Bioinformatik

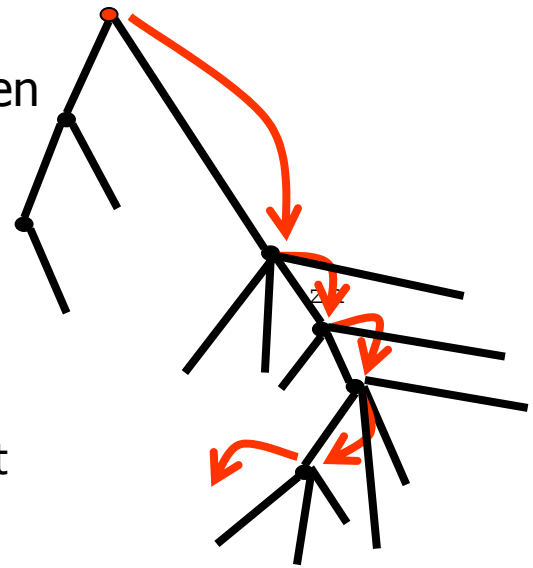
Approximative Stringvergleiche

Ulf Leser

Wissensmanagement in der Bioinformatik

Suche in Suffixbäumen

- Matche Suchstring bis Erfolg oder Mismatch
  - An jedem Knoten Entscheidung unter allen ausgehenden Kanten basierend auf erstem Zeichen des Kantenlabels
  - Alle Kantenlabel beginnen mit verschiedenen Zeichen
- Wie trifft man diese Entscheidung?
  - Array in der Größe des Alphabets Σ
    - Zelle x mit Pointer auf Kante k, wenn label(k)[1]=x
    - Konstante Zeit pro Knoten
  - Verkettete Liste
    - Pointer auf Kinderkanten sind untereinander verkettet
    - Lineare (in $|\Sigma|$) Zeit pro Knoten
  - Wachsendes, sortiertes Array
    - Pointer auf Kinderkanten sind alphabetisch sortiert und direkter Zugriff auf Pointer
    - Mit binärer Suche: $\log(|\Sigma|)$



Suffixarrays

- Definition
  - *Das Suffixarray A für String S ist ein Integerarray der Länge |S|, in dem A[i] die Startposition des i-ten Suffix von S, sortiert nach lexikographischer Ordnung, enthält*
- Beispiel

```
12345678901
mississippi
```

mississippi	i	A[1]=11
ississippi	ippi	A[2]=8
ssissippi	issippi	A[3]=5
sissippi	ississippi	A[4]=2
issippi	mississippi	A[5]=1
ssippi	pi	A[6]=10
sippi	ppi	A[7]=9
ippi	sippi	A[8]=7
ppi	sissippi	A[9]=4
pi	ssippi	A[10]=6
i	ssissippi	A[11]=3

Trick zur linearen Konstruktion

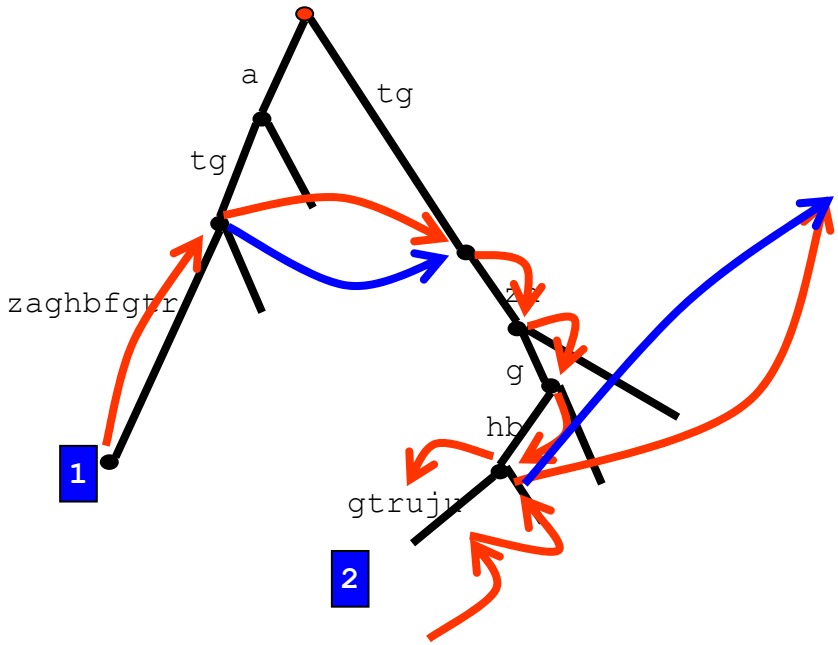
- Ablauf in „lexikographischer" Depth-First Ordnung
  - Wir laufen den Suffixbaum Depth-First ab
  - An jedem Knoten wählen wir die Kinder in der lexikographischen Reihenfolge der Kantenlabel
  - Mitzählen
    - Erstes Blatt mit Beschriftung $i_1 \Rightarrow A[1] = i_1$
    - Zweites Blatt mit Beschriftung $i_2 \Rightarrow A[2] = i_2$
  - [„$" gilt dabei als kleiner als alle anderen Zeichen]
- Komplexität: O(m)
  - Depth-First ist abhängig von Anzahl Knoten
  - Wenn die Kinder als sortierte verkettete Liste oder als Array gespeichert sind ist jede Entscheidung konstant

Suche mit Suffixarrays

- Ideen?
- Suche alle Vorkommen von P=„ssi“ in „mississippi“
  - Erinnerung: Jeder Substring ist Präfix (mindestens) eines Suffix
  - P liegt also am Anfang eines Suffix (wenn P in S)
  - Suffixe liegen alle sortiert vor
  - ➢ Binäre Suche im Suffixarray

```
a[1]=11     i
a[2]=8      ippi
a[3]=5      issippi
a[4]=2      ississippi
a[5]=1      mississippi
a[6]=10     pi
a[7]=9      ppi
a[8]=7      sippi
a[9]=4      sissippi
a[10]=6     ssippi
a[11]=3     ssissippi
```

Konstruktion von Suffixbäumen mit Ukkonen's Algorithmus



- Baum wird beim Konstruieren auf zwei Arten traversiert
  - Verfolgen von Suffix-Links – Sprünge in andere Teilbäume
  - Knotenhüpfen – Abstieg in einen Teilbaum
- Kein Problem beim Aufbau im Hauptspeicher, aber ...

Idee

- Hunt, E., Atkinson, M. and Irving, R. W. "A Database Index to Large Biological Sequences". VLDB 2001.
- Algorithmus
  - Keine Verwendung von Suffix-Links
  - Multi-Pass Algorithmus: Komplette Sequenz muss mehrmals gelesen werden
  - In jedem Lauf werden nur Suffixe mit einem bestimmten Präfix behandelt
- Dadurch: Komplette Teilbäume können im Hauptspeicher gebaut werden
  - Keine Sprünge zwischen Teilbäumen durch Suffix-Links
  - Keine Änderungen in anderen Teilbäumen durch gemeinsames Suffix-Präfix
  - Teilbaum wird im HS gebaut, geschrieben, und nie mehr geladen

Partitionen

- Zerlegung der Menge aller Suffixe in Partitionen
  - Partition ist charakterisiert durch gemeinsames Präfix
  - Unterschiedliches Präfix – unterschiedlicher Teilbaum
  - Präfixe entweder exakt bestimmen
    - Häufigkeiten von q-Grammen mit steigenden q zählen
    - q-Gramm X befindet sich an Position i -> Suffix mit Präfix q beginnt an Position i
    - Optimale q-Gramme so bestimmen, dass jeweilige Anzahl Suffixe exakt in den Hauptspeicher passt
    - Sehr teuer – viel Lesen des Strings, bevor überhaupt die Konstruktion beginnt
  - ... oder schätzen
    - DNA ist nahezu zufällig verteilt
    - Alle q-Gramme gleich häufig
    - Nur die Länge q abschätzen

Approximatives Matching

Inhalt dieser Vorlesung

- Approximative Stringvergleiche
- Dotplots
- Edit-Abstand und Alignment
- Naiver Algorithmus

Approximativer Stringvergleich

- Bisher: Suche nach exakten Vorkommen von Pattern im Template
- Aber
  - Auch nicht-exakte Vorkommen hochgradig interessant
  - Manchmal interessieren gerade die Unterschiede
  - Gleitender Übergang zwischen
    - Exakter Match
    - Guter Match
    - Schlechter Match
- Was ist ein „approximativer", „guter", „schlechter" Match?

Beispiel

- „AGGTAG“ in „AGTAGGTAGGATAGCTCAGA“
  - 1: AGTAGGTAGGATAGCTCAGA
  - 2: AGTAGGTAGGATAGCTCAGA
  - 3: AGTAGGTAGGATAGCTCAGA
  - 4: AGTAGGTAGGATAGTTCAGA
- Welche Matches sind „gut“? Wie gut?
  - 1: „G“ fehlt
  - 2: Perfekt
  - 3: „A“ zuviel
  - 4: „T“ durch „G“ ersetzen oder „T“ löschen und „G“ einfügen, zweites „C“ zu viel

Motivation

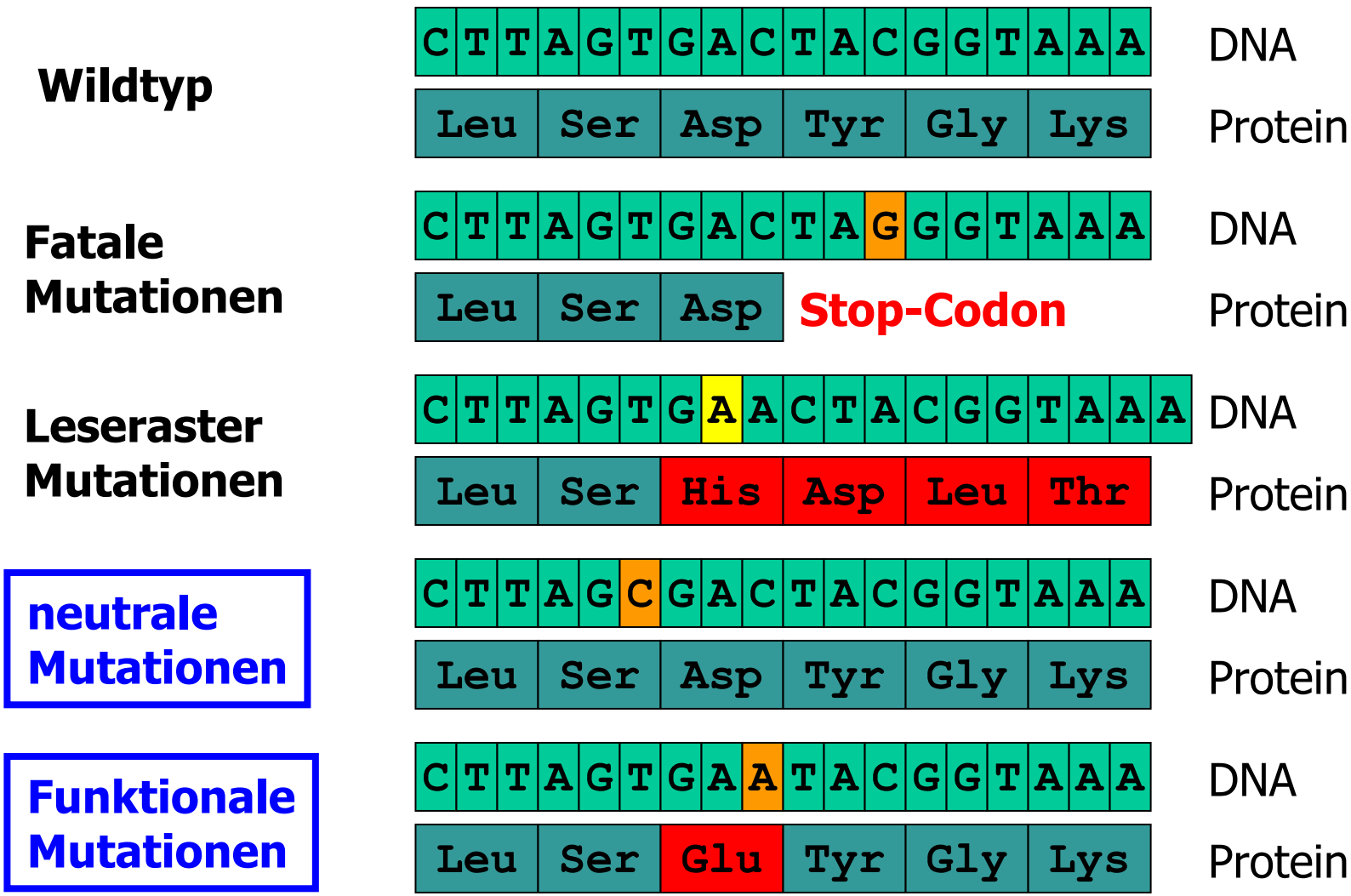
- BLAST / FASTA und Verwandte sind *die* Bioinformatik Anwendung
  - Teilweise synonym für „Bioinformatik"
- Grundlegende Gesetzmäßigkeit der Bioinformatik

Hohe Sequenzähnlichkeit bei DNA, RNA und Proteinen heißt in der Regel ähnliche Funktion bzw. Struktur

Begründung

- Biochemische Aktivität der Proteine wird bestimmt durch
  - 3D Faltung der Proteine
  - Vorkommen bestimmter Aminosäuren an bestimmten Stellen (Motiv, Domäne)
  - Interaktion und Modifikation von Proteinen
- Wesentliches Element ist die 3D Struktur von Proteinen
- Der Weg DNA – Struktur ist nicht eindeutig
  - Code zur Übersetzung DNA-Triplet – Aminosäure ist redundant
  - Abweichungen verändern die Funktion oftmals nicht
  - Nicht alle Aminosäuren sind (gleich-)wichtig für die Struktur
- Durch Evolution entstehen Variationen
  - Funktionale Änderungen schaffen Varianten (oder sind letal)
  - Evolution geht meist in kleinen Schritten: Kleine Änderungen, leicht veränderte Struktur, leicht verändertes funktionales Verhalten
  - Stammbaumentstehung (Phylogenie)

Genetischer Code



Variationen in Proteinsequenzen

- Änderungen in Proteinsequenz sind oft harmlos
  - Viele Änderungen ändern die Struktur nicht
  - Nicht alle Teile einer Struktur sind gleich wichtig: Periphere Teile versus funktionale Domänen
- Proteine
  - Ab Ähnlichkeit von 20-30% geht man von verwandter Funktion aus
  - Aber auch 85% Identität ist keine Garantie

Fazit

- Relevant ist die biologische Funktion, nicht die Sequenz
- Sequenz und Funktion hängen eng zusammen, sind aber nicht direkt ableitbar
- Bestimmung von Funktion ist extrem aufwändig (wenn überhaupt möglich), Bestimmung von Sequenzen dagegen sehr billig
- Also: Annäherung der Funktion über Sequenzähnlichkeiten
  - Geburtsüberlegung der Bioinformatik
  - Basiert auf approximativem Stringmatching

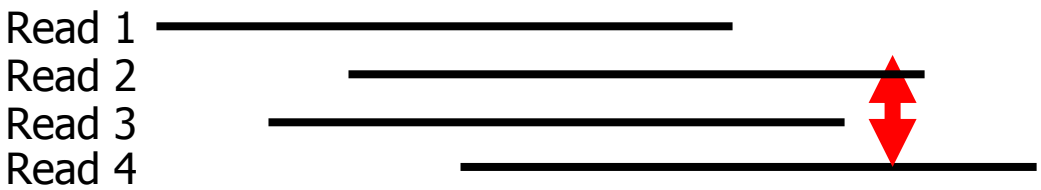
Drei konkrete Beispiele

- Sequenzieren: Assembly
- Bestimmung funktionaler Domänen
- Comparative Genomics

Assembly

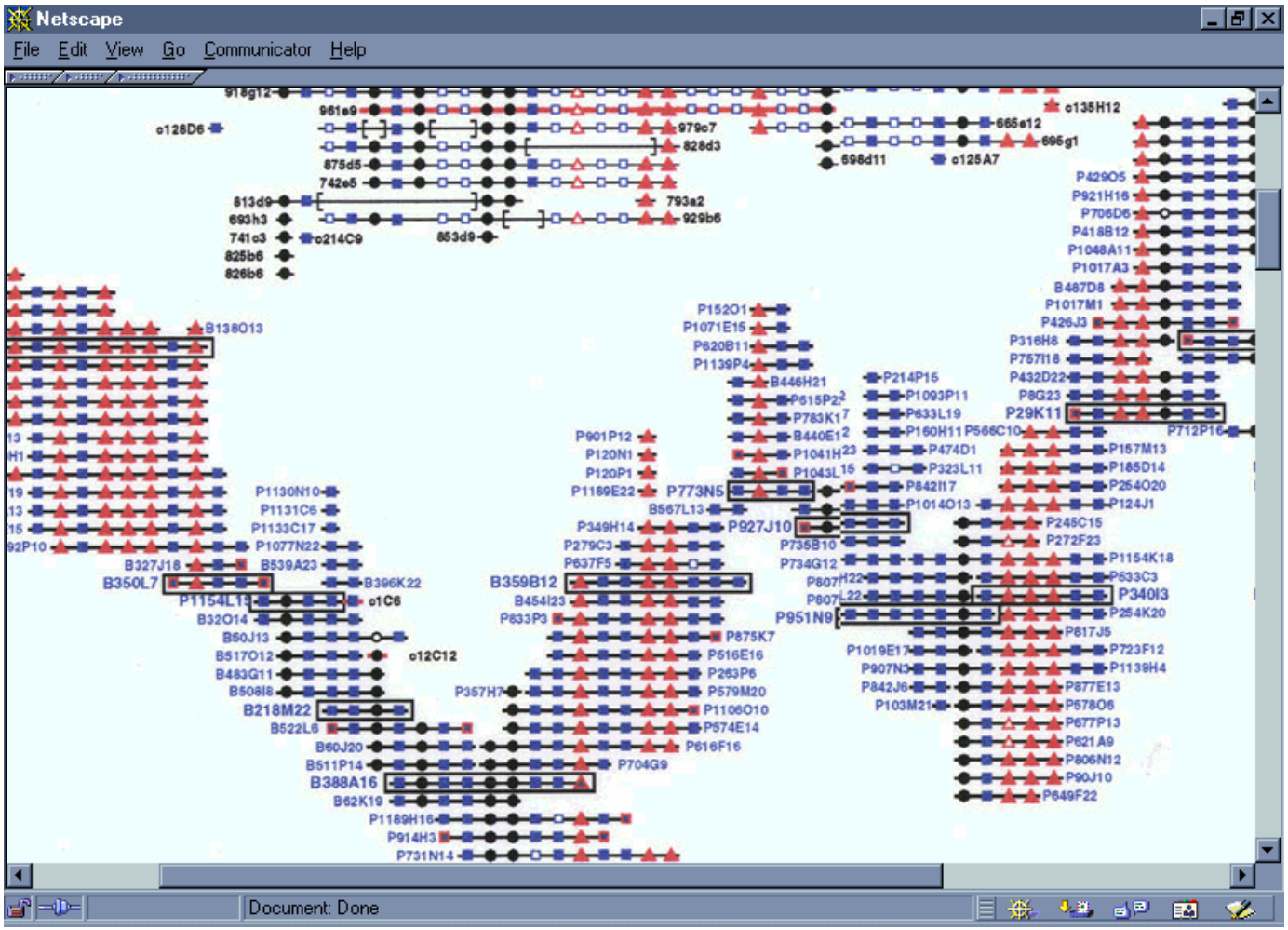
- Szenario: Shotgun Sequenzierung
- Ergebnis des Base Calling: Einzelne Reads
- Gesucht: Gesamtsequenz
- ... bzw.:
  - zusammenhängende Stücke (Contigs)
  - möglichst sichere Sequenz (Redundanz!)
- Assembly: Berechnung der „Konsensussequenz"

Assembly



- Gesucht
  - Überlappungen der einzelnen Reads
  - Fehler sind immer vorhanden (insb. fehlende/eingeschobene Blöcke durch Fehler in bakterieller Replikation)
  - Dadurch keine perfekten Überlappungen
  - Oftmals mehrere „unterschiedlich gute" Möglichkeiten
- Grundverfahren: Schnelle Bestimmung möglichst guter Überlappungen
  - Approximatives Stringmatching

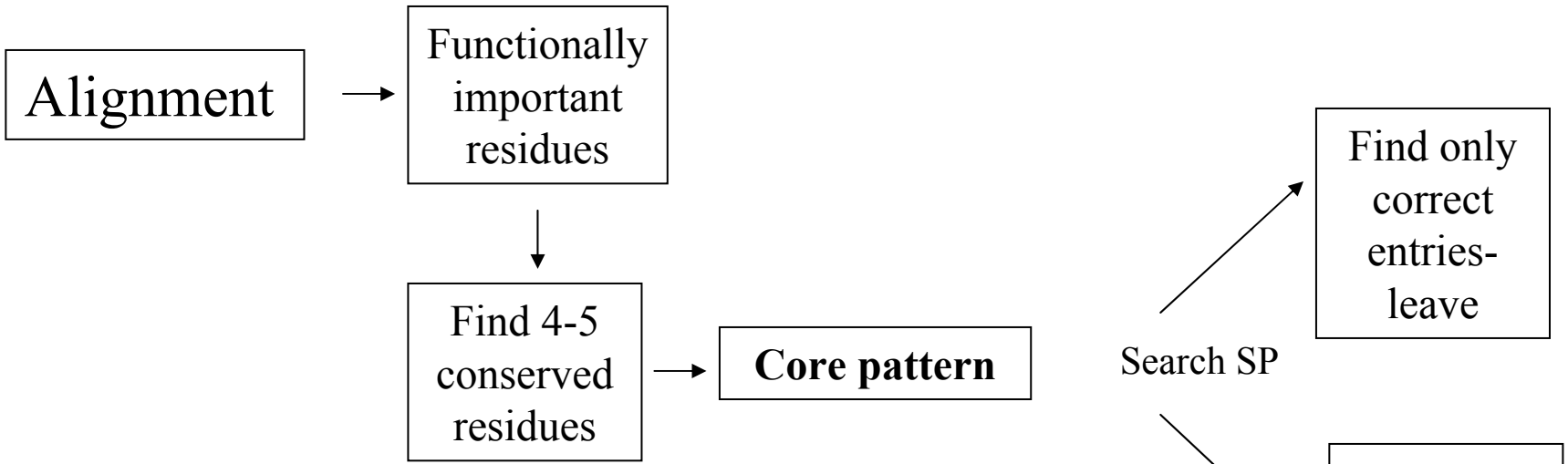
Resultat


Netscape
File Edit View Go Communicator Help
Document: Done

Proteindomänen

- Pattern, Domäne, Motiv, Site: Teile einer Proteinsequenz mit funktionaler Bedeutung
  - Bindungsstellen, Enzymatische Aktivität, Signal, etc.
  - Beschrieben z.B. durch reguläre Ausdrücke, Fingerprints, Profile, ...
- Datenbanken von Domänen
  - PROSITE, Pfam, InterPro, BLOCKS, PRINTS, ...
- Beispiel PROSITE
  - Beginn: Finden einer „interessanten" Teilsequenz in der Literatur
  - Identifikation ähnlicher Sequenzen in anderen Proteinen
    - Approximatives Stringmatching
  - Identifikation der konservierten Aminosäuren
    - Multiple Sequence Alignment

Entstehung von Prosite Pattern



Pattern is given as regular expression:

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

ala/cys-any-val-any-any-any-any-(any except glu or asp)

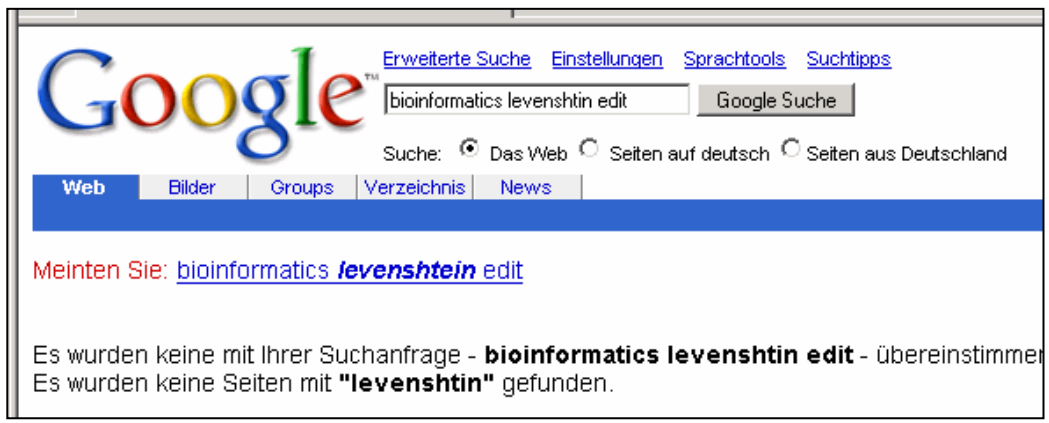
Quelle: „PROTEIN PATTERN DATABASES", EBI

Comparative Genomics

- Bestimmung von Protein/Genfunktion in anderen Spezies wesentlich leichter als beim Menschen
  - Bakterien, Knock-out Mäuse, etc.
- Viele Gene sind hochgradig konserviert
  - Maus – Mensch: 97% Sequenzidentität
  - „Housekeeping Genes" in allen Organismen ähnlich vorhanden
  - Die 4% „aktivsten" (am besten verbundenen) Proteine sind in allen (bisher sequenzierten) bekannten Organismen vorhanden
- Vorwärts
  - Finden und sequenzieren eines neues Genes beim Menschen
  - Suchen nach ähnlichen Sequenzen in anderen Organismen
  - BLAST gegen Genbank / EMBL
- Rückwärts
  - Bestimmung der Funktion eines Genes einer anderen Spezies
  - Suche nach ähnlichen Sequenzen beim Menschen
  - BLAST gegen Genbank / EMBL

Approximatives Matchen außerhalb der Bioinformatik

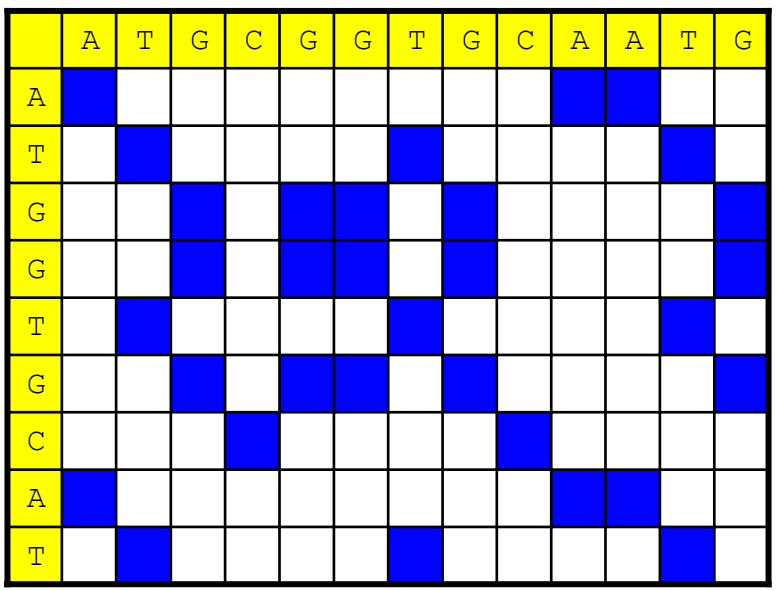
- Anwendungen außerhalb der Bioinformatik
  - Unscharfe Volltextsuche
    - Suche mit „Xylofon" und finde auch „Xhylophon"
  - Personenabgleich
    - Ist „Herr Müller, 27, Stargarder Str 54" identisch zu „Hr. Mueller, 27, Stagarder Str. 54" ?
  - Phonetische Suche
    - Finde alle Meyer, Meier, Maier, Mair, ...



- Erste Annäherung: Dotplots

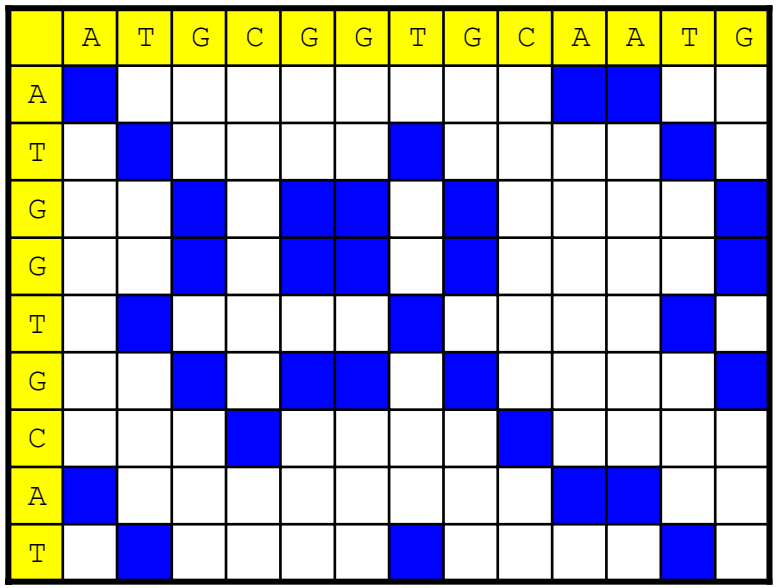
Dotplot

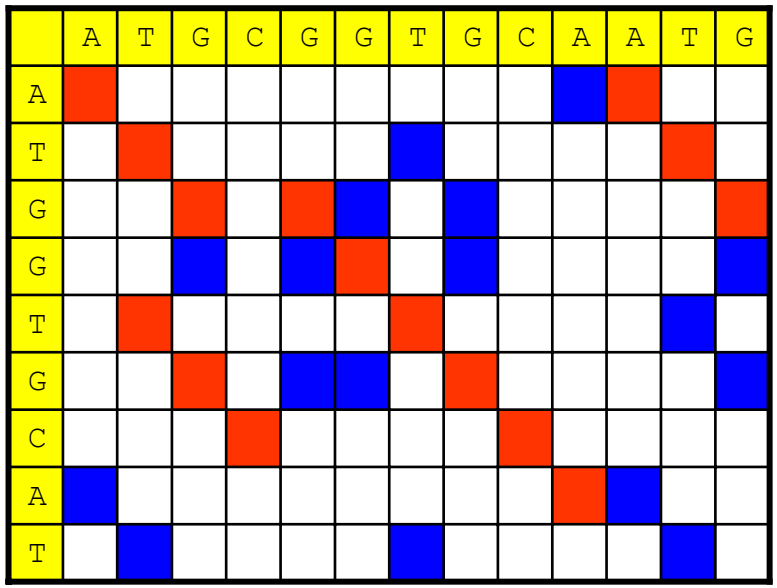
- Definition
  Ein Dotplot zweier Strings A, B ist eine Matrix M mit
  - *Die Spalten entsprechen den Zeichen von A*
  - *Die Zeilen entsprechen den Zeichen von B*
  - *M[a,b]=1 gdw. A[a] = B[b]; sonst 0*



Dotplot und gleiche Teilstrings

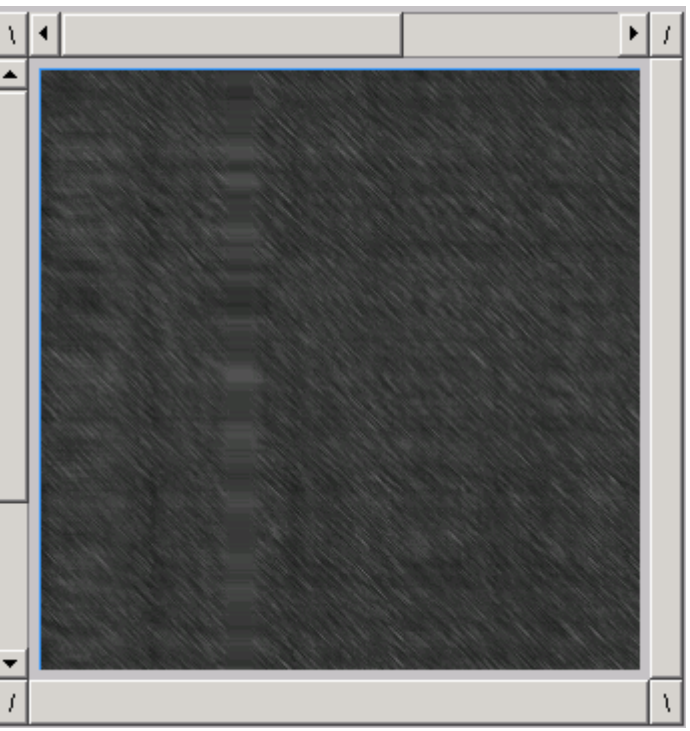
- Wie erkennt man gleiche Teilstrings im Dotplot?

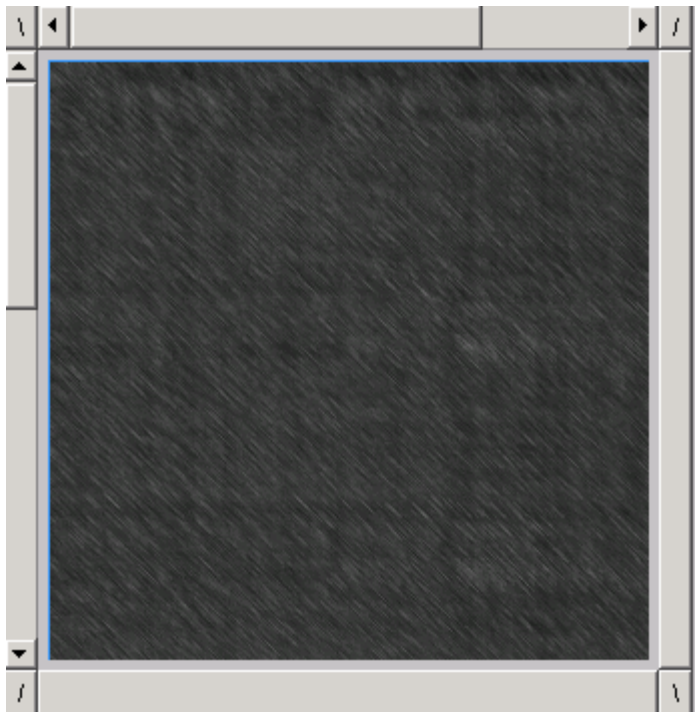


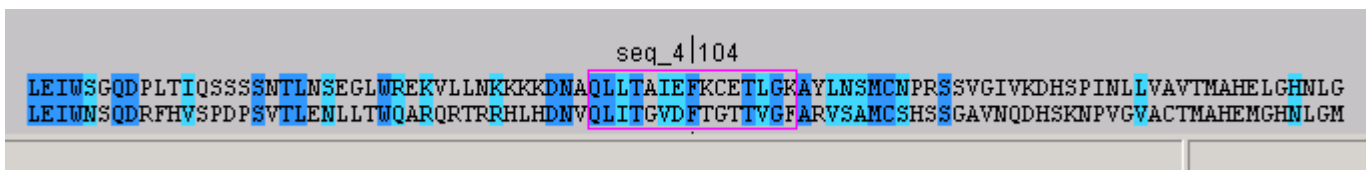


- Diagonalen von links-oben nach rechts-unten
  - Größter gemeinsamer Teilstring – längste Diagonale
  - Visuell bei kurzen Strings möglich

Visuelle Untersuchung



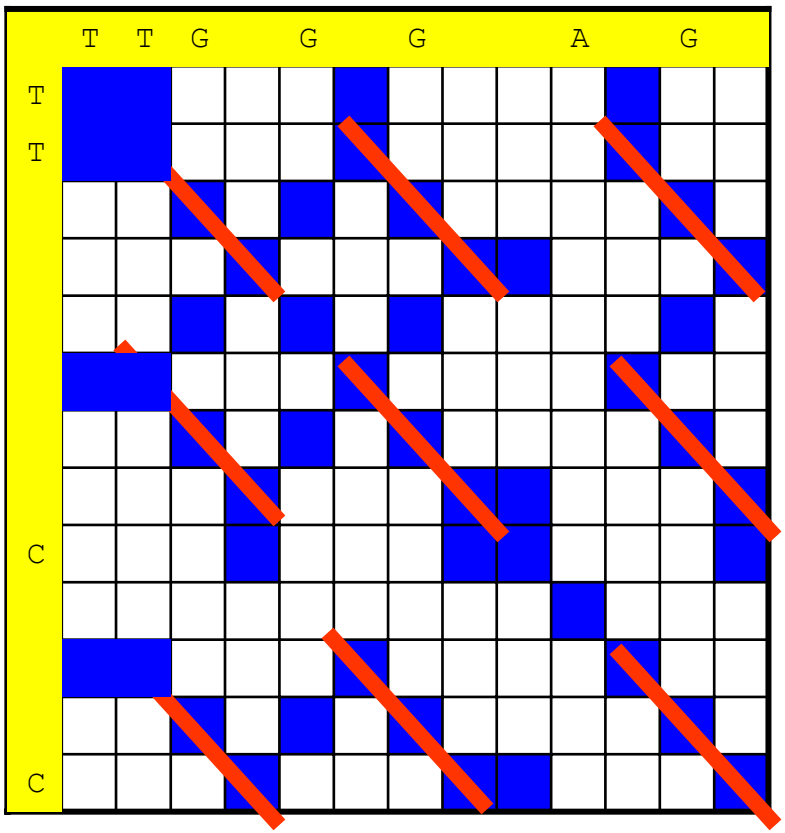


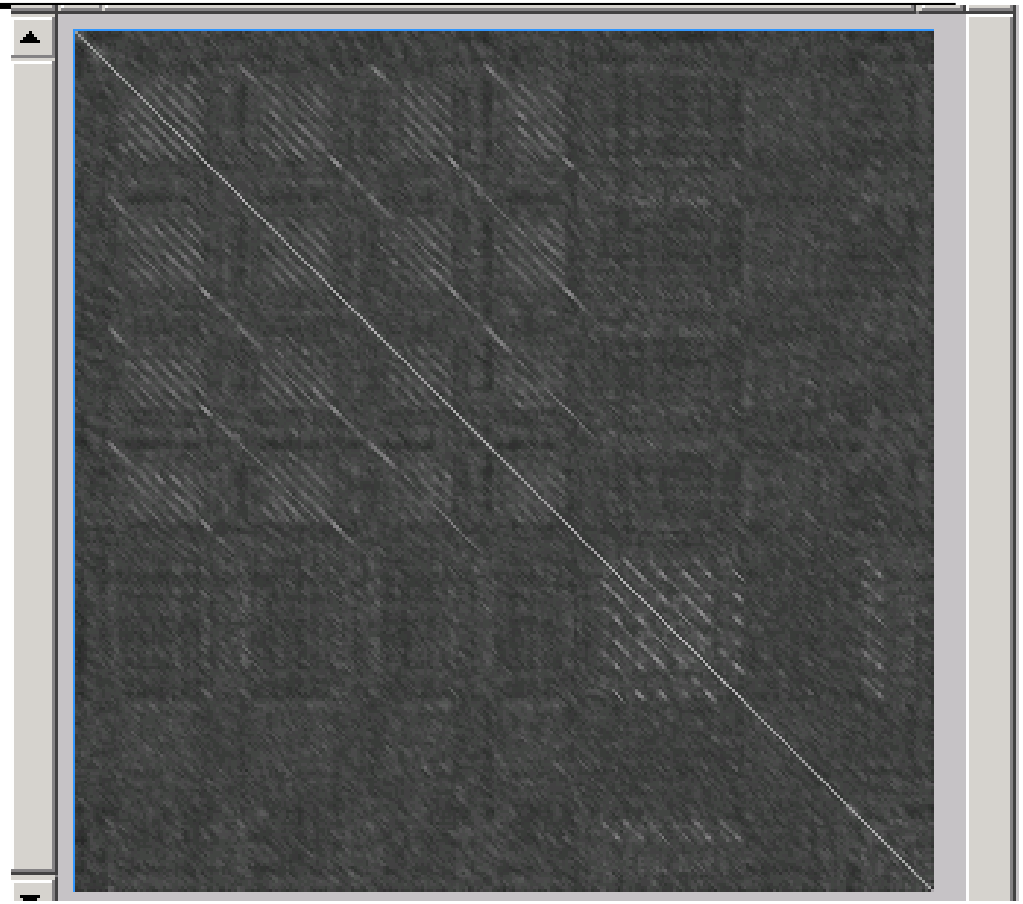


- Helligkeit: Ähnlichkeit im Umfeld eines Pixels

Quelle: Dotlet, http://www.isrec.isb-sib.ch/java/dotlet/Dotlet.html

Repetitive Sequenzen





- Dotplot mit A=B
  - Zitat (Genbank, P24014):

```
[SIMILARITY] CONTAINS 7 EGF-LIKE DOMAINS.
[SIMILARITY] Contains 24 leucine-rich (LRR) repeats.
```

Erweiterungen von Dotplots

- Trennen der signifikanten Übereinstimmungen vom Rauschen ist schwierig
- Sliding Windows
  - Statt Zeichen – Zeichen vergleiche Substring – Substring
  - Schieben eines Fensters der Länge l über beide Sequenzen
  - Dot nur dann, wenn mindestens z Zeichen in l matchen
  - Beispiel: DNA plotten mit l=15 und z=10
    - Da DNA (4 Zeichen) sehr viel Rauschen erzeugt
  - ➢ Kurze Matches verschwinden
  - ➢ Wichtige Matchregionen treten klarer zutage

Finden längster Teilstrings mit Dotplots

- Gegeben Dotplot M zweier Strings A, B
- Gesucht: Längster gemeinsamer Teilstring
  - Annahme: |A|=|B|=m
- Naives Verfahren
  - Prüfe jede der 2*m Diagonalen
  - Suche jeweils zusammenhänge 1‘er (linear in m)
  - Merke das längste zusammenhängende Stück
  - Komplexität: $O(m^2)$
  - (Zusätzlich: Konstruktion von M - wie schwierig?)
- Wir kennen schon lineare Algorithmen
  - Welche?
- Außerdem wollen wir approximativ matchen ...

Abstandsmaße und Algorithmen

- Quantifizierung von „Ähnlichkeit“
- Editabstand

Abstandsmaße

- Approximatives Stringmatching sucht Ähnlichkeiten
  - Welcher Substring von T ist am ähnlichsten zu P?
  - Welcher String $T_1,...,T_n$ ist am ähnlichsten zu T?
- Voraussetzung dafür
  - Was heißt ähnlich?
  - Was heißt „am ähnlichsten"?
- Quantifizierung des Abstandes zweier Strings
  - Definition von Ähnlichkeit ist oft eine sehr schwierige Aufgabe
  - Ähnlichkeit ist abhängig vom Gegenstand und Aufgabe
    - Wann sind sich Gesichter ähnlich - Haarfarbe zählt weniger als Augenfarbe?
    - Wann sind sich Texte ähnlich – gleiche Wörter oder gleicher Inhalt?

Mögliche Maße

- Hammingabstand
  - Voraussetzung: |A|=|B|
  - Vergleiche A und B Zeichen für Zeichen
  - Hammingabstand = Anzahl der Mismatches
  - Beispiel: ha(CGTGCTCGC, ACGTGCTCG)= 9
  - Das kann nicht in unserem Sinne sein
- Biologischen Hintergrund nicht vergessen
  - Situation: Wir haben humane Gensequenz A und suchen ähnliche Sequenzen (B) in anderen Organismen
  - Annahme: A und B haben gemeinsamen Vorfahren und sind durch evolutionäre Prozesse entstanden
    - Welche Annahme steckt hier drin?
  - Einfaches Modell: Basenaustausch, Baseneinfügung, Basenlöschen

Begriffe

- Sequenzen heißen
  - Homolog, wenn sie einen gemeinsamen Ursprung haben und von diesem durch Evolution divergiert sind
  - Ortholog, wenn sie in verschiedenen Spezies vorkommen, aber vom gleichen „Vorfahren" abstammen
  - Paralog, wenn sie durch Duplikation innerhalb einer Spezies entstanden sind
- Ob zwei ähnliche Sequenzen homolog, paralog oder ortholog sind (oder weder noch), kann man eigentlich nicht bestimmen
  - Nur Indizien sammeln
  - Ähnlichkeit der Sequenz ist in sehr starkes Indiz
    - Andere: Lage im Genom, Regulationsmechanismen, Beteiligung in den gleichen Stoffwechselwegen an gleicher Stelle, ...

Editskripte

- Definition
  Ein Editskript e für zwei Strings A, B aus $\Sigma^{*}=\Sigma \cup$ "_" ist eine Sequenz von Editieroperationen
    - *I (Einfügen eines Zeichen $c \in \Sigma$ in A)*
      - *Dargestellt als Lücke in A; das neue Zeichen erscheint in B*
    - *D (Löschen eines Zeichen c in A)*
      - *Dargestellt als Lücke in B; das alte Zeichen erscheint in A*
    - *R (Ersetzen eines Zeichen in A mit einem anderen Zeichen in B)*
    - *M (Match, d.h., gleiche Zeichen in A und B an dieser Stelle)*

  so, dass e(A)=B
- Beispiel: A=„ATGTA", B=„AGTGTC"
  - `MIMMMR` `IRMMMDI`
    `A_TGTA` `_ATGTA_`
    `AGTGTC` `AGTGT_C`

Editabstand

- Offensichtlich gibt es für A,B ziemlich viele Editskripte
  - Wie viele?
- Definition
  - *Die Länge eines Editskript ist die Anzahl von Operationen o im Skript mit o∈{I, R, D}*
  - *Der Editabstand zweier Strings A, B ist die Länge des kürzesten Editskript für A, B*
- Bemerkung
  - Matchen zählt nicht – interessant sind nur die Änderungen
  - Anderer Name: Levenshtein-Abstand
  - Es gibt oft verschiedene kürzeste Editskripte
  - ```
    IMMMMMD      DMMMMMI
     AGAGAG      AGAGAG_
    GAGAGA_      _GAGAGA
    ```
    ```

Alignment

- Andere Darstellung: Alignments
- Definition
  - *Ein (globales) Alignment zweier Strings A,B ist eine Untereinanderanordnung von A und B, jeweils mit beliebigen zusätzlichen Leerzeichen (_)*
    - Achtung: Zeichen dürfen matchen oder nicht
  - *Der Alignmentscore eines Alignment ist die Anzahl von Leerzeichen und Mismatches*
  - *Der Alignmentabstand zweier Strings A, B ist der minimal mögliche Alignmentscore aller Alignments der beiden Strings*
- Beispiele

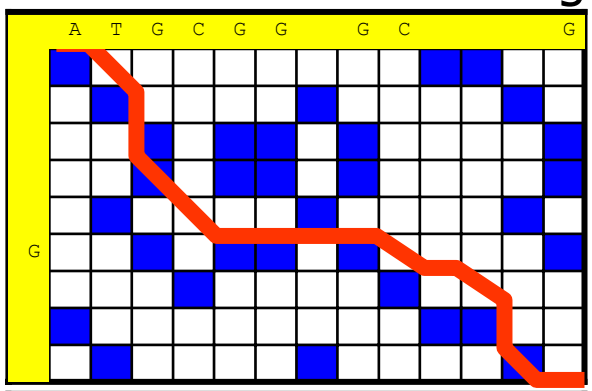
A_TGT_A	A_T_GTA	_AGAGAG	AGAGAG_
AGTGTC_	_AGTGTC	GAGAGA_	_GAGAGA
Score: 3	**5**	**2**	**2**

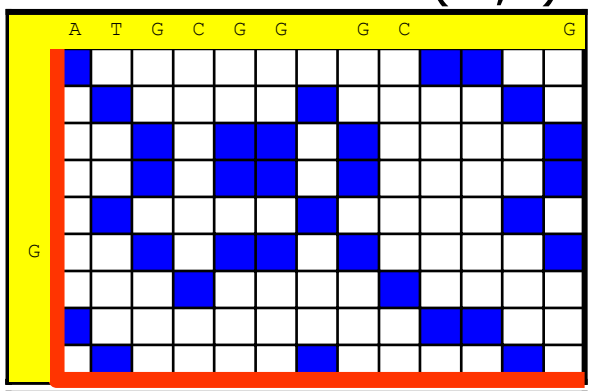
Alignment versus Editskript

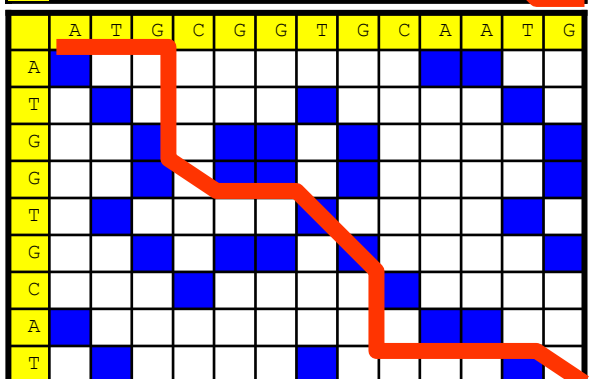
- Sind logisch äquivalent. Übersetzung ist einfach
  - Alignment – Editskript: Definiere Operationen im Skript wie folgt
    - Space in A ergibt ein I Space in B ergibt ein D
    - Mismatch ergibt ein R Match ergibt ein M
  - Editskript – Alignment: Umgekehrter Weg
- Alignments
  - Dienen eher zur Visualisierung
  - Charakterisieren einen Stringvergleich
- Editskripte
  - Bezeichnen einen Transformationsprozess
  - Entspringen einem Evolutionsmodell
- Wir werden diverse Varianten betrachten
    - Unterschiedliche Kosten für Operationen I, D, R
    - Unterschiedliche Kosten für R je nach mismatchenden Zeichen
    - Gesonderte Behandlung von Gaps
    - ...

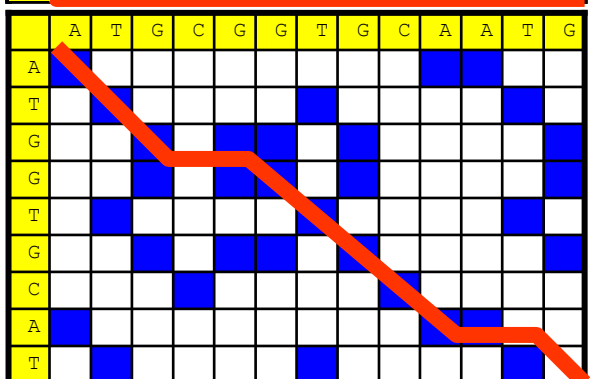
Alignments und Dotplots

- Sei |A|=m, |B|=n
- Betrachte Pfade im Dotplot von (1,1) nach (m,n)
  - Pfad startet in linker oberer Ecke
  - Erlaubte Schritte: nach rechts, nach unten und nach rechts-unten (diagonal)
  - Pfad: Zusammenhänge Menge von Schritten bis (m,n)







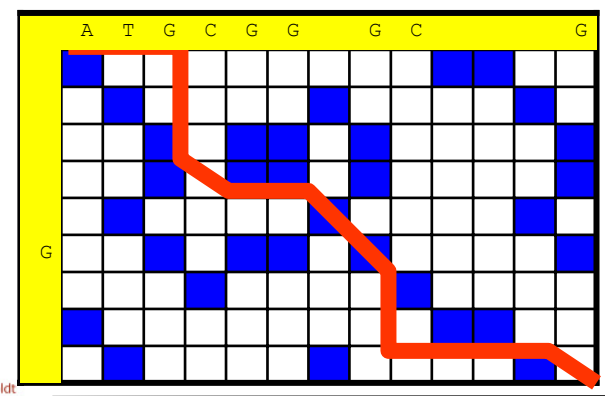


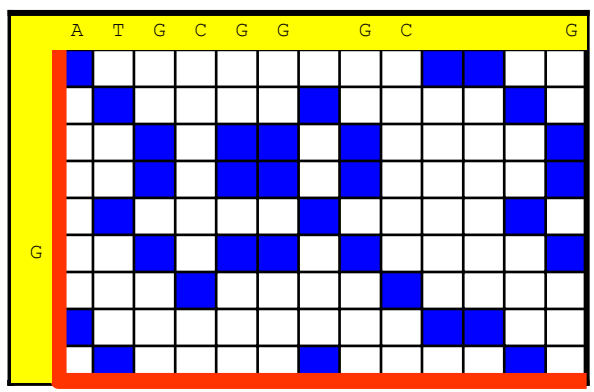
Alignments und Dotplots 2

- Übersetzung von Pfaden im Dotplot in Alignments
  - Dotplot: Sei A horizontal und B vertikal aufgetragen
  - Alignment: Sei A über B angeordnet
  - Schritt nach rechts: Nächstes Zeichen von A; „_“ in B
  - Schritt nach unten: Nächstes Zeichen von B; „_“ in A
  - Schritt nach rechts-unten: Nächstes Zeichen von A und B

```
ATG___CGGTG__CAATG
___ATGG__TGCA____T
```

```
__________ATGCGGTGCAATG
ATGGTGCCAT_____________
```

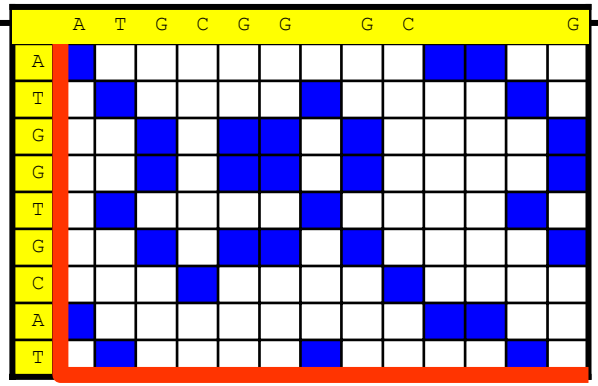




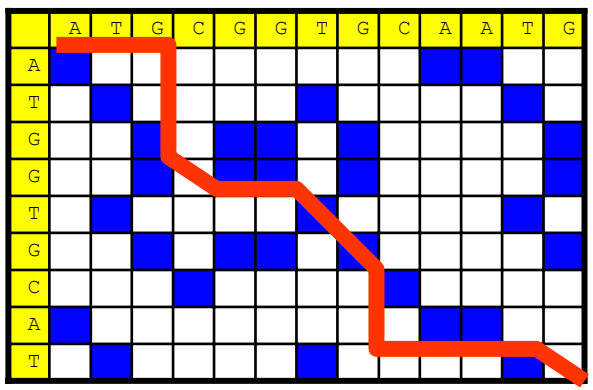
Pfadgüte

- „Gute Pfade“ haben viele Matches
  - Matches im Dotplot sind die 1‘er Felder
- Definition
  Die Güte eines Pfades P durch einen Dotplot M ist die Anzahl an diagonal durchquerten 1‘er Feldern
  - Schritte nach rechts oder unten zählen nicht
- Bemerkung
  - Der beste Pfad kann also höchstens Güte min(m,n) haben

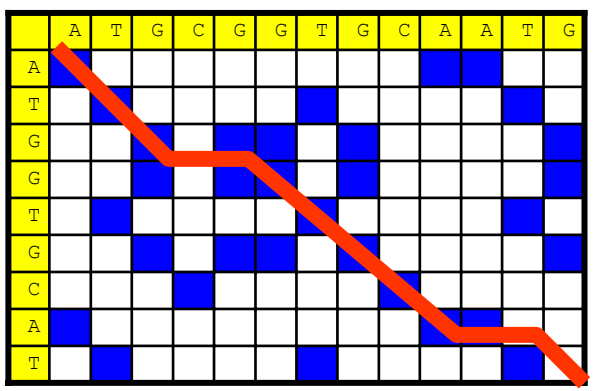
Beispiele



Pfadgüte: 0



Pfadgüte: 2



Pfadgüte: 8

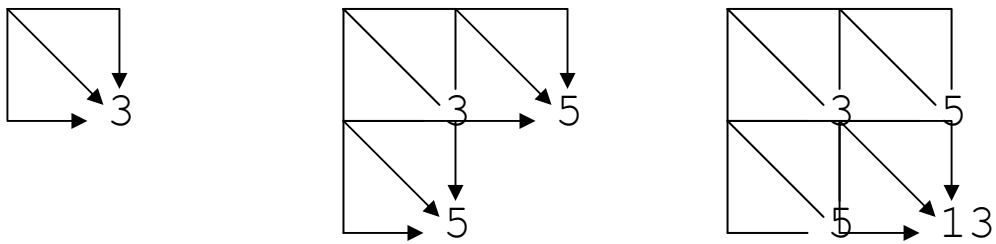
Maximale Güte?

Alles das Gleiche

- Gegeben zwei Strings A,B und Dotplot M
- Die folgenden Probleme sind äquivalent
  - Finde das optimale Alignment von A und B (= Alignmentabstand)
  - Finde die minimale Menge an Editoroperationen von A nach B (= Editabstand)
  - Finde in M den Pfad mit maximaler Güte
- Beweis
  - Pfade lassen sich in Alignments übersetzen (und beinahe auch umgekehrt)
  - Alignments lassen sich in Editskripte übersetzen und umgekehrt
- Eigentlich ...
  - Alignments/Editskripte können „mehr" (beliebig viele Leerzeichen anhängen)
  - Dieses „mehr" ist aber uninteressant

Algorithmus

- Naives Verfahren um den besten Pfad zu finden
  - Alle Pfade aufzählen
  - Das sind exponentiell viele



- Nur Pfade „um" die Hauptdiagonale: > $3^{min(m,n)}$
- Inakzeptable Laufzeit
- Tatsächliche Komplexität des Problems: $O(m^2)$
- Trick: Dynamische Programmierung

Zusammenfassung

- Approximatives Matching ist das Thema der Bioinformatik schlechthin
  - Grundlage vieler Anwendungen
  - Prinzip des „Sequenzvergleich ersetzt Experiment“
- Wir werden sehen: Exaktes Matching ist oft Hilfsmittel zum approximativen Matching
- Visualisierung durch Dotplots
- Bewertung der Approximation setzt Abstandsmaß voraus
  - Editabstand
- Alignment gleichwertig zu Editabstand zu Dotplotpfaden
- Naive Algorithmen mit katastrophaler Komplexität
- Nächste Stunde: Dynamische Programmierung