Algorithmische Bioinformatik

Distanzbasierte phylogenetische Algorithmen

Ulf Leser

Wissensmanagement in der Bioinformatik

Ziele dieser Vorlesung

- Verständnis von baum-artigen Abstandsmaßen
- Grenzen reduktionistischer Ansätze verstehen
- Konkrete Algorithmen kennenlernen

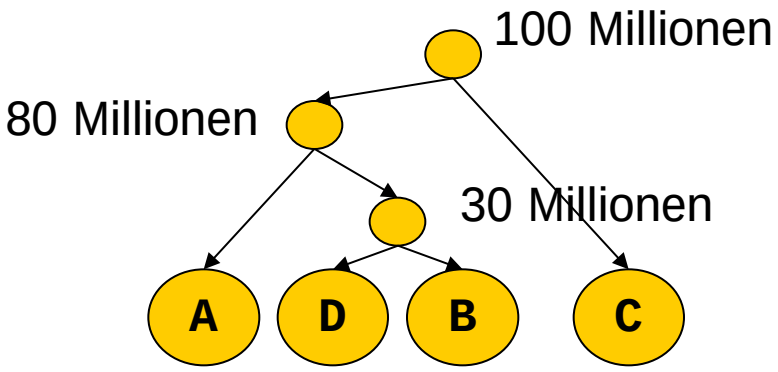
Inhalt dieser Vorlesung

- Ultrametriken
- Hierarchisches Clustering: UPGMA
- Additive Bäume und Neighbor Joining

Molecular Clock Assumption

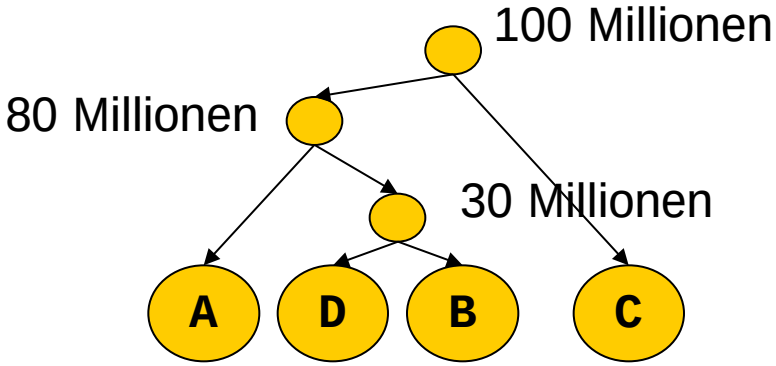
- Häufige Annahme: Molecular Clock
  - Mutationen setzen sich bzgl. der Zeit immer mit gleicher Wsk durch
  - Unabhängig von Teilbaum, Zeitpunkt, Ort und Art der Mutation
- Die ist hilfreich, aber falsch
  - Zeiten erhöhter Mutationshäufigkeit: Sonneneruptionen, ...
  - Zeiten erhöhten Selektionsdrucks: Klimaverschiebungen, ...
  - Teilbäume, die schneller mutieren: Abhängig vom Anpassungsdruck
  - Sequenzabschnitte, die unterschiedlich schnell mutieren: Coding versus non-coding Regions, House-Keeping genes,
  - ...

Folgerungen



- Wenn die Molecular Clock Assumption gilt
  - Ist die Menge an Veränderungen auf einer Kante proportional zu der verstrichenen Zeit
  - Damit haben Geschwister den gleichen Abstand zum Elternknoten
  - Damit ist Editabstand zweier Knoten proportional zur Summe der Editabstände beider Knoten zum kleinsten gemeinsamen Vorfahr
- Damit kann man für innere Knoten den Zeitpunkt der Speziation bestimmen

Ultrametriken



- Wenn man den Baum und die Zeitpunkte weiß, dann gilt
  - Zahlen auf Pfad von Wurzel zu Blatt nehmen strikt ab
  - Der Zeitpunkt der Aufspaltung ist ein Abstandsmaß für zwei Arten
    - Für X, Y sei d(X,Y) das Label des letzten gemeinsamen Vorfahren
    - Im Beispiel: d(A,B)=80, d(B,C)=100, d(A,D)=80
  - Das ist eine Metrik
    - $d(X,X)=0$, $d(X,Y)>0$, $d(X,Y)=d(Y,X)$, und $d(X,Y) \leq d(X,Z)+d(Z,Y)$
  - Es ist sogar eine Ultrametrik

Ultrametrik

- Definition
  Eine Ultrametrik ist eine Metrik für die gilt:
  $$d(a,c) \leq max(d(a,b), d(b,c))$$

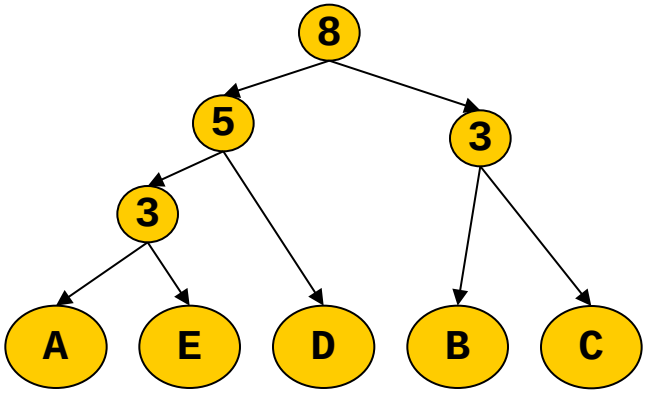
- Bemerkung
  - Für Metriken muss gelten: $d(a,c) \leq d(a,b)+d(b,c)$
  - Jede Ultrametrik ist eine Metrik, aber nicht umgekehrt

Ultrametrische Bäume

- Definition
  Sei T ein binärer, gewurzelter, ungeordneter Baum und D eine positive symmetrische Matrix mit n Zeilen und n Spalten und $\forall i$: D[i,i]=0. T heißt ultrametrischer Baum für D wenn gilt
  - *T hat n Blätter, beschriftet mit den Zeilen von D*
  - *Jeder innere Knoten von T ist mit einem Wert aus D beschriftet*
  - *Auf jedem Pfad von der Wurzel zu einem Blatt in T sind die Beschriftungen der inneren Knoten strikt abnehmend*
  - *Für alle Blätter i,j mit $i \neq j$ gilt: der letzte gemeinsame Vorfahr von i und j ist mit D[i,j] beschriftet*

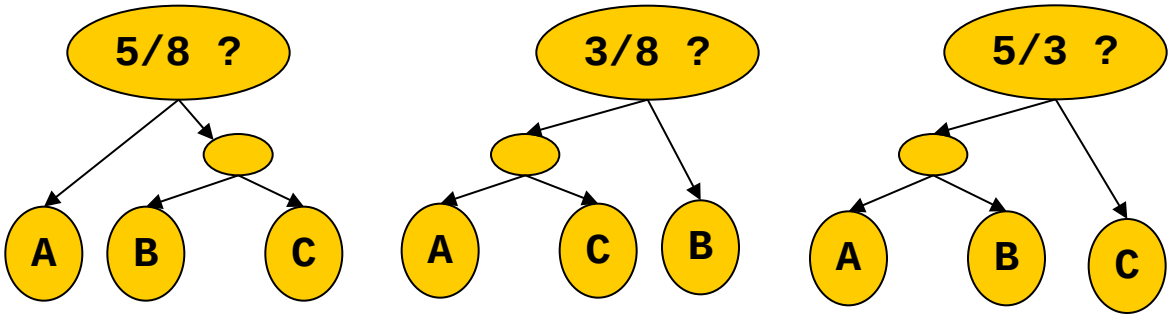
Beispiel

	A	B	C	D	E
A		8	8	5	3
B			3	8	8
C				8	8
D					5
E					



Geht das immer?

	A	B	C
A		8	5
B			3
C			



Überlegung

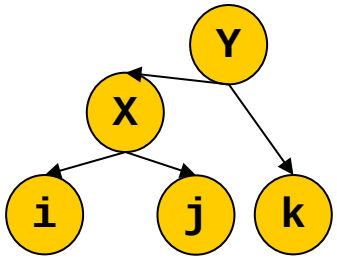
- Das kann auch nicht immer gehen
  - Matrix hat $(n^2-n)/2$ relevante Zellen
  - Baum hat nur n-1 innere Knoten
  - Eine Matrix, zu der man einen ultrametrischen Baum konstruieren kann, muss also Duplikate enthalten

Test auf Ultrametriken

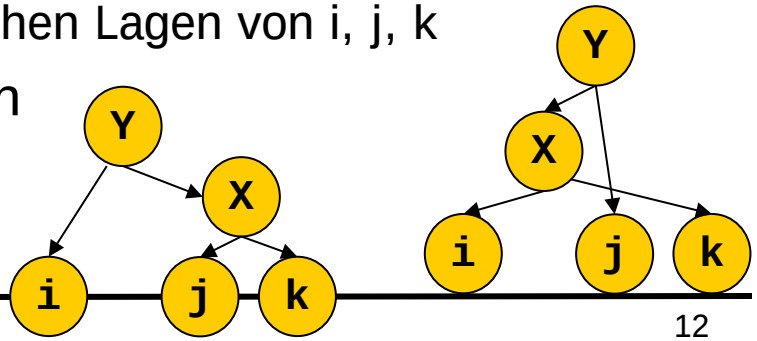
- Definition
  Eine positive symmetrische Matrix D mit n Spalten und Zeilen ist ultrametrisch, wenn für beliebige Zeilen i, j, k gilt, dass das Maximum von D[i,j], D[j,k] und D[i,k] genau zweimal vorkommt
- Bemerkung
  - Also entweder
    - D[i,j]=D[j,k] und D[i,j]>D[i,k]
    - D[i,j]=D[i,k] und D[i,j]>D[j,k]
    - D[j,k]=D[i,k] und D[j,k]>D[i,j]
  - Eine Abstandsmatrix von Objekten ist also ultrametrisch, wenn das Abstandsmaß eine Ultrametrik ist

Von der Matrix zum Baum und zurück

- Theorem
  Eine symmetrische Matrix D hat einen ultrametrischen Baum T gdw. D ultrametrisch ist.
- Beweis
  - (1) Nehmen wir erst an, dass zu D ein ultrametrischer Baum T existiert. Nehmen wir an, dass i, j, k in T so liegen:

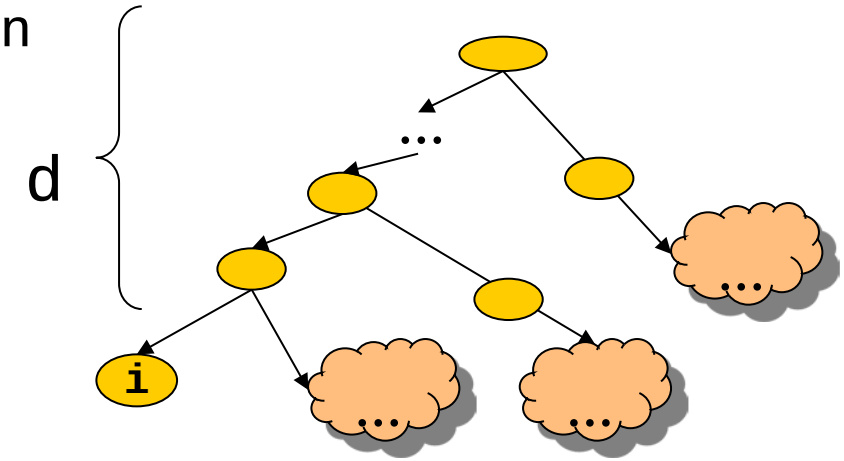


  - Dann gilt offensichtlich D[i,k]=D[j,k]=Y und D[i,k]>D[i,j]=X
    - Dito für die zwei anderen möglichen Lagen von i, j, k
  - Das gilt für alle Tripel von Knoten
  - Also ist D ultrametrisch



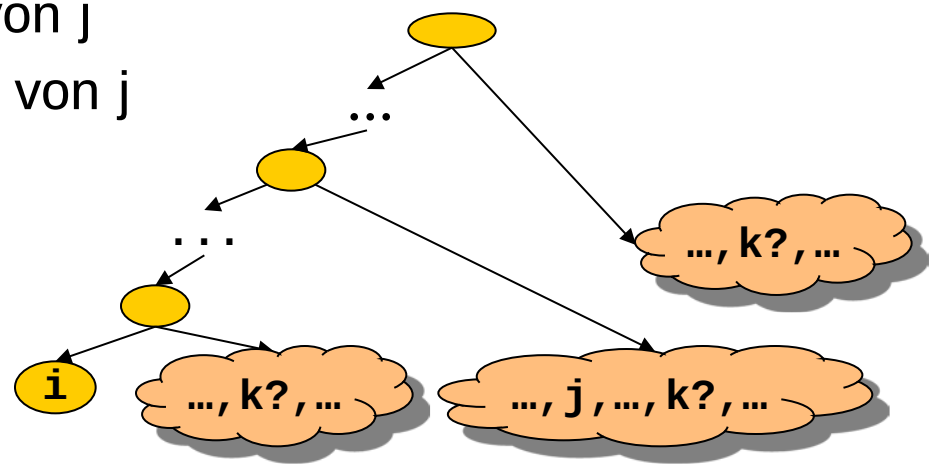
Beweis Gegenrichtung

- (2) Nehmen wir an, dass D ultrametrisch ist. Wir konstruieren einen ultrametrischen Baum T aus D
  - Betrachten wir eine beliebige Zeile i. Diese entspricht Blatt i in T
  - i hat letzte gemeinsame Vorfahren mit allen n-1 anderen Blättern
  - Diese Vorfahren müssen mit den Werten D[i,x], x≠i, in aufsteigender Reihenfolge beschriftet werden
  - Der Pfad von i zur Wurzel muss nicht n-1 Knoten enthalten, denn die letzten gemeinsamen Vorfahren mit verschiedenen anderen Knoten sind oft identisch. Nehmen wir an, dass es auf dem Pfad d verschiedene Werte gibt (d≤n-1)



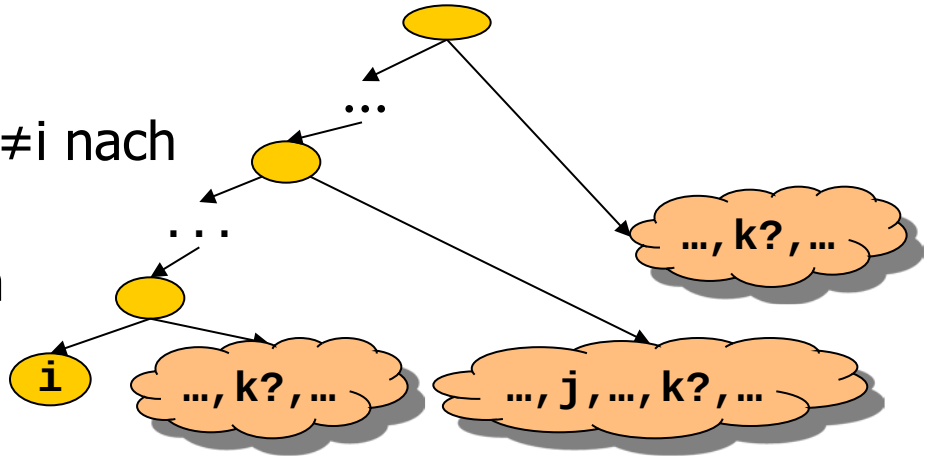
Beweis Gegenrichtung -2-

- Die Menge aller Blätter (ohne i) zerfällt damit in d Klassen
  - Alle Blätter einer Klasse befinden sich in einem Unterbaum bzgl. genau eines Knoten auf dem Pfad von i zur Wurzel
  - Alle Blätter einer Klasse haben den selben Abstand zu i
- Betrachten wir ein Blatt $j \neq i$ und ein beliebiges anderes Blatt $k \neq i$. Drei Möglichkeiten
  - k liegt in der selben Klasse wie j
  - k liegt in einer Klasse „links“ von j
  - k liegt in einer Klasse „rechts“ von j



Beweis Gegenrichtung -3-

- Fall 1: j und k in der selben Klasse
  - Das gilt, wenn D[i,j]=D[i,k] und D[j,k]<D[i,j]
- Fall 2: k liegt links von j
  - Das gilt, wenn D[i,j]=D[k,j] und D[i,k]<D[i,j]
- Fall 3: k liegt rechts von j
  - Das gilt, wenn D[i,k]=D[j,k] und D[i,j]<D[j,k]
- qed.
- Konstruktion
  - i beliebig wählen, alle Knoten ≠i nach Abstand zu i klassifizieren
  - Strang von i zur Wurzel bauen
  - Jede Klassen rekursiv lösen



Folgerung

- Der Beweis ist konstruktiv; man kann auf diese Weise einen ultrametrischen Baum bauen
- Das wird immer derselbe sein, egal in welcher Reihenfolge man die Blätter wählt
- Theorem
  Sei D eine ultrametrische Matrix. Dann gibt es genau einen ultrametrischen Baum T für D.
- Beweis
  – Durch Konstruktion; Literatur

Distanzbasierte Algorithmen

- Algorithmen zur Berechnung von Stammbäumen, die nur die Distanzmatrix benutzen, nennt man distanzbasiert
  - Die Geschichte einzelner „Sites“ (Basen, Sequenzabschnitte etc.) wird nicht berücksichtigt
  - Sequenzen an inneren Knoten können nicht rekonstruiert werden
- Alternative: Merkmalsbasierte Verfahren
  - Beachten jede einzelne Site (Basen)
  - Vertreter: Perfect Phylogeny, Maximum Parsimony, ...

Inhalt dieser Vorlesung

- Ultrametriken
- Hierarchisches Clustering: UPGMA
- Additive Bäume und Neighbor Joining

UPGMA - Hierarchisches Clustering

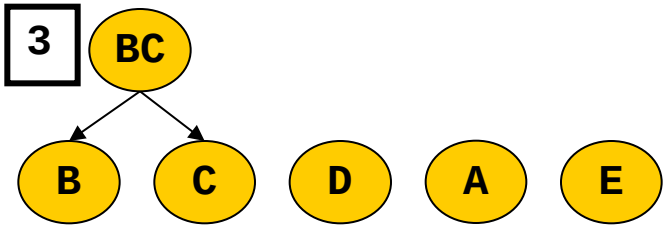
- UPGMA
  - „Unweighted pair group method with arithmetic mean“
  - Anderer Name: Hierarchisches Clustering
- Theorem
  Wenn eine Matrix ultrametrisch ist, berechnet UPGMA den dazu gehörenden ultrametrischen Baum.
- Beweis
  - Literatur
- Bemerkung
  - Wenn eine Matrix nicht ultrametrisch ist, berechnet UPGMA auch einen Baum – aber wie gut ist der?
  - Die Molecular Clock Assumption ist also Voraussetzung für die (korrekte) Anwendung von UPGMA

UPGMA Algorithmus

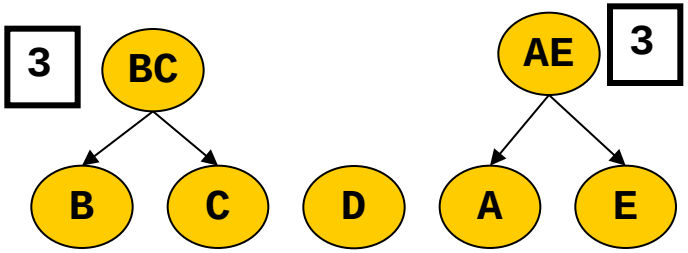
- Gegeben: Distanzmatrix D
- Erzeuge ein „Baumgerüst“ mit n Blättern
- Loop
  - Wähle den kleinsten Wert D[i,j] Wert der Matrix und verbinde die Knoten i und j durch einen neuen Knoten „ij“ mit Beschriftung D[i,j] und Kanten zu i und zu j
    - Anfangs sind i und j Blätter, später können es auch innere Knoten sein
  - Lösche Zeilen und Spalten i und j aus D
  - Füge in D eine Zeile und eine Spalte „ij“ hinzu mit D[ij,k] = (D[i,k]+D[j,k])/2
- Bis D nur noch 2 Spalten/Zeilen hat

Beispiel

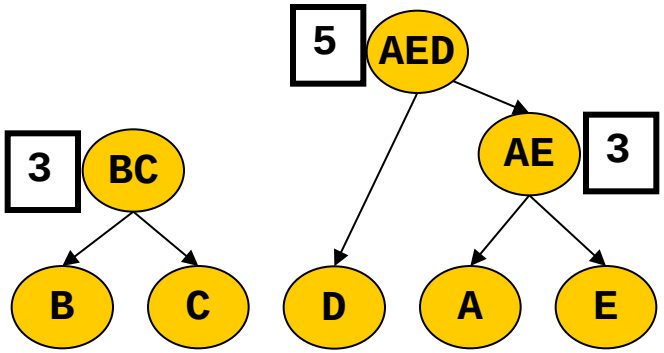
	B	C	D	E
A	8	8	5	3
B		3	8	8
C			8	8
D				5



	BC	D	E
A	8	5	3
BC		8	8
D			5

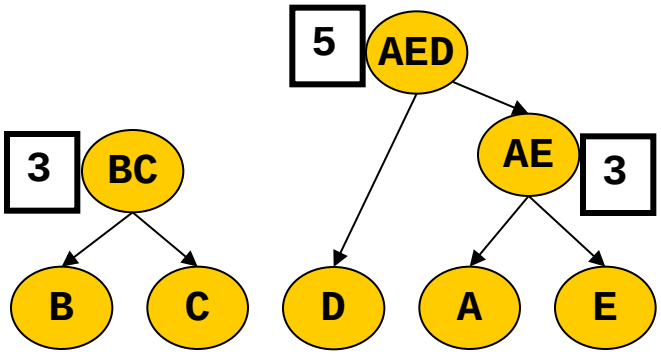


	BC	D
AE	8	5
BC		8

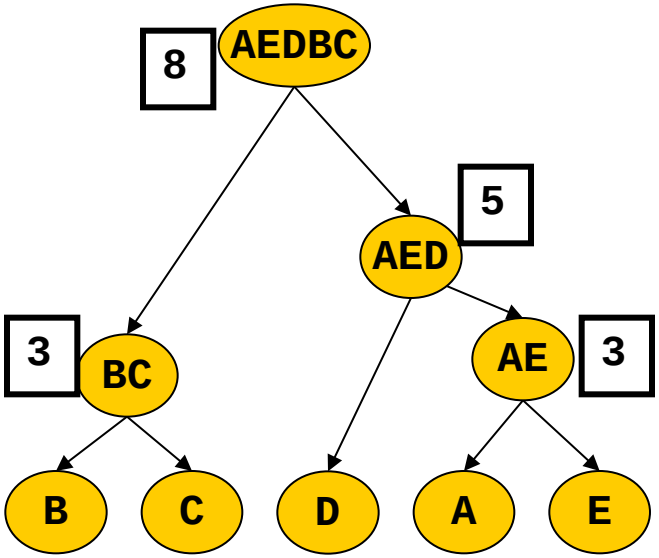


Beispiel

	AE	BC	D
AE		8	5
BC			8



	BC
AED	8

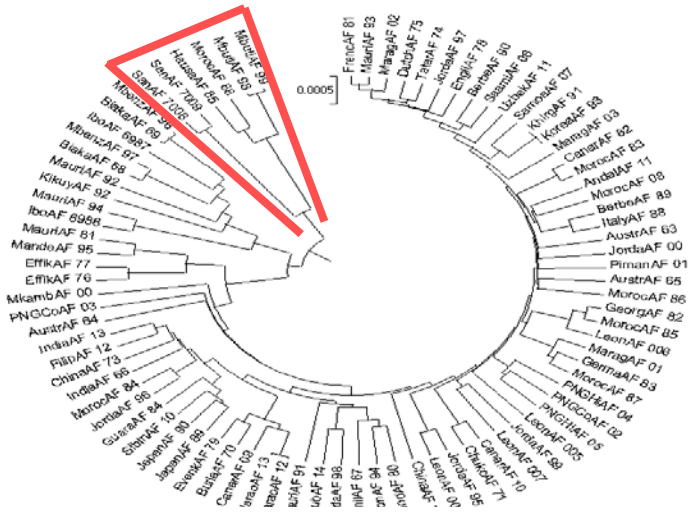


Kontrolle

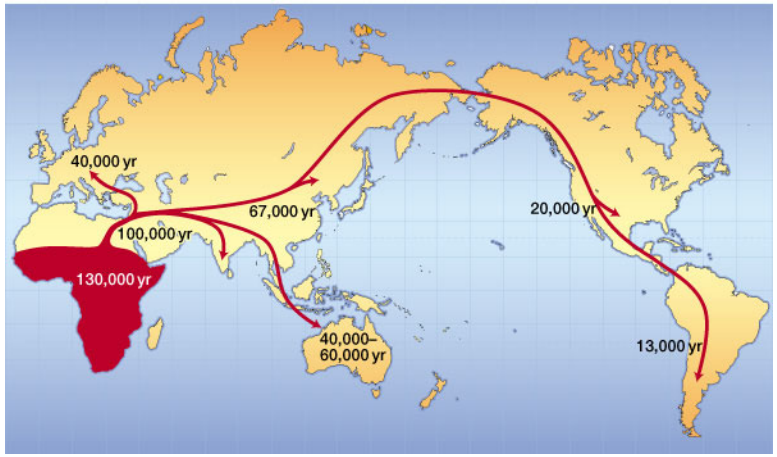
	B	C	D	E
A	8	8	5	3
B		3	8	8
C			8	8
D				5

Anwendungsbeispiel

- Sequenzierung der mitochondrialer DNA (16 KB) von 86 geographisch verteilt lebenden Personen
- Ergebnis: Mitochondriale DNA scheint mit molekularen Uhr zu mutieren; Divergenz ist ca. 1,7E-8 pro Base und Jahr

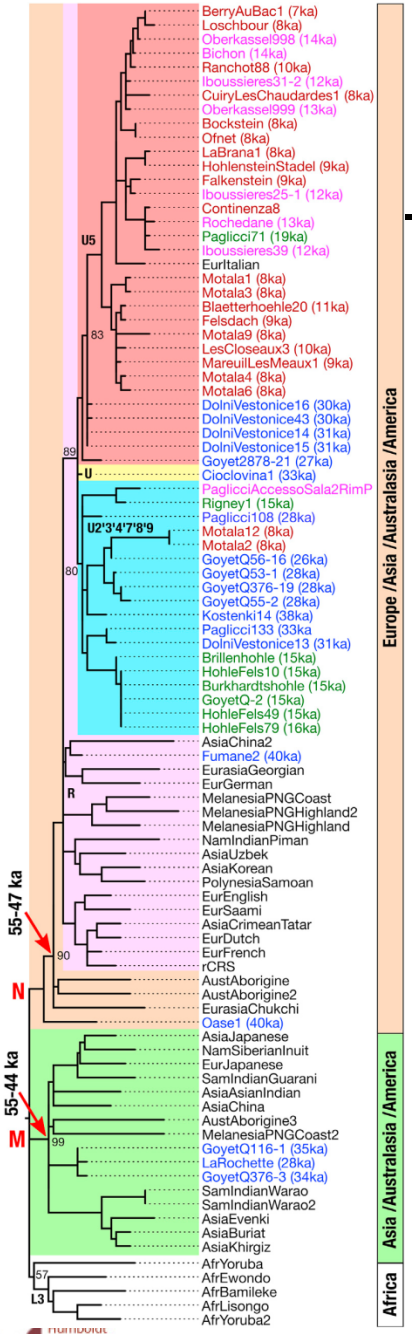


Quelle:
http://www.genpat.uu.se/mtDB/sequences.html
Methode: UPGMA



Quelle:
Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. & Gyllensten, U.
Nature 408: 708-713 (2000)

Aktuelle Variante



- 55 mitochondriale DNA aus Proben aus Europa bis zu 35.000 Jahre alt
- Vergleich mit 311 aktuellen 66 prähistorischen Proben Weltweit
- Bayesian phylogenetic inference
- Resultat: Nur eine Einwanderungswelle

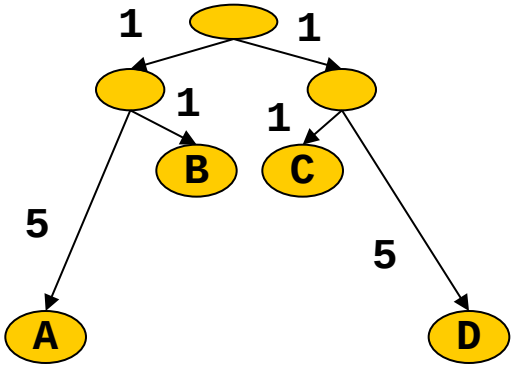
- Posth et al., Pleistocene Mitochondrial Genomes Suggest a Single Major Dispersal of Non-Africans and a Late Glacial Population Turnover in Europe, Current Biology (2016)

Komplexität

- n Durchläufe
  - In jedem Durchlauf wird die Matrix um eine Zeile/Spalte kleiner
- Pro Durchlauf: O(n) Berechnungen
  - 2 Spalten / Zeilen löschen (nicht durch Matrix kopieren!)
  - O(n) neue Einträge in der Matrix
- Also $O(n^2)$?
- Wir müssen noch kleinsten Eintrag in der Matrix zu finden
- Mit geschickten Priority Queues: $O(n*(n*\log(n)+n)) = O(n^2\log(n))$
- Es gibt $O(n^2)$ Algorithmen zur Rekonstruktion des Baumes aus einer ultrametrischen Matrix
  - Siehe Gusfield, Errata Webseite

Ultrametriken und Sequenzabstände

- Reale Abstandsmatrizen sind selten ultrametrisch
  - Molecular Clock Assumption gilt idR nicht
  - Editabständen der Sequenzen sind nur Annäherungen an wahren evolutionären Abstand (siehe auch Jukes-Cantor Modell)
  - Sequenzen haben Fehler
- Bei realen Bäumen sind Mutationen auf den Kanten zu Geschwistern nicht gleich verteilt
- Beispiel

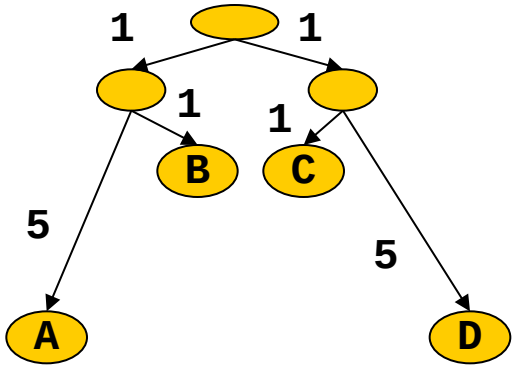


	A	B	C	D
A		6	8	12
B			4	8
C				6
D				

Wo UPGMA irrt

Der echte Baum

	B	C	D
A	6	8	12
B		4	8
C			6
D			

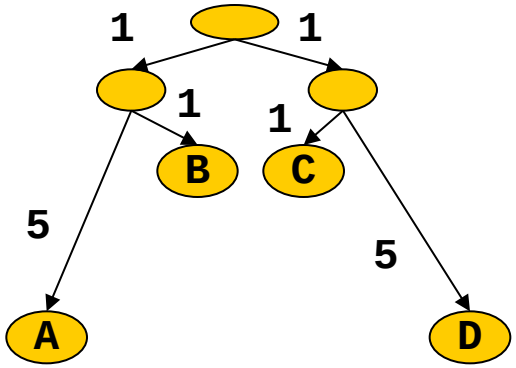


Was erzeugt UPGMA?

Wo UPGMA irrt

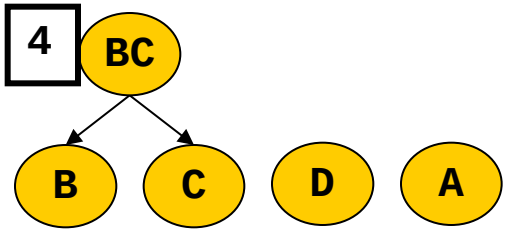
Der echte Baum

	B	C	D
A	6	8	12
B		4	8
C			6
D			



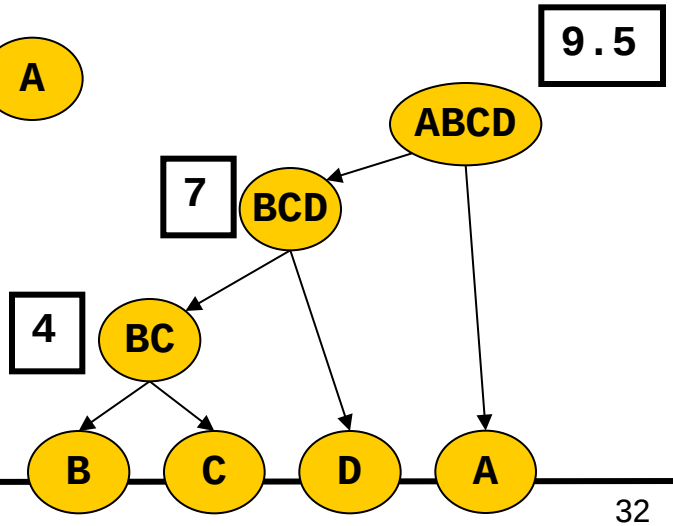
Was erzeugt UPGMA?

	B	C	D
A	6	8	12
B		4	8
C			6



	A	BC	D
A		7	12
BC			7

	A
BCD	9.5

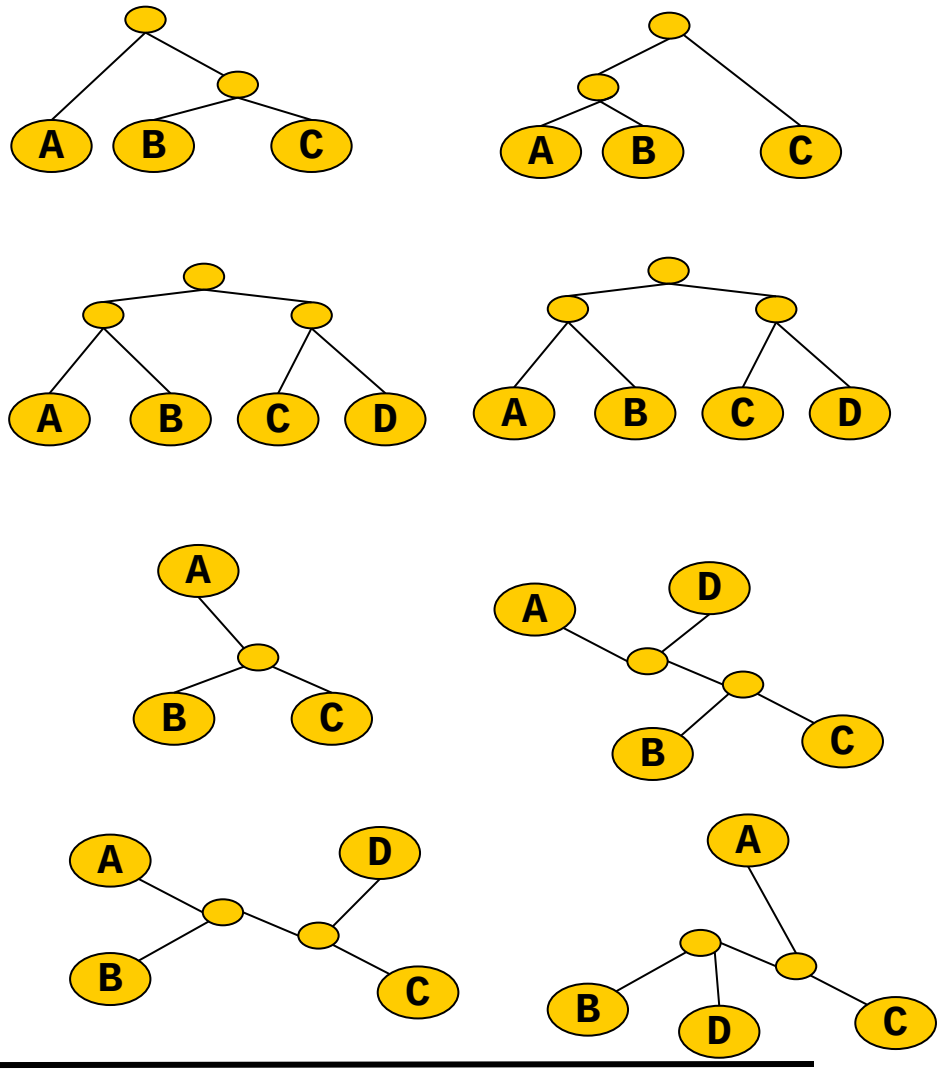


Inhalt dieser Vorlesung

- Ultrametriken
- Hierarchisches Clustering: UPGMA
- Additive Bäume und Neighbor Joining

Einschub: Ungewurzelte Bäume

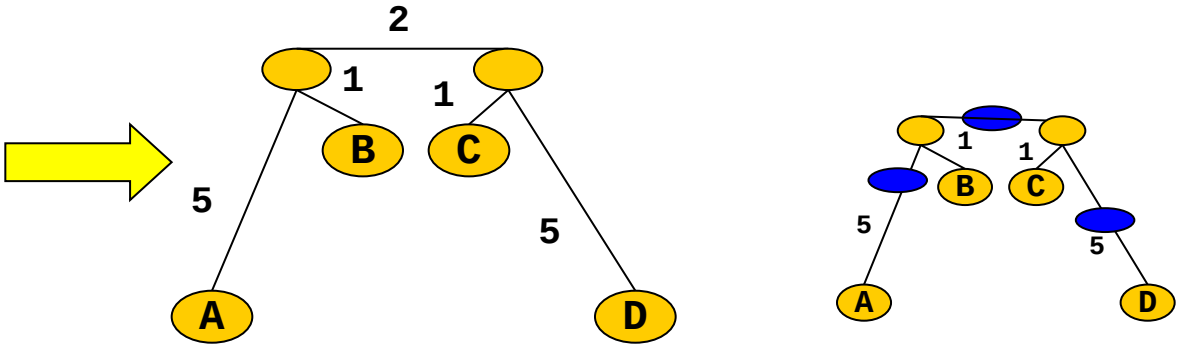
- Ein binärer, ungerichteter, gewurzelter Baum ist ein zyklenfreier Graph, in dem ein Knoten Grad zwei hat (Wurzel) und alle anderen Grad drei (innere Knoten) oder Grad eins (Blätter)
- Ein binärer, ungerichteter, ungewurzelter Baum ist ein zyklenfreier Graph, in dem alle Knoten Grad drei oder Grad eins haben



Additive Bäume

- Problem: Gegeben D, finde einen binären Baum so, dass die Summe der Kantenlabel auf dem Pfad von jedem Knoten i zu jedem Knoten j gleich D[i,j] ist
- Da es nur Abstände zwischen Blättern gibt, kann die Wurzel nicht identifiziert werden – Berechnung eines ungewurzelten Baums
  - Beide Kanten zur Wurzel sind in allen Blattdistanzen entweder zusammen oder gar nicht
  - Können nicht durch Differenzbildung identifiziert werden

	B	C	D
A	6	8	12
B		4	8
C			6
D			



Formal

- Definition
  Sei D eine positive symmetrische Matrix mit n Spalten und Zeilen und ∀i: D[i,i]=0. Ein binärer, ungeordneter und ungewurzelter Baum T heißt additiver Baum für D gdw.
  - *T hat n Blätter, beschriftet mit den Zeilen von D*
  - *Innere Knoten in T sind nicht beschriftet, Kanten sind beschriftet*
  - *Für jedes Paar i,j ist D[i,j] gleich der Summe der Kantenlabel auf dem (eindeutigen) Pfad von i nach j*
- Bemerkung
  - Wenn eine Matrix einen additiven Baum besitzt, so nennen wir die Matrix additiv

Additive Bäume versus Ultrametriken

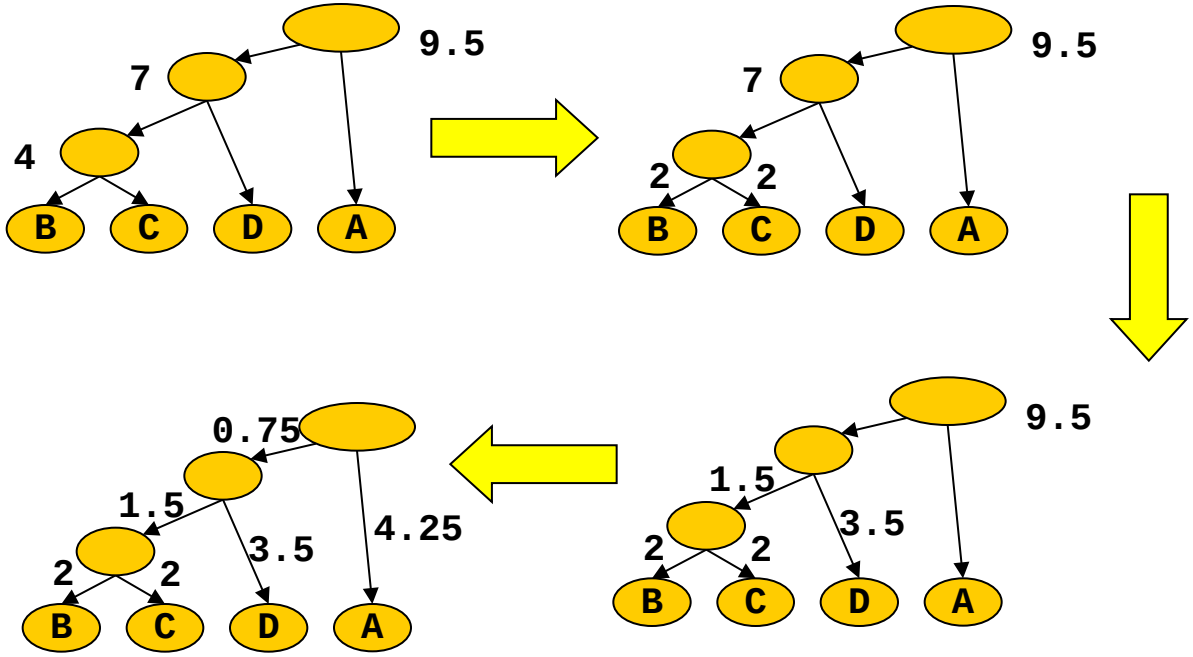
- Ultrametriken: Label auf den inneren Knoten
  - Abstände korrelieren mit Speziationszeitpunkten (per Annahme)
  - Kanten zu Kindern sind immer gleich lang
  - Label sind als Werte in der Matrix enthalten
- Additive Bäume: Label auf den Kanten
  - Es werden keine Speziationszeitpunkte berechnet
  - Kanten zu Kindern können unterschiedlich lang sein
  - Die Werte in der Matrix sind i.A. keine Label im Baum
- Jede ultrametrische Matrix hat einen additiven Baum, aber nicht umgekehrt

Von ultrametrischen zu additiven Bäumen

	B	C	D
A	6	8	12
B		4	8
C			6
D			

?

	B	C	D
A	9.5	9.5	9.5
B		4	7
C			7
D			



Matrizen und additive Bäume

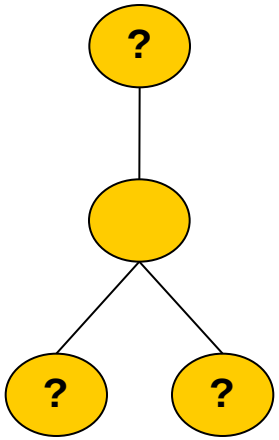
- Fragen
  - Existiert zu jeder Matrix ein additiver Baum?
  - Wann ist eine Matrix additiv?
  - Wie findet man einen additiven Baum zu einer additiven Matrix?

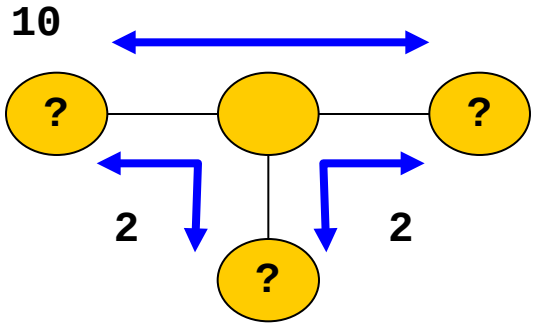
Matrizen und additive Bäume

- Fragen
  - Existiert zu jeder Matrix ein additiver Baum?

- Gegenbeispiel
  - Es gibt nur einen ungewurzelten Baum für drei Spezies

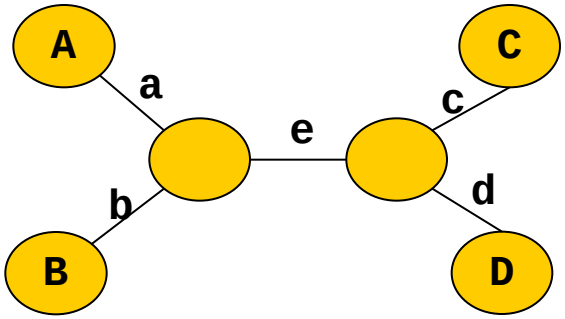
	A	B	C
A		10	2
B			2





Beobachtung

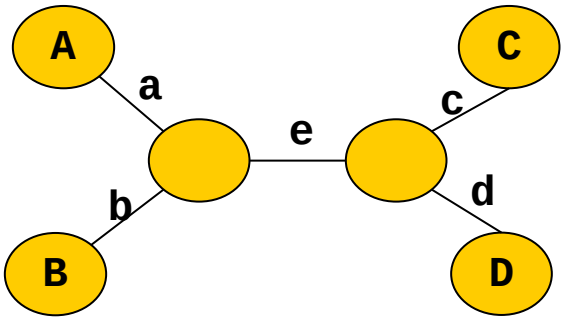
- Fragen
  - Wann ist eine Matrix additiv?



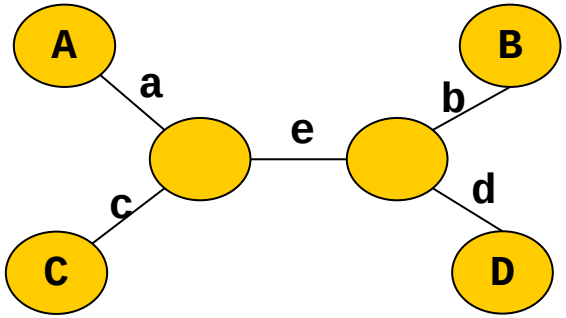
- Betrachten wir beliebige vier Blätter A, B, C, D
- In welchem Verhältnis stehen deren Abstände?
  - Die 6 Abstände setzen sich aus 5 Kantenlabeln zusammen
- Beobachtung
  - $D(A,B)+D(C,D) \leq D(A,D)+D(B,C) = D(A,C)+D(B,D)$
  - Denn: $(a+b) + (c+d) \leq (a+e+d) + (b+e+c) = (a+e+c) + (b+e+d)$
- Aber die Knoten können auch anders angeordnet sein

4-Punkt Bedingung

- Theorem
  Eine Matrix D ist additiv gdw. für alle Quadrupel A,B,C,D die 4-Punkt Bedingung gilt:
  $D(A,B)+D(C,D) \leq max(D(A,D)+D(B,C) , D(A,C)+D(B,D))$
- Beweis
  - => Alle drei Topologien für vier Blätter ausprobieren
  - <= Literatur



$(a+b) + (c+d) \leq max((a+e+d) + (b+e+c), (a+e+c) + (b+e+d))$



$(a+e+b) + (c+e+d) \leq max((a+e+d) + (b+e+c), (a+c) + (b+d))$

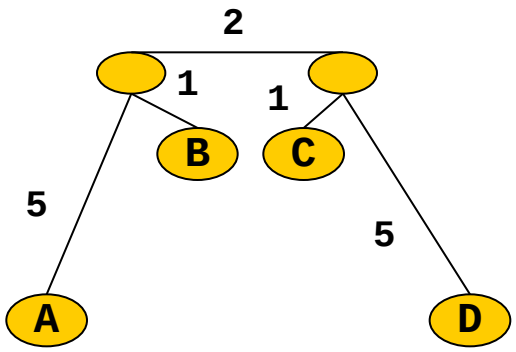
Rekonstruktion

- Fragen
  - Wie findet man einen additiven Baum zu einer additiven Matrix?
- Verfahren von Warnow
  - T. Warnow. Tree compatibility and inferring evolutionary history. Journal of Algorithmics, 16:388–407, 1994.
  - Läuft in $O(n^2)$
  - Startet mit beliebigem Paar und fügt iterativ Blätter zu einem wachsenden Baum
  - Über die 4-Punkt Bedingung kann die Position des neuen Blatts immer genau bestimmt werden
- Aber: Echte Matrizen sind praktisch nie additiv
  - Dann funktioniert Warnow‘s Algorithmus nicht

Neighbor-Joining

- Findet additiven Baum zu einer (fast) additiven Matrix
- Auch ein hierarchisches Clusterverfahren
  - Erzeugt einen binären Baum ohne Wurzel
  - Beginne mit so vielen Clustern wie Blättern
  - Wähle zwei Cluster, die garantiert Nachbarn im Baum werden
    - Nach einem bestimmtem Kriterium
  - Verschmelze diese Cluster und verbinde Knoten im Baum
  - Iteriere, bis nur noch ein Cluster vorhanden ist
- Unterschiede zu UPGMA
  - UPGMA wählt Cluster zur Verschmelzung nur nach Nähe zueinander
  - Neighbor Joining wählt Cluster nach der Nähe zueinander und dem Abstand zu anderen Clustern aus
- Beweise sehr schön in [VSL02]

Intuition



- B,C
  - Nahe beieinander
  - Aber auch relativ nahe an allen anderen
  - Kein starkes Signal, dass die sofort zusammengehören
- A,B
  - Nicht ganz so nahe beieinander
  - Aber A ist weit weg von allen anderen – B ist noch am nächsten

Verfahren

- Bilde aus jeder Zeile einen Cluster
- Berechne für jeden Cluster i den durchschnittlichen Abstand u_i zu allen anderen Clustern

$$u_i = \sum_{k \neq i} \frac{D[i,k]}{n-2}$$

  – n-2: Für durchschnitt. Abstand zu allen Knoten außer dem gewählten Paar (das sind n-2 viele)
- Suche das Clusterpaar (i,j), für das gilt

$$D[i,j] - u_i - u_j \overset{!}{=} \min$$

  – Möglich nahe beieinander
  – Möglichst weit weg von allen anderen

Wählt auf jeden Fall ein Nachbarpaar

Verfahren 2

- Erzeuge Cluster ij mit Kanten zu i und j mit Kantenlängen

$$d(i,ij) = \frac{D[i,j] + u_i - u_j}{2} \qquad d(j,ij) = \frac{D[i,j] + u_j - u_i}{2}$$

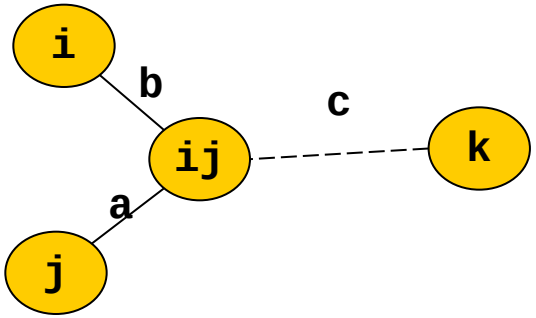
- Erzeuge neuen Clusterknoten ij mit Abständen zu anderen Clustern

$$D[k,ij] = \frac{D[i,k] + D[k,j] - D[i,j]}{2}$$

- Lösche Cluster i und j
- Iteriere, solange mehr als ein Cluster existiert

Intuition

- Kantenbeschriftungen
  - Wir kennen x=a+c
    (aus der Matrix)
  - Wir kennen y=b+c
    (aus den mittleren Abständen; u_j)
  - Genauso z=a+b
    (aus den mittleren Abständen; u_i)
  - Es ergibt sich c = (x+y-z)/2 = (a+c+b+c-a-b)/2 = (2c)/2 = c
- c ist der neue Wert in der Matrix – Abstand k zu ij



Beispiel (hier scheiterte UPGMA)

	A	B	C	D
A		6	8	12
B			4	8
C				6
u_i	13	9	9	13

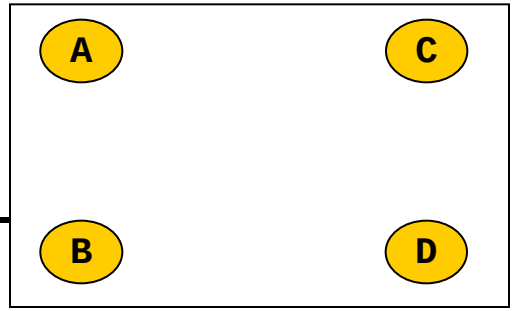
NJ-Abstände der Clusterpaare

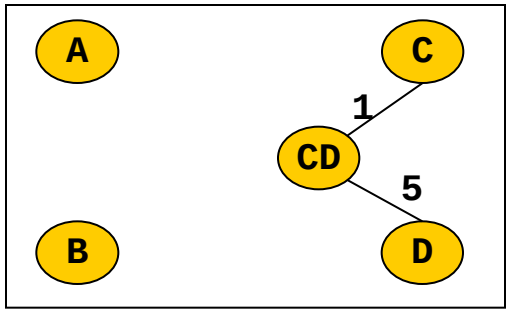
	B	C	D
A	-16	-14	-14
B		-14	-14
C			-16

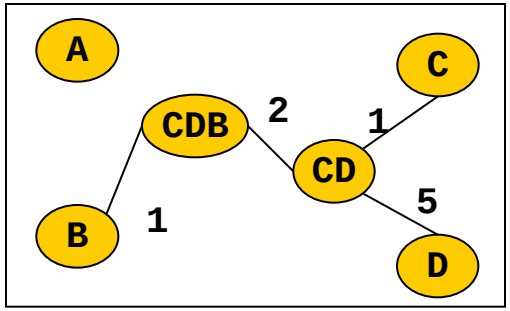
	A	B	CD
A		6	7
B			3
u_i	13	9	10

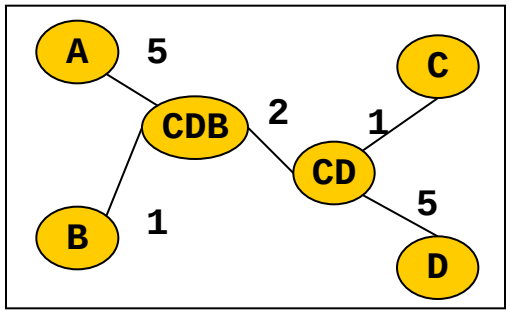
	B	CD
A	-16	-16
B		-16

	A	BCD
A		5

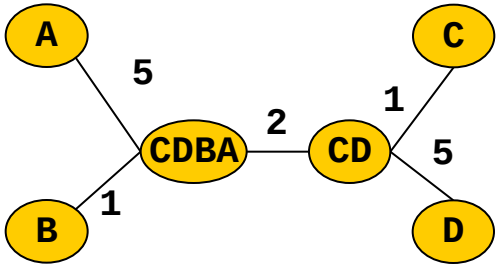


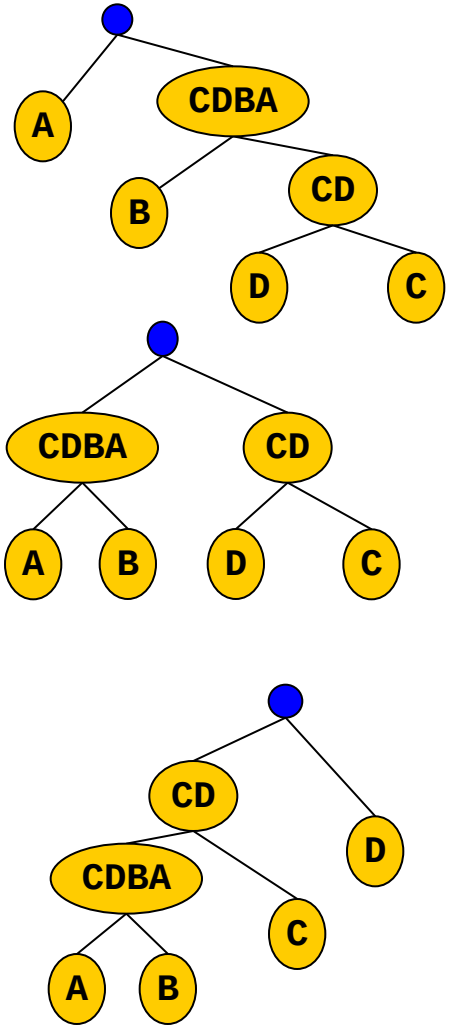






Rooting eines Baumes

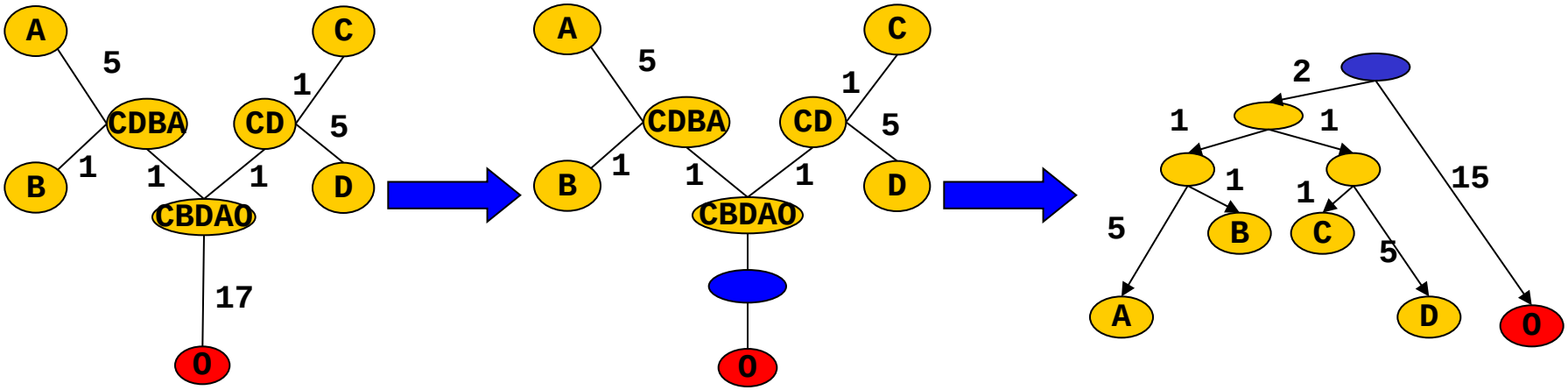




- NJ berechnet keine zeitliche Reihenfolge der Knoten
- Ein Wurzelknoten kann prinzipiell auf jeder Kante platziert werden
- Wie findet man die echte Wurzel?
  - Externe Datierung einzelner Knoten, z.B. durch Fossilien und C14-Methode
  - Benutzung einer Outgroup

Outgroups

- Eine Outgroup ist ein Taxa, das weiter von allen anderen Taxa entfernt ist als diese untereinander
  - Beispiel: Menschen, Mäuse, Ratten, Schweine – Storch
- Was passiert mit der Outgroup?
  - NJ ordnet sie im Baum ein
  - Offensichtlich muss die Kante, die zu der Outgroup führt, den Wurzelknoten enthalten
  - Damit wird der ganze Baum zeitlich angeordnet



Wenn die Daten nun ...

- Weder ultrametrisch noch additiv?
- Man lebt mit dem Fehler ...
- oder man formuliert ein Fehlerminimierungsproblem ...
  - Gegeben D. Finde Topologie T und Abstände im Baum d(i,j) so, dass der folgende Fehler minimiert wird

$$error(T) = \sum_{i=1}^{n} \sum_{i \neq j} \left(D[i, j] - d(i, j) \right)^2$$

  - Für gegebene Topologie T ist das effizient lösbar, aber ...
  - Man muss alle Topologien ausprobieren
  - Das Problem ist NP-schwierig
- oder man nimmt ganz andere Methoden (nächste Stunde)

Literatur

- Gute Einführung (sehr praktisch orientiert)
  - Baldauf, S. L. (2003). "Phylogeny for the faint of heart: a tutorial." *Trends Genet* **19**(6): 345-51.
- Ausführliche Übersicht (weniger über die Algorithmen)
  - Morrison „Phylogenetic Tree Building“, Int J of Parasitology, 1996
- Ultrametriken und Additivität
  - Gusfield (Kapitel 17)
- UPGMA und Neighbor Joining
  - Sehr gut: Vingron, Stoye, Luz: Algorithms for Phylogenetic Reconstructions, Lecture Notes, 2002/2003

Selbsttest

- Was besagt die „Molecular Clock Assumption“? Was folgt aus hier? Ist sie realistisch?
- Was ist ein additiver Baum?
- Beweisen Sie, dass es zu jeder Distanzmatrix genau dann einen ultrametrischen Baum gibt, wenn sie ultrametrisch ist
- Erklären Sie die 4-Punkt Bedingung für additive Matrizen an einem Beispiel
- Führen sie ein hierarchisches Clustering mit UPGMA auf der folgenden Matrix durch: ...
- Zeigen Sie, dass jede Ultrametric eine Metrik ist, aber nicht umgekehrt
- Geben Sie die WC-Komplexität von Neighbor Joining an