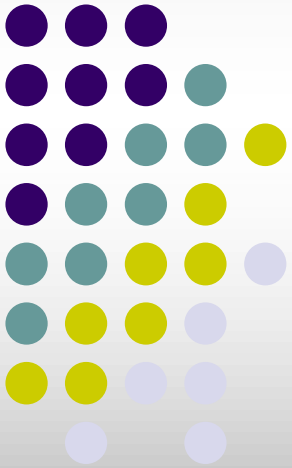
Ζευγαρωτή αντιστοιχία σειρών



Εισαγωγή

- Δύο αλληλουχίες DNA ή αλληλουχίες αμινοξέων (πρωτεΐνες) που είναι πολύ όμοιες πιθανόν να έχουν σχετιζόμενες λειτουργίες και επίσης μπορεί να σχετίζονται επειδή έχουν έναν κοινό πρόγονο.

- Μεγάλη η σημασία της σύγκρισης των αλληλουχιών (ιδίως πρωτεϊνικών σειρών) καθώς όμοιες αλληλουχίες έχουν σχετιζόμενες λειτουργίες ή / και προέρχονται από κοινό πρόγονο.

Εισαγωγή

Η διαδικασία αντιστοίχισης δύο αλληλουχιών (βάσεων ή αμινοξέων) ονομάζεται

sequence alignment (αντιστοιχία αλληλουχιών).

Όταν μια νέα αλληλουχία ανακαλύπτεται, η δομή και η λειτουργία της μπορούν εύκολα να προβλεφθούν κάνοντας αντιστοίχηση με γνωστές ήδη αλληλουχίες(sequence alignment).

- Δύο αλληλουχίες με κοινό πρόγονο θα εμφανίσουν παρόμοια δομή ή λειτουργία.
- Όσο μεγαλύτερη η ομοιότητα, τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα να έχουν κοινή δομή ή λειτουργία.

Εισαγωγή

- Σύγκριση πρωτοταγούς πρωτεϊνικής δομής (αλληλουχία αμινοξέων) vs. Σύγκριση δευτεροταγούς και τριτοταγούς πρωτεϊνικής δομής.
- Για τον προσδιορισμό της λειτουργίας μίας πρωτεΐνης βρίσκουμε μία ομόλογη αυτής σειρά, για την οποία να είναι γνωστή η λειτουργία της.
- Ως ομόλογες (**homologs**) χαρακτηρίζονται σειρές ή δομές οι οποίες έχουν προέλθει από ένα κοινό πρόγονο μέσα από την εξελικτική διαφοροποίηση.
- Η ομολογία (**homology**) δεν μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα, αλλά πρέπει να διαπιστωθεί μέσω της ομοιότητας των εν λόγω σειρών.

Ζευγαρωτή αντιστοιχία αλληλουχιών

Αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων

- Η αναζήτηση όμοιων αλληλουχιών σε βάσεις δεδομένων μας δίνει τη δυνατότητα
  - ανάκτησης αλληλουχιών, που είναι όμοιες με μια ζητούμενη (query) αλληλουχία, και επίσης τη δυνατότητα
  - ποσοτικοποίησης αυτής της ομοιότητας.

  - Το μέγεθος της ομοιότητας επιτρέπει την αναγνώριση
    - της δομής,
    - της λειτουργίας, ή
    - της οικογενείας της ζητούμενης αλληλουχίας.

Αντιστοιχία αλληλουχιών

- Μια από τις πιο χρήσιμες αναπαραστάσεις της ομοιότητας αλληλουχιών είναι η αντιστοιχία. Ας θεωρήσουμε ένα απλό παράδειγμα όπου θέλουμε να συγκρίνουμε τις δύο παρακάτω αλληλουχίες DNA:
  - X= A A T C T G A T A G A A G C C C T A
  - Y= C C A A T C C A G A A C G C C C A
- Μπορούμε να μετασχηματίσουμε την X σε Y (ή αντίστροφα) με μια σειρά απλών αλλαγών βάσεων, μεταλλάξεων ή επεμβατικών λειτουργιών. Οι επιτρεπτές λειτουργίες είναι:
  - Ομοιότητα (match): παραμένει η βάση αμετάβλητη
  - Μη- ομοιότητα (mismatch): αντικατάσταση μιας βάσης από διαφορετική βάση (συντηρητική αντικατάσταση)
  - Κενό (gap): εισαγωγή / διαγραφή μιας βάσης

- Μια αντιστοιχία της X και Y είναι η απεικόνιση των επεμβατικών λειτουργιών, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον μετασχηματισμό μιας σειράς σε μια άλλη.

- Υπάρχει μεγάλος αριθμός πιθανών αντιστοιχιών της X κα Y, που αντιστοιχούν σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς όπου οι αλληλουχίες θα μπορούσαν να αποκλίνουν από μια κοινή προγονική αλληλουχία. Μια τέτοια αντιστοιχία είναι η παρακάτω:

X	**-**	**-**	**A**	**A**	**T**	**C**	**T**	**G**	**A**	**T**	**A**	**G**	**A**	**A**	**G**	**C**	**C**	**C**	**T**	**A**
			:	**:**	**:**	**:**		**:**	**:**	*****	**:**		**:**	*****	**:**	**:**	**:**	**:**		**:**
Y	**C**	**C**	**A**	**A**	**T**	**C**	**-**	**G**	**A**	**G**	**A**	**-**	**A**	**C**	**G**	**C**	**C**	**C**	**-**	**A**
Θέση	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Όπου,

: σημαίνει ομοιότητα

***** σημαίνει μη-ομοιότητα

- σημαίνει κενό λόγω της εισαγωγής μιας βάσης σε μια αλληλουχία, ή αντίστοιχα η διαγραφή μιας βάσης στην άλλη αλληλουχία.

- Σύμφωνα με την παραπάνω αντιστοιχία, για τον μετασχηματισμό της X στην Y θα πρέπει να γίνει:
  - Αντικατάσταση της G από T στη θέση 10
  - Αντικατάσταση της A από C στη θέση 14
  - Εισαγωγή της C στις θέσεις 1, 2
  - Διαγραφή της T στις θέσεις 7, 19
  - Διαγραφή της G στην θέση 12
- Οπότε η αντιστοιχία περιέχει 13 ομοιότητες, 2 μη-ομοιότητες και 5 κενά.
- Το συνολικό μήκος της αντιστοιχίας είναι 20 και η ομολογία (13/20)x100=65%.

- Για οποιοδήποτε ζεύγος αλληλουχιών θα υπάρχουν πολλαπλές δυνατές αντιστοιχίες. Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας μερικές διαφορετικές επεμβατικές λειτουργίες, μια εναλλακτική αντιστοιχία για τις παραπάνω σειρές X και Y είναι η παρακάτω:

X		-	-	A	A	T	C	T	G	A	T	A	G	A	A	-	G	C	C	C	T	A
				:	:	:	:		:			:	:	:	:		:	:	:	:		:
Y		C	C	A	A	T	C	-	G	-	-	A	G	A	A	C	G	C	C	C	-	A
Θέση	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	

- Η οποία περιέχει 14 ομοιότητες, 0 αντικαταστάσεις και 7 κενά.

- Τώρα το μήκος της αντιστοιχίας είναι 21 και το ποσοστό ομολογίας έχει αυξηθεί σε (14/21)x100=66.7%.

- Για οποιοδήποτε ζεύγος αλληλουχιών θα υπάρχουν πολλαπλές δυνατές αντιστοιχίες, που μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$\binom{n+m}{m} \quad \frac{(m+n)!}{(m!)^2} \approx \frac{2^{m+n}}{\sqrt{\pi m}}$$

Για δύο αλληλουχίες μήκους n

n	Αριθμός αντιστοιχίσεων
10	184,756
20	$1.40e^{11}$
100	$9.00e^{58}$

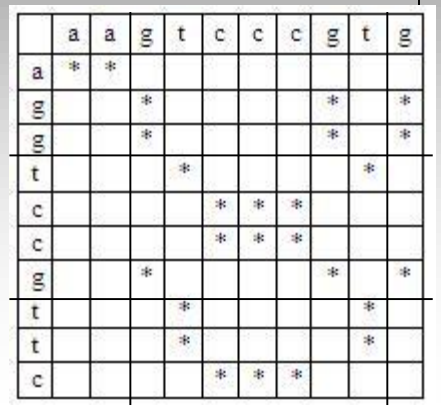
Διάγραμμα ακίδων (Dot plots)

Το διάγραμμα ακίδων είναι μια γραφική παράσταση της ομοιότητας δύο αλληλουχιών.

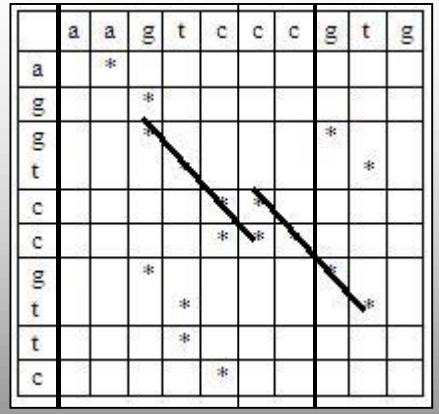
(i) Ας θεωρήσουμε δύο σειρές, Α και Β, με διαφορετικά μήκη. Σε ένα διάγραμμα ακίδων, δημιουργούμε έναν ορθογώνιο πίνακα όπου π.χ. οι βάσεις της Α τοποθετούνται πάνω στο χ-άξονα και οι βάσεις της Β πάνω στο y-άξονα

Τα κελιά του πίνακα για τα οποία ισχύει Ai=Bj παίρνουν την τιμή 1 αλλιώς την τιμή 0. τα κελία αυτά έχουν σημαδευτεί με ακίδα / αστερίσκο.

- Τα κοινά τμήματα αναπαρίστανται στον πίνακα σαν διαγώνιες.
- Οι εισαγωγές και ο διαγραφές εμφανίζονται σαν διακοπές στη διαγώνιο.
- Περιοχές με τοπική αντιστοίχηση αναπαριστώνται με μικρές διαγωνίους.

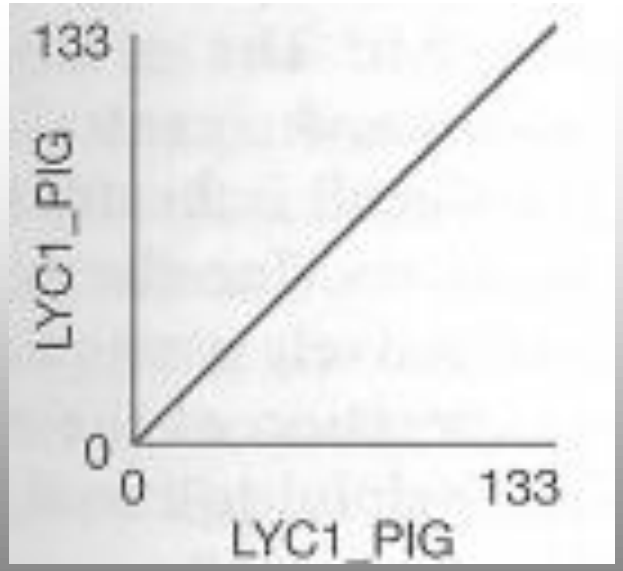


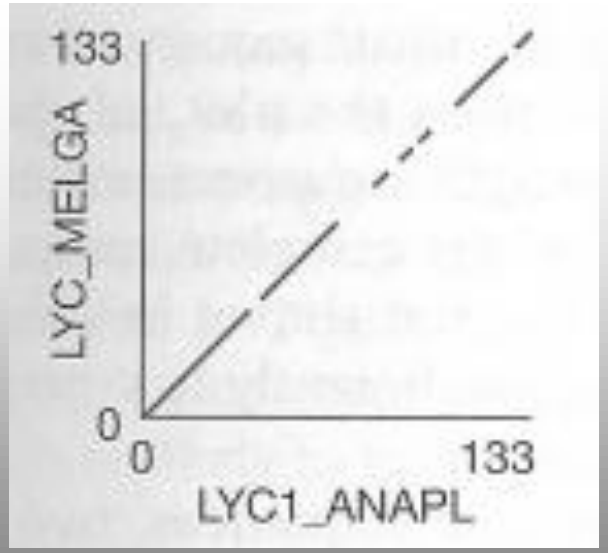
(ii) Μόνο τα κελιά τα οποία αντιστοιχούν σε tuples δύο και τεσσάρων βάσεων έχουν σημαδευτεί και έχει επισημανθεί το βέλτιστο μονοπάτι - αντιστοίχηση.

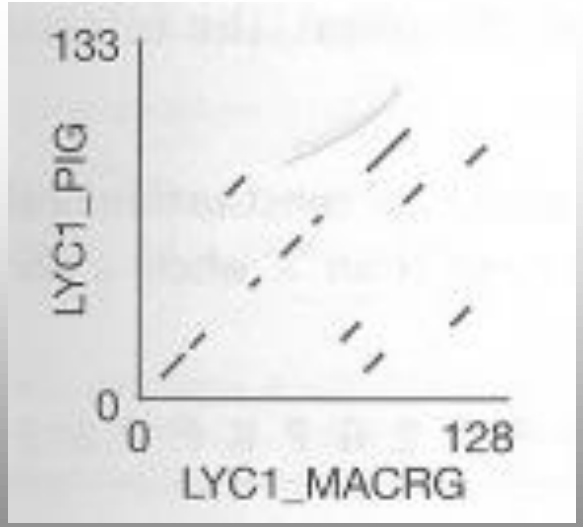


Σημείωση : *k-tuple* είναι μία σειρά από *k residues* μέσα σε μία σειρά. Π.χ., ένα *2-tuple* αντιστοιχεί σε δύο συνεχόμενα residues

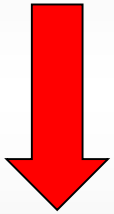
- Δύο πανομοιότυπες αλληλουχίες απεικονίζονται με μία απλή συνεχόμενη διαγώνια γραμμή κατά μήκος του διαγράμματος.
- Δύο παρόμοιες αλληλουχίες θα απεικονίζονται με μια διακεκομμένη διαγώνια γραμμή, όπου οι περιοχές με τις διακοπές δηλώνουν μη-ομοιότητα.
- Δύο διαφορετικές αλλά σχετιζόμενες αλληλουχίες θα απεικονίζονται από διαγώνιες ομάδες ακίδων, παράλληλες με την κεντρική διαγώνιο.







Ποια είναι η καλύτερη αντιστοιχία (ή το καλύτερο μονοπάτι);



ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΩΝ

Βαθμολόγηση ζευγαρωτής αντιστοιχίας: το κόστος της μετατροπής της μίας αλληλουχίας στην άλλη

Τι πρέπει να λάβουμε υπόψη από την βιολογία;

Οι αλλαγές οι οποίες παρουσιάζονται ανάμεσα σε δύο ομόλογες σειρές κατά την πορεία της εξέλιξης, οφείλονται σε:

- μεταλλάξεις (**mutations**)
  - αντικαταστάσεις (**substitutions**) βάσεων (DNA ή RNA), ή αμινοξέων (πρωτεΐνες)
  - **gaps/indels**
    - εισαγωγές (**insertions**) βάσης ή αμινοξέως
    - διαγραφές (**deletions**) βάσης ή αμινοξέως
- φυσική επιλογή (**selection**).

Βαθμολόγηση ζευγαρωτής αντιστοιχίας: το κόστος της μετατροπής της μίας αλληλουχίας στην άλλη

Ανάγκη για δημιουργία μοντέλων βαθμολόγησης που θα λάβουν υπόψη:

- Κόστος μεταλλάξεων
- Κόστος εισαγωγών/διαγραφών
- Επιβράβευση αντιστοιχήσεων

Scoring model for sequence alignment

Απλό scoring model:

επιμέρους βαθμοί που αποδίδονται για κάθε αντιστοίχηση βάσεων/αμινοξέων μεταξύ των δύο σειρών (θετικός όρος) + επιμέρους βαθμοί που αποδίδονται για κάθε κενό στις σειρές (αρνητικός όρος)

Παράδειγμα

- **1ο βήμα:**

  Εντοπίζουμε τις ακριβείς αντιστοιχίες μεταξύ των δύο σειρών και αποδίδουμε βαθμολογία στην καθεμία.

  ACCGG**TATC**C - - - **GAC**
  : : : : : : : * : : :
  ACC - - **TATC**T**TAGGAC**

- **2ο βήμα:**

  Εντοπίζουμε τις συντηρητικές αντικαταστάσεις και αποδίδουμε σε αυτές τους ανάλογους βαθμούς.

  ACCGGTATC**C** - - - GAC
  : : : : : : : ***** : : :
  ACC - - TATC**T**TAGGAC

- **3ο βήμα:**

  Αποδίδουμε την κατάλληλη βαθμολογία (ή ποινή) σε κάθε κενό ή εισαγωγή στις σειρές. Το μήκος ενός κενού είναι ο αριθμός των indels που το αποτελούν. Στο απλό αυτό παράδειγμα συναντούμε δύο κενά (ένα κενό σε κάθε σειρά), μήκους 2 και 3.

  ACC**GG**TATCC - - - GAC
  : : : : : : : * : : :
  ACC - - TATCT**TAG**GAC

Βαθμολόγηση / Ποινές κενών (Gap penalties)

Πολύ σημαντική διαδικασία η επιλογή του τρόπου βαθμολόγησης των κενών σε μία σειρά.

Τα κενά αυξάνουν την αβεβαιότητα στην αντιστοίχηση. Από βιολογικής απόψεως θεωρείται πιο εύκολο για μία πρωτεΐνη να 'δεχθεί' την αντικατάσταση ενός residue σε μία θέση, αντί για την εισαγωγή ή διαγραφή τμημάτων της αλληλουχίας. Επομένως τα κενά (gaps)/ εισαγωγές (insertions) θα έπρεπε να είναι πιο σπάνια από τις αντικαταστάσεις.

Αυθαίρετη εισαγωγή κενών χωρίς ποινή θα σήμαινε τελικά να προκύπτει αντιστοιχία μεταξύ οποιονδήποτε σειρών, ακόμα και μεταξύ σειρών τελείως άσχετων μεταξύ τους.

Πρέπει να λαμβάνεται υπόψην η εκάστοτε περίπτωση:

- κενά σε introns vs. κενά σε exons
- κενά που συναντώνται σε περιοχές κωδικοποίησης μίας πρωτεΐνης, κ.ο.κ.

Βαθμολόγηση / Ποινές κενών (Gap penalties)

Τρόποι βαθμολόγησης κενών:

- **Σταθερός (constant)** : βαθμολόγηση / αξιολόγηση κενού ανεξάρτητη από το μήκος του
- **Καθορισμένος (affine)** : ποινή ανοιχτού κενού – **gap open penalty**(ποινή για το πρώτο residue κάθε νέου κενό στη σειρά) & ποινή κενού επέκτασης – **gap extension penalty** (ποινή για κάθε επιπλέον residue στο κενό)
- **Κυρτός (convex)** : κάθε επιπλέον κενό συμβάλει σε μικρότερο βαθμό στην ολική / τελική βαθμολογία
- **Αυθαίρετος (arbitrary)** : κάποια αυθαίρετη συνάρτηση βασιζόμενη στο μήκος του εκάστοτε κενού

  Π.χ., συνάρτηση της μορφής: $\gamma(g) = -gd$,

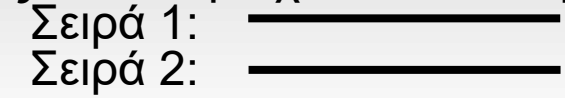
  όπου : g: μήκος του κενού,

  d: σταθερά και

  γ(g): βαθμολογία του κενού συναρτήσει του μήκους του.

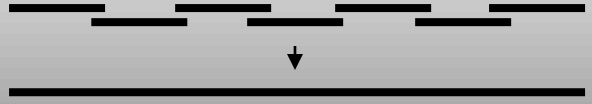
Είδη αντιστοίχησης (Alignment types)

- **Καθολική αντιστοίχηση** δύο σειρών (**global alignment**). Η αντιστοίχηση αυτή χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου οι σειρές έχουν ακριβώς το ίδιο ή σχεδόν το ίδιο μήκος.



- **Τοπική αντιστοίχηση** δύο σειρών (**local alignment**). Χρησιμοποιείται για την εύρεση κοινών υποσειρών μέσα στις σειρές.

- **Αντιστοίχηση με ελεύθερα άκρα (Ends free alignment)**. Για την εύρεση ενώσεων (joins) / επικαλύψεων (overlaps).



Δυναμικός προγραμματισμός

- Στην αντιστοιχία σειρών, η καλύτερη αντιστοιχία, ή το καλύτερο μονοπάτι, μπορεί να βρεθεί χρησιμοποιώντας

ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟ.

- Εντοπίζει την αντιστοιχία με ποσοτικό τρόπο καθώς δίνει βαθμολογία (πίνακας βαθμολόγησης) σε σχέση με την εφαρμογή του διαγράμματος ακίδων.

Δυναμικός προγραμματισμός

Τι είναι ο δυναμικός προγραμματισμός;

- μια τεχνική βελτιστοποίησης για την ανάλυση βαθμολογημένων πινάκων, ο οποίος βρίσκει το υψηλότερα βαθμολογημένο μονοπάτι σε ένα πίνακα, δηλ. βρίσκει την καλύτερη αντιστοιχία μεταξύ δύο σειρών.

- Μεταξύ δύο σειρών που φαίνονται διαφορετικές, συχνά υπάρχουν πολλαπλές δυνατές αντιστοιχίες.

- Ο δυναμικός προγραμματισμός επιτρέπει τον έλεγχο διαφορετικών μονοπατιών που αντιστοιχούν σε διαφορετικές αντιστοιχίες με υψηλή ομολογία (βαθμολόγηση), συνυπολογίζοντας διάφορες παραμέτρους (π.χ. κυρώσεις από κενά).

  Στην ουσία, προσπαθεί να ταιριάξει τον μέγιστο αριθμό από ζεύγη πανομοιότυπων βάσεων ή αμινοξέων αλλά και ταυτόχρονα επιτρέποντας το ελάχιστο αριθμό εισαγωγών και διαγραφών σε δύο σειρές,

- Στο τέλος, επιλέγεται το καλύτερο από όλα τα μονοπάτια, ως η τελική αντιστοιχία.

Δυναμικός προγραμματισμός
Αλγόριθμος Needleman – Wunsch

- Ο αλγόριθμος Needleman – Wunsch είναι αλγόριθμος δυναμικού προγραμματισμού ο οποίος χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις *καθολικής αντιστοίχησης δύο σειρών.*
- Καθολική αντιστοίχηση = Συμπεριλαμβάνει **όλες** τις βάσεις και από τις δύο σειρές στην αντιστοίχηση και στην βαθμολόγηση.
- Τα κενά προστίθενται στο εσωτερικό, ή στα άκρα κάθε σειράς με αποτέλεσμα το μήκος των δύο σειρών (βάσεις + κενά) να είναι ακριβώς το ίδιο.
- Κάθε βάση ή κενό στην κάθε σειρά αντιστοιχίζεται με μία βάση ή κενό στην άλλη σειρά.
- Η βασική ιδέα του αλγορίθμου είναι να χτιστεί η βέλτιστη αντιστοίχηση χρησιμοποιώντας προηγούμενες λύσεις από βέλτιστες αντιστοιχίσεις μικρότερων υποσειρών.

Αλγόριθμος Needleman – Wunsch

Ας υποθέσουμε τώρα πως έχουμε δύο σειρές *S* και *T*.

- Η σειρά *S* αποτελείται από *n* βάσεις, επομένως έχει μήκος *n*, και η σειρά *T* αποτελείται από *m* βάσεις (έχει λοιπόν μήκος *m*).
- Συμβολίζουμε την αντιστοίχηση μεταξύ της βάσης *i* στη σειρά *S* με τη βάση *j* στη σειρά *T* ως: (*Si*, *Tj*).
- Η βαθμολογία στην περίπτωση αυτή συμβολίζεται ως: σ(*Si*, *Tj*) και για mismatch είναι σ(*Si*, *Tj*) = -1, ενώ για match είναι σ(*Si*, *Tj*) = 2.
- Συμβολίζουμε την αντιστοίχηση μεταξύ της βάσης *i* στη σειρά *S* με ένα κενό στη σειρά *T* ως: (*Si*, -).
- Θέτουμε μία αυθαίρετη ποινή για τα κενά της τάξης του -1 για κάθε indel.
- Η βαθμολογία στην περίπτωση αυτή συμβολίζεται ως: σ(*Si*, -) = -1.

Αλγόριθμος Needleman – Wunsch

- Για πίνακα βαθμολόγησης, φτιάχνουμε ένα πίνακα διαστάσεων n+1 επί m+1.

- Η βαθμολογία για κάθε κελί του πίνακα υπολογίζεται αναδρομικά, με βάση τις βαθμολογίες των γύρω και προηγούμενων από αυτό κελιών, βρίσκοντας τη βέλτιστη επιλογή ανάμεσα σε αυτά η οποία αναπαριστά είτε κενό, είτε επιτυχία / αποτυχία αντιστοίχησης.

  Ας δούμε ένα παράδειγμα εφαρμογής του αλγορίθμου:

Παράδειγμα Needleman – Wunsch

- Έχουμε τις ακόλουθες δύο σειρές :

  S = ACCGGTAT

  T = ACCTATC

- Μήκος της σειράς S : n = 8

  Μήκος της σειράς T : m = 7

  Τα δύο μήκη είναι σχεδόν τα ίδια, επομένως μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε καθολική αντιστοίχηση.

- Φτιάχνουμε τον πίνακα V διαστάσεων (n+1=)9 επί (m+1=)8.

- Ορίζουμε την τιμή του στοιχείου V(0,0) = 0.

- Η πρώτη γραμμή και η πρώτη στήλη συμπληρώνονται σαν να προσθέταμε διαδοχικά κενά και στις δύο σειρές. Η γραμμή 0 και η στήλη 0 του πίνακα αναπαριστούν το κόστος που θα είχαμε προσθέτοντας διαδοχικά κενά και στις δύο σειρές κατά την έναρξη της αντικατάστασης.

Παράδειγμα Needleman – Wunsch

Πίνακας διαστάσεων 9x8 :

		A	C	C	G	G	T	A	T	***(S)***
	0 →	-1 →	-2 →	-3 →	-4 →	-5 →	-6 →	-7 →	-8	
A	-1 ↓									
C	-2 ↓									
C	-3 ↓									
T	-4 ↓									
A	-5 ↓									
T	-6 ↓									
C	-7									
(T)										

Παράδειγμα Needleman – Wunsch

- Η βαθμολογία για κάθε κελί του πίνακα υπολογίζεται αναδρομικά, με βάση τις βαθμολογίες των γύρω και προηγούμενων από αυτό κελιών, βρίσκοντας τη βέλτιστη επιλογή ανάμεσα σε αυτά η οποία αναπαριστά είτε κενό, είτε επιτυχία / αποτυχία αντιστοίχησης.

- Συμπληρώνουμε τον υπόλοιπο πίνακα κινούμενοι γραμμή – γραμμή από πάνω αριστερά προς κάτω δεξιά.

- Γνωρίζοντας τις τιμές των $V(i-1, j-1)$, $V(i-1, j)$ και $V(i, j-1)$ μπορεί να υπολογιστεί η τιμή του $V(i, j)$, η οποία δίδεται ως εξής:

$$V(i,j) = \max \begin{cases} V(i-1,j-1) + \sigma(Si, Tj) \\ V(i-1,j) + \sigma(Si, -) \\ V(i,j-1) + \sigma(-, Tj) \end{cases}$$

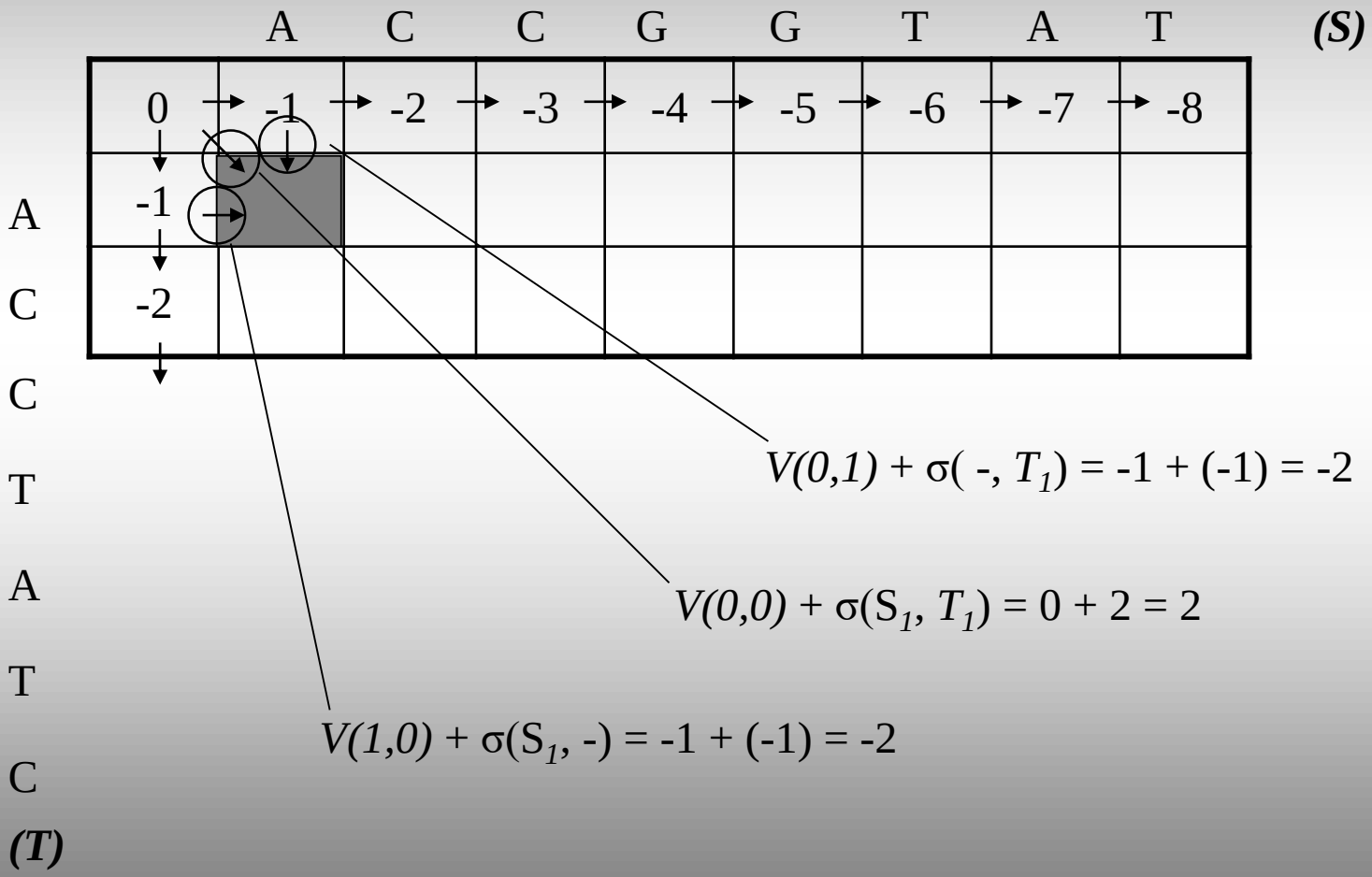
Η τιμή του $V(i, j)$ δηλαδή βρίσκεται μέσω του βέλτιστου μονοπατιού...

Παράδειγμα Needleman – Wunsch

Κανόνες συμπλήρωσης πίνακα βαθμολόγησης:

- Σε περίπτωση μη ταύτισης μπορούμε να κινηθούμε είτε διαγωνίως, είτε οριζοντίως ή καθέτως.
  - Κινούμενοι καθέτως, θεωρούμε πάντα ότι εισάγουμε κενό στη σειρά *S* η οποία αναπαρίσταται οριζόντια στον πίνακα. Επομένως, η βαθμολογία που προστίθεται σε αυτή του στοιχείου *V(i, j-1)* είναι πάντα η ποινή (σ(*Si*, -)) που αντιστοιχεί σε κενό.
  - Το ίδιο ισχύει πάντα και όταν κινούμαστε οριζοντίως, με τη μόνη διαφορά ότι το κενό εισάγεται στην κάθετη σειρά *T* και η ποινή του είναι (σ(-, *Ti*)).
  - Κινούμενοι διαγωνίως, προσθέτουμε την (αρνητική) ποινή που έχει οριστεί για τη μη-ταύτιση.

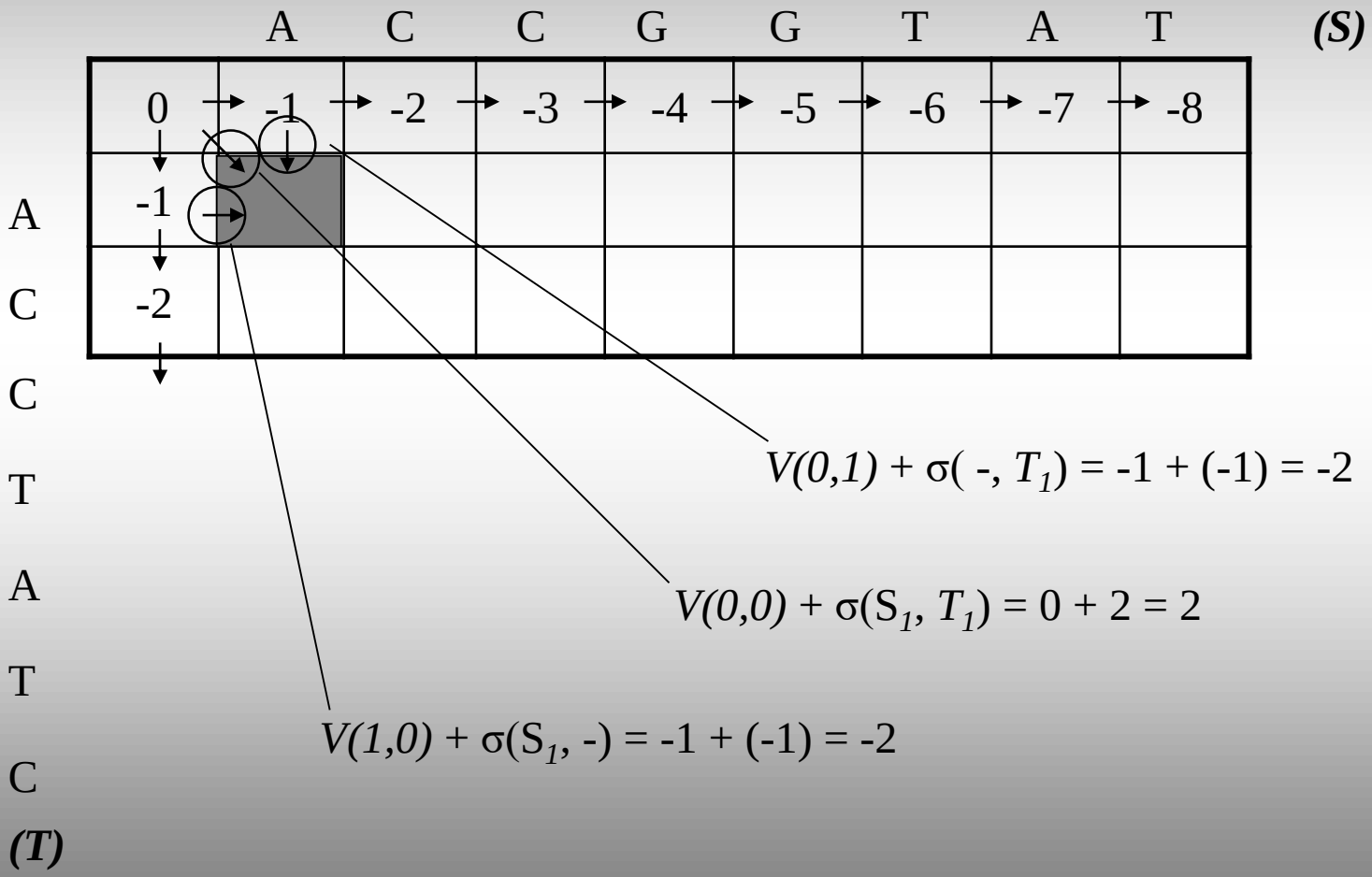
Παράδειγμα Needleman – Wunsch



Παράδειγμα Needleman – Wunsch

- Σε περίπτωση που υπάρχει ακριβής ταύτιση των αντιστοιχούμενων βάσεων μεταξύ των δύο σειρών, μπορούμε να κινηθούμε πάλι είτε διαγωνίως, είτε οριζοντίως ή καθέτως.
  - Κινούμενοι καθέτως ή οριζοντίως θεωρούμε, ακόμα και στην περίπτωση της ταύτισης, ότι εισάγουμε κενό στη σειρά *S* ή στη σειρά *T* αντιστοίχως. Επομένως, η βαθμολογία που προστίθεται σε αυτή του στοιχείου *V(i, j-1)* είναι αντίστοιχα η ποινή (σ(*Si*, -)) ή η ποινή (σ(-, *Ti*)) που αντιστοιχεί σε κενό.
  - Μόνο κινούμενοι διαγωνίως, προσθέτουμε τον προκαθορισμένο βαθμό για την απόλυτη ταύτιση (στην προκειμένη σ(S*i*, *Ti*) = 2) στην τιμή του στοιχείου *V(i-1, j-1)*.

Παράδειγμα Needleman – Wunsch



Παράδειγμα Needleman – Wunsch

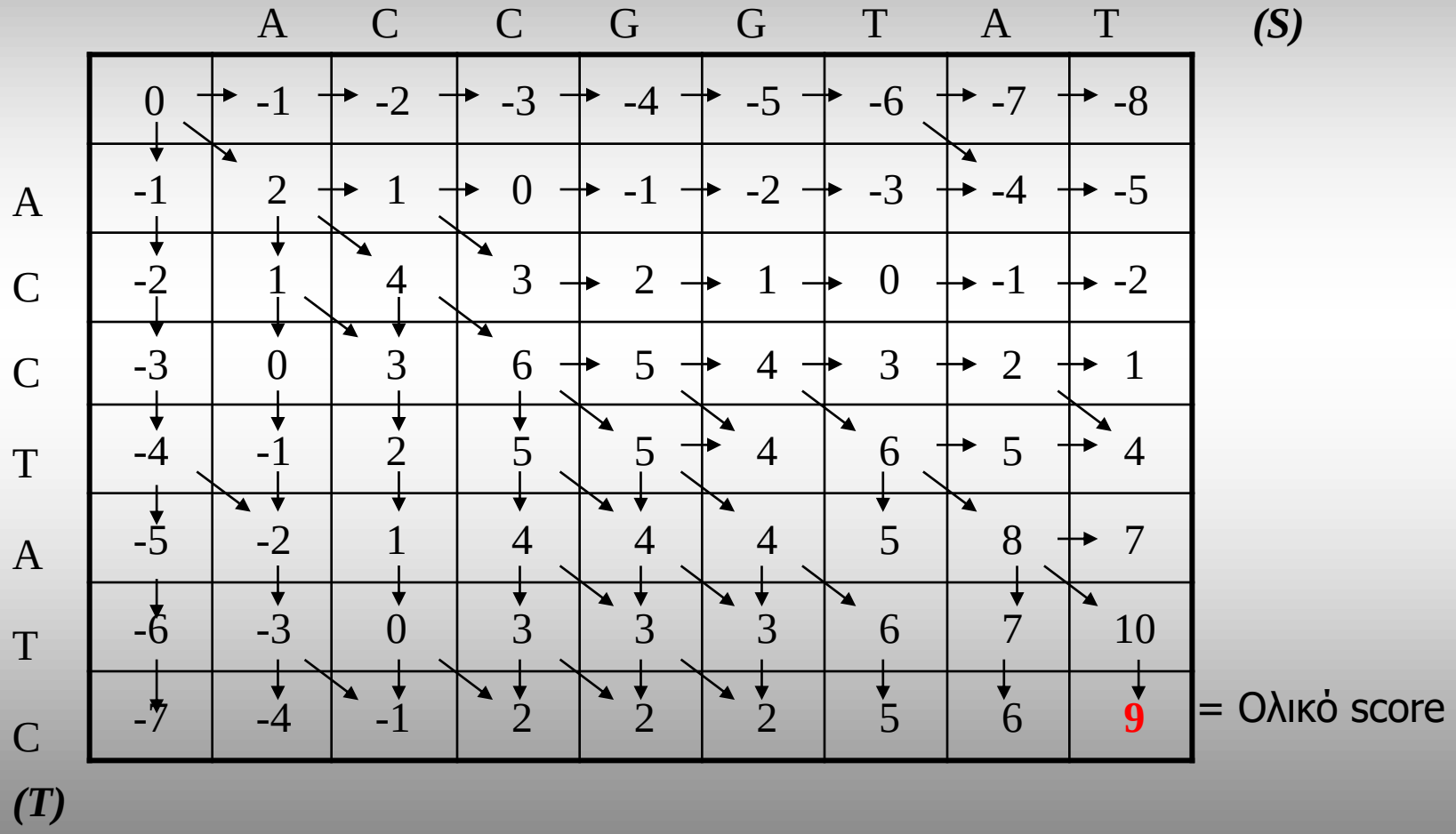
- Επομένως στο παράδειγμά μας θα είναι :

$$V(1,1) = \max \begin{cases} V(0,0) + \sigma(S_1, T_1) = 0 + 2 = 2 \\ V(0,1) + \sigma(S_1, -) = -1 + (-1) = -2 \\ V(1,0) + \sigma(-, T_1) = -1 + (-1) = -2 \end{cases}$$

Άρα: $V(1,1) = 2$

Με τον ίδιο τρόπο συμπληρώνουμε και τα υπόλοιπα στοιχεία του πίνακα....

Παράδειγμα Needleman – Wunsch



Παράδειγμα Needleman – Wunsch

Για την ανακατασκευή της αντιστοίχησης των σειρών:

- Βρίσκουμε το οριακό στοιχείο του πίνακα (δηλαδή στοιχείο που βρίσκεται στην ακριανή γραμμή ή ακριανή στήλη και απ' το οποίο δεν ξεκινά δείκτης προς άλλο στοιχείο) και το οποίο έχει τη μέγιστη τιμή.
- Με αφετηρία το στοιχείο αυτό κινούμαστε αναδρομικά ακολουθώντας τους δείκτες που δείχνουν από ποιο προηγούμενο στοιχείο οδηγηθήκαμε στο παρόν.
- Εάν μία τιμή ενός στοιχείου έχει προκύψει από τα δύο ή και τα τρία προηγούμενα στοιχεία του πίνακα, οι δείκτες απ' όλα τα στοιχεία κρατούνται και έτσι προκύπτουν αντίστοιχα δύο ή τρία διαφορετικά μονοπάτια.
- Κάθε μονοπάτι απεικονίζει και μία διαφορετική αντιστοίχηση και η επιλογή του βέλτιστου μονοπατιού / αντιστοίχησης, γίνεται πλέον με γνώμονα τη μέγιστη βαθμολόγηση που αντιστοιχεί σε κάποιο από αυτά. Σε περίπτωση που τα μονοπάτια είναι ισότιμα, η επιλογή γίνεται αυθαίρετα.
- Η μέγιστη τιμή του οριακού στοιχείου του πίνακα απ' όπου ξεκινήσαμε αποτελεί την ολική βαθμολογία της αντιστοίχησης.

- (S)

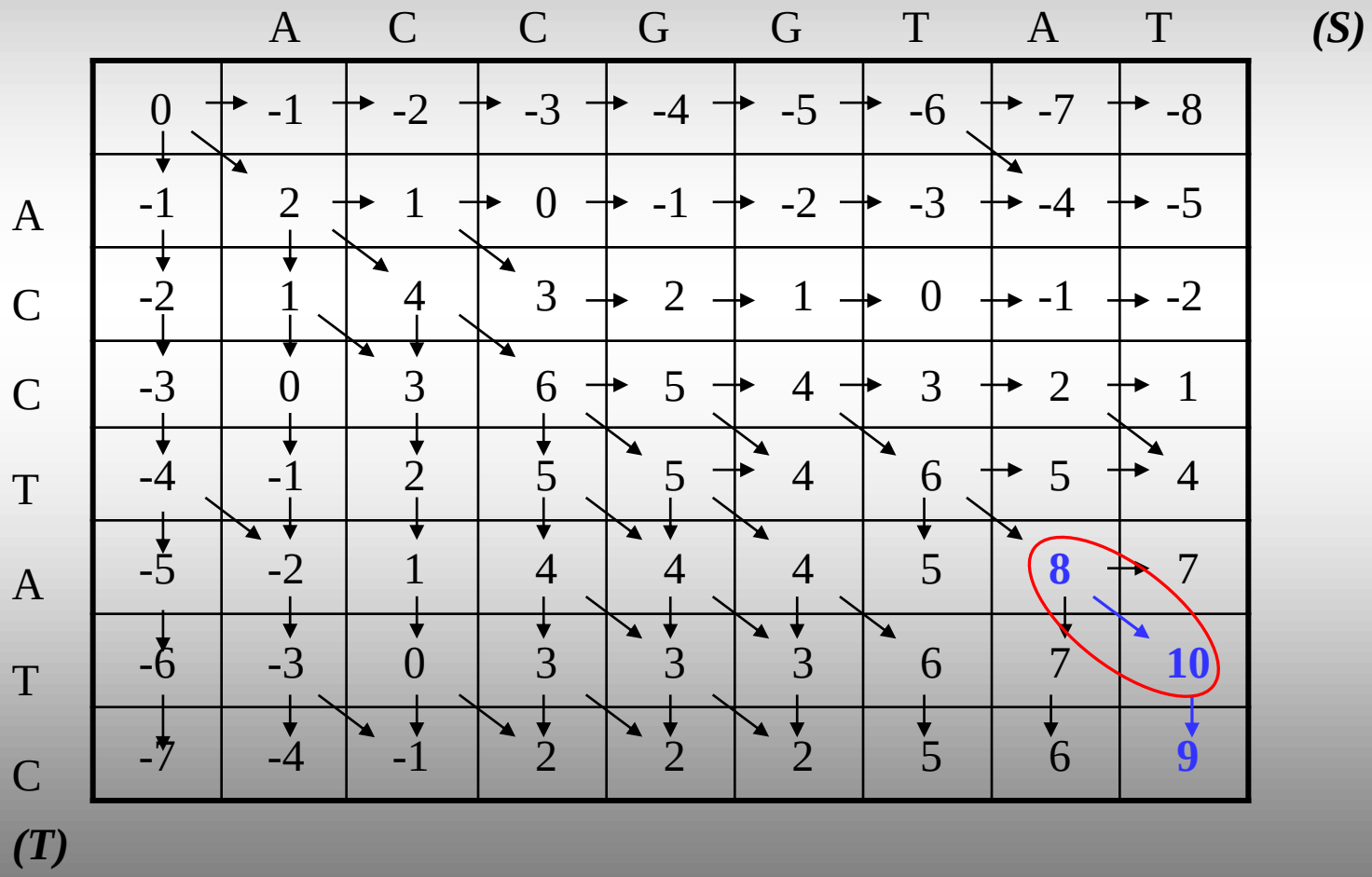
C (T)

		A	C	C	G	G	T	A	T	*(S)*
	0	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	
A	-1	2	1	0	-1	-2	-3	-4	-5	
C	-2	1	4	3	2	1	0	-1	-2	
C	-3	0	3	6	5	4	3	2	1	
T	-4	-1	2	5	5	4	6	5	4	
A	-5	-2	1	4	4	4	5	8	7	
T	-6	-3	0	3	3	3	6	7	**10**	
C	-7	-4	-1	2	2	2	5	6	**9**	
(T)										

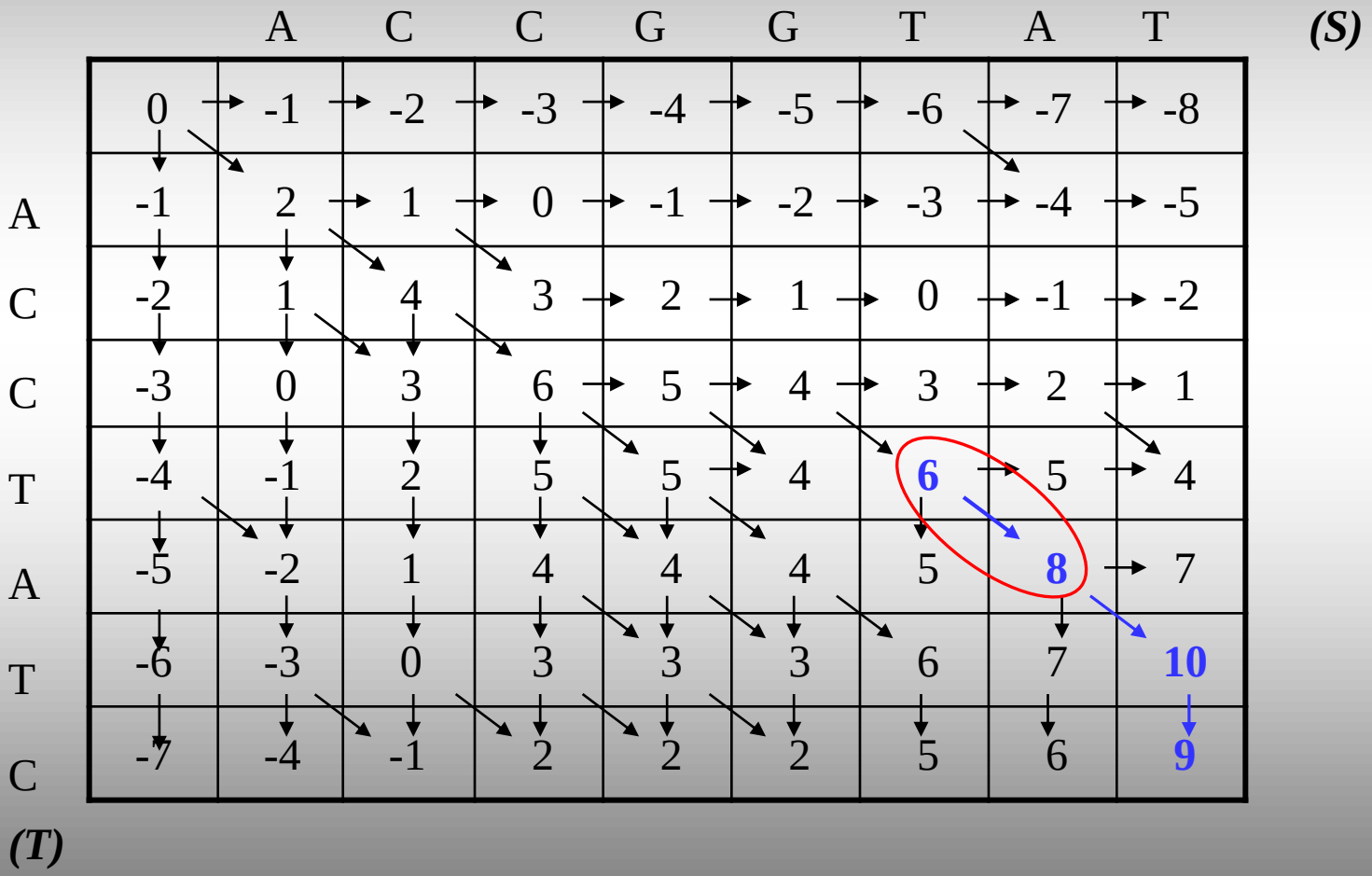
T - ***(S)***

|

T C ***(T)***


A C C G G T A T (S)
0 -1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8
A -1 2 1 0 -1 -2 -3 -4 -5
C -2 1 4 3 2 1 0 -1 -2
C -3 0 3 6 5 4 3 2 1
T -4 -1 2 5 5 4 6 5 4
A -5 -2 1 4 4 4 5 8 7
T -6 -3 0 3 3 3 6 7 10
C -7 -4 -1 2 2 2 5 6 9
(T)

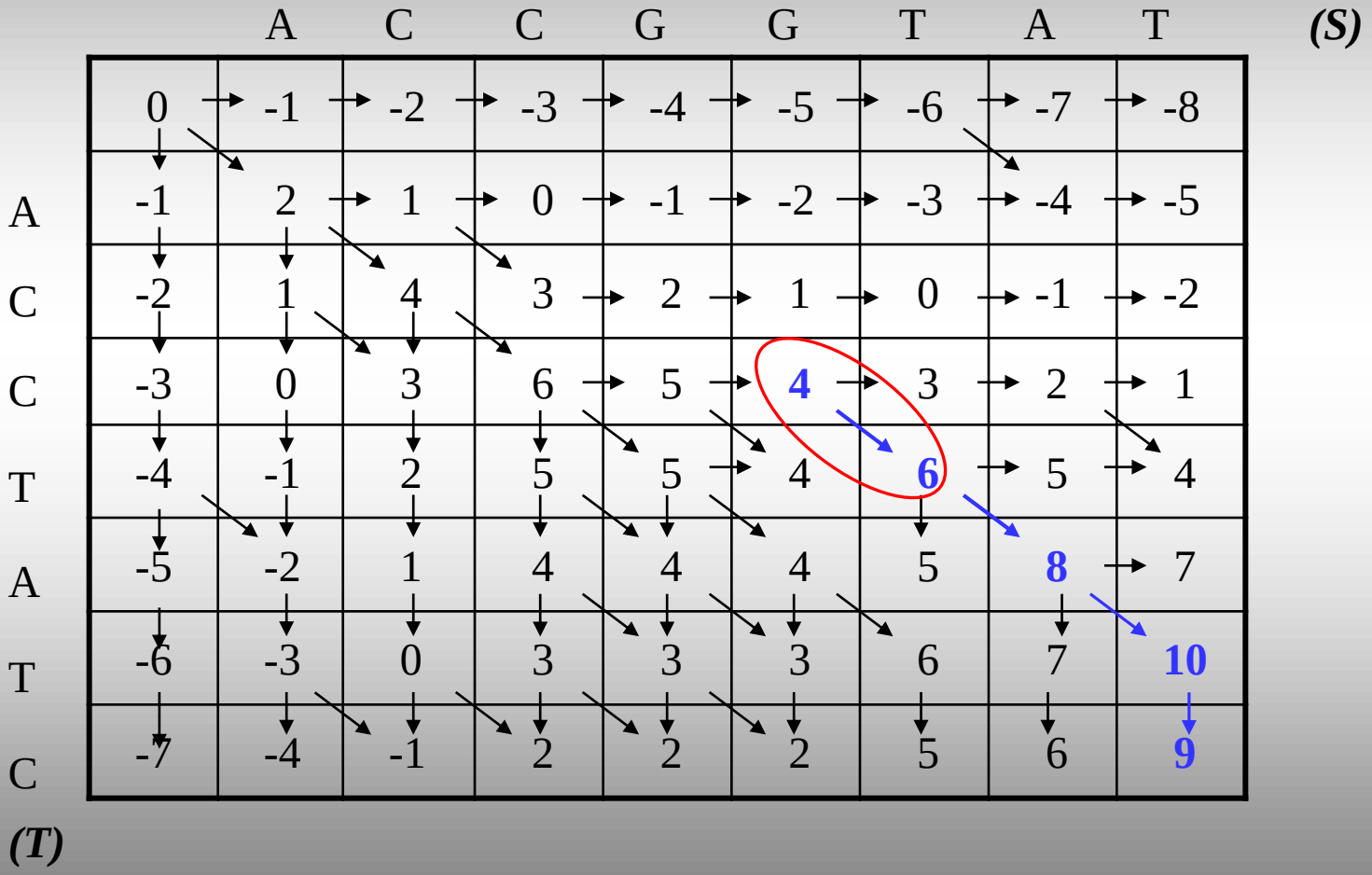
A T - *(S)*
| |
A T C *(T)*


A C C G G T A T (S)
0 -1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8
A -1 2 1 0 -1 -2 -3 -4 -5
C -2 1 4 3 2 1 0 -1 -2
C -3 0 3 6 5 4 3 2 1
T -4 -1 2 5 5 4 6 5 4
A -5 -2 1 4 4 4 5 8 7
T -6 -3 0 3 3 3 6 7 10
C -7 -4 -1 2 2 2 5 6 9
(T)

T A T - ***(S)***

| | | |

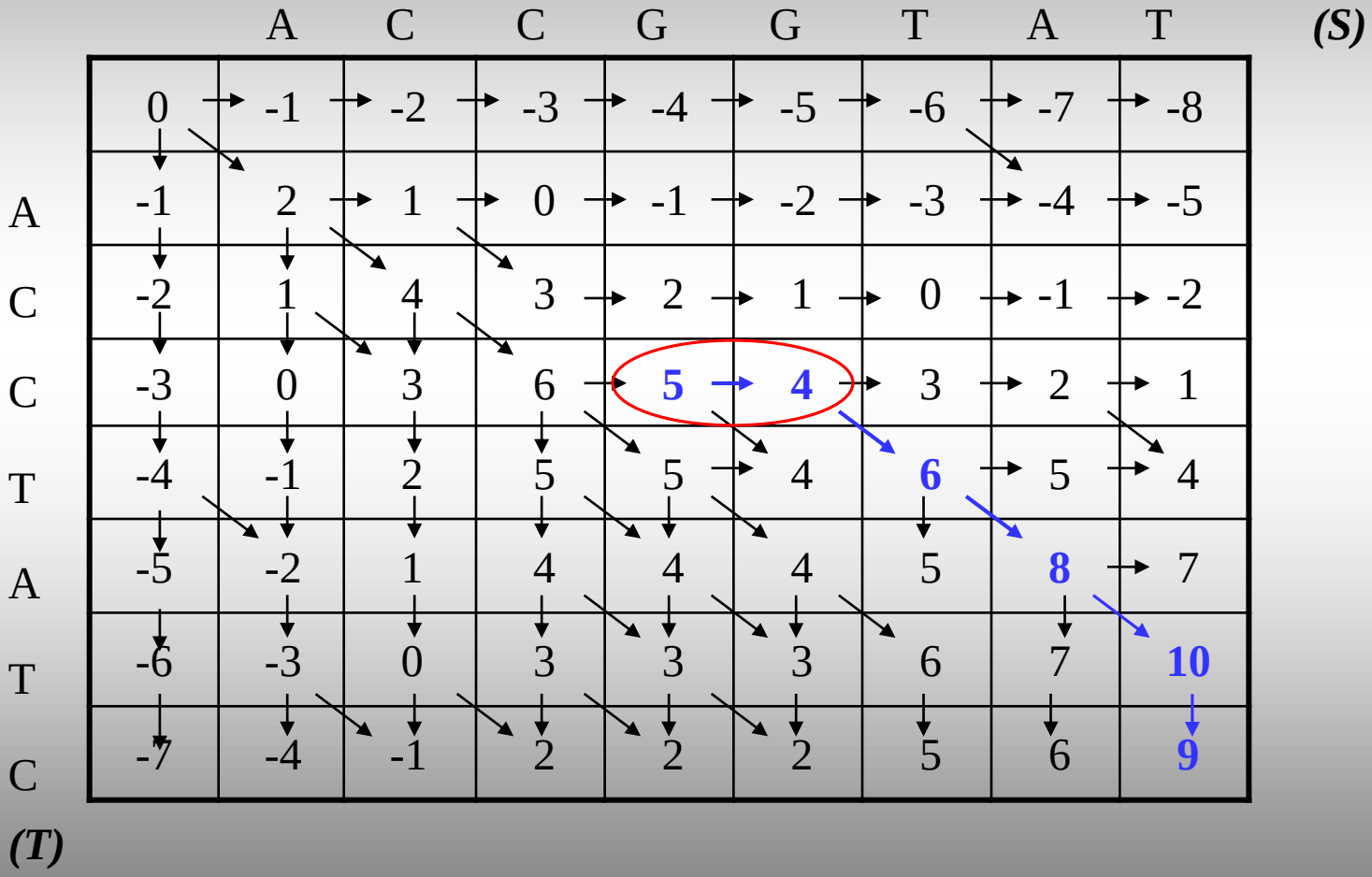
T A T C ***(T)***


A C C G G T A T (S)
0 -1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8
A -1 2 1 0 -1 -2 -3 -4 -5
C -2 1 4 3 2 1 0 -1 -2
C -3 0 3 6 5 4 3 2 1
T -4 -1 2 5 5 4 6 5 4
A -5 -2 1 4 4 4 5 8 7
T -6 -3 0 3 3 3 6 7 10
C -7 -4 -1 2 2 2 5 6 9
(T)

G T A T - ***(S)***

| | | |

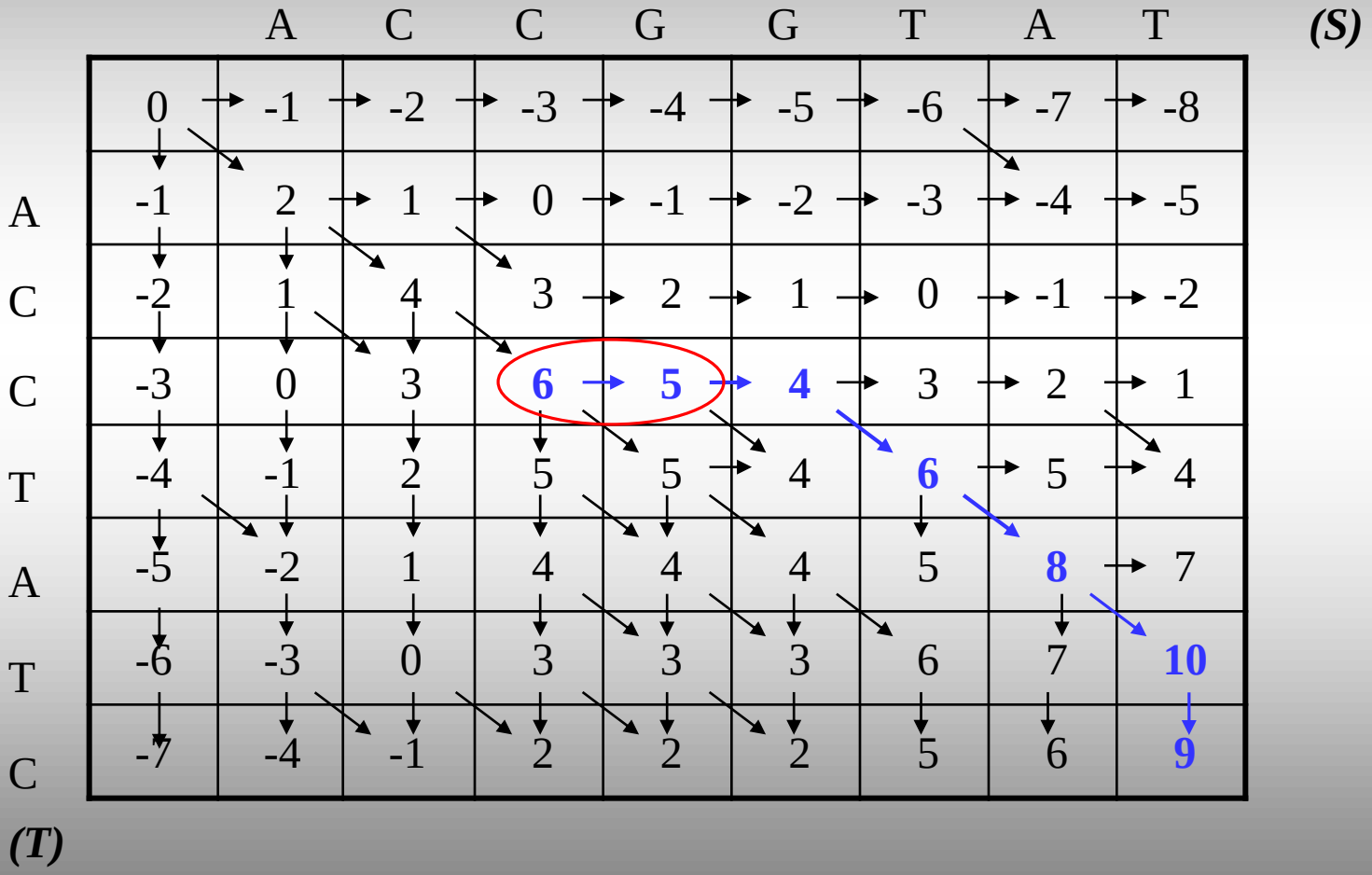
- T A T C ***(T)***


A C C G G T A T (S)
0 -1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8
A -1 2 1 0 -1 -2 -3 -4 -5
C -2 1 4 3 2 1 0 -1 -2
C -3 0 3 6 5 4 3 2 1
T -4 -1 2 5 5 4 6 5 4
A -5 -2 1 4 4 4 5 8 7
T -6 -3 0 3 3 3 6 7 10
C -7 -4 -1 2 2 2 5 6 9
(T)

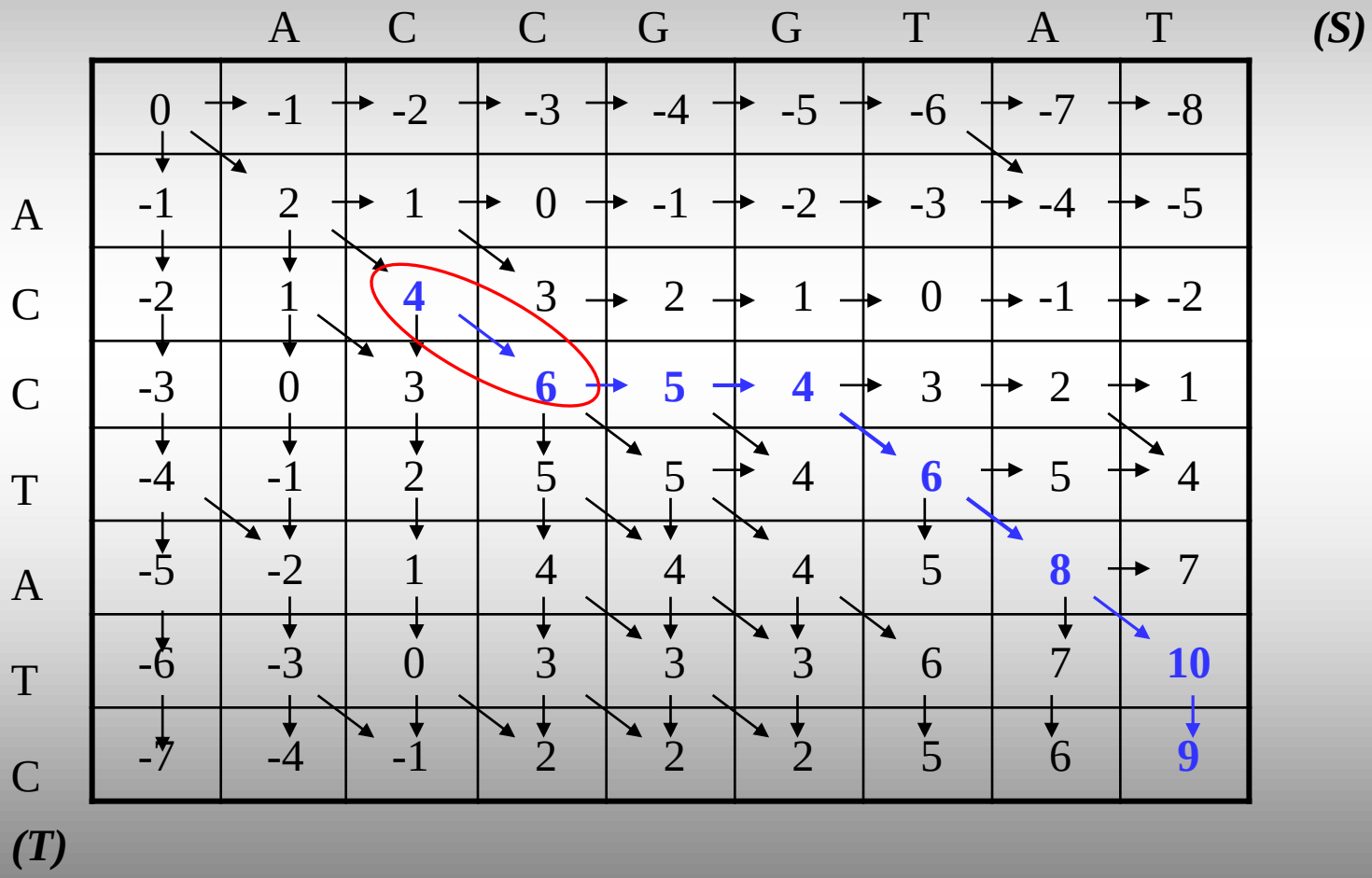
G G T A T - *(S)*

| | | |

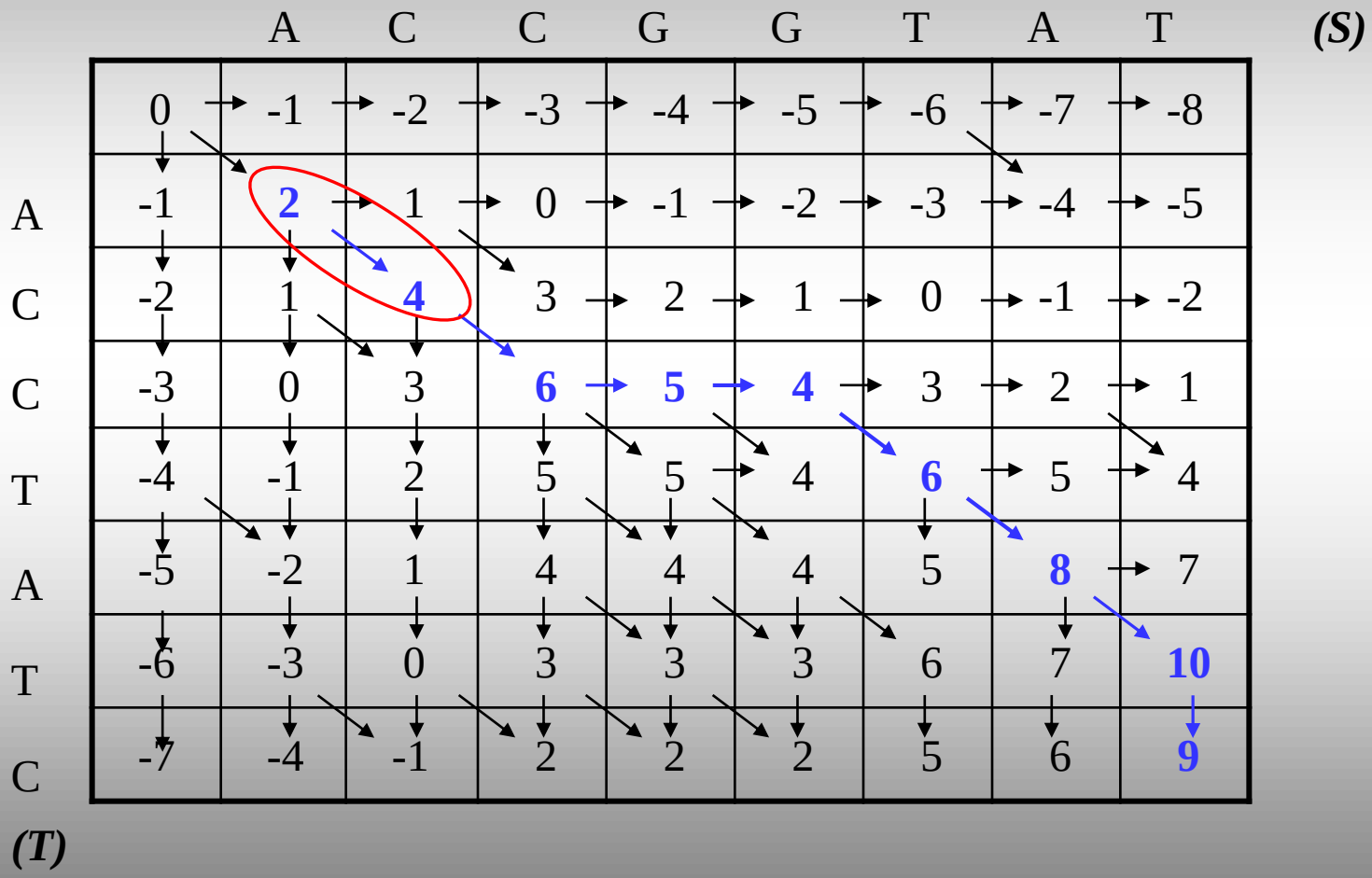
- - T A T C *(T)*



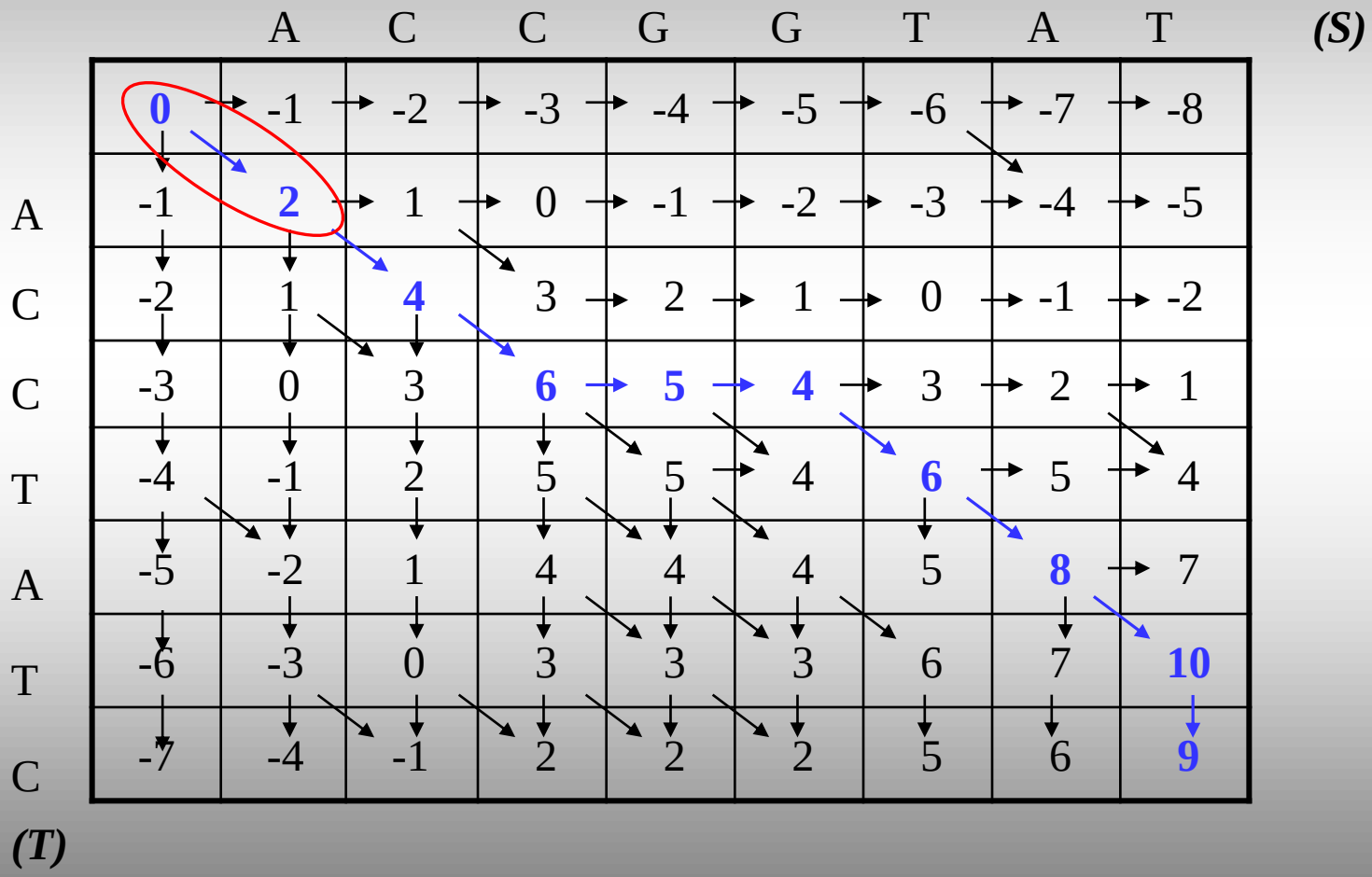
C G G T A T - *(S)*
| | | | |
C - - T A T C *(T)*



```
C C G G T A T -   (S)
| |     | | |
C C - - T A T C   (T)
```



```
A C C G G T A T -   (S)
| | |     | | |
A C C - - T A T C   (T)
```



Παράδειγμα Needleman – Wunsch

Η αντιστοίχηση που προκύπτει για τις σειρές S και T είναι η ακόλουθη:

```
A C C G G T A T -    (S)
| | |     | | |
A C C - - T A T C    (T)
```

- Λάβαμε υπόψη όλες τις βάσεις σε κάθε σειρά.

- Υπολογίζουμε τη βαθμολογία της αντιστοίχησης :
  6 ταυτίσεις (matches) = 6 x 2 = 12 βαθμοί
  3 κενά = 3 x (-1) = -3 βαθμοί ποινής
  0 mismatches
  Άρα συνολικά : 12 + (-3) = 9 βαθμοί
  Η βαθμολογία αυτή συμπίπτει με τη βαθμολογία που προκύπτει από τον πίνακα βαθμολόγησης

Τοπική αντιστοίχηση (Local Alignment)

- Σε ορισμένες περιπτώσεις κρίνεται προτιμότερο να βρούμε τη βέλτιστη αντιστοίχηση ανάμεσα σε *υποσειρές* δύο σειρών (όταν π.χ. υπάρχει περίπτωση δύο πρωτεΐνες να έχουν μία κοινή περιοχή (domain)), αντί για αντιστοίχηση ολόκληρων των σειρών. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιούμε την **τοπική αντιστοίχηση (local alignment)**.

- Η τοπική αντιστοίχηση θεωρείται πιο ευαίσθητη μέθοδος αντιστοίχησης δύο σειρών.

- Είναι χρήσιμη σε περιπτώσεις που δύο σειρές, αν και ομόλογες, έχουν διαφοροποιηθεί πολύ μέσα στην εξελικτική τους πορεία. Τότε μόνο ορισμένες μόνο περιοχές των σειρών θα μπορούν να ταυτιστούν, καθώς οι υπόλοιπες θα έχουν διαφοροποιηθεί τόσο πολύ εξαιτίας του προσαρτώμενου σε αυτές θορύβου.

- Η τοπική αντιστοίχηση παρουσιάζει κοινά με την καθολική:
  - χρησιμοποιεί τον ίδιο τύπο πινάκων βαθμολόγησης και ποινών για τα κενά,
  - κάνει χρήση αλγορίθμων δυναμικού προγραμματισμού.

Αλγόριθμος Smith - Waterman

Εφαρμογή της τοπικής αντιστοίχησης είναι ο αλγόριθμος Smith – Waterman.

- Ο πίνακας βαθμολόγησης για τον αλγόριθμο Smith – Waterman κατασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως και για τον αλγόριθμο Needleman – Wunsch.

- Κανόνες κατασκευής του πίνακα βαθμολόγησης για τον αλγόριθμο Smith – Waterman :
  - Εάν η βάση *Si* ταυτίζεται με την *Ti* τότε σ(*Si*, *Tj*) >= 0
  - Σε περίπτωση μη – ταύτισης ή κενού τότε σ(*Si*, *Tj*) <= 0
  - Μόνη διαφορά από τον Needleman – Wunsch ότι για τον Smith – Waterman η κατώτερη τιμή που μπορεί να αποθηκευτεί για κάποιο στοιχείο του πίνακα είναι 0.

    Επιλέγουμε να δώσουμε σε ένα στοιχείο του πίνακα την τιμή 0, αντί μίας αρνητικής τιμής, γιατί έτσι σηματοδοτούμε στην έναρξη μίας νέας αντιστοιχίας. Η λογική είναι ότι σε περίπτωση που προκύψει αρνητικός βαθμός σε μία αντιστοίχηση είναι προτιμότερο να ξεκινήσει μία νέα αντιστοιχία υποσειρών αντί να συνεχιστεί η προηγούμενη.

Αλγόριθμος Smith - Waterman

- Για πίνακα βαθμολόγησης *V*, γνωρίζοντας τις τιμές των *V(i-1, j-1)*, *V(i-1, j)* και *V(i, j-1)*, οι τιμές των στοιχείων του προκύπτουν ως εξής:
  - *V(i, 0)= 0, V(0, j) = 0, για κάθε i, j* και
  - $$V(i,j) = \max \begin{cases} 0 \\ V(i-1,j-1) + \sigma(S_i, T_j) \\ V(i-1,j) + \sigma(S_i, -) \\ V(i,j-1) + \sigma(-, T_j) \end{cases}$$

Ας δούμε όμως ένα παράδειγμα:

- Έστω ότι έχουμε τις σειρές : S = ACCGGTAT μήκους n = 8
  T = TTGTATC μήκους m = 7
- Φτιάχνουμε τον πίνακα V διαστάσεων (n+1=)9 επί (m+1=)8.
- Ορίζουμε V(i, 0) = 0 και V(0, j) = 0, για κάθε i, j.

Παράδειγμα Smith - Waterman

Πίνακας διαστάσεων 9x8 :

		A	C	C	G	G	T	A	T	***(S)***
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T	0									
T	0									
G	0									
T	0									
A	0									
T	0									
C	0									

(T)

Παράδειγμα Smith - Waterman

Συμπληρώνουμε τα υπόλοιπα στοιχεία του πίνακα (ελάχιστη τιμή στον πίνακα είναι το 0) :

		A	C	C	G	G	T	A	T
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	0	2	1	2
T	0	0	0	0	0	0	2	1	3
G	0								
T	0								
A	0								
T	0								
C	0								

(S)

(T)

Παράδειγμα Smith - Waterman

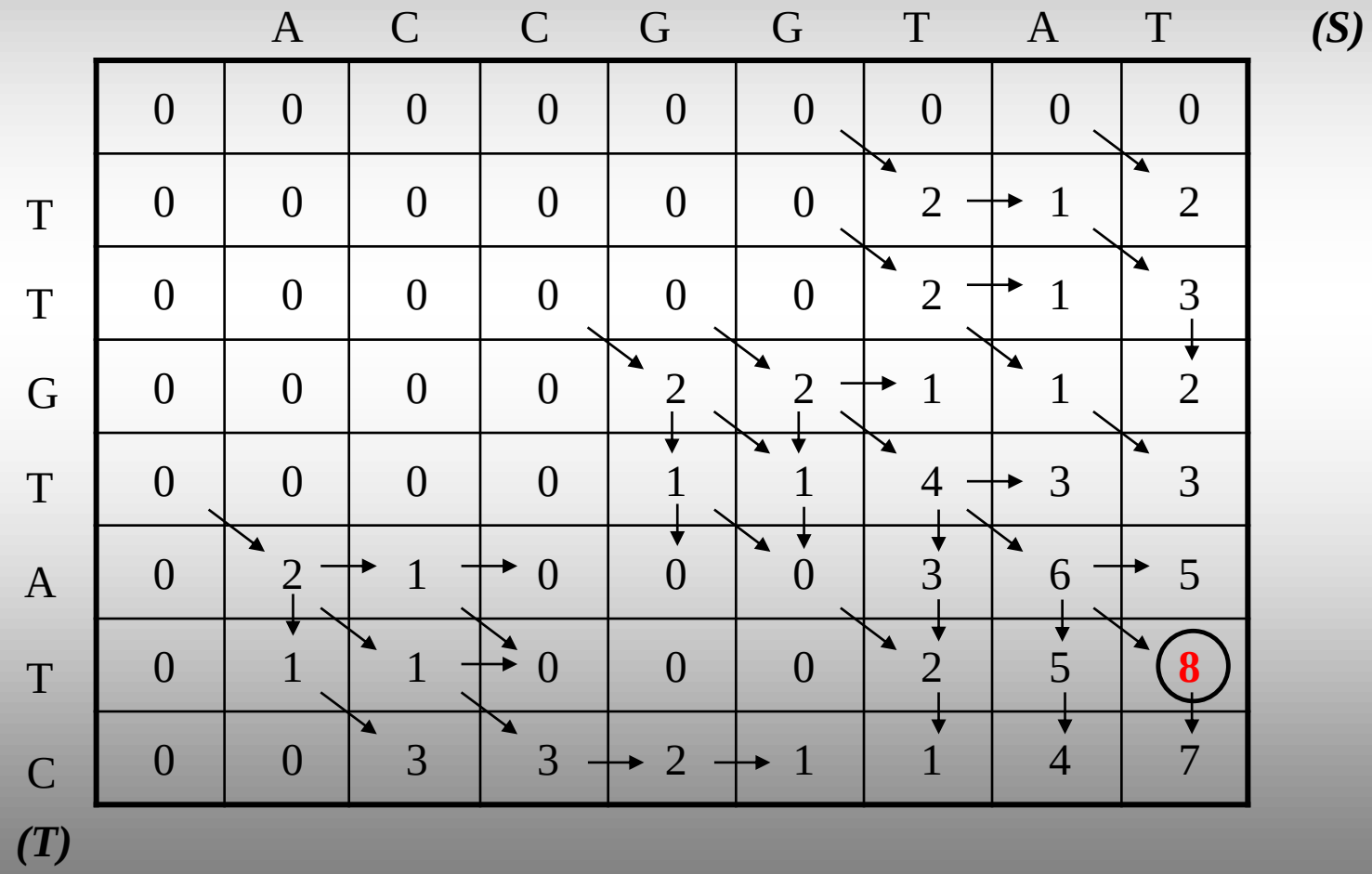
Συμπληρώνουμε τα υπόλοιπα στοιχεία του πίνακα (ελάχιστη τιμή στον πίνακα είναι το 0) :

		A	C	C	G	G	T	A	T
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	0	2	1	2
T	0	0	0	0	0	0	2	1	3
G	0	0	0	0	2	2	1	1	2
T	0	0	0	0	1	1	4	3	3
A	0	2	1	0	0	0	3	6	5
T	0	1	1	0	0	0	2	5	8
C	0	0	3	3	2	1	1	4	7

(S)

(T)

- Αφού συμπληρωθεί ο πίνακας, βρίσκουμε, σε οποιαδήποτε θέση του πίνακα, το στοιχείο το οποίο έχει τη μεγαλύτερη τιμή. Στο παράδειγμά μας το στοιχείο αυτό είναι το *V(9, 7) = 8.*



- Με αφετηρία το στοιχείο αυτό και ακολουθώντας τους δείκτες, κινούμαστε αναδρομικά, μέχρις ότου συναντήσουμε στοιχείο με την τιμή 0 και το οποίο μπορεί να βρίσκεται σε οποιαδήποτε θέση του πίνακα.

G T A T *(S)*
| | | |
G T A T *(T)*

		A	C	C	G	G	T	A	T	*(S)*
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T	0	0	0	0	0	0	2	1	2	
T	0	0	0	0	0	0	2	1	3	
G	0	0	0	0	2	**2**	1	1	2	
T	0	0	0	0	1	1	**4**	3	3	
A	0	2	1	0	0	0	3	**6**	5	
T	0	1	1	0	0	0	2	5	**8**	
C	0	0	3	3	2	1	1	4	7	
(T)										

Παράδειγμα Smith - Waterman

- Η ολική βαθμολογία που αποδίδεται στην αντιστοίχηση υποσειρών είναι η τιμή του στοιχείου απ' όπου ξεκινήσαμε την αναδρομή (η υψηλότερη τιμή στοιχείου στον πίνακα).

  Στο παράδειγμά μας έχουμε 4 ταυτίσεις, επομένως η βαθμολογία της αντιστοίχησης είναι 4x2 = 8, τιμή που συμπίπτει με αυτή που προκύπτει από τον πίνακα.

- Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται το αποτέλεσμα της τοπικής αντιστοίχησης μεταξύ δύο σειρών να είναι υποσύνολο της ολικής αντιστοίχησης των ιδίων σειρών, όμως κάτι τέτοιο δεν πρέπει να θεωρείται πάντα δεδομένο

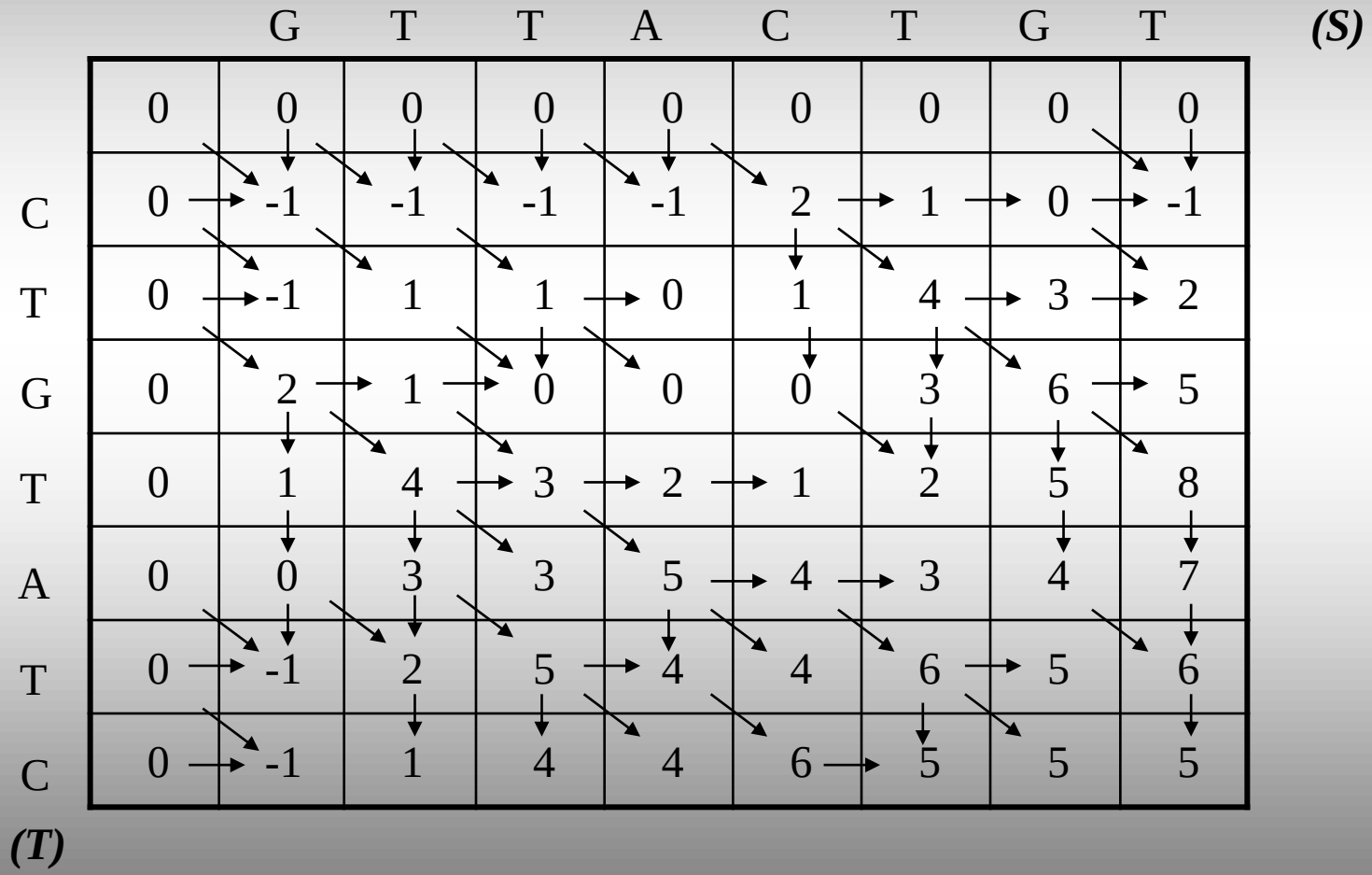
Ends – free alignment

- Σε περιπτώσεις που η μία σειρά από τις δύο που θέλουμε να αντιστοιχίσουμε περιέχει την άλλη, ή ορισμένες περιοχές των δύο σειρών τυγχάνει να επικαλύπτονται, η ολική και η τοπική αντιστοίχηση δεν αποτελούν καλή επιλογή (π.χ. όταν συγκρίνουμε τμήματα σειρών DNA μεταξύ τους ή με μεγαλύτερες σειρές χρωμοσωμάτων).
- Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιείται η ends – free αντιστοίχηση.
- Ο πίνακας βαθμολόγησης στην ends – free αντιστοίχηση συμπληρώνεται με τον ίδιο αναδρομικό μοντέλο που εφαρμόστηκε και στην ολική αντιστοίχηση.
- Για πίνακα βαθμολόγησης *V*, γνωρίζοντας τις τιμές των *V(i-1, j-1)*, *V(i-1, j)* και *V(i, j-1)* οι τιμές των στοιχείων του προκύπτουν ως εξής:

$$V(i, 0) = 0,\ V(0, j) = 0, \text{ για κάθε } i, j$$

$$V(i, j) = \max \begin{cases} V(i-1, j-1) + \sigma(Si, Tj) \\ V(i-1, j) + \sigma(Si, -) \\ V(i, j-1) + \sigma(-, Tj) \end{cases}$$

Παράδειγμα ends – free αντιστοίχησης



Παράδειγμα ends – free αντιστοίχησης

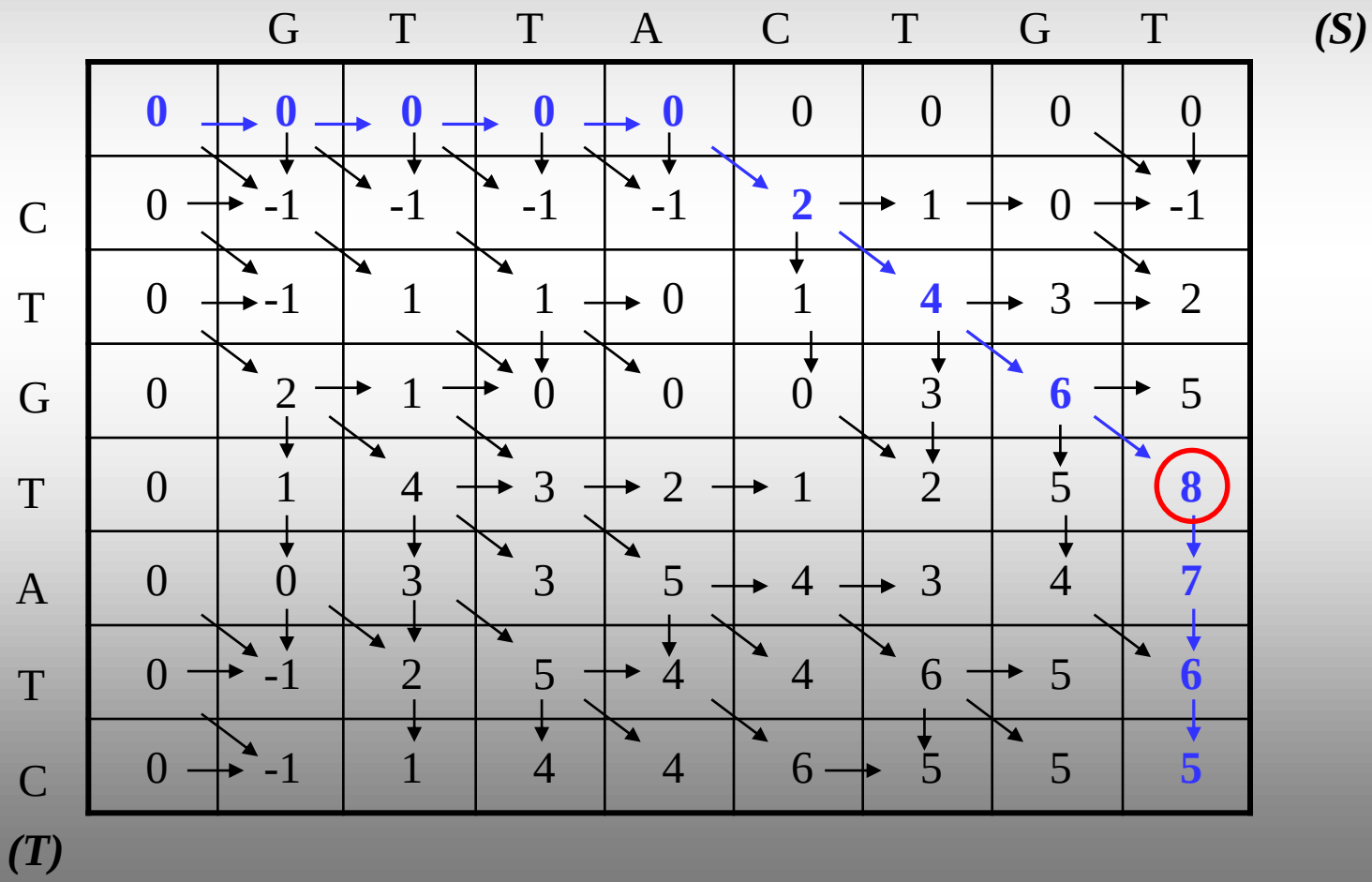
- Για το βέλτιστο μονοπάτι εντοπίζουμε το ακραίο στοιχείο του πίνακα (είτε στην ακραία γραμμή του πίνακα είτε στην ακραία στήλη του) με την καλύτερη τιμή και χρησιμοποιώντας αυτό ως αφετηρία κινούμαστε αναδρομικά και ‘χτίζουμε’ την αντιστοιχία.

- Τα κενά (indels / gaps) επιτρέπονται στην αρχή και στο τέλος των σειρών χωρίς την επιβολή ποινής σε αυτά.

G T T A C T G T - - - ***(S)***

| | | | |

- - - - C T G T A T C ***(T)***



Πίνακες Αντικατάστασης (Substitution Matrices)

- Πίνακας δύο διαστάσεων με τιμές που δίνουν την πιθανότητα ενός αμινοξέος ή μιας βάσης να αντικατάσταθεί από μία άλλη κατά την εξέλιξη

Ιδιαίτερα πολύπλοκοι οι πίνακες για τα αμινοξέα:

- φυσικο-χημικές ιδιότητες των αμινοξέων
- Ορισμένα αα με παρόμοιες ιδιότητες μπορούν να αντικατασταθούν πιο εύκολα: διατήρηση της δομής/λειτουργίας
- "Η διασπαστική» αντικατάσταση είναι λιγότερο πιθανό να επιλεγεί στην εξέλιξη (π.χ. μη λειτουργικές πρωτεΐνες)
- Πιθανότητα αντικατάστασης αμινοξέων μεταξύ αληθινά ομόλογων αλληλουχιών

Πίνακες Αντικατάστασης (Substitution Matrices)

- Κάθε πίνακας αντικατάστασης αναπαριστά μία ξεχωριστή εξελικτική θεωρία και αντιστοιχεί σε μία συγκεκριμένη εξελικτική απόσταση.

- Οι τιμές των στοιχείων που αποθηκεύονται σε ένα πίνακα αντικατάστασης αναπαριστούν είτε την **ομοιότητα** – πόσο 'κοντινό' είναι δηλαδή ένα αμινοξύ με αυτό που αντικατέστησε στη σειρά – είτε την **απόσταση** – ποιο είναι το κόστος από την αντικατάσταση ενός αμινοξέως με ένα άλλο. Δηλαδή, βαθμολογούν τις αντικαταστάσεις που συναντόνται σε μία αντιστοίχηση.

- Η λογική πίσω και από τις δύο αυτές προσεγγίσεις είναι οι ίδια, επομένως οι πίνακες αντικατάστασης θα έχουν σχετικά σταθερή μορφή.

Πίνακες Αντικατάστασης (Substitution Matrices)

Η πιο συνήθης προσέγγιση για την εύρεση των τιμών ενός πίνακα αντικατάστασης είναι με τη χρήση πιθανοτήτων:

$$S_{ij} = \log (q_{ij} / p_i p_j)$$

όπου :

S_{ij} : τιμή του (i, j) στοιχείου του πίνακα S

q_{ij} : πιθανότητα τα αμινοξέα i και j να έχουν προκύψει από έναν κοινό πρόγονο (εξελικτική συγγένεια)

p_i : πιθανότητα τυχαίας εμφάνισης του αμινοξέως i

p_j : πιθανότητα τυχαίας εμφάνισης του αμινοξέως j

$p_i p_j$: πιθανότητα να υπάρξει τυχαία αντιστοίχησή των i και j

- Η βαθμολογία αντικατάστασης είναι η πιθανότητα του λογαριθμικού λόγου ότι το αμινοξύ ***a*** θα μπορούσε να αλλάξει (μεταλλαχθεί) σε αμινοξύ ***b*** μέσω της εξέλιξης, με βάση τους περιορισμούς του εξελικτικού μας τρόπου

PAM250

	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W	B	Z
C	12																					
S	0	2																				
T	-2	1	3																			
P	-3	1	0	6																		
A	-2	1	1	1	2																	
G	-3	1	0	-1	1	5																
N	-4	1	0	-1	0	0	2															
D	-5	0	0	-1	1	2	2	4														
E	-5	0	0	-1	0	0	1	3	4													
Q	-5	-1	-1	0	0	-1	1	2	2	4												
H	-3	-1	-1	0	-1	-2	2	1	1	3	6											
R	-4	0	-1	0	-2	-3	0	-1	-1	1	2	6										
K	-5	0	0	-1	-1	-2	1	0	0	1	0	3	5									
M	-5	-2	-1	-2	-1	-3	-2	-3	-2	-1	-2	0	0	6								
I	-2	-1	0	-2	-1	-3	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	5							
L	-6	-3	-2	-3	-2	-4	-3	-4	-3	-2	-2	-3	-3	4	2	6						
V	-2	-1	0	-1	0	-1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	2	4	2	4					
F	-4	-3	-3	-5	-4	-5	-4	-6	-5	-5	-2	-4	-5	0	1	2	-1	9				
Y	0	-3	-3	-5	-3	-5	-2	-4	-4	-4	0	-4	-4	-2	-1	-1	-2	7	10			
W	-8	-2	-5	-6	-6	-7	-4	-7	-7	-5	-3	2	-3	-4	-5	-2	-6	0	0	17		
B	-4	0	0	-1	0	0	2	3	2	1	1	-1	1	-2	-2	-3	-2	-5	-3	-5	2	
Z	-5	0	-1	0	0	-1	1	3	3	3	2	0	0	-2	-2	-3	-2	-5	-4	-6	2	3

για έναν δεδομένο πίνακα αντικατάστασης:

- μια θετική βαθμολογία σημαίνει ότι η συχνότητα των αντικαταστάσεων αμινοξέων που βρέθηκαν στις αντιστοιχίσίσεις υψηλής βαθμολόγησεις (ομολογίας) είναι μεγαλύτερη από ό,τι θα είχε συμβεί από τυχαία τύχη
- μια μηδενική βαθμολογία: ότι η συχν. ισούται με αυτό που αναμένεται κατά τύχη
- μια αρνητική βαθμολόγία: ότι η συχν. είναι λιγότερο από αυτό που αναμένεται τυχαία

Πίνακες PAM (Point Accepted Mutation)

Οι Dayhoff, Schwarz και Orcutt (1978) χρησιμοποίησαν 71 οικογένειες πρωτεϊνών με ομοιότητα γύρω στο 85% (δηλ., οι σειρές των πρωτεϊνών διαφέρουν το πολύ κατά το 15% των residues τους).

Αντιστοίχησαν τις πρωτεϊνες αυτές και, αγνοώντας την εξελικτική κατεύθυνση, έχτισαν' ένα θεωρητικό φυλογενετικό δένδρο (phylogenetic tree – μία γραφική απεικόνιση των εξελικτικών σχέσεων μίας ομάδας οργανισμών).

Βασιζόμενοι σε 1572 αλλαγές residues, κατέγραψαν τη συχνότητα αντικατάστασης ενός residue X από ένα residue Y μέσα σε χρόνο Z. Προέβλεψαν έτσι τα residues τα οποία έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανιστούν στις προγονικές σειρές.

1PAM : ο πρώτος πίνακας PAM και απευθύνεται σε σειρές όπου ο αριθμός των αποδεκτών μεταλλάξεων σε αυτές αποτελεί το 1% του συνολικού μήκους τους (point accepted mutation).

Προκειμένου να αυξηθεί η επιτρεπόμενη απόσταση, ο πίνακας PAM1 μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να χρησιμοποιηθούν τα πολλαπλάσιά του. Η πιο διαδεδομένη έκδοση που χρησιμοποιείται είναι ο **PAM250**.

Επιλέγοντας δηλαδή έναν πίνακα PAM με μεγαλύτερη τιμή, επιτρέπουμε αντιστοιχίσεις σειρών με μεγαλύτερη εξελικτική απόσταση.

Πίνακες PAM (Point Accepted Mutation)

Οι πίνακες PAM είναι καλή επιλογή για αντιστοίχηση σειρών με στενή συγγένεια.

Βασίζονται σε δεδομένα όπου οι αντικαταστάσεις είναι πιο πιθανό να συμβούν από αλλαγές μίας μόνο βάσης στα κωδικόνια.

Κλίνουν προς συντηρητικές μεταλλάξεις στην αλληλουχία του DNA (αντί για αντικαταστάσεις αμινοξέων) οι οποίες επηρεάζουν σε μικρό βαθμό την λειτουργία / δομή.

Μία αντικατάσταση σε κάποιο σημείο της σειράς εξαρτάται αποκλειστικά από το αμινοξύ στο συγκεκριμένο σημείο και από την πιθανότητα που δίνεται από τον πίνακα. Έτσι δεν γίνεται σωστή απεικόνιση των εξελικτικών διαδικασιών, καθώς σειρές με μακρινή συγγένεια συνήθως έχουν περιοχές υψηλής συντήρησης (blocks).

Νέα έκδοση του PAM δημιουργήθηκε το 1992 από τους Jones, Taylor και Thornton, οι οποίοι χρησιμοποίησαν 59190 αντικαταστάσεις.

Πίνακες BLOSUM (Blocks Substitution Matrix)

Για την κατασκευή των πινάκων BLOSUM ο Henikoff (1991) χρησιμοποίησε σύνολα περιοχών χωρίς κενά. Οι περιοχές αυτές ανήκουν σε οικογένειες πρωτεϊνών που περιέχονται στη βάση BLOCKS (η ΒΔ BLOCKS περιλαμβάνει ομαδοποιημένες (clustered) σύντομες σειρές πρωτεϊνών οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα. Οι ομάδες αυτές προκύπτουν από τη βάση SWISS-PROT και άλλες βάσεις, εφαρμόζοντας σε αυτές τον αλγόριθμο MOTIF. Στην παρούσα έκδοση περιλαμβάνονται 8656 Blocks πρωτεϊνών.

Στην ίδια ομάδα ανήκουν σειρές οι οποίες έχουν ποσοστό ομοιότητας που υπερβαίνει κάποιο προκαθορισμένο όριο.

Υπολογίζεται και η συχνότητα με την οποία δύο residues τα οποία έχουν αντιστοιχιστεί σε μία ομάδα να τύχει να αντιστοιχιστούν και σε μία άλλη.

Το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ο λόγος των κατεγραμμένων αντικαταστάσεων μεταξύ δύο οποιονδήποτε residues προς όλες τις αντικαταστάσεις που έχουν καταγραφεί, δηλαδή η πιθανότητα ένα συγκεκριμένο residue να αντικατασταθεί από ένα άλλο συγκεκριμένο residue.

Πίνακες BLOSUM (Blocks Substitution Matrix)

Οι πίνακες BLOSUM είναι η καλύτερη επιλογή για τον εντοπισμό ασθενών πρωτεϊνικών πιθανοτήτων.

Όπως και με τους πίνακες PAM, υπάρχουν πολλές εκδόσεις των πινάκων BLOSUM, με τη διαφορά ότι η αρίθμησή τους είναι αντίστροφη από αυτή των πινάκων PAM.

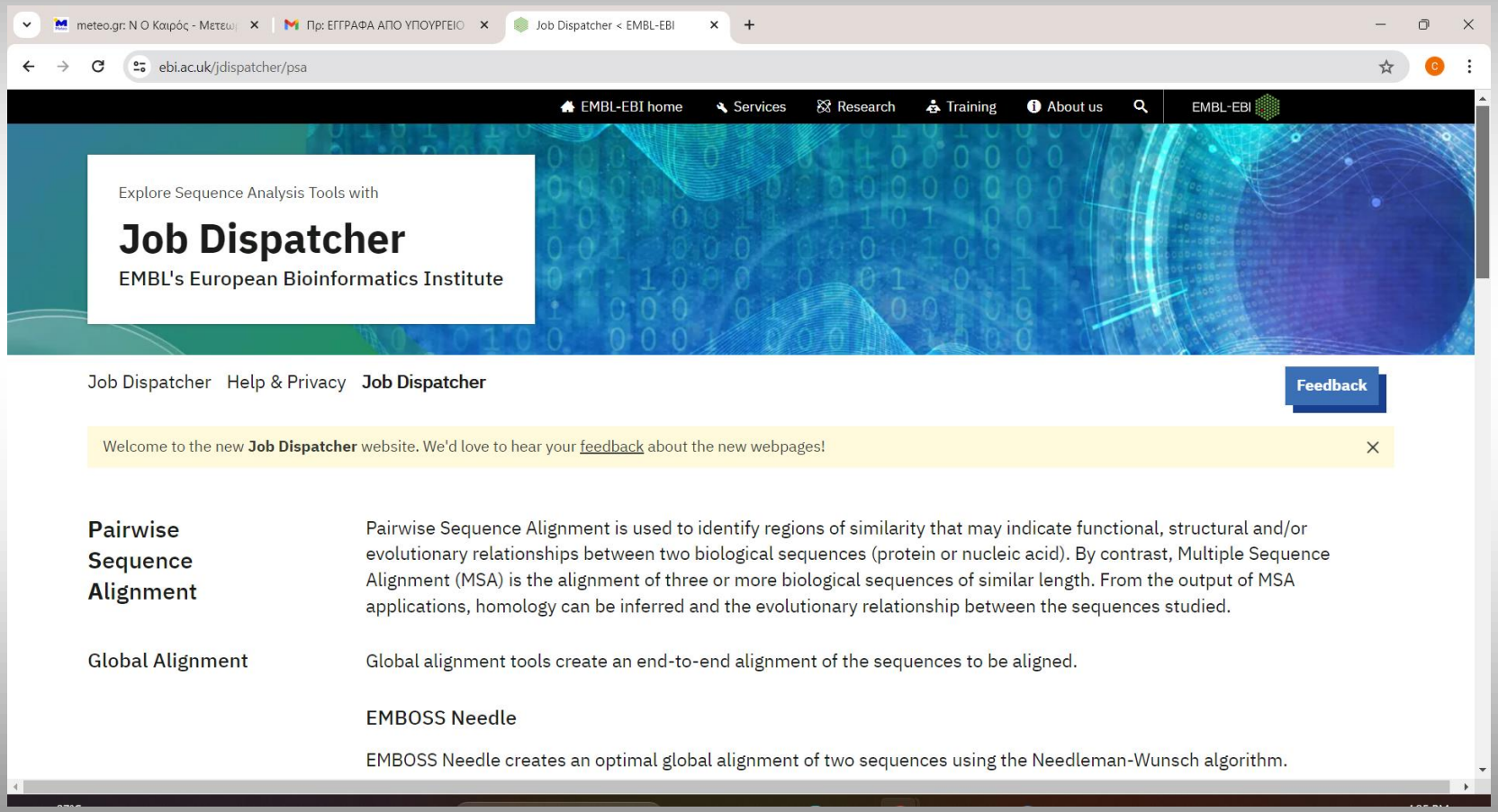
Έτσι, π.χ. ο πίνακας BLOSUM50 περιλαμβάνει ομάδες σειρών με τουλάχιστον 50% ομοιότητα, ενώ ο BLOSUM62 περιλαμβάνει ομάδες σειρών με τουλάχιστον 62% ομοιότητα.

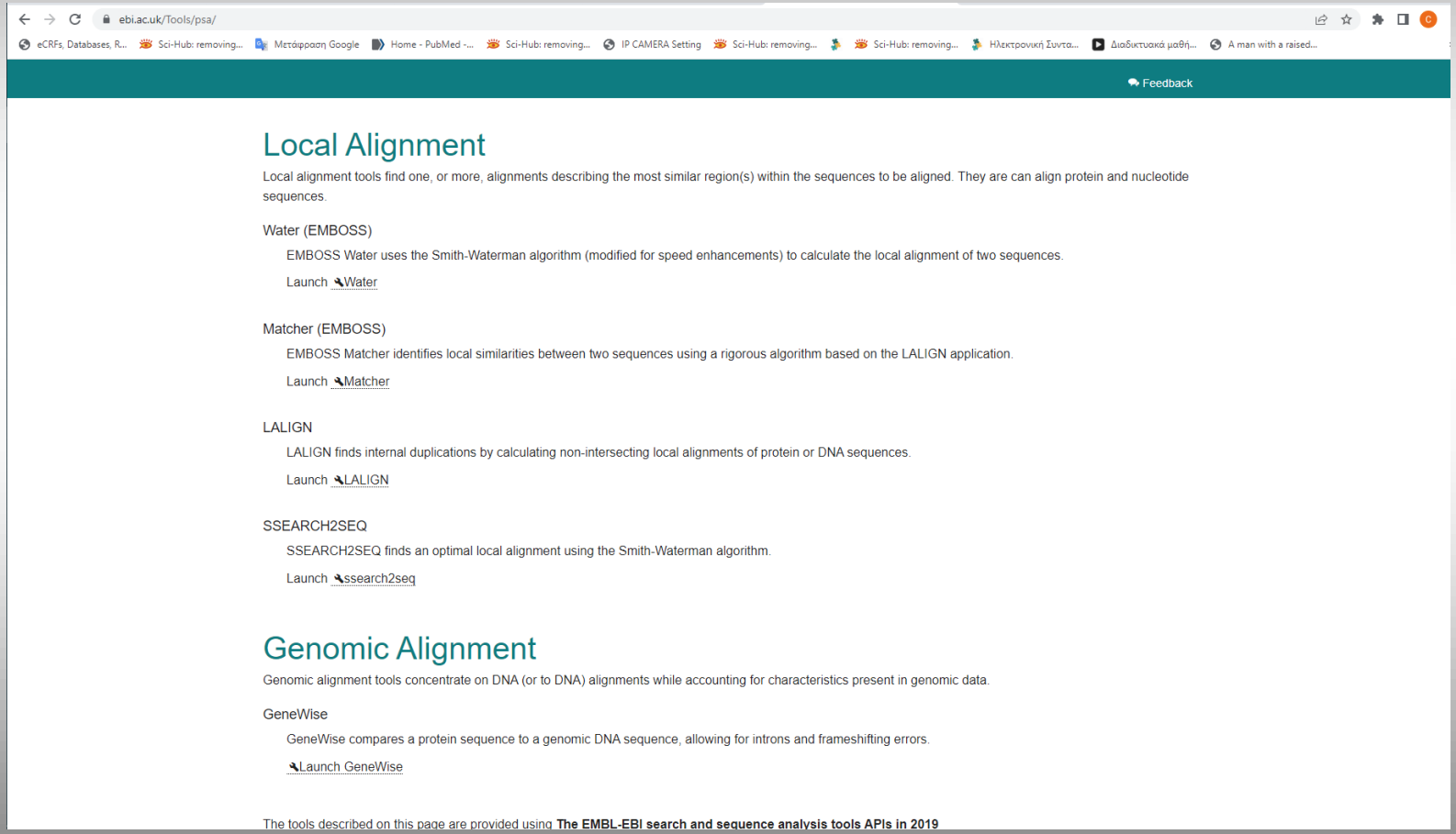
Επιλέγοντας δηλαδή έναν πίνακα BLOSUM με μεγαλύτερη τιμή, επιτρέπουμε αντιστοιχίσεις σειρών με μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας.

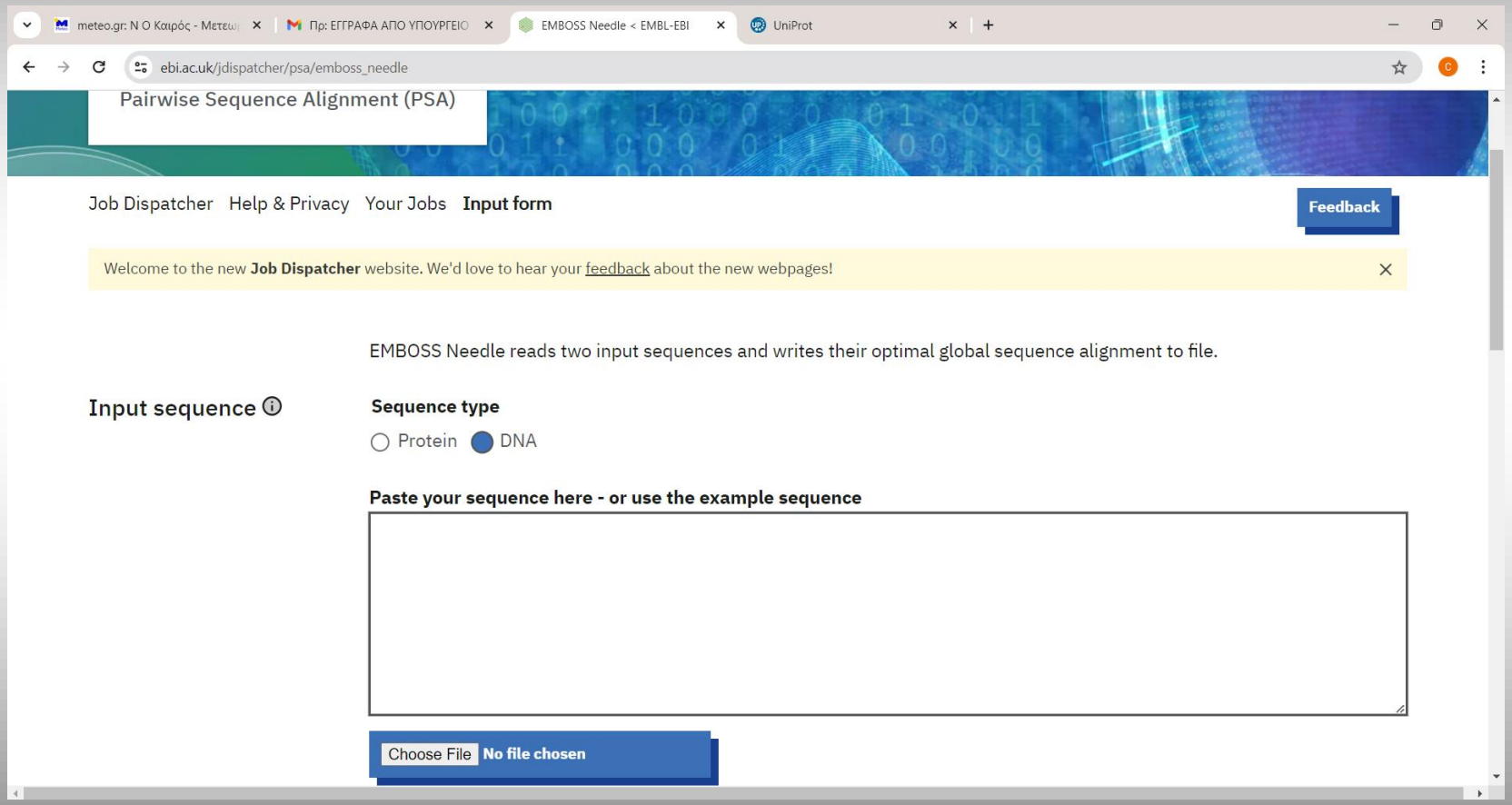
	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Ala	4																			
Arg	-1	5																		
Asn	-2	0	6																	
Asp	-2	-2	1	6																
Cys	0	-3	-3	-3	9															
Gln	-1	1	0	0	-3	5														
Glu	-1	0	0	2	-4	2	5													
Gly	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
His	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
Ile	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
Leu	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
Lys	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
Met	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
Phe	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
Pro	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
Ser	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
Thr	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
Trp	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Tyr	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
Val	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

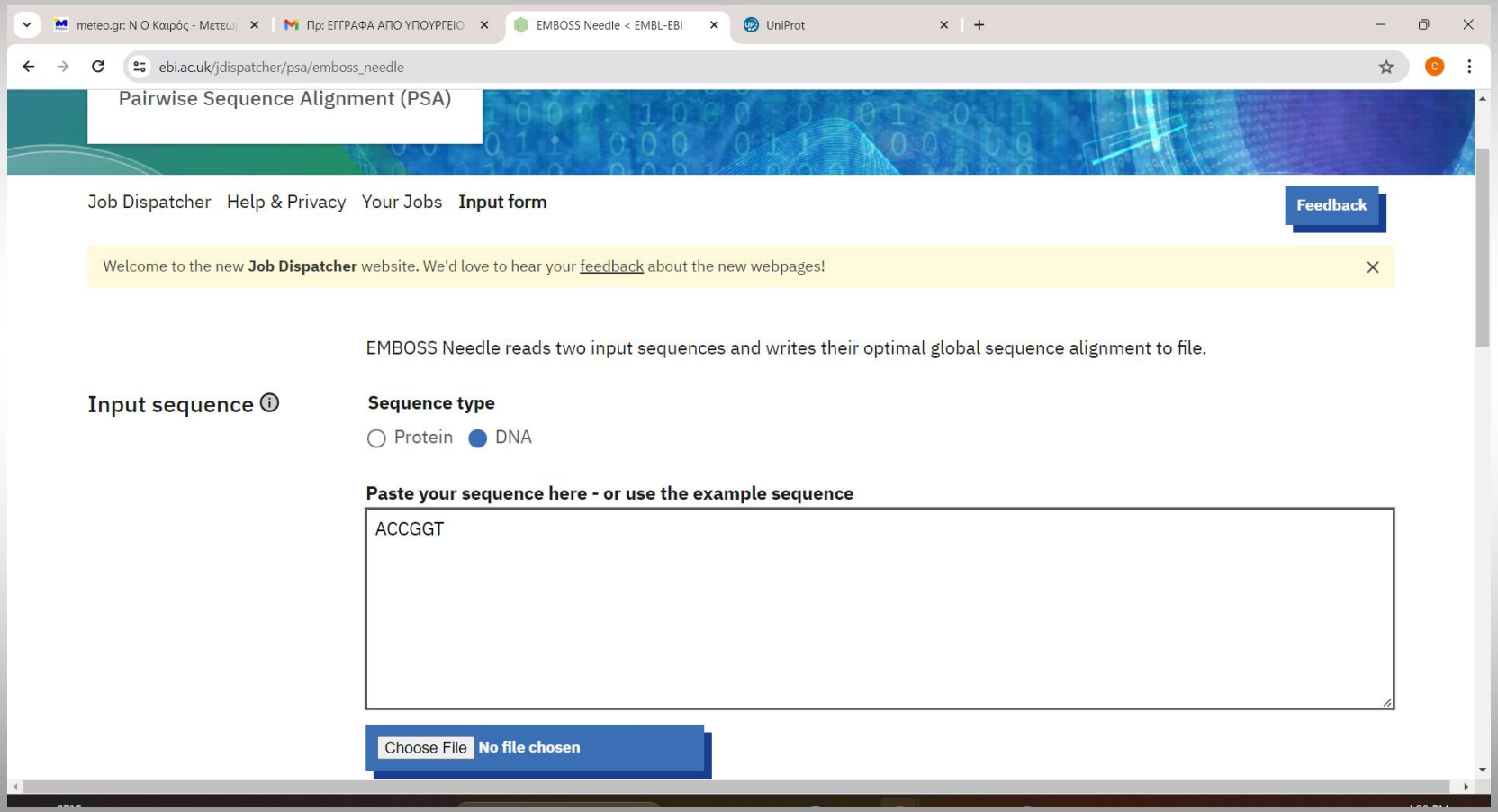
- Ο Πίνακας Αντικατάστασης BLOSUM62. (Εικόνα από Hannes Röst, CC BY SA 2.5, από Wikimedia Commons).

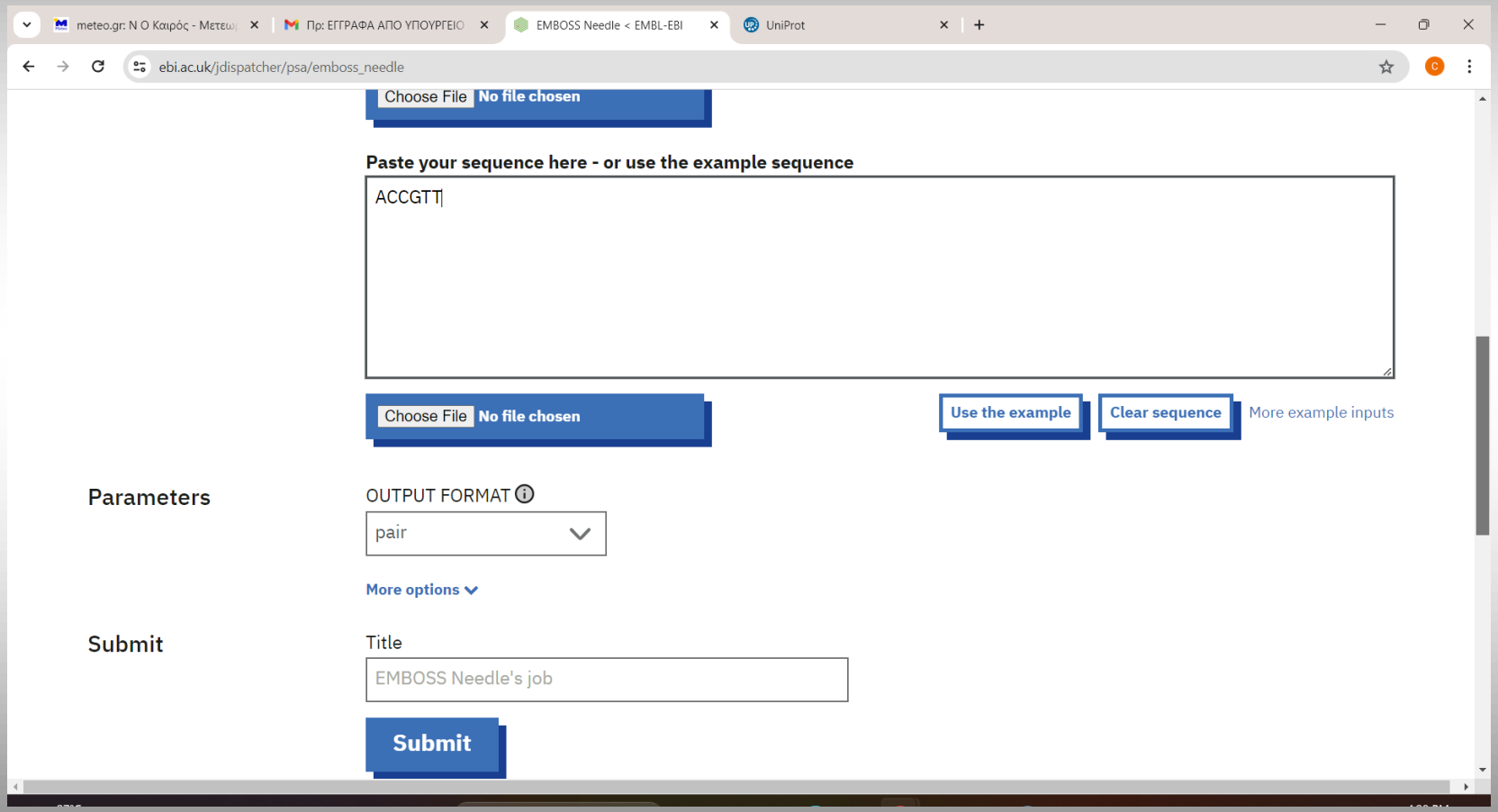
Μπορουμε να χρησιμοποιησουμε την http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/

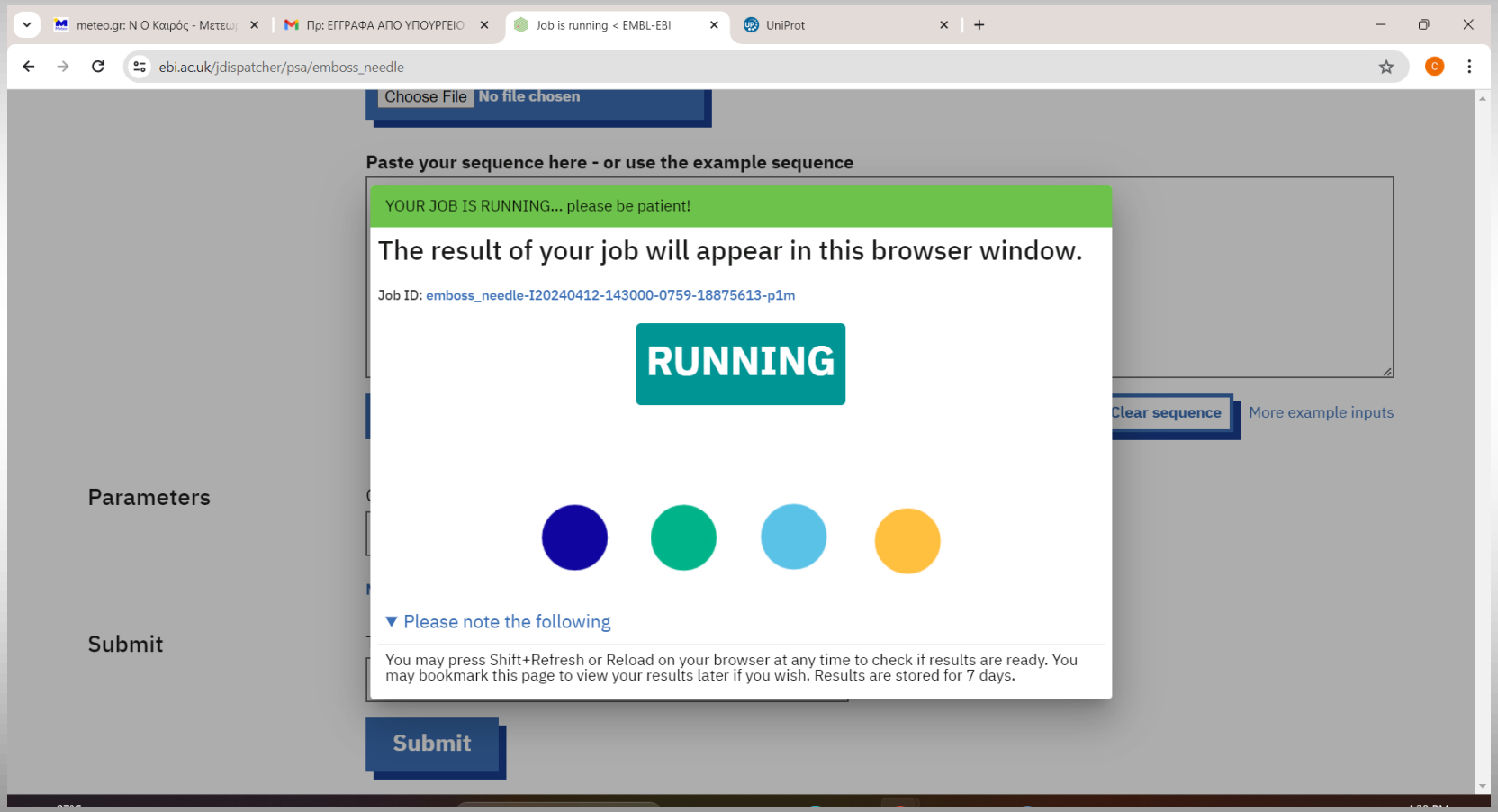


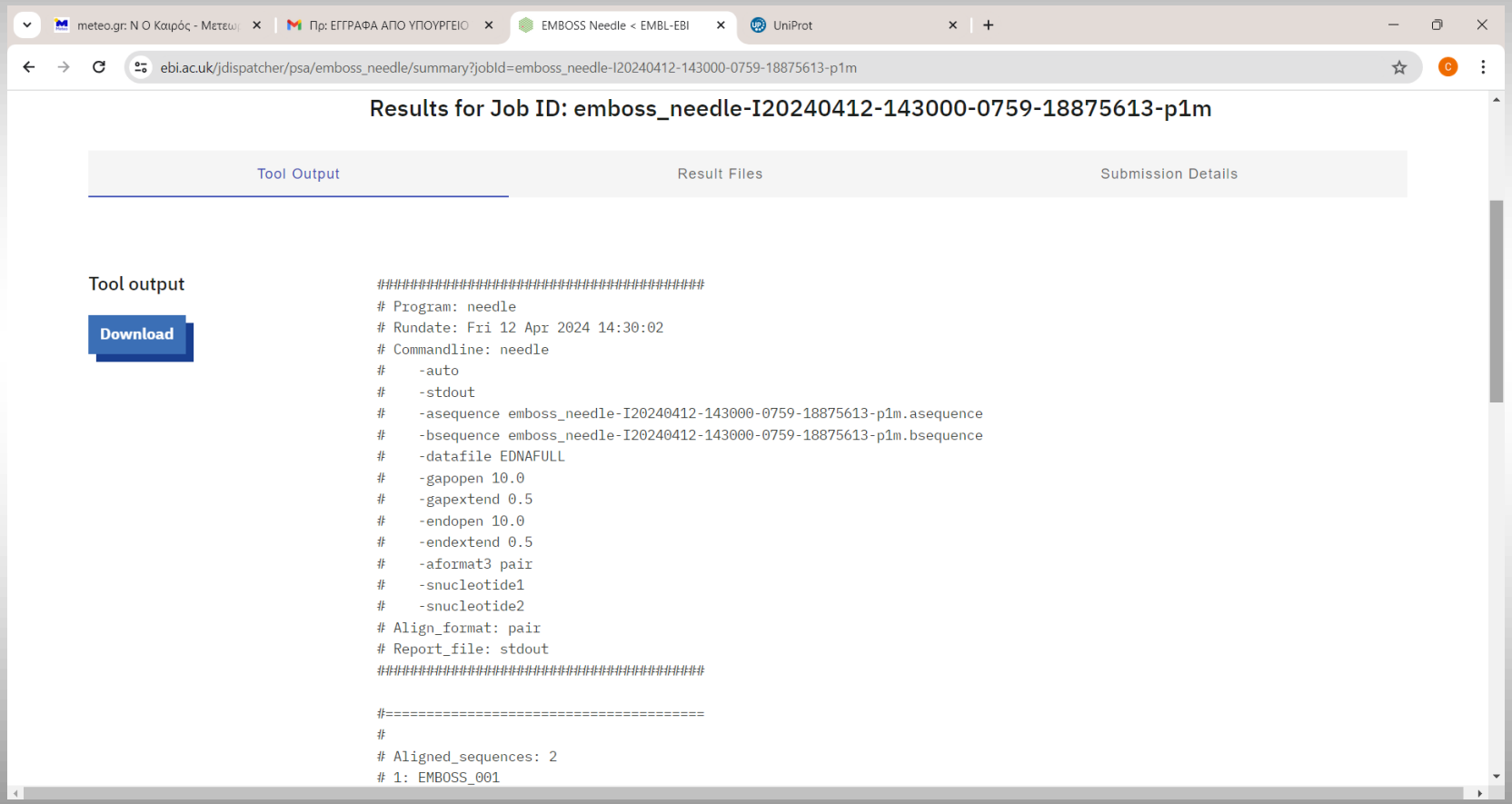

ebi.ac.uk/Tools/psa/
Feedback
Local Alignment
Local alignment tools find one, or more, alignments describing the most similar region(s) within the sequences to be aligned. They are can align protein and nucleotide sequences.
Water (EMBOSS)
EMBOSS Water uses the Smith-Waterman algorithm (modified for speed enhancements) to calculate the local alignment of two sequences.
Launch Water
Matcher (EMBOSS)
EMBOSS Matcher identifies local similarities between two sequences using a rigorous algorithm based on the LALIGN application.
Launch Matcher
LALIGN
LALIGN finds internal duplications by calculating non-intersecting local alignments of protein or DNA sequences.
Launch LALIGN
SSEARCH2SEQ
SSEARCH2SEQ finds an optimal local alignment using the Smith-Waterman algorithm.
Launch ssearch2seq
Genomic Alignment
Genomic alignment tools concentrate on DNA (or to DNA) alignments while accounting for characteristics present in genomic data.
GeneWise
GeneWise compares a protein sequence to a genomic DNA sequence, allowing for introns and frameshifting errors.
Launch GeneWise
The tools described on this page are provided using The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019

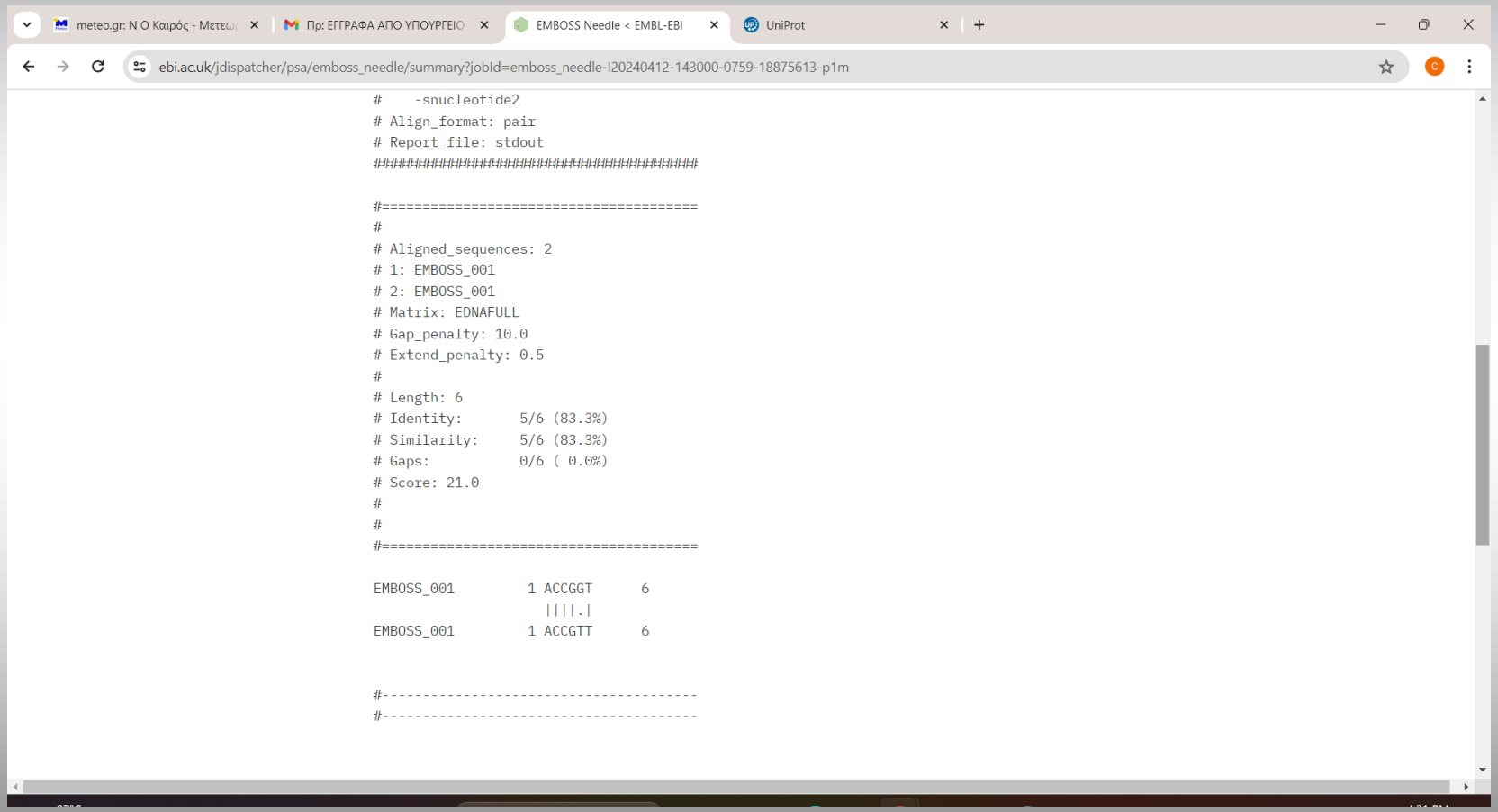

meteo.gr: Ν Ο Καιρός - Μετεω
Πρ: ΕΓΓΡΑΦΑ ΑΠΟ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
EMBOSS Needle < EMBL-EBI
UniProt
ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle
Pairwise Sequence Alignment (PSA)
Job Dispatcher
Help & Privacy
Your Jobs
Input form
Feedback
Welcome to the new Job Dispatcher website. We'd love to hear your feedback about the new webpages!
EMBOSS Needle reads two input sequences and writes their optimal global sequence alignment to file.
Input sequence
Sequence type
Protein
DNA
Paste your sequence here - or use the example sequence
Choose File
No file chosen


meteo.gr: Ν Ο Καιρός - Μετεω
Πρ: ΕΓΓΡΑΦΑ ΑΠΟ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
EMBOSS Needle < EMBL-EBI
UniProt
ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle
Pairwise Sequence Alignment (PSA)
Job Dispatcher
Help & Privacy
Your Jobs
Input form
Feedback
Welcome to the new Job Dispatcher website. We'd love to hear your feedback about the new webpages!
EMBOSS Needle reads two input sequences and writes their optimal global sequence alignment to file.
Input sequence
Sequence type
Protein
DNA
Paste your sequence here - or use the example sequence
ACCGGT
Choose File
No file chosen


meteo.gr: Ν Ο Καιρός - Μετεω
Πρ: ΕΓΓΡΑΦΑ ΑΠΟ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
EMBOSS Needle < EMBL-EBI
UniProt
ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle
Choose File No file chosen
Paste your sequence here - or use the example sequence
ACCGTT
Choose File No file chosen
Use the example
Clear sequence
More example inputs
Parameters
OUTPUT FORMAT
pair
More options
Submit
Title
EMBOSS Needle's job
Submit


meteo.gr: Ν Ο Καιρός - Μετεω
Πρ: ΕΓΓΡΑΦΑ ΑΠΟ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
Job is running < EMBL-EBI
UniProt
ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle
Choose File
No file chosen
Paste your sequence here - or use the example sequence
YOUR JOB IS RUNNING... please be patient!
The result of your job will appear in this browser window.
Job ID: emboss_needle-I20240412-143000-0759-18875613-p1m
RUNNING
Clear sequence
More example inputs
Parameters
Submit
▼ Please note the following
You may press Shift+Refresh or Reload on your browser at any time to check if results are ready. You may bookmark this page to view your results later if you wish. Results are stored for 7 days.
Submit


meteo.gr: Ν Ο Καιρός - Μετεω
Πρ: ΕΓΓΡΑΦΑ ΑΠΟ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
EMBOSS Needle < EMBL-EBI
UniProt
ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle/summary?jobId=emboss_needle-I20240412-143000-0759-18875613-p1m
Results for Job ID: emboss_needle-I20240412-143000-0759-18875613-p1m
Tool Output
Result Files
Submission Details
Tool output
Download
##
Program: needle
Rundate: Fri 12 Apr 2024 14:30:02
Commandline: needle
-auto
-stdout
-asequence emboss_needle-I20240412-143000-0759-18875613-p1m.asequence
-bsequence emboss_needle-I20240412-143000-0759-18875613-p1m.bsequence
-datafile EDNAFULL
-gapopen 10.0
-gapextend 0.5
-endopen 10.0
-endextend 0.5
-aformat3 pair
-snucleotide1
-snucleotide2
Align_format: pair
Report_file: stdout
##
#=======================================
#
Aligned_sequences: 2
1: EMBOSS_001


meteo.gr: Ν Ο Καιρός - Μετεω
Πρ: ΕΓΓΡΑΦΑ ΑΠΟ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
EMBOSS Needle < EMBL-EBI
UniProt
ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle/summary?jobId=emboss_needle-I20240412-143000-0759-18875613-p1m
-snucleotide2
Align_format: pair
Report_file: stdout
##
#=======================================
#
Aligned_sequences: 2
1: EMBOSS_001
2: EMBOSS_001
Matrix: EDNAFULL
Gap_penalty: 10.0
Extend_penalty: 0.5
#
Length: 6
Identity: 5/6 (83.3%)
Similarity: 5/6 (83.3%)
Gaps: 0/6 (0.0%)
Score: 21.0
#
#
#=======================================
EMBOSS_001   1 ACCGGT   6
                       ||||.|
EMBOSS_001   1 ACCGTT   6
#---------------------------------------
#---------------------------------------

Στατιστικές μετρήσεις για τη σημαντικότητα αντιστοιχίας στην αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων

- Η αντιστοιχία αλληλουχιών πραγματοποιείται με τη χρήση προγραμμάτων υπολογιστών.
- Αυτά τα προγράμματα παρέχουν κάποια στατιστική εκτίμηση δηλώνοντας το επίπεδο αξιοπιστίας που θα πρέπει να σχετίζεται σε μια αντιστοιχία.
- Τα συνηθισμένα στατιστικά μεγέθη είναι το p-value και E-value.

- Το ***p-value*** σχετίζει το αποτέλεσμα μιας αντιστοιχίας με την πιθανότητα να είναι τυχαίο
  - *(όσο πιο πολύ προσεγγίζει το μηδέν, τόσο μεγαλύτερη αξιοπιστία υπάρχει ότι το αποτέλεσμα είναι πραγματικό).*

- Το ***E-value*** περιγράφει τον αριθμό επιτυχιών (ομοιοτήτων) που αναμένεται να είναι τυχαία στην αναζήτηση μιας βάσης δεδομένων συγκεκριμένου μεγέθους
  - όταν το E-value πάρει την τιμή 1 για ένα ταίριασμα, αυτό μπορεί να ερμηνευτεί ότι στην τρέχουσα έρευνα, αναμένεται μόνο από τύχη να βρεθεί μια ομοιότητα με ίδιο αποτέλεσμα.
  - Μια τιμή 0 δηλώνει ότι κανένα δεν αναμένεται να είναι τυχαίο, δηλ. είναι απίθανο η αντιστοιχία να είναι από τυχαία ομοιότητα).

  - αντιπροσωπεύουν την πιθανότητα της αντιστοίχισης που συμβαίνει τυχαία. Πρόκειται για στατιστικό υπολογισμό που βασίζεται στην ποιότητα της αντιστοίχισης (βαθμολογία) και στο μέγεθος της βάσης δεδομένων.
  - Μια E-value 0.001 λέει ότι υπάρχει μια πιθανότητα 0.001 ότι αυτή η αντιστοίχιση θα υπάρξει στην βάση δεδομένων τυχαία, δηλαδή, αν η βάση δεδομένων περιέχει 10000 ακολουθίες, τότε ίσως αναμένετε ότι η αντιστοίχιση θα συμβεί 10 φορές.
  - Μια τιμή E-value 0 είναι στην πραγματικότητα μια στρογγυλευμένη πιθανότητα (ίσως 1e-250 ή κάτι τέτοιο), και απλά λέει ότι υπάρχει (σχεδόν) καμία πιθανότητα ότι η αντιστοίχιση μπορεί να συμβεί τυχαία.