

Multiple Sequence Alignment (MSA) di sequenze SARS-CoV-2

EDOARDO SILVA 816560
DAVIDE MARCHETTI 815990

A.A.: 2019/2020

1 Abstract

Date le variazioni sulle sequenze rilevate e catalogate nelle parti precedenti, costruiremo appositamente una matrice binaria di caratteri, evitando la generazione della "matrice proibita", da utilizzare per la realizzazione della filogenesi perfetta delle sequenze.

Successivamente realizzeremo l'albero filogenetico con l'ausilio delle librerie **Bio** e **anytree**, confronteremo dell'albero ottenuto rispetto a quello prodotto con i tool di allineamento e scriveremo i risultati ottenuti.

I risultati ci diranno la qualità implementativa del lavoro svolto e cercherà di ottenere risultati per come il virus si sia introdotto nelle aree analizzate.

2 Filogenesi Perfetta

La filogenesi perfetta si basa su 2 postulati:

1. I caratteri possono essere acquisiti (cambiamenti di righe da 0 a 1) una sola volta, ma persi più volte.
2. un carattere non ancora acquisito può essere acquisito successivamente e indipendente in multipli sottoalberi, ma in tal caso non può essere perso.

Un albero rappresentante la filogenesi perfetta ha quindi 3 caratteristiche:

1. L'albero ha il numero di foglie equivalente al numero di campioni analizzati, con ogni campione come foglia.
2. Ognuno dei caratteri identifica esattamente una ramificazione.
3. Per ogni sequenza, seguendo il percorso fino alla radice, si percorrono i suoi caratteri.

Per verificare che una matrice possa supportare la filogenesi perfetta, si controlla la non presenza in essa della matrice proibita come sottomatrice.

2.1 Matrice di caratteri

La matrice di caratteri così ottenuta pone sulle righe l'identificativo di ciascuna sequenza analizzata e sulle colonne sono posti i caratteri. Per la costruzione dell'albero si è scelto di utilizzare ciascuna alterazione come identificativa di un singolo carattere associandovi un codice univoco.

La matrice viene popolata con il valore 1 qualora il j -esimo carattere (variazione) si manifesti nell' i -esima sequenza, altrimenti viene inserito il valore zero. Procedendo in questo modo si ottiene la matrice di caratteri riportata in ??.

Sequence	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	C38	C39	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48	C49	C50	C51	C52
NC_045512.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
EPI_ISL_442523	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
EPI_ISL_437512	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
EPI_ISL_447469	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
EPI_ISL_417444	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0		
EPI_ISL_437334	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
EPI_ISL_437317	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
MT320891.2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
MT281530.2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
MT276598.1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
MT276597.1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
MT240479.1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
MT262993.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
MT327745.1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Figura 1: Albero di output del nostro script

Tuttavia per una filogenesi perfetta è necessario che la matrice utilizzata non sia una "matrice proibita", cioè che sia...

La matrice in fig. 2 è ottenuta applicando l'algoritmo descritto nel listato 3 alla matrice di caratteri costruita in precedenza. Durante il procedimento vengono eliminate solamente 5 colonne, corrispondenti a cinque variazioni distinte.

Sequence	C2	C6	C1	C4	C5	C20	C10	C9	C40	C41	C42	C43	C8	C23	C11	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C21	C22	C52	C24	C25	C50	C49	C48	C47	C46	C45	C39	C38	C37	C36	C35	C34	C33	C32	C30	C29	C28	C27	C51	C26		
NC_045512.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
EPI_ISL_442523	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
EPI_ISL_437512	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	
EPI_ISL_447469	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EPI_ISL_417444	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EPI_ISL_437334	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EPI_ISL_437317	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MT320891.2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MT281530.2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MT276598.1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
MT276597.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT240479.1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MT262993.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT327745.1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 2: Matrice di caratteri per filogenesi perfetta

3 Algoritmo

3.1 Matrice delle variazioni

Inizialmente, vengono recuperati gli identificativi delle 14 sequenze usate e caricati i file delle variazioni degli allineamenti generati in output nella prima parte del progetto:

Listing 1: Caricamento dei file necessari per l'elaborazione

```
1 reference_id = load_fasta_id(  
2     os.path.join('..', '..', 'project-1', 'input', 'reference.fasta')  
3 )  
4 sequence_ids = read_sequence_ids(paths=[  
5     os.path.join('..', '..', 'project-1', 'input', 'GISAID'),  
6     os.path.join('..', '..', 'project-1', 'input', 'ncbi'),  
7 ])  
8 sequence_ids.insert(0, reference_id) #insert reference no variations  
9  
10 clustal_output = load_output('Clustal-NC_045512.2.json')  
11 variations = clustal_output['unmatches'].items()
```

L'algoritmo a partire dai file di output della prima parte del progetto genera una matrice binaria utilizzando come indici di riga gli identificativi delle sequenze e come colonne un identificativo univoco assegnato ad ogni variazione.

La matrice binaria così impostata contiene il valore 1 qualora la variazione identificata dalla colonna sia presente nella sequenza identificata dalla riga, altrimenti il valore della cella sarà pari a 0. Questa è salvata nel file `character_table.csv`.

Listing 2: Generazione della matrice binaria di caratteri

```
1 for key, value in variations:  
2     row = np.zeros(len(sequence_ids))  
3     indexes.append('C{}'.format(counter))  
4     for sequence in value['sequences']:  
5         row[sequence_ids.index(sequence)] = 1  
6     rows.append(row)  
7     counter += 1  
8  
9 trait_matrix = pd.DataFrame(rows, index=indexes, columns=  
10     ↪ sequence_ids, dtype=np.uint8).transpose()  
11 trait_matrix = phylogeny.reorder_columns(trait_matrix, axis=0)  
12 trait_matrix.to_csv(os.path.join('..', 'output', 'character_table.  
    ↪ csv'))
```

3.2 Filogenesi perfetta

Prima di procedere con la creazione dell'albero è necessario verificare che la matrice binaria generata in precedenza sia valida per una filogenesi perfetta.

Il metodo riportato nel listato 3 riporta il codice utilizzato per costruire la matrice binaria più grande che non sia "matrice proibita".

Listing 3: Funzione di generazione della matrice binaria per filogenesi perfetta

```
1 def get_perfect_phylogeny_character_matrix(df):
2     columns = df.columns
3     candidate_matrix = df[columns[0:1]]
4     for i in range(1, len(columns)):
5         candidate_matrix = candidate_matrix.join(df[columns[i:i+1]])
6
7         if phylogeny.is_forbidden_matrix(candidate_matrix):
8             candidate_matrix = candidate_matrix.drop(labels=
9                 ↪ candidate_matrix.columns[-1], axis=1)
10    return candidate_matrix
```

3.3 Generazione dell'albero

A questo punto è possibile procedere con la ricostruzione dell'albero filogenetico a partire dalla `candidate_matrix` e utilizzando funzioni definite nel file `phylogeny.py` per costruire e visualizzare in output l'albero della filogenesi.

Listing 4: Chiamata alla generazione dell'albero

```
1 candidate_matrix = get_perfect_phylogeny_character_matrix(
2     ↪ trait_matrix)
3 phylogeny.build_tree(candidate_matrix)
```

3.3.1 Creazione dell'albero

La generazione dell'albero viene svolta come segue:

1. Ordinamento decrescente delle colonne del dataframe in base al numero di valori 1 presenti.

Listing 5: Ordinamento decrescente delle colonne

```
1 sorted_axis = df.sum(axis=0).sort_values(ascending=False)
2 return df[sorted_axis.index]
```

2. A partire dal nodo `root`, per ogni sequenza genera una sequenza di nodi uno per ogni variazione presente, collegandola alla variazione precedente o al nodo `root`.

Durante l'elaborazione delle sequenze successive, se esiste già un figlio del `current_node` rappresentante la variazione attuale, questo viene riutilizzato, altrimenti viene creato un nuovo nodo e collegato come figlio di `current_node`.

Listing 6: Funzione di creazione dell'albero

```
1 root = Node('root', edges={})
2 for i, row in df.iterrows():
3     current_node = root
4
5     for j in range(len(row)):
6         # If alteration is present in the current sequence
7         if row.iloc[j]:
8             # If current_node has a link to the variation with label=j
9             if j in current_node.edges:
10                 # Follow the same path without creating new nodes
11                 current_node = current_node.edges[j]
12             else:
13                 u = Node('U-{}'.format(row.index[j]), edges={})
14                 current_node.parent = current_node
15                 current_node.edges[j] = u
16                 current_node = u
17
18     Node(i, parent=current_node)
```

3. Conversione dell'albero precedentemente generato in un `newick_tree` elaborabile dalla libreria `biopython.Phylo` usata per la visualizzazione.

Listing 7: Funzione di conversione in Newick Tree

```
1 def to_newick_tree(node):
2     if node.is_leaf:
3         return node.name
4
5     return '({})'.format(','.join([ to_newick_tree(child) for child in
6         ↪ node.children ]))
7
8 newick_string = to_newick_tree(root)
9 tree = Phylo.read(io.StringIO(newick_string), 'newick')
```

4. Inserimento delle informazioni aggiuntive sulle sequenze nelle foglie dell'albero. Questo step non può essere effettuato durante la conversione a `newick_tree` perché alcuni caratteri usati verrebbero interpretati come parte della struttura dell'albero, alterando il risultato finale.

Listing 8: Funzione per l'inserimento dei dati nelle foglie dell'albero

```
1 def merge_sequences_data(node, sequences_data):
2     if node.is_terminal():
3         data = sequences_data[node.name]
4         node.name = '{}\n {} in {}'.format(node.name, data['date'], data
           ↪ ['location'])
5     return
6
7     [ merge_sequences_data(child, sequences_data) for child in node.
           ↪ clades ]
8
9 root = newick_tree.clade
10 merge_sequences_data(root, sequences_data)
```

5. Salvataggio e visualizzazione dell'albero filogenetico finale.

Listing 9: Salvataggio e visualizzazione dell'albero filogenetico finale

```
1 fig = plt.figure(figsize=(10, 8))
2 ax = fig.add_subplot(1, 1, 1)
3
4 Phylo.draw(tree, do_show=False, axes=ax)
5
6 ax.set_xlabel('Number of alterations')
7 ax.set_ylabel('Sequences')
8 plt.tight_layout()
9 plt.savefig(os.path.join '..', 'output', 'phylogenetic-tree.png'))
10 plt.show()
```

4 Conclusioni

L'albero generato con ClustalW in fig. 4, rispetto all'albero da noi prodotto (fig. 3), riesce a ottenere un livello di dettaglio maggiore arrivando a scindere i rami terminanti con tre foglie da noi identificati.

Il nodo israeliano etichettato con MT276597.1 in entrambi gli alberi risulta distante dalle altre due sequenze israeliane. Questo potrebbe far presupporre che derivi da un ceppo diverso del virus o da un'area geografica differente.

Il nodo MT262993.1 presenta alterazioni differenti rispetto alle altre sequenze rilevate in Pakistan. Come già descritto in precedenza nella seconda parte del progetto, alcune di queste alterazioni risultano essere cancellazioni di porzioni di basi per noi riconducibili ad un errore in fase di sequenziamento.

I rami restanti dell'albero in fig. 3 mostrano come nella stessa area geografica i genomi siano simili tra loro il che ci porta a ipotizzare che la diffusione all'interno del paese si sia sviluppata a partire da un singolo paziente per nazione e non da pazienti contagiati da mutazioni diverse del virus.

Analizzando l'albero, i ceppi *iraniani* e *turchi* presentano mutazioni comuni. Inoltre, le sequenze di entrambi i paesi condividono una variazione con il ceppo *pakistano*. Il ceppo di virus rilevato in *Israele* sembra avere un'origine differente e non condivide mutazioni simili con le sequenze degli altri paesi analizzati.

In conclusione, gli alberi ottenuti in fig. 3 e 4 risultano abbastanza simili, tuttavia presentano alcune differenze.

Ipotizziamo che queste derivino principalmente dal fatto che l'albero in fig. 3 è costruito basandosi sul numero di alterazioni rispetto alla sequenza reference. Al contrario, l'albero in fig. 4 è generato in base alla distanza tra le *intere* sequenze a partire da un allineamento.

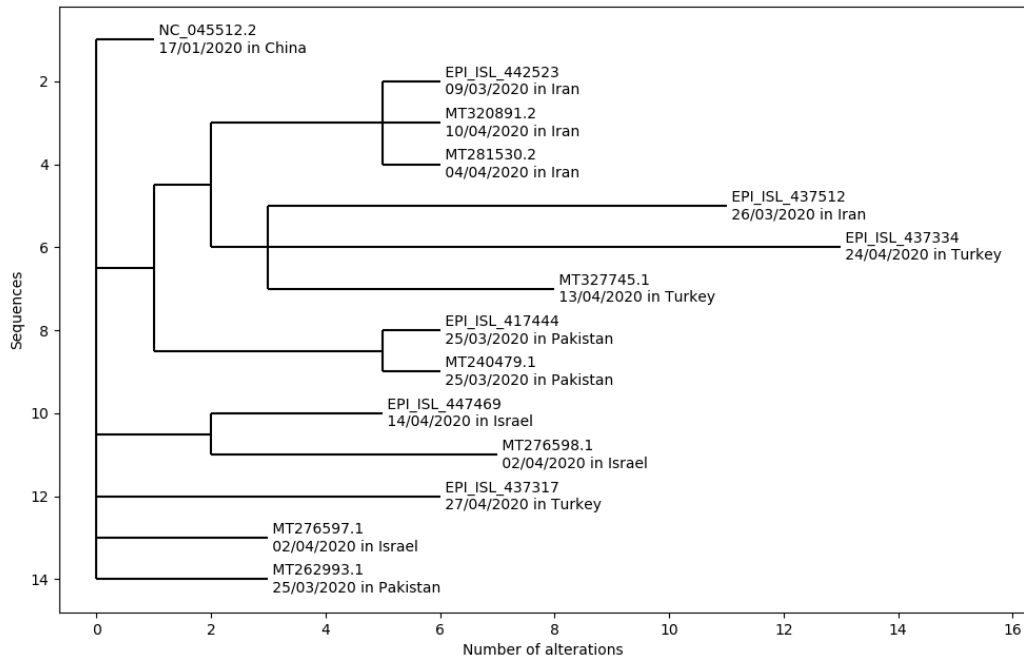


Figura 3: Albero di output del nostro script

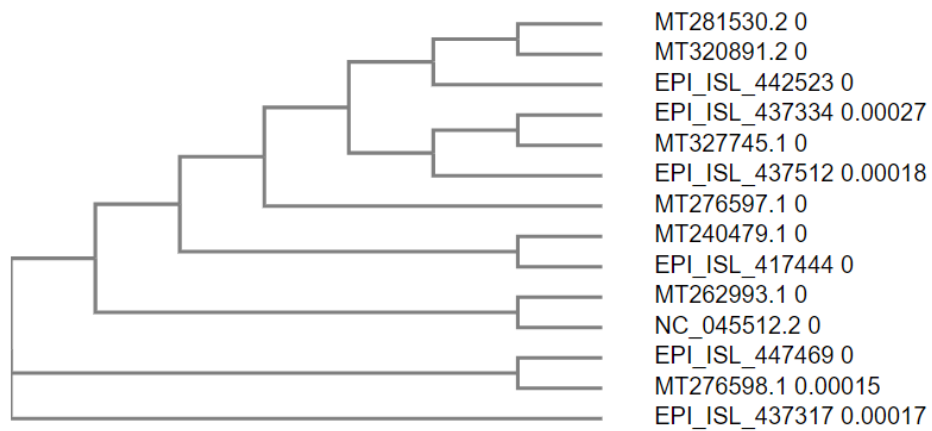


Figura 4: Albero di output derivato dall'allineamento con ClustalW

5 Divisone del lavoro

Durante la realizzazione del progetto entrambi i componenti del gruppo hanno partecipato attivamente alla sua realizzazione. In particolare:

- **Edoardo Silva** si è occupato principalmente di recuperare i file esterni da elaborare e confrontare.
- **Davide Marchetti** si è occupato principalmente di generare i file di output.
- Entrambi hanno lavorato alla creazione ed elaborazione della matrice e dell'albero, con tutte le funzioni ausiliarie allo scopo del progetto.