Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Comparação de sequências

aula 3

João Carlos Setubal

2021

Alinhamento múltiplo

- Queremos alinhar mais do que $n = 2$ sequências
- n pode variar de 3 a milhares
- Por que haveria interesse em fazer tais alinhamentos?

Motivação mais geral

- Representante da situação em que similaridade entre 2 sequências pode ser apenas coincidência
- Mas similaridade entre 10 ou 20 ou 100 sequências (ou seja, todas com todas) é muito mais difícil que seja coincidência

Motivação mais concreta

- Para construir filogenias é necessário criar AMs

Alinhamento múltiplo

```
C:      ----SDIPAGDYEKGKKVYKQRCLQCHVVDSTAT-KTGPTLHGVIGRTSGTVSGFDYSAA
Y:      ----TEFKAGSAKKGATLFKTRCLQCHTVEKGGPHKVGPNLHGIFGRHSGQAEGYSYTDA
A:      MASFDEAPPGNPKAGEKIFRTKCAQCHTVEKGAGHKQGPNLNGLFGRQSGTTPGYSYSAA
D:      -----GVPAGDVEKGKKLFVQRCAQCHTVEAGGKHKVGPNLHGLIGRKTGQAAGFAYTDA
H:      ---------GDVEKGKKIFIMKCSQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKTGQAPGYSYTAA
M:      ---------GDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKTGQAAGFSYTDA
                 *. : * .::  .* ***.*:  .  * **.*:*::** :* . *: *: *
```

```
C:      NKNKGVVWTKETLFEYLLNPKKYIPGTKMVFAGLKKADERADLIKYIEVESAKSL
Y:      NIKKNVLWDENNMSEYLTNPKKYIPGTKMAFGGLKKEKDRNDLITYLKKACE---
A:      NKSMAVNWEEKTLYDYLLNPKKYIPGTKMVFPGLKKPQDRADLIAYLKEGTA---
D:      NKAKGITWNEDTLFEYLENPKKYIPGTKMIFAGLKKPNERGDLIAYLKSATK---
H:      NKNKGIIWGEDTLMEYLENPKKYIPGTKMIFVGIKKKEERADLIAYLKKATNE--
M:      NKNKGITWGEDTLMEYLENPKKYIPGTKMIFAGIKKKGERADLIAYLKKATNE--
        *    : * :..: :** ********** * *:**  :* *** *::
```

Como dar notas para alinhamentos múltiplos?

Soma de pares (aminoácidos)

- Numa coluna determinada, podemos separar todos os pares de aminoácidos
  - da linha 1 com linha 2, da linha 1 com linha 3, 1 com 4, etc
  - depois: da linha 2 com linha 3, 2 com 4, etc
  - A cada par corresponde uma nota na matriz BLOSUM62
  - A soma de todas as notas dos pares dá a nota da coluna
  - A soma das notas das colunas dá a nota do alinhamento

Coluna de um alinhamento

L

I

V

V

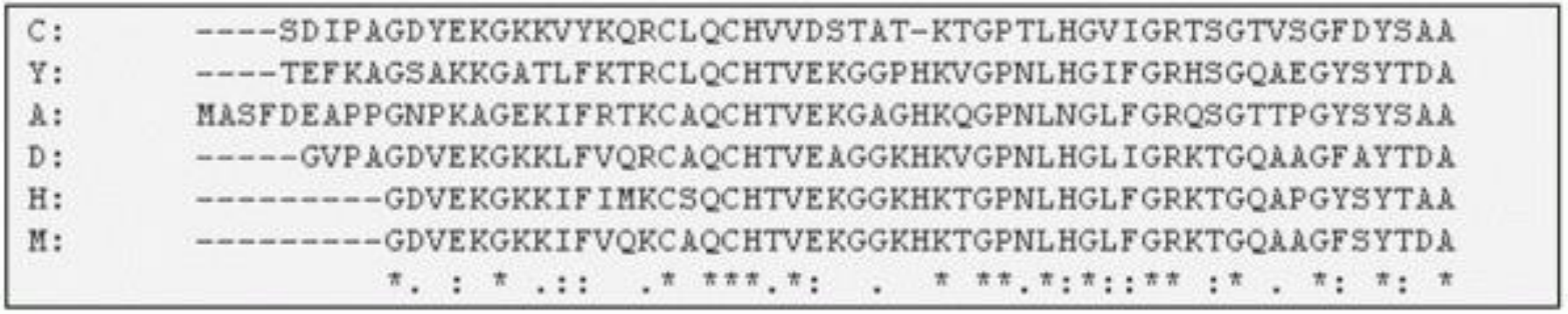
I

BLOSUM62

```
L/L:  4
L/I:  2
L/V:  1
I/I:  4
I/V:  3
V/V:  4
```

	L	I	V	V	I	
L		2	1	1	2	**6**
I			3	3	4	**10**
V				4	3	**7**
V					3	**3**
I						**26**

Nota da coluna



What do the consensus symbols mean in the alignment?

An * (asterisk) indicates positions which have a single, fully conserved residue

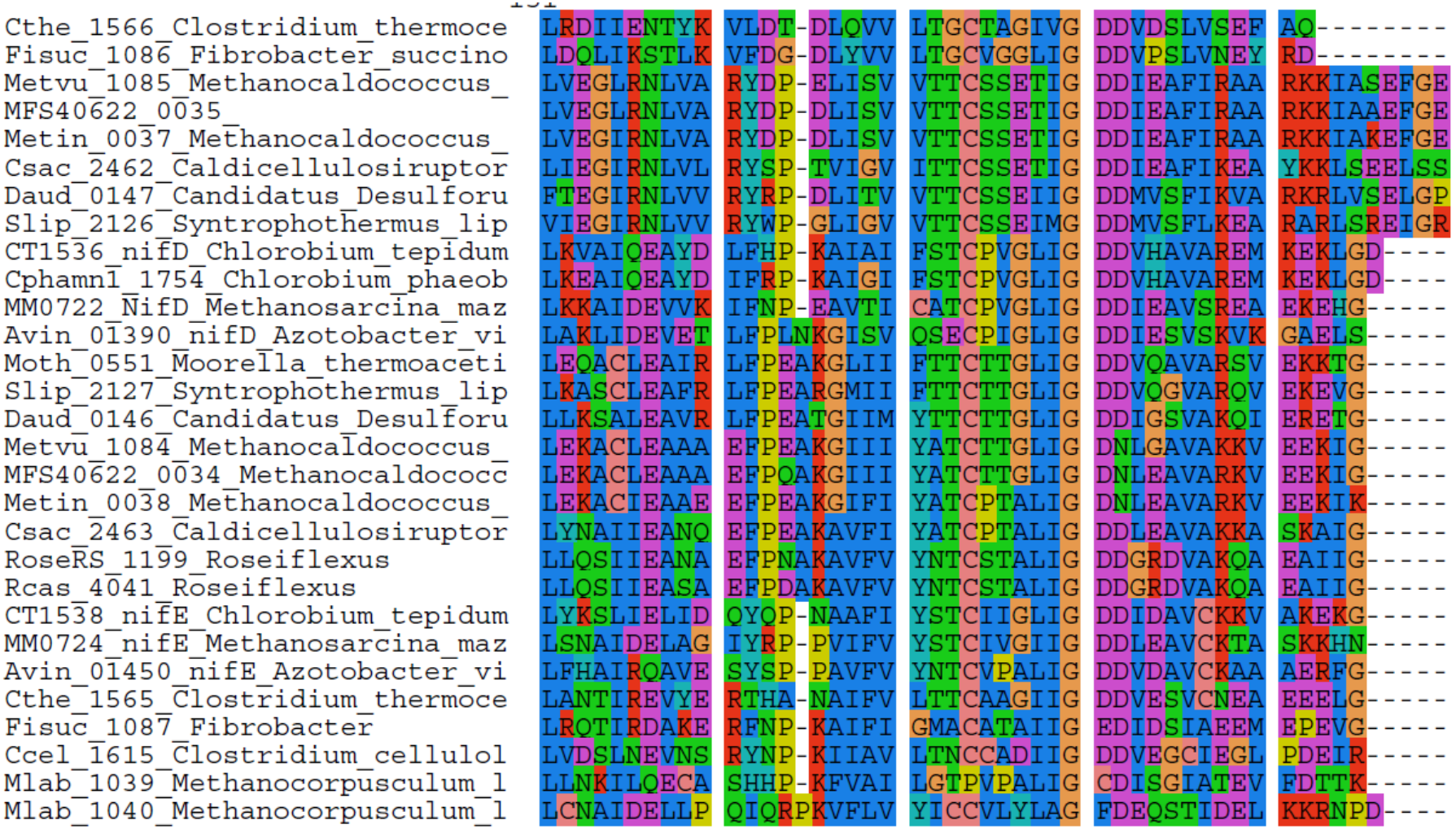
A : (colon) indicates conservation between groups of strongly similar properties - scoring > 0.5 in the Gonnet PAM 250 matrix

A . (period) indicates conservation between groups of weakly similar properties - scoring =< 0.5 in the Gonnet PAM 250 matrix

Não existe padrão universalmente aceito para avaliar AMs

- Ou seja, não existe o equivalente de e-values em BLAST
- Diferentes programas produzem diferentes notas

As cores representam famílias de aminoácidos



Exercício

- Compare os aminoácidos de mesmas cores do slide anterior com as famílias apresentadas na aula 1 de comparações
- Compare também com as notas desses grupos de aminoácidos na matriz BLOSUM62

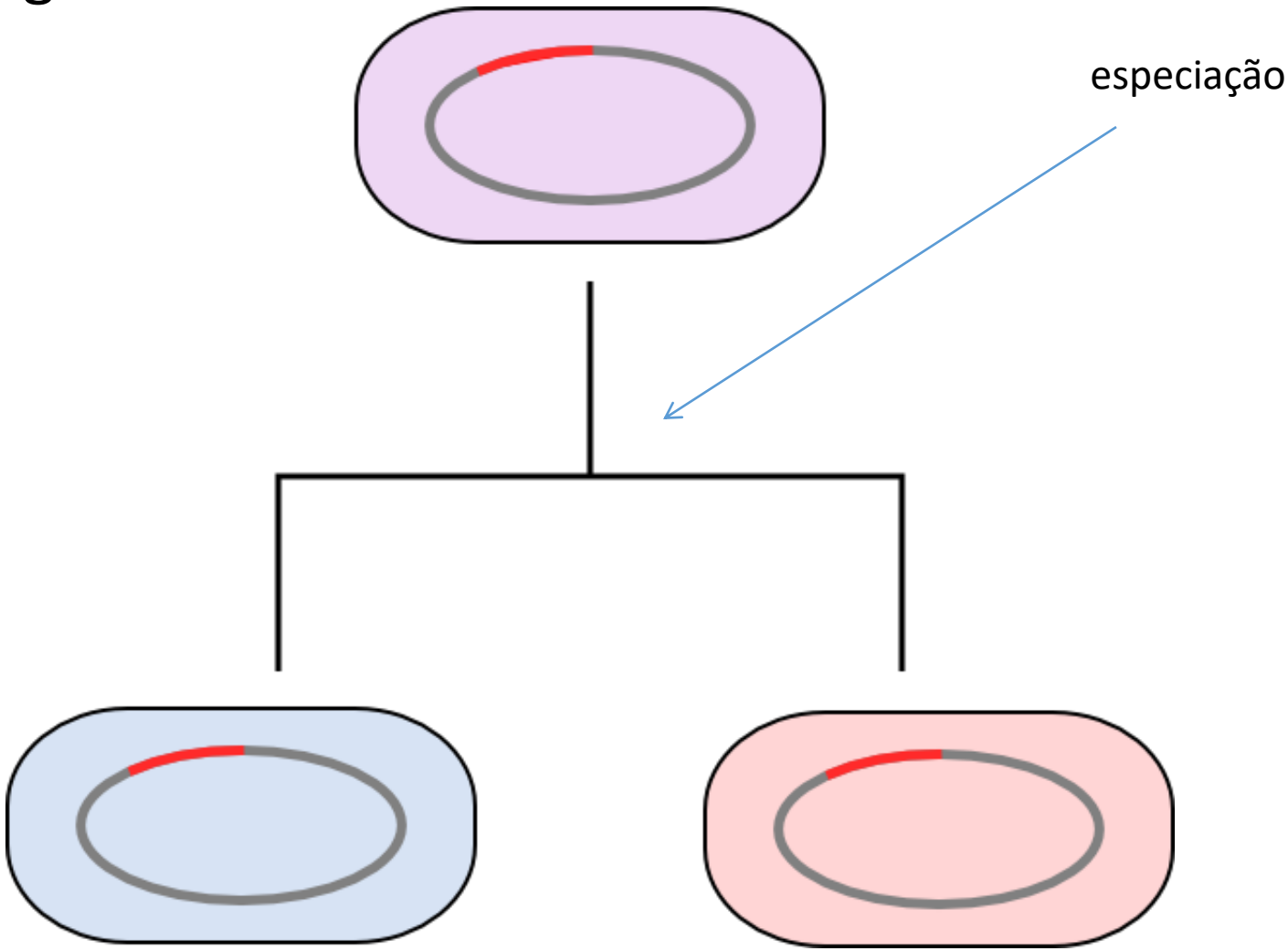
Sequências de entrada para um AM

- Dois conceitos importantes
  - Homologia
  - Família

Homologia

- Dois genes que tem um mesmo ancestral são homológos
- Freq. usado erroneamente com o sentido de similar
- Similaridade não implica necessariamente em homologia
  - Asas: morcêgo e insetos (convergência)
- Às vezes a similaridade é (ou parece) baixa mas mesmo assim existe homologia
  - Barbatana de baleia e braços em humanos
- Dois tipos de homologia
  - Ortologia e paralogia

Ortólogos



parálogos

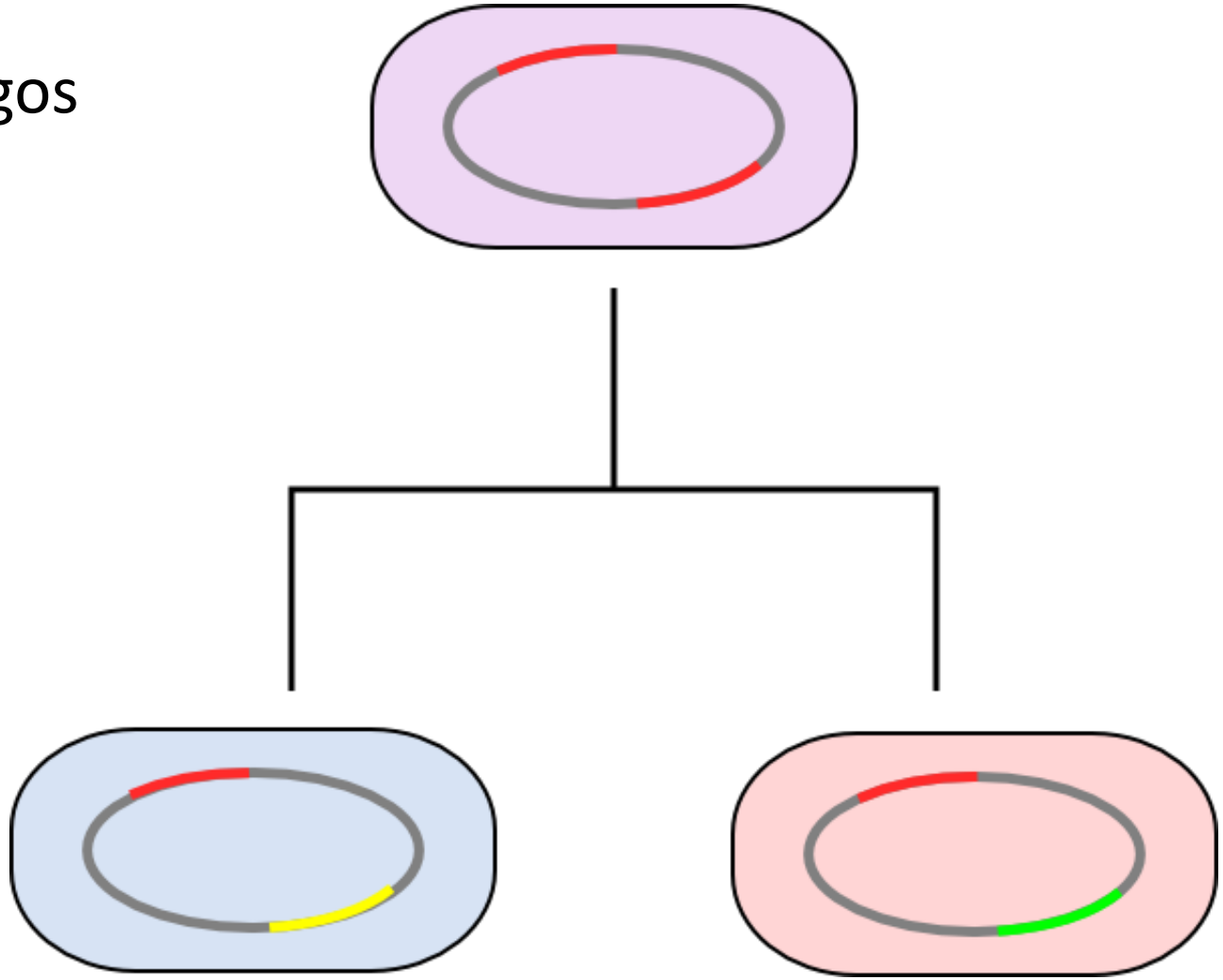


Figure by C. Lasher

In-parálogos

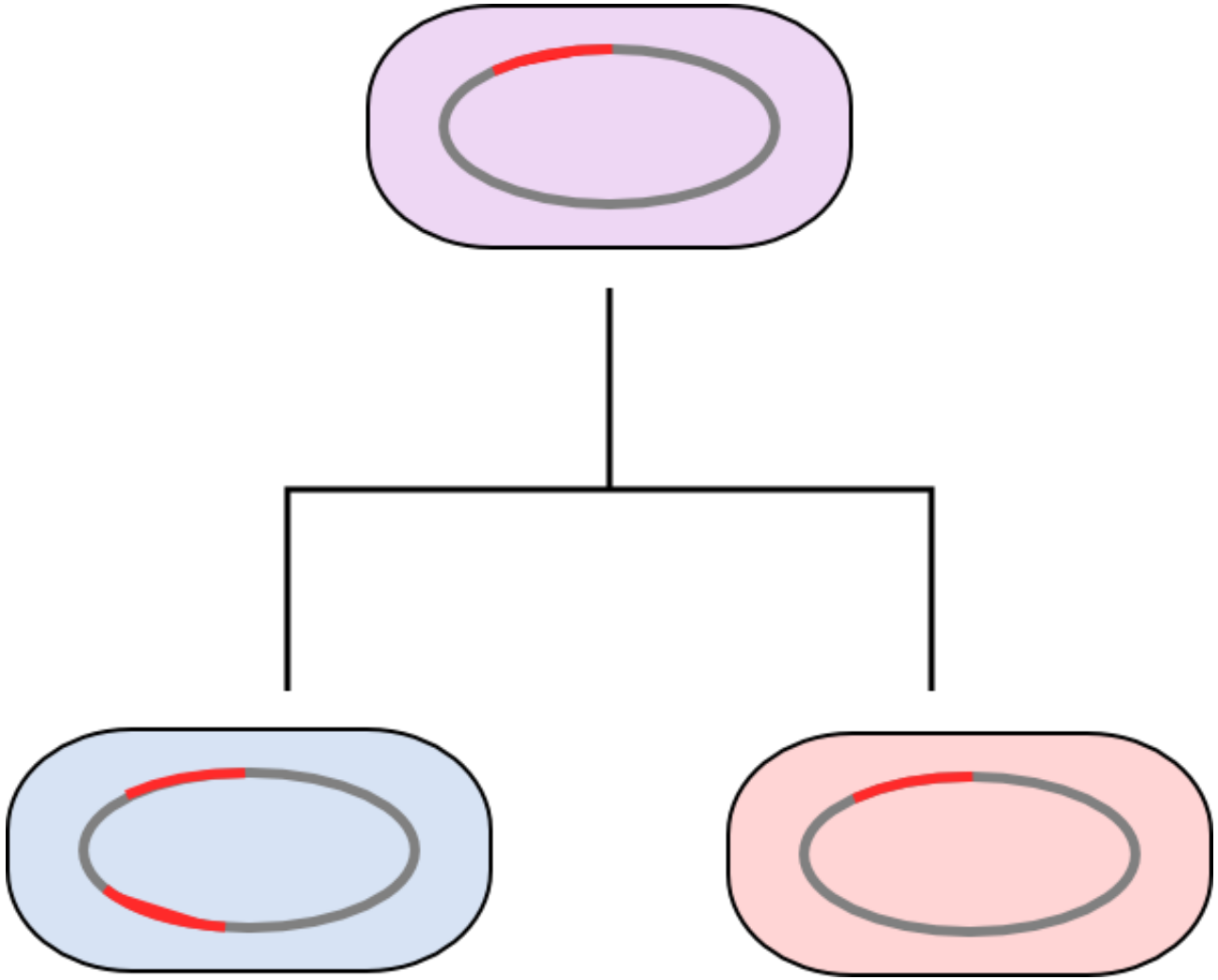


Figure by C. Lasher

Homologia e função

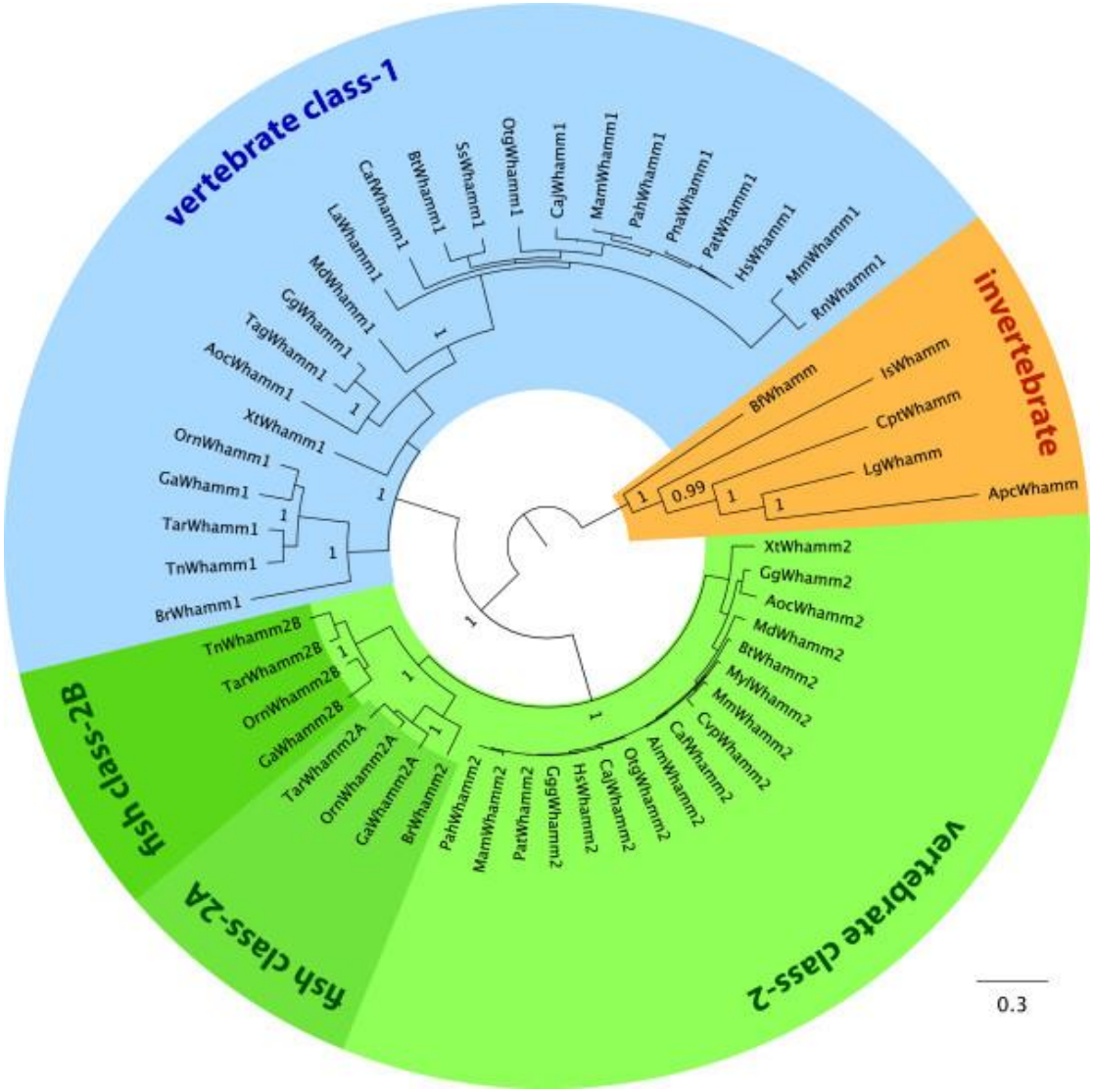
- Seria bom se proteínas homólogas tivessem mesma função
- Geralmente é o caso; mas nem sempre
- Parálogos estão mais sujeitos a desenvolver novas funções
  - Neo-funcionalização
- Na prática
  - Membros de uma mesma família de proteínas são homólogos e em geral tem mesma função
  - Mas existem os conceitos de Superfamílias e subfamílias

Família de proteínas

- Definição operacional
  - Duas proteínas estão na mesma família se seus genes são homólogos
- ou (mais exigente)
  - Duas proteínas estão na mesma família se seus genes são ortólogos

- Falar em proteínas homólogas é um certo abuso de linguagem: são os genes que são homólogos

Exemplo de subfamílias. Nesta figura são definidas 3 subfamílias (azul, verde, laranja), e 3 sub-subfamílias (dentro da subfamília verde)



Phylogenetic tree of the WHAMM proteins
Kollmar *et al. BMC Research Notes* 2012 **5**:88 doi:10.1186/1756-0500-5-88

Colunas num AM devem ser homólogas

- Uma coluna homóloga significa que o gene ancestral comum das sequências no AM também tinha a posição correspondente a essa coluna

Alinhar DNA ou aminoácidos?

- DNA: mais difícil garantir homologia nas colunas
- DNA é mais sensível, mas a terceira base de codons não é informativa
- Comparação com aminoácidos permite que proteínas mais distantes possam ser incluídas
  - Há casos em que não dá para alinhar DNA (muita divergência)
- DNA é indicado quando as sequências de proteínas são todas idênticas ou quase idênticas
  - Como seria o caso na comparação de proteínas de cepas de uma espécie de bactéria

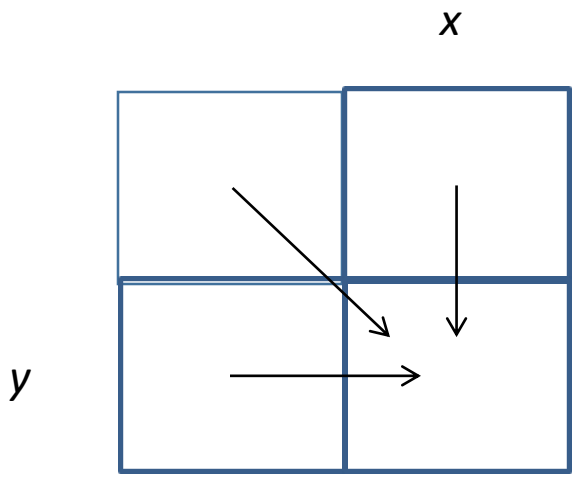
Algoritmo para alinhamento múltiplo de sequências

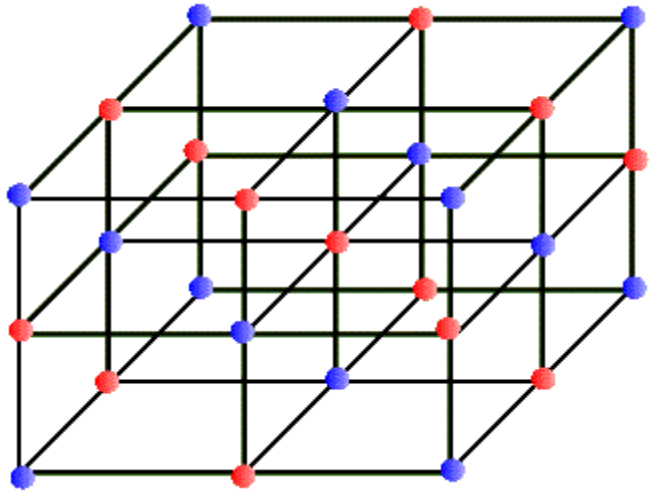
- Programação dinâmica
- Generalização de alinhamento 2-a-2

Generalização de PD para AM

2 sequências

3 sequências





$O(n^2)$

$O(n^3)$

$\Omega(2^k n^k)$

Omega significa que o custo é *pelo menos* esse

Consequência

- Se PD para alinhamentos 2-a-2 já é caro...
- ...para AM é ainda mais caro!
- Portanto todos os programas práticos para AM são heurísticas
  - Não tem garantia de otimalidade (produzem aproximações)

Mesmo sendo heurísticas esses programas tem limitações

- Essas limitações vão variar de programa para programa, e dependendo de onde o programa é rodado
- A grosso modo, as sequências de entrada não podem ser:
  - muito longas (não mais do que algo como 10 kb, no caso de AM para nucleotídeos)
  - nem muitas (não mais do que algo como 1000)

Alinhamento progressivo

- é a heurística que está na base de vários programas de AM
- Ideia: combinar alinhamentos de pares, iniciando com o par mais similar entre si
- Ir juntando os pares
- Dois estágios
  1. constrói-se uma árvore-guia que determina a hierarquia de similaridade entre os pares
  2. as sequências são adicionadas ao alinhamento num processo guiado pela árvore
- Seria melhor que AM e árvore fossem feitos simultaneamente
  - Mas é muito mais complicado de fazer com rigor

Programas para AM

- **Muscle**
  - Edgar, R.C. (2004) *Nucleic Acids Res*. **32**(5):1792-1797
  - http://www.drive5.com/muscle
- **MAFFT**
  - Katoh, Misawa, Kuma, Miyata 2002 (*Nucleic Acids Res.* **30**:3059-3066)
  - http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/
- ClustalW/X (antigos) **Clustal Omega** (novo)
  - Sievers et al. Molecular Systems Biology (2011) 7:539
  - http://www.clustal.org/omega/
  - http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
- Outros: Probcons, Cobalt (NCBI), T-coffee

Para ilustrar as complexidades de avaliação de alinhamentos múltiplos

- Artigo do próximo slide procurou comparer diferentes programas de AM entre si

A Comprehensive Benchmark Study of Multiple Sequence Alignment Methods: Current Challenges and Future Perspectives

Julie D. Thompson, Benjamin Linard, Odile Lecompte, Olivier Poch

Published: March 31, 2011 • DOI: 10.1371/journal.pone.0018093

- Abstract
- Introduction
- Results
- Discussion
- Materials and Methods
- Acknowledgments
- Author Contributions
- References

Reader Comments (0)
Figures

Abstract

Multiple comparison or alignmentof protein sequences has become a fundamental tool in many different domains in modern molecular biology, from evolutionary studies to prediction of 2D/3D structure, molecular function and inter-molecular interactions etc. By placing the sequence in the framework of the overall family, multiple alignments can be used to identify conserved features and to highlight differences or specificities. In this paper, we describe a comprehensive evaluation of many of the most popular methods for multiple sequence alignment (MSA), based on a new benchmark test set. The benchmark is designed to represent typical problems encountered when aligning the large protein sequence sets that result from today's high throughput biotechnologies. We show that alignmentmethods have significantly progressed and can now identify most of the shared sequence features that determine the broad molecular function(s) of a protein family, even for divergent sequences. However,we have identified a number of important challenges. First, the locally conserved regions, that reflect functional specificities or that modulate a protein's function in a given cellular context,are less well aligned. Second, motifs in natively disordered regions are often misaligned. Third, the badly predicted or fragmentary protein sequences, which make up a large proportion of today's databases, lead to a significant number of alignment errors. Based on this study, we demonstrate that the existing MSA methods can be exploited in combination to improve alignment accuracy, although novel approaches will still be needed to fully explore the most difficult regions. We then propose knowledge-enabled, dynamic solutions that will hopefully pave the way to enhanced alignment construction and exploitation in future evolutionary

Subject Areas

- Computer software
- Database searching
- Genome evolution
- Multiple alignment c...
- Sequence alignment
- Sequence analysis
- Sequence databases
- Sequence motif anal...

Figure 1: An example benchmark alignment.

(A) Reference alignment of representative sequences of the p53/p63/p73 family, with the domain organization shown above

(B) the alignment (AD: activation domain, Oligo: oligomerization, SAM: sterile alpha motif). Colored blocks indicate conserved

(C) regions. The grey regions correspond to sequence segments that could not be reliably aligned and white regions indicate

(D) gaps in the alignment. (B) Different MSA programs produce different alignments, especially in the N-terminal region (boxe

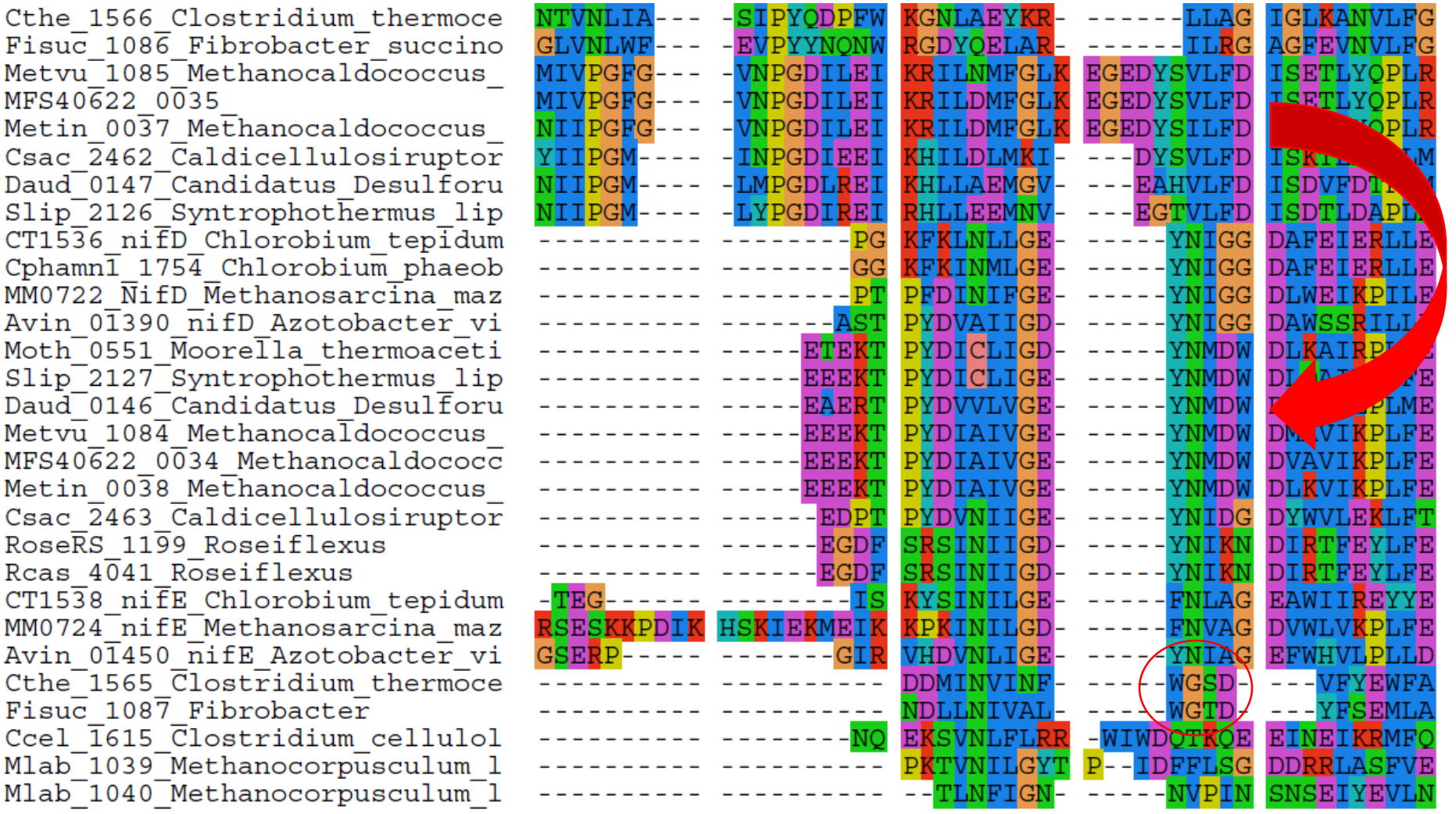
(E) d in red in A) containing rare motifs and a disordered proline-rich domain.

Esquema comparativo de notas

Alinhamentos múltiplos particularmente importantes podem ser editados manualmente

- A premissa é que um especialista será capaz de identificar alterações no AM que fazem mais sentido biológico
- O especialista em geral tem uma noção da estrutura das proteínas que estão alinhadas, o que nenhum programa de AM tem
- Algumas colunas podem não ser informativas, e deveriam ser removidas
  - sempre de acordo com o especialista!

O trecho indicado pela flecha poderia ser alvo de edição, para que os Ds ficassem alinhados

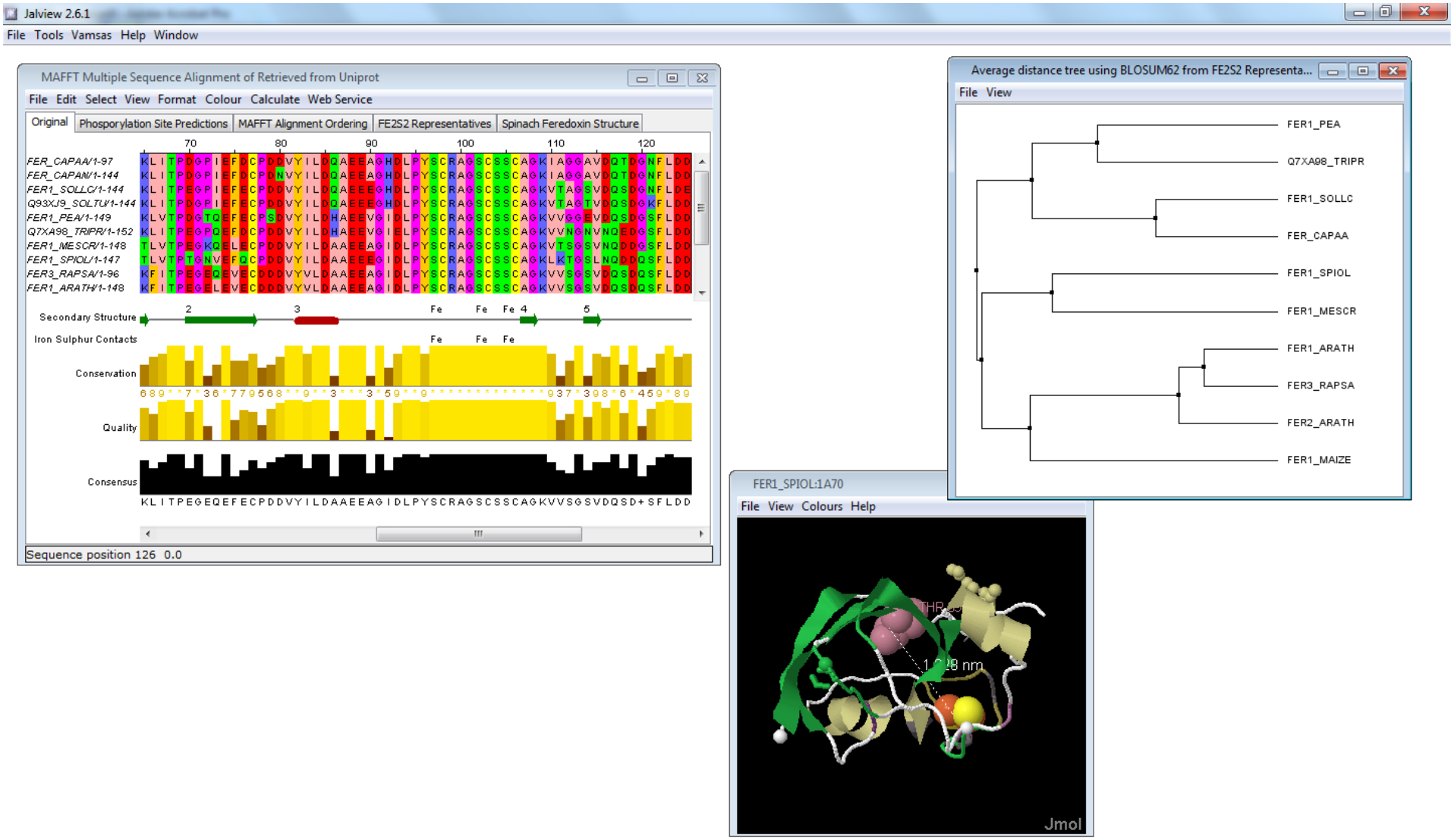


Edição manual de AMs

- **Jalview**
  - **www.jalview.org**
  - Waterhouse et al. *Bioinformatics* 2009 **25** (9) 1189-1191
- **Seaview**
  - http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html
    - Gouy M., Guindon S. & Gascuel O. (2010) *Molecular Biology and Evolution* **27(2)**:221-224

JALVIEW

http://www.jalview.org/



SeaView

Version 4.4.2

NEW: seaview drives the **Gblocks** program to select blocks of conserved sites.
NEW: seaview drives the **Clustal Ω** program to perform multiple sequence alignment.

SeaView is a multiplatform, graphical user interface for multiple sequence alignment and molecular phylogeny.

- SeaView reads and writes various file formats (NEXUS, MSF, CLUSTAL, FASTA, PHYLIP, MASE, Newick) of DNA and protein sequences and of phylogenetic trees.
- SeaView drives programs muscle or Clustal Omega for multiple sequence alignment, and also allows to use any external alignment algorithm able to read and write FASTA-formatted files.
- Seaview drives the Gblocks program to select blocks of evolutionarily conserved sites.
- SeaView computes phylogenetic trees by
  - parsimony, using PHYLIP's dnapars/protpars algorithm,
  - distance, with NJ or BioNJ algorithms on a variety of evolutionary distances,
  - maximum likelihood, driving program PhyML 3.0.
- SeaView prints and draws phylogenetic trees on screen, SVG, PDF or PostScript files.
- SeaView allows to download sequences from EMBL/GenBank/UniProt using the Internet.

Screen shots of the main alignment and tree windows. On-line help document. Old seaview version 3.2

Download SeaView

Mac Universal **MacOS X**	**32-bit Linux on x86** **64-bit Linux on x86_64**
MS Windows **self-extractible archive**	**Solaris on SPARC**
source code	

Note for Linux/Unix users: The downloaded archives contain the seaview executable itself, an example data file, a .html file, and 4 other programs (muscle, clustalo, phyml, Gblocks) that seaview drives. These 4 programs and the .html file can either be left in the same directory as seaview, or be put in any directory of your PATH.

Edição automática de AMs

- GBLOCKS
  - http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html
  - Castresana, J. (**2000**) **Molecular Biology and Evolution** 17, 540-552
- GUIDANCE
  - http://guidance.tau.ac.il/index.html
  - Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D. and Pupko, T. (2010). **GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores.** *Nucleic Acids Research, 2010 Jul 1; 38 (Web Server issue):W23-W28*; doi: 10.1093/nar/gkq443

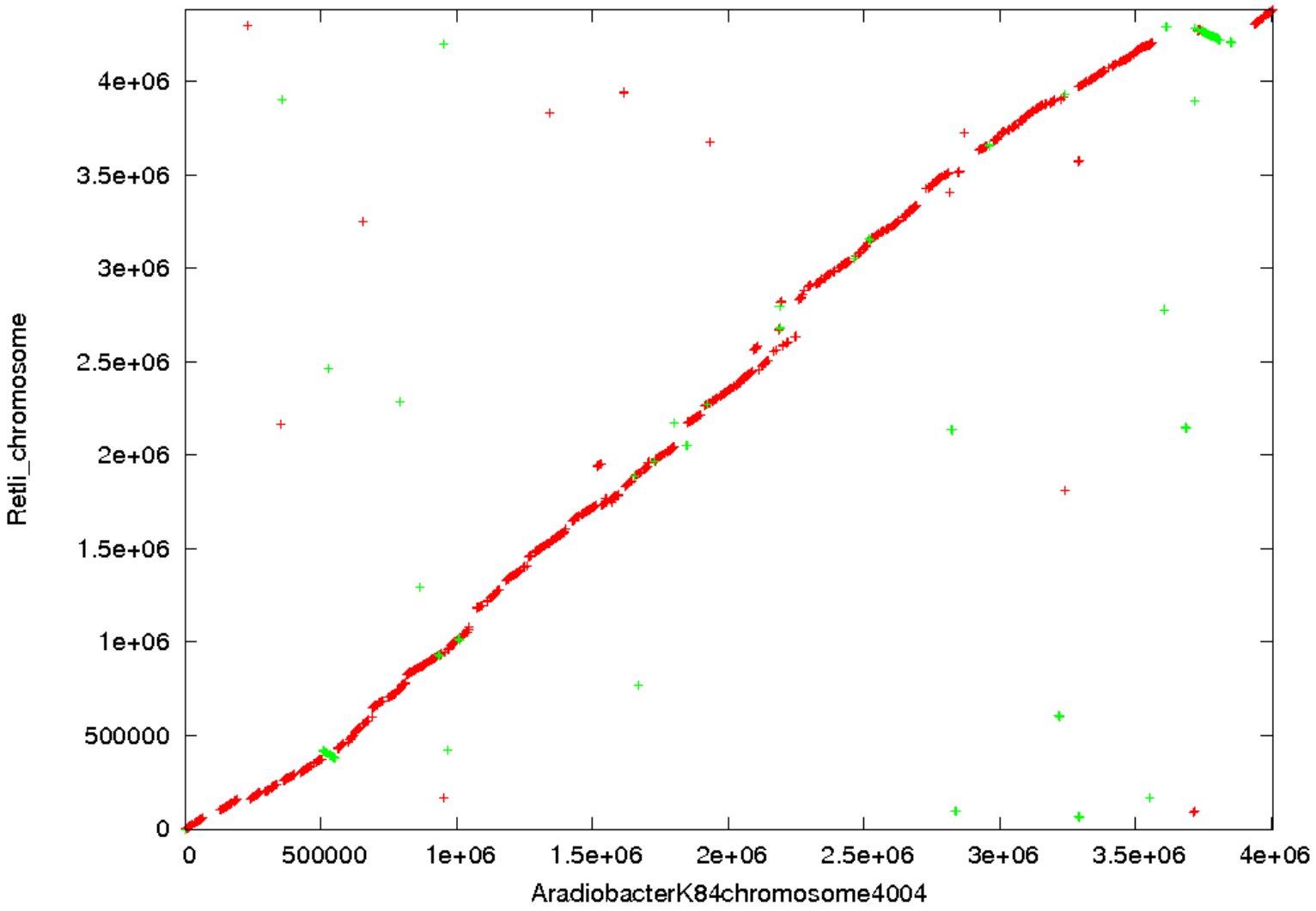
Existem diferentes formatos de alinhamentos múltiplos

- clustal, FASTA, MSF, NEXUS, PHYLIP
- Portanto é preciso cuidado quando se usa a saída de um programa de AM como entrada para um outro programa; os 2 programas tem que estar de acordo quanto ao formato!
- É em geral simples de se converter de um formato para outro
- http://molecularevolution.org/resources/fileformats/converting

Alinhamento entre sequências longas

- Por exemplo, cromossomos inteiros
- O cromossomo típico de uma bactéria tem 4 Mbp
- Cromossomo de humanos: algo como 300 Mbp

Este é um dotplot representando o alinhamento entre os cromossomos de duas bactérias: *Agrobacterium radiobacter* e *Rhizobium etli*



BLAST não serve para isso

- Mesmo computadores com centenas de GBytes de RAM não dão conta de rodar BLAST para essas entradas
- Problema não é tempo; é memória RAM
- Outras abordagens são necessárias

O programa MUMmer

- Delcher AL, Phillippy A, Carlton J, Salzberg SL. Fast algorithms for large-scale genome alignment and comparison. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 1;30(11):2478-83.
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 2004;5(2):R12
- http://mummer.sourceforge.net

Como MUMmer funciona

- It finds Maximal Unique Matches
- These are exact matches above a user-specified threshold that are unique
- Exact matches found are clustered and extended (using dynamic programming)
  - Result is approximate matches
- Data structure for exact match finding: suffix tree
  - Difficult to build but very fast
- Nucmer and promer
  - Both very fast
  - O(*n* + #MUMs), *n* = genome lengths
- Nucmer é para comparação de nucleotídeos
- Promer faz tradução nos 6 quadros de leitura de ambas as sequências (a la tblastx)

Árvore de sufixos para GTATCTAGG

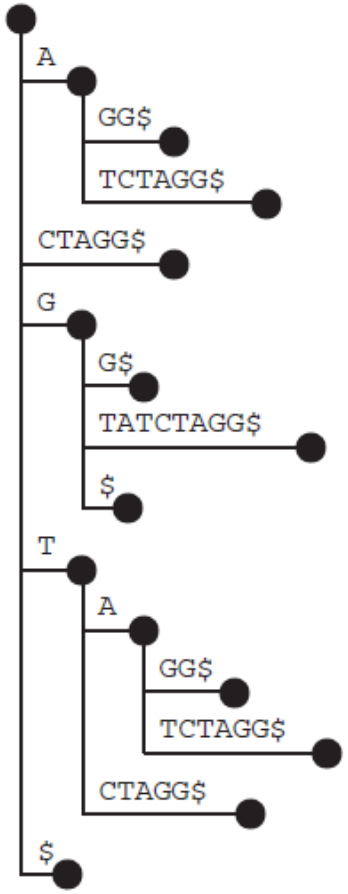


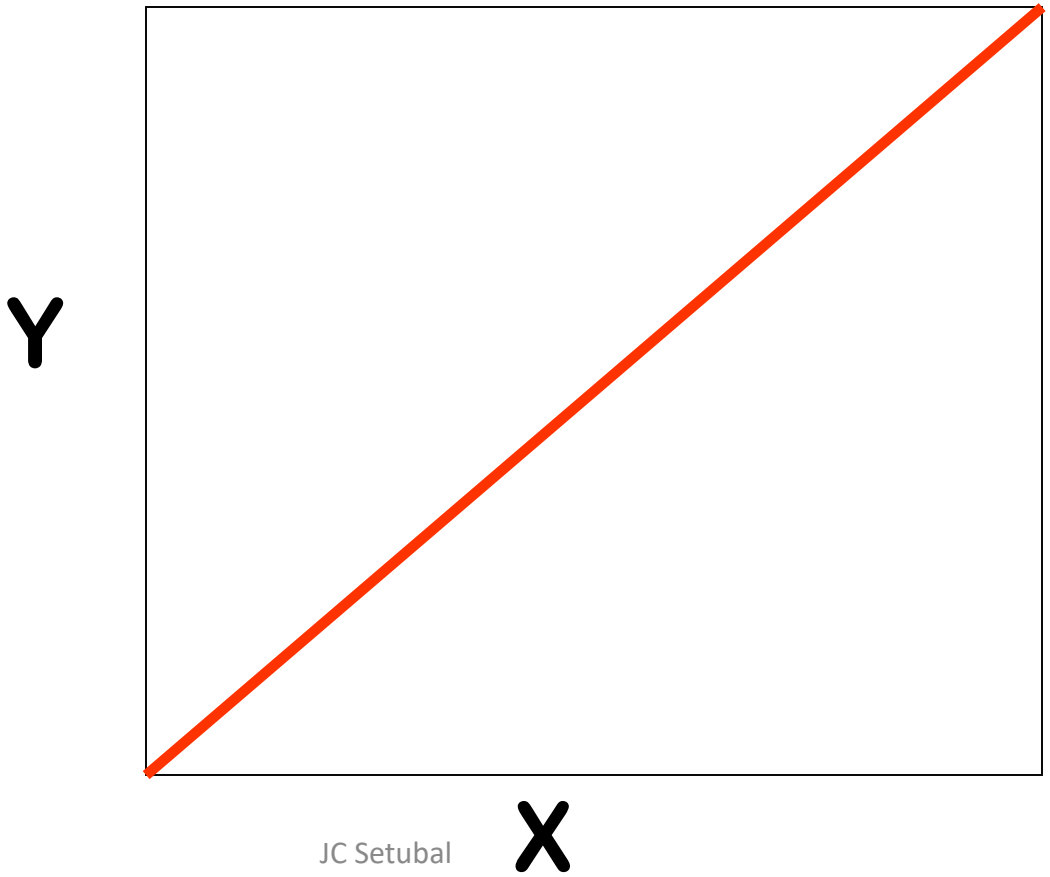
FIGURE 3.19

An example of a suffix tree for string GTATCTAGG. *A dollar sign marks the end of the string.*

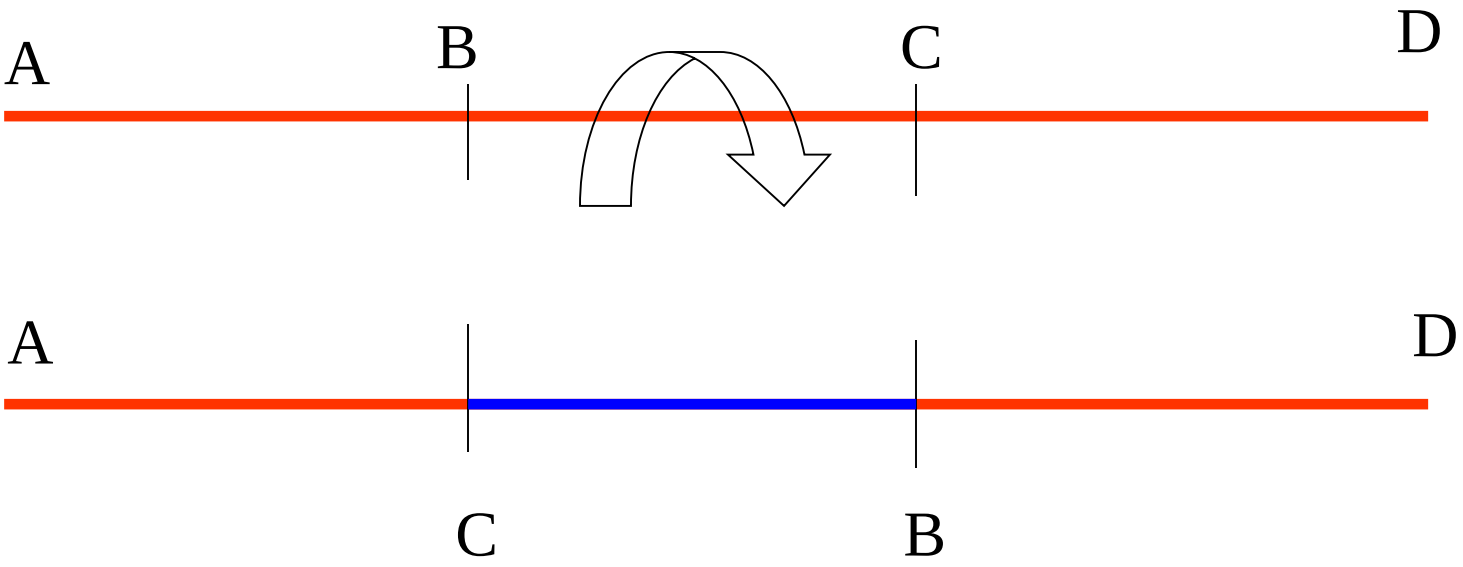
- Alinhamentos de cromossomos podem revelar rearranjos genômicos

Alinhamentos de cromossomos

Se as sequências (X e Y) fossem idênticas, veríamos isto num dotplot:

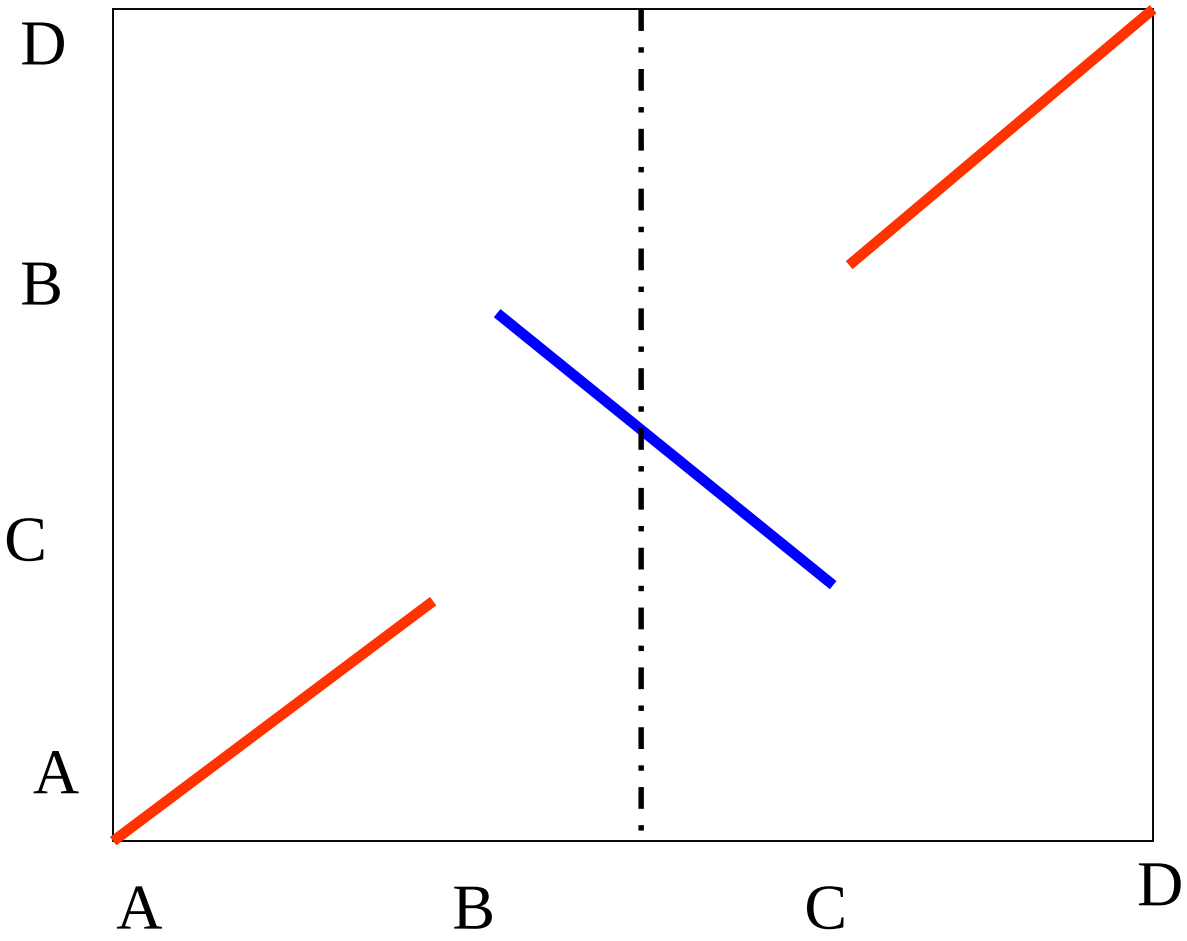


Suponha agora que houve uma inversão na sequência X



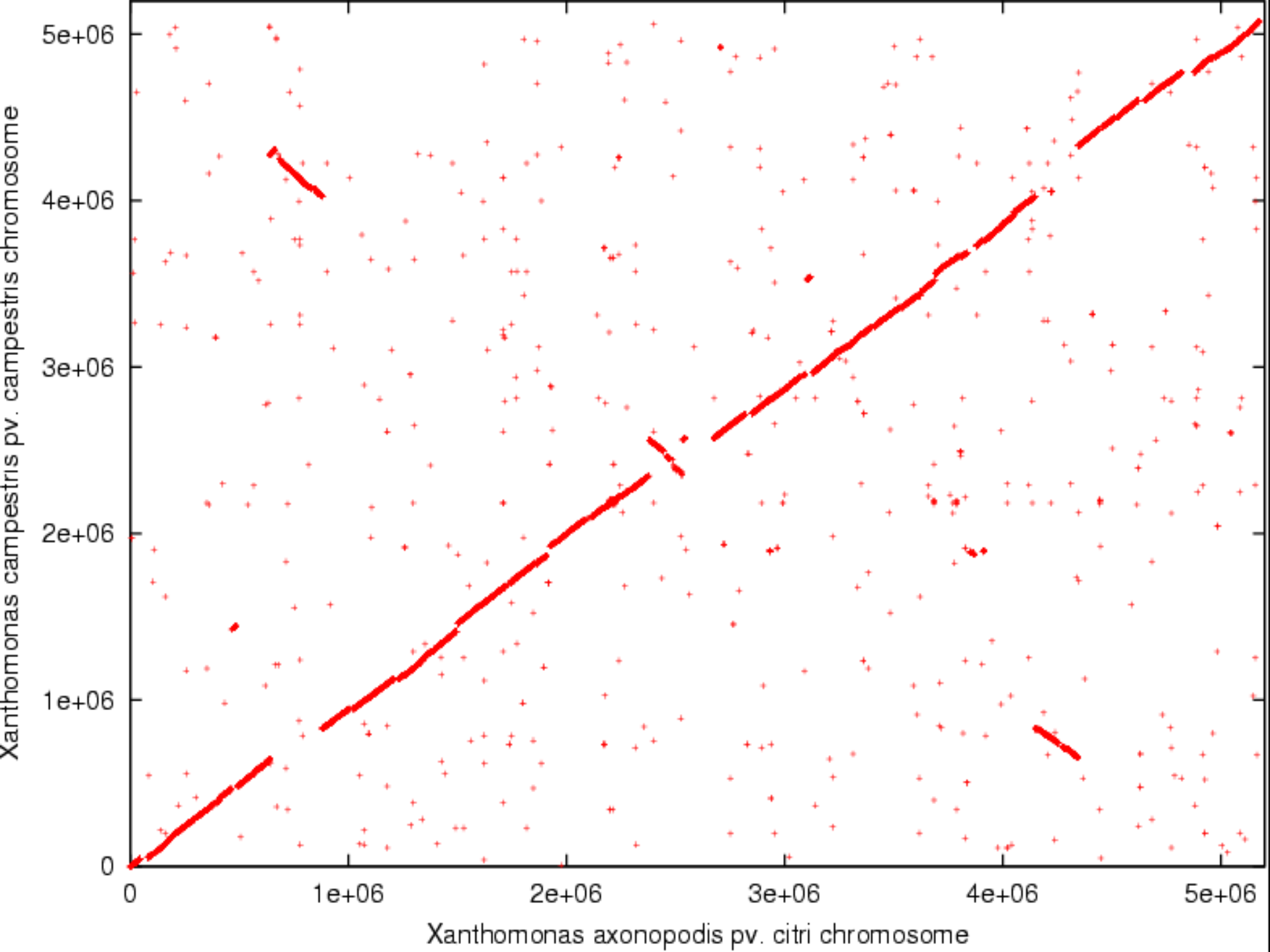
As letras são apenas rótulos para identificar posições ao longo das sequências

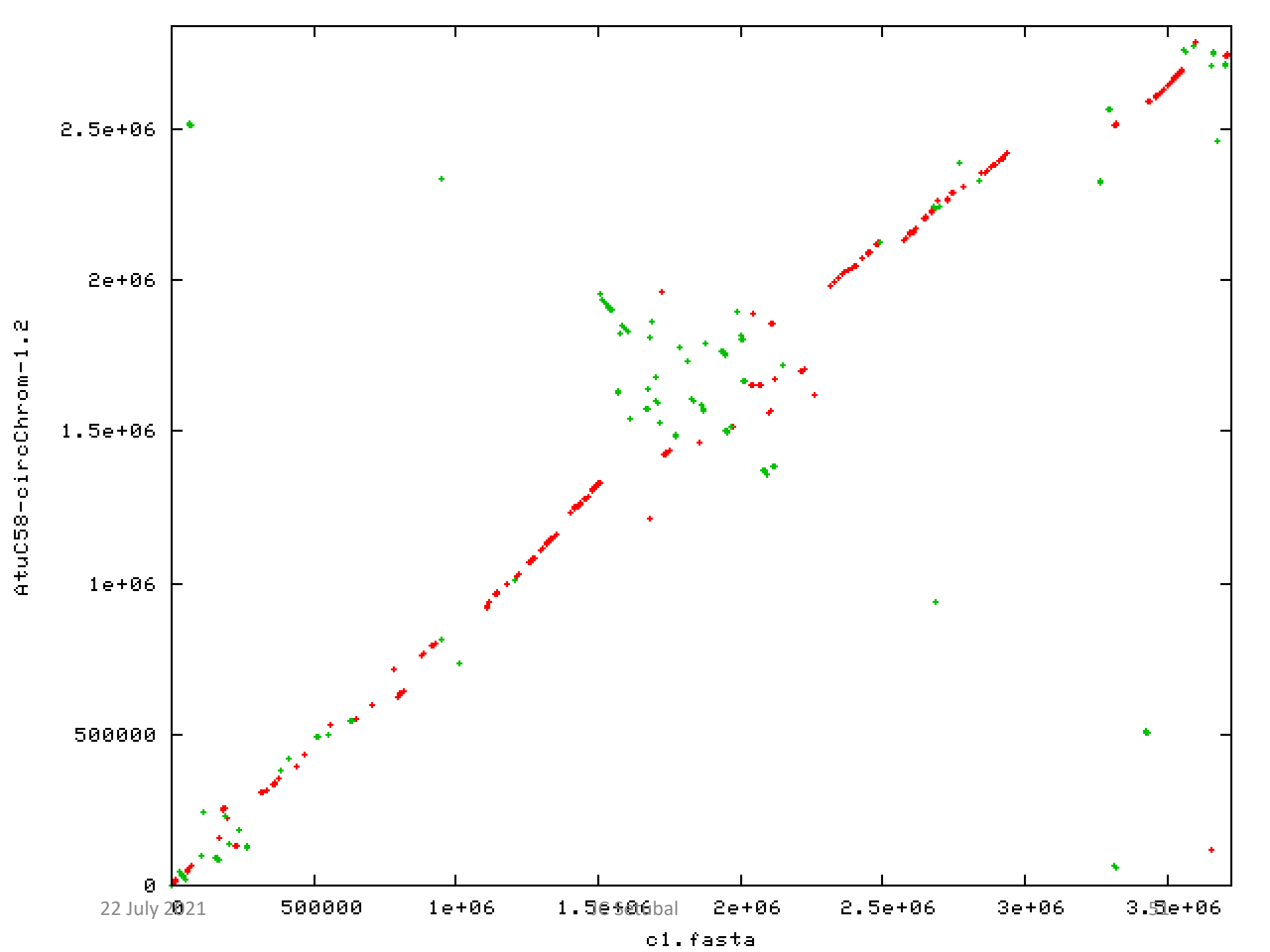
O dotplot entre X com inversão e Y ficaria assim

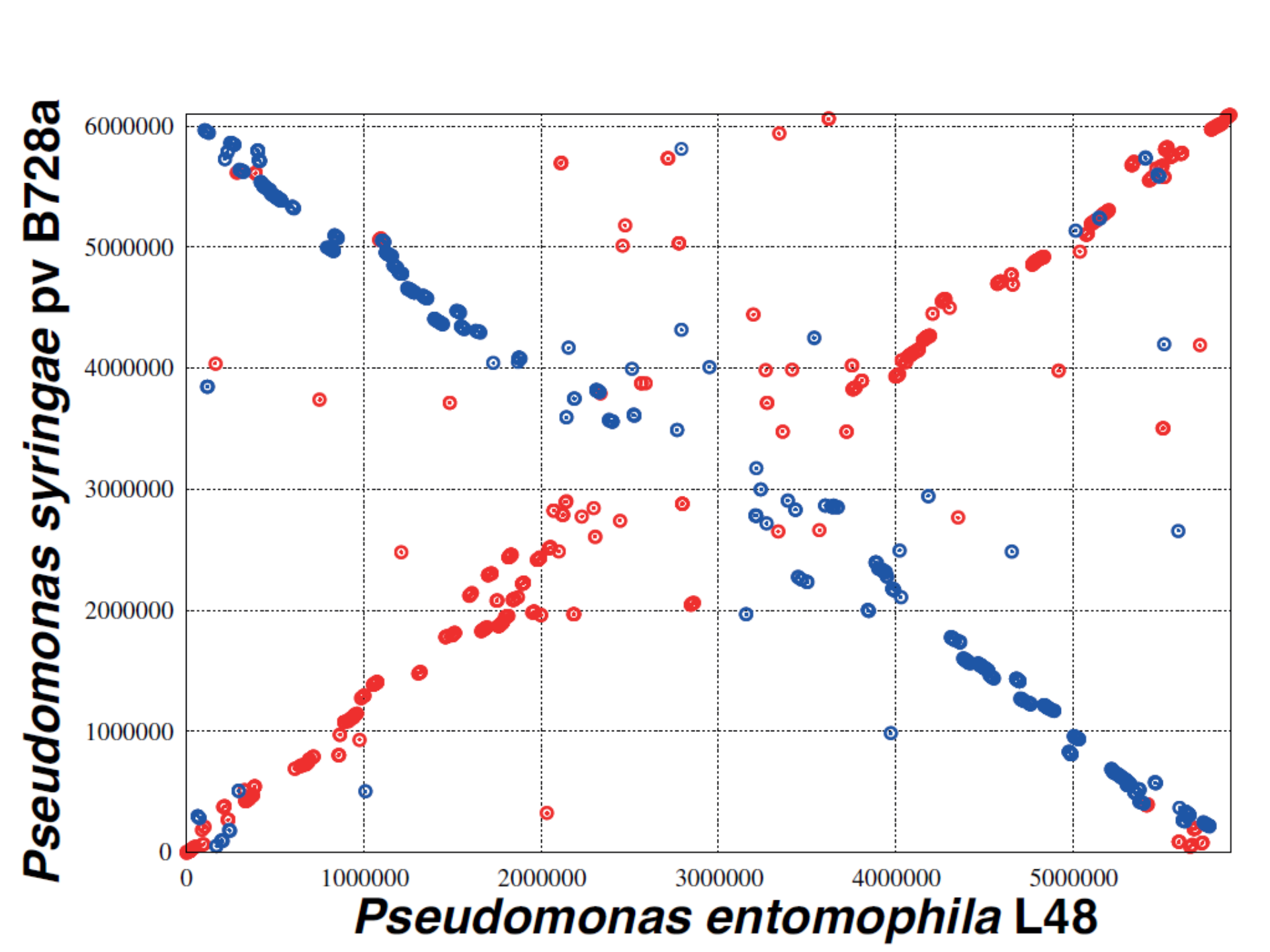


Such inversions seem to happen around the *origin* or *terminus of replication*

Vamos ver agora alguns exemplos de alinhamentos reais de cromossomos de diferentes bactérias

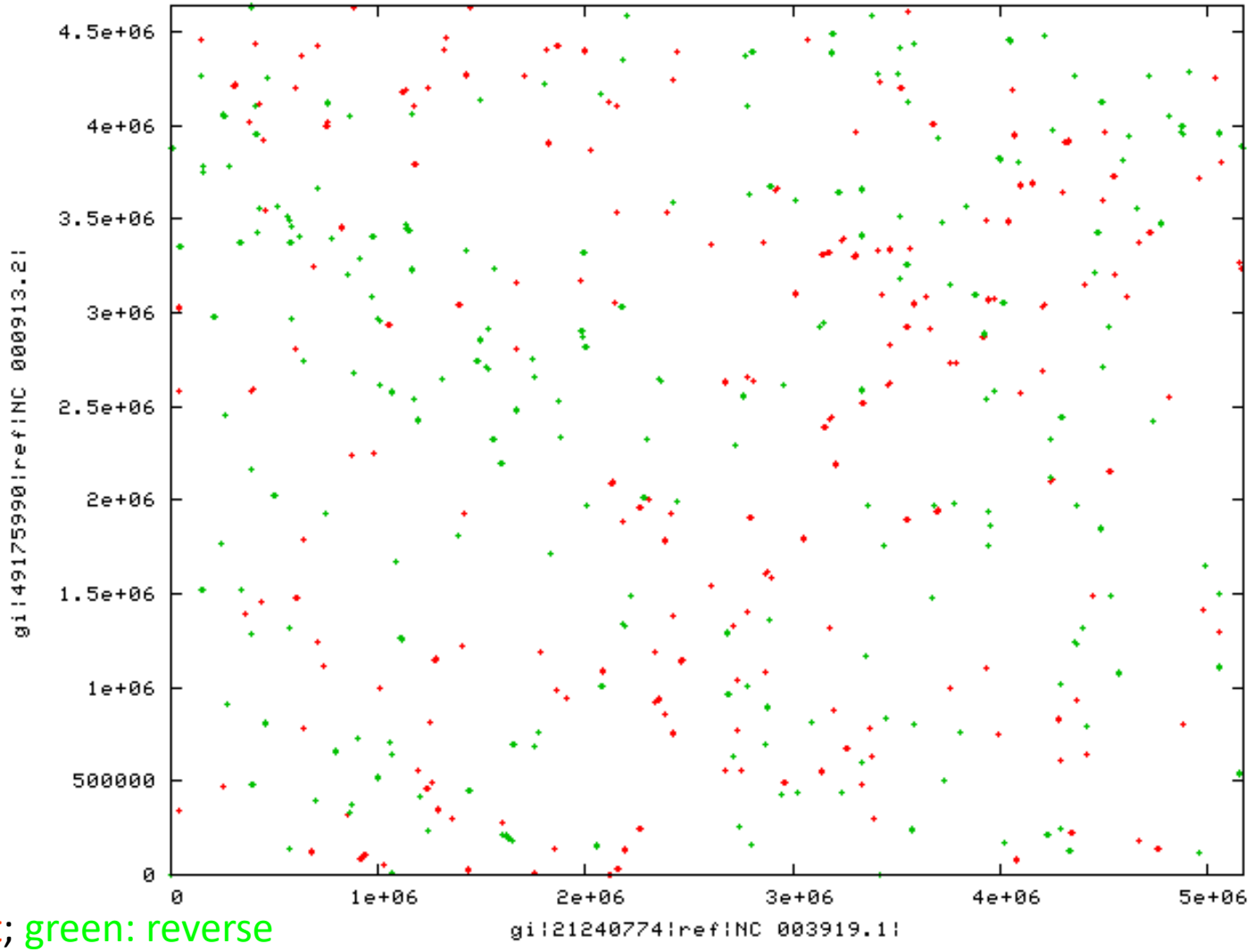

Xanthomonas campestris pv. campestris chromosome
5e+06
4e+06
3e+06
2e+06
1e+06
0
0
1e+06
2e+06
3e+06
4e+06
5e+06
Xanthomonas axonopodis pv. citri chromosome


AtuC58-circChrom-1.2
c1.fasta
0
500000
1e+06
1.5e+06
2e+06
2.5e+06
3e+06
3.5e+06


Pseudomonas syringae pv B728a
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
0
1000000
2000000
3000000
4000000
5000000
Pseudomonas entomophila L48

E. coli K12

Promer alignment



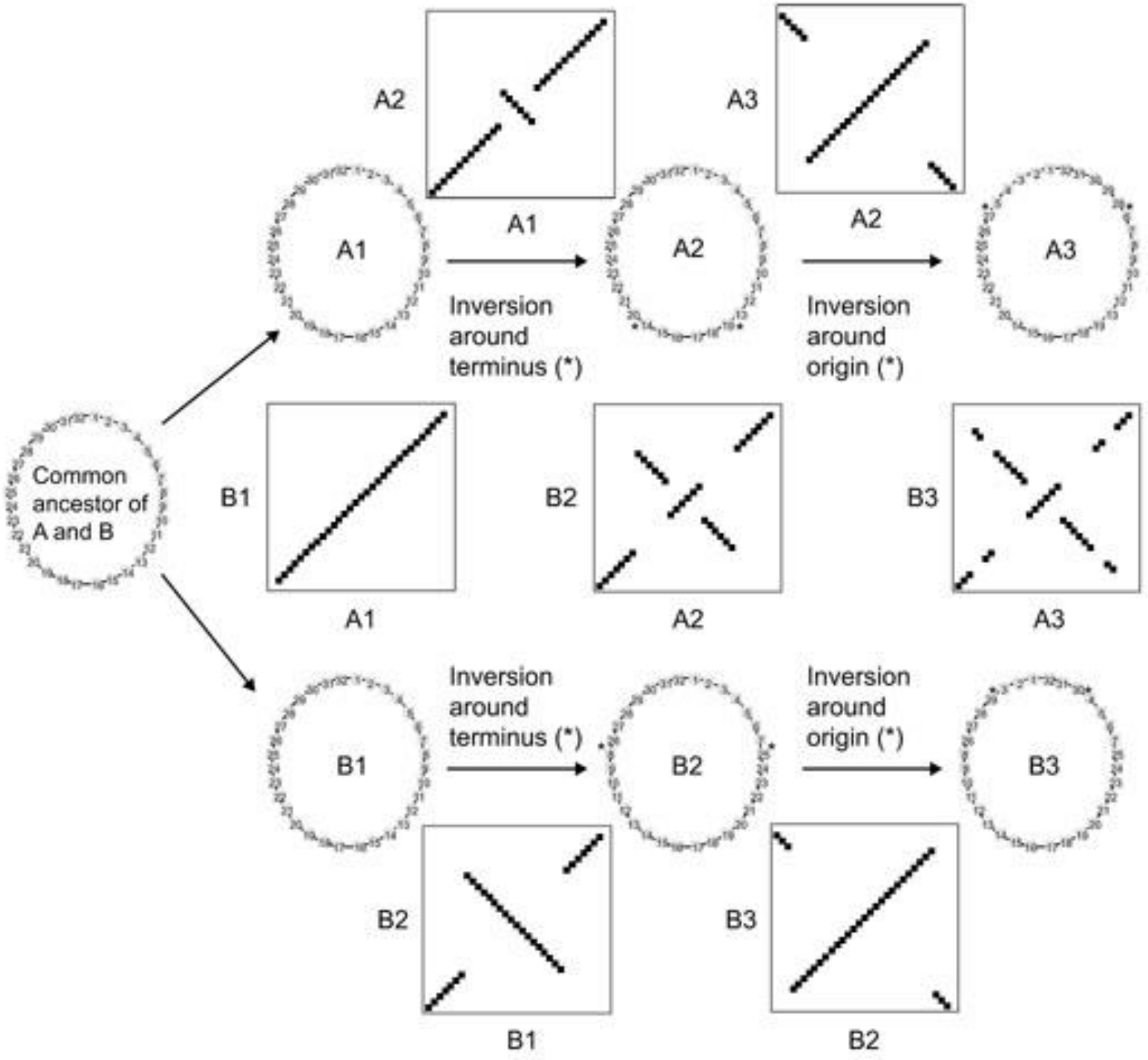
Red: direct; green: reverse

Both are γ proteobacteria!

Xanthomonas axonopodis* pv *citri

Observações

- Todos os alinhamentos menos o ultimo apresentam um padrão em X
- como explicar?
- J. Eisen et al. (2000) propuseram um modelo para explicar esse padrão
- Esse modelo supõe repetidas inversões ocorrendo nos cromossomos de espécies descendentes de um mesmo ancestral



Eisen JA, Heidelberg JF, White O, Salzberg SL. Evidence for symmetric chromosomal inversions around the replication origin in bacteria. *Genome Biol.* 2000;1(6):RESEARCH0011

E o último alinhamento?

- Aquele que alinhou *Xanthomonas citri* com *Escherichia coli*
- Resultou numa nuvem de pontos
- de acordo com o modelo, a explicação seria
  - houve tantas inversões nesses 2 cromossomos ao longo do tempo (milhões de anos), que o sinal da diagonal se perdeu totalmente