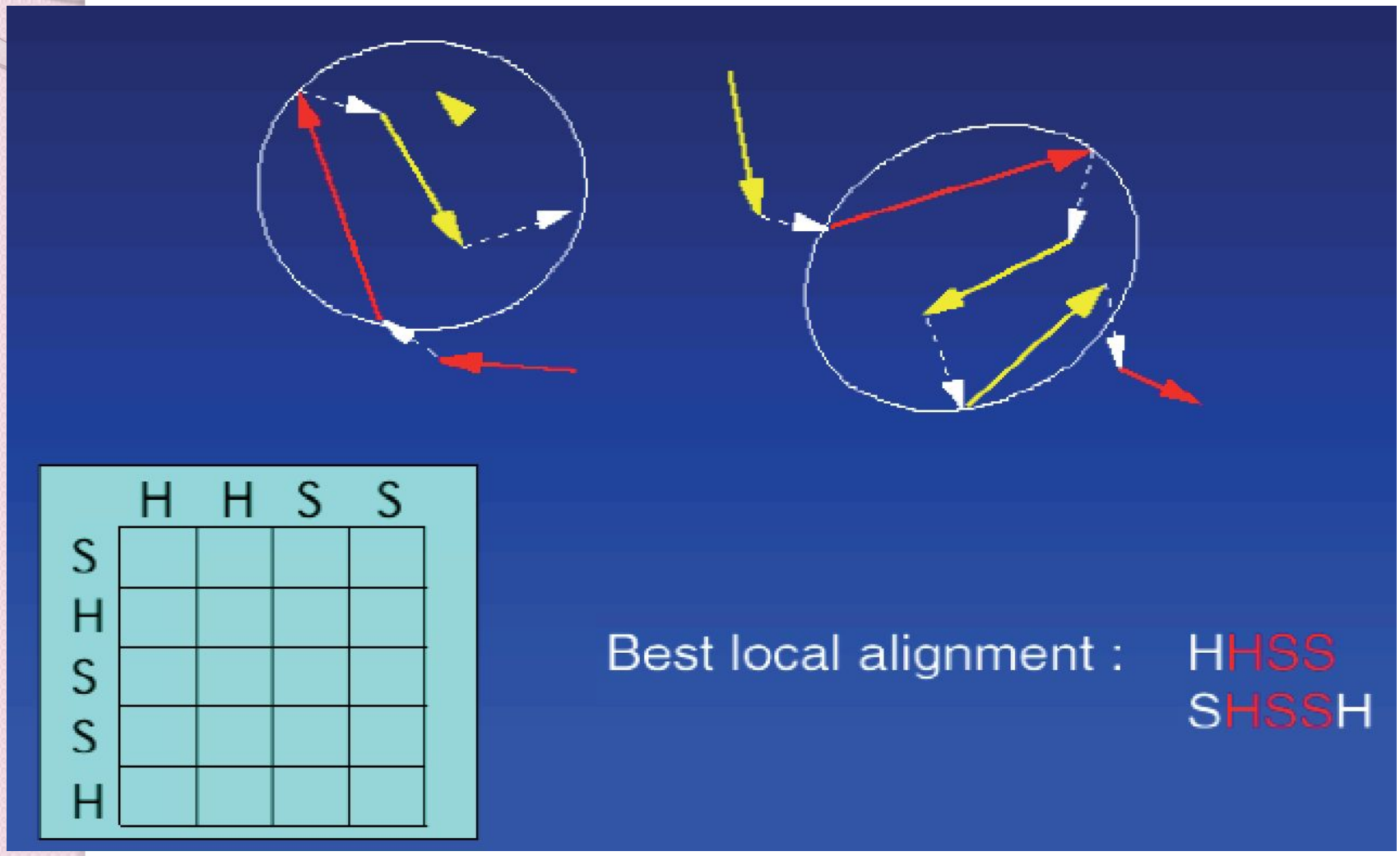
S = S(distance(k,r))

$$S(d) = \left[\frac{2M}{1 + \left[\frac{d}{d_o} \right]^2} - M \right]$$



Структурное выравнивание при помощи прототипов: LOCK (прод.)

Выравнивание «векторов вторичной структуры»

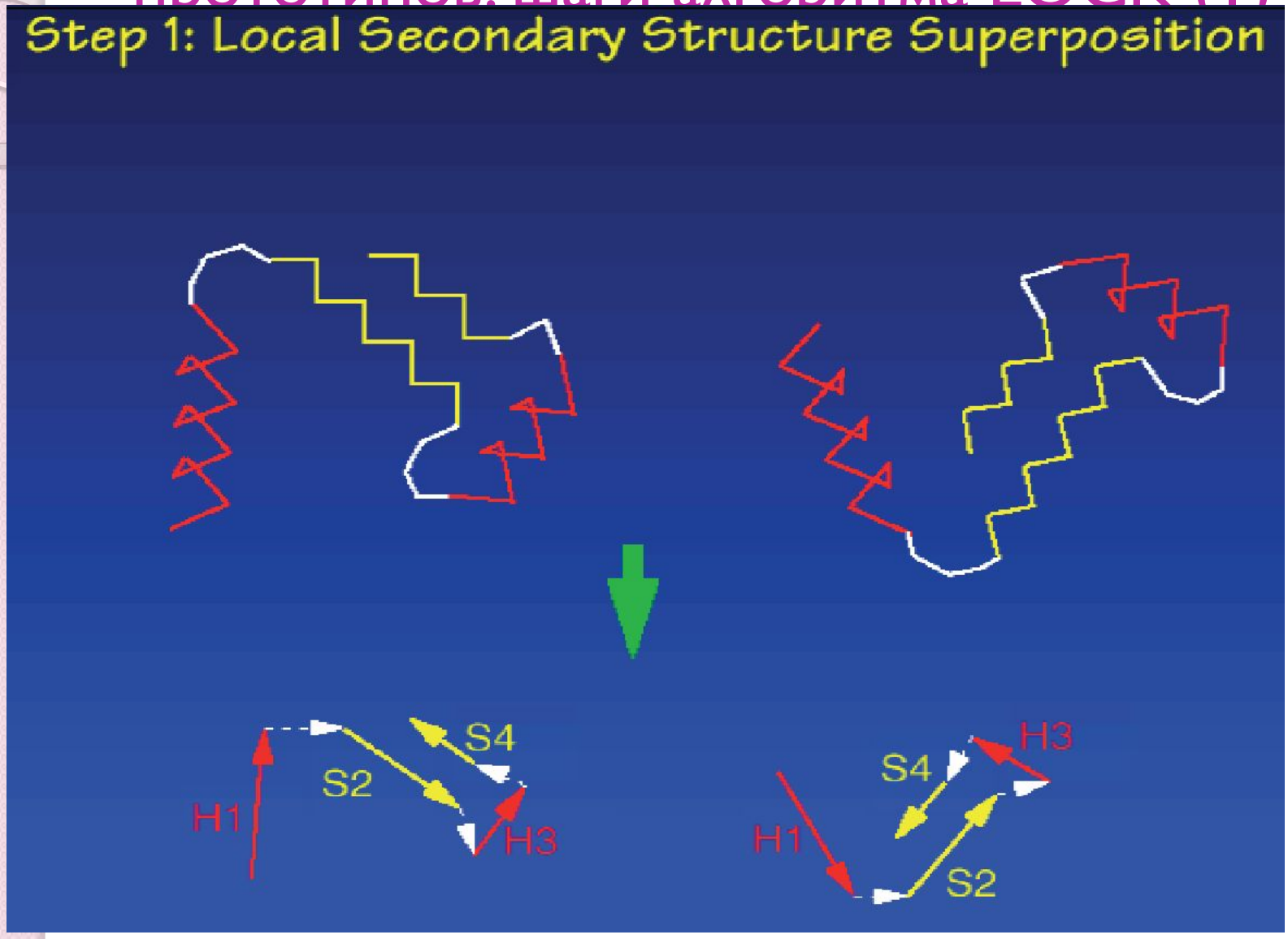


Структурное выравнивание при помощи прототипов: LOCK (прод.)

- Шаги алгоритма

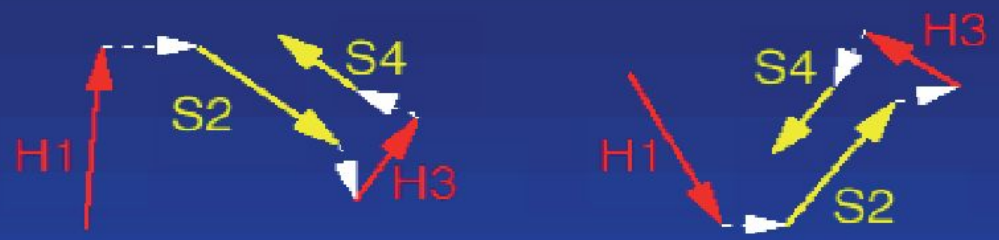
1) определить локальные элементы вторичной структуры
2) построить начальное наложение структур методом ДП, используя
   - выбранную функцию веса
   - векторное представление элементов вторичной структуры
3) определить ближайших соседей, минимизируя евклидовы расстояния
4) удалить лишние атомы, чтобы получить минимальное с.к.о.

Структурное выравнивание при помощи прототипов: шаги алгоритма LOCK (1)



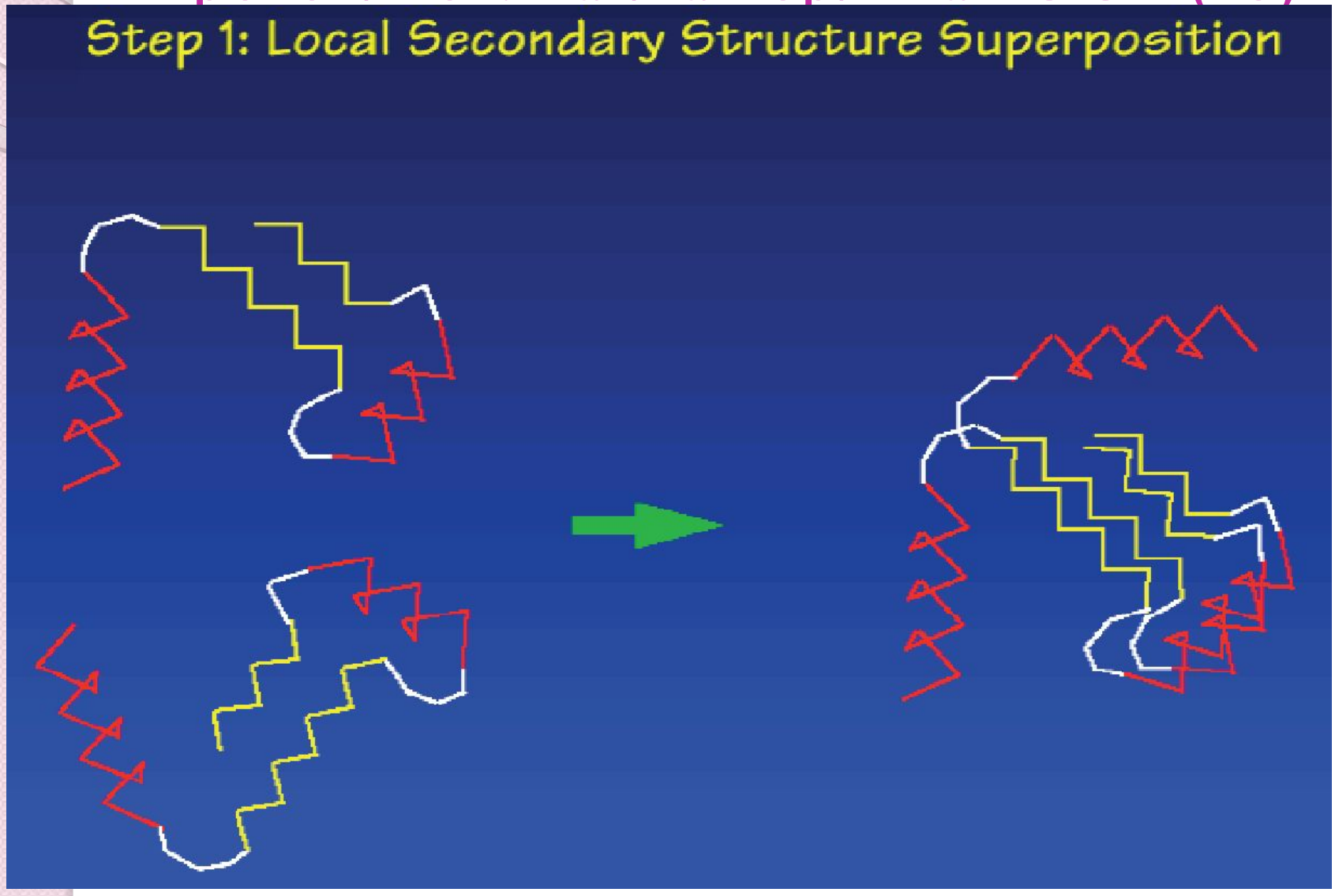
Структурное выравнивание при помощи прототипов: шаги алгоритма LOCK (1a)

Step 1: Local Secondary Structure Superposition

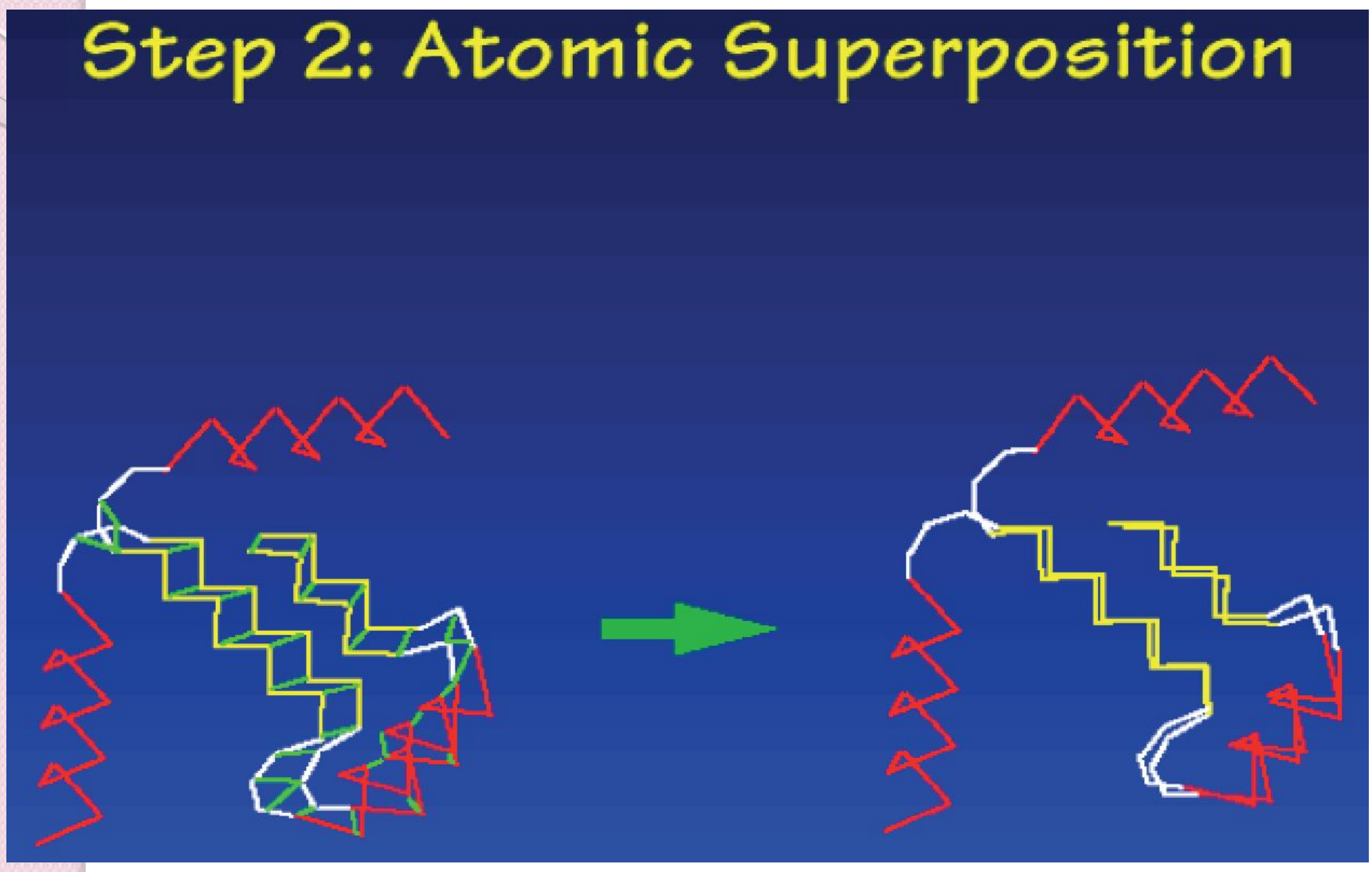


pair	# of aligned vectors	total alignment score
H1,S2	2	27
S2,H3	3	65
H3,S4	3	71
S2,S4	3	68

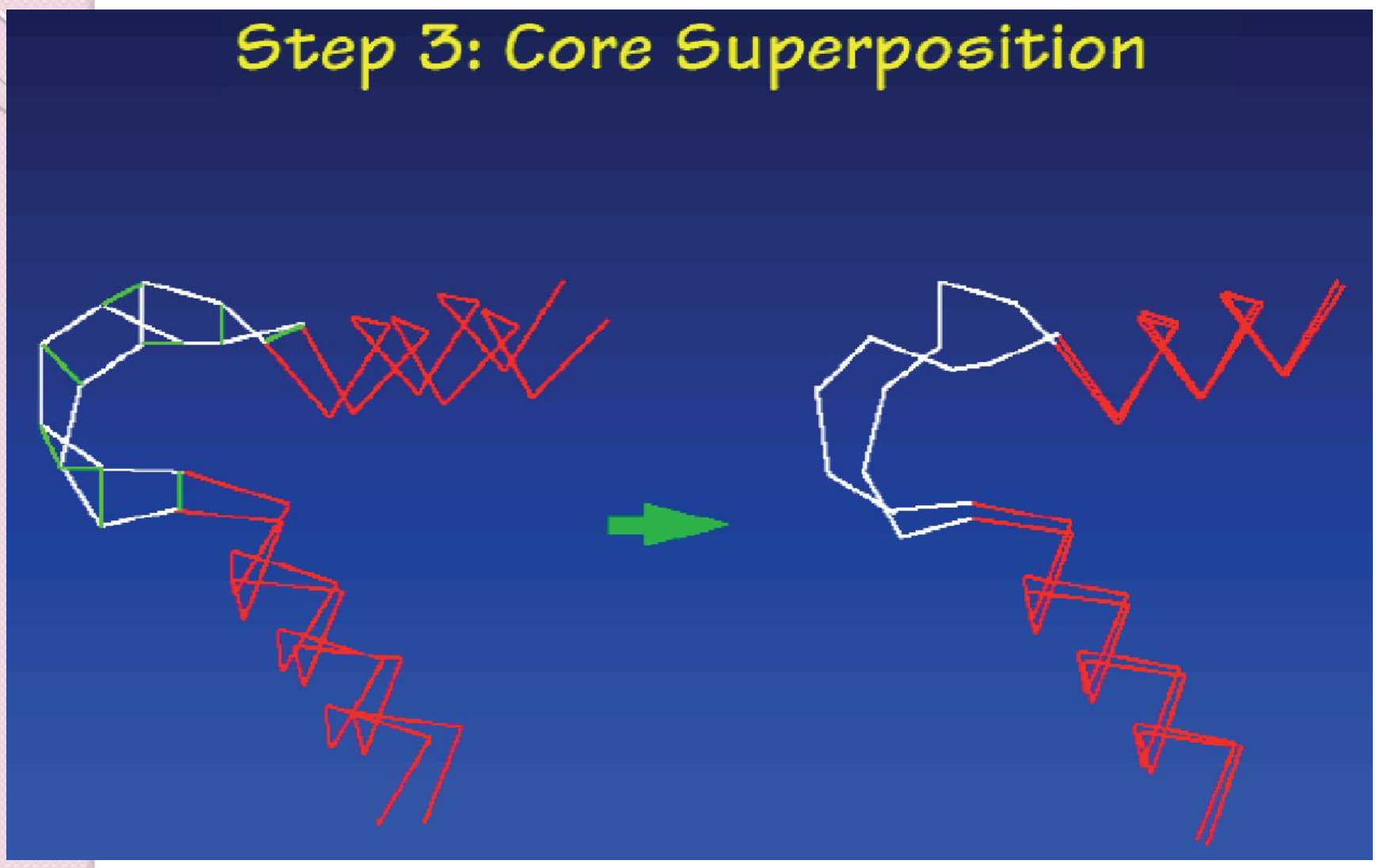
Структурное выравнивание при помощи прототипов: шаги алгоритма LOCK (1b)



Структурное выравнивание при помощи прототипов: шаги алгоритма LOCK (2)



Структурное выравнивание при помощи прототипов: шаги алгоритма LOCK (3)



Структурное выравнивание: «за» и «против»

- «Золотой» стандарт для выравнивания пос-стей
- Трехмерная структура часто неизвестна
- Структурное выравнивание **не всегда** отражает ход эволюции
  - точная последовательность вставок/замен/делеций неизвестна

ПРОБЛЕМА: как построить “правильное” выравнивание последовательностей белков если структуры белков неизвестны?

На сегодня известны:

- более 10 млн(!!!) последовательностей белков (включая фрагменты и трансляты)
- пространственные структуры около 70 тыс. белков

Дякую за увагу
Благодарю за внимание
Thank you for your attention