Einführung in die Angewandte Bioinformatik: Phylogenetik und Taxonomie 04.06.2009, 18.06.2009

Prof. Dr. Sven Rahmann

Phylogenetik: Berechnung phylogenetischer Bäume

Phylogenetik (phylum = Stamm):
Rekonstruktion von evolutionären Stammbäumen
(= phylogenetische Bäume, **Phylogenien**)
aus unterscheidbaren **Merkmalen**, insbes. aus DNA- / Proteinsequenzen,
und/oder aus Merkmalen berechneten **Distanzen**

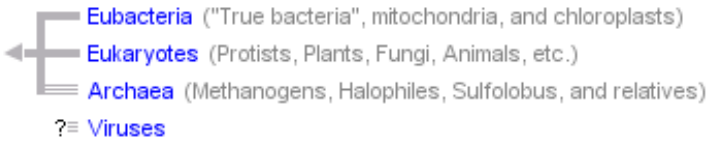
- für Spezies [**Spezies-Bäume**]
- für einzelne Gen- / Protein-Familien [**Gen-Bäume**]

Tree Of Life - Projekt
Langfristiges Ziel:
Stammbaum aller existierenden (und ausgestorbenen) Arten.
Tree Of Life Web Project: http://www.tolweb.org

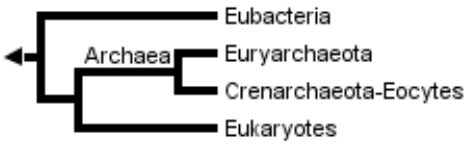
Tree Of Life Web Project

http://www.tolweb.org

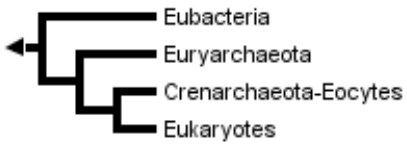
Kontroverse über Verzweigungen nahe der Wurzel



The "archaea tree":

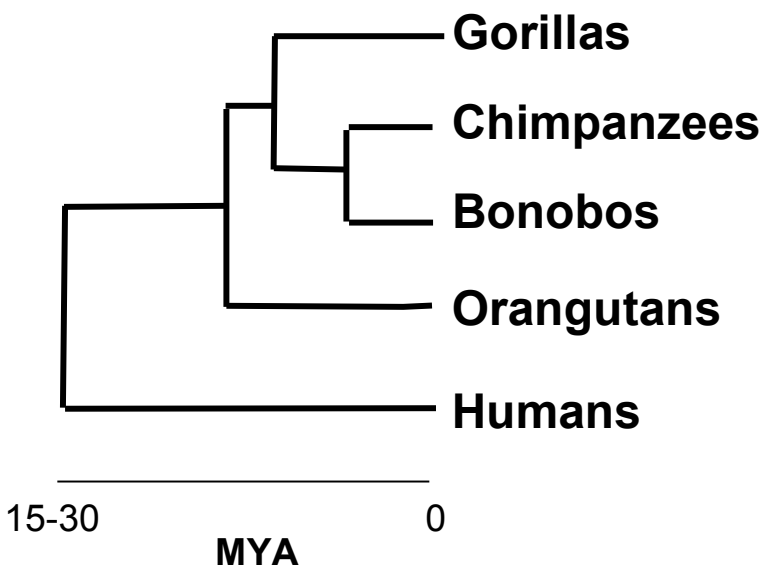


The "eocyte tree":

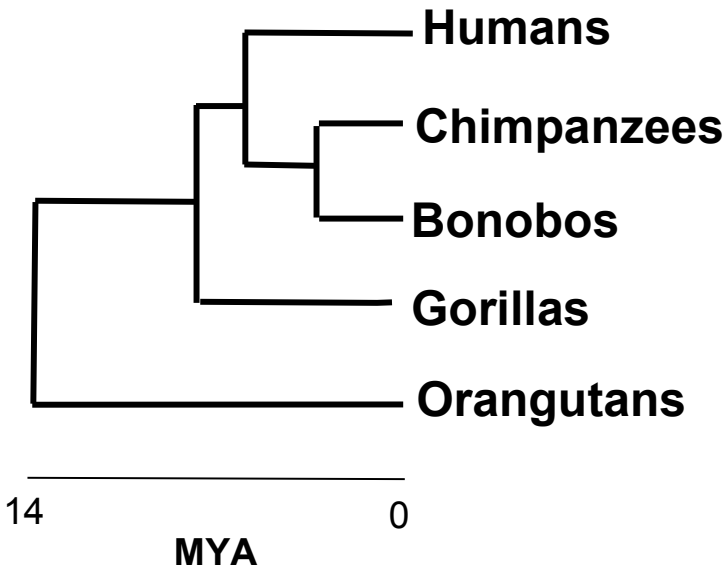


Aufgaben der Phylogenetik (Speziesbäume)

Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Arten (Spezies) und der Ereignisse, die bei den Arten seit der Speziation stattfanden.



Klassische Sichtweise,
basierend auf äußeren Merkmalen



Moderne Sichtweise,
basierend auf DNA-Vergleich

Aufgaben der Phylogenetik (Genbäume)

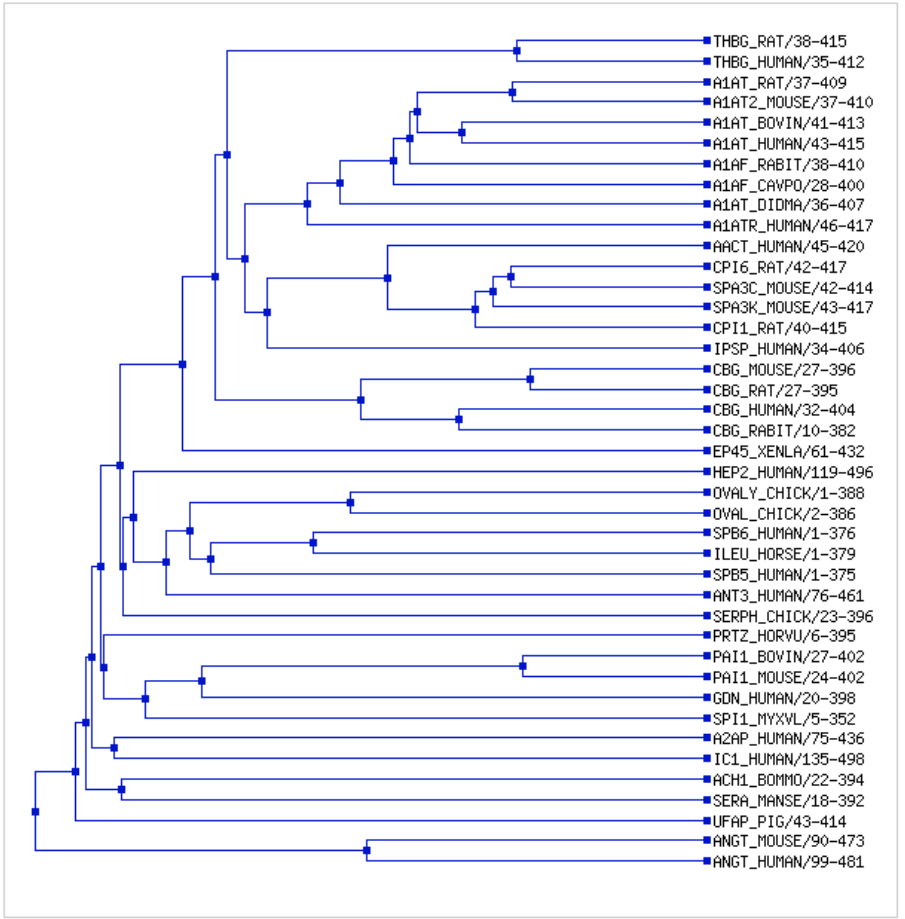
Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Genen in einer Gen- / Proteinfamilie / Domäne.

Bekanntes Beispiel:
Serpin-Familie in der pfam-Datenbank

Dies ist ein Gen-Baum (gene tree), kein Arten-Baum (species tree):

An den Blättern (rechts) stehen einzelne Gene/Proteine/Sequenzen, keine Spezies.

Evolutionäre Ereignisse (innere Knoten):
- Genduplikation
- Speziation

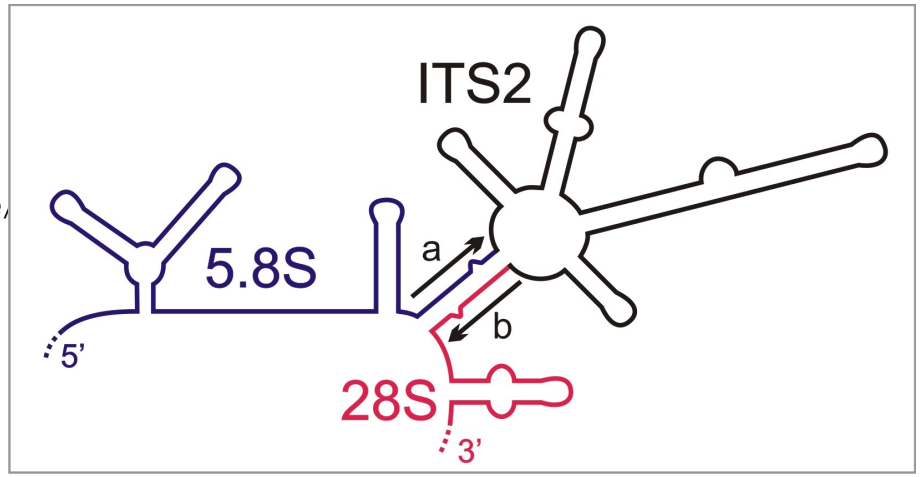


Gibt es einen DNA-Bereich (Gen?), der sich zur Rekonstruktion von Spezies-Bäumen eignet?

Schwierig:
langsam evolvierende Gene unterscheiden nicht nah verwandte Spezies, dafür Gruppen auf höherem Niveau.
schnell evolvierende Gene unterscheiden gut nah verwandte Spezies, dafür geringe Auflösung auf höherem Niveau.

Mögliche Lösung (Eukaryoten):
ITS2-Marker (internal transcribed spacer 2 der rRNA)
- Sequenz evolviert schnell.
- Sekundärstruktur evolviert langsam.

ITS2-Datenbank mit Strukturen:
http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/



Taxonomie (gr. táxis=Ordnung, -nómos =Gesetz)

systematische hierarchische Klassifikation
der Verwandtschaftsbeziehungen von Lebewesen
anhand von beobachtbaren Merkmalen.

Unterschied zur Phylogenetik:
benutzte Hierarchie muss nicht evolutionäre Verwandtschaft sein.
Idealerweise verlangt man aber monophyletische taxonomische Gruppen (Taxa).

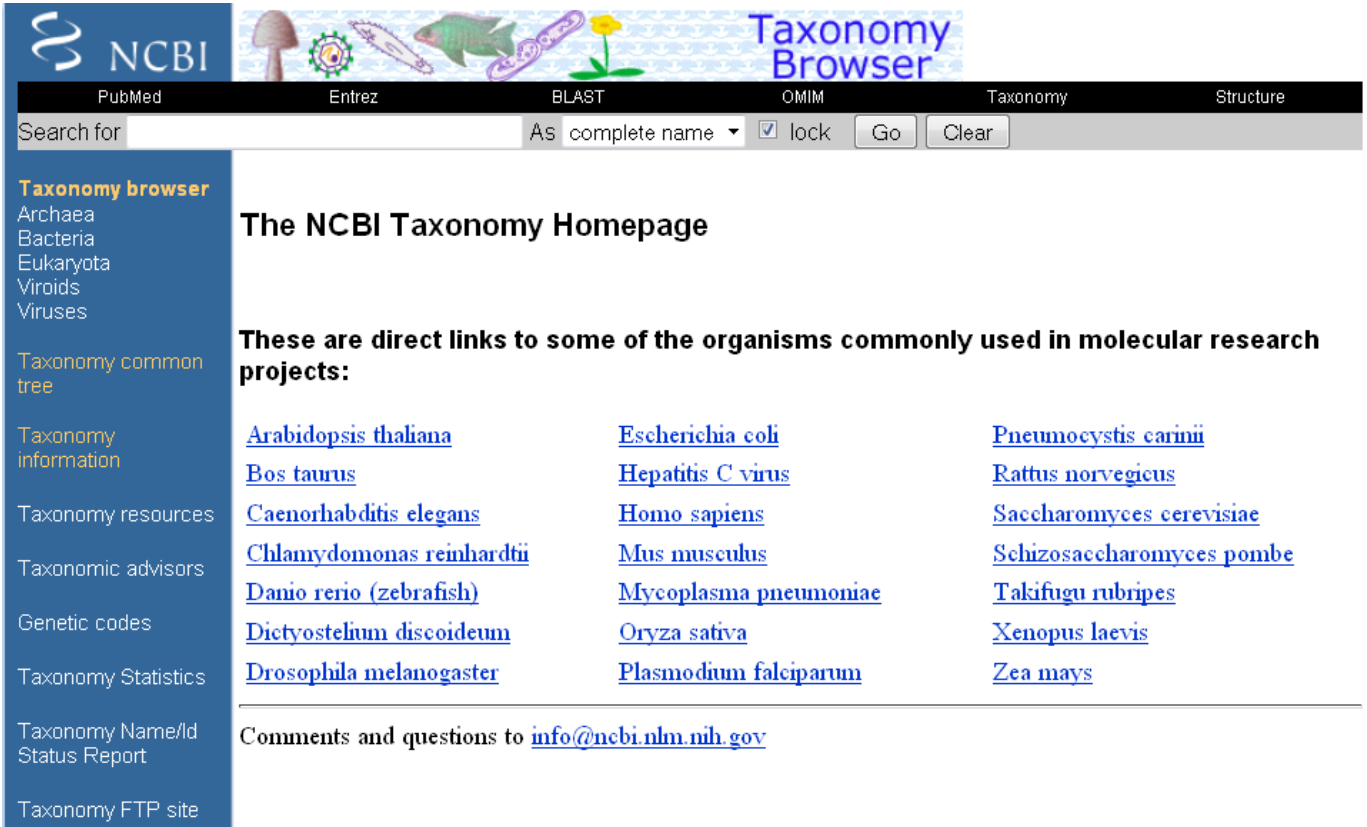
Klassische Einteilung der Lebewesen in:
- Reich
- Stamm (Abteilung); Unterstamm
- Klasse
- Ordnung; Unterordnung
- Familie; Unterfamilie
- Gattung
- Art; Unterart

NCBI Taxonomy - Datenbank

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/

Inhalt:

- taxonomische Klassifikation der Lebewesen (nicht: Tree of Life!).
- weiterführende Informationen in anderen NCBI-Datenbanken zu jeder Spezies.



NCBI Taxonomy – Datenbank: Beispiel

Suche nach „red fox“.
Beachte: taxonomy ID, genetische Codes, Abstammungslinie, Entrez links.

Vulpes vulpes

Taxonomy ID: 9627
Genbank common name: **red fox**
Inherited blast name: **carnivores**
Rank: **species**
Genetic code: Translation table 1 (Standard)
Mitochondrial genetic code: Translation table 2 (Vertebrate Mitochondrial)
Other names:

synonym: **Vulpes vulpes var.**

common name: **silver fox**

Lineage (full)

cellular organisms; Eukaryota; Fungi/Metazoa group; Metazoa; Eumetazoa; Bilateria; Coelomata; Deuterostomia; Chordata; Craniata; Vertebrata; Gnathostomata; Teleostomi; Euteleostomi; Sarcopterygii; Tetrapoda; Amniota; Mammalia; Theria; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia; Canidae; Vulpes

Entrez records		
Database name	Subtree links	Direct links
Nucleotide	354	352
Nucleotide GSS	83	83
Protein	257	257
Genome Sequences	1	1
Popset	44	44
PubMed Central	128	128
Gene	37	37
OMIA	7	7
Taxonomy	2	1

Grundlagen der Phylogenetik

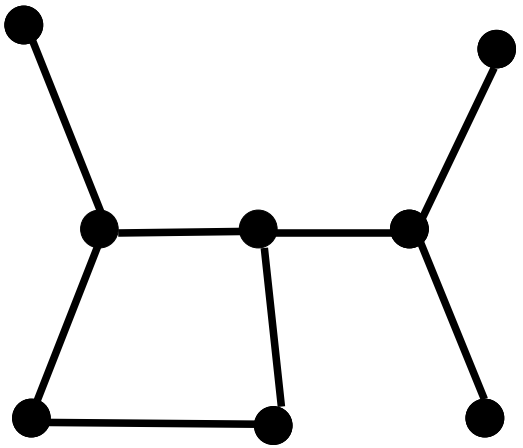
- Graphen
- Bäume
- „Vokabeln“

Grundlagen: Graphen

Ein Graph besteht aus:
- **Knoten** (vertices *V*, nodes) und
- **Kanten** (edges *E*),
  die zwischen den Knoten verlaufen.

Graphen können **gerichtet** oder **ungerichtet** sein
(Kanten haben eine Richtung oder nicht).

Der **Grad** eines Knoten
ist die Anzahl seiner Nachbarn.

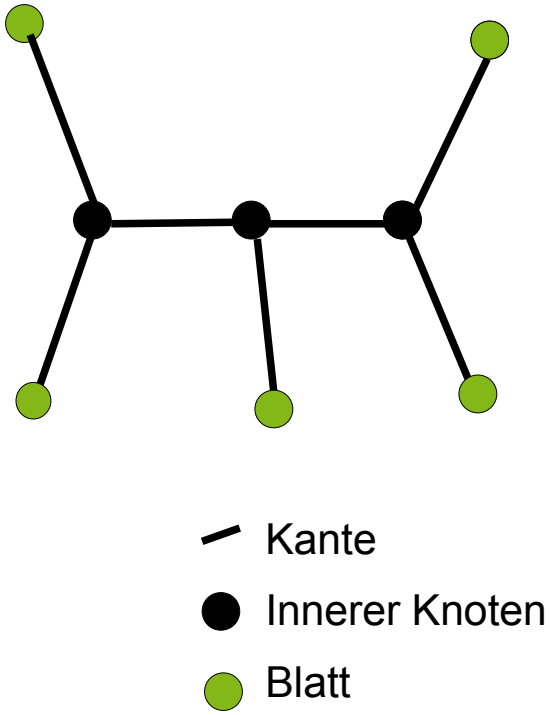


Grundlagen: ungewurzelte Bäume

Ungewurzelter Baum (unrooted tree) $T = (V,E)$:
Graph ist
- zusammenhängend
  (:= jeder Knoten wird von jedem anderen erreicht)
- kreisfrei
  (:= es gibt nur einen Weg zwischen je zwei Knoten)

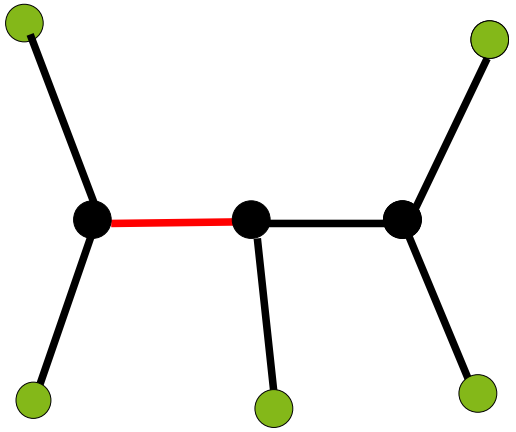
In einem Baum unterscheidet man zwischen
- inneren Knoten (inner nodes N), und
- Blättern = äußeren Knoten (leaves L).

Baum heißt Binärbaum,
wenn innere Knoten Grad 3 und Blätter Grad 1 haben.
Ungewurzelte binäre Bäume erfüllen
$|E| = 2|L| - 3$ und $|N| = |L| - 2$.

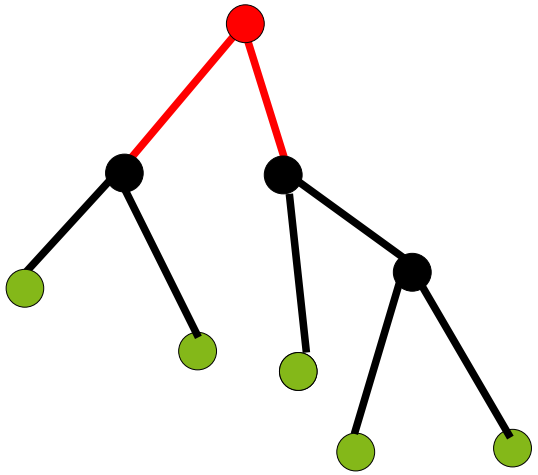


Grundlagen: Gewurzelte Bäume

Ungewurzelter Baum kann gewurzelt werden,
indem man eine Kante auswählt,
in deren Mitte einen Knoten (Wurzel) einfügt,
und den Baum daran aufhängt.



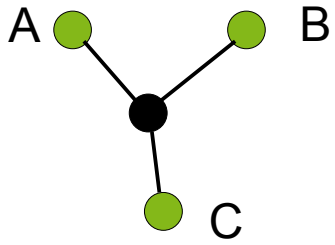
Wurzel hat Grad 2, stets ganz oben.
Kanten werden von der Wurzel weg gerichtet
(Kanten verlaufen von oben nach unten.)
Blätter unten.



Anzahl Binärbäume

Ungewurzelte Binärbäume:

- 3 Blätter: 1 Baum mit 3 Kanten
- 4 Blätter: 3 verschiedene Bäume, je 5 Kanten
- 5 Blätter: 3*5 = 15 Bäume, je 7 Kanten
- 6 Blätter: 15*7 = 105 Bäume ...

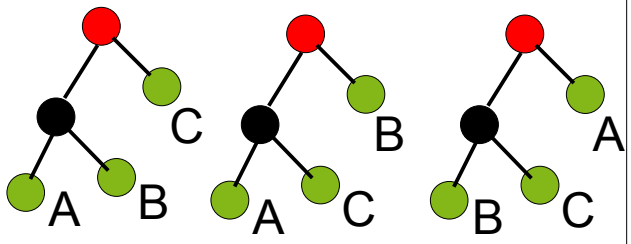


3 Blätter: 1 ungewurzelter Baum

Gewurzelte Binärbäume:

Man kann die Wurzel wie ein weiteres Blatt bei ungewurzelten Bäumen behandeln:

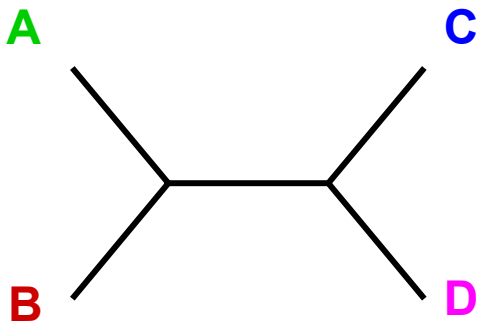
- 3 Blätter: 3 Bäume
- 4 Blätter: 3*5 = 15 Bäume
- 5 Blätter: 15*7 = 105 Bäume ...



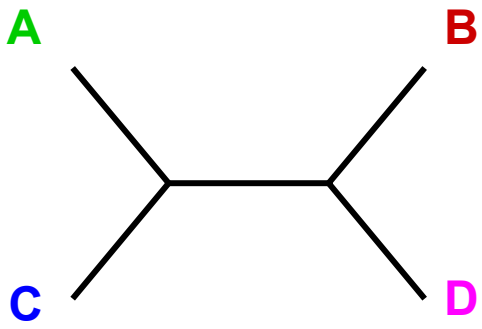
3 Blätter: 3 gewurzelte Bäume mit veschiedenen „Nachbarschaftsverhältnissen“

Anzahl der binären Bäume wächst super-exponentiell in der Zahl der Blätter n (schneller als c^n für jede Konstante c)

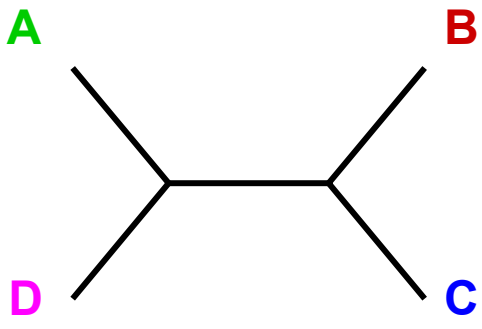
Die drei Quartette (ungewurzelte Bäume mit 4 Knoten)



AB || CD



AC || BD



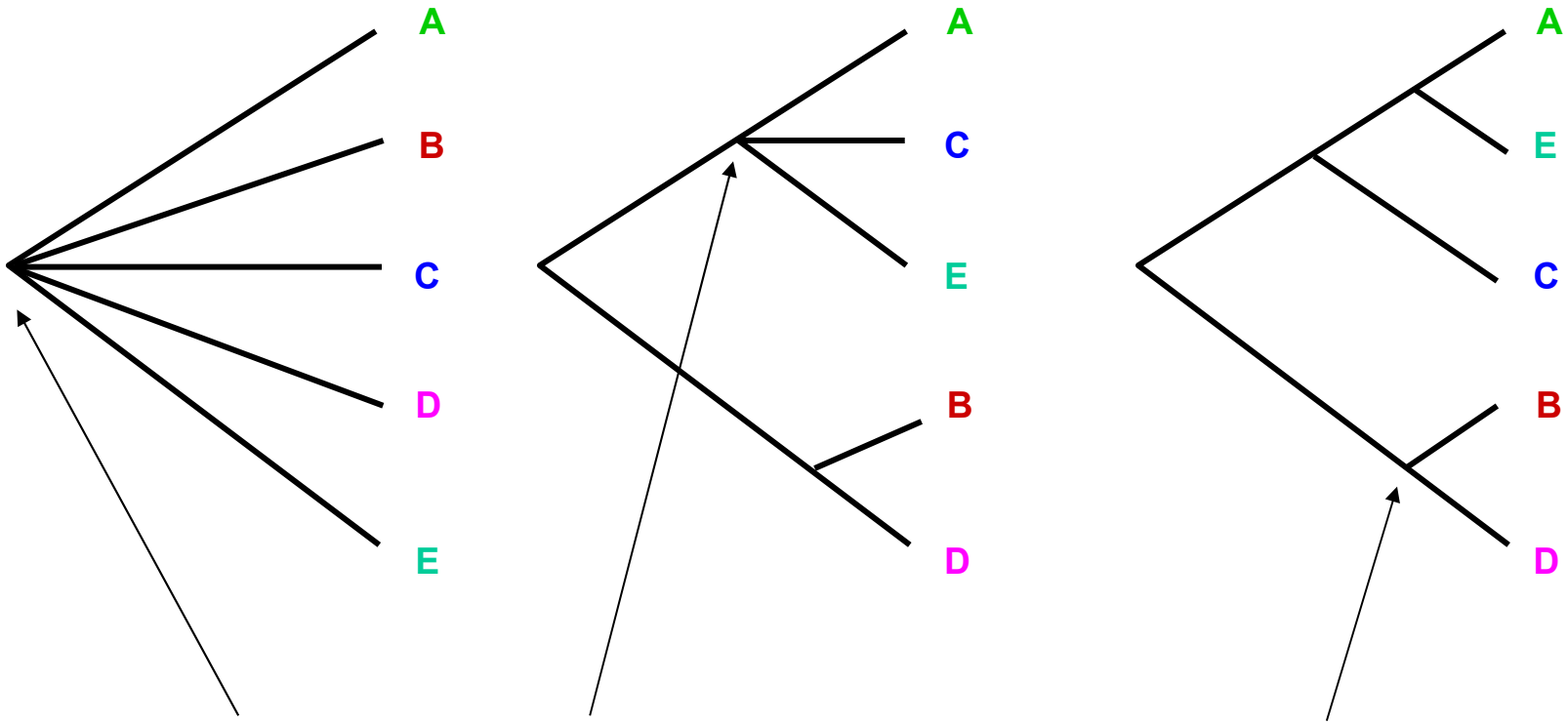
AD || BC

Grad der Auflösung des Verzweigungsmusters

"Stern"-Baum, nicht aufgelöst

Teilweise aufgelöst

Vollständig aufgelöst (Binärbaum)

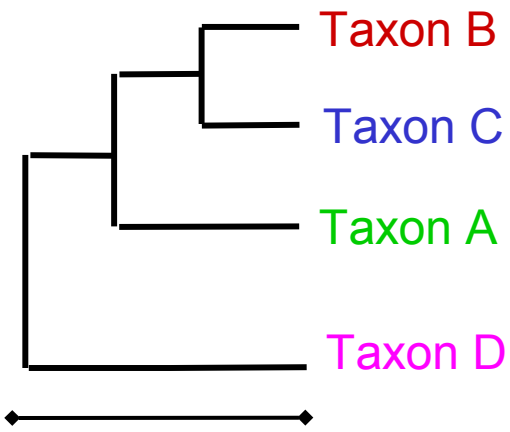


Polytomie, Multifurkation

Bifurkation

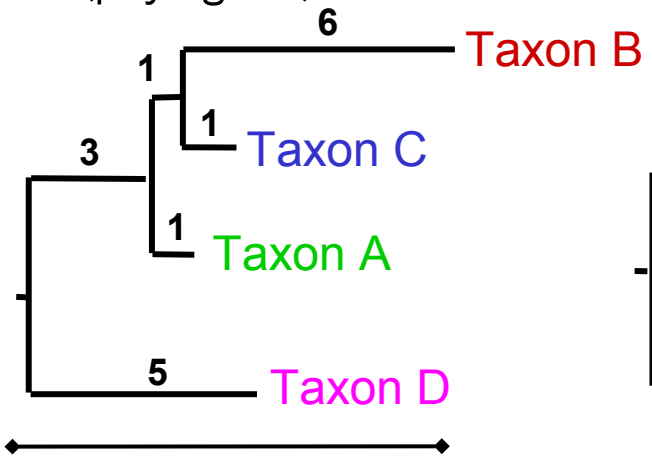
Darstellung phylogenetischer Bäume

Kladogramm
(cladogram)



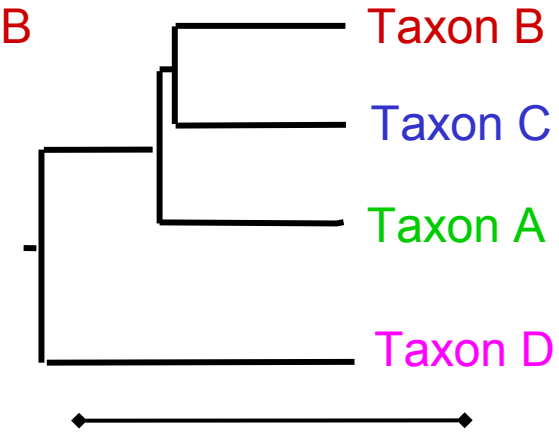
Achse hat
keine Bedeutung

Phylogramm
(phylogram)



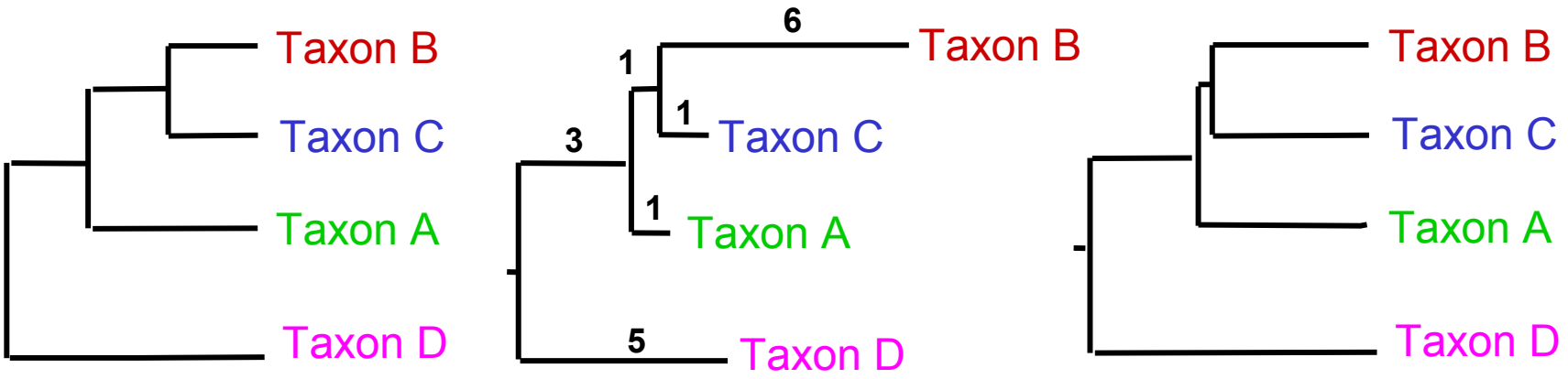
Menge an Evolution
(z.B. PAM-Einheiten)

Ultrametrischer Baum
(ultrametric tree)



Realzeit: gleicher Abstand
aller Blätter zur Wurzel

Darstellung phylogenetischer Bäume



Alle Darstellungsformen (Kladogramm, Phylogramm, ultrametrischer Baum) zeigen die gleiche Baumtopologie (Verzweigungen zwischen den Taxa).
Taxa im selben Unterbaum bilden eine monophyletische Gruppe (clade).

Darstellung durch geschachtelte Klammern:
- Kladogramm: (((B,C),A),D)
- Phylogramm: (((B:6,C:1):1,A:1):3), D:5)
- ultrametrischer Baum: analog

Die molekulare Uhr (molecular clock)

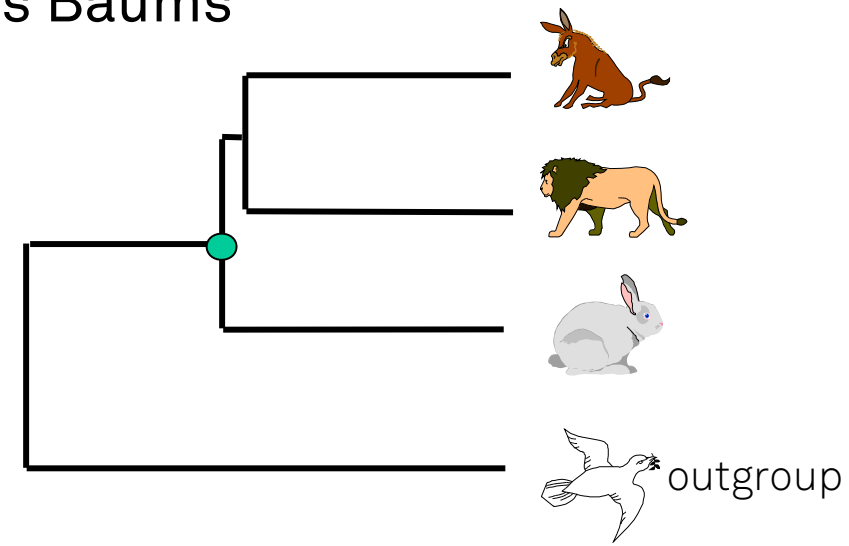
Evolutionäre Abstände zwischen Sequenzen werden gemessen
- nicht in Realzeit,
- sondern als "Evolutionsmenge" [PAM].

Problem: Distanz ist nicht Realzeit.
Evolutionsrate variiert idR zeitlich, genspezifisch, gattungsspezifisch.
Berechnete Bäume repräsentieren keine realen zeitlichen Abstände.
Auch die Wurzel kann nicht zuverlässig positioniert werden.
Man berechnet ungewurzelte Phylogramme.

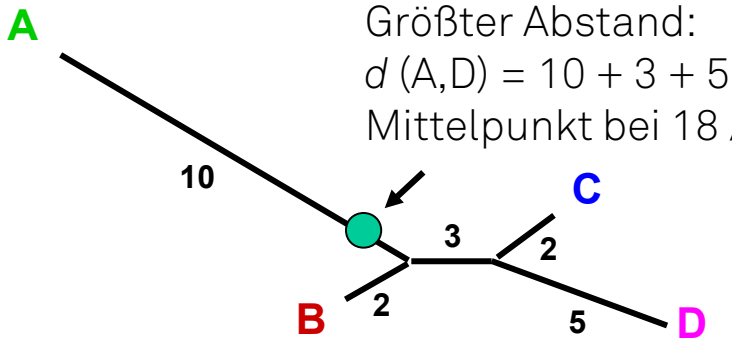
Ausnahme: Evolutionsrate konstant.
Man sagt: Es gilt die Hypothese der „molekularen Uhr“.
Man erhält einen gewurzelten ultrametrischen Baum.

Zwei Methoden zum Wurzeln eines Baums

(1) Mit Hilfe einer „outgroup“:
Spezies, die bekanntermaßen außerhalb der betrachteten Gruppe liegt.
- erfordert Vorwissen
- relativ zuverlässig



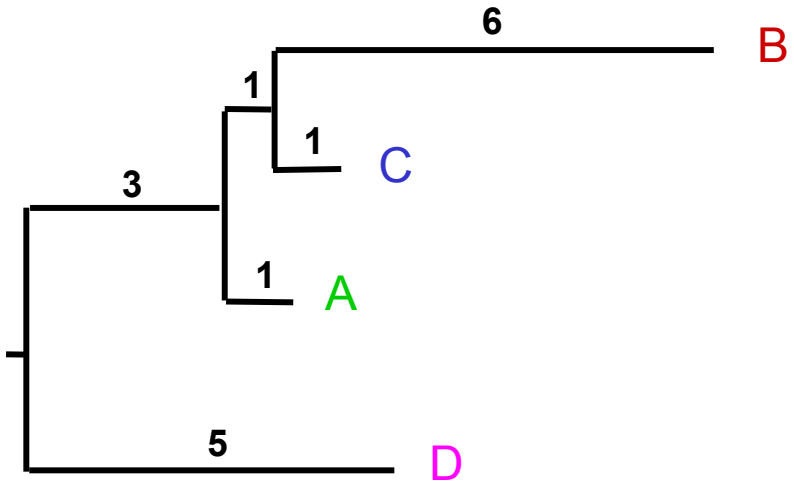
(2) Als Mittelpunkt
der am weitesten voneinander entfernten Taxa
(einfach, relativ unsicher)



Größter Abstand:
d (A,D) = 10 + 3 + 5 = 18
Mittelpunkt bei 18 / 2 = 9

Ähnlichkeit ist nicht Verwandtschaft

Ähnlichkeit, Distanz: beobachtbar, messbar.
Verwandtschaft: historische Tatsache, kann nicht mehr beobachtet werden.

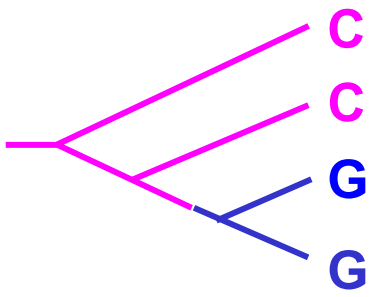


C ist ähnlicher zu A ($d = 3$) als zu B ($d = 7$),
aber C und B sind am nächsten verwandt.

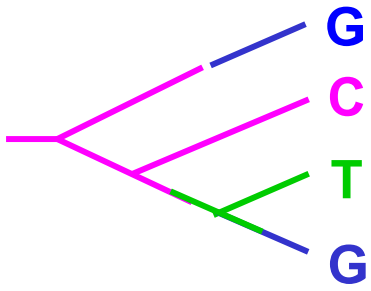
Das heißt, C und B hatten einen
späteren gemeinsamen Vorfahren
als C oder B mit A.

3 Gründe für beobachtete Ähnlichkeit

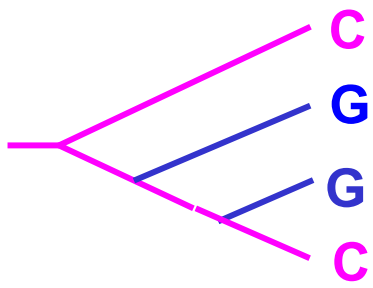
(1) Evolutionäre Verwandtschaft
- gemeinsame Stamm-Merkmale (C)
- gemeinsame abgeleitete Merkmale (G)



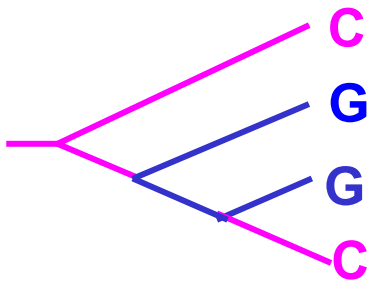
(2) parallele unabhängige Entwicklung von Merkmalen (Homoplasie)



konvergente Mutation zu G



parallele Mutation zu G

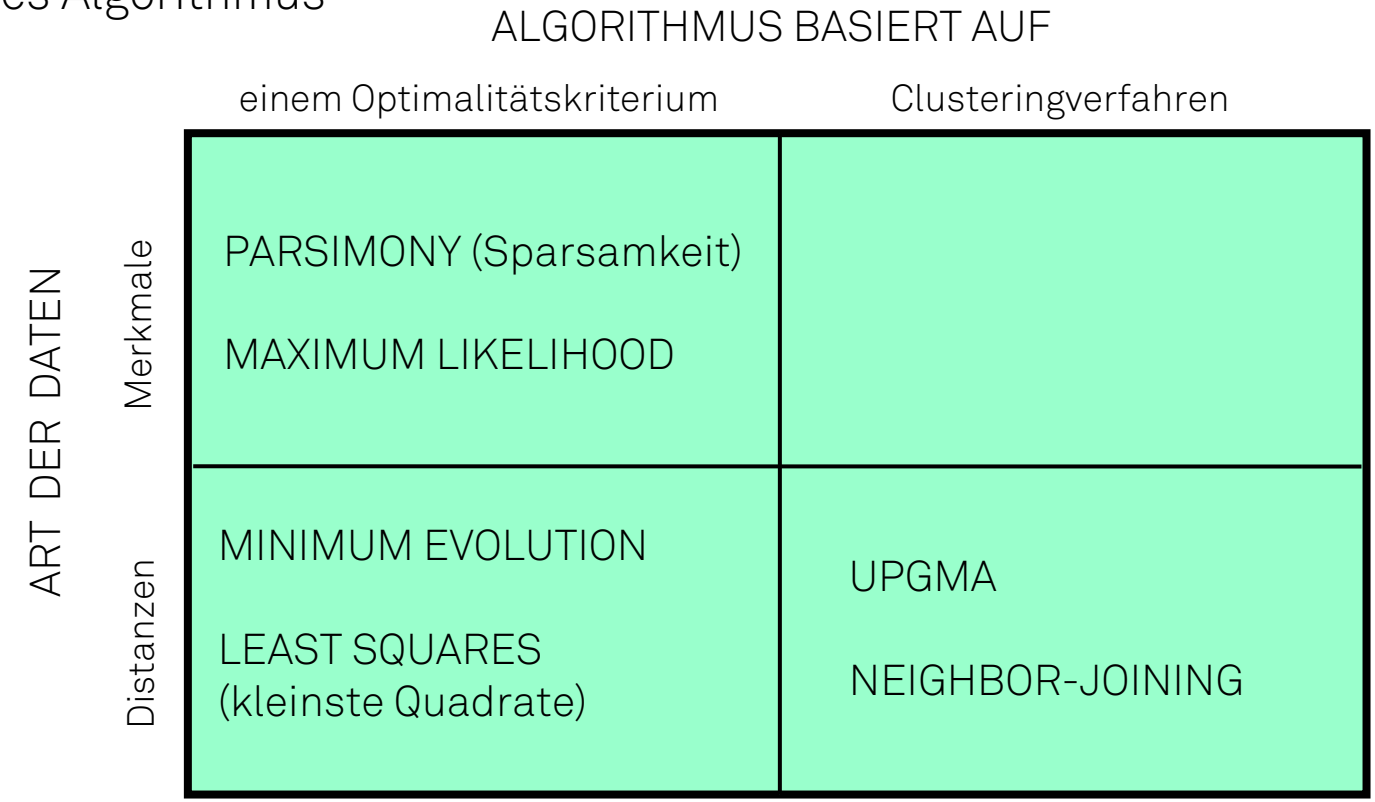


Rückmutation zu C

(3) geringe Evolutionsraten (hoher negativer selektiver Druck)

Methoden der Phylogenetik

Unterscheidung nach:
- Art der Daten (Merkmale oder Distanzen)
- Prinzip des Algorithmus



Merkmals-basierte Methoden

Merkmale:

- Objekte, die einen von mehreren Zuständen annehmen können, z.B. Spalte in einem multiplen Alignment von DNA-Sequenzen.
- In jedem Taxon liegt eine **Merkmalsausprägung** vor.
- Merkmale (Alignments) werden direkt zur Baumkonstruktion verwendet.

- Merkmalsausprägung der Ahnen kann geschätzt werden.
- Zeitpunkte evolutionärer Ereignisse können geschätzt werden.
- Häufig schwierige (NP-schwere) resultierende Probleme

Taxa	Merkmale
Species A	**ATGGCTATTCTTATAGTACG**
Species B	**ATCGCTAGTCTTATATTACA**
Species C	**TTCACTAGACCTGTGGTCCA**
Species D	**TTGACCAGACCTGTGGTCCG**
Species E	**TTGACCAGTTCTCTAGTTCG**

Distanz-basierte Methoden

Merkmale werden mit mathematischem Modell ("evolutionärer Markovprozess") in paarweise Distanzen zwischen Taxa umgerechnet.
Nur Distanzen werden zur Baumkonstruktion verwendet.
(Merkmale werden "vergessen".)

- vielseitig (auch außerhalb der Phylogenetik) verwendbare Methoden
- Evolutionäre Ereignisse und Ahnen-Merkmale können nicht geschätzt werden.

	A	B	C	D	E
Species A	----	0.20	0.50	0.45	0.40
Species B	0.23	----	0.40	0.55	0.50
Species C	0.87	0.59	----	0.15	0.40
Species D	0.73	1.12	0.17	----	0.25
Species E	0.59	0.89	0.61	0.31	----

Zwei berechnete Distanzmatrizen
rechts: Anteil Unterschiede, links: PAM-Schätzung / 100

Optimierungs-Methoden

Kriterium (Eigenschaft des zu berechnenden Baumes) wird definiert,
das es zu optimieren gilt.

Beispiele:
- möglichst wenig Mutationsereignisse insgesamt im Baum (Merkmals-basiert)
- möglichst wenig Diskrepanz zwischen gegebenen Distanzen
  und den Distanzen, die die Baumtopologie impliziert (Distanz-basiert)

Aufgabe des Algorithmus:
Finde einen (den) Baum, der das Kriterium optimiert.

- Unterscheide exakte Algorithmen vs. Heuristiken.
- Kann Ausgaben (Güte) verschiedener Algorithmen miteinander vergleichen:
  "Baum A ist (bezüglich des Kriteriums) besser als Baum B".

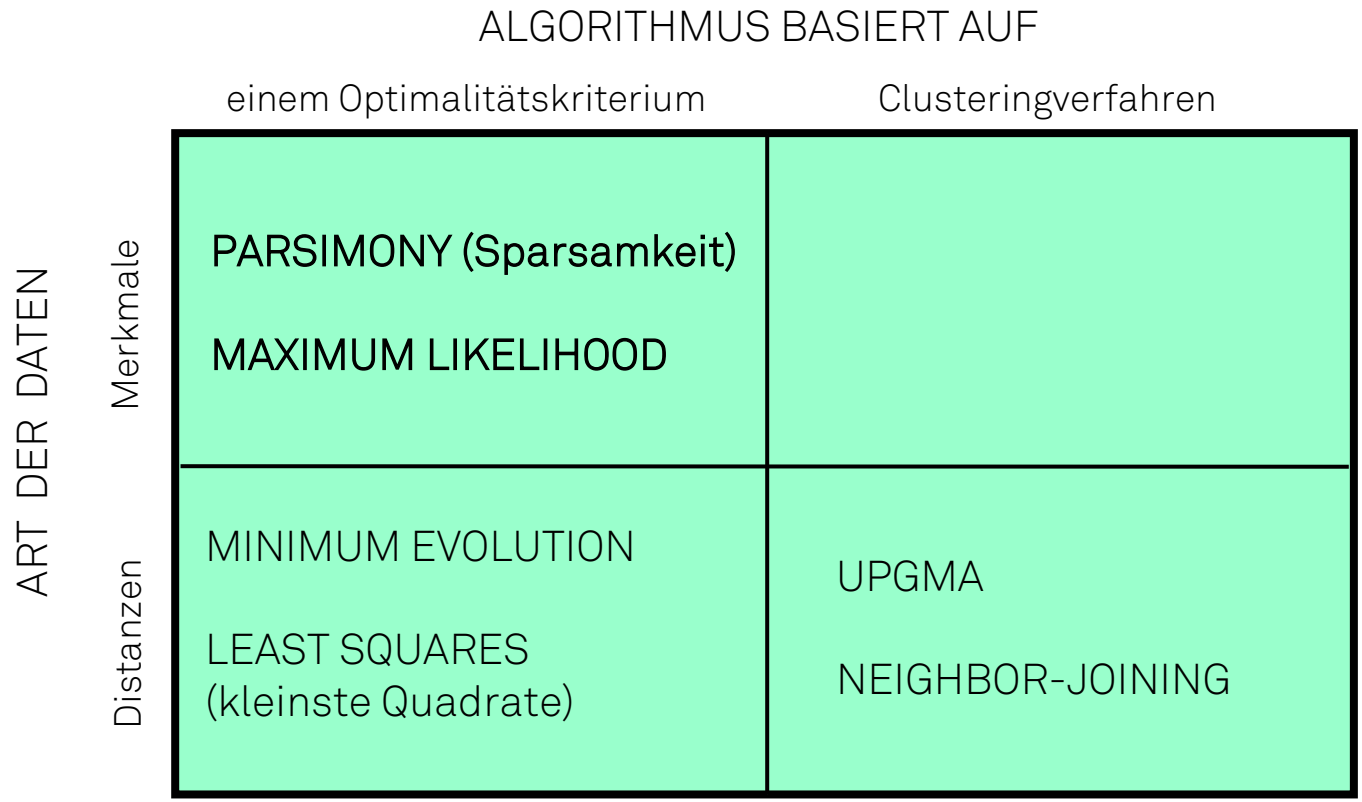
Clustering-Methoden

Definiere Regeln,
nach denen Taxa zu (2er-)Bäumen zusammenzufassen sind,
diese wiederum zu größeren Bäumen, etc.

Liefern immer einen einzigen Baum;
dieser kann nicht gegenüber Alternativen bewertet werden.
(Es gibt kein Optimalitätskriterium.)

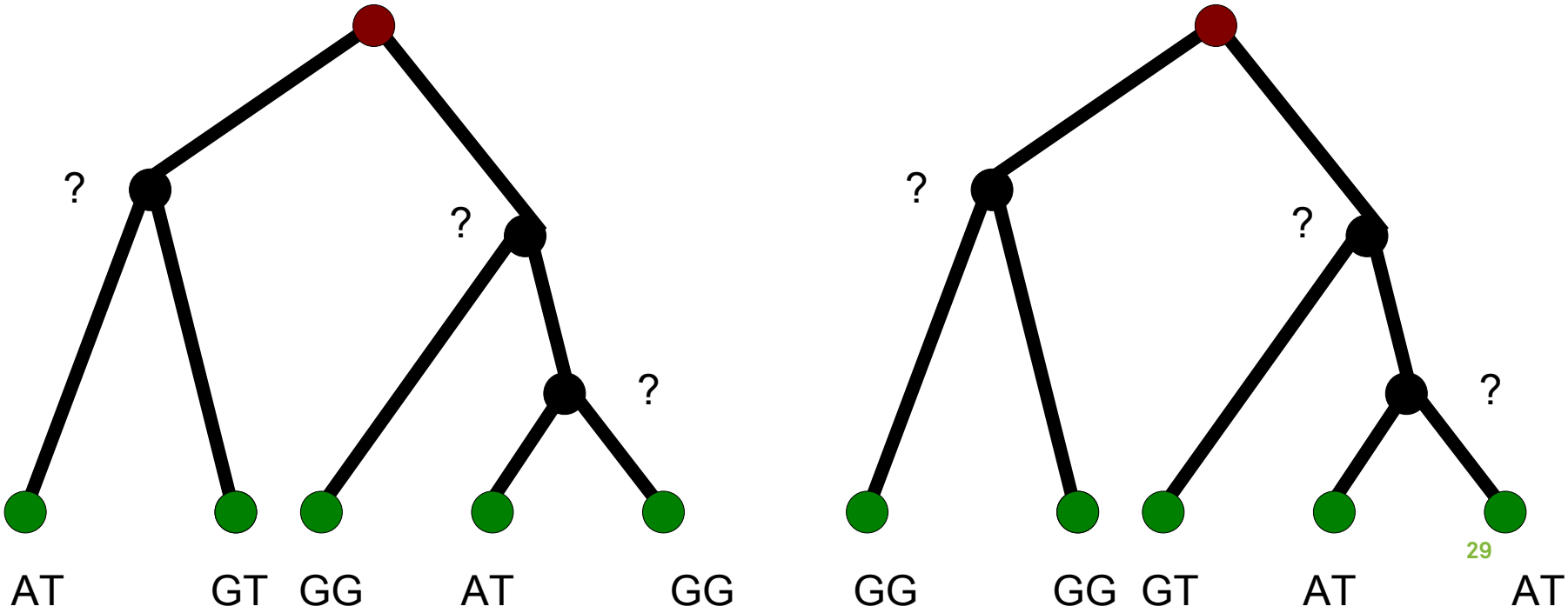
Achtung:
Weder Optimierungs-Methoden noch Clustering-Methoden
garantieren evolutionär korrekten Baum.

Ausgewählte Verfahren in der Übersicht



Einfaches Beispiel zu Maximum Parsimony und ML

Gegeben sind 5 Sequenzen: AT, AT, GT, GG, GG
Zwei Baumtopologien:
Welche Sequenzen stehen jeweils an den inneren Knoten?
Welcher Baum ist besser?



Maximum Parsimony

Gesucht / Ausgabe:
Baumtopologie, Ahnen-Sequenzen in den inneren Knoten & Wurzel
Optimalitätskriterium: “sparsamster” Baum (“most parsimonious” tree):
über alle Kanten summiert am wenigsten Änderungen.

Vorteile
- Kriterium intuitiv, motiviert durch Occam's Razor:
  „die einfachste, kürzeste Erklärung ist die beste“.

Nachteile:
- Unterschätzt die wahre Anzahl von evolutionären Ereignissen
  bei entfernt verwandten Sequenzen (z.B. wegen Homoplasien)
- liefert falsche Ergebnisse
  bei weit entfernten Sequenzen und stark unterschiedlichen Raten
- NP-schweres Problem

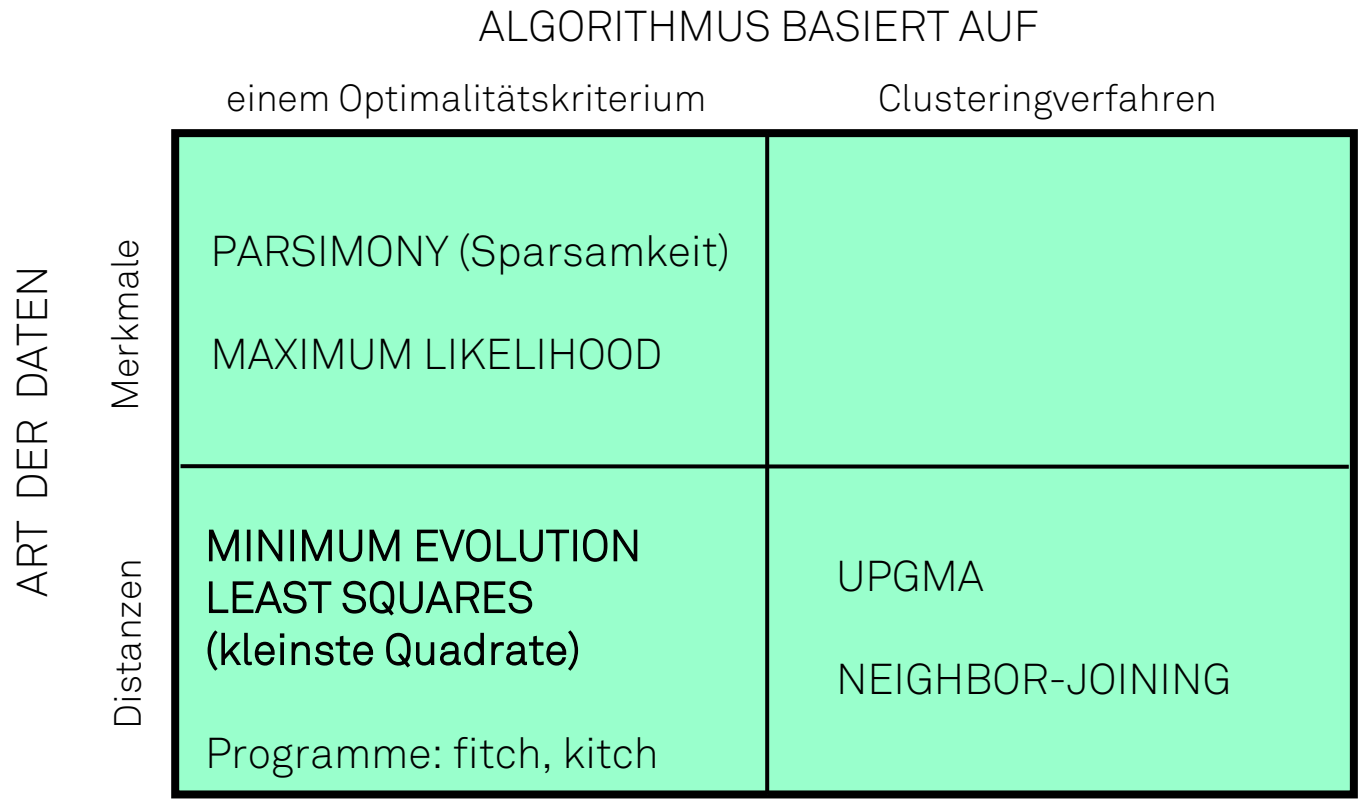
Maximum Likelihood

Gesucht / Ausgabe:
Baumtopologie, Kantenlängen (in PAM-Einheiten o.ä.).
Optimalitätskriterium:
Zu gegebenem statistischem Evolutionsmodell + Baumtopologie + Kantenlängen berechnete Wahrscheinlichkeit, dass beobachtete Sequenzen auftreten.

Vorteile
- Modellbasiert: Alle Annahmen werden explizit gemacht
- Mehrfach- und Rücksubstitutionen sind im Modell berücksichtigt
- Konsistente Schätzung evolutionärer Distanzen (Kantenlängen)

Nachteile:
- Ergebnisse Modell-abhängig; falsches Modell führt zu beliebigen Ergebnissen
- schwierig(er) zu verstehen (als MP)
- NP-schweres Problem

Ausgewählte Verfahren in der Übersicht



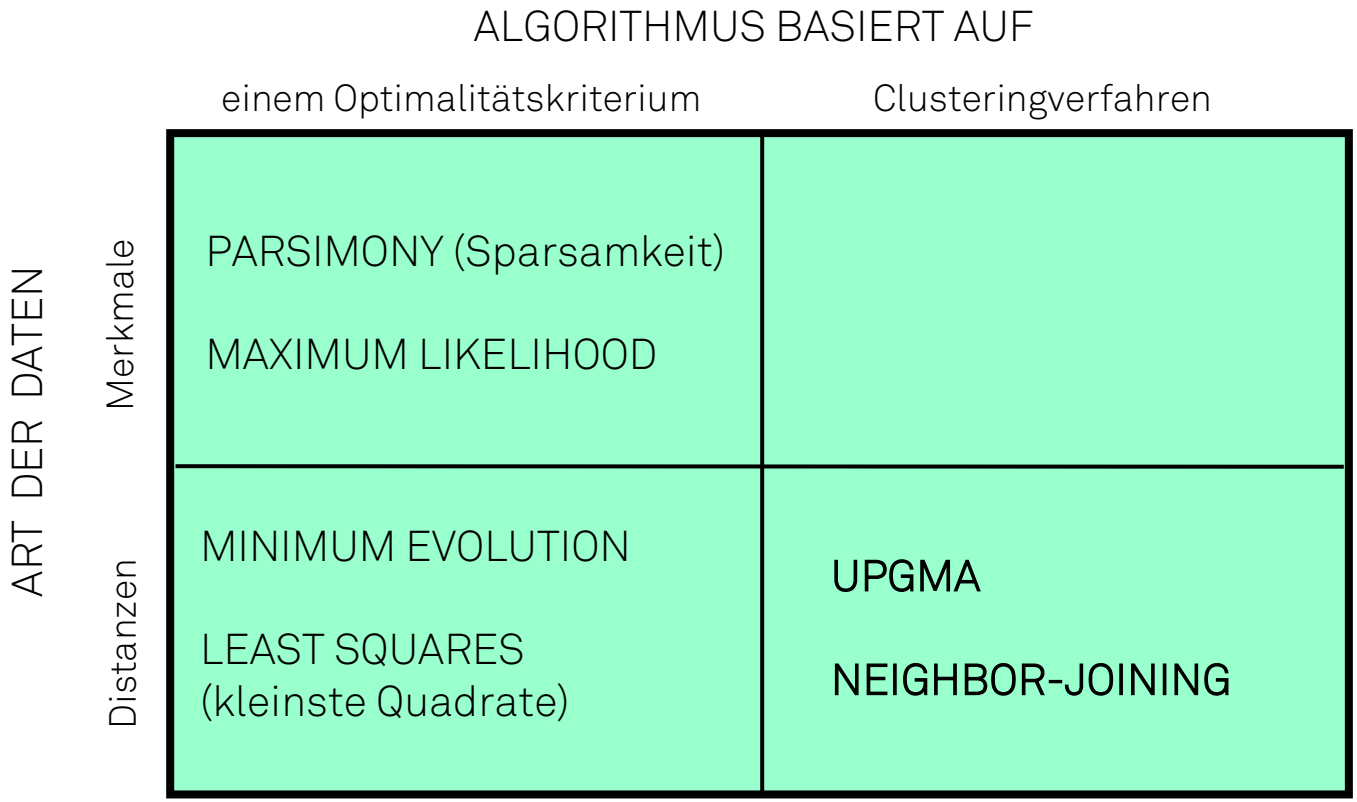
Least Squares und Minimum Evolution

Gesucht / Ausgabe: Baumtopologie, Kantenlängen
Optimalitätskriterium: Zu jeder Baumtopologie werden Kantenlängenbestimmt, so dass die Baum-Distanzen die gegebenen Distanzen optimal approximieren (im Sinne kleinster Quadrate).
Optimal ist die Baumtopologie
- mit kleinstem quadratischen Fehler (bei least squares)
- mit kleinster Gesamtlänge (bei minimum evolution)

Vorteile
- optimalitäts-basiert („Lösungen“ können vergleichend evaluiert werden)
- schneller als Merkmals-basierte Methoden

Nachteile:
- langsamer als Clustering-Methoden NJ und UPGMA

Ausgewählte Verfahren in der Übersicht



UPGMA: Unweighted Pair Group Method Using Averaging

Gesucht / Ausgabe: Baumtopologie, Kantenlängen
Verfahren:
Solange mehr als ein Objekt vorhanden ist:
  Finde das Paar (x,y) von Objekten mit kleinster Distanz.
  Ersetze sie durch ein einziges Objekt z={x,y}.
  Berechne Distanzen von z={x,y} zu den anderen Objekten a, ...,
    mittels Durchschnittbildung zwischen d(x,a) und d(y,a).
Baum ergibt sich aus der Hierarchie der zusammengefassten Objekte.

Vorteile
- einfach zu verstehen, einfach durchzuführen.
- liefert korrektes Resultat bei ultrametrischen Distanzen,
  d.h. wenn es einen ultrametrischen Baum gibt, der die gegebenen Distanzen als Distanzen zwischen den Blättern aufweist, wird dieser (schnell) gefunden.

Nachteile
- Ergebnisse schlecht interpretierbar bei nicht ultrametrischen Eingaben.

NJ: Neighbor Joining

Gesucht / Ausgabe: Baumtopologie, Kantenlängen

Verfahren:
- ähnlich wie bei UPGMA
- zu aggregierendes Objektpaars wird „sorgfältiger“ gewählt:
  berücksichtigt alle Distanzen, nicht nur die kleinste.
- Baum ergibt sich aus der Hierarchie der zusammengefassten Objekte.

Vorteile
- korrektes Resultat bei additiven Distanzen,
  d.h. wenn es einen (ungewurzelten) Baum gibt, der die gegebenen Distanzen als Distanzen zwischen den Blättern aufweist, wird dieser gefunden.
- schnell ($O(n^3)$, verbesserte Version Fast-NJ $O(n^2)$ für n Taxa)

Nachteile
- Ergebnisse schlecht interpretierbar bei nicht additiven Eingabe-Distanzen.

Empfehlung

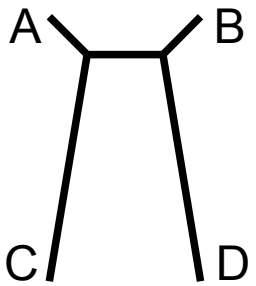
Distanzbasierte Clustering-Methoden: gut und schnell
- schnell und gut, wenn das richtige Distanz-Modell verwendet wurde.
- Es empfiehlt sich, eine NJ-Variante zu benutzen, nicht UPGMA.

Probabilistische Methoden (ML, Bayes'sche Methoden): häufig gut
- langsam (versuchen NP-schwere Probleme zu lösen),
- können bei guter Modellwahl bessere Ergebnisse liefern als NJ.
- können alternative Bäume und Konfidenzwerte berechnen.

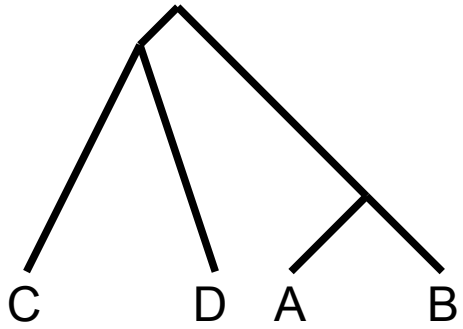
Parsimony-Methoden: langsam, fehleranfällig
- unterschätzen den evolutionären Abstand (ok bei nah verwandten Sequenzen)
- keine Kantenlängen / Zeitschätzungen
- langsam (NP-schweres Problem)
- Problem der **long branch attraction**

Long Branch Attraction bei Parsimony-Methoden

Wahrer Baum



von MP berechneter Baum

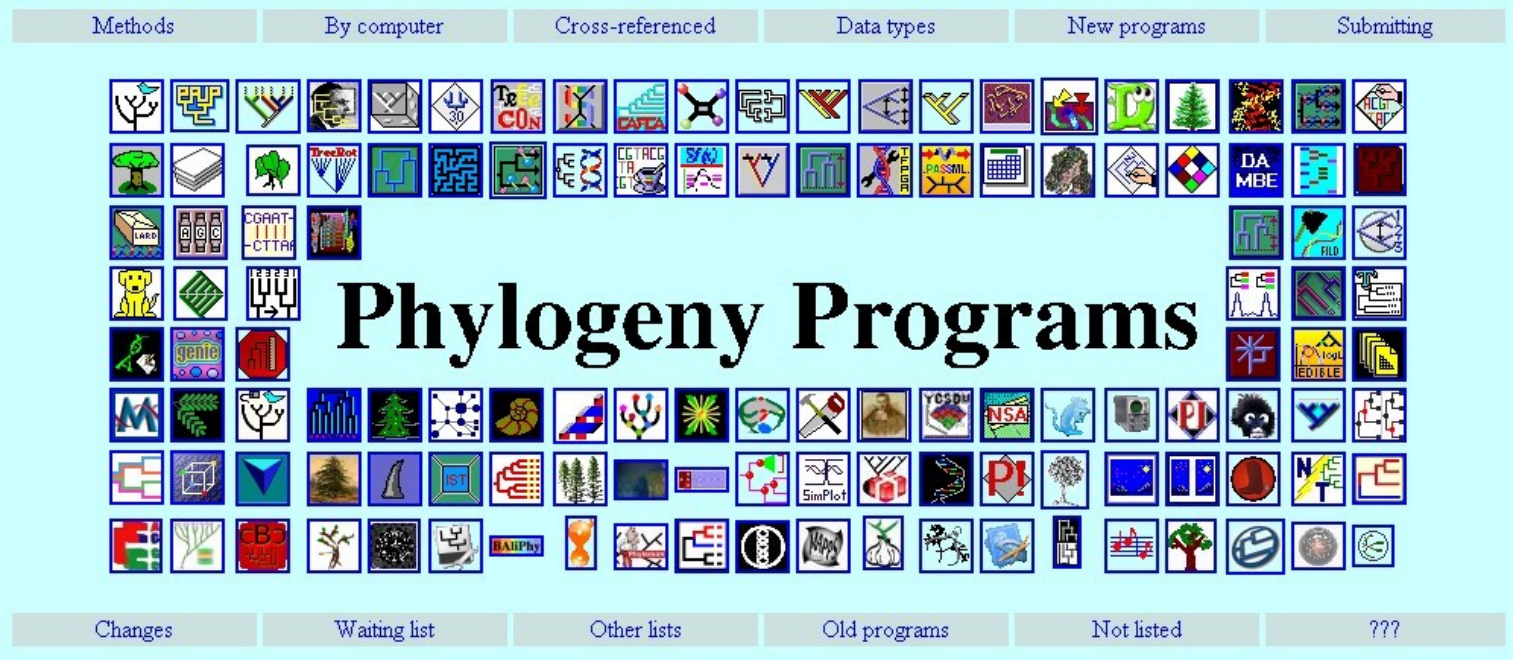


Problem

lange Kanten = schnell evolvierende Ahnenlinien,
dort Wahrscheinlichkeit konvergenter Evolution (Homoplasie) erhöht.
MP misinterpretiert dies als Synapomorphie (gemeinsamer Ursprung),
da die Kantenlänge bei MP nicht beachtet wird.
=> Taxa an langen Ästen erscheinen verwandter als sie sind.

Software

Umfangreiche Sammlung phylogenetischer Software:
http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html



Software: Phylip

- häufig benutztes Paket zum Erstellen von Phylogenien
- enthält zahlreiche Programme für verschiedene Aufgaben

- Projekt-Homepage: http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html
- Web-Interface zu einer Teilmenge von Phylip + mehr: http://mobyle.pasteur.fr