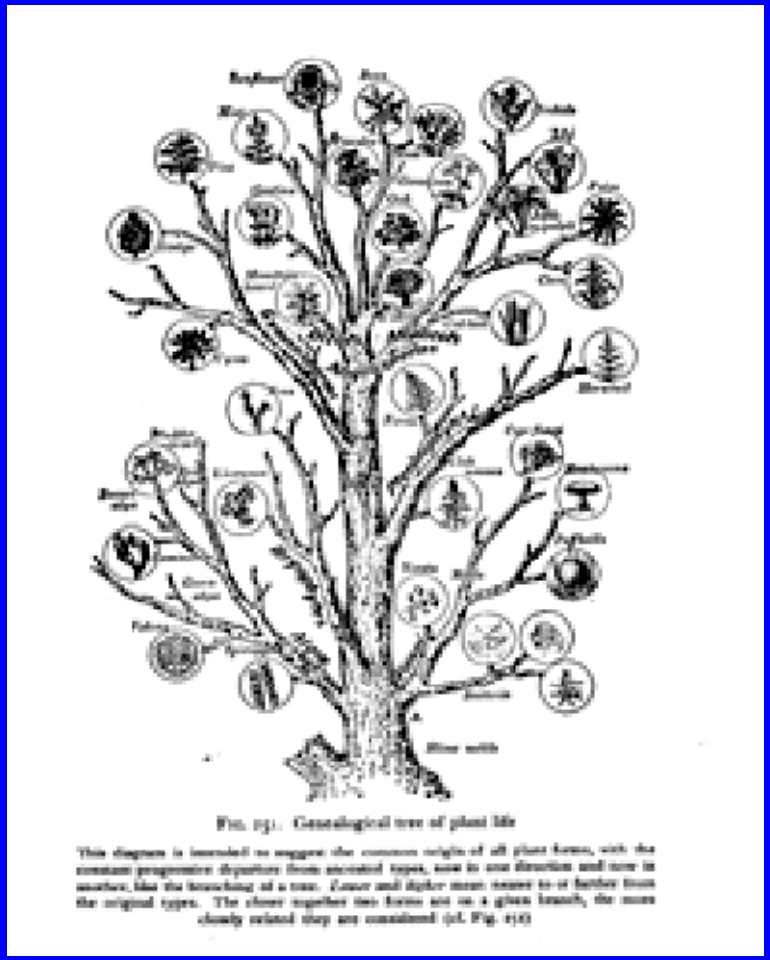
Филогенетические деревья

The time will come, I believe, though I shall not live to see it, when we shall have fairly true genealogical trees of each great kingdom of Nature.

Charles Darwin



- ✓ Что это такое
- ✓ Общий план действий
- ✓ Программы, которые строят деревья

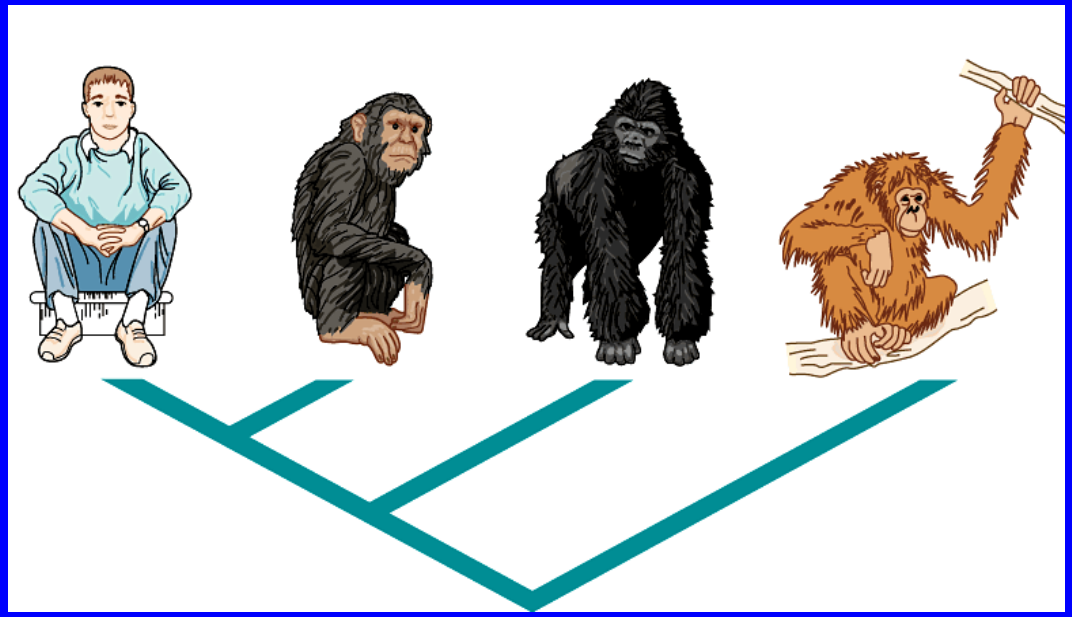
Что такое филогенетическое дерево?

- **Филогения** - раздел биологии, изучающий родственные взаимоотношения разных групп живых организмов. Филогению отображается обычно в виде "эволюционных древ" или систематических названий.
- **Филогенетика (=молекулярная филогенетика)** – те же взаимоотношения, но на уровне отдельных белковых (генных) семейств

Зачем нужны филогенетические деревья?

<u>Биологические задачи</u>:

- **сравнение 3-х и более объектов**
  (*кто на кого более похож ....)*
- **реконструкция эволюции**
  (*кто от кого, как и когда произошел…)*

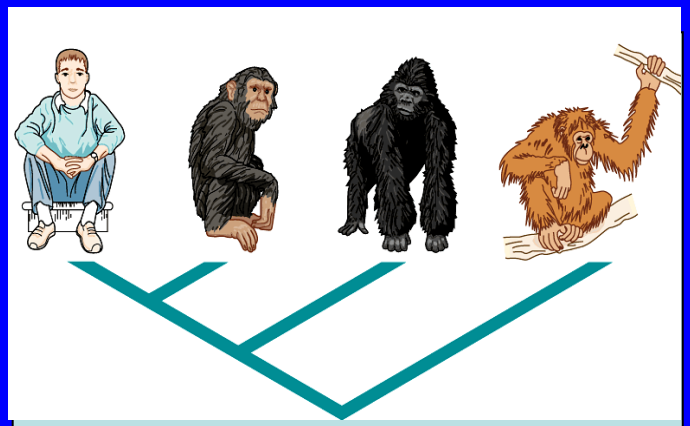


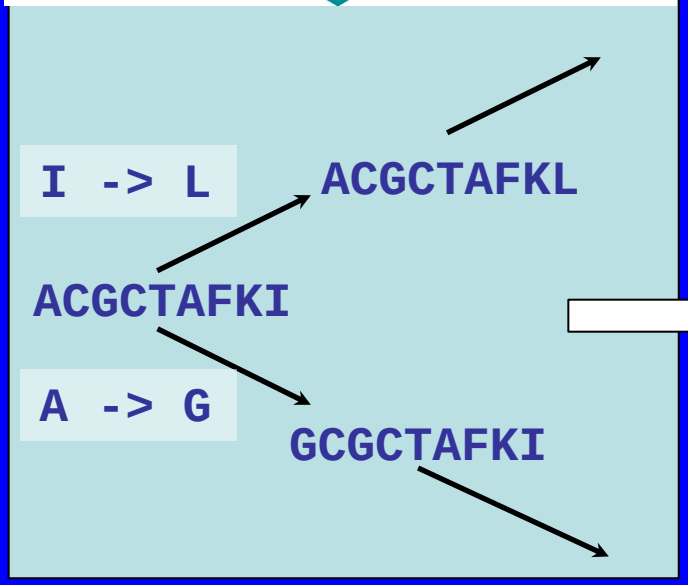
Реальные события : Данные: Построенное дерево

эволюция в природе или в лаборатории, компьютерная симуляция

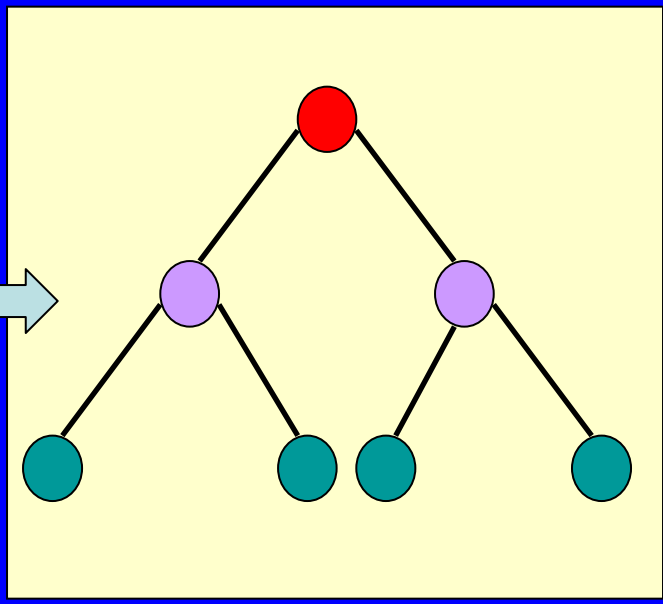
например, а.к. последовательности или количество щетинок

древовидный граф, ***вычисленный на основе данных***, может отражать или не отражать реальные события






```
>Seq1
ASGCTAFKL
. . .
>Seq3
GCGCTLFKI
>Seq4
GCGCTGFKI
. . . . .
```



Основные термины

Узел (node) — точка разделения предковой последовательности (вида, популяции) на две независимо эволюционирующие. Соответствует внутренней вершине графа, изображающего эволюцию.

Лист (leaf, OTU – оперативная таксономическая единица) — реальный (современный) объект; внешняя вершина графа.

Ветвь (branch) — связь между узлами или между узлом и листом; ребро графа.

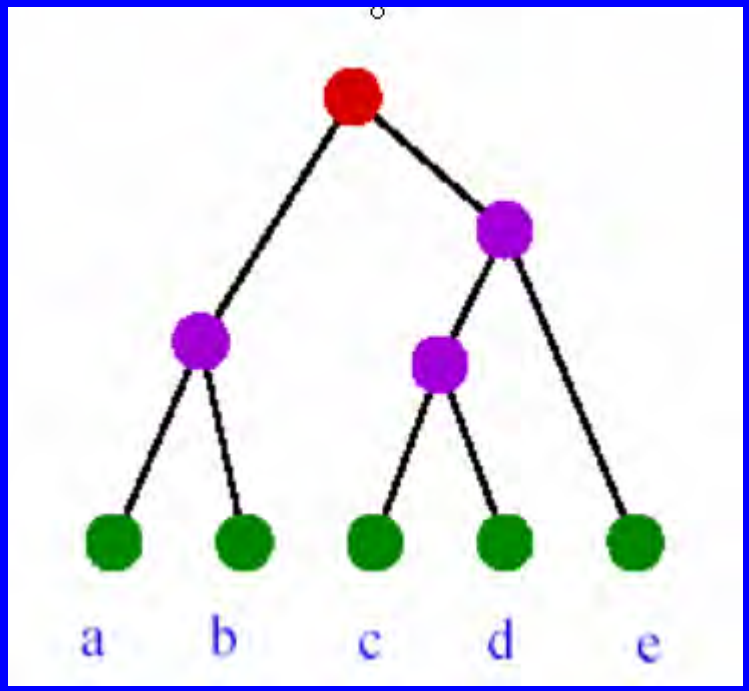
Корень (root) — гипотетический общий предок.

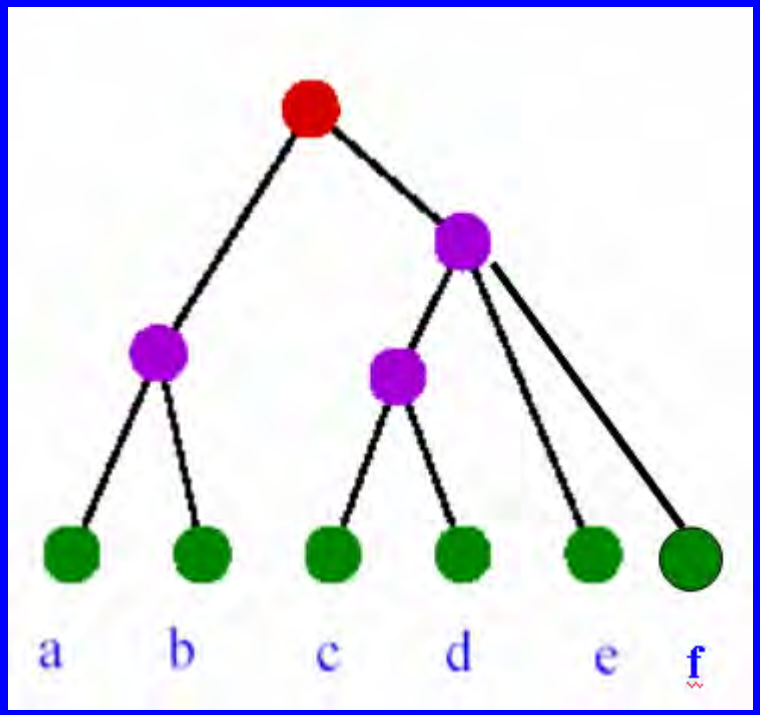
Клада (clade) - группа двух или более таксонов или последовательностей ДНК, которая включает как своего общего предка, так и всех его потомков.

Какие бывают деревья?

Бинарное (разрешённое)
(в один момент времени может произойти только одно событие)

Небинарное (неразрешённое)
(может ли в один момент времени произойти два события?)

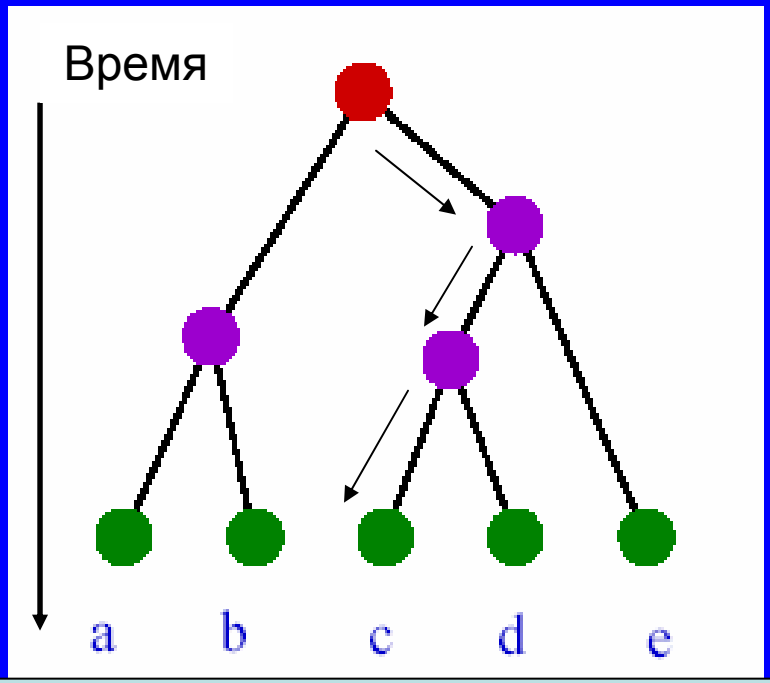




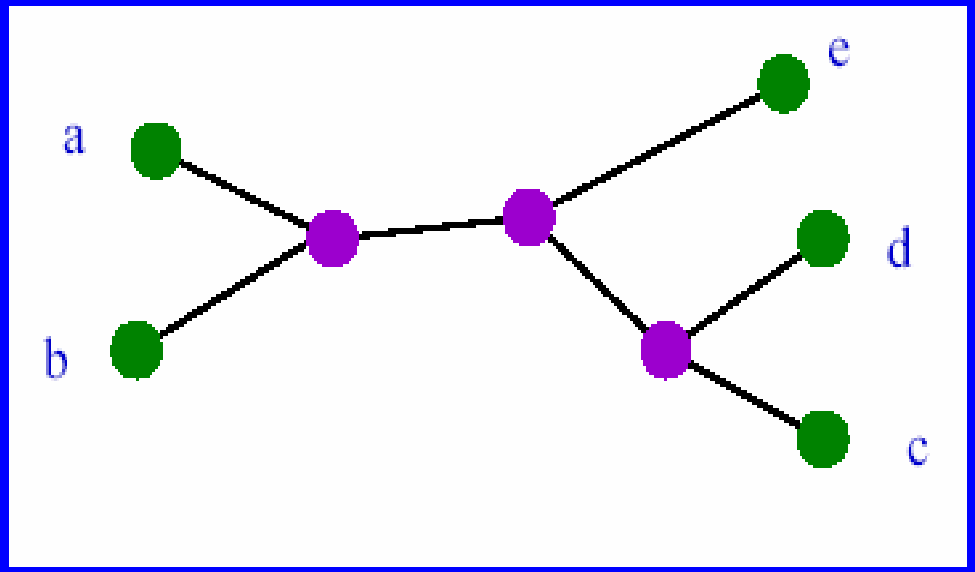
Время

Какие бывают деревья?

Укорененное дерево (rooted tree) отражает направление эволюции



Неукорененное (бескорневое) дерево (unrooted tree) показывает только связи между узлами



Если число листьев равно n, существует (2n-3)!! разных бинарных укоренных деревьев.
По определению, (2n-3)!! = 1·3 ·... ·(2n-3)

Существует (2n-5)!! разных бескорневых деревьев с n листьями

Рутинная процедура, или как строят деревья?

Составление выборки последовательностей

Множественное выравнивание

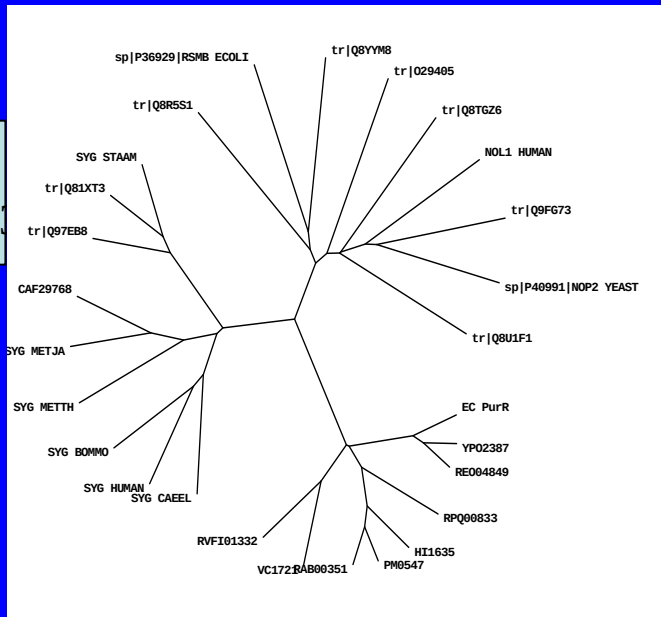
```
f53969          ALLKTPAEFDAYELNSSIKGAGTDEACLIEILSSRSNAEI
con101          AMLKTPSQYDAYELKEAIKGAGTDEACLIEILASRSNAEI
hum4            GMMTPTVLYDVQELRRAMKGAGTDEGCLIEILASRTPEEI
```

Построение дерева

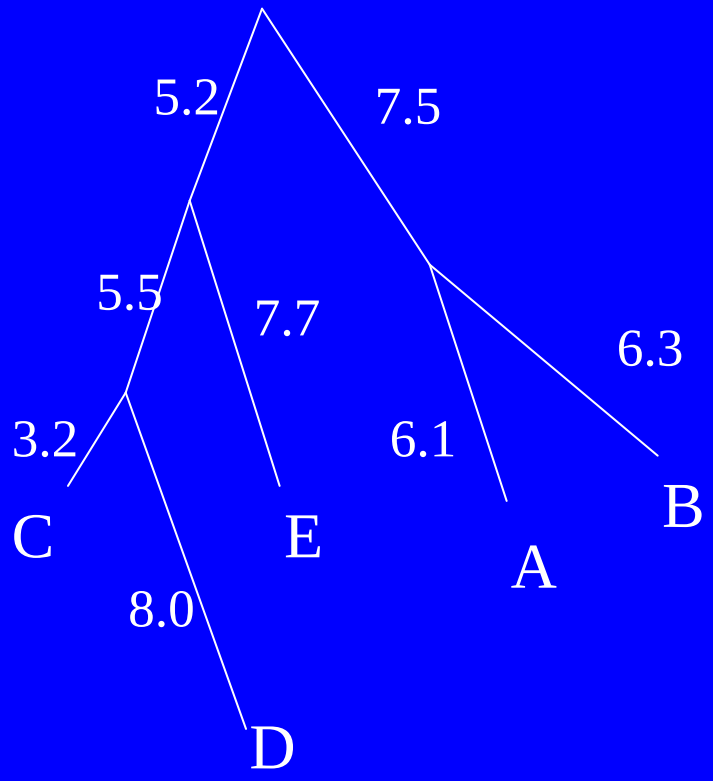
фрагмент записи в виде скобочной формулы:

(((((con101:38.51018,(f53969:28.26973,((f67220:8.39851,
max4:27.50591):4.92893,con92:30.19677):13.62315):9.53075):25.8

Визуализация и редактура дерева



Скобочная формула (Newick format)




```
(((C,D),E)),(A,B));
```

```
(((C:3.2,D:8.0):5.5,E:7
```

длины ветвей

Как выбирать последовательности для дерева?

- ✓ Кроме случаев очень близких последовательностей, проще работать с белками (а не с ДНК)
- ✓ Придерживайтесь небольшой выборки (< 50 последовательностей)
- ✓ Избегайте:
  - фрагментов;
  - ксенологов;
  - рекомбинантных последовательностей;
  - многодоменных белков и повторов
- ✓ Используйте outgroup (последовательность, ответвившаяся от общего предка заведомо (но минимально!) раньше разделения интересующих групп-клад)

Самое главное – хорошее выравнивание!

- ✓ Максимальный вклад в финальное дерево: нельзя построить хорошее дерево по плохому выравниванию
- ✓ Блоки, содержащие много гэпов, плохо выровненные N- и C- концы можно просто вырезать.

Основные алгоритмы построения филогенетических деревьев

Методы, основанные на оценке расстояний (матричные методы):

Вычисляются эволюционные расстояния между всеми листьями (OTUs) и строится дерево, в котором расстояния между вершинами наилучшим образом соответствуют матрице попарных расстояний.

- **UPGMA**
- **Neighbor-joining**
- Минимальная эволюция
- Квартеты («топологический»)
- …

Наибольшего правдоподобия, Maximal likelihood, ML

Используется модель эволюции и строится дерево, которое наиболее правдоподобно при данной модели

Максимальной экономии (бережливости), maximal parsimony, MP

Выбирается дерево с минимальным количеством мутаций, необходимых для объяснения данных

Пример матрицы расстояний

1	2	3	4	5	6	7	8	
0.00	10.53	9.77	12.78	12.03	16.54	13.53	25.00	
	0.00	9.02	12.03	9.77	15.79	9.02	27.27	
		0.00	9.77	9.02	16.54	12.03	24.24	
			0.00	2.26	17.29	10.53	25.76	
				0.00	15.79	8.27	25.76	RAT
					0.00	10.53	29.55	
						0.00	25.00	PIG
							0.00	

Расстояние (уровень дивергенции) между соответствующими последовательностями из геномов мыши и свиньи

Как понимать расстояние между объектами?

- Как время, в течение которого они эволюционировали
- Как число «эволюционных событий» (мутаций)

В первом случае объекты образуют
ультраметрическое пространство
(если все объекты наблюдаются в одно время, что, как правило, верно)

Но время непосредственно измерить невозможно

Гипотеза «молекулярных часов» (E.Zuckerkandl, L.Pauling, 1962)

За равное время во всех ветвях эволюции накапливается равное число мутаций

Если гипотеза молекулярных часов принимается, число различий между выровненными последовательностями можно считать примерно пропорциональным времени. Отклонения от ультраметричности можно считать случайными. Эволюция реконструируется в виде **ультраметрического** дерева.

Укоренённое дерево называется ультраметрическим, если расстояние от корня до любого из листьев одинаково.

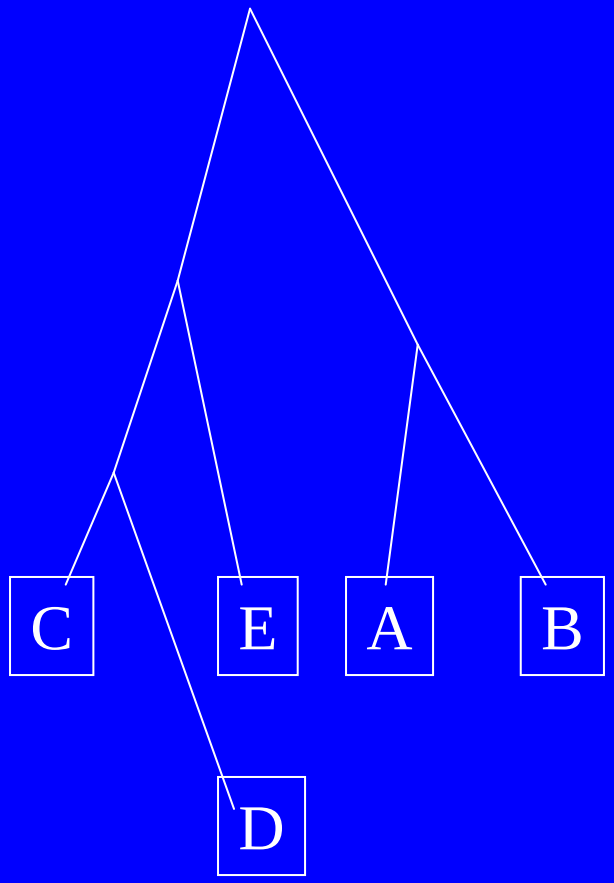
UPGMA

Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

разновидность кластерного метода

Расстояние между кластерами вычисляется как среднее арифметическое всевозможных расстояний между последовательностями из кластеров

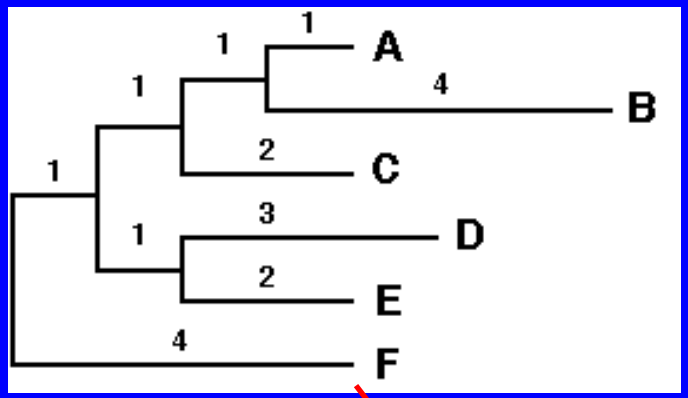
Гипотеза молекулярных часов не всегда справедлива



(длина ветвей пропорциональна числу мутаций)

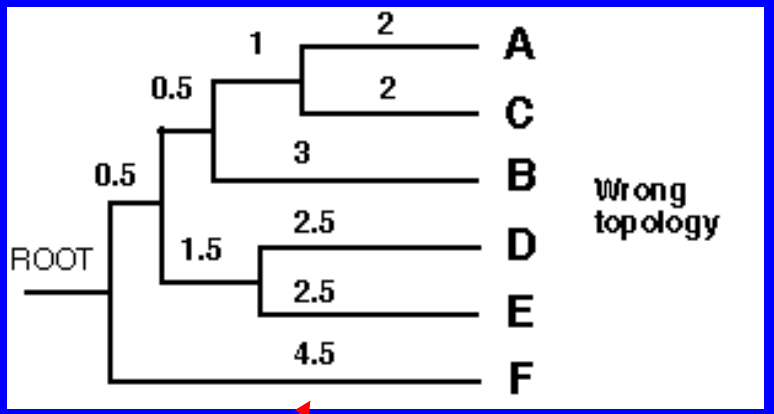
Недостатки UPGMA

Алгоритм строит ультраметрическое дерево, а это означает, что скорость эволюции предполагается одинаковой для всех ветвей дерева. Использовать этот алгоритм имеет смысл только в случае ультраметрических данных (справедливости «молекулярных часов»).



Реальное дерево

	A	B	C	D	E
B	5				
C	4	7			
D	7	10	7		
E	6	9	6	5	
F	8	11	8	9	8

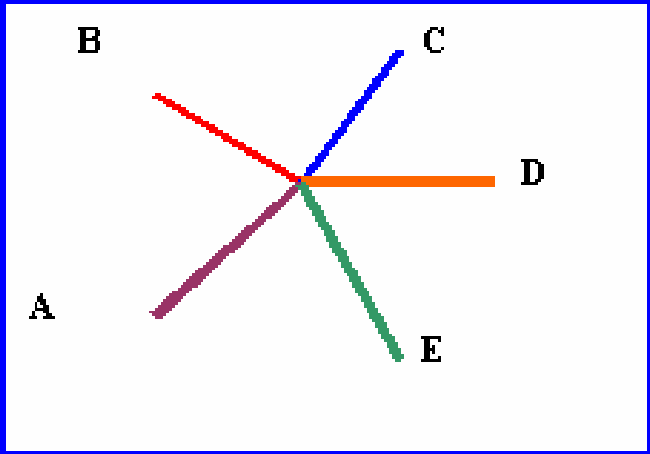


UPGMA

Метод ближайших соседей (Neighbor-joining, NJ)

- ✓ Строит неукоренённое дерево
- ✓ Может работать с большим количеством данных
- ✓ Достаточно быстрый
- ✓ Хорошо зарекомендовал себя на практике: если есть недвусмысленное с точки зрения эксперта дерево, то оно будет построено.
- ✓ Могут появиться ветви с длиной <0

Метод Neighbor-joining



Рисуем «звездное» дерево и будем «отщипывать» от него по паре листьев

Пусть $u_i = \Sigma_k \ M_{ik}/(n-2)$ — среднее расстояние от листа *i* до других листьев

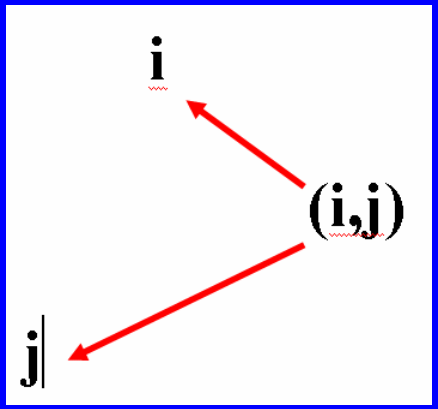
1. Рассмотрим все возможные пары листьев. Выберем 2 листа *i* и *j* с минимальным значением величины

$$M_{ij} - u_i - u_j$$

т.е. выбираем 2 узла, которые близки друг к другу, но далеки ото всех остальных.

Метод ближайших соседей (Neighbor-joining, NJ)

2. Кластер (i, j) – новый узел дерева



Расстояние от i или от j до узла (i,j):

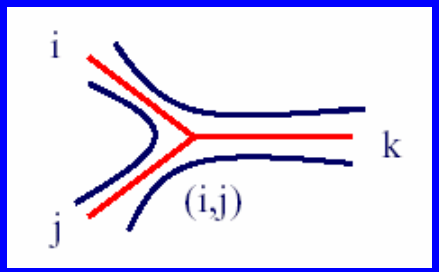
$D(i, (i,j)) = 0,5 \cdot (Mij + ui - uj)$

$D(j, (i,j)) = 0,5 \cdot (Mij + uj - ui)$

т.е. длина ветви зависит от среднего расстояния до других вершин

3. Вычисляем расстояние от нового кластера до всех других

$$M(ij)k = \frac{Mik + Mjk - Mij}{2}$$



5. В матрице M убираем i и j и добавляем (i, j).

Повторяем, пока не останутся 3 узла ...

Стандартная ситуация

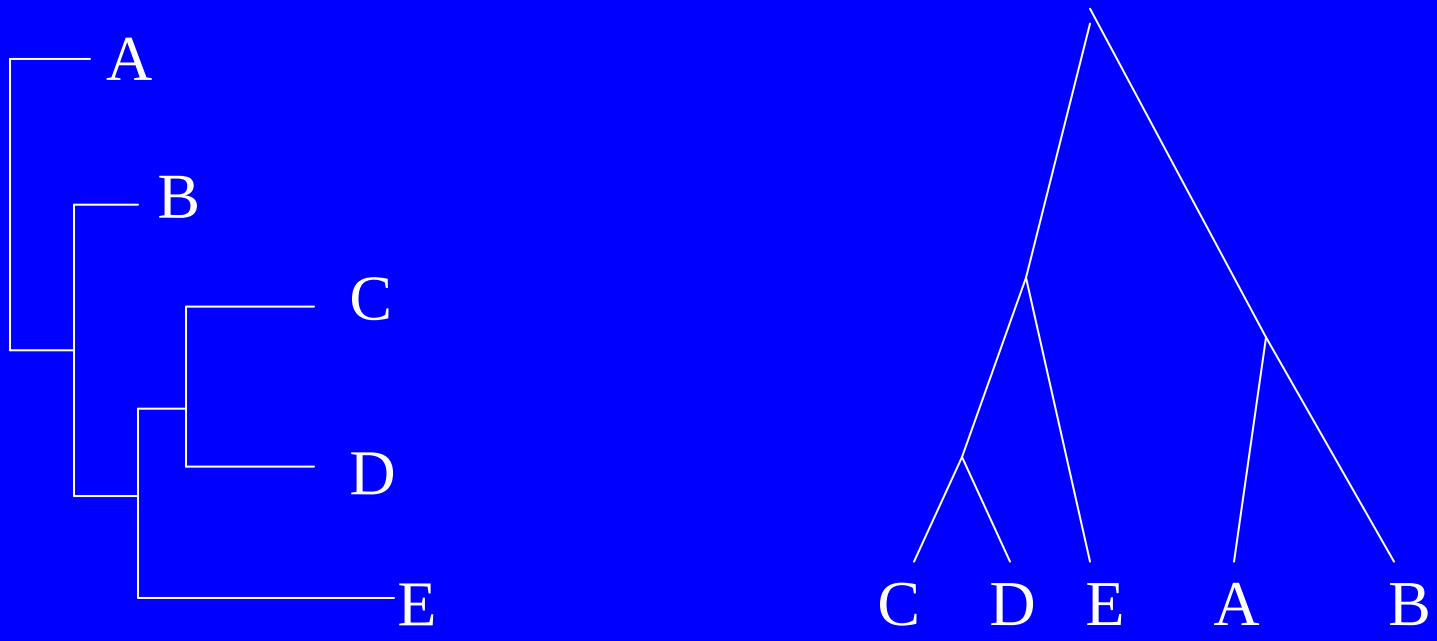
- ✓ Понимаем расстояние как число мутаций
- ✓ Реальное (неизвестное нам) дерево — укоренённое, но не ультраметрическое
- ✓ Мы реконструируем неукоренённое дерево (топологию и длины ветвей). Его надо понимать как **множество** всех возможных укоренений.

Если данные таковы, что гипотеза молекулярных часов не проходит, то реконструкция укорененного дерева намного менее надёжна, чем реконструкция неукоренённого

Как изобразить дерево? Топология дерева

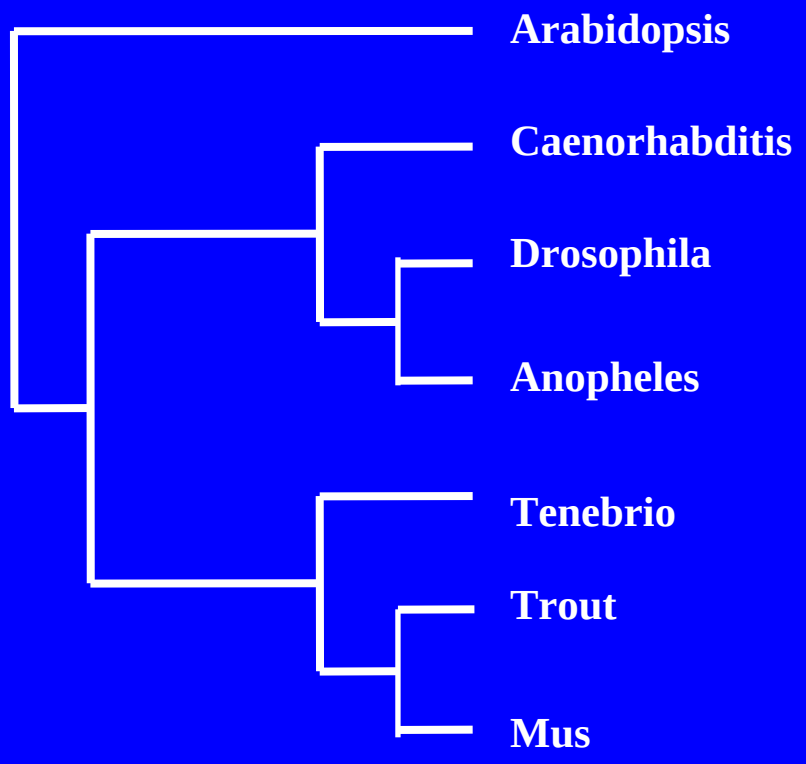
Топология дерева — только листья, узлы, (корень) и связывающие их ветви

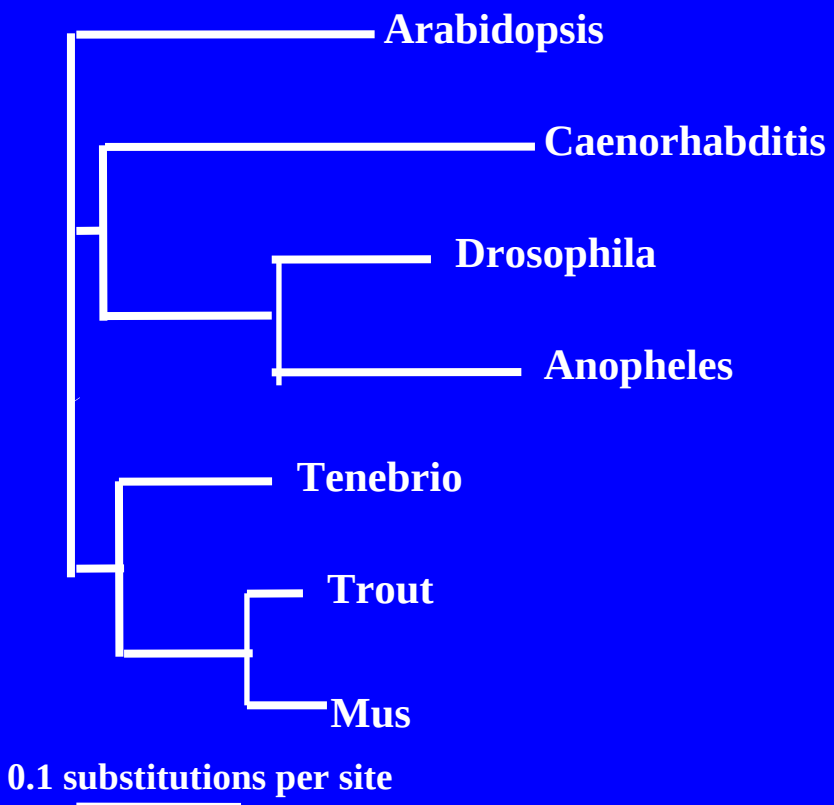
(топология не зависит от способа изображения дерева)



Два изображения одной и той же топологии

Как можно нарисовать построенное дерево?



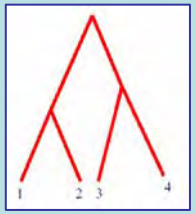


Кладограмма:
представлена только топология, длина ребер игнорируется.

Филограмма:
Длина ребер пропорциональна эволюционному расстоянию между узлами.

Достоверность топологии. Bootstraps

Есть множественное выравнивание и построенное по нему дерево.
Верим ли мы в топологию дерева?

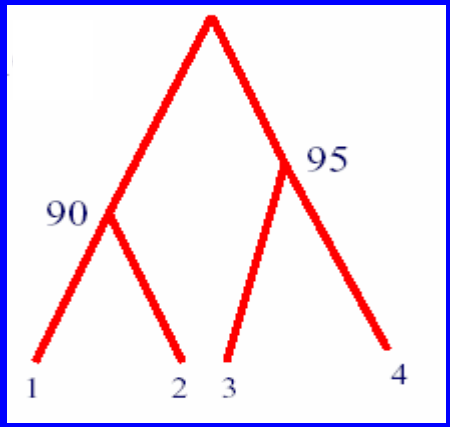


- Создадим псевдоданные:

  N множественных выравниваний той же длины, что и исходное, каждое из псевдовыравниваний - случайный набор столбцов из исходного (выборка с возвращением!)

- Построим N деревьев:

  на каждой внутренней ветви отметим долю случаев из N, в которых появлялся этот узел.



Обычно верят в топологию, если метки ветвей на бутстрепном дереве больше 70-80% . Если меньше 50%, то не верим. В иных случаях – думаем…

Какие on-line программы строят деревья?

- ✓ ClustalW. “Tree type” – nj, phylip: строит только методом NJ, но результат – в разных форматах, no bootstraps
- ✓ Phylip (Felsenstein, 1993) – пакет программ для построения филогенетических деревьев (stand-alone)

  On-line (partly): например, http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phylip-uk.html
- ✓ PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)

Phylip

Phylogeny

- **Parsimony method programs**

  PHYLIP
  - dnapars: Nucleic sequences.
  - protpars: Protein sequences.
  - pars: Discrete character parsimony
  - mix: Mixed method parsimony.
  - dollop: Dollo and Polymorphism Parsimony program.

  LVB
  - lvb: Reconstructing evolution with parsimony and simulated annealing.

- **Computation of distance**

  PHYLIP
  - dnadist: Aligned nucleic sequences.
  - protdist: Aligned protein sequences.

  EMBOSS
  - distmat: Creates a distance matrix from multiple alignments

- **Distance matrix method programs**

  PHYLIP
  - neighbor: Neighbor-joining or UPGMA.
  - fitch: Fitch-Margoliash and least-squares methods.
  - kitsch: Fitch-Margoliash and least-squares methods with molecular clock.

Пакет Phylip

- ✓ protdist — оценка эволюционных расстояний между белковыми последовательностями (вход — множественное выравнивание, выход — матрица попарных расстояний)
- ✓ dnadist — то же для нуклеотидных посл-тей
- ✓ protpars – оценка числа нуклеотидных мутаций для наблюдаемой частоты белковых замен (близкие последовательности)
- ✓ neighbor — реконструкция филогении по матрице расстояний методами NJ и UPGMA
- ✓ drawtree — рисование неукоренённого дерева
- ✓ drawgram — рисование кладограмм и филограмм

Bootstrapping with Phylip

- ✓ Надо выбрать Bootstrap options еще в protdist, выставить не менее 100 итераций, нечетное число в “Random number of seed”
- ✓ Затем, при запуске “Neighbor” снова выбрать “Bootstrap options” и выставить указанное в пред. пункте количество наборов данных и отметить “Compute a consensus tree”

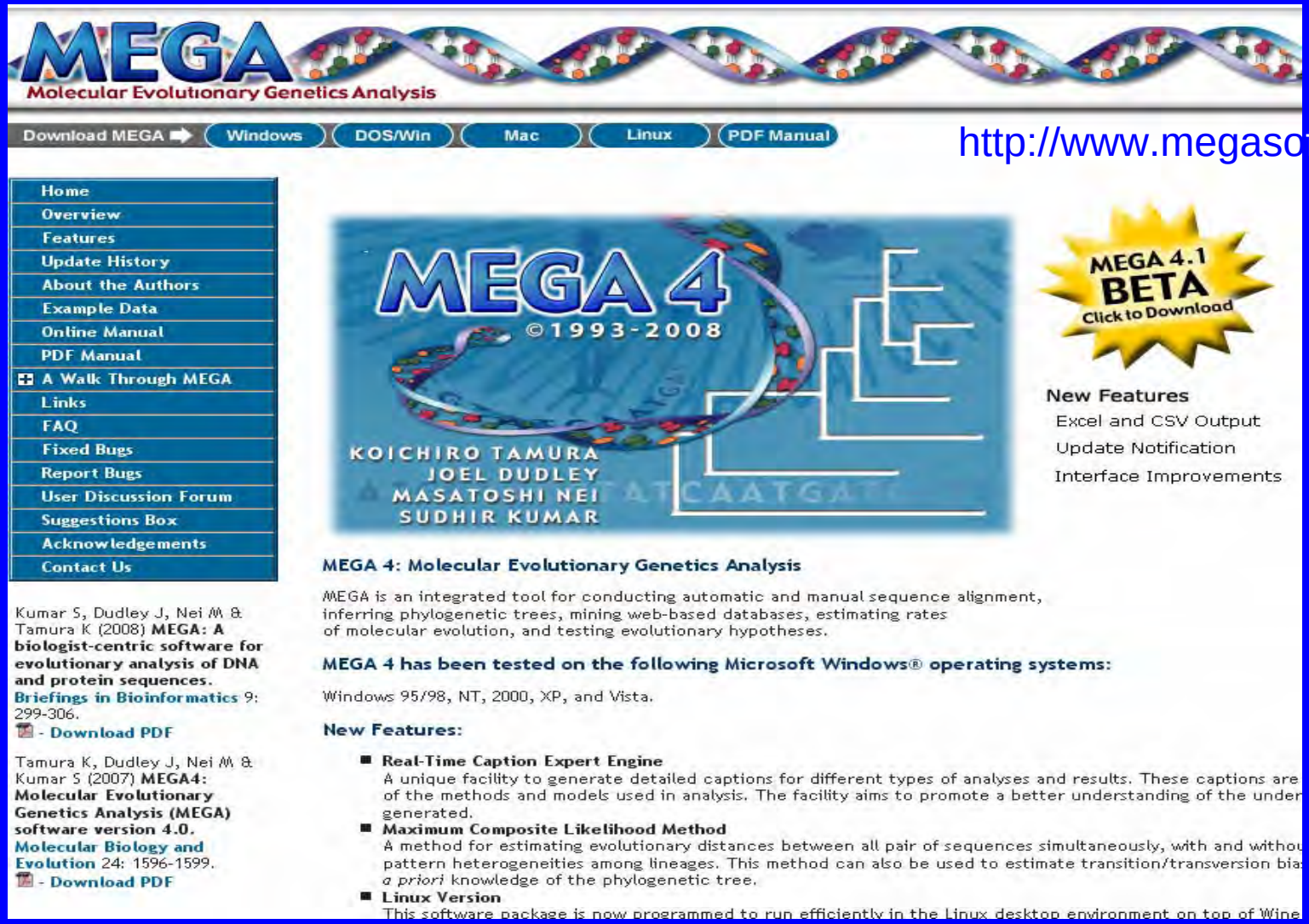
Общий план действий с пакетом Phylip

- ✓ Множественное выравнивание -> protdist
- ✓ Bootstrap options - ?
- ✓ Результат – или сразу, или URL по e-mail (предлагают продолжить с программой построения дерева)
- ✓ Выбрать Neighbor, Neighbor-Joining, Boostrap…?, outgroup – позиция outgroup в выравнивании
- ✓ Выход: outfile.consense – текстовый рисунок
- ✓ + outtree.consense – в Newick формате
- ✓ Представление дерева в графическом режиме одной из программ – Drawtree или Drawgram (без bootstraps) - или другими программами

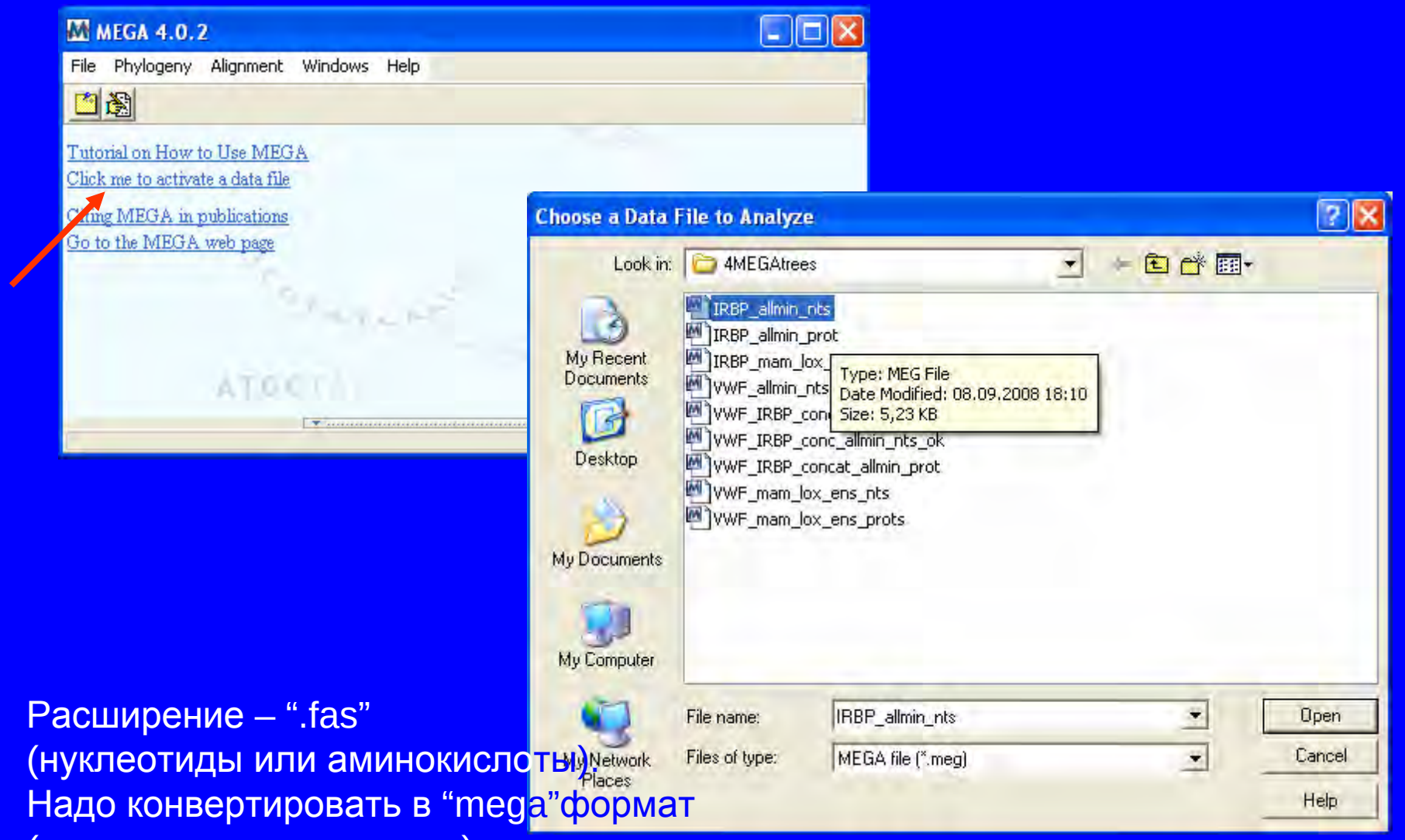
Outtree.consense

```
  12 Populations

Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.6a3


 Neighbor-joining method

 Negative branch lengths allowed


                 +Canis_2_fa
               +-2
             +-3 +Canis_3_fa
             ! !
     +------4 +Canis_1_fa
     !       !
     !       +Canis_4_fa
     !
  +-10       +Homo
  !  !    +--5
  !  ! +-8  +Pan
  !  ! ! !
  !  +-9 +-----Oryctolagu
  !    !
  !    ! +----Bos
  !    +-6
  !      +-----Sus
  !
  !    +-Rattus
  7----1
  !    +Mus
  !
  +----------------------------------------Danio


remember: (although rooted by outgroup) this is an unrooted tree!
```

MEGA: филогенетический анализ последовательностей

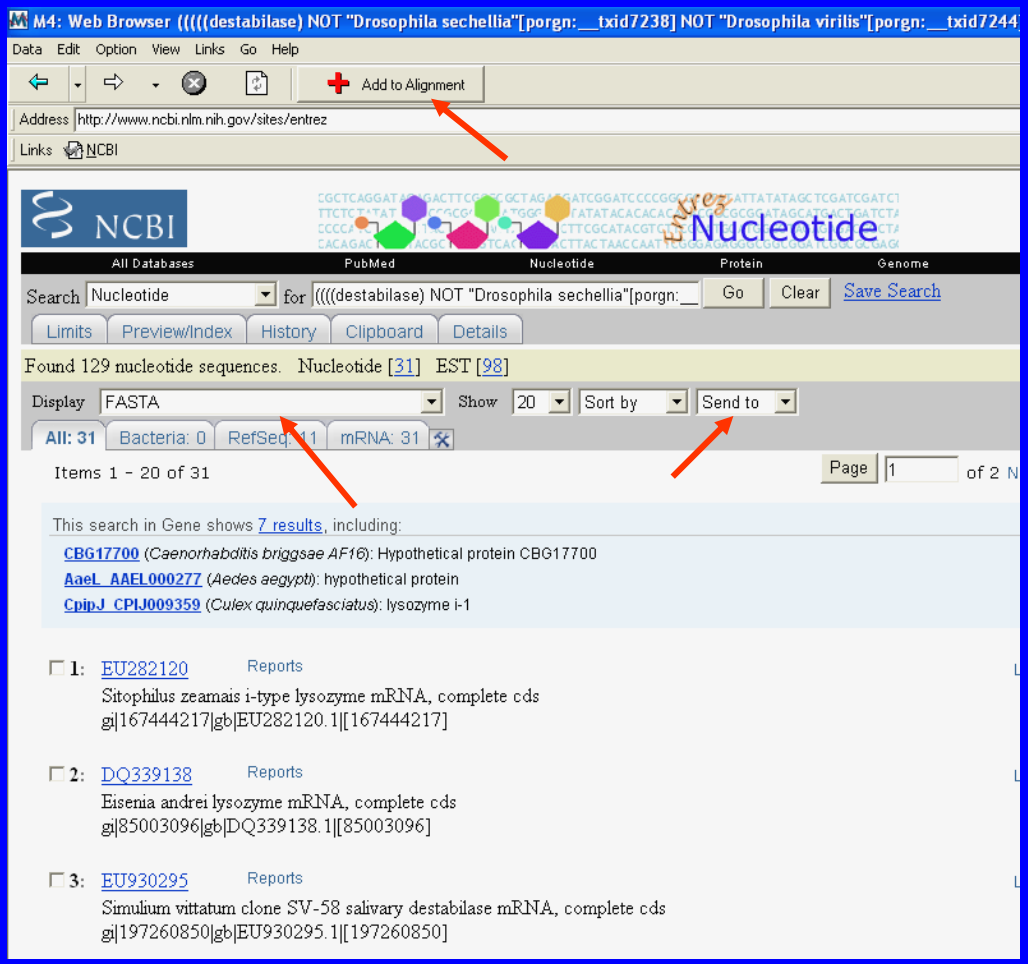


To start



Расширение – “.fas”
(нуклеотиды или аминокислоты).
Надо конвертировать в “mega”формат
(из текстового редактора)

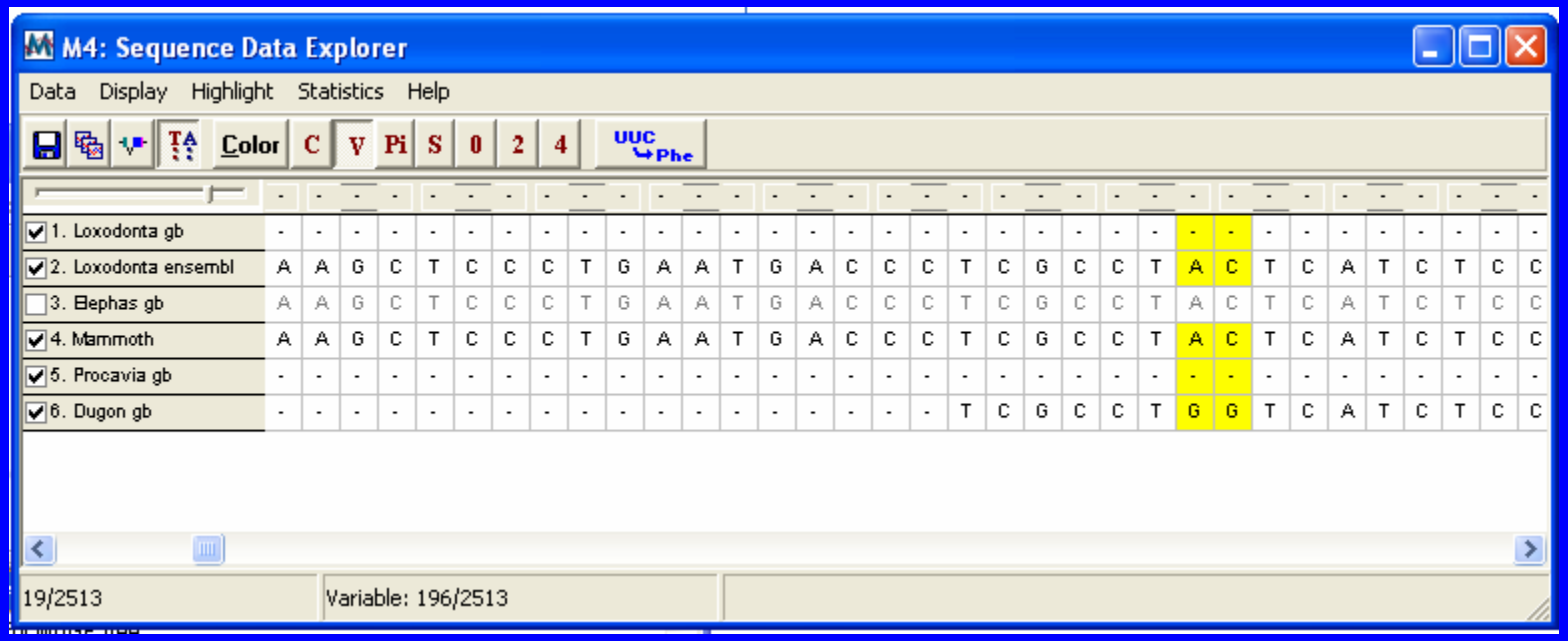
MEGA: Web Browser



Выбрать в FASTA или GenBank формат;
Send to Text;

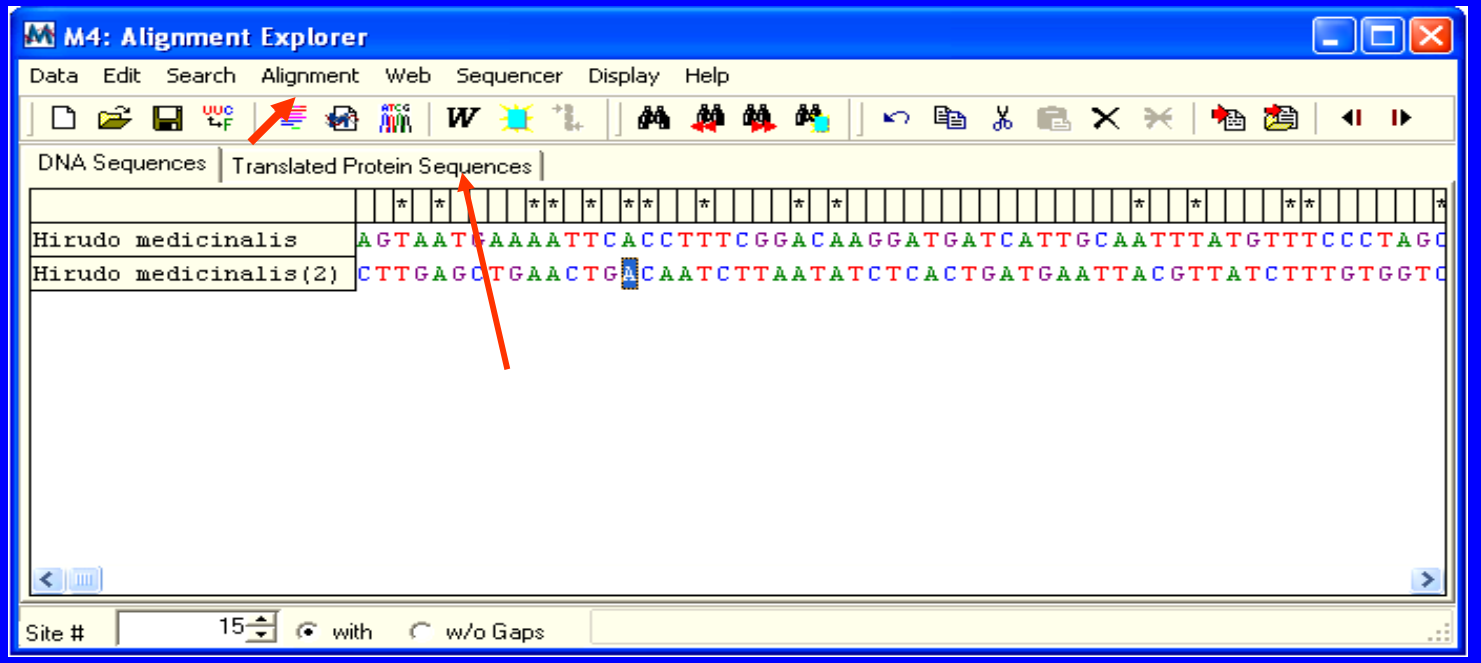
И затем “Add to alignment”

Sequence data explorer



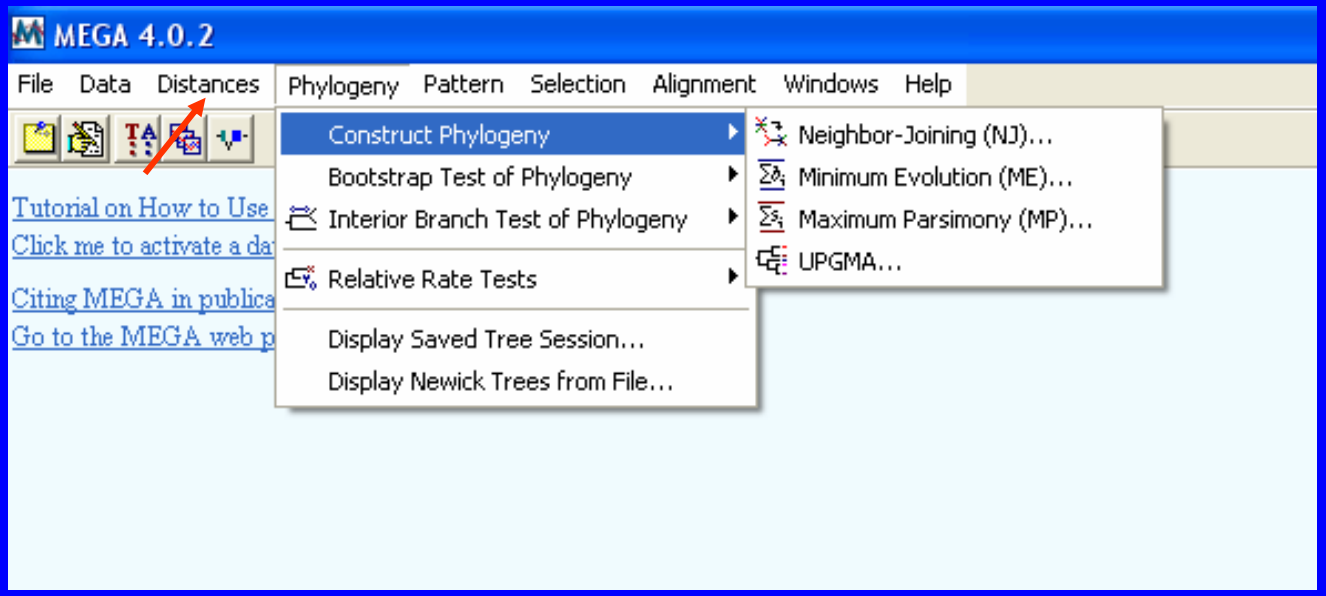
Можно анализировать подвыборку как по последовательностям, так и по позициям; считает статистику кодонов, вариабельные, консервативные сайты, синглетоны и сайты, информативные для парсимонии, 0-, 2- и 4-вырожденные сайты; можно также анализировать статистику белка; можно (не) анализировать отдельные домены

Построение выравниваний



Множественное выравнивание ClustalW;
выравнивание на уровне белка
А также – анализировать прямо хроматограммы с секвенаторов;
Выбирать последовательности из результатов бласта;
Искать мотивы в последовательностях и т.п.
МОЖНО РЕДАКТИРОВАТЬ ВЫРАВНИВАНИЯ!!!!

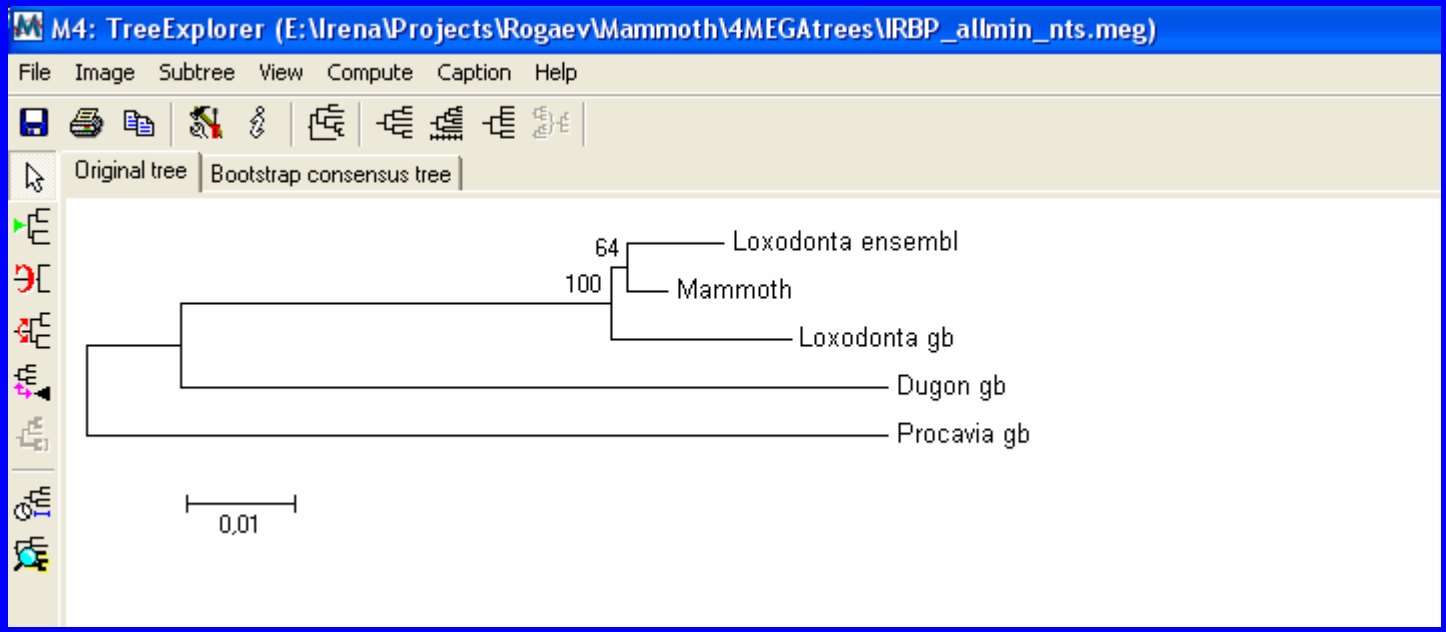
Построение деревьев



Distance Matrix Explorer – можно посмотреть попарные расстояния, ошибку их вычисления, вычислить всевозможные средние

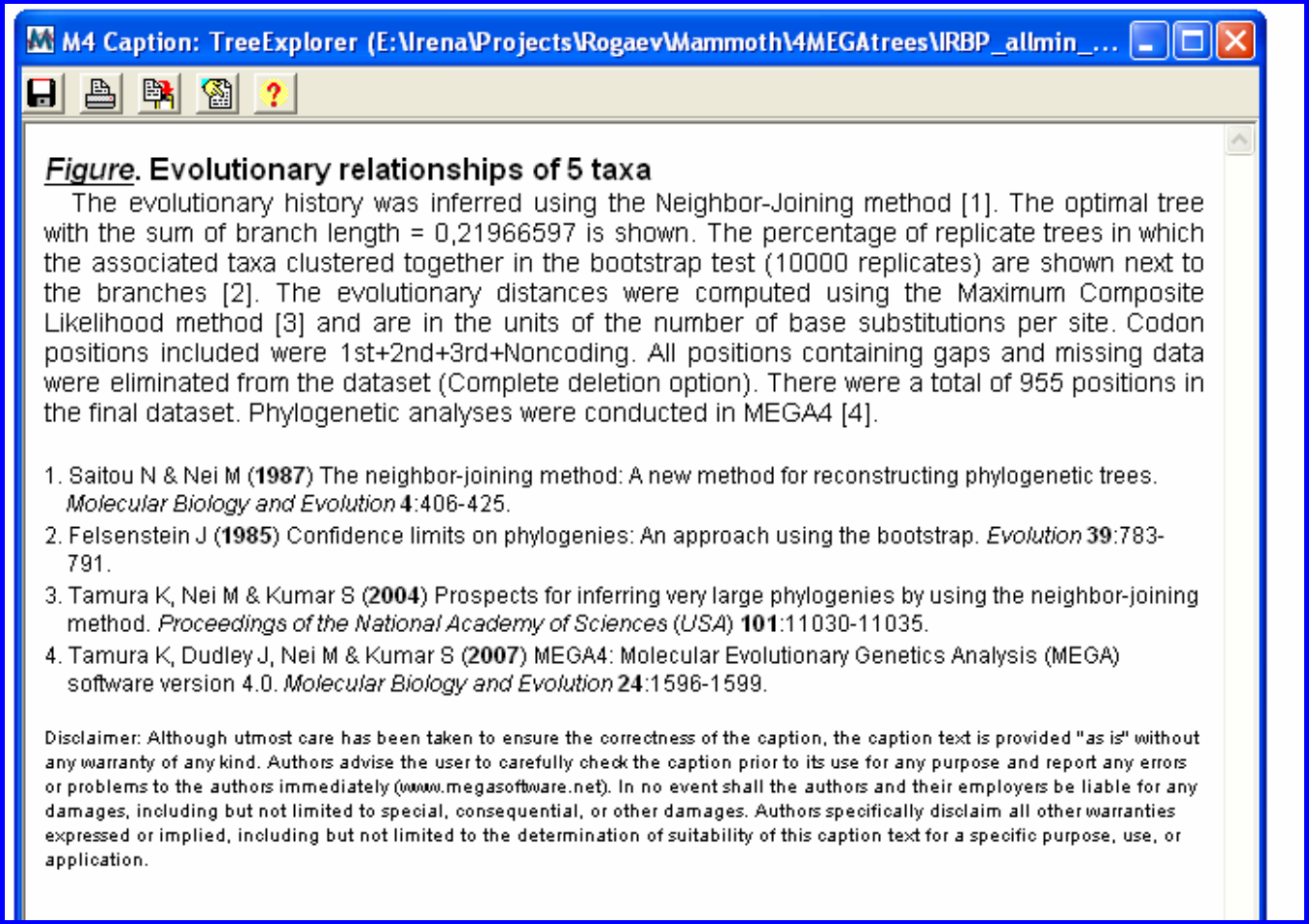
Деревья – bootstrap, тесты на относительную скорость эволюции, на внутренние ветви.
Пока нет Maximum Likelihood – будет в следующей версии
(если надо прямо сейчас; on-line – PhyML, http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/)

Tree Explorer



Можно нарисовать дерево в разных формах, редактировать дерево разнообразно; построить “консенсусное дерево”; оценить время расхождения при гипотезе молекулярных часов; оценить, какой нуклеотид или аминокислота в какой вершине и т.п.

Подписи к рисункам



Перечисление необходимых параметров, которые использовались, а также правильные ссылки