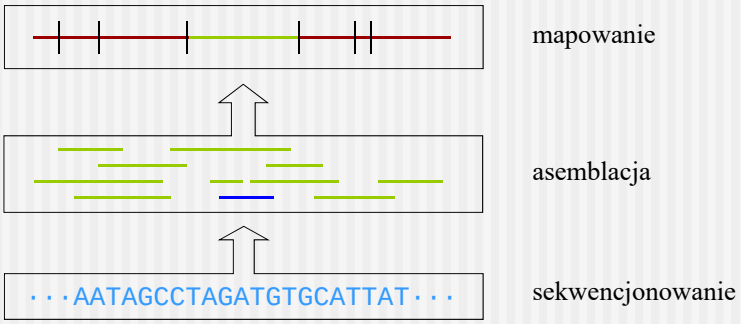
Bioinformatyka

wykład 2: sekwencjonowanie cz. 1

prof. dr hab. inż. **Marta Kasprzak**
Instytut Informatyki, Politechnika Poznańska

Poznawanie sekwencji genomowej

- Poznawanie sekwencji genomów na trzech poziomach



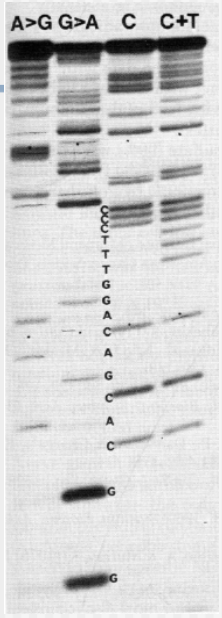
Sekwencjonowanie

- Sekwencjonowanie DNA jest procesem wyznaczania sekwencji nukleotydów pewnego fragmentu DNA. Fragmenty, w zależności od metody, osiągają długość od kilkudziesięciu do tysiąca nukleotydów (więcej w sekwencjonowaniu trzeciej generacji)
- Metody laboratoryjne sekwencjonowania na żelu nie wymagają metod obliczeniowych, są za to nieodporne na błędy eksperymentalne
- Przez dziesięciolecia w powszechnym użyciu były metody laboratoryjne Maxama i Gilberta (1977) oraz Sangera i in. (1977) wykorzystujące elektroforezę żelową do odczytania wyniku sekwencjonowania fragmentu DNA

Sekwencjonowanie

[A.M. Maxam i W. Gilbert,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977)]

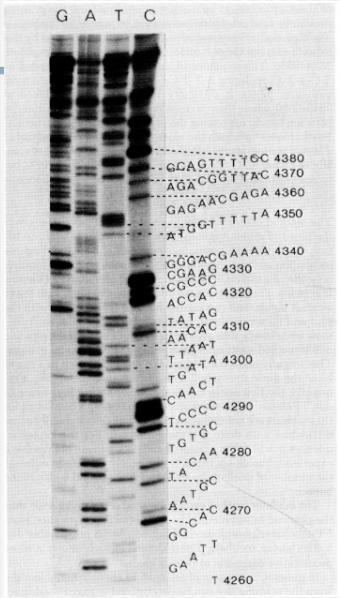
- Metoda chemicznej degradacji
- W chemicznych reakcjach kopie badanego DNA przerywane są po nukleotydach: A (+ częściowo G), G (+ częściowo A), C, C+T. Najpierw dane nukleotydy są uszkadzane, po czym łańcuchy pękają w słabszych miejscach
- Fragmenty wynikowe znakowane radioaktywnie poddawane są elektroforezie żelowej. Na zdjęciu sekwencja GGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATT AATGTGAGTTAG



Sekwencjonowanie

[F. Sanger i in., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977)]

- Sekwencjonowanie przez syntezę
- Na jednej nici DNA, począwszy od startera, syntetyzowana jest druga nić z użyciem polimerazy DNA, nukleotydów i zmodyfikowanych nukleotydów uniemożliwiających dalszą rozbudowę
- Fragmenty wynikowe znakowane radioaktywnie poddawane są elektroforezie żelowej

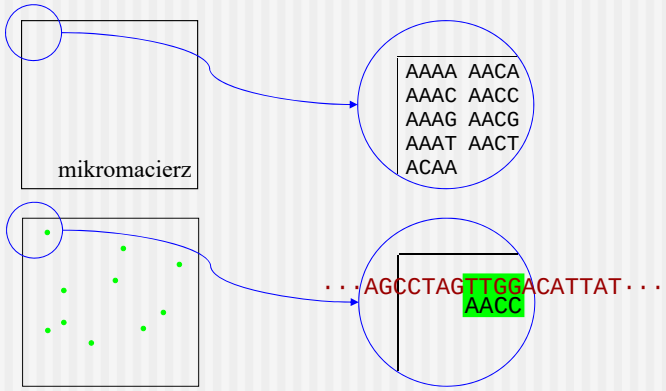


Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

- Hybrydyzacja to proces łączenia komplementarnych nici kwasów nukleinowych w dwuniciowe kompleksy
- W eksperymencie hybrydyzacyjnym wykorzystywana jest skłonność jednoniciowych DNA do hybrydyzacji. Przeprowadzony z biblioteką oligonukleotydów i jednoniciowymi kopiami badanego DNA dostarcza informację o oligonukleotydach wchodzących w skład badanego łańcucha
- Sekwencjonowanie przez hybrydyzację (SBH) polega na odtworzeniu badanej sekwencji DNA na podstawie takiego zbioru oligonukleotydów (spektrum)
- Długość badanego DNA można zmierzyć w procesie elektroforezy. W klasycznym modelu przyjmuje się, że żadne dodatkowe informacje o elementach spektrum nie są dostępne. Niektóre modele uwzględniają przybliżoną wiedzę o liczbie ich wystąpień

Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

- SBH z biblioteką oligonukleotydów o stałej długości



Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

badana sekwencja: CCGACGT

długość oligonukleotydów: 3

spektrum bez błędów:

{ACG, CCG, CGA, CGT, GAC}

Rozwiązanie:

CCGACGT

CCG
 CGA
  GAC
   ACG
    CGT

Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

Błędy eksperymentu hybrydyzacyjnego:

- Błąd negatywny — gdy oligonukleotyd obecny w sekwencji nie zostanie wykryty
  (a) oligonukleotyd występuje więcej niż raz w badanej sekwencji
  (b) oligonukleotyd komplementarny na skutek nieoptymalnych warunków eksperymentu nie połączy się z badaną sekwencją
- Błąd pozytywny — gdy zostanie wskazany oligonukleotyd nieobecny w sekwencji
  (c) oligonukleotyd niezupełnie komplementarny połączy się z badaną sekwencją
  (d) zaszumiony obraz fluorescencyjny mikromacierzy

Spektrum zazwyczaj zawiera oba rodzaje błędów

Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

Przykłady błędów eksperymentu hybrydyzacyjnego

	sekwencja	spektrum
(a)	TTACATTA	{ACA, ATT, CAT, TAC, TTA}
(b)	TTACATTC	{ACA, ATT, TAC, TTA, TTC}
(c)	TTACAT	{ACA, CAT, TAC, TTA, TTT}
(d)	TTACAT	{ACA, CAT, GAG, TAC, TTA}

Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

badana sekwencja: CCGACGT

długość oligonukleotydów: 3

spektrum bez błędów:

{ACG, CCG, CGA, CGT, GAC}

błąd negatywny: CGA

błędy pozytywne: AAT, TTG

spektrum z błędami:

{AAT, ACG, CCG, CGT, GAC, TTG}

Rozwiązanie:

CCGACGT

CCG

GAC

ACG

CGT

Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

- Sformułowanie problemu klasycznego sekwencjonowania DNA przez hybrydyzację z błędami — wersja optymalizacyjna

  Instancja: Zbiór oligonukleotydów o jednakowej długości l, długość sekwencji oryginalnej n.

  Odpowiedź: Sekwencja o długości $\leq n$ zawierająca maksymalną liczbę oligonukleotydów ze zbioru.
- Problem sekwencjonowania jest silnie NP-trudny, nawet po ograniczeniu błędów do tylko negatywnych lub tylko pozytywnych
- Nawet przy założeniu wiedzy o istnieniu unikalnego rozwiązania w instancji oba podproblemy pozostają trudne obliczeniowo

Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

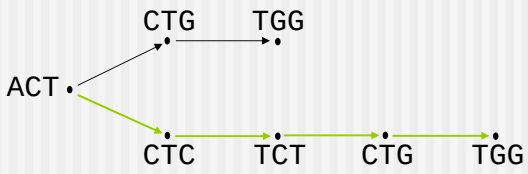
- Prezentowane modele opisują warianty klasycznego problemu sekwencjonowania przez hybrydyzację, z założeniem braku lub obecności błędów w instancji
- Wspólnym celem omawianych podejść jest znalezienie ścieżki w grafie skierowanym zbudowanym na podstawie instancji
- Etykiety przypisane wierzchołkom pozwalają jednoznacznie przekształcić ścieżkę w grafie na sekwencję nukleotydów

Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

[W. Bains i G.C. Smith, *J. Theor. Biol.* 135 (1988)]

- Pierwszy algorytm rekonstruujący sekwencję oryginalną na podstawie spektrum
- Założenie o braku błędów w instancji
- Konstrukcja drzewa, w którym oligonukleotydy odpowiadają wierzchołkom (przeszukiwanie z nawrotami)

ACTCTGG, S = {ACT, CTC, CTG, TCT, TGG}

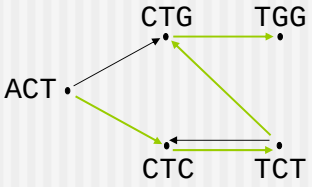


Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

[Y.P. Lysov i in., *Doklady Akademii Nauk SSSR* 303 (1988)]

- Pierwszy algorytm odwołujący się do znanego problemu z teorii grafów
- Założenie o braku błędów w instancji
- Poszukiwanie ścieżki Hamiltona w grafie skierowanym, w którym oligonukleotydy odpowiadają wierzchołkom

ACTCTGG, S = {ACT, CTC, CTG, TCT, TGG}

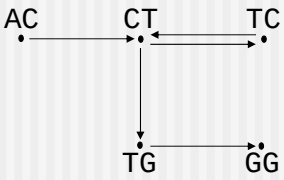


Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

[P.A. Pevzner, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 7 (1989)]

- Pierwszy algorytm rozwiązujący problem sekwencjonowania bez błędów w instancji w czasie wielomianowym
- Poszukiwanie ścieżki Eulera w grafie skierowanym, w którym oligonukleotydy odpowiadają łukom

ACTCTGG, S = {ACT, CTC, CTG, TCT, TGG}



Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

[J. Błażewicz i in., *Discrete Appl. Math.* 98 (1999)]

- Pevzner w swoim artykule nie wyjaśnił, dlaczego możliwa była transformacja grafu, w którym poszukiwana jest ścieżka Hamiltona (problem w ogólności silnie NP-trudny) w graf, w którym poszukiwana jest ścieżka Eulera (problem obliczeniowo łatwy)
- Grafy z metody Lysova i in. (tzw. grafy DNA) należą do klasy grafów liniowych (krawędziowych) skierowanych, dla których problem poszukiwania ścieżki Hamiltona rozwiązywany jest w czasie wielomianowym. Ich grafami oryginalnymi są grafy z metody Pevznera
- Wierzchołki grafu liniowego $G=(V,A)$ reprezentują łuki grafu oryginalnego $H=(U,V)$, łuki w G łączą wierzchołek x z y, jeśli w H koniec łuku x pokrywa się z początkiem łuku y

Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

- Zadanie

Dla następującego spektrum bez błędów:

S = {AGTA, AGTG, GTAC, GTAG, GTGT, TACC, TAGT, TGTA}

należy skonstruować grafy metodami Lysova i in. oraz Pevznera, znaleźć w nich odpowiednie ścieżki reprezentujące rozwiązania i odczytać możliwe sekwencje wynikowe.

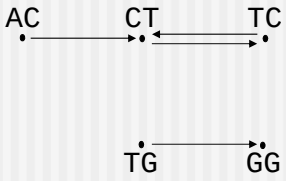
Przeprowadzić transformację grafu liniowego z metody Lysova i in. do jego grafu oryginalnego.

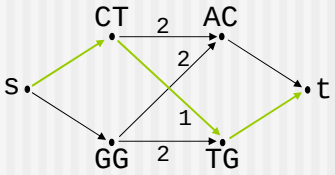
Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

[P.A. Pevzner, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 7 (1989)]

- Założenie o obecności błędów negatywnych w instancji
- Algorytm heurystyczny wielomianowy
- Poszukiwanie brakujących oligonukleotydów jako przepływu o wartości m–1 i minimalnym koszcie w sieci opartej na grafie dwudzielnym $K_{m,m}$

ACTCTGG, S = {ACT, CTC, TCT, TGG}





Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

[P.A. Pevzner, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 7 (1989)] – cd.

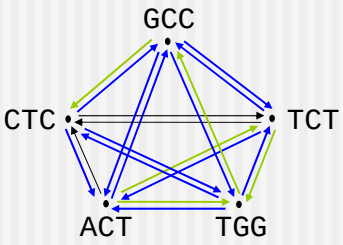
- Niepowodzenie, gdy przepływ o minimalnym koszcie okaże się mieć koszt inny niż liczba brakujących oligonukleotydów
- Niepowodzenie, gdy uzupełniony graf okaże się niespójny
- Ewentualne niepowodzenie, gdy wierzchołek z brakującymi incydentnymi łukami nie zostanie wstawiony do grafu dwudzielnego

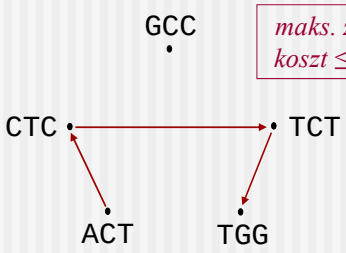
Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

[J. Błażewicz i in., *J. Comput. Biol.* 6 (1999)]

- Pierwszy algorytm rozwiązujący problem z dowolnymi błędami negatywnymi i pozytywnymi w instancji
- Sformułowanie wariantu problemu selektywnego komiwojażera w grafie skierowanym pełnym

ACTCTGG, S = {ACT, CTC, GCC, TCT, TGG}





maks. zysk
koszt $\leq n-l$