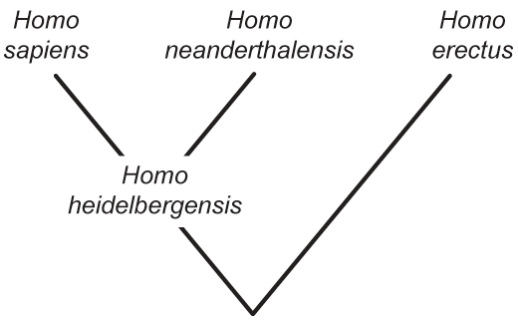
Práctica 4: El misterioso homínido de Siberia

Introducción

En 2008, la falange del dedo de un homínido no identificado fue escavada de la Cueva Denisova, en las montañas Altai de Siberia, en Rusia. La cueva ya era conocida por tener evidencia de habitación humana remontándose >125000 años al pasado.

Usando estimativos de fechas de descomposición del radiocarbono, la edad del nuevo espécimen fue estimada entre 30000 y 48000 años. Esto significa que el individuo existió en tiempos en los que los humanos modernos (*Homo sapiens*) y los neandertales (*Homo neanderthalensis*) cohabitaron en extendidas regiones de Eurasia, antes de la extinción de los neandertales hace aproximadamente 25000 años.

Antes de la aparición de los humanos modernos y los neandertales, hubo otra especie humana que estaba presente en Eurasia: *Homo erectus*. Hay evidencia que *Homo erectus* migró desde áfrica hace alrededor de 1.9 millones de años, posiblemente existiendo en Indonesia hasta hace 100000 años. Esto es diferente a la historia de los humanos modernos, quienes salieron de áfrica hace ~50000 años a colonizar Eurasia, de acuerdo a evidencia genética y arqueológica.



La opinión actual de la filogenia de los homínidos es que los humanos modernos y los neandertales son especies hermanas, posiblemente compartiendo un ancestro a *Homo heidelbergensis*, hace aproximadamente medio millón de años. *Homo erectus* se considera un pariente mas lejano. Hace aproximadamente 6 o 7 millones de años, el linaje que llevó a todas estas especies de *Homo* divergió del linaje que llevó a las dos especies actuales de chimpancé (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus*). Juntas, estas especies forman un grupo llamado “Hominini”.

Investigadores del instituto Max Plank de Antropología Evolutiva en Lepzig secuenciaron el genoma mitocondrial de la falange de Denisova. Secuenciar ADN antiguos de homínidos es un verdadero reto. El ADN esta altamente degradado y con una baja concentración de ADN autentico, lo que significa que hay un riesgo alto de contaminación de otras fuentes. Sin embargo, nuevas tecnologías de secuenciación han sido claves para sobrellevar estos retos.

En esta práctica, vas a investigar al homínido de Denisova usando un análisis filogenético Bayesiano. El análisis te permitirá elucidar las relaciones entre el misterioso individuo y otros homínidos, y estimar la escala temporal de estos eventos evolutivos.

Práctica 4 : Análisis filogenético Bayesiano de los homínidos

Antes de comenzar, confirma que tengas versiones recientes de los siguientes programas:

- *BEAST 2* (que incluye *BEAUti*, *BEAST*, y *TreeAnnotator*)
- *Tracer*
- *FigTree*

Los tres archivos de datos para esta sección de los ejercicios prácticos son **denisovan_cp1.nex**, **denisovan_cp2.nex**, y **denisovan_cp3.nex**. Cada archivo esta en formato 'Nexus', que es ampliamente usado para filogenética. Los alineamientos son las posiciones 1, 2, y 3 de los codones de 13 genes mitocondriales codificantes, para 7 especies de homínidos: (i) el homínido de Denisova; (ii) Neandertal (*Homo neanderthalensis*); (iii) humano moderno (*Homo sapiens*); (iv) chimpancé común (*Pan paniscus*); (vi) gorila (*Gorilla gorilla*); y (vii) orangután (*Pongo pygmaeus*).

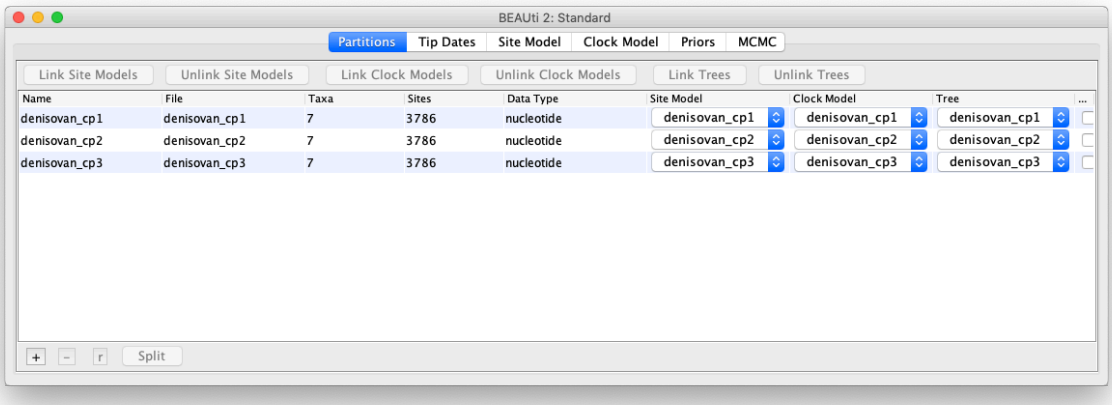
En éste ejercicio usaremos el programa de filogenética Bayesiana *BEAST 2*. El programa es extenso y requiere que creemos un archivo en formato XML, que podemos crear usando el intuitivo programa *BEAUti*. Hay tres partes al análisis:

- Crear un archivo en formato XML usando *BEAUti*
- Análisis Bayesiano usando *BEAST*
- Procesar los resultados usando *Tracer*, *TreeAnnotator*, y *FigTree*

Sección 4.1: Crear un archivo en formato XML usando *BEAUti*

a) Abre el programa *BEAUti*. El propósito de este programa es crear un archivo para *BEAST*. El primer paso es cargar nuestros alineamientos a *BEAUti.* Selecciona "Import Alignment" de el menú "File" (archivo) y abre los tres alineamientos, **denisovan_cp1.nex**, **denisovan_cp2.nex**, y **denisovan_cp3.nex**. Alternativamente, puedes arrastrar los archivos de los alineamientos a la ventana de *BEAUti*.

b) Deberías estar en la pestaña **Partitions** en *BEAUti*. La ventana muestra algunas de las características de los datos que has cargado. Podrás ver que cada alineamiento contiene 7 organismos y 3786 nucleótidos.



Hay varias opciones en esta pestaña relacionadas a cómo particionar los datos. Hacer particiones nos permite aplicar diferentes modelos evolutivos a cada parte de los alineamientos.

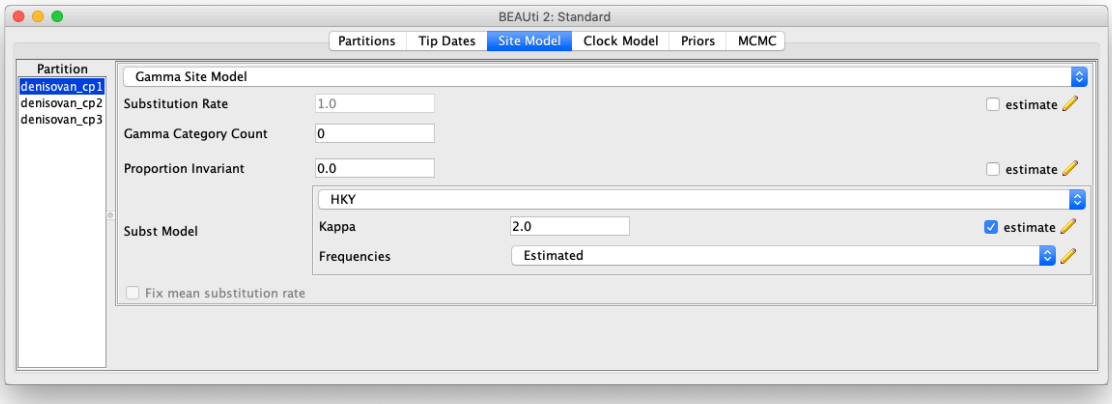
Por defecto, *BEAUti* le asigna a cada una de las tres posiciones de codón diferentes modelos de sustitución (site), tasa evolutiva entre especies (clock), y árbol. Esto se ve en el hecho que hay tres nombres diferentes en las filas de las columnas para estos modelos. Para este análisis queremos que cada posición tenga diferentes modelos de sustitución y tasas evolutivas. Sin embargo, podemos asumir que las tres posiciones comparten el árbol filogenético porque están ligadas en el genoma de la mitocondria, el cual no recombina.

Selecciona los tres alineamientos en esta pestaña y haz click en "Link Trees". Puedes ver que ahora los árboles de las 3 posiciones de codón tienen el mismo nombre "denisovan_cp1".

c) Ignora por ahora la pestaña **Tip Dates**. Normalmente, esa pestaña nos permite incluir las edades del homínido de Denisova y el Neandertal para el análisis, pero esto no lo haremos para reducir la carga computacional. También ignoraremos este paso porque las edades de estas secuencias son mínimas comparado con la edad total de el árbol filogenético que estamos investigando.

d) Dirígete a la pestaña **Site Model**, donde elegiremos el modelo de sustitución. En este análisis vamos a usar el modelo HKY para cada una de las tres posiciones de codón. El modelo HKY permite que la tasa de transiciones (A↔G and C↔T) sea diferente a la tasa de transversiones (A↔C, A↔T, G↔C and G↔T). Para seleccionar este modelo, selecciona "HKY" en la caja "Subst Model". Deja el valor por defecto de 2.0 para el parámetro "Kappa", que representa la proporción de transiciones contra transversiones. Este parámetro será estimatdo en el análisis. Deja también "Frequencies" como "Estimated", que significa que vamos a estimar las frecuencias ancestrales de cada uno de los nucleótidos.

Ahora selecciona todas las particiones en la ventana a la izquierda de la pestaña. Ahora veras una opción "Clone from denisovan_cp1", que significa que *BEAUti* nos esta dando la opción de copiar el modelo de sustitución para las otras 2 posiciones de codón. Haz click en "OK" para asignarles el modelo HKY a las otras 2 posiciones de codón. Ahora cada una de las 3 posiciones tendrá su propio modelo HKY.



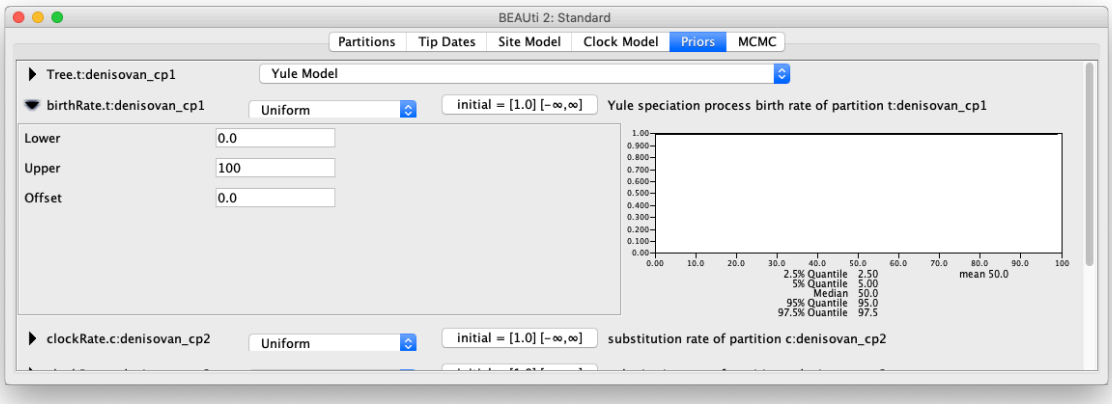
e) Dirígete a la pestaña **Clock Model**. Aquí necesitamos elegir el tipo de modelo de tasas evolutivas entre especies (reloj molecular) que queremos usar en nuestro análisis. Fíjate que aunque no vamos a estimar fechas de divergencia en este análisis específico, *BEAST* exige que elijamos un modelo de reloj molecular. *BEAST* solo infiere árboles enraizados. Vamos a usar un reloj molecular estricto, "strict clock", para cada una de las tres posiciones de codón. Puedes dejar el valor de "Clock.rate" en el defecto de 1.0.

El modelo que hemos elegido es un reloj molecular estricto para cada una de las tres posiciones de codón. Esto permite que cada posición de codón tenga su propia tasa evolutiva. Específicamente, el programa fijará la tasa evolutiva de la posición de codón 1 a 1.0, mientras las tasas de las otras dos posiciones serán estimadas relativas a la de la posición 1 durante el análisis.

f) Dirígete a la pestaña **Priors**. Aquí tenemos que elegir distribuciones para los priors de cada uno de los parámetros de nuestro análisis, incluyendo el árbol. En el menú a la derecha de "Tree.t:denisovan_cp1" hay varios modelos que se pueden usar para generar una distribución para el árbol. En este análisis vamos a lidiar con secuencias de diferentes especies, que significa que necesitamos usar un modelo de especiación. Los modelos coalescentes solo son apropiados para datos a nivel poblacional. Elige el modelo de especiación más simple, que es el proceso Yule. Este modelo es de solo especiación, en el que todos los linajes tienen la misma probabilidad de bifurcarse en dos linajes descendientes, en todos los momentos de tiempo.

Si haces click en la flecha negra a la izquierda de "Tree.t:denisovan", veras las opciones para el modelo Yule. Deja el valor inicial para la tasa de especiación (birth rate) en el defecto de 1.0.

Mira los otros priors de esta pestaña. Hay una distribución uniforme para la tasa de especiación del modelo Yule, y una distribución lognormal para el parámetro kappa para cada una de las tres posiciones de codón. Debemos cambiar la distribución uniforme de el prior de la tasa de especiación para que su limite superior no sea infinito. Haz click en el triangulo negro al lado de "birthrate.t:denisovan" y cambia el valor de "Upper" (límite superior) a 100.



g) Dirígete a la pestaña **MCMC**. Aquí tenemos que definir cuanto tiempo vamos a pasar acumulando muestras de la distribución a posterior usando simulaciones en una cadena de Monte Carlo markoviana (MCMC). Recuerda que queremos estimar las distribuciones

a posterior de los parámetros, incluyendo el árbol. Sin embargo, esta distribución no se puede calcular directamente, sino que tenemos que tomar muestras de distribuciones a posterior usando una simulación MCMC que esté correctamente diseñada. Usando estas muestras Podemos aproximar la distribución a posterior. Para que el análisis sea rápido, cambia la longitud de la cadena, "Chain Length" a 5000000.

Haz click en el triangulo negro al lado de "tracelog" y cambia el nombre del archivo "File name" a **denisovan_hky.log**. Ahora haz click en el triangulo negro al lado de "treelog.t:denisovan_cp1" y camia el nombre del archivo de árboles a **denisovan_hky.trees**.

h) Ahora dirígete al menú File (o Archivo) y selecciona "Save As" (Guardar como). Guarda el archivo XML con el nombre **denisovan_hky.xml** en el escritorio de tu computador o en tu directorio actual (donde sea que quieres que *BEAST* escriba los resultados). Esto va a escribir un archivo en formato XML que *BEAST* puede usar. Mantén *BEAUti* abierto, ya que luego vamos a cambiar algunas de las especificaciones del análisis.

Sección 4.2: Análisis filogenético Bayesiano usando *BEAST*

a) Abre el programa *BEAST* y elige el archivo XML que creaste en la sección previa. Haz click en el botón "Run" en la parte inferior derecha de la ventana.

b) Mientras el análisis progresa, *BEAST* continuamente escribirá los resultados en tres archivos nuevos. El que termina en .log contiene los valores de la distribución a posterior de los parámetros de los modelos, mientras el archivo terminado en .trees contiene las muestras de la distribución a posterior de árboles. El archivo terminado en .state guarda el estado actual de la cadena MCMC, en caso que quieras resumir el análisis desde un momento dado.

El análisis se tomará unos minutos dependiendo de la velocidad de tu computador. Mientras esperas, puedes probar responder estas preguntas sobre la filogenética Bayesiana.

Q. *¿Cómo podemos elegir la distribución prior para cada parámetro en el análisis?*

Podemos basar la distribución del prior en nuestras propia opinión (subjetiva), conocimiento dado por observaciones o estudios previos, o usando un modelo biológico (ej., un proceso de especiación o coalescente para el árbol).

Q. *¿Sería correcto usar estimativos de nuestros datos para informar nuestra elección de la distribución para el prior? ¿Por qué o por qué no?*

No. El prior de nuestro análisis debería reflejar nuestras expectativas previas e incertidumbre, sin ser influenciado por los datos que estamos analizando.

Q. *¿Dado que no es posible obtener la distribución a posterior directamente, qué método podemos usar para estimar la distribución a posterior?*

Usando una cadena markoviana de monte carlo (MCMC) y el algoritmo Metropolis-Hastings.

Sección 4.3: Procesar los resultados usando *Tracer*, *TreeAnnotator*, y *FigTree*

a) Abre el programa *Tracer*, y haz click en "Import Trace File" en el menú "File" para importar el archivos .log files de tu análisis de *BEAST*.

b) Puedes inspeccionar las características de las distribuciones a posterior para cada parámetro. Lo primero es mirar que el número efectivo de muestras (ESS; effective simple size) sea superior a 200 para todos los parámetros. Esto indica que se han tomado suficientes muestras de la distribución a posterior para cada parámetro. Las muestras del MCMC no son completamente independientes entre ellas, y esta es la razón que en número efectivo de muestras es menor al total. Si algún valor de ESS es inferior a 200, indica que es necesario tomar más muestras durante el análisis. Si esto ocurre en tus parámetros, lo puedes ignorar para el proposito de esta práctica.

c) En adición, queremos que las muestras vengan de la distribución estacionaria. Por esta razón normalmente nos deshacemos de el primer 10% de las muestras. Esto se conoce como la fase 'burn-in'. Por defecto, *Tracer* excluye el primer 10% de tus muestras cuando calcula el promedio y otras estadísticas. Normalmente llevamos a cavo el análisis múltiples veces y revisamos que las replicas de los análisis tengan resultados consistentes. Puedes intentar hacer esto y revisar los resultados de múltiples análisis simultáneamente en *Tracer.*

d) Miremos los estimativos de algunos de los parámetros. Específicamente, mira los parámetros "clockRate.2" y "clockRate.3". Estos representan las tasas de sustitución para los codones 2 y 3, respectivamente, comparadas con el codón 1 (cuya tasa ha sido fijada en 1.0).

Q. *¿Cuales son las tasas de sustitución relativas en las posiciones de codón 2 y 3? ¿Es este resultado consistente con nuestra expectativa del proceso de evolución molecular, dado nuestro conocimiento sobre los codones y cómo codifican amino ácidos?*

La tasa relativa en la posición de codón 2 es de alrededor de 0.355, y la del codón 3 alrededor de 5.667. Estos valores indican que la posición 3 evoluciona alrededor de 16 veces mas rápido que la posición 2. Estos resultados son consistentes con nuestras expectativas, dado que las sustituciones en la segunda posición tienden a ser no-sinónimas (cambian el amino ácido codificado) mientras las sustituciones en la tercera posición tienden a ser sinónimas (no cambian el amino ácido codificado). Por lo tanto, la tercera posición es más libre de cambiar mientras la posición 1 tiene una tasa evolutiva intermedia.

e) Abre el programa *TreeAnnotator*. Este programa se usa para procesar el archivo terminado en .trees producido por *BEAST.* El programa leerá todas las muestras de árboles del MCMC y resumirá la información en un solo árbol.

f) Escribe el valor "10" en la caja al lado de "Burnin percentage". Esto significa que estamos deshaciéndonos del primer 10% de las muestras, tratándolas como burn-in. En la opción

"Input Tree File" haz click en "Choose File" y selecciona el archivo terminado en .trees generado por el análisis de *BEAST*. En la opción "Output File" haz click en "Choose File" y selecciona el directorio donde quieres guardar el archivo que va a producir *TreeAnnotator*. Dale el nombre **denisovan_hky.tre** y haz click en "Run".

g) Abre el programa *FigTree* y úsalo para ver el archivo **denisovan_hky.tre** que acaba de generar *TreeAnnotator*. En la ventana verás el árbol que resume las muestras de arboles de tu análisis filogenético Bayesiano. Puedes explorar las opciones de *FigTree* para ver la información asociada con el árbol. Prueba hacer click en los tres símbolos en el menú "Layout". De izquierda a derecho, estos deberían permitirte visualizar el árbol como enraizado, circular, y desenraizado, respectivamente.

Estamos particularmente interesados en dos características del árbol. Primero, queremos ver donde esta posicionado el homínido de Denisova. Haz click en la caja al lado de "Node Labels" y selecciona "posterior" en el menú al lado de "Display". Esto pondrá información en los nodos del árbol de acuerdo a sus probabilidades a posterior, que indican el soporte estadístico para cada una de las agrupaciones representadas en el árbol.

Q. *¿Donde esta localizado el homínido de Denisova en el árbol filogenético? ¿Cual es la probabilidad a posterior de la agrupación de el homínido de Denisova junto con los otros dos humanos?*

El homínido de Denisova aparece agrupado con el humano moderno y el neandertal como grupo hermano con una probabilidad a posterior de 1.00.

Q. *¿De acuerdo a este resultado, el homínido de Denisova es un humano moderno, un neandertal, o ninguno de los dos?*

El homínido de Denisova es el linaje hermano de los humanos modernos y el neandertal. De acuerdo con este árbol, es evidente que no es ni un humano moderno ni un neandertal.

Q. *Cuando tomas muestras durante el análisis usando MCMC, elegimos guardar el valor de los parámetros cada 1000 pasos. ¿Por qué no elegimos guardar los valores en todos y cada uno de los pasos?*

Cuando miramos gráficamente las muestras de MCMC para estimar la distribución a posterior, asumimos que las muestras son mutuamente independientes. Sin embargo, los pasos de MCMC en nuestra cadena no son independientes. Al guardar los pasos (el árbol y los valores de los parámetros) cada 10000 pasos, estamos reduciendo la correlación entre muestras.

Q. *¿Qué podemos hacer para reducir la duración del 'burn-in'? En otras palabras, ¿qué Podemos hacer para ayudar a nuestra cadena markoviana para que llegue a la distribución estacionaria más rápidamente?*

En lugar de empezar con valores aleatorios del árbol y los valores de los parámetros, podemos especificar estos valores iniciales. También podemos hacer que cada paso sea una propuesta de parámetros sustancialmente diferente al paso anterior, de manera que se explore el espacio más rápidamente.

Q. *A veces la cadena markoviana no explora en detalle el paisaje de posibles combinaciones de parámetros, de manera que nuestras muestras no proveen una buena representación de la distribución a posterior. ¿Cómo podemos identificar si este es el caso?*

Podemos hacer varios análisis con especificaciones idénticas (quizás con puntos iniciales diferentes). Si todos nuestros análisis convergen en los mismos resultados, podemos estar confiados que estamos tomando muestras de la distribución a posterior.