Alinhamento Múltiplo de Sequências

Zanoni Dias

Instituto de Computação – Unicamp

11 de maio de 2009

Alinhamento Múltiplo de Sequências

- Dadas k sequências $\alpha_1, \alpha_2, \ldots, \alpha_k$ sobre um alfabeto $\mathcal{A}$ com, respectivamente, $n_1, n_2, \ldots, n_k$ caracteres, obter um alinhamento $\alpha = \{\alpha'_1, \alpha'_2, \ldots, \alpha'_k\}$, sobre o alfabeto $\mathcal{A}' = \mathcal{A} \cup \{-\}$, tal que, $|\alpha'_1| = |\alpha'_2| = \ldots = |\alpha'_k| = n$, e α_i possa ser obtida através da remoção de todos os buracos (-) de α'_i (para todo $1 \leq i \leq k$).
- O alinhamento normalmente é representado por uma matriz de dimesões n e k, onde as linhas representam as sequências.
- Uma coluna, por definição, não pode conter apenas buracos.
- Dado um esquema de pontuação para alinhamentos múltiplos, desejamos encontrar o alinhamento de maior pontuação possível.
- O problema do Alinhamento Multiplo de Sequências é também conhecido como MSA (*Multiple Sequence Alignment*).

Alinhamento Múltiplo de Sequências

```
P E A A L Y G R F T I K S D V W
E A A L Y G R F T I E S D V W
P E S L A Y N K F S I K S D V W
P E A L N Y G R Y S S E S D V W
P E A L N Y G W Y S S E S D V W
P E V I R M Q D D N P F S F Q S D V Y
```


Alinhamento Múltiplo de Sequências

```
P E A A L Y G R F T - - - I K S D V W
- E A A L Y G R F T - - - I E S D V W
P E S L A Y N K F - - - S I K S D V W
P E A L N Y G R Y - - - S S E S D V W
P E A L N Y G W Y - - - S S E S D V W
P E V I R M Q D D N P F S F Q S D V Y
```

Como Pontuar um Alinhamento Múltiplo de Sequências

- Soma da pontuação de todas as colunas do alinhamento.
  - Necessita de uma função de pontuação de colunas.
- Exemplo de funções de pontuação de colunas:
  - Generalização da matriz de similariedade, com k dimensões.
  - Soma de Pares (SP-score: Sum-of-Pairs).
  - Entropia da coluna.

Soma de Pares

- Considera a soma, par a par, das similariedades de todos os símbolos da coluna.
- Fórmula da Soma de Pares para uma coluna c:

$$\sum_{1 \leq i < j \leq k} \sigma(\alpha_i[c], \alpha_j[c])$$

- Soma de pares pode ser usada para avaliar o alinhamento como um todo, e com isso considerar esquemas de penalidade sub-aditivos para buracos.
- Neste caso teríamos:

$$\sum_{1 \leq i < j \leq k} sim(\alpha_i, \alpha_j)$$

- A Soma de Pares de uma coluna pode ser calculada em $\Theta(k^2)$.

Pontuação baseada em Entropia

- Quanto mais similar forem os símbolos de uma coluna, menor a entropia.
- A pontuação de uma alinhamento pode ser obtido pela soma das entropias das colunas.
- Neste caso, estamos interessados num alinhamento de entropia mínima.
- Fórmula da entropia de uma coluna:

$$-\sum_{x \in \mathcal{A}'} p_x \log_2 p_x$$

  onde p_x é a frequência do símbolo x na coluna.
- Note que se $p_x = 1$, ou seja, a coluna contiver apenas o símbolo x, então a entropia da coluna será $-1 \log_2 1 = 0$.
- Caso, a coluna contiver mais de um símbolo, então a entropia será positiva. Exemplo, $p_A = p_C = p_T = p_G = \frac{1}{4}$, então a entropia será $-4(\frac{1}{4} log_2 \frac{1}{4}) = 2$.
- A entropia de uma coluna pode ser calculada em $\Theta(|\mathcal{A}| + k)$.

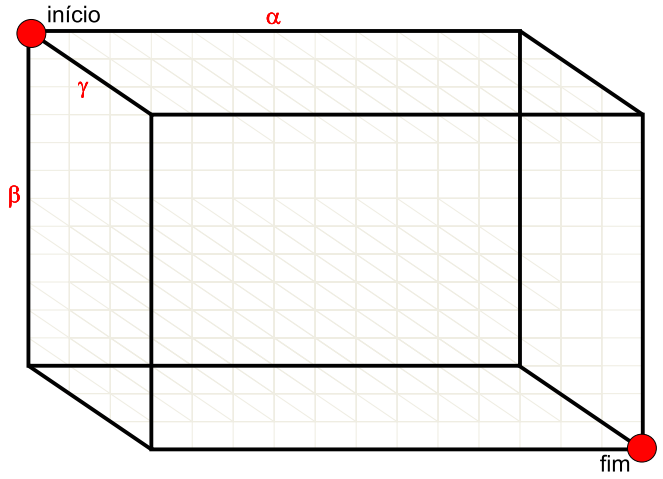
Sequência Consenso

- Em muitas aplicações, além do alinhamento das sequências, deseja obter uma sequência que represente o consenso do alinhamento.
- A sequência consenso (C) pode ser obtida, coluna a coluna, escolhendo o símbolo que maximiza a soma das similariedade entre ele e todos os demais símbolos da coluna, ou seja:

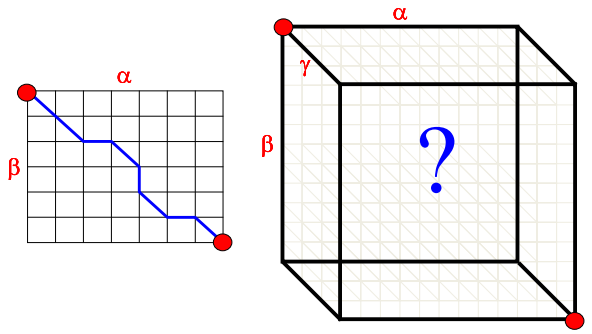
$$maximize \sum_{i=1}^{k} \sigma(C[c], \alpha_i[c])$$

  com $C[c] \in \mathcal{A}'$, para toda coluna c do alinhamento múltiplo.
- A sequência consenso pode ser obtida em $\Theta(|\mathcal{A}|kn)$.

Alinhamento de Três Sequências



Alinhamento de Três Sequências



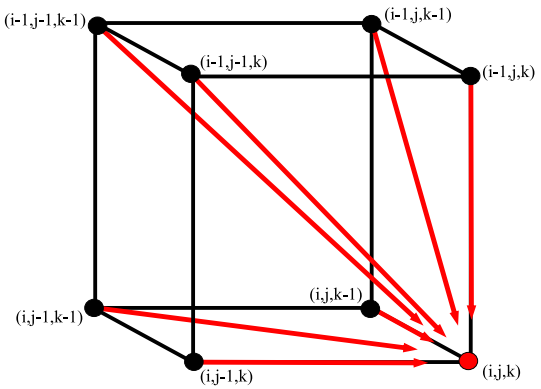
Alinhamento de Três Sequências

- Generalização do algoritmo de Needleman e Wunsch para alinhamento de duas sequências.
- Matriz de Programação Dinâmica deverá ser tridimensional (cada dimensão representará uma sequência a ser alinhada).
- Fórmula de recorrência usada no preenchimento da matriz:

$$\text{M[i,j,k]} \leftarrow max \left\{ \begin{array}{l} M[i-1,j,k] + \sigma(\alpha_1[i],-,-) \\ M[i,j-1,k] + \sigma(-,\alpha_2[j],-) \\ M[i,j,k-1] + \sigma(-,-,\alpha_3[k]) \\ M[i-1,j-1,k] + \sigma(\alpha_1[i],\alpha_2[j],-) \\ M[i-1,j,k-1] + \sigma(\alpha_1[i],-,\alpha_3[k]) \\ M[i,j-1,k-1] + \sigma(-,\alpha_2[j],\alpha_3[k]) \\ M[i-1,j-1,k-1] + \sigma(\alpha_1[i],\alpha_2[j],\alpha_3[k]) \end{array} \right\}$$

- Complexidade de tempo e espaço:
  - $\Theta(n^3)$

Alinhamento de Três Sequências



Alinhamento de k Sequências

- Generalização do algoritmo de Needleman e Wunsch para alinhamento de duas sequências.
- Matriz de Programação Dinâmica deverá ser k-dimensional (cada dimensão representará uma sequência a ser alinhada).
- Cada célula da matriz dependerá de outras $2^k - 1$ células.
- Quanto custa preencher cada célula?
  - Usando Soma de Pares: $\Theta(k^2 2^k)$
  - Usando Entropia: $\Theta(k2^k)$
- Complexidade de tempo total:
  - $\Omega(k2^k n^k)$
- Complexidade de espaço:
  - $\Theta(n^k)$
- Lusheng Wang e Tao Jiang provaram em 1994 que o problema do alinhamento múltipo de sequências é $\mathcal{NP}$-Completo.

Alinhamento de k Sequências
Redução do Espaço de Busca

- Metodo para redução de tempo de processamento quando usasse Soma de Pares para pontuar cada coluna.
- Antes de expandir uma célula (e atualizar a similariedade das células que são influenciadas por ela), verificar se ela é relevante, ou seja, se ela pode fazer parte do alinhamento múltiplo.
- O método usa as matrizes de pontuação total entre todos os pares de sequências as serem alinhadas.
- A Matriz de Pontuação Total (c) entre as sequências α e β, de tamanho m e n, é definida como:

$$c[i,j] = a[i,j] + b[i,j]$$

onde:

$$a[i,j] = sim(\alpha[1..i], \beta[1..j])$$
$$b[i,j] = sim(\overline{\alpha[i+1..n]}, \overline{\beta[j+1..m]})$$

Alinhamento de k Sequências
Matriz de Pontuação de Prefixos

a

α	A	C	T	G	A	G	T	C
β 0	-5	-10	-15	-20	-25	-30	-35	-40
A -5	3	-2	-7	-12	-17	-22	-27	-32
T -10	-2	1	1	-4	-9	-14	-19	-24
T -15	-7	-4	4	-1	-6	-11	-11	-16
G -20	-12	-9	-1	7	2	-3	-8	-13
A -25	-17	-14	-6	2	10	5	0	-5
G -30	-22	-19	-11	-3	5	13	8	3

Alinhamento de k Sequências
Matriz de Pontuação de Sufixos

b

3	-5	-7	-10	-8	-16	-19	-27	-30	A
-5	0	-3	-5	-8	-11	-14	-22	-25	T
-8	-3	2	-6	-3	-6	-9	-17	-20	T
-16	-11	-6	-1	-6	-1	-9	-12	-15	G
-24	-19	-14	-9	-4	-9	-4	-7	-10	A
-32	-27	-22	-17	-12	-7	-7	-2	-5	G
-40	-35	-30	-25	-20	-15	-10	-5	0	β
A	C	T	G	A	G	T	C	α	

Alinhamento de k Sequências
Matriz de Pontuação Total

c	α	A	C	T	G	A	G	T	C
β	3	-10	-17	-25	-28	-41	-49	-62	-70
A	-10	3	-5	-12	-20	-28	-36	-49	-57
T	-18	-5	3	-5	-7	-15	-23	-36	-44
T	-31	-18	-10	3	-7	-7	-20	-23	-31
G	-44	-31	-23	-10	3	-7	-7	-15	-23
A	-57	-44	-36	-23	-10	3	-2	-2	-10
G	-70	-57	-49	-36	-23	-10	3	3	3

Alinhamento de k Sequências
Redução do Espaço de Busca

Teorema

Seja α um alinhamento ótimo entre as sequências $\alpha_1, \alpha_2, \ldots, \alpha_k$ e α_{ij} a projeção do alinhamento entre α_i e α_j. Se SP-score$(\alpha) \geq L$, então:

$$sim(\alpha_{ij}) \geq L_{ij}$$

onde:

$$L_{ij} = L - \sum_{1 \leq x < y \leq k, (x,y) \neq (i,j)} sim(\alpha_x, \alpha_y)$$

Logo, se a célula $M[i_1, i_2, \ldots, i_k]$ é relevante, então:

$$c_{xy}[i_x, i_y] \geq L_{xy}$$

para todo par x e i, tal que, $1 \leq x < y \leq k$, onde c_{xy} é a matriz de pontuação total entre α_x e α_y.

Alinhamento de k Sequências
Redução do Espaço de Busca

Algoritmo 1: MSA

Input: $k, n_1, n_2, \ldots, n_k, \alpha_1, \alpha_2, \ldots, \alpha_k, L$
for *all* x *e* y, $1 \leq x < y \leq k$ **do** Calcule c_{xy}
for *all* x *e* y, $1 \leq x < y \leq k$ **do** $L_{xy} \leftarrow L - \sum_{1 \leq p < q \leq k, (p,q) \neq (x,y)} sim(\alpha_p, \alpha_q)$
$pool \leftarrow \{0\}$
while $pool \neq \emptyset$ **do**
  $i \leftarrow$ the lexicographically smallest cell in the *pool*
  $pool \leftarrow pool \setminus i$
  if $c_{xy}[i_x, i_y] \geq L_{xy}$, *for all pair* x *e* y, *where* $1 \leq x < y \leq k$ **then**
    for *each cell* j *dependent on* i **do**
      if $j \notin pool$ **then**
        $pool \leftarrow pool \cup \{j\}$
        $M[j] \leftarrow M[i] + SP\text{-score}(Column(\alpha, j-1))$
      end
      else
        $M[j] \leftarrow max(M[j] + M[i] + SP\text{-score}(Column(\alpha, j-1))$
      end
    end
  end
end
return $M[n_1, n_2, \ldots, n_k]$

Alinhamento de k Sequências
Redução do Espaço de Busca

- Complexidade de tempo:
  - $\Theta(k^2n^2 + k^4 + r2^kk^2)$
    onde r é o número de células relevantes.
  - Pior caso: $r = \Theta(n^k)$
  - Logo, a complexidade de pior caso é $\Theta(n^k2^kk^2)$
- Método proposto por Humberto Carrillo e David Lipman em 1988.
- Implementado no programa MSA, de David Lipman, Stephen Altschul e John Kececioglu (1989).

Similariedade x Distância

- Propriedades de distância de sequências:
  - $\delta(x, x) = 0$, para todo $x \in \mathcal{A}$.
  - $\delta(x, y) > 0$, com $x \neq y$, para todo para $x, y \in \mathcal{A}$.
  - $\delta(x, y) = \delta(y, x)$, para todo par $x, y \in \mathcal{A}$.
  - $\delta(x, y) \leq \delta(x, z) + \delta(z, y)$, para toda tripla $x, y, z \in \mathcal{A}$.
- Distância de sequência não é adequada para comparação local.
- Equivalência entre similariedade e distância de sequências:
  - $\delta(x, y) = M - \sigma(x, y)$.
  - $g' = -g - \frac{M}{2}$.
  - $sim(\alpha, \beta) + dist(\alpha, \beta) = \frac{M}{2}(m + n)$.
- Equivalência descrita por Temple Smith, Michael Waterman e Walter Fitch, em 1981.

Compatibildiade de Alinhamentos de Pares de Sequências

α1 = A A A A T T T T
α2 = T T T T G G G G
α3 = A A A A G G G G

α1 = A A A A T T T T - - - -
α2 = - - - - T T T T G G G G

α2 = - - - - T T T T G G G G
α3 = A A A A - - - - G G G G

α1 = A A A A T T T T - - - -
α3 = A A A A - - - - G G G G

Compatibildiade de Alinhamentos de Pares de Sequências

α1 = A A A A T T T T
α2 = T T T T G G G G
α3 = A A A A G G G G

α1 = A A A A T T T T - - - -
α2 = - - - - T T T T G G G G

α2 = T T T T G G G G - - - -
α3 = - - - - G G G G A A A A

α1 = - - - - A A A A T T T T
α3 = G G G G A A A A - - - -

Incompatibildiade de Alinhamentos de Pares de Sequências

α1 = A A A A T T T T
α2 = T T T T G G G G
α3 = G G G G A A A A

α1 = A A A A T T T T - - - -
α2 = - - - - T T T T G G G G

α2 = T T T T G G G G - - - -
α3 = - - - - G G G G A A A A

α1 = - - - - A A A A T T T T
α3 = G G G G A A A A - - - -

Alinhamento Estrela

- Construir um alinhamento múltiplo, usando uma sequência como âncora para as demais.
- Como escolher a âncora?
  - Use cada uma das sequências como âncora e retorne apenas o melhor alinhamento.
  - Use a sequência que maximiza a soma das similariedades em relação a todas as demais sequências.
- Passos:
  - Calcule os alinhamentos entre todos os pares de sequências.
  - Escolha a âncora.
  - Adicione, uma a uma, as demais sequências ao alinhamento.
    - ⋆ Usa a regra: *"once a gap, always a gap"*.
- O valor do alinhamento ótimo obtido pode ser usado como limite inferior (L) para o algoritmo de Carrillo e Lipman.
- Complexidade:
  - $\Theta(k^2 n^2)$

Alinhamento Estrela

$\alpha 1 =$ **A T T G C C A T T**
$\alpha 2 =$ **A T G G C C A T T**
$\alpha 3 =$ **A T C C A A T T T T**
$\alpha 4 =$ **A T C T T C T T**
$\alpha 5 =$ **A C T G A C C**

Alinhamento Estrela

sim	α1	α2	α3	α4	α5	soma
α1		22	-1	4	-4	21
α2	22		-1	4	-7	18
α3	-1	-1		4	-14	-12
α4	4	4	4		-4	8
α5	-4	-7	-14	-4		-29
soma	21	18	-12	8	-29	

Match = 3 Mismatch = -2 Gap = -5

Alinhamento Estrela

dist	α1	α2	α3	α4	α5	soma
α1		5,0	29,5	21,5	28,0	84,0
α2	5,0		29,5	21,5	31,0	87,0
α3	29,5	29,5		23,0	39,5	121,5
α4	21,5	21,5	23,0		26,5	92,5
α5	28,0	31,0	39,5	26,5		125,0
soma	84,0	87,0	121,5	92,5	125,0	

Match = 0 Mismatch = -5 Gap = -6,5

Alinhamento Estrela

$\alpha 1 =$ A T T G C C A T T
$\alpha 2 =$ A T G G C C A T T

$\alpha 1 =$ A T T G C C A - - T T
$\alpha 3 =$ A T C - C A A T T T T

$\alpha 1 =$ A T T G C C A T T
$\alpha 4 =$ A T C T T C - T T

$\alpha 1 =$ A T T G C C A T T
$\alpha 5 =$ A C T G A C C - -

Alinhamento Estrela

$\alpha 1 =$ A T T G C C A T T
$\alpha 2 =$ A T G G C C A T T

Alinhamento Estrela

$\alpha 1 =$ A T T G C C A T T
$\alpha 2 =$ A T G G C C A T T

$\alpha 1 =$ A T T G C C A - - T T
$\alpha 3 =$ A T C - C A A T T T T

Alinhamento Estrela

$\alpha 1 =$ A T T G C C A - - T T
$\alpha 2 =$ A T G G C C A - - T T
$\alpha 3 =$ A T C - C A A T T T T

Alinhamento Estrela

$\alpha 1 =$ A T T G C C A - - T T
$\alpha 2 =$ A T G G C C A - - T T
$\alpha 3 =$ A T C - C A A T T T T

$\alpha 1 =$ A T T G C C A T T
$\alpha 4 =$ A T C T T C - T T

Alinhamento Estrela

$\alpha 1 =$ A T T G C C A - - T T
$\alpha 2 =$ A T G G C C A - - T T
$\alpha 3 =$ A T C - C A A T T T T
$\alpha 4 =$ A T C T T C - - - T T

Alinhamento Estrela

$\alpha 1 =$ A T T G C C A - - T T
$\alpha 2 =$ A T G G C C A - - T T
$\alpha 3 =$ A T C - C A A T T T T
$\alpha 4 =$ A T C T T C - - - T T

$\alpha 1 =$ A T T G C C A T T
$\alpha 5 =$ A C T G A C C - -

Alinhamento Estrela

$\alpha 1 =$ A T T G C C A - - T T
$\alpha 2 =$ A T G G C C A - - T T
$\alpha 3 =$ A T C - C A A T T T T
$\alpha 4 =$ A T C T T C - - - T T
$\alpha 5 =$ A C T G A C C - - - -

Alinhamento Estrela

- Seja:
  - α_c: sequência usada como âncora do alinhamento estrela.
  - $dist(\alpha_i, \alpha_j)$: distância mínima entre α_i e α_j.
  - $dist^*(\alpha_i, \alpha_j)$: distância entre α_i e α_j no alinhamento estrela.
  - $V(\alpha^*) = \sum_{1 \leq i,j \leq k} dist^*(\alpha_i, \alpha_j)$
  - $V(\alpha) = \sum_{1 \leq i,j \leq k} dist(\alpha_i, \alpha_j)$

Lema

Para quaisquer sequências α_i e α_j, com $1 \leq i, j \leq k$, temos que:
$dist^*(\alpha_i, \alpha_j) \leq dist^*(\alpha_i, \alpha_c) + dist^*(\alpha_c, \alpha_j) = dist(\alpha_i, \alpha_c) + dist(\alpha_c, \alpha_j)$.

Teorema

$V(\alpha^*)/V(\alpha) \leq 2\frac{(k-1)}{k} < 2$

Algoritmos de Aproximação para Alinhamento Múltiplo de Sequências

(usando Soma de Pares para pontuação de alinhamentos)

- Daniel Gusfield, 1993.
  - Aproximação: 2 - 2/k.
  - Complexidade: $O(k^2 n^2)$.
- Pavel Pevzner, 1992.
  - Aproximação: 2 - 3/k.
  - Complexidade: $O(n^3 k^3 + k^4)$.
- Vineet Bafna, Eugene Lawler e Pavel Pevzner, 1997.
  - Aproximação: 2 - l/k.
  - Complexidade: $O(k^{l+1}(2^k + kl^2 2^l n^l))$
- Winfried Just, 2001.
  - MSA $\in \mathcal{MAX}$-$\mathcal{SNP}$-Difícil.
  - Não existe um esquema de aproximação polinomial (PTAS - *Polynomial Time Approximation Scheme*) para MSA, a menos que $\mathcal{P} = \mathcal{NP}$.

Alinhamento Progressivo

- Consiste em construir um alinhamento múltiplo a partir de alinhamentos de pares de sequências e/ou de alinhamentos.
- Descrito inicialmente por Hogeweg e Hesper (1984) e depois reinventado por Feng e Doolittle (1987) e Taylor (1988).
- Características:
  - Simples e efetivo para MSA.
  - Requer pouco tempo e memória.
  - Bom desempenho para seqüências homólogas e relativamente bem conservadas.
  - Problema: natureza gulosa e muito sensível ao esquema de pontuação.

Alinhamento Progressivo

- Etapas:
  1. Computar alinhamentos de todos os pares de sequências.
  2. Construir uma árvore guia.
  3. Construir o alinhamento múltiplo guiado pela árvore.
- Construção de árvore guia:
  - UPGMA (Sneath e Sokal, 1973)
  - Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987)
- Construção do alinhamento múltiplo:
  - Seleção do par a incluir no alinhamento.
  - Alinhar duas seqüências/alinhamentos.
- Programas que implementam alinhamento progressivo:
  - `Clustal W` (Thompson et al, 1994)
  - `MUSCLE` (Edgar, 2004)
  - `T-COFFEE` (Notredame et al, 2000)
  - `ProbCons` (Do et al, 2005)

Alinhamento Iterativo

- Consiste em refinar alinhamentos através de uma série de ciclos.
- Produz bons alinhamentos.
- Problema: requer muito tempo e depende de outros métodos auxiliares.
- Programas que implementam alinhamento múltiplo iterativo:
  - `PRRP` (Gotoh, 1996)
  - `SAGA` (Notredame e Higgins, 1996)