3. Páronkénti szekvencia−összerendezés

1. Alapfogalmak
2. Hasonlósági mátrixok (PAM, BLOSUM)
3. Statisztikai szignifikancia
4. A pontábrázolás
5. Lokális és globális hasonlóság
6. Globális összerendezés: Needleman−−Wunsch−algoritmus
7. Lokális összerendezés: Smith−−Waterman−algoritmus
8. Szekvenciahasonlósági keresések adatbázison (FASTA, BLAST)
9. Webhelyek

Alapfogalmak

Jelentõség

- **Jelentõsége**: új, ismeretlen fehérjéhez tartozó szekvencia esetében az ismert szekvenciák adatbázisában kell keresni az újhoz hasonlókat.
- Meg kell állapítani a hasonlóság mértékét
- A nagy hasonlóság rokonságra utal, kis hasonlóság esetén a rokonság feltételes
- Rokonsági viszonyok fontosak. Pl. ha egy adott géncsaládnak az egérben 10 tagja van, az emberben pedig csak 7−et találtak, vsz. van még min. 3!
- A szekvencia−összerendezés a hasonlóság megállapításának eszköze

Ábécék, komplexitások

- Szekvencia: egy betûkészlet, ábécé elemeibõl áll
- DNS: 4 betû, fehérje: 20 betû (néha még: X [ismeretlen], B [Asp/Asn], Z [Glu/Gln])
- EST: 5 betû (ATGC+N [ismeretlen])
- Programok az ismeretlen betûkkel sokféleképpen bánnak (felismeri/kicseréli/ figyelmen kívül hagyja/leáll, stb.)

Egyszerû manuális összerendezés

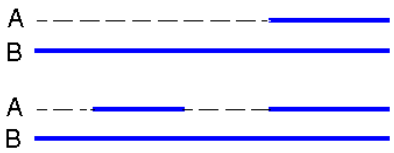
Összerendezés elõtt:

```
1. szekvencia:      AGGVLIIQVG
                    ||||||
2. szekvencia:      AGGVLIQVG
```

Összerendezés után:

```
1. szekvencia:      AGGVLIIQVG
                    ||||| ||||
2. szekvencia:      AGGVL-IQVG
```

- **Gap**−et, hézagot szúrunk be, így az egyezések száma 6−ról 9−re nõ
- Gyakorlatban hosszú, kevésbé hasonló szekvenciák
- Pontozni szükséges: egyezések és eltérések száma, beszúrt hézagok száma −−> definiálható egy **metrika**, amely megadja két szekvencia távolságát
- Részszekvenciák:



Hasonlósági mátrixok

- Elvben 100%−os azonosságot érhetünk el az összerendezett pozíciókban, ha gátlástalanul hézagokat szúrunk be. Pl.:

```
Q---ACFWE---MKVRT---ACFYI---MACP
QMKV---WEACF---RTMKV---YIKVF---P
```

- Ennek azonban biológiailag nincs értelme. A hézagok beszúrását korlátozni kell: büntetõpontokat vezetünk be:
  - ♦ Gap opening penalty: új hézag beszúrásakor alkalmazott büntetõpont
  - ♦ Gap extension penalty: meglévõ hézag növelésekor alkalmazott büntetõpont
- Értelmes összerendezésnél egymás alá kerülnek eltérõ aminosavak is; nem mindegy, hogy mi mire cserélõdik. Az aminosavak hasonlóságát pontozni kell. E pontszámokat tartalmazzák az aminosavhasonlósági mátrixok.
- Ha csak az azonosságokat vesszük figyelembe a pontozásnál, akkor **egységmátrixot** használunk:

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

Egységmátrix nukleotidokra

	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W
C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Egységmátrix aminosavakra

- Ezek ún. **ritka mátrixok**. Hasonlósági keresésnél nem kedvezõek, mert csak a teljes egyezést veszik figyelembe, azokat is egyenlõ súllyal.
- Szükség van "engedékenyebb" hasonlósági mátrixokra, amelyek a hasonló aminosavakat is jutalmazzák. Hátrány: növekszik a "zaj" is (hasonlósági keresésnél több találat adódik, nem rokon fehérjékkel is)
- A jel/zaj viszony a mátrixtól függ. Külön kutatási ág a jó aminosav−hasonlósági mátrixok megalkotása
- Hasonlósági mátrix alapján hasonlósági pontszám számítható az összerendezésre
- hasonlósági százalékérték: a pozitív hasonlósági pontszámú aminosavpárok százalékos aránya
- Sokféle mátrixot lehet definiálni, pl. az aminosavak fizikai−kémiai tulajdonságai alapján, vagy a mutációs gyakoriságok alapján.
- Két leggyakoribb mátrix: PAM és BLOSUM (mutációs gyakoriságok alapján definiált mátrixok).

A Dayhoff−féle PAM mátrixok

- 70−es években dolgozta ki Margaret Dayhoff és mtsai
- PAM = APM = Accepted Point Mutation (a szelekció által jóváhagyott mutáció)
- PAM: az evolúciós távolság mértékegysége is: 1 PAM az az evolúciós távolság (tkp. idõtartam), amely két, kezdetben azonos szekvencia között 1% eltérést hoz létre pontmutációkkal.
- Dayhoff: a 70−es években ismert szekvenciák összehasonlításából aminosavcserék valószínûségét számította. Manuálisan összerendezett, >85% azonosságú szekvenciákból

- Számítható: XY aminosavcsere valószínûsége adott idõ alatt (PAM−ban mérve), osztva az X és az Y aminosav gyakoriságával −−> **"relatedness odds matrix" (rokonsági esély mátrixa)**
- Két szekvencia összehasonlításakor ezeket pozícióról pozícióra össze kéne szorozni. Egyszerûbb a logaritmusokat összeadni −−> **"log odds" mátrix**

Cisztein	**C**	12																		
Speciális	**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													
Asx, Glx	**N**	−4	1	0	−1	0	0	2												
	D	−5	0	0	−1	0	1	2	4											
	E	−5	0	0	−1	0	0	1	3	4										
	Q	−5	−1	−1	0	0	−1	1	2	2	4									
Bázikus	**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						
Alifás	**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		
Aromás	**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
		C	**S**	**T**	**P**	**A**	**G**	**N**	**D**	**E**	**Q**	**H**	**R**	**K**	**M**	**I**	**L**	**V**	**F**	**Y**	**W**

A log odds mátrix 250 PAM−ra. Pozitív értékek: konzervatív cserék, negatívak: valószínûtlen cserék. Az aminosavak tulajdonságaik szerint csoportosítva vannak felsorolva, ezért az átló közelében lévõ pontszámok nagyobbak.

- 250 PAM: kb. 20% szekvenciaazonosságnak felel meg, ez a legérdekesebb tartomány, ezért a PAM250 mátrixot gyakran használják. (1 PAM idõ alatt 1% eltérést okozó pontmutáció történik, 250−szer annyi idõ alatt kb. 80%−nyi eltérést okozó pontmutáció).
- De: Elvben elõre tudni kéne a szekvenciaazonosságot, és a megfelelõ PAM mátrixot használni:

A két szekvencia eltérése százalékban	**Evolúciós távolság PAM−ban**
1	1
10	11
20	23
30	38
40	56
50	80
60	112
70	159
80	246

(de a szekvenciaazonosság csak az összerendezés után számítható...)

- PAM mátrixok hátránya: a számokat >85% azonosságú szekvenciapárokból származtatták, ennél kisebb azonosságokra csak extrapolálták. Továbbá viszonylag kis számú szekvenciából származtatták az adatokat.

A BLOSUM mátrixok

- Henikoff és Henikoff 1992
- BLOCKS adatbázison alapul: ebben fehérjecsaládok többszörösen összerendezett szekvenciablokkjai vannak
- Szekvenciákból csoportokat, **klasztereket** képeznek a szekvenciahasonlóság alapján, pl. az egymással 62%−nál nagyobb azonosságot mutató szekvenciák egy klaszterbe kerülnek. Az azonosság mértéke alapján sokféle klaszter képezhetõ (80%, 60%, 40%, stb.)
- Aminosav−helyettesítési mátrixokat számolnak a klaszterekben lévõ szekvenciák alapján −−> BLOSUM 80, BLOSUM 60, BLOSUM 40, stb. mátrixok
- Gyakran használt: BLOSUM 62.
- Általánosságban biológiailag helyesebb összerendezéseket ad, mint a PAM mátrixok (ismert szerkezetû fehérjéknél ez ellenõrizhetõ).
- BLOSUM és PAM más−más aminosavcseréket részesít elõnyben. Pl.:

```
(a)
Identities = 36/52 (69%), Positives = 47/52 (90%)

Query: 214 KMGPGFTKALGHGVDLGHIYGDNLERQYQLRLFKDGKLKYQVLDGEMYPPSV 265
             GP+FTK+  HGVDL+HIYG++LERQ +LRLFKDGK+KYQ+++GEMYPP+V
Sbjct: 97  ERGPAFTKGKNHGVDLSHIYGESLERQHKLRLFKDGKMKYQMINGEMYPPTV 148


(b)
Identities = 36/53 (68%), Positives = 47/53 (89%)

Query: 214 KMGPGFTKALGHGVDLGHIYGDNLERQYQLRLFKDGKLKYQVLDGEMYPPSVE 266
           + GP FTK   HGVDL HIYG++LERQ++LRLFKDGK+KYQ+++GEMYPP+V+
Sbjct: 97  ERGPAFTKGKNHGVDLSHIYGESLERQHKLRLFKDGKMKYQMINGEMYPPTVK 149
```

(a) PAM250 összerendezés, (b) BLOSUM 62 összerendezés. A preferált cseréket jelzõ + jelek nem ugyanott vannak, ezért a (b) összerendezés eggyel hosszabb is.

Statisztikai szignifikancia

- Bármely két szekvenciát össze lehet rendezni (elég engedékeny paraméterekkel), szemre még jó is lehet.
- Szükség van megbízhatósági mérõszámra
- A legtöbb program valamilyen statisztikai paramétert ad meg, pl.
    - **P érték**: annak a valószínûsége, h. a kapott összerendezés a véletlen szüleménye. Minél kisebb, annál jobb.
    - **E érték**: várható gyakoriság (expected frequency): adatbázison való kereséskor a véletlennek köszönhetõen várható találatok száma. Pl. E=1 esetén 1 találat véletlenül is várható. Minél kisebb, annál jobb.

    Példa:

```
>bbs|69040 70 kda cyclooxygenase-related protein [mice, Peptide Partial, 80aa]

 Score = 145 bits (362), Expect = 7e-34
 Identities = 66/80 (82%), Positives = 73/80 (90%)

Query: 294 LPGLMLYATLWLREHNRVCDLLKAEHPTWGDEQLFQTTRLILIGETIKIVIEEYVQQLSG 353
           +PLGM+YAT+WLREHNRVCDLLK EHP WGDEQLFQT+RLILIGETIKIVIE+YVQ LSG
Sbjct: 1   VPGLMMYATIWLREHNRVCDLLKQEHPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSG 60

Query: 354 YFLQLKFDPELLFGVQFQYR 373
           Y  +LKFDPELLF  QFQY+
Sbjct: 61  YHFKLKFDPELLFNQQFQYQ 80
```

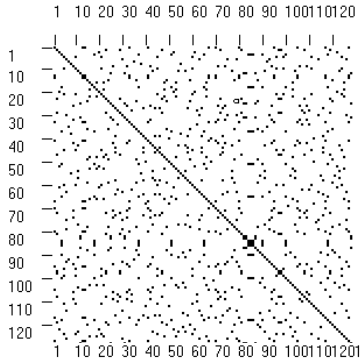
A pontábrázolás (dotplot)

- Két szekvencia összehasonlításának legegyszerûbb eszköze
- Téglalap alakú mátrix két tengelyére a két szekvencia
- Aminosavak/nukleotidok egyezése/hasonlósága esetén a megfelelõ helyre egy pontot (X−et, stb.) teszünk

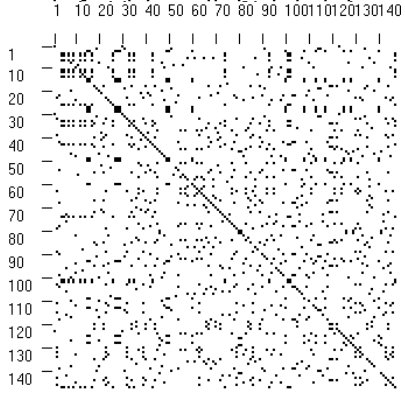
```
  M T F R D L L S V S F E G P R P D S S A G G
M X
T   X
F     X               X
R       X                       X
D         X                           X
L           X X
L           X X
S               X   X               X X
V                 X
S               X   X               X X
F     X               X
E                       X
G                         X                 X X
P                           X   X
R       X                     X
P                           X   X
O
S               X   X               X X
S               X   X               X X
A                                       X
G                         X               X X
G                         X               X X
```

- Diagonális vonalak hosszabb egyezõ szakaszokat jelentenek
- Jel és zaj vizuálisan jól elkülöníthetõ
- Hosszabb szekvenciák:

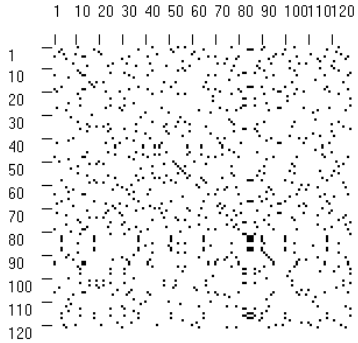
Két azonos szekvencia (sertés lizozim):



Nagyon hasonló szekvenciák (rokon fajok lizozimjei):



Távoli, de rokon szekvenciák (lizozim és alfa−laktalbumin):



- Moduláris fehérjéknél a modulok azonosításának fontos eszköze
- Hasonlósági mátrixok alapján árnyalni, színezni is lehet, de a zaj nõ.

Lokális és globális hasonlóság

- Globális hasonlóság: a szekvencia teljes hossza mentén
- Lokális hasonlóság: csak egyes régiókban
- Hasonlósági kereséseknél a lokális hasonlóságot célszerû keresni (funkció szempontjából fontos helyek gyakran rövid szakaszok, lokális keresés gyorsabb is)
- Nincs jó és rossz összerendezés, csak különbözõ matematikai modellek, melyek más−más biológiai szempontokra készültek

---

Globális összerendezés: Needleman−−Wunsch−algoritmus

- Needleman Wunsch 1970, késõbb finomítások
- A két szekvencia maximális egyezését keressük, lehetséges deléciókkal. Gap penalty érvényben van.
- **Szemléltetés:** Rendezzük össze az ADLGAVFALCDRYFQ és az ADLGRTQNCDRYYQ szekvenciákat!
- A dotplotból kiindulva felírunk egy mátrixot, az egyezéseknél 1−eseket, az eltéréseknél 0−t írunk be, vagyis a $H_{i,j}=s(a_i, b_j)$ képletet alkalmazzuk, ahol $s(a_i, b_j)$ az a_i és b_j aminosavak hasonlósági pontszáma (itt az egységmátrixot alkalmazzuk):

	A	D	L	G	A	V	F	A	L	C	D	R	Y	F	Q
A	**1**	0	0	0	**1**	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0
D	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0
L	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0
T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**
N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0
D	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0
R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0
Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0
Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0
Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**

- Ezután a jobb alsó sarokból indulva, jobbról balra és lentrõl felfelé haladva kitöltjük a mátrixot a következõ, rekurzív képlet szerint:

$$H_{i,j} = H_{i,j} + \max \{ H_{i+1,j+1}; \max_{k>=1} (H_{i+k+1,j+1} - W_k); \max_{k>=1} (H_{i+1,j+k+1} - W_k) \}$$

(Itt W_k a k hosszúságú hézaghoz tartozó gap penalty.)

Tehát mindegyik cella tartalmához hozzáadjuk három érték közül a legnagyobbat. A három érték:

1. a cellától jobbra és lefelé esõ cella tartalma
2. az eggyel lejjebb lévõ sorban és legalább kettõvel jobbrább lévõ oszlopban oszlopban lévõ elemek gap penaltyvel csökkentett értékeinek maximuma
3. az eggyel jobbrább lévõ oszlopban és legalább kettõvel lejjebb lévõ sorban lévõ elemek gap penaltyvel csökkentett értékeinek maximuma

W_k=0 gap penaltyt használva a mátrix félig kitöltve így fest:

	A	D	L	G	A	V	F	A	L	C	D	R	Y	F	Q
A	1	0	0	0	1	0	0	1	0	4	3	2	1	1	0
D	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	4	2	1	1	0
L	0	0	1	0	0	0	0	0	1	4	3	2	1	1	0
G	0	0	0	1	0	0	0	0	5	4	3	2	1	1	0
R	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	3	3	1	1	0
T	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	3	2	1	1	0
Q	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	3	2	1	1	1
N	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	3	2	1	1	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	3	2	1	1	0
D	0	1	0	0	0	0	0	0	3	3	4	2	1	1	0
R	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	1	1	0
Y	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	1	0
Y	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	1	0
Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

A megjelölt 1−eshez hozzáadjuk az almátrix maximumát (5), így a cellába 6−os kerül.

- Az algoritmus értelme: a $H_{i,j}$ mátrixelem az a_i és b_j aminosavpárral kezdõdõ és a két szekvencia végéig tartó legjobb lehetséges összerendezés pontszámát tartalmazza.
- Valamelyik N−terminálishoz érve készen van a mátrix. Az összerendezés visszafelé, a bal felsõ sarokból a jobb alsó felé haladva a maximális pontszámokat követve (backtracking) adódik:

	A	D	L	G	A	V	F	A	L	C	D	R	Y	F	Q
A	**9**	7	6	6	7	6	6	7	5	4	3	2	1	1	0
D	7	**8**	6	6	6	6	6	6	5	4	4	2	1	1	0
L	6	6	**7**	5	5	5	5	5	6	4	3	2	1	1	0
G	5	5	5	**6**	5	5	5	5	5	4	3	2	1	1	0
R	5	5	5	5	**5**	5	5	5	5	4	3	3	1	1	0
T	5	5	5	5	5	**5**	5	5	5	4	3	2	1	1	0
Q	5	5	5	5	5	5	**5**	5	5	4	3	2	1	1	1
N	5	5	5	5	5	5	5	**5**	5	4	3	2	1	1	0
C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	**5**	3	2	1	1	0
D	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	**4**	2	1	1	0
R	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	**3**	1	1	0
Y	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	**2**	1	0
Y	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	**1**	0
Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**

Az útvonalat "leolvasva" adódik az összerendezés:

```
ADLGAVFALCDRYFQ
||||     |||| |
ADLGRTQN-CDRYYQ
```

- (Megjegyzés: ebben a szemléltetõ példában az egyszerû pontozási rendszer (egységmátrix) és a *gap penalty*−k használatának mellõzése miatt a fenti mátrixból nem következik egyértelmûen a megadott összerendezés).
- Ugyanezt *gap penalty*kkel, egységmátrix helyett pedig megfelelõ hasonlósági mátrixokkal (PAM, BLOSUM), stb. alkalmazva: jó, optimális összrendezések (maximális pontszám a hasonlóságokat és a gap penaltyket figyelembe véve) nyerhetõk.

Lokális összerendezés: Smith−−Waterman−algoritmus

- Smith és Waterman 1981, késõbb finomítások
- Hasonló a Needleman−−Wunsch algoritmushoz, de rövid, lokálisan hasonló régiókat is megtalál. Két fõ eltérés:
  1. A különbözõ (ill. nem hasonló) aminosavak párosítását negatív pontszámmal kell pontozni (és nem nullával)
  2. A mátrix kitöltésénél negatív értéket nem engedünk meg; ha negatív érték jönne ki, helyette 0−t írunk be.
- A mátrix mindegyik cellája egy lehetséges lokális összerendezés végpontja (jobb szélsõ eleme), az ehhez tartozó maximális hasonlósági pontszámot írjuk a cellába
  Szemléltetés: az elõbb látott két szekvenciát rendezzük össze
- A mátrix éleit nullákkal töltjük fel (ezek nem lehetnek összerendezés végpontjai)

	x	A	D	L	G	A	V	F	A	L	C	D	R	Y	F	Q
x	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A	0.0															
D	0.0															
L	0.0															
G	0.0															
R	0.0															
T	0.0															
Q	0.0															
N	0.0															
C	0.0															
D	0.0															
R	0.0															
Y	0.0															
Y	0.0															
Q	0.0															

- A bal felsõ sarokból indulva balról jobbra és fentrõl lefelé haladva a mátrixot feltöltjük pontszámokkal. Az (i,j) cellába írandó pontszámot a következõ rekurzív képlet szerint számítjuk:

$$H_{i,j} = \max \{ H_{i-1,j-1} + s(a_i, b_j);\quad \max_{k>=1} (H_{i-k,j} - W_k);\quad \max_{k>=1} (H_{i,j-k} - W_k);\quad 0 \}$$

Tehát kiszámítunk 3 értéket, jelentésük: az (i,j) cellánál végzõdõ lokális összerendezés pontszáma 3 lehetséges esetben:

1. Az a_i és b_j aminosavak az összerendezésben egymásnak meg vannak feleltetve. Pontozása: Az aminosavpár hasonlósági pontszámához ($s(a_i,b_j)$) hozzáadjuk az $(i-1,j-1)$ cellában lévõ pontszámot ($H_{i-1,j-1}$), ez az eggyel rövidebb összerendezés pontszáma). A mátrix ezekkel a számokkal kitöltve így fest:

	x	A	D	L	G	A	V	F	A	L	C	D	R	Y	F	Q
x	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
D	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.7	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
L	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	1.0	0.3	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0
G	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	1.0	0.0	0.0	0.0
T	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
Q	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	1.0
N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
D	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
R	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	3.0	0.0	0.0	0.0
Y	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	4.0	0.0	0.0
Y	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	3.7	0.0
Q	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	4.7

A mátrix a $Hi,j = \max \{ Hi-1,j-1 + s(ai, bj); 0\}$ képlet szerint kitöltve. Egyezés pontszáma 1, eltérésé −1/3. Egy tizedesre kerekített értékeket adtunk meg.

2. Az a_i aminosav egy k hosszúságú deléció végén helyezkedik el (k darab hézag van elõtte). Pontozása: a deléciót megelõzõ utolsó összerendezett aminosavpár pontszáma ($H_{i-k,j}$), mínusz a k darab delécióhoz tartozó gap penalty, W_k. Ezt az összes lehetséges k−ra végig kell próbálni és a maximális pontszámot kell venni.
3. A b_j aminosav egy k hosszúságú deléció végén helyezkedik el (k darab hézag van elõtte). Pontozása: a deléciót megelõzõ utolsó összerendezett aminosavpár pontszáma ($H_{i,j-k}$), mínusz a k darab delécióhoz tartozó gap penalty, W_k. Ezt az összes lehetséges k−ra végig kell próbálni és a maximális pontszámot kell venni.

- E 3 érték maximumát írjuk a cellába, illetve ha ez negatív, akkor nullát, hogy a rossz lokális összerendezések ne éreztessék a hatásukat a szomszédos szegmenseknél.

Végeredmény:

	x	A	D	L	G	A	V	F	A	L	C	D	R	Y	F	Q
x	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
D	0.0	0.0	2.0	0.7	0.3	0.0	0.7	0.0	0.0	0.7	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
L	0.0	0.0	0.7	3.0	1.7	1.3	1.0	0.7	0.3	1.0	0.3	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0
G	0.0	0.0	0.3	1.7	4.0	2.7	2.3	2.0	1.7	1.3	1.0	0.7	0.3	0.3	0.0	0.0
R	0.0	0.0	0.0	1.3	2.7	3.7	2.3	2.0	1.7	1.3	1.0	0.7	1.0	0.0	0.0	0.0
T	0.0	0.0	0.0	1.0	2.3	2.3	3.3	2.0	1.7	1.3	1.0	0.7	0.3	0.7	0.0	0.0
Q	0.0	0.0	0.0	0.7	2.0	2.0	2.0	3.0	1.7	1.3	1.0	0.7	0.3	0.0	0.3	1.0
N	0.0	0.0	0.0	0.3	1.7	1.7	1.7	1.7	2.7	1.3	1.0	0.7	0.3	0.0	0.0	0.0
C	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	2.3	1.0	0.7	0.3	0.0	0.0	0.0
D	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	0.7	0.3	0.0	0.0
R	0.0	0.0	0.0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	1.7	3.0	1.7	1.3	1.0
Y	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	1.7	4.0	2.7	2.3
Y	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	2.7	3.7	2.3
Q	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.3	2.3	4.7

A teljesen kitöltött mátrix. A k darab delécióhoz tartozó gap penalty értéke: Wk=1+(1/3)k volt. A megjelölt 1.7−es érték származtatása: az átlósan fölötte lévõ érték 2.0, ehhez hozzáadva az eltérés pontszámát (−1/3) kapjuk az 1.7−et. Az elemmel azonos sorban és oszlopban lévõ elemek közül a megjelölt 3.7 adja a maximumot, ebbõl a 3 delécióhoz tartozó gap penaltyt (1+3*(1/3)=2) levonva szintén 1.7−et kapunk, így a cellába 1.7 kerül.

- Az összerendezés származtatása: megkeressük az egész mátrixban a legnagyobb értéket, s ebbõl két irányba haladunk a maximális pontszámok mentén. Itt a jobb alsó sarokban lévõ 4.7−tõl indulva:

```
ADLGAVFALCDRYFQ
ADLGRTQNC−DRYYQ
```

- A következõ legjobb lokális összerendezés megkapható, ha megkeressük a második legnagyobb értéket a mátrixban, amely nem része az elsõ összerendezésnek, s ebbõl haladunk két irányba, stb.
- A Needleman−−Wunsch és Smith−−Waterman algoritmusok a **dinamikus programozás**nak nevezett algoritmusok kategóriájába tartoznak (a probléma megoldását kisebb alproblémák megoldására vezeti vissza)
- A lokális és a globális összerendezés ebben az esetben nagyon hasonló eremdényt szolgáltatott. Ez nem mindig van így. Példa:

```
Összerendezendõ szekvenciák: TTGACACCCTCCCAATTGTA és ACCCCAGGCTTTACACAT

Globális összerendezés:

               TTGACACCCTCC−CAATTGTA
                   ::  ::   ::  :
               ACCCCAGGCTTTACACAT−−−

Lokális összerendezés:

     ---------TTGACACCCTCCCAATTGTA                    TTGACAC
              :: ::::                    vagyis       :: ::::
     ACCCCAGGCTTTACACAT-----------                    TTTACAC
```

Szekvenciahasonlósági keresések adatbázisokon

- Needleman−−Wunsch vagy Smith−−Waterman algoritmusok alaposak, de sok szekvenciához nem elég gyorsak
- Egyszerûsített algoritmusok kellenek a hatékony kereséshez
- FASTA, BLAST: rövid, azonos/hasonló szakaszok kereséséből indulnak ki
- E vagy P értéket szolgáltatnak.
- Paraméterek változtathatóak (pl. gap penalty−k a szelektivitást és az érzékenységet befolyásolják)
- A szelektivitás (mennyire találja meg a valódi homológokat) és az érzékenység (megtalál−e távoli homológokat) ált. egymás rovására megy.

FASTA

- Lipman és Pearson 1985, késõbb bõvítések, finomítások
- Kiindulópont: rövid, azonos, k hosszúságú "szavakat" (k−tuple) keres a két szekvencia között. Fehérjéknél k=1−2, DNS−nél k=4−6.
- A közeli, ugyanazon a diagonálison lévõ k−tuple−okat heurisztikus eljárással összekapcsolja
- Elegendõ számú egyezésnél dinamikus programozással (Smith−Waterman) összerendezést számít.

Példa (FASTA)

BLAST

- Altschul és mtsai 1990, késõbb bõvítések, finomítások
- Népszerû, mert nagyon hatékonyan implementálható, párhuzamosítható, nagyon gyors
- Kiindulópont: adott hosszúságú, adott értéknél magasabb hasonlósági pontszámú szegmenspárokat (HSP, High−Scoring Pair) keres a két szekvencia között (nem azonosságot). Találat esetén ezeket mindkét irányba növeli bizonyos küszöbparaméterek eléréséig
- Gap nélküli összerendezéseket szolgáltat, ezért gyakran több szegmenspárt is megad

  Példa (BLAST)

- **Gapped BLAST** (Altschul et al. 1997): Csak egy szegmenspárt keres, aztán azt nyújtja mindkét irányba dinamikus programozással. 3−szor gyorsabb a gap nélküli BLAST−nál
- **PSI−BLAST**: még érzékenyebb, többszörös összerendezéseket használ, lásd következõ elõadás.

Webhelyek

Lásd ExPASy: Proteomics Tools
