technische universität
dortmund

Analyse von RAD-Seq-Daten unter Berücksichtigung von Sequenzierfehlerraten und Heterozygotiewahrscheinlichkeiten

Antonie Vietor

4. März 2021

Technische Universität Dortmund
Fakultät für Informatik
Lehrstuhl 11
Bioinformatics for High-Throughput Technologies
http://ls11-www.cs.tu-dortmund.de/

In Kooperation mit:
Universität Duisburg-Essen
Genome Informatics
http://genomeinformatics.uni-due.de/

Aufbau von DNA und RNA

Aufbau der DNA

- besteht aus Nukleotiden
- jedes **Nukleotid** besteht aus einem Zuckermolekül (Desoxyribose), einem Phosphatrest und einer Base
- **Basen**: A (Adenin), T (Thymin), G (Guanin), C (Cytosin)
- meist **doppelsträngig**
- dient vor allem der **Informationsspeicherung** (Erbinformation)

Aufbau von DNA und RNA

Aufbau der DNA

- besteht aus Nukleotiden
- jedes **Nukleotid** besteht aus einem Zuckermolekül (Desoxyribose), einem Phosphatrest und einer Base
- **Basen**: A (Adenin), T (Thymin), G (Guanin), C (Cytosin)
- meist **doppelsträngig**
- dient vor allem der **Informationsspeicherung** (Erbinformation)

Unterschiede im Aufbau der RNA

- **Nukleotide**: das Zuckermolekül ist Ribose
- **Basen**: Uracil (U) statt Thymin
- meist **einzelsträngig**
- viele Funktionen, dient unter anderem der **Informationsübertragung** bei der Proteinbiosynthese

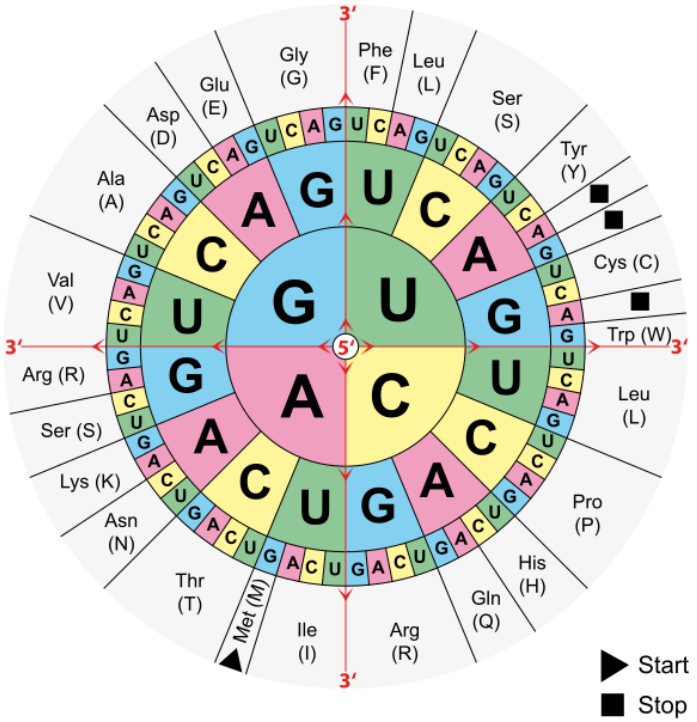
Struktur der DNA

- **Doppelhelixstruktur**
- **Komplementarität**: selektive Basenpaarung von A und T und ebenso von G und C
- **Antiparallelität**: in der Doppelhelix sind die beiden DNA-Stränge gegenläufig zu einander
- **Gene**: Wechsel von codierenden (Exons) und nicht-codierenden Abschnitten (Introns)
- zwischen den Genen nicht-codierende Bereiche, z.T. mit regulatorischen Funktionen
- ca. 98 % der DNA sind nicht-codierend

Proteinbiosynthese

Genetischer Code

- Codierung der **DNA-Sequenz** in eine **Aminosäuresequenz**, welche die Primärstruktur der Proteine darstellt
- **Basentripletts** (Codons) codieren für i.d.R. 20 Aminosäuren sowie ein Start- und drei Stop-Codons
- **Degeneration**: mehrere Basentripletts können für die gleiche Aminosäure codieren



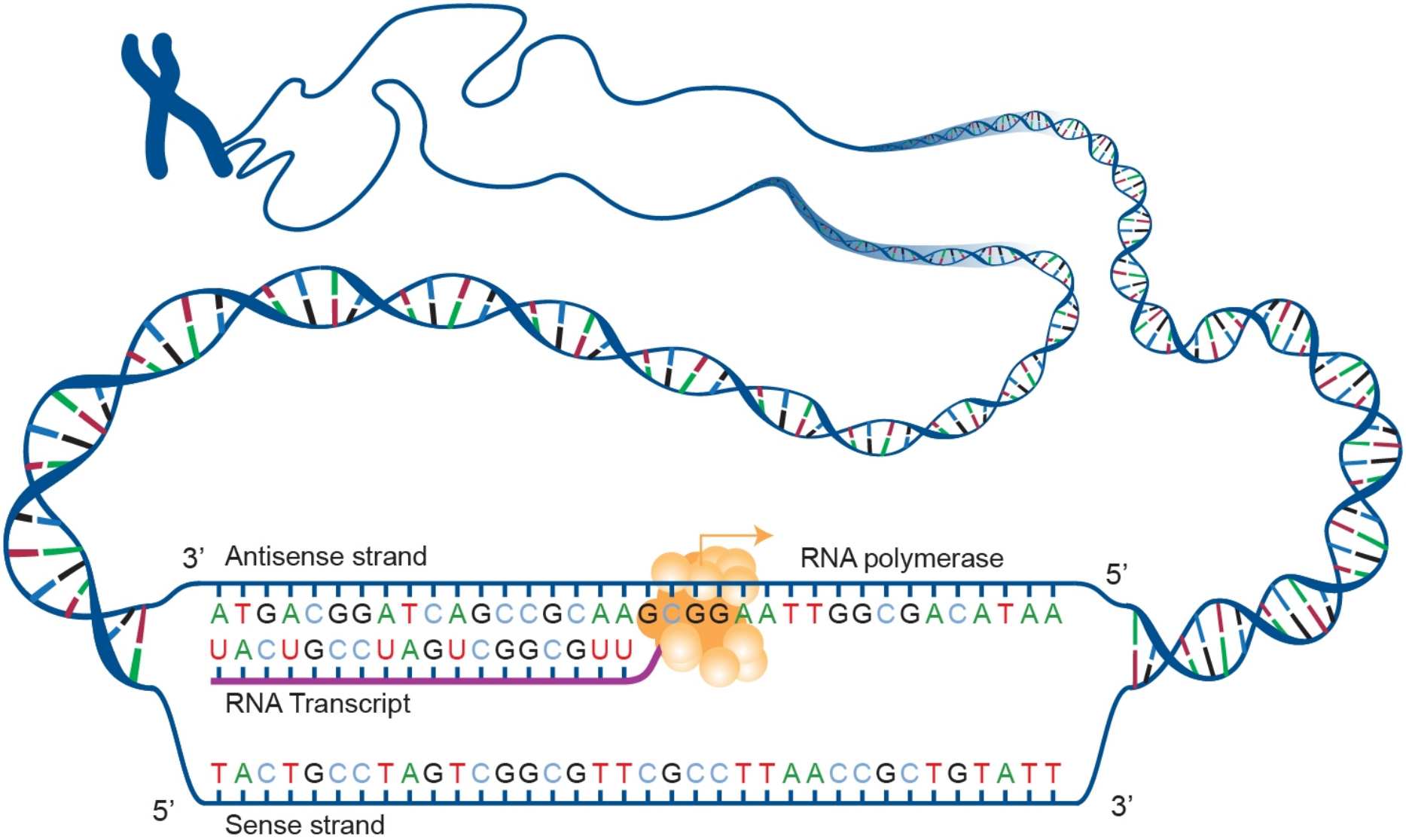
Bildquelle: [1]

Proteinbiosyntese

Transkription

Umschreiben eines DNA-Abschnitts zu Arbeitskopien in Form von **mRNA** (messenger RNA)

Proteinbiosyntese



Bildquelle: [2]

Proteinbiosyntese

Translation

- **Übersetzen** der Basensequenz in die Aminosäuresequenz mit Hilfe von **tRNA** (transfer RNA)

Proteinbiosyntese

Translation

- **Übersetzen** der Basensequenz in die Aminosäuresequenz mit Hilfe von **tRNA** (transfer RNA)
- Aufbau der tRNA:

  $\Rightarrow$ **mRNA-Bindungsstelle** bestehend aus einem Basentriplett

Proteinbiosyntese

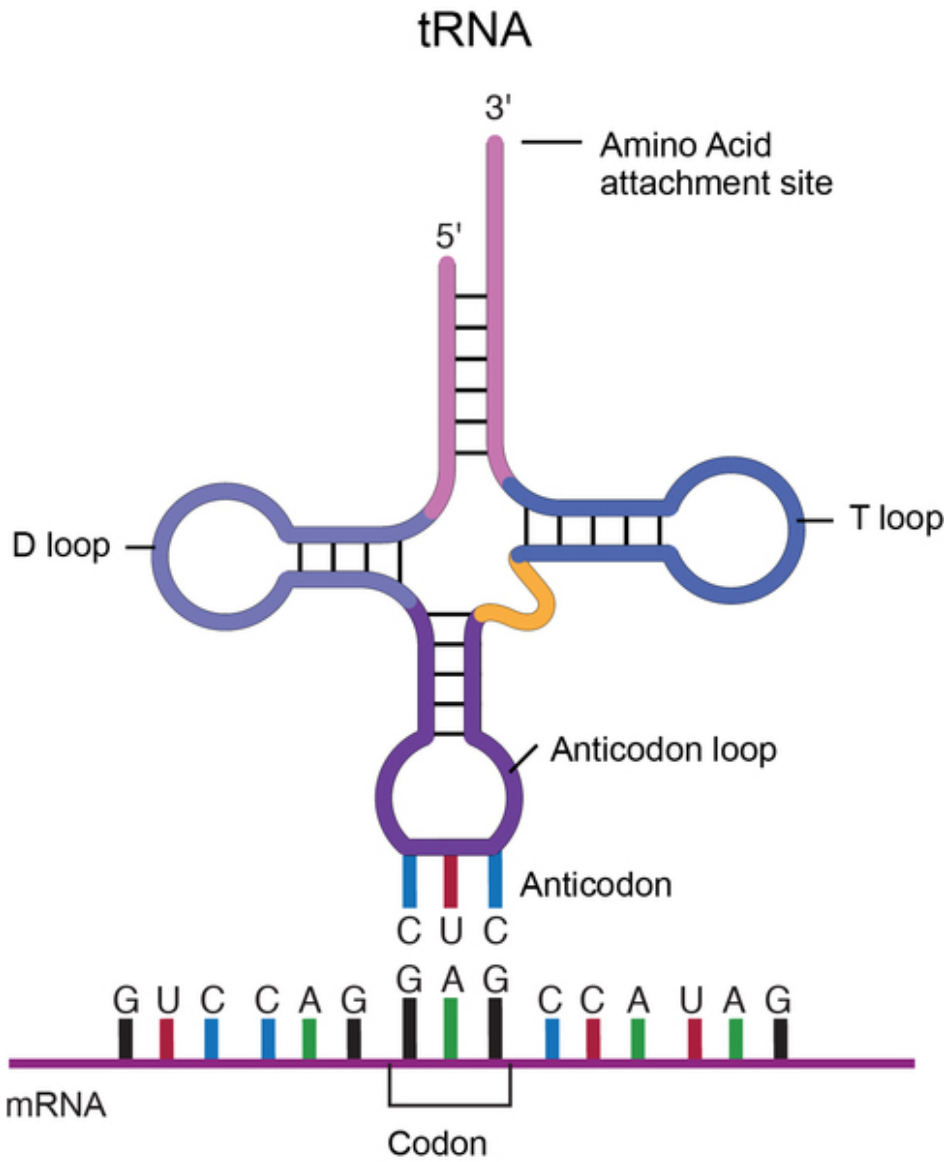
Translation

- **Übersetzen** der Basensequenz in die Aminosäuresequenz mit Hilfe von **tRNA** (transfer RNA)
- Aufbau der tRNA:

  $\Rightarrow$ **mRNA-Bindungsstelle** bestehend aus einem Basentriplett

  $\Rightarrow$ trägt die **korrespondierende Aminosäure** (AS), die nach dem genetischen Code der mRNA-Bindungsstelle entspricht

Proteinbiosyntese



Bildquelle: [3]

Proteinbiosyntese

Translation

- **Übersetzen** der Basensequenz in die Aminosäuresequenz mit Hilfe von **tRNA** (transfer RNA)
- Aufbau der tRNA:

  $\Rightarrow$ **mRNA-Bindungsstelle** bestehend aus einem Basentriplett

  $\Rightarrow$ trägt die **korrespondierende Aminosäure** (AS), die nach dem genetischen Code der mRNA-Bindungsstelle entspricht

Proteinbiosyntese

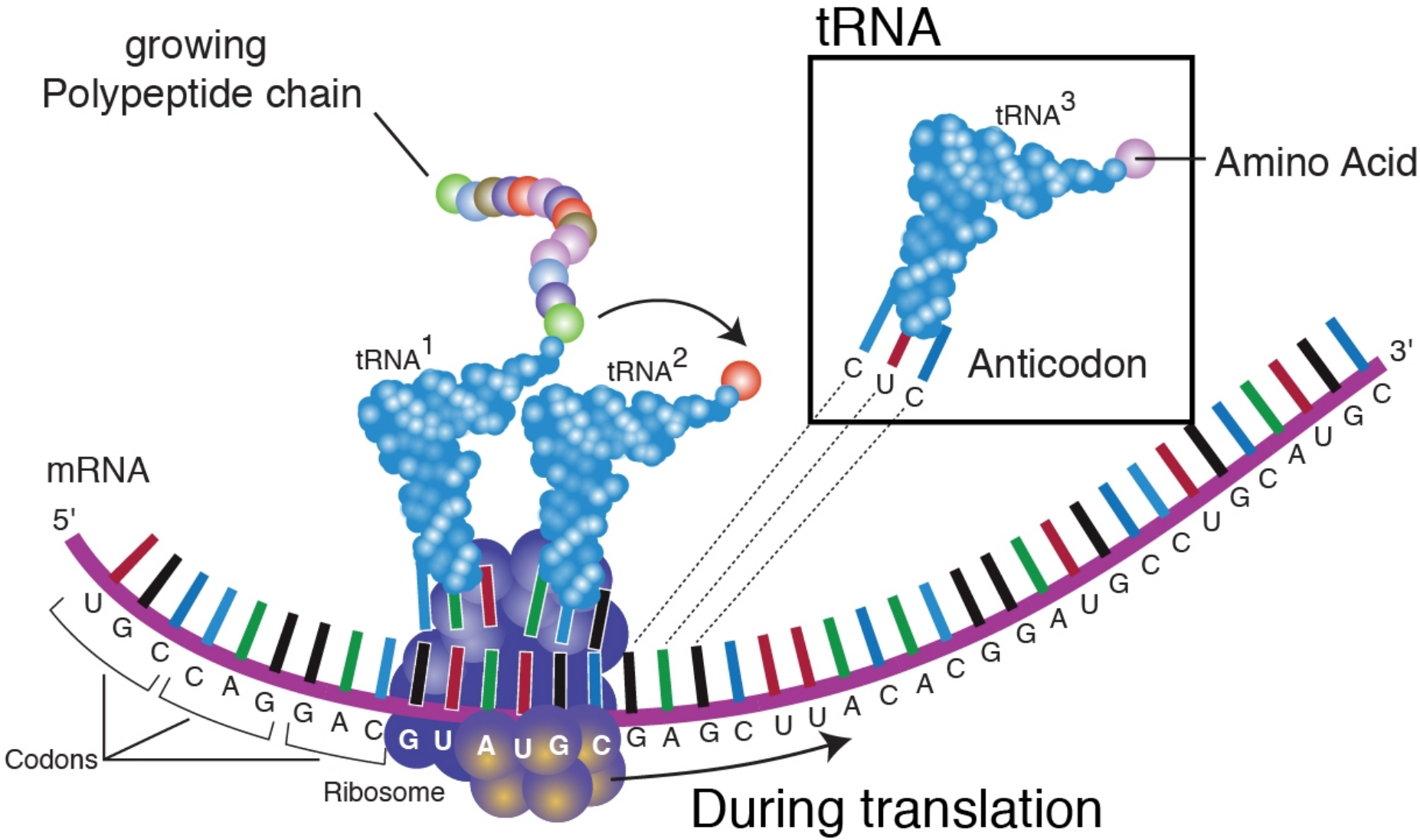
Translation

- **Übersetzen** der Basensequenz in die Aminosäuresequenz mit Hilfe von **tRNA** (transfer RNA)
- Aufbau der tRNA:

  $\Rightarrow$ **mRNA-Bindungsstelle** bestehend aus einem Basentriplett

  $\Rightarrow$ trägt die **korrespondierende Aminosäure** (AS), die nach dem genetischen Code der mRNA-Bindungsstelle entspricht
- von der Startsequenz ausgehend werden die tRNAs mit komplementärer Bindungsstelle nacheinander an die mRNA gebunden, dadurch wird ihre AS gelöst und an die AS der nachfolgenden tRNA gebunden $\Rightarrow$ es entsteht eine **Aminosäuresequenz**

Proteinbiosyntese



Bildquelle: [4]

DNA-Replikation

Natürlicher Vorgang zur Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung:

1. Entwindung der DNA (**Topoisomerasen**)

DNA-Replikation

Natürlicher Vorgang zur Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung:

1. Entwindung der DNA (**Topoisomerasen**)
2. Auftrennung des DNA-Doppelstrangs (**Helikase**)

DNA-Replikation

Natürlicher Vorgang zur Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung:

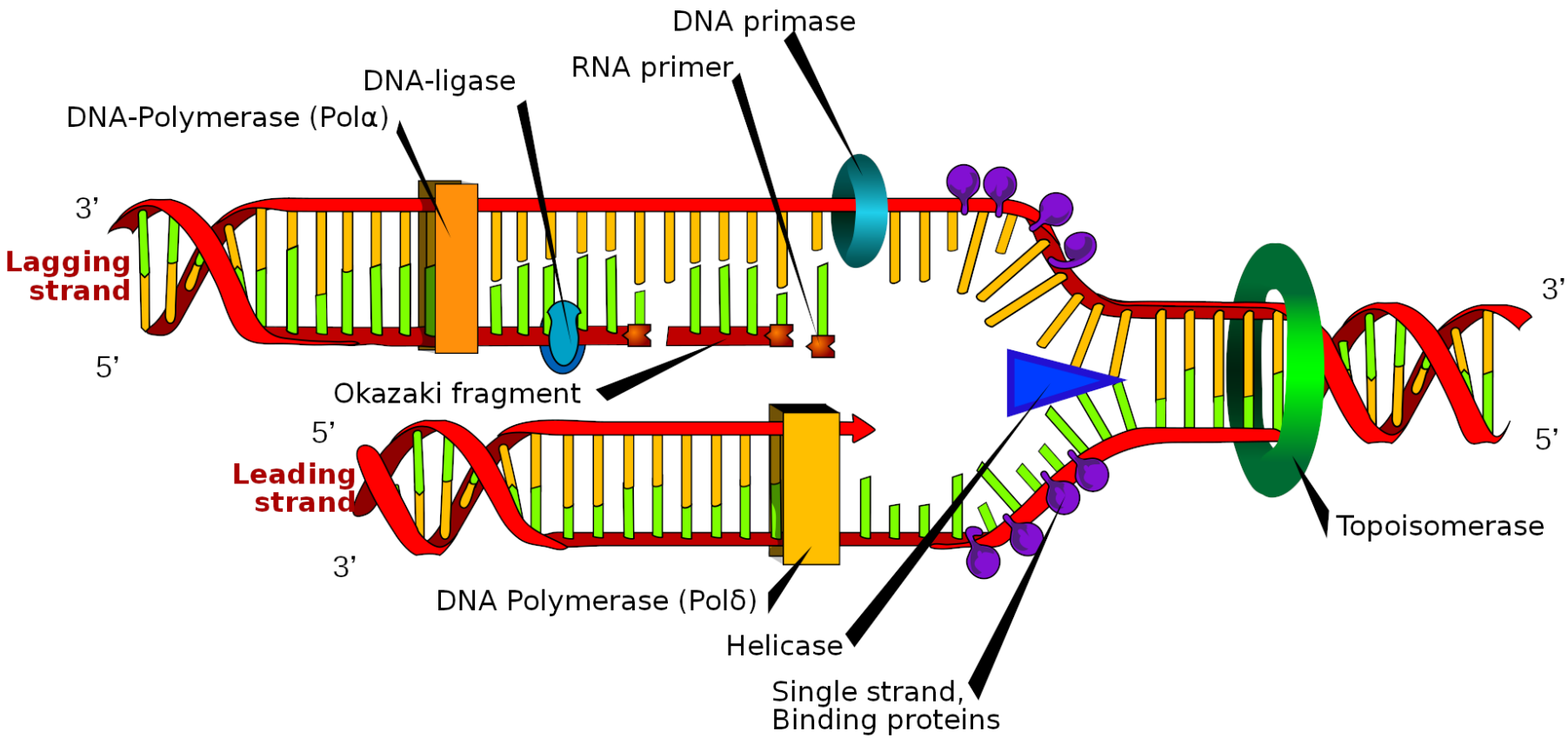
1. Entwindung der DNA (**Topoisomerasen**)
2. Auftrennung des DNA-Doppelstrangs (**Helikase**)
3. Synthese der RNA-Primer (**Primasen**)

DNA-Replikation

Natürlicher Vorgang zur Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung:

1. Entwindung der DNA (**Topoisomerasen**)
2. Auftrennung des DNA-Doppelstrangs (**Helikase**)
3. Synthese der RNA-Primer (**Primasen**)
4. Kopieren der beiden Elternstränge ausgehend von den RNA-Primern (**DNA-Polymerasen**)

DNA-Replikation



Bildquelle: [5]

DNA-Replikation

Natürlicher Vorgang zur Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung:

1. Entwindung der DNA (**Topoisomerasen**)
2. Auftrennung des DNA-Doppelstrangs (**Helikase**)
3. Synthese der RNA-Primer (**Primasen**)
4. Kopieren der beiden Elternstränge ausgehend von den RNA-Primern (**DNA-Polymerasen**)

DNA-Replikation

Natürlicher Vorgang zur Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung:

1. Entwindung der DNA (**Topoisomerasen**)
2. Auftrennung des DNA-Doppelstrangs (**Helikase**)
3. Synthese der RNA-Primer (**Primasen**)
4. Kopieren der beiden Elternstränge ausgehend von den RNA-Primern (**DNA-Polymerasen**)

   $\Rightarrow$ es entstehen zwei komplementäre Tochterstränge

DNA-Replikation

Natürlicher Vorgang zur Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung:

1. Entwindung der DNA (**Topoisomerasen**)
2. Auftrennung des DNA-Doppelstrangs (**Helikase**)
3. Synthese der RNA-Primer (**Primasen**)
4. Kopieren der beiden Elternstränge ausgehend von den RNA-Primern (**DNA-Polymerasen**)

   $\Rightarrow$ es entstehen zwei komplementäre Tochterstränge

   $\Rightarrow$ kontinuierliche Synthese des Leitstrangs

DNA-Replikation

Natürlicher Vorgang zur Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung:

1. Entwindung der DNA (**Topoisomerasen**)
2. Auftrennung des DNA-Doppelstrangs (**Helikase**)
3. Synthese der RNA-Primer (**Primasen**)
4. Kopieren der beiden Elternstränge ausgehend von den RNA-Primern (**DNA-Polymerasen**)

   $\Rightarrow$ es entstehen zwei komplementäre Tochterstränge

   $\Rightarrow$ kontinuierliche Synthese des Leitstrangs

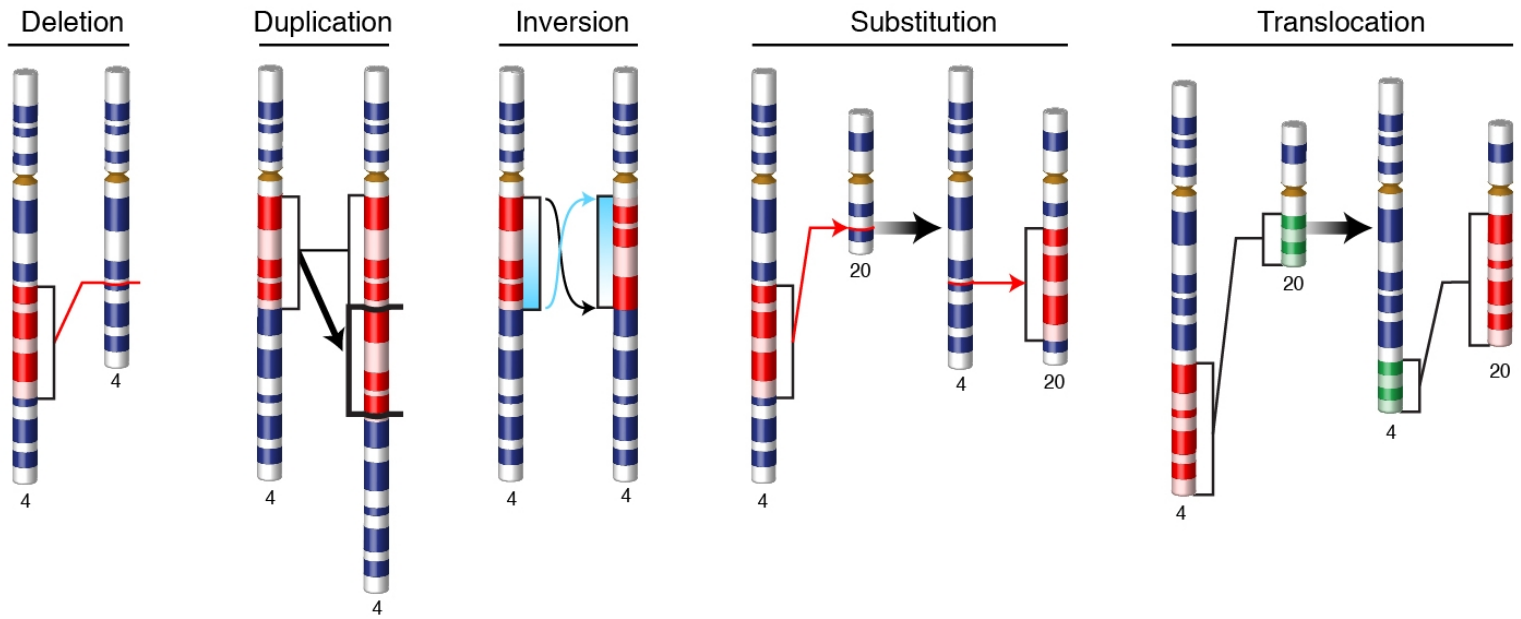
   $\Rightarrow$ diskontinuierliche Synthese des Folgestrangs (Okazaki-Fragmente)

DNA-Replikation

Natürlicher Vorgang zur Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung:

1. Entwindung der DNA (**Topoisomerasen**)
2. Auftrennung des DNA-Doppelstrangs (**Helikase**)
3. Synthese der RNA-Primer (**Primasen**)
4. Kopieren der beiden Elternstränge ausgehend von den RNA-Primern (**DNA-Polymerasen**)
   - $\Rightarrow$ es entstehen zwei komplementäre Tochterstränge
   - $\Rightarrow$ kontinuierliche Synthese des Leitstrangs
   - $\Rightarrow$ diskontinuierliche Synthese des Folgestrangs (Okazaki-Fragmente)
5. Verbindung der Okazaki-Fragmente des Folgestrangs (**Ligase**)

Mutationen

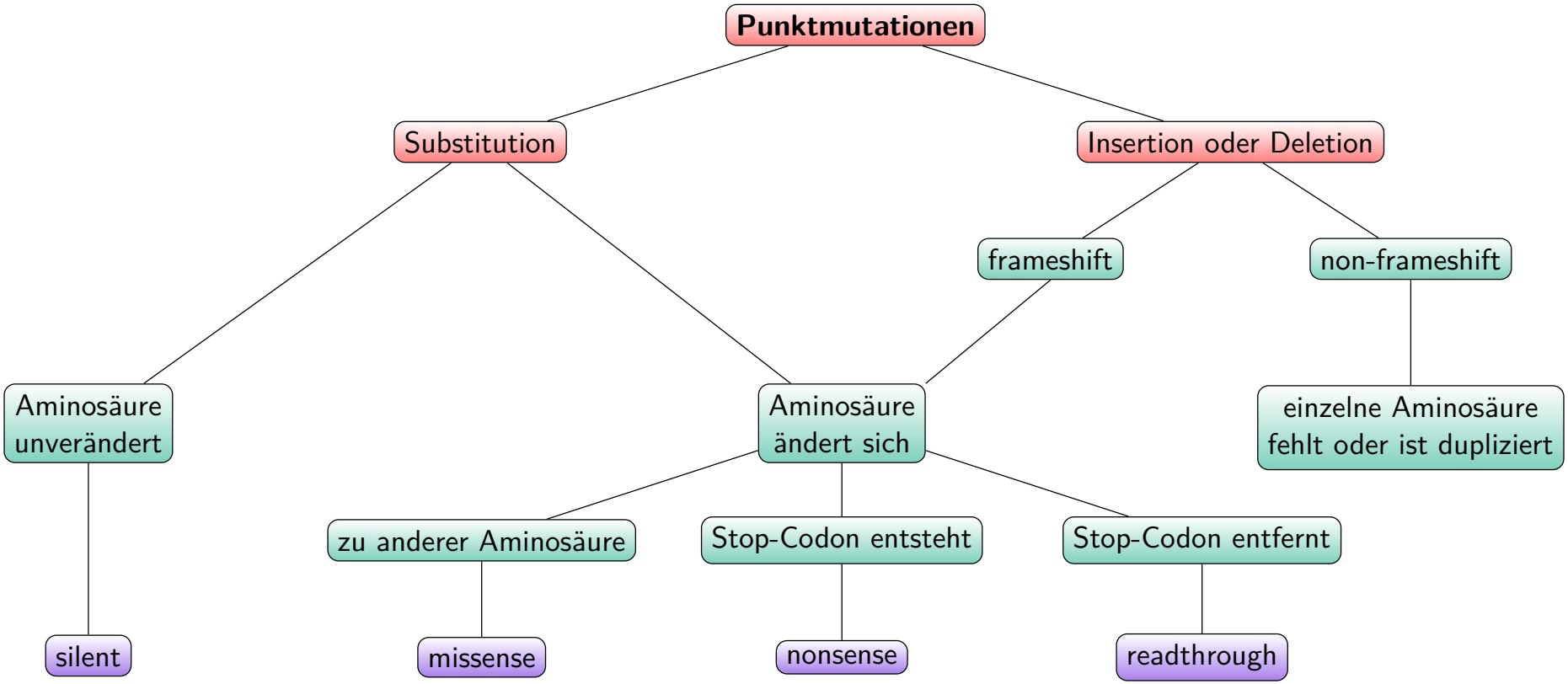


Bildquelle: [6]

Mutationen

Bildquelle: [6]

Mutationen


Punktmutationen
Substitution
Insertion oder Deletion
frameshift
non-frameshift
Aminosäure unverändert
Aminosäure ändert sich
einzelne Aminosäure fehlt oder ist dupliziert
zu anderer Aminosäure
Stop-Codon entsteht
Stop-Codon entfernt
silent
missense
nonsense
readthrough

Folgen von Mutationen

- Loss-of-function-Mutationen
- Gain-of-function-Mutationen

Folgen von Mutationen

- Loss-of-function-Mutationen
- Gain-of-function-Mutationen

Varianten

- oft Varianten einzelner Basen: SNPs (single nucleotide polymorphism)
- ohne pathologische Auswirkungen
- vermehrtes Auftreten innerhalb einer Spezies

Folgen von Mutationen

- Loss-of-function-Mutationen
- Gain-of-function-Mutationen

Varianten

- oft Varianten einzelner Basen: SNPs (single nucleotide polymorphism)
- ohne pathologische Auswirkungen
- vermehrtes Auftreten innerhalb einer Spezies

Allele, Locus, Ploidie und Genotyp

- **Allele**: verschiedene Varianten eines genomischen Ortes (**Locus**)
- **Ploidie**: Anzahl der Chromosomensätze (**homologe Chromosomen**)
- **Genotyp**:

  $\Rightarrow$ **Homozygotie**: an einem Locus liegt auf allen homologen Chromosomen das gleiche Allel vor

  $\Rightarrow$ **Heterozygotie**: die homologen Chromosomen weisen an einem Locus unterschiedliche Allele auf

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten
- mehrere Zyklen der folgenden temperaturabhängigen Schritte:

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten
- mehrere Zyklen der folgenden temperaturabhängigen Schritte:
  1. **Denaturierung**: durch Erhitzen wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgespalten (96°C)

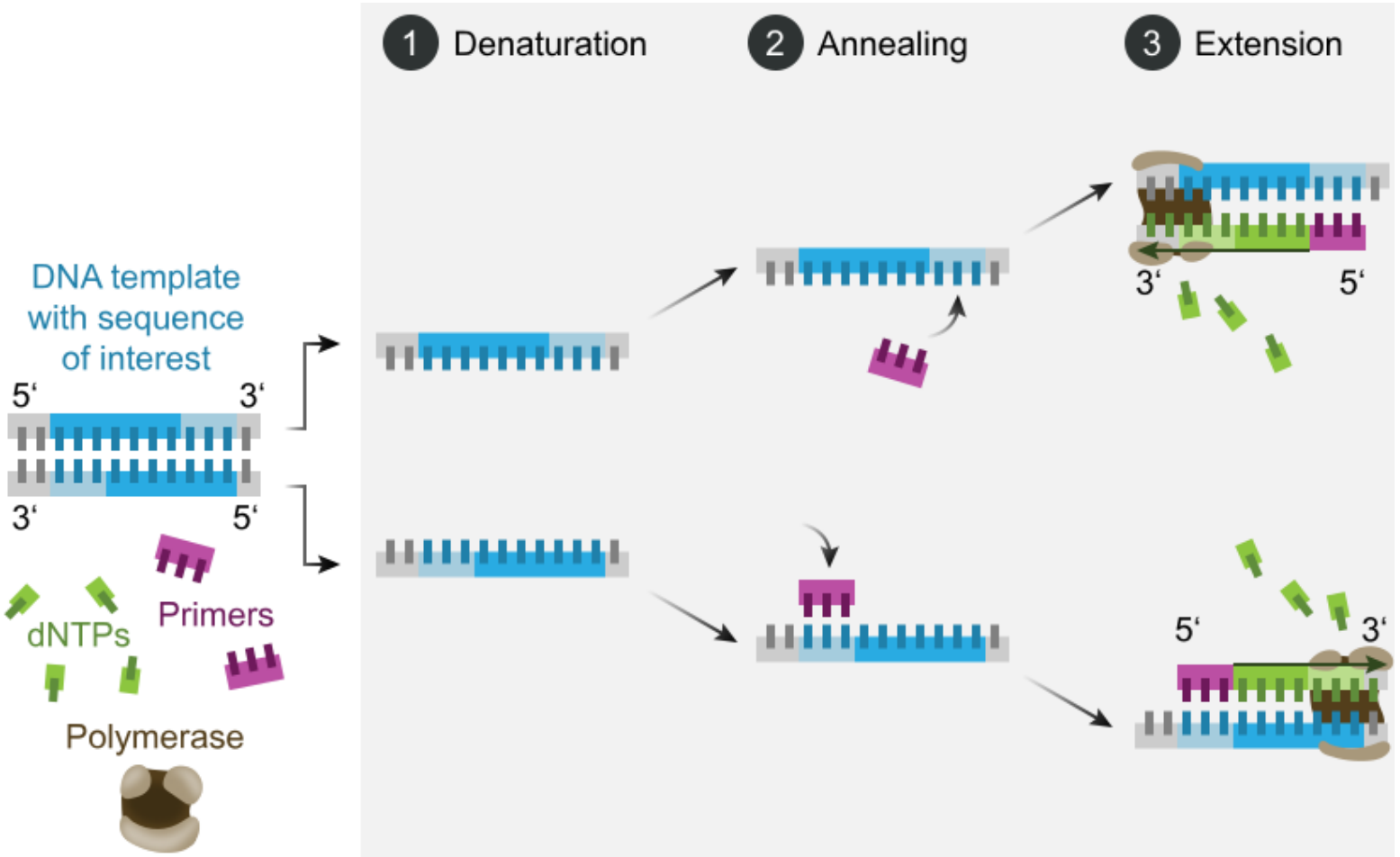
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten
- mehrere Zyklen der folgenden temperaturabhängigen Schritte:
  1. **Denaturierung**: durch Erhitzen wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgespalten (96°C)
  2. **Annealing**: Primerbindung an den 3'-Enden der zu amplifizierenden Gensequenz beider Einzelstränge (55-65°C)

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten
- mehrere Zyklen der folgenden temperaturabhängigen Schritte:
  1. **Denaturierung**: durch Erhitzen wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgespalten (96°C)
  2. **Annealing**: Primerbindung an den 3'-Enden der zu amplifizierenden Gensequenz beider Einzelstränge (55-65°C)
  3. **Elongation**: DNA-Synthese der komplementären Stränge (72°C)

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



Bildquelle: [7]

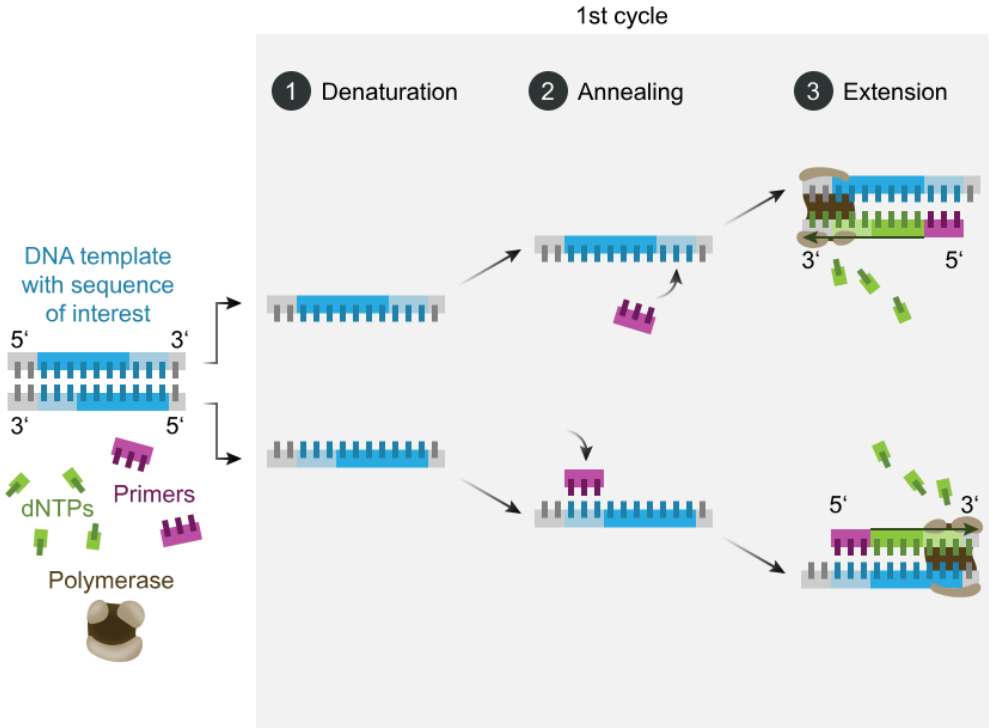
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten
- mehrere Zyklen der folgenden temperaturabhängigen Schritte:
  1. **Denaturierung**: durch Erhitzen wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgespalten (96°C)
  2. **Annealing**: Primerbindung an den 3'-Enden der zu amplifizierenden Gensequenz beider Einzelstränge (55-65°C)
  3. **Elongation**: DNA-Synthese der komplementären Stränge (72°C)

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

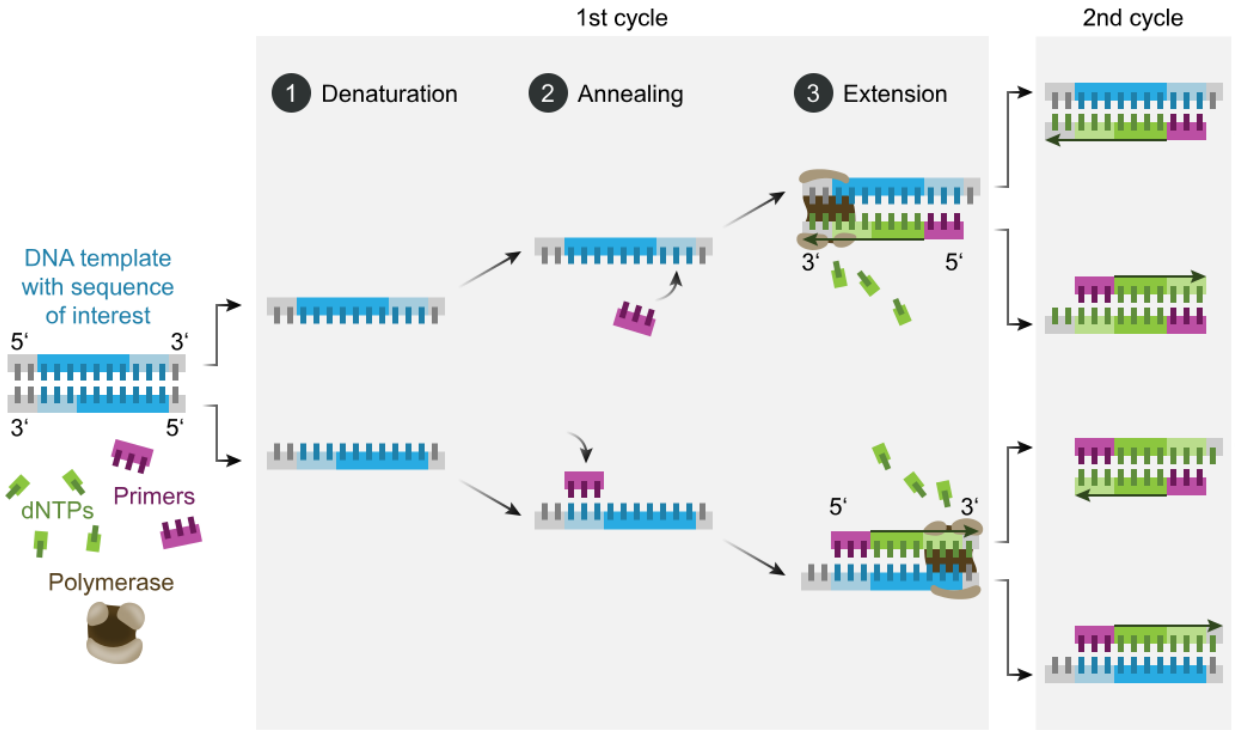
- Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten
- mehrere Zyklen der folgenden temperaturabhängigen Schritte:
  1. **Denaturierung**: durch Erhitzen wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgespalten (96°C)
  2. **Annealing**: Primerbindung an den 3'-Enden der zu amplifizierenden Gensequenz beider Einzelstränge (55-65°C)
  3. **Elongation**: DNA-Synthese der komplementären Stränge (72°C)
- mit jedem Zyklus wird die betreffende Sequenz verdoppelt
- in Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten Zyklen n exponentieller Anstieg der Kopien 2^n

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



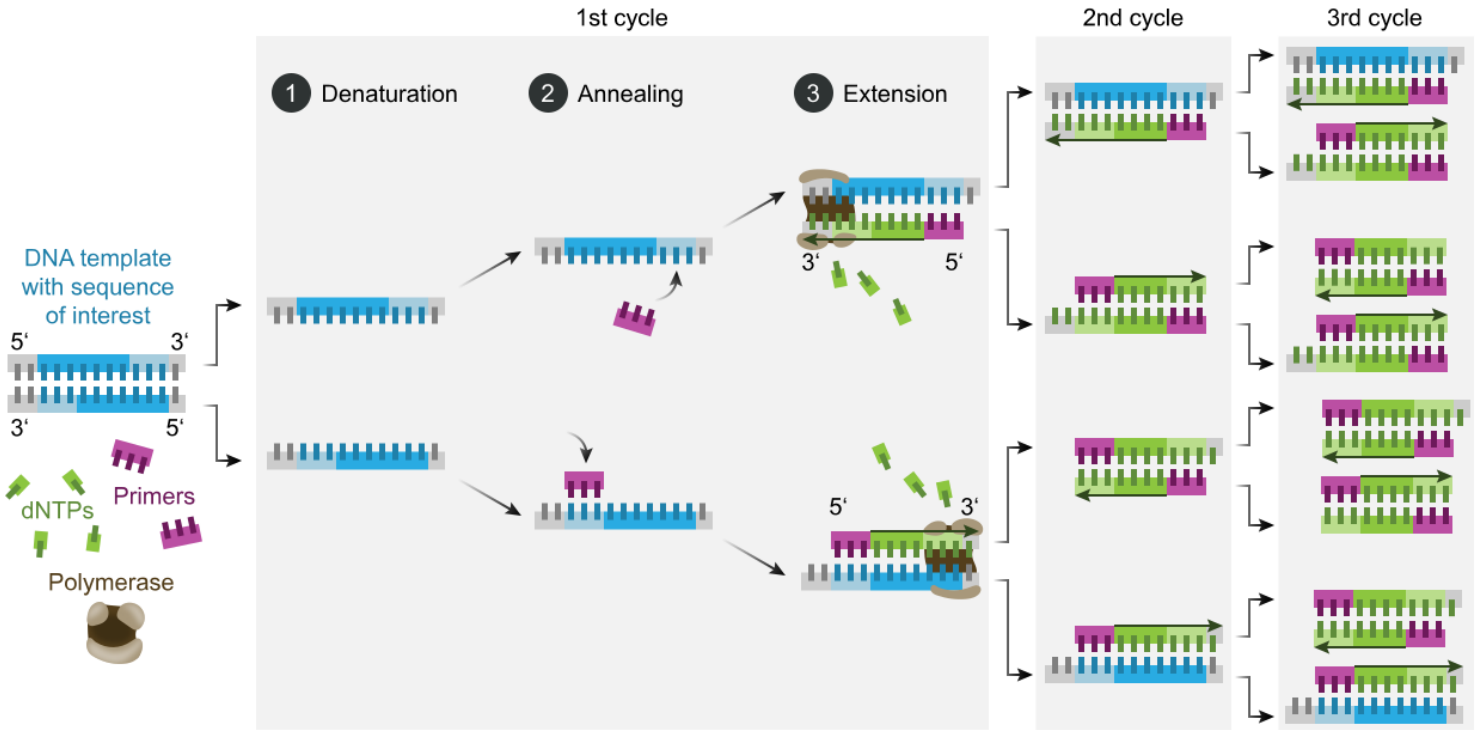
Bildquelle: [7]

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



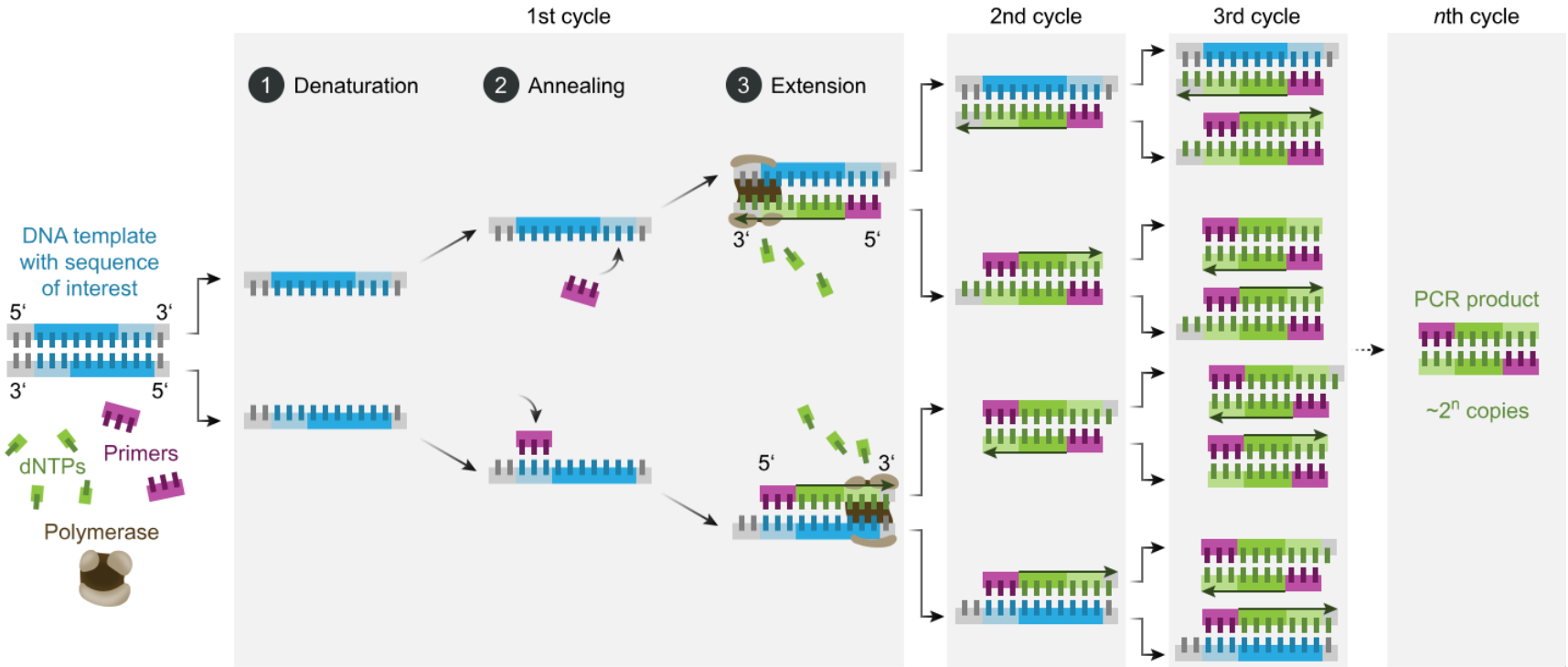
Bildquelle: [7]

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



Bildquelle: [7]

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



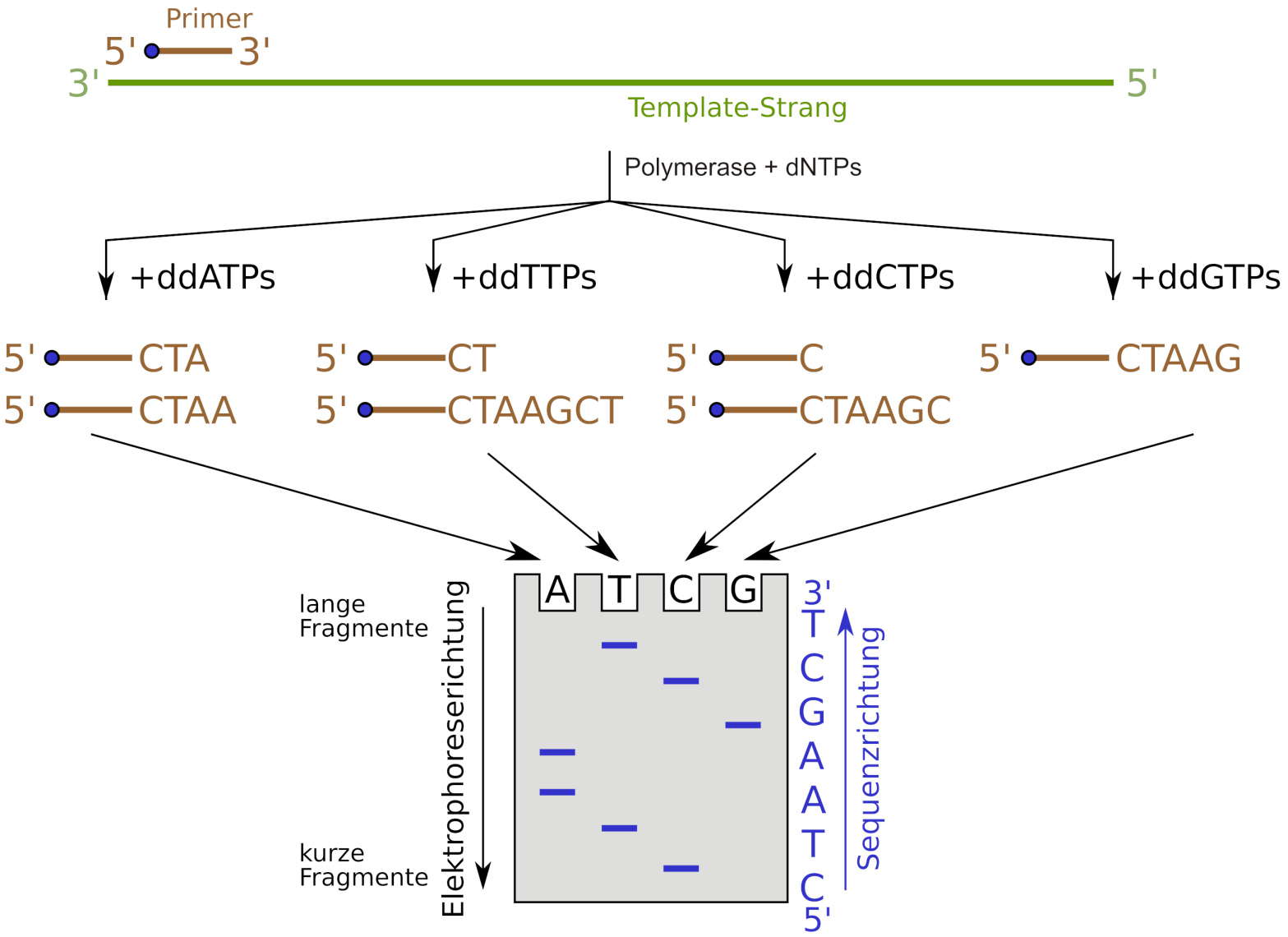
Bildquelle: [7]

Sequenzierung

Sanger-Sequenzierung

Kettenabbruch-Synthese mit vier Probenansätzen denen jeweils eine der vier möglichen Nukleotide in modifizierter Form beigefügt wird

Sequenzierung



Bildquelle: [8]

Sequenzierung

Sanger-Sequenzierung

Kettenabbruch-Synthese mit vier Probenansätzen denen jeweils eine der vier möglichen Nukleotide in modifizierter Form beigefügt wird

Sequenzierung

Sanger-Sequenzierung

Kettenabbruch-Synthese mit vier Probenansätzen denen jeweils eine der vier möglichen Nukleotide in modifizierter Form beigefügt wird

NGS-Sequenzierung

verbesserte Sequenziertechnologien im Hochdurchsatzverfahren

Sequenzierung

Sanger-Sequenzierung

Kettenabbruch-Synthese mit vier Probenansätzen denen jeweils eine der vier möglichen Nukleotide in modifizierter Form beigefügt wird

NGS-Sequenzierung

verbesserte Sequenziertechnologien im Hochdurchsatzverfahren

RAD-Sequenzierung

- restriction site associated DNA sequencing
- **Anwendung**: Populationsgenetik, Ökologie, Genotypisierung, Evolutionsforschung
- Sequenzierung multipler kleiner DNA-Fragmente aus dem gesamten Genom
- gleichzeitige Analyse mehrerer Individuen in gepoolten Proben
- benötigt kein Referenzgenom

RAD-Verfahren

Restriktionsenzyme

- molekulare Scheren, welche die DNA an spezifischen Sequenzen schneiden
- Enden können glatt oder versetzt sein

RAD-Verfahren

Restriktionsenzyme

- molekulare Scheren, welche die DNA an spezifischen Sequenzen schneiden
- Enden können glatt oder versetzt sein

Bildquelle: [9]

RAD-Verfahren

Restriktionsenzyme

- molekulare Scheren, welche die DNA an spezifischen Sequenzen schneiden
- Enden können glatt oder versetzt sein

Bildquelle: [10]

RAD-Verfahren

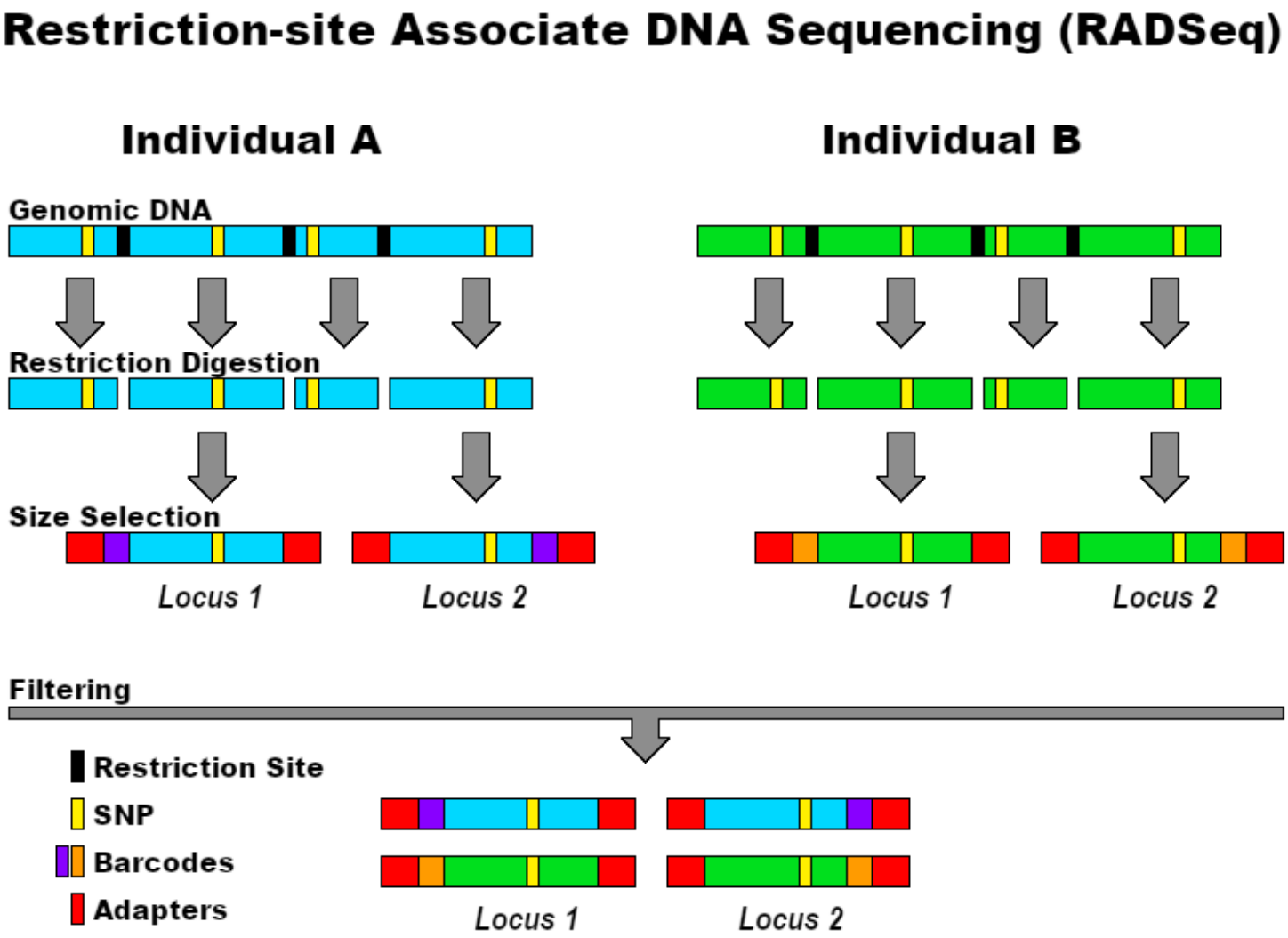
Restriktionsenzyme

- molekulare Scheren, welche die DNA an spezifischen Sequenzen schneiden
- Enden können glatt oder versetzt sein

Methode

1. **DNA-Verdau** durch Restriktionsenzyme
2. Sequenz der Restriktionsstelle ist bekannt, dies ermöglicht die Bindung der **Adapter-** und **Barcodesequenzen**
3. **Größenselektion** der DNA-Fragmente
4. **Sequenzierung** der gepoolten Proben verschiedener Individuen

RAD-Verfahren



Bildquelle: [11] (modifiziert)

RAD-Verfahren

Restriktionsenzyme

- molekulare Scheren, welche die DNA an spezifischen Sequenzen schneiden
- Enden können glatt oder versetzt sein

Methode

1. **DNA-Verdau** durch Restriktionsenzyme
2. Sequenz der Restriktionsstelle ist bekannt, dies ermöglicht die Bindung der **Adapter-** und **Barcodesequenzen**
3. **Größenselektion** der DNA-Fragmente
4. **Sequenzierung** der gepoolten Proben verschiedener Individuen

RAD-Verfahren

Restriktionsenzyme

- molekulare Scheren, welche die DNA an spezifischen Sequenzen schneiden
- Enden können glatt oder versetzt sein

Methode

1. **DNA-Verdau** durch Restriktionsenzyme
2. Sequenz der Restriktionsstelle ist bekannt, dies ermöglicht die Bindung der **Adapter**- und **Barcodesequenzen**
3. **Größenselektion** der DNA-Fragmente
4. **Sequenzierung** der gepoolten Proben verschiedener Individuen

ddRADSeq (double digest RAD sequencing)

- Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen
- bessere Steuerbarkeit und höhere Genauigkeit

RADSeq-Verfahren

- durch die **Sequenzspezifität der Restriktionsenzyme** stammen die DNA-Fragmente bei den verschiedenen Individuen meistens vom gleichen genomischen Locus
- interindividueller Vergleich ist **ohne Referenzgenom** möglich
- **gepoolte Proben**: Zeit- und Kostenersparnis, gleiche Versuchsbedingungen für die verschiedenen Individuen
- die DNA-Fragmente stammen aus dem gesamten Genom, aber **keine vollständige genomische Abdeckung**

Problemstellung

Problem:

- Reads ohne Kenntnis eines Referenzgenoms möglichen Loci zuordnen
- die Loci und ihre Sequenz sind unbekannt

Problemstellung

Problem:

- Reads ohne Kenntnis eines Referenzgenoms möglichen Loci zuordnen
- die Loci und ihre Sequenz sind unbekannt

Gegeben:

- Menge von Reads: $D = (s_1, \ldots, s_m) \in \{A, C, G, T, \}^{k^m}$
- Qualität der Sequenzierung: $Q = (q_1, \ldots, q_m) \in [0, 1]^{k^m}$
- Sequenzierfehlerraten: $\epsilon = \{\epsilon_{ins}, \epsilon_{del}\}$
- Heterozygotiewahrscheinlichkeiten: $\eta = \{\eta_{sub}, \eta_{ins}, \eta_{del}\}$
- Ploidie: ϕ

Problemstellung

Problem:

- Reads ohne Kenntnis eines Referenzgenoms möglichen Loci zuordnen
- die Loci und ihre Sequenz sind unbekannt

Gegeben:

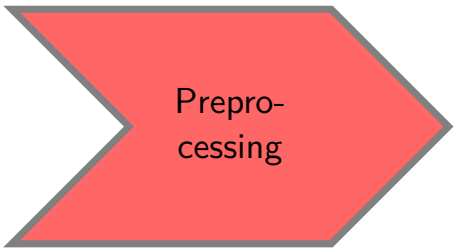
- Menge von Reads: $D = (s_1, \ldots, s_m) \in \{A, C, G, T, \}^{k^m}$
- Qualität der Sequenzierung: $Q = (q_1, \ldots, q_m) \in [0, 1]^{k^m}$
- Sequenzierfehlerraten: $\epsilon = \{\epsilon_{ins}, \epsilon_{del}\}$
- Heterozygotiewahrscheinlichkeiten: $\eta = \{\eta_{sub}, \eta_{ins}, \eta_{del}\}$
- Ploidie: ϕ

Ziel:

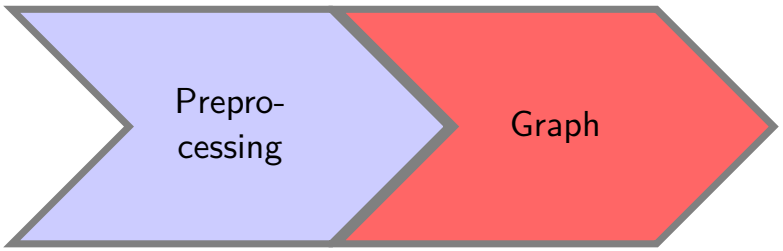
- Zuordnung der Reads zu den Loci unter Berücksichtigung von ϵ und η
- Ausgabe der Menge der ermittelten Loci mit den Sequenzen der beteiligten Allele

$\Rightarrow$ die Loci können anschließend für Diversitätsanalysen genutzt werden

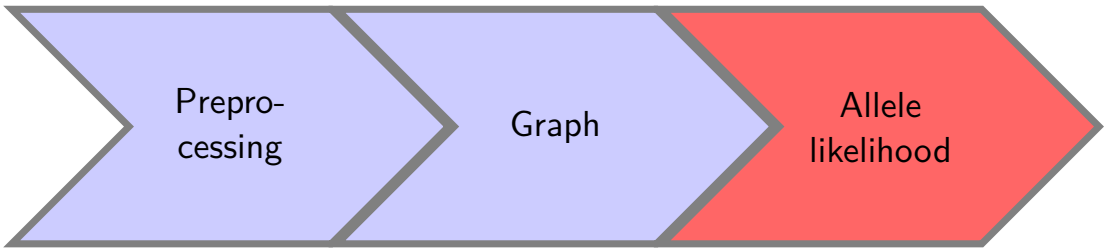
Model



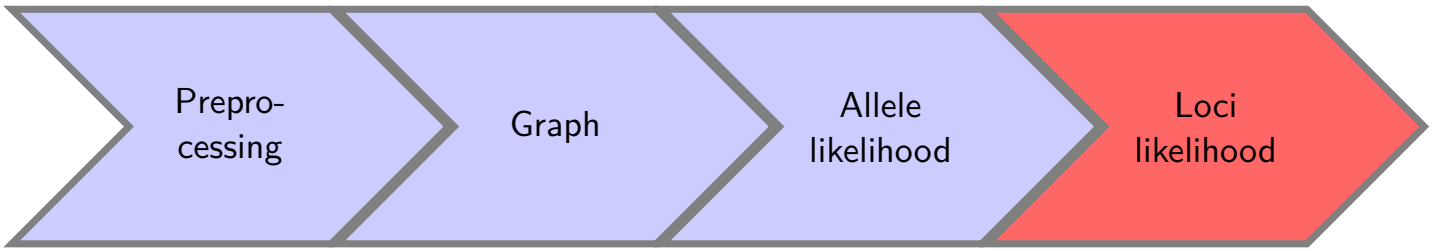
Model



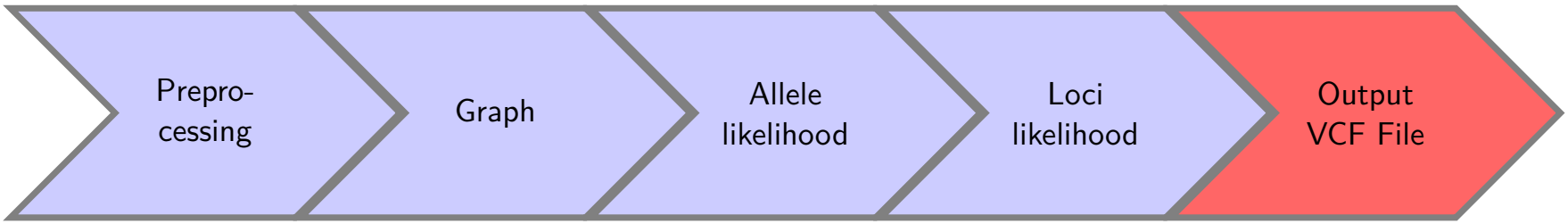
Model



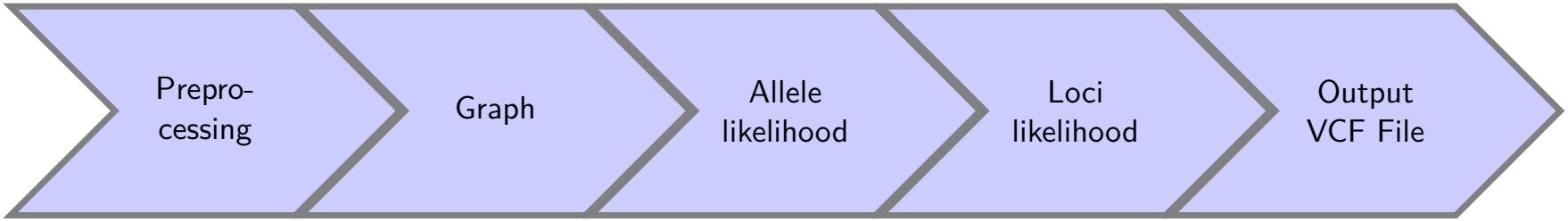
Model



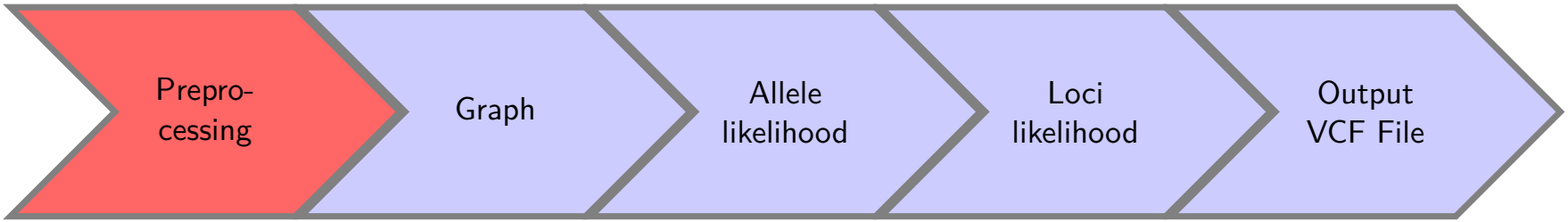
Model


Prepro-
cessing
Graph
Allele
likelihood
Loci
likelihood
Output
VCF File

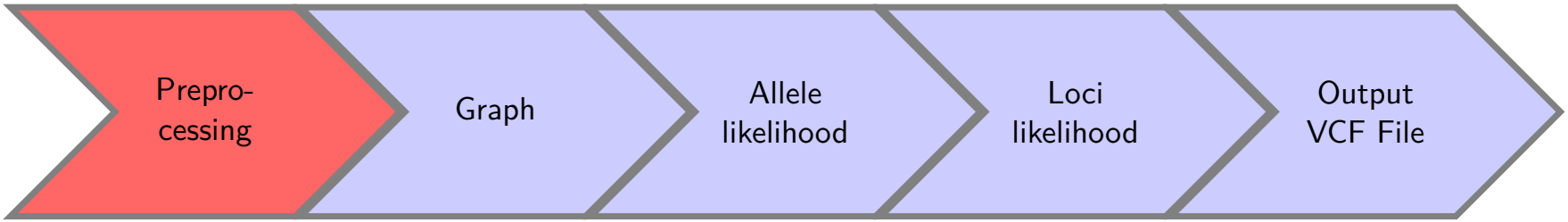
Model - Preprocessing



Model - Preprocessing

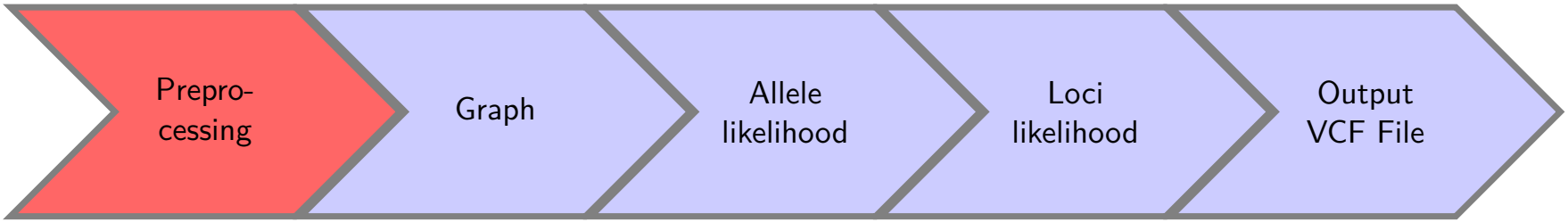


Model - Preprocessing

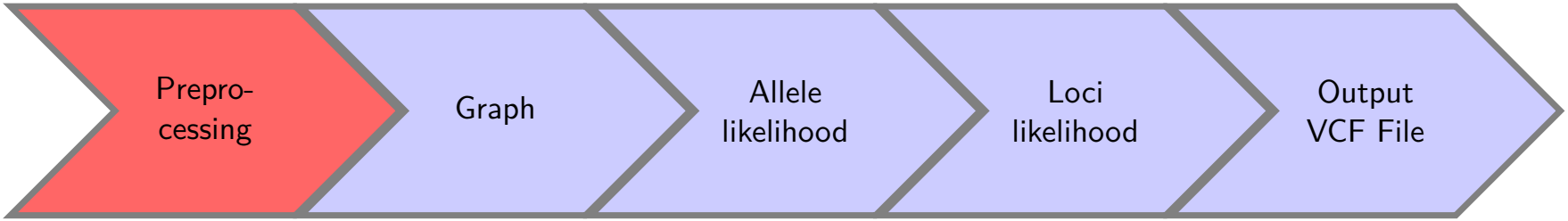


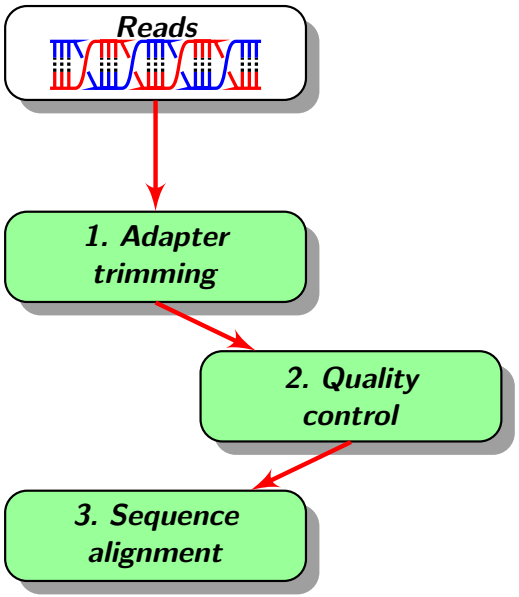
- Statistiken zur Qualität der Reads
- Individuen werden entsprechend ihres Barcodes separiert
- Entfernen der Barcode- und Adaptersequenzen
- Erzeugen eines Sequenzalignments

Implementierung - Preprocessing

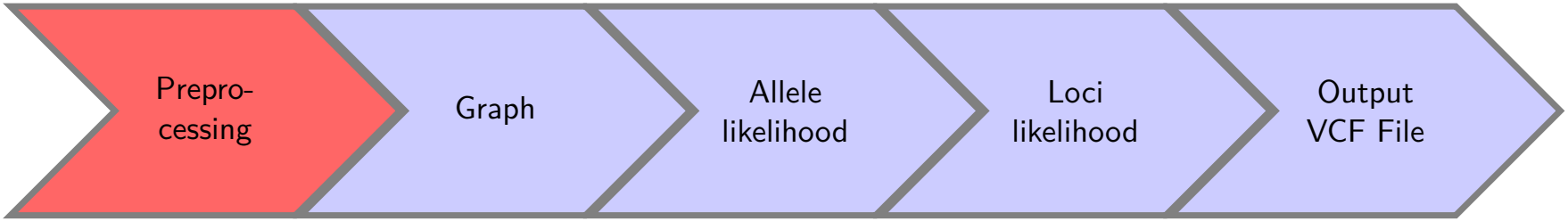


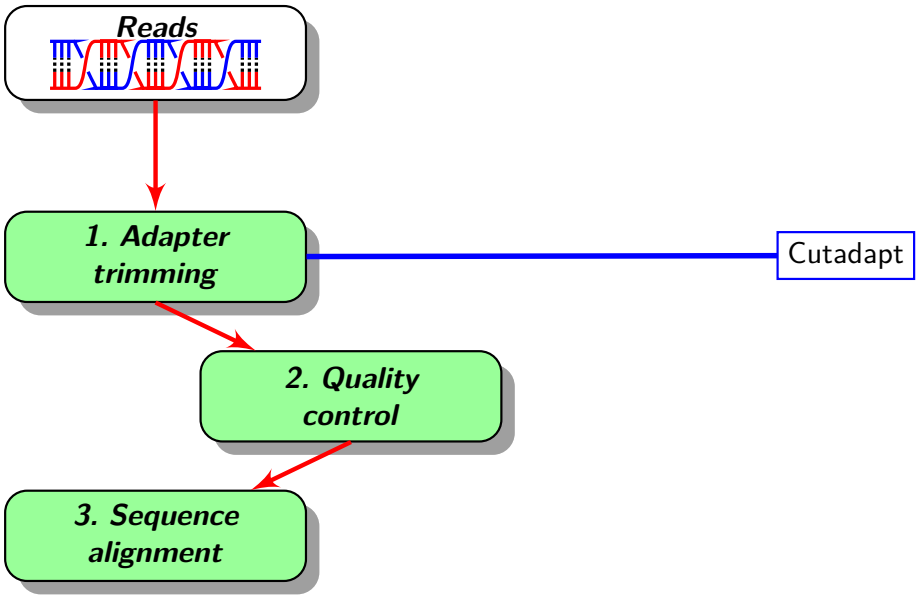
Implementierung - Preprocessing



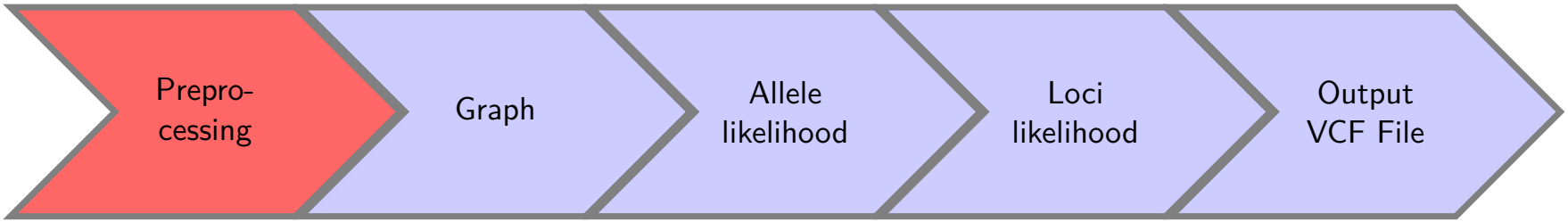


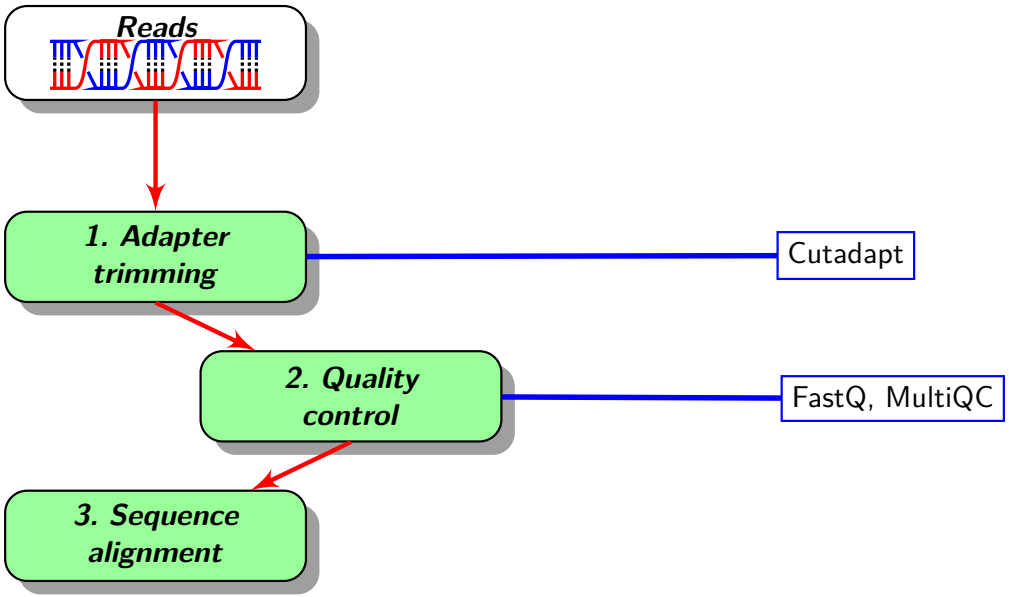
Implementierung - Preprocessing



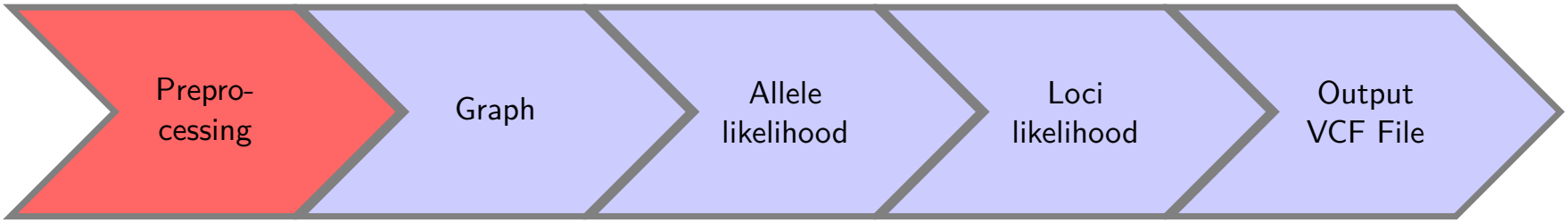


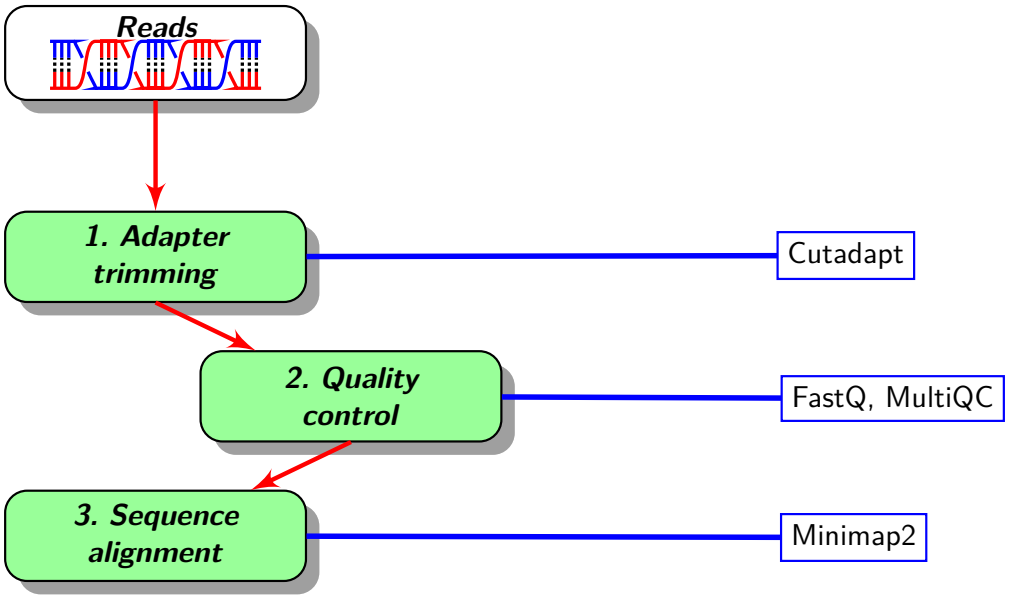
Implementierung - Preprocessing



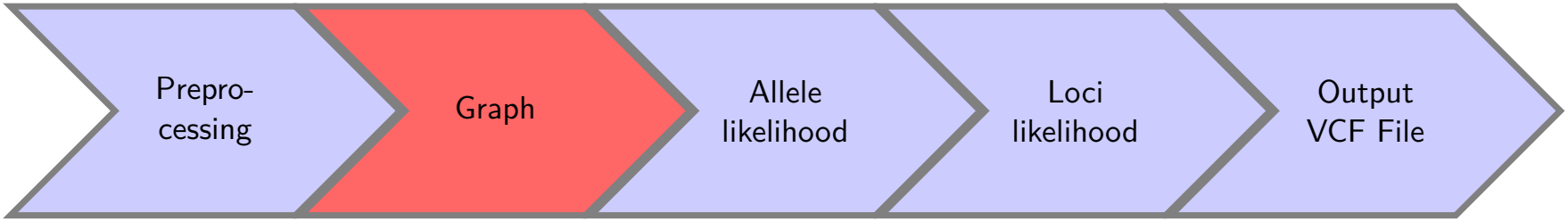


Implementierung - Preprocessing

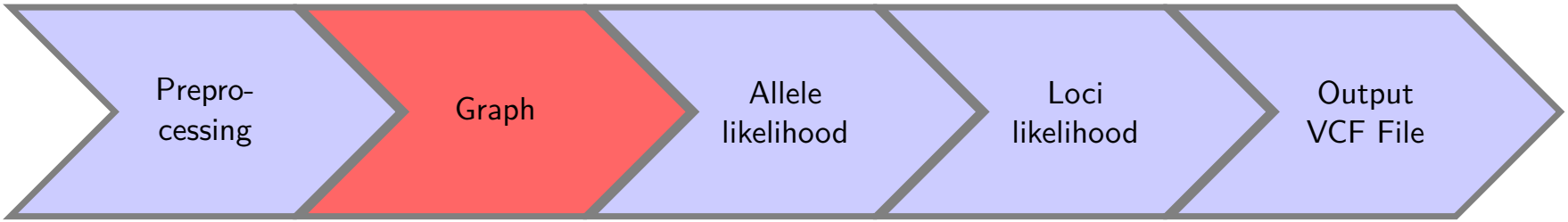




Model - Graphkonstruktion



Model - Graphkonstruktion



- das Problem wird als gerichteter Graph $G = (V, E)$ betrachtet
- die Knoten werden durch die Reads repräsentiert
- die Kanten basieren auf dem Sequenzalignment
- das Sequenzalignment wird als approximiertes pairHMM betrachtet

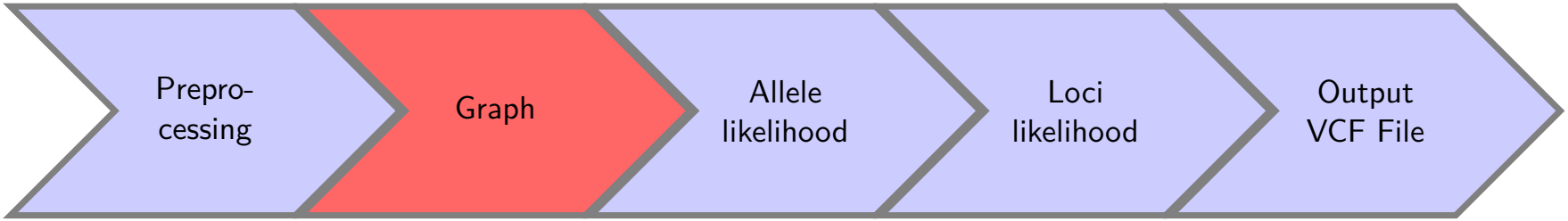
pairHMM vs. Minimap

tabelle

Likelihoodberechnung beim approximierten pairHMM

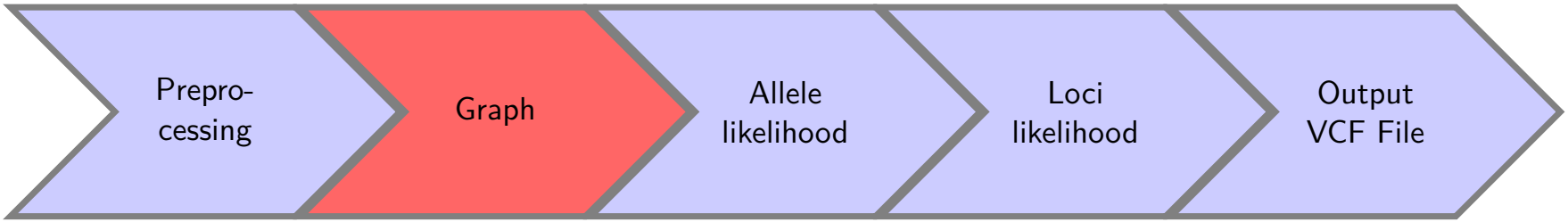
Tabelle

Model - Graphkonstruktion



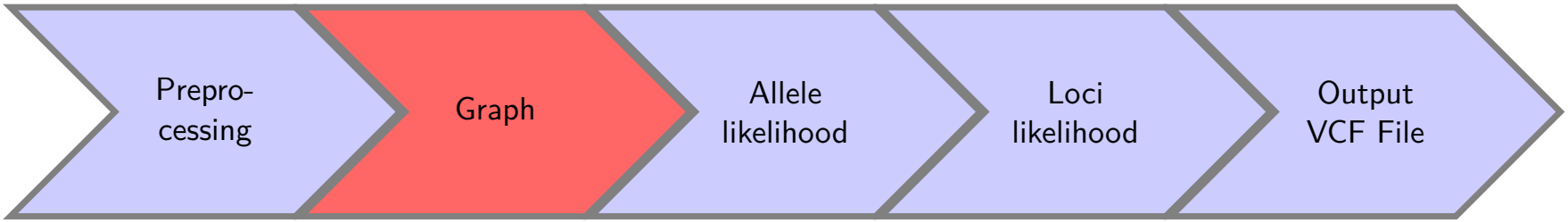
- das Problem wird als gerichteter Graph $G = (V, E)$ betrachtet
- die Knoten werden durch die Reads repräsentiert
- die Kanten basieren auf dem Sequenzalignment
- das Sequenzalignment wird als approximiertes pairHMM betrachtet

Model - Graphkonstruktion



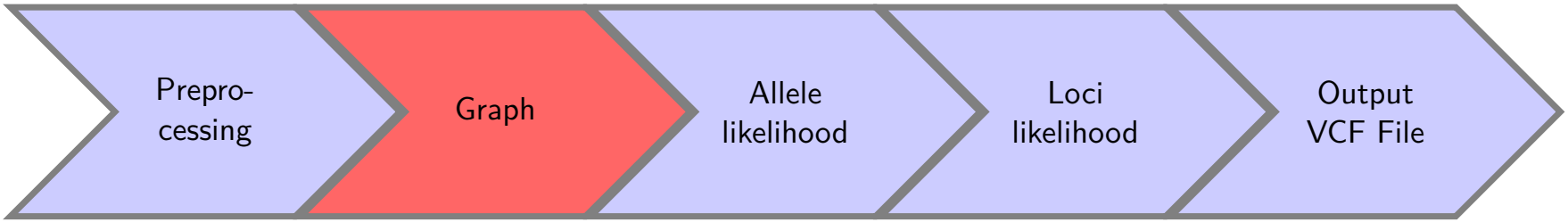
- das Problem wird als gerichteter Graph $G = (V, E)$ betrachtet
- die Knoten werden durch die Reads repräsentiert
- die Kanten basieren auf dem Sequenzalignment
- das Sequenzalignment wird als approximiertes pairHMM betrachtet
- Kanten entstehen nur zwischen Knoten deren Readsequenzen einander ähneln
- Partitionierung des Graphen in mehrere Zusammenhangskomponenten $\Rightarrow$ das Gesamtproblem wird in mehrere Teilprobleme aufgeteilt

Model - Graphkonstruktion

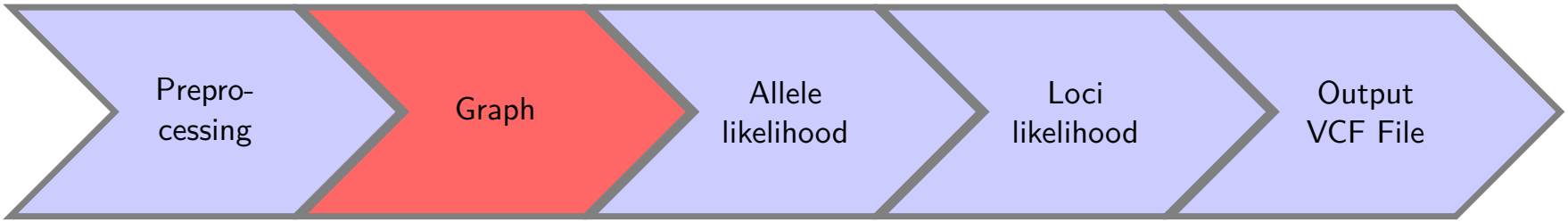


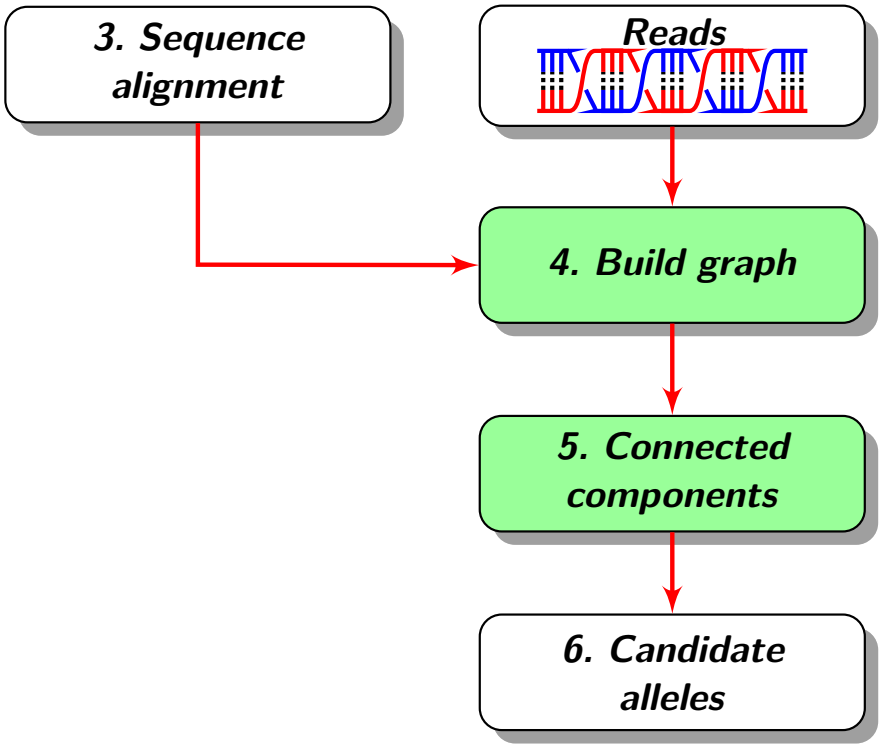
- **Grapheigenschaften**:
  - Ploidie
  - Sequenzierfehlerraten für Insertionen und Deletionen
  - Heterozygotiewahrscheinlichkeiten für Substitutionen und Indels
- **Knoteneigenschaften**:
  - ID
  - Basensequenz
  - Basenqualität
- **Kanteneigenschaften**:
  - CIGAR-Tupel
  - Edit-Distanz

Implementierung - Graphkonstruktion

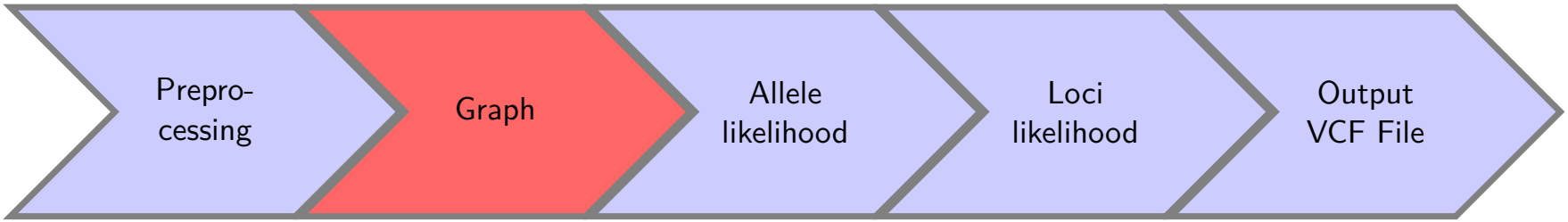


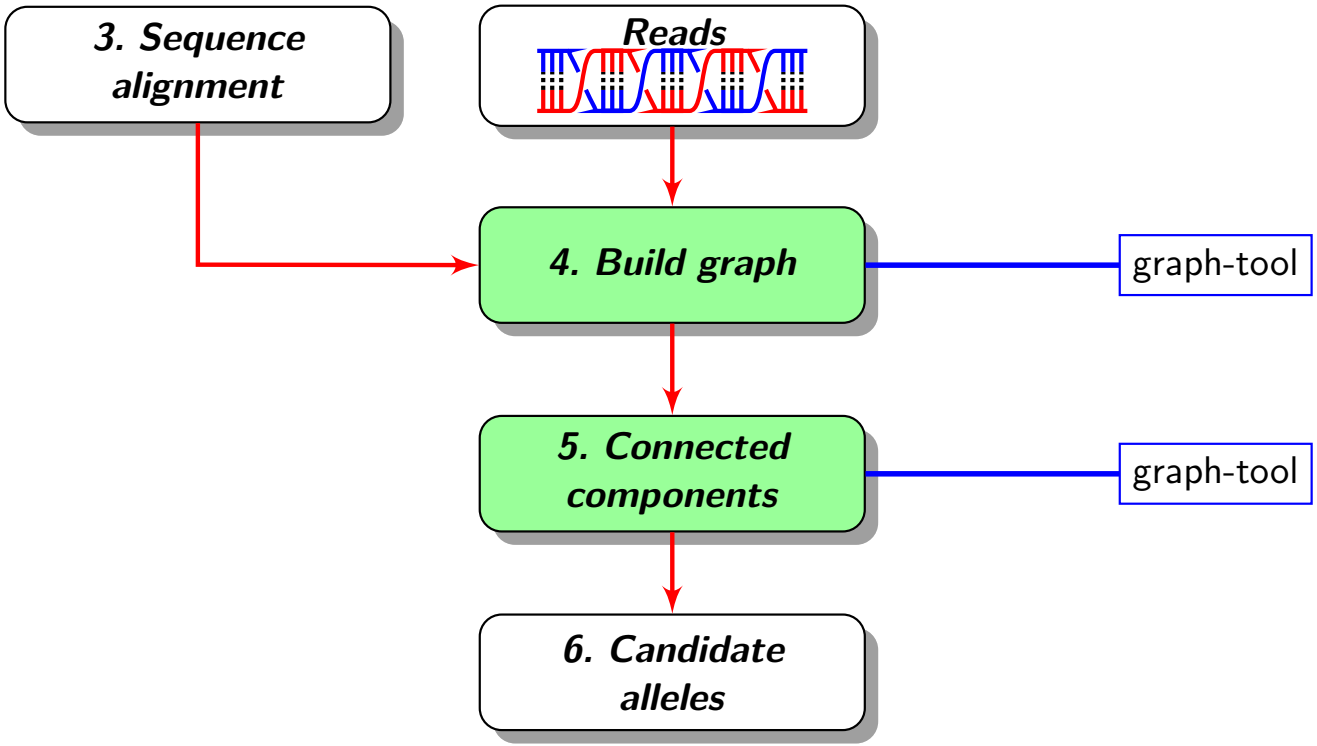
Implementierung - Graphkonstruktion



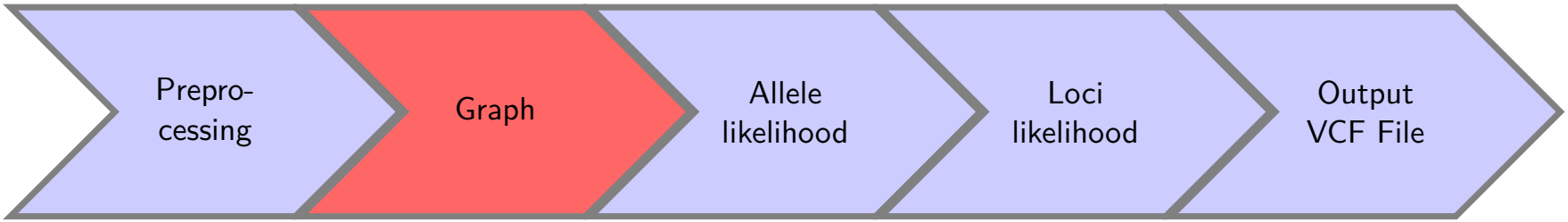


Implementierung - Graphkonstruktion





Laufzeit - Graphkonstruktion



- Erzeugung der Knoten: $O(|V|)$
- Hinzufügen der Kanten: $O(|E| \cdot |V|)$
- Zusammenhangskomponenten: $O(|V|^2 + |E|)$

$\Rightarrow$ **Gesamtlaufzeit**: $O(|V| \cdot (|V| + |E|))$

Model - Allele-Fractions

Model - Allele-Fractions

- Identifizierung der Allele, von denen die übrigen Reads der Zusammenhangskomponenten am wahrscheinlichsten durch Sequenzierfehler entstanden sind

Model - Allele-Fractions

- Identifizierung der Allele, von denen die übrigen Reads der Zusammenhangskomponenten am wahrscheinlichsten durch Sequenzierfehler entstanden sind
- Kandidatenallele und Anzahl der tatsächlich zu erwartenden Allele $n_{alleles}$ bestimmen:

$$n_{alleles} = \begin{cases} \phi, & \phi \geq n_{cand} \\ n_{cand} + \phi - d, & \phi < n_{cand} \wedge d \neq 0 \\ n_{cand}, & \phi < n_{cand} \wedge d = 0 \end{cases}$$

(es gilt $d = n_{cand} \mod \phi$)

Model - Allele-Fractions

$\Rightarrow$ aus den Kandidatenallelen **Kombinationen mit Wiederholung** der Länge $n_{alleles}$ gebildet:

Model - Allele-Fractions

$\Rightarrow$ aus den Kandidatenallelen **Kombinationen mit Wiederholung** der Länge $n_{alleles}$ gebildet:

$ploidy = 2, n_{cand} = 2, n_{alleles} = 2$:

[(0, 0), (0, 1), (1, 1)]

Model - Allele-Fractions

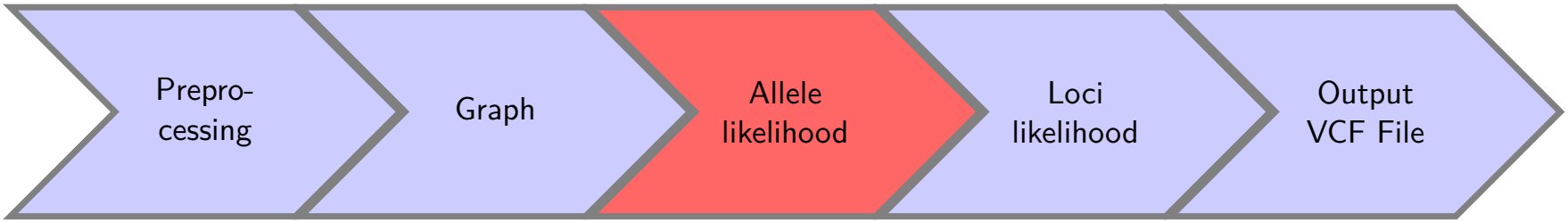
$\Rightarrow$ aus den Kandidatenallelen **Kombinationen mit Wiederholung** der Länge $n_{alleles}$ gebildet:

$ploidy = 2, n_{cand} = 2, n_{alleles} = 2$:

[(0, 0), (0, 1), (1, 1)]

$\Rightarrow$ aus den Kombinationen werden die Häufigkeitsverteilungen der Kandidatenallele (**Allele-Fractions**) bestimmt:

Model - Allele-Fractions



$\Rightarrow$ aus den Kandidatenallelen **Kombinationen mit Wiederholung** der Länge $n_{alleles}$ gebildet:

$ploidy = 2, n_{cand} = 2, n_{alleles} = 2$:

[(0, 0), (0, 1), (1, 1)]

$\Rightarrow$ aus den Kombinationen werden die Häufigkeitsverteilungen der Kandidatenallele (**Allele-Fractions**) bestimmt:

$ploidy = 2, n_{cand} = 2, n_{alleles} = 2$:

[1.0, 0.0], [0.5, 0.5], [0.0, 1.0]

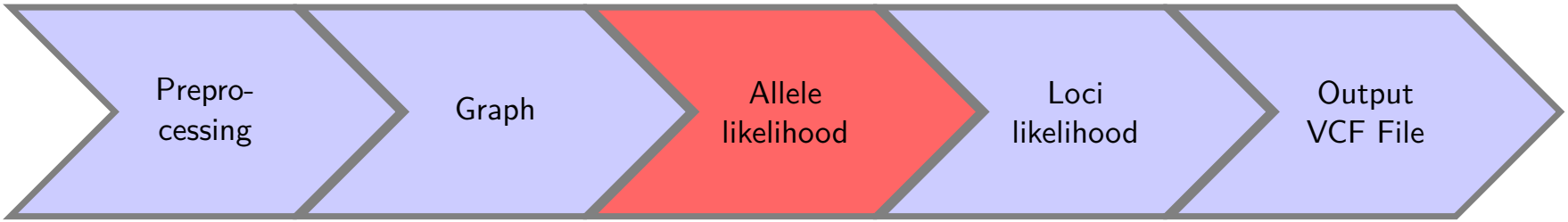
Model - Allele-Fractions

Allelkombinationen:

$ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

[(0, 0, 0, 0), (0, 0, 0, 1), (0, 0, 0, 2), (0, 0, 1, 1), (0, 0, 1, 2),
(0, 0, 2, 2), (0, 1, 1, 1), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 2, 2), (0, 2, 2, 2),
(1, 1, 1, 1), (1, 1, 1, 2), (1, 1, 2, 2), (1, 2, 2, 2), (2, 2, 2, 2)]

Model - Allele-Fractions



Allelkombinationen:

$ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

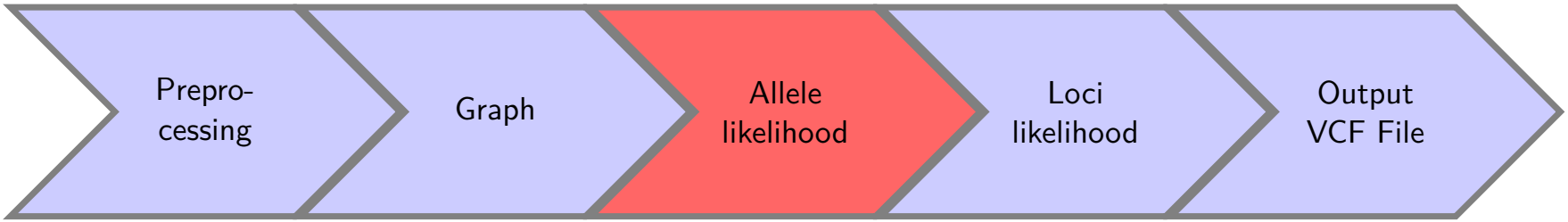
[(0, 0, 0, 0), (0, 0, 0, 1), (0, 0, 0, 2), (0, 0, 1, 1), (0, 0, 1, 2),
(0, 0, 2, 2), (0, 1, 1, 1), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 2, 2), (0, 2, 2, 2),
(1, 1, 1, 1), (1, 1, 1, 2), (1, 1, 2, 2), (1, 2, 2, 2), (2, 2, 2, 2)]

Allele-Fractions:

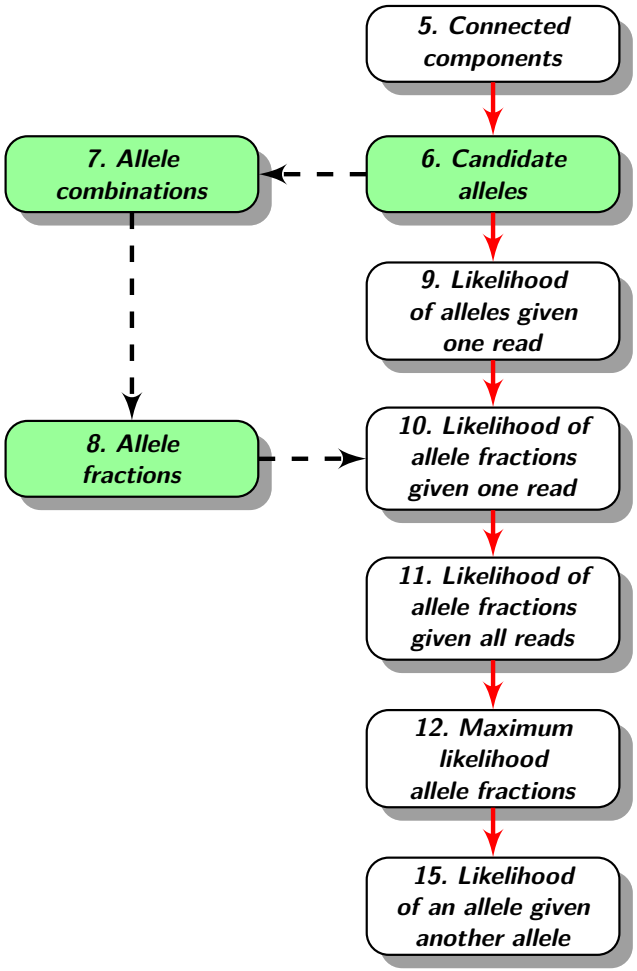
$ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

[1.0, 0.0, 0.0], [0.75, 0.25, 0.0], [0.75, 0.0, 0.25], [0.5, 0.5, 0.0],
[0.5, 0.25, 0.25], [0.5, 0.0, 0.5], [0.25, 0.75, 0.0], [0.25, 0.5, 0.25],
[0.25, 0.25, 0.5], [0.25, 0.0, 0.75], [0.0, 1.0, 0.0], [0.0, 0.75, 0.25],
[0.0, 0.5, 0.5], [0.0, 0.25, 0.75], [0.0, 0.0, 1.0]

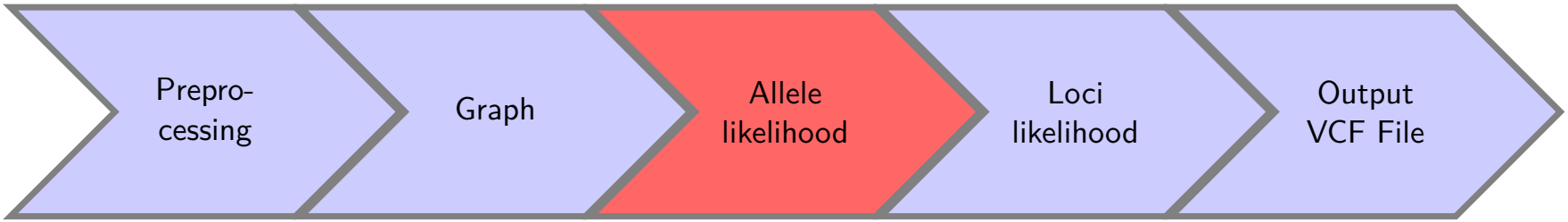
Implementierung - Allele-Fractions

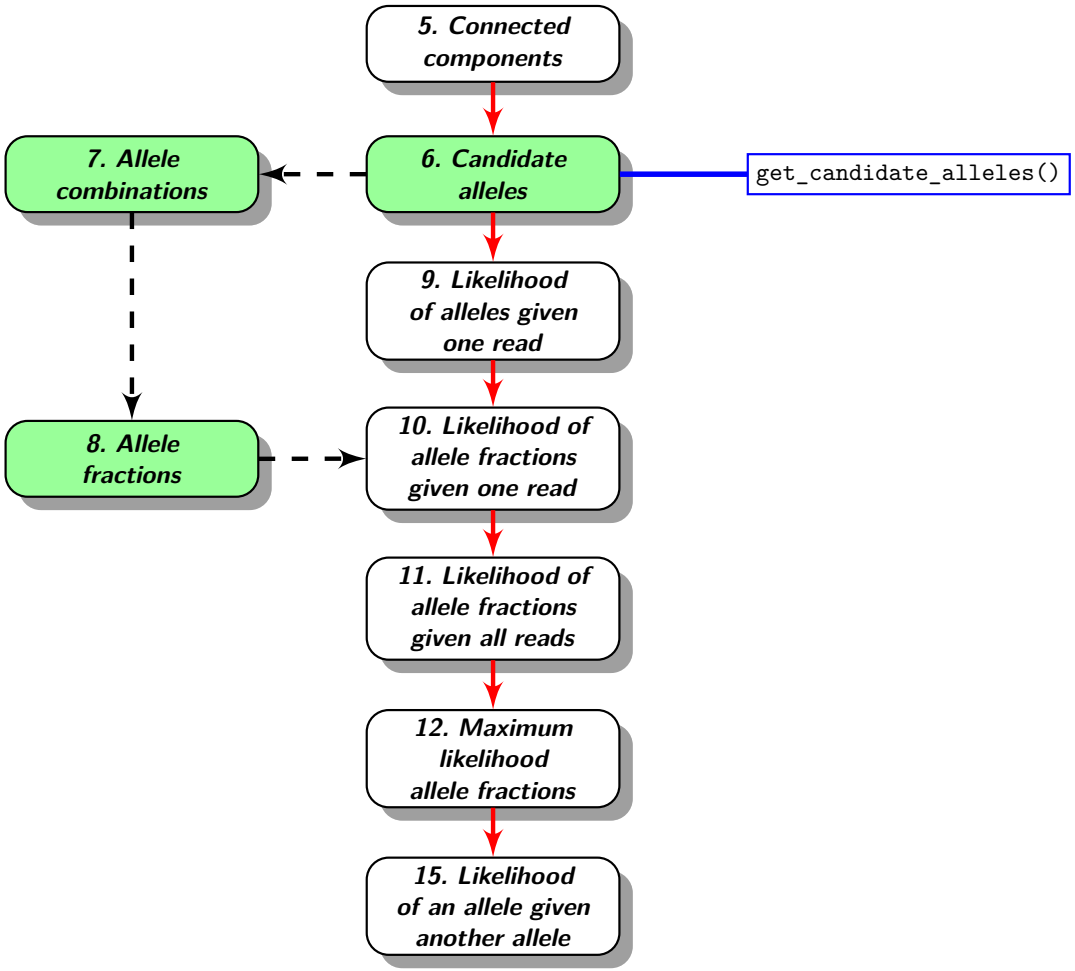


Implementierung - Allele-Fractions

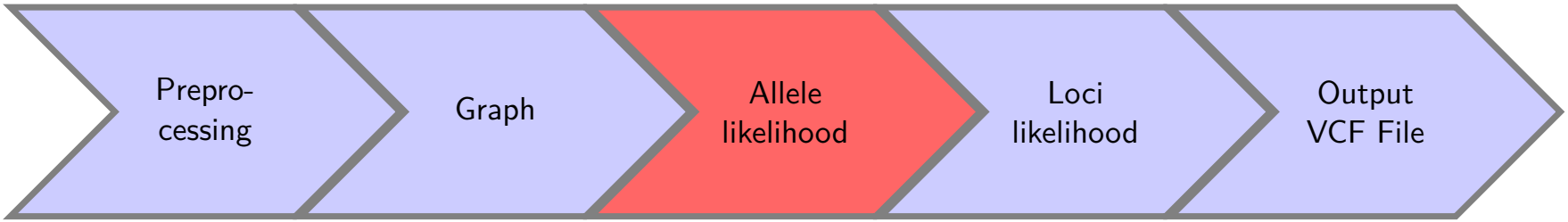


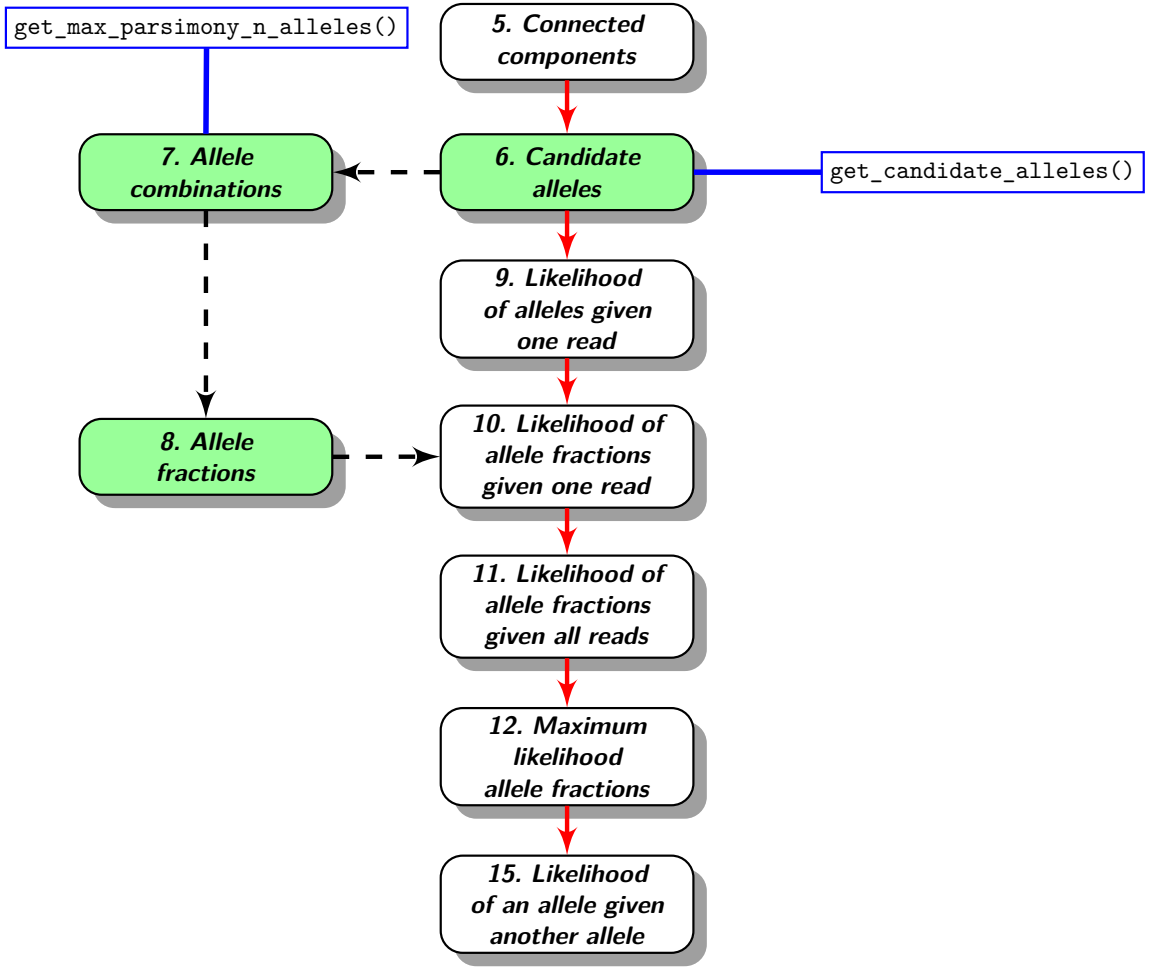
Implementierung - Allele-Fractions



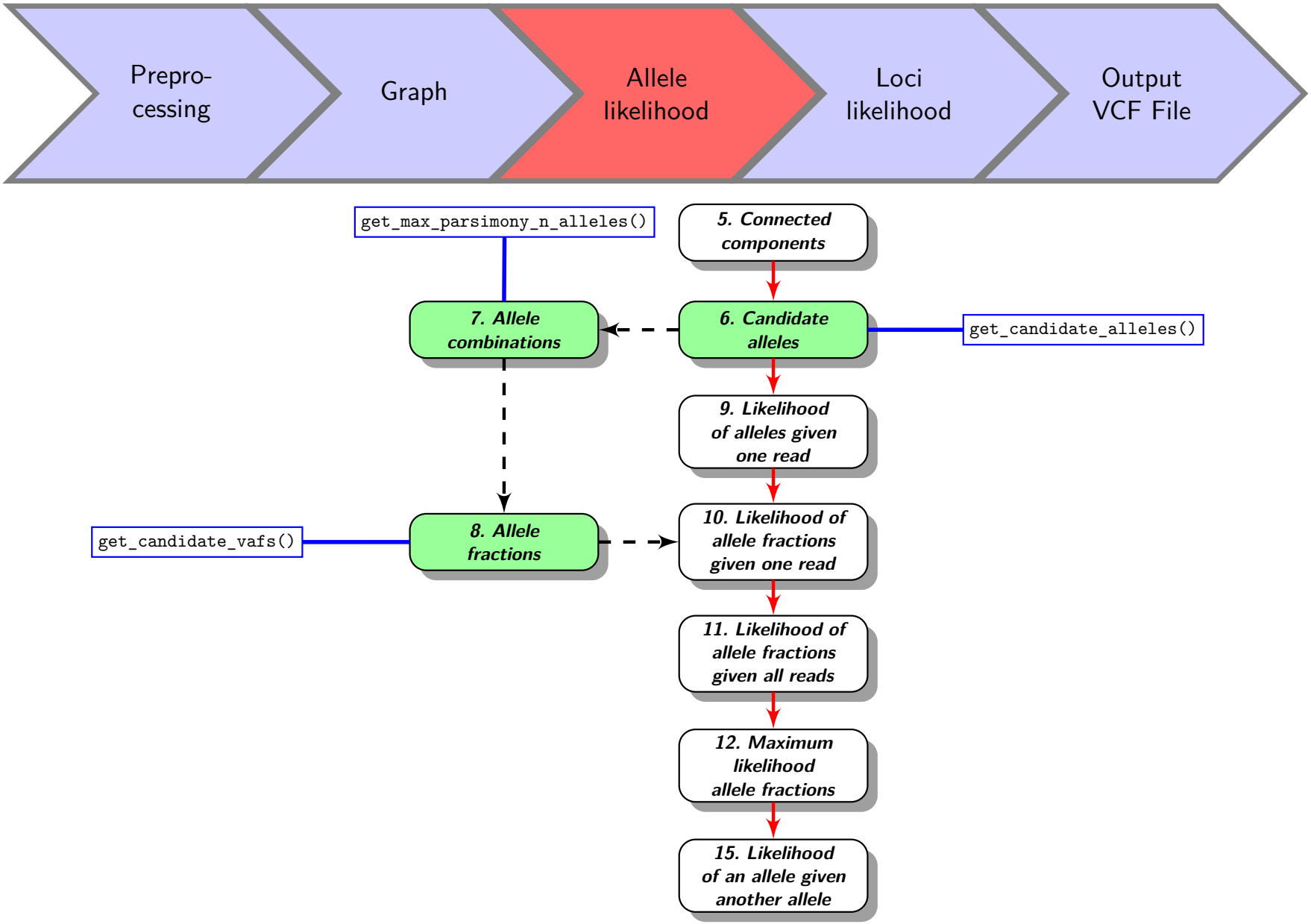


Implementierung - Allele-Fractions





Implementierung - Allele-Fractions



Laufzeit - Allele-Fractions

- `get_candidate_alleles()`: $O(|V_{C_i}|)$
- `get_max_parsimony_n_alleles()`: $O(1)$
- `get_candidate_vafs()`:

  Kombinationen mit Wiederholung: $O(\binom{n+k-1}{k}) \in O(e^n)$
  Allele-Fractions bilden: $O(n)$

  $\Rightarrow$ gesamt: $O(n \cdot e^n)$

Model - Likelihood der Allele-Fractions

Für **jeden Read** mit der Sequenz s_r wird die Wahrscheinlichkeit errechnet, dass er aus einem bestimmten Allel a_i allein durch Sequenzierfehler ϵ hervorgegangen ist:

Model - Likelihood der Allele-Fractions

Für **jeden Read** mit der Sequenz s_r wird die Wahrscheinlichkeit errechnet, dass er aus einem bestimmten Allel a_i allein durch Sequenzierfehler ϵ hervorgegangen ist:

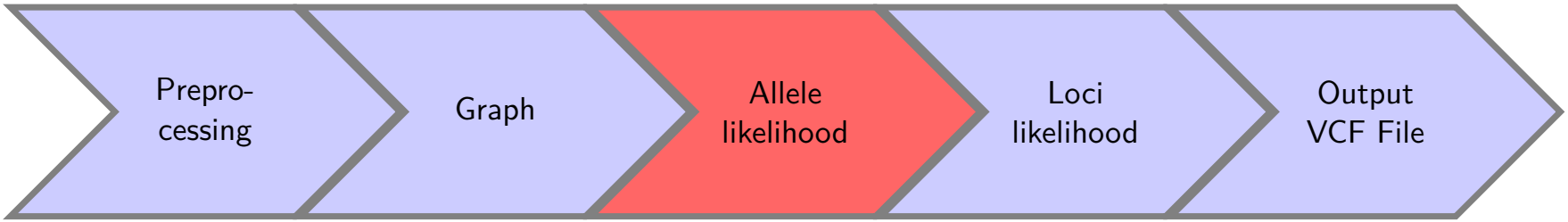
Allel-Likelihood gegeben ein Read

$$Pr(T = s_r \mid S = a_i, \epsilon) = pairHMM_{\epsilon,q_r}(a_i, s_r)$$

Model - Likelihood der Allele-Fractions

Berechnung der Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Read s_r anhand einer gegebenen **Allele-Fraction** $\Theta_i = (\theta_1, \ldots, \theta_n) \in [0,1]^n$ zu beobachten:

Model - Likelihood der Allele-Fractions



Berechnung der Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Read s_r anhand einer gegebenen **Allele-Fraction** $\Theta_i = (\theta_1, \ldots, \theta_n) \in [0,1]^n$ zu beobachten:

Likelihood einer Allele-Fraction gegeben ein Read

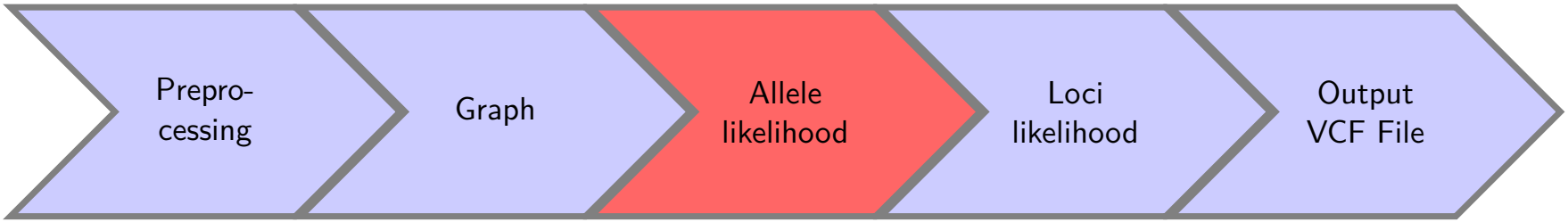
$$Pr(s_r \mid \Theta = \theta_1, \ldots, \theta_n) = \sum_{i=1}^{n} \theta_i \cdot Pr(T = s_r \mid S = a_i, \epsilon)$$

(es gilt $n = n_{cand}$)

Model - Likelihood der Allele-Fractions

Bestimmung der resultierende Likelihood einer Allele-Fraction in Zusammenschau mit **allen Reads** $D = (s_1, \ldots, s_m) \in \{A, C, G, T\}^{k^m}$:

Model - Likelihood der Allele-Fractions

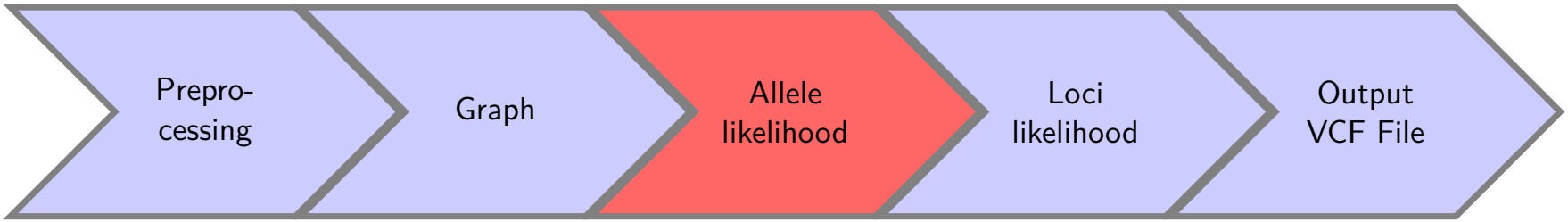


Bestimmung der resultierende Likelihood einer Allele-Fraction in Zusammenschau mit **allen Reads** $D = (s_1, \ldots, s_m) \in \{A, C, G, T\}^{k^m}$:

Likelihood einer Allele-Fraction gegeben alle Reads

$$L(\Theta = \theta_1, \ldots, \theta_n \,|\, D) = Pr(D \,|\, \Theta) = \prod_{r=1}^{m} Pr(s_r \,|\, \Theta)$$

Model - Likelihood der Allele-Fractions



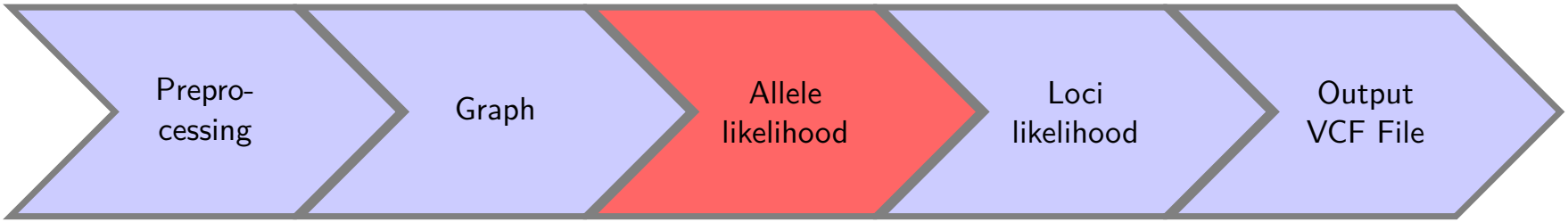
Bestimmung der resultierende Likelihood einer Allele-Fraction in Zusammenschau mit **allen Reads** $D = (s_1, \ldots, s_m) \in \{A, C, G, T\}^{k^m}$:

Likelihood einer Allele-Fraction gegeben alle Reads

$$L(\Theta = \theta_1, \ldots, \theta_n \,|\, D) = Pr(D \,|\, \Theta) = \prod_{r=1}^{m} Pr(s_r \,|\, \Theta)$$

$\Rightarrow$ L ist eine mögliche Loci-Verteilung, die durch die gegebene Allele-Fraction abgebildet wird

Model - Likelihood der Allele-Fractions



Bestimmung der resultierende Likelihood einer Allele-Fraction in Zusammenschau mit **allen Reads** $D = (s_1, \ldots, s_m) \in \{A, C, G, T\}^{k^m}$:

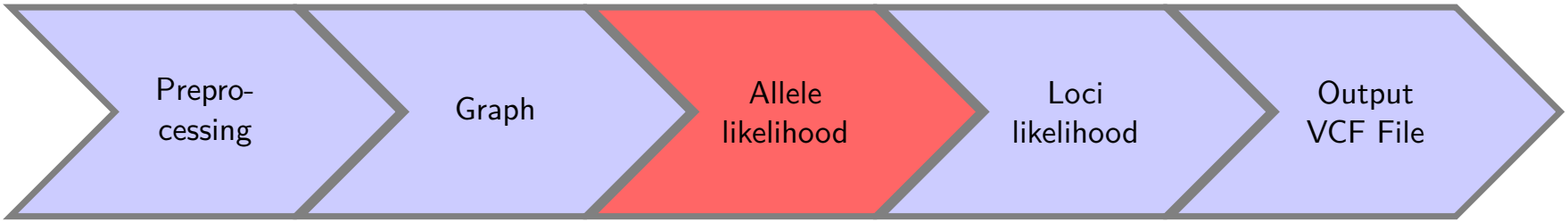
Likelihood einer Allele-Fraction gegeben alle Reads

$$L(\Theta = \theta_1, \ldots, \theta_n \,|\, D) = Pr(D \,|\, \Theta) = \prod_{r=1}^{m} Pr(s_r \,|\, \Theta)$$

$\Rightarrow$ L ist eine mögliche Loci-Verteilung, die durch die gegebene Allele-Fraction abgebildet wird

$\Rightarrow$ die Unsicherheit bei der Zuordnung der Reads wird durch die relativen Häufigkeiten in der Allele-Fraction abgebildet und an die spätere Loci-Zuordnung weitergereicht

Model - Likelihood der Allele-Fractions



Allel-Likelihood gegeben ein Read

$$Pr(T = s_r \mid S = a_i, \epsilon) = pairHMM_{\epsilon,q_r}(a_i, s_r)$$

Likelihood einer Allele-Fraction gegeben ein Read

$$Pr(s_r \mid \Theta = \theta_1, \ldots, \theta_n) = \sum_{i=1}^{n} \theta_i \cdot Pr(T = s_r \mid S = a_i, \epsilon)$$

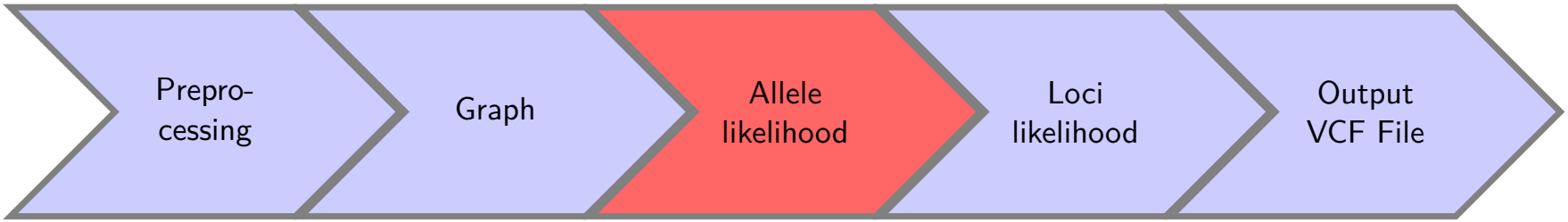
Likelihood einer Allele-Fraction gegeben alle Reads

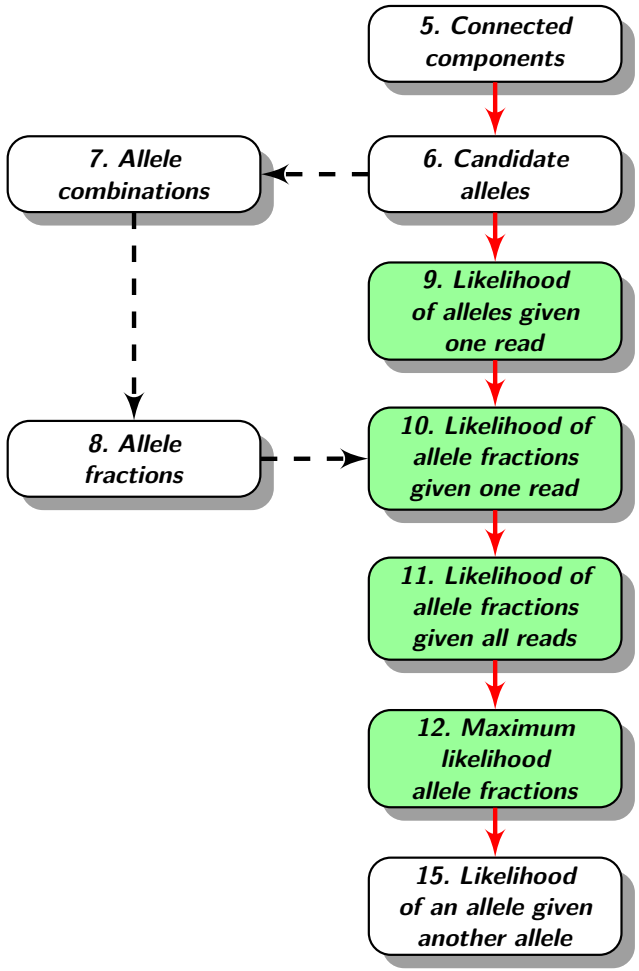
$$L(\Theta = \theta_1, \ldots, \theta_n \mid D = s_1, \ldots, s_m) = Pr(D \mid \Theta) = \prod_{r=1}^{m} Pr(s_r \mid \Theta)$$

$\Rightarrow$ für die Allele-Fraction mit maximaler Likelihood erfolgt die Loci-Zuordnung

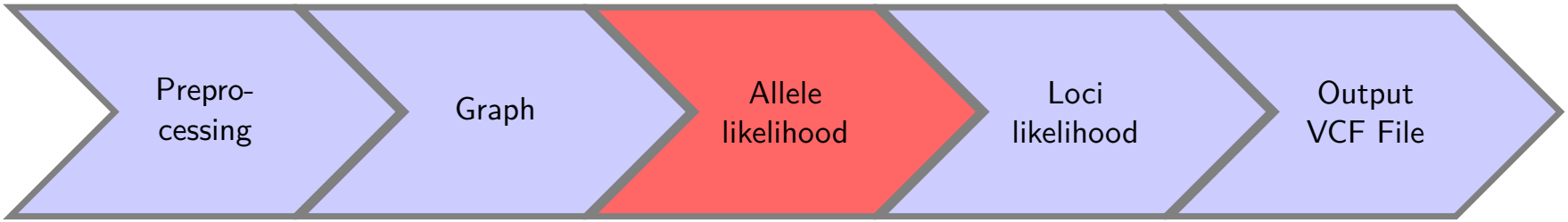
Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions

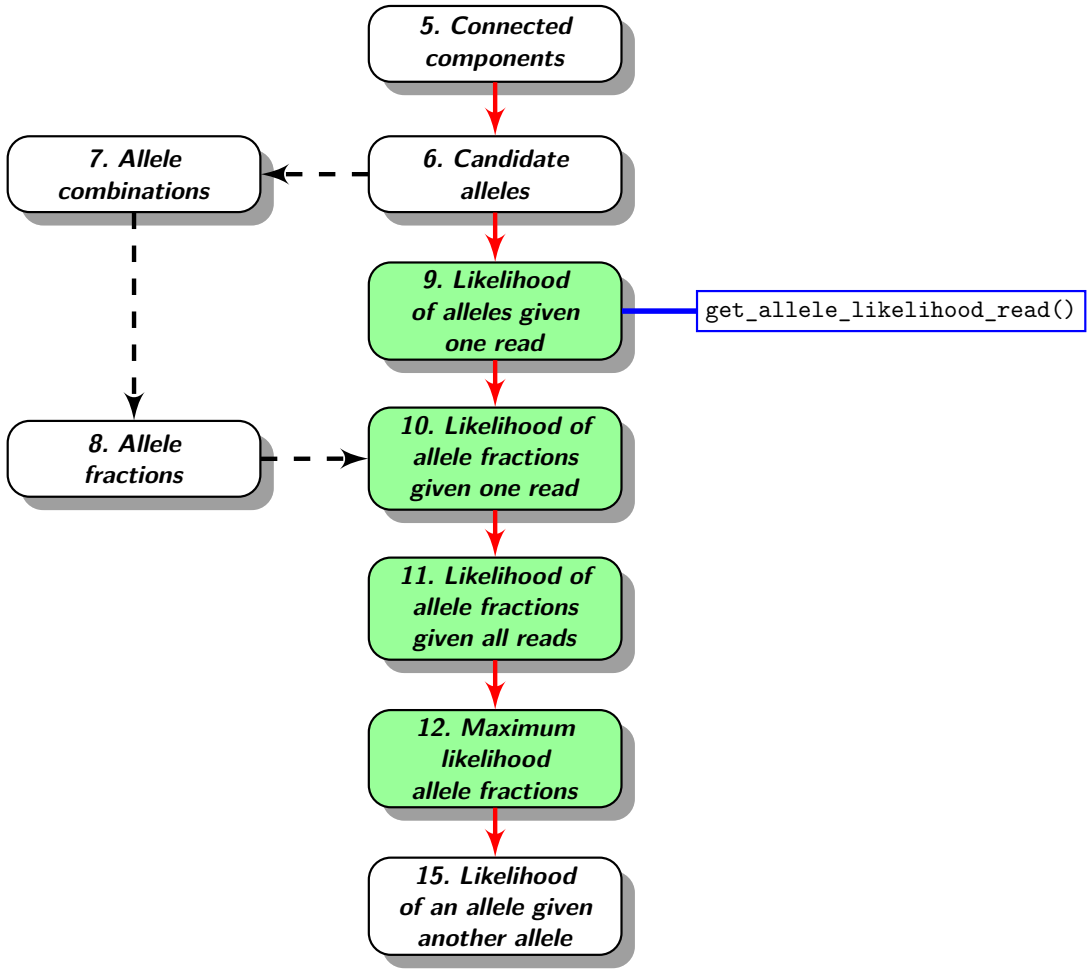
Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions





Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions





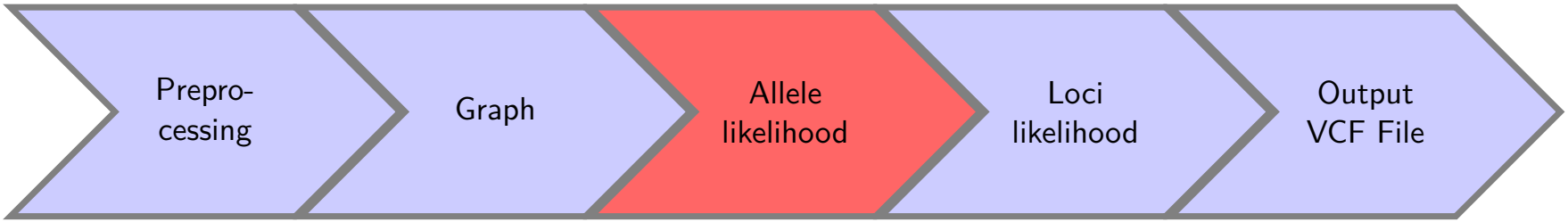
Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions

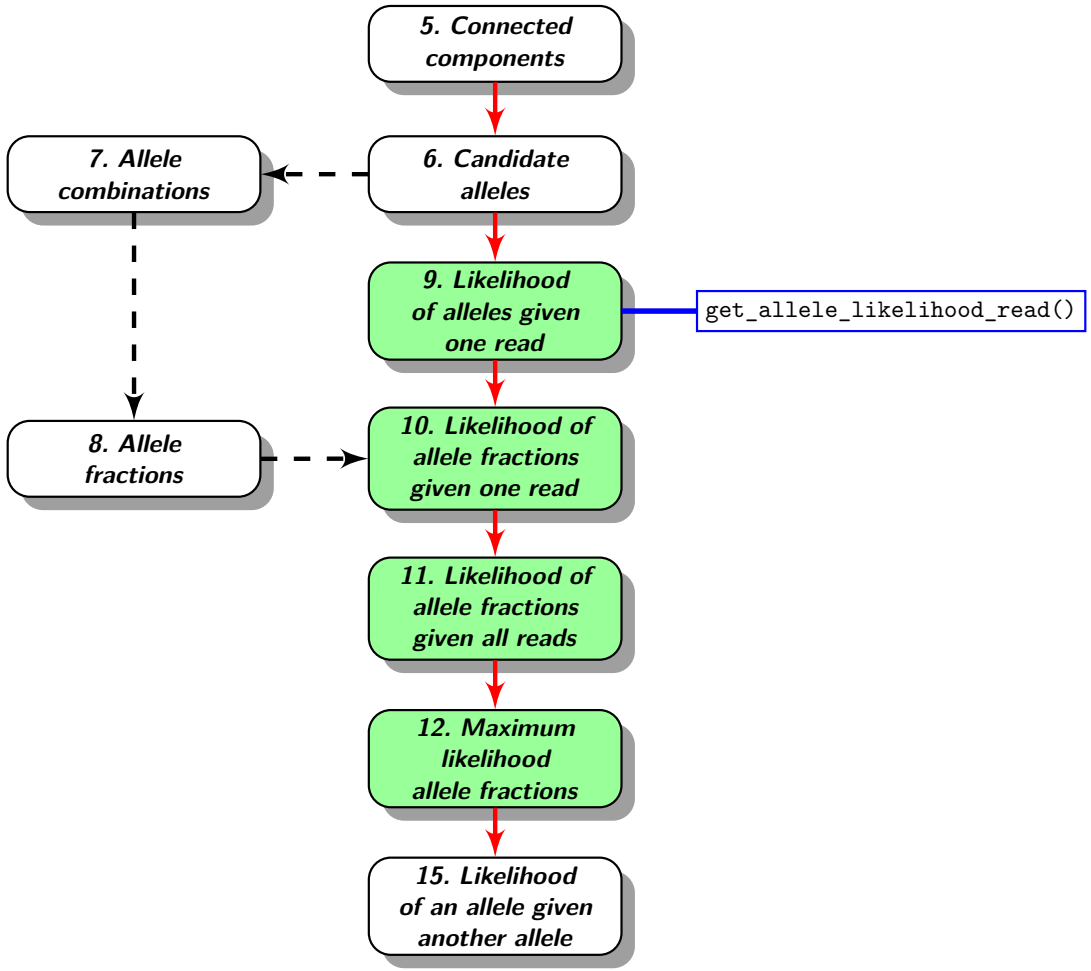
function GET_ALLELE_LIKELIHOOD_READ(C_k, r_i, s_{a_j}, $dict$)
    $idx_{r_i} \leftarrow r_i[name]$
    $qual \leftarrow r_i[q\_values]$
    $\epsilon \leftarrow C_k[\epsilon_{ins}] \cup C_k[\epsilon_{del}]$
    if $\exists(idx_{r_i}, s_{a_i}) : ((idx_{r_i}, s_{a_i}), L_{r_i,a_i}) \in dict$ **then**
        return L_{r_i,a_i}
    end if
    $out\_neighbors \leftarrow get\_out\_neighbors(r_i)$
    for $out\_neighbor \in out\_neighbors$ **do**
        if $s_{a_j} = out\_neighbor[sequence]$ **then**
            $cig \leftarrow edge(r_i, out\_neighbor)[cigar\_tuples]$
            $rev \leftarrow False$
            $L_{r_i,a_i} \leftarrow get\_alignment\_likelihood(\epsilon, cig, qual, rev)$
            $dict \leftarrow dict \cup ((r_i, out\_neighbor[sequence]), L_{r_i,a_i})$
            return L_{r_i,a_i}
        end if
    end for
    $\Rightarrow$ **check in_neighbors**
    return 0
end function

Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions

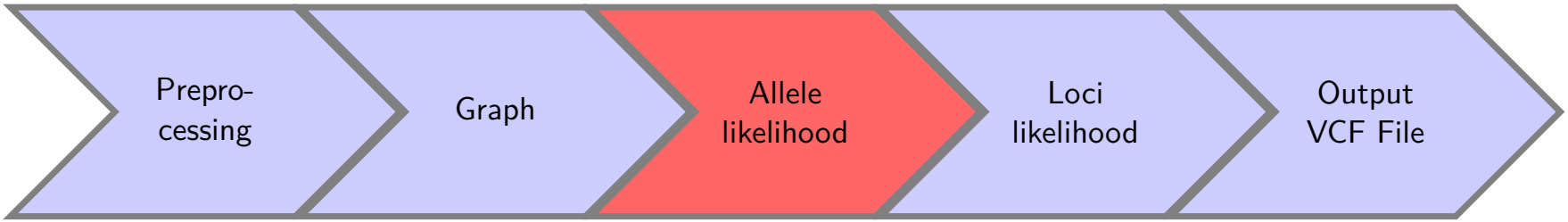
function GET_ALLELE_LIKELIHOOD_READ(C_k, r_i, s_{a_j}, $dict$)
    $idx_{r_i} \leftarrow r_i[name]$
    $qual \leftarrow r_i[q\_values]$
    $\epsilon \leftarrow C_k[\epsilon_{ins}] \cup C_k[\epsilon_{del}]$
    if $\exists(idx_{r_i}, s_{a_i}) : ((idx_{r_i}, s_{a_i}), L_{r_i,a_i}) \in dict$ **then**
        return L_{r_i,a_i}
    end if
    $\Rightarrow$ **check out_neighbors**
    $in\_neighbors \leftarrow get\_in\_neighbors(r_i)$
    for $in\_neighbor \in in\_neighbors$ **do**
        if $s_{a_j} = in\_neighbor[sequence]$ **then**
            $cig \leftarrow edge(in\_neighbor, r_i)[cigar\_tuples]$
            $rev \leftarrow True$
            $L_{r_i,a_i} \leftarrow get\_alignment\_likelihood(\epsilon, cig, qual, rev)$
            $dict \leftarrow dict \cup ((r_i, in\_neighbor[sequence]), L_{r_i,a_i})$
            return L_{r_i,a_i}
        end if
    end for
    return 0
end function

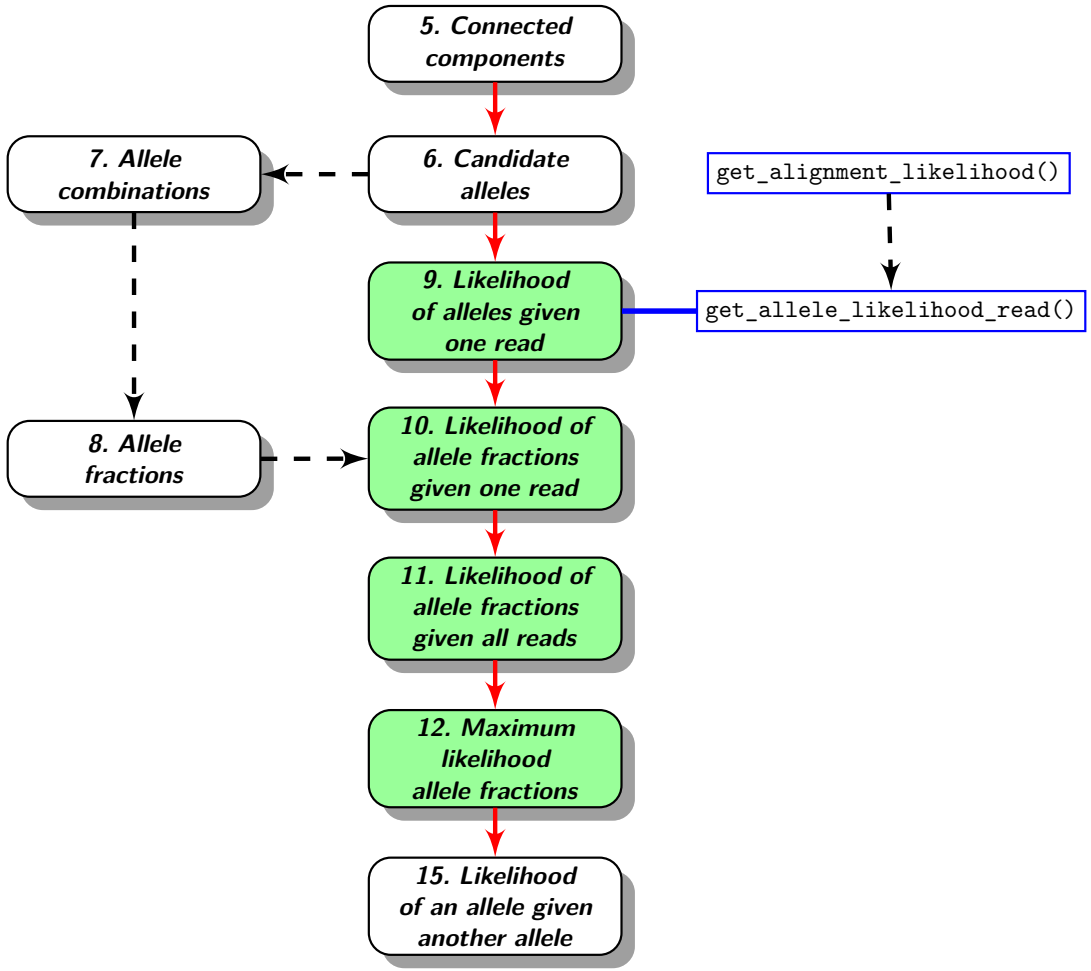
Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions





Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions

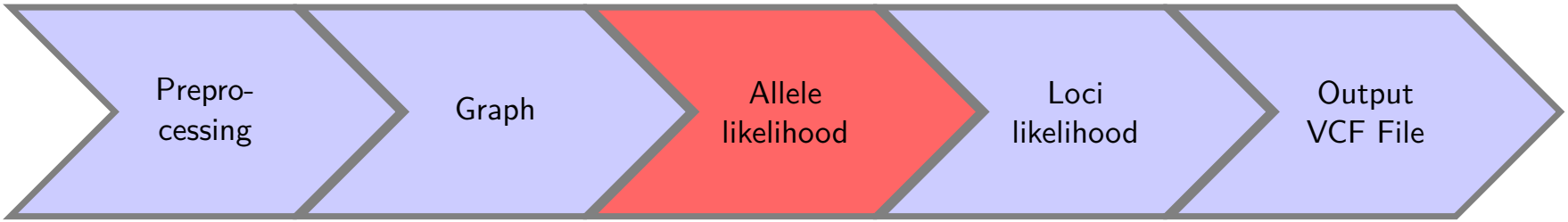


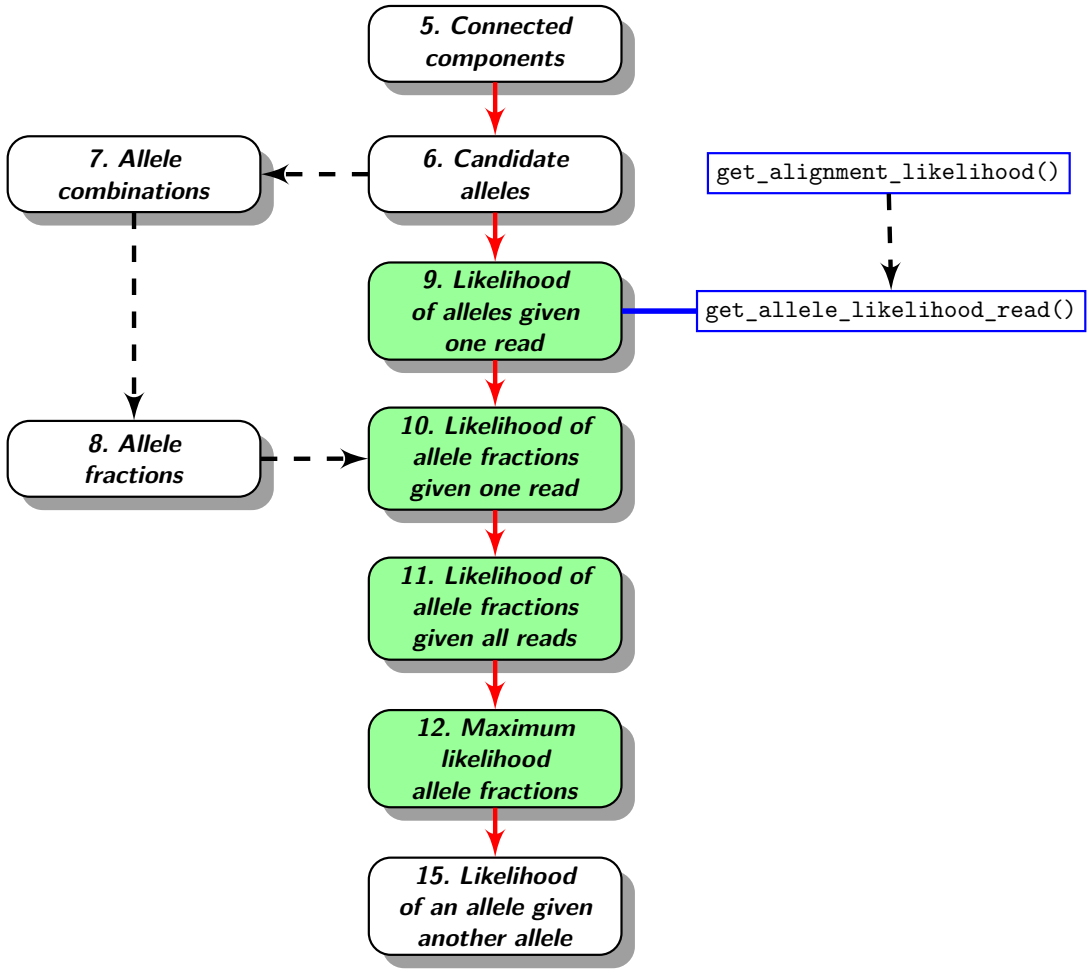


Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions

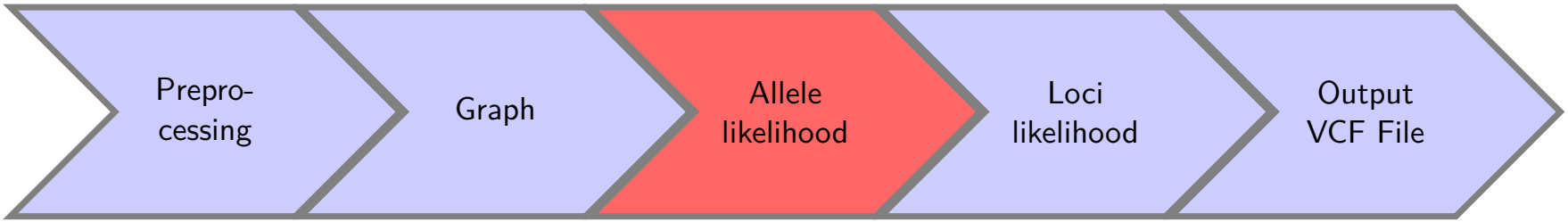
function GET_ALIGNMENT_LIKELIHOOD(ϵ_{ins}, ϵ_{del}, *cigar_tuples*, q_{query}, reverse)
  $likelihood \leftarrow 1.0$, $index \leftarrow 0$, $p_{query} \leftarrow [\,]$
  for $q_i \in q_{query}$ **do**
    $p_{query} \leftarrow p_{query} \cup (10^{\frac{-q_i}{10}})$
  end for
  if *reverse* **then**
    swap values of ϵ_{ins} and ϵ_{del}
  end if
  for all $(operation, length) \in cigar\_tuples$ **do**
    while $index < (index + length)$ **do**
      if $operation \in match$ **then**
        $likelihood \leftarrow likelihood \cdot (1 - p_{query}[index])$
      end if
      if $operation \in substitution$ **then**
        $likelihood \leftarrow likelihood \cdot \frac{1}{3} \cdot p_{query}[index]$
      end if
      if $operation \in insertion$ **then**
        $likelihood \leftarrow likelihood \cdot \epsilon_{ins}$
      end if
      if $operation \in deletion$ **then**
        $likelihood \leftarrow likelihood \cdot \epsilon_{del}$
      end if
      $index \leftarrow index + 1$
    end while
  end for
  return *likelihood*
end function

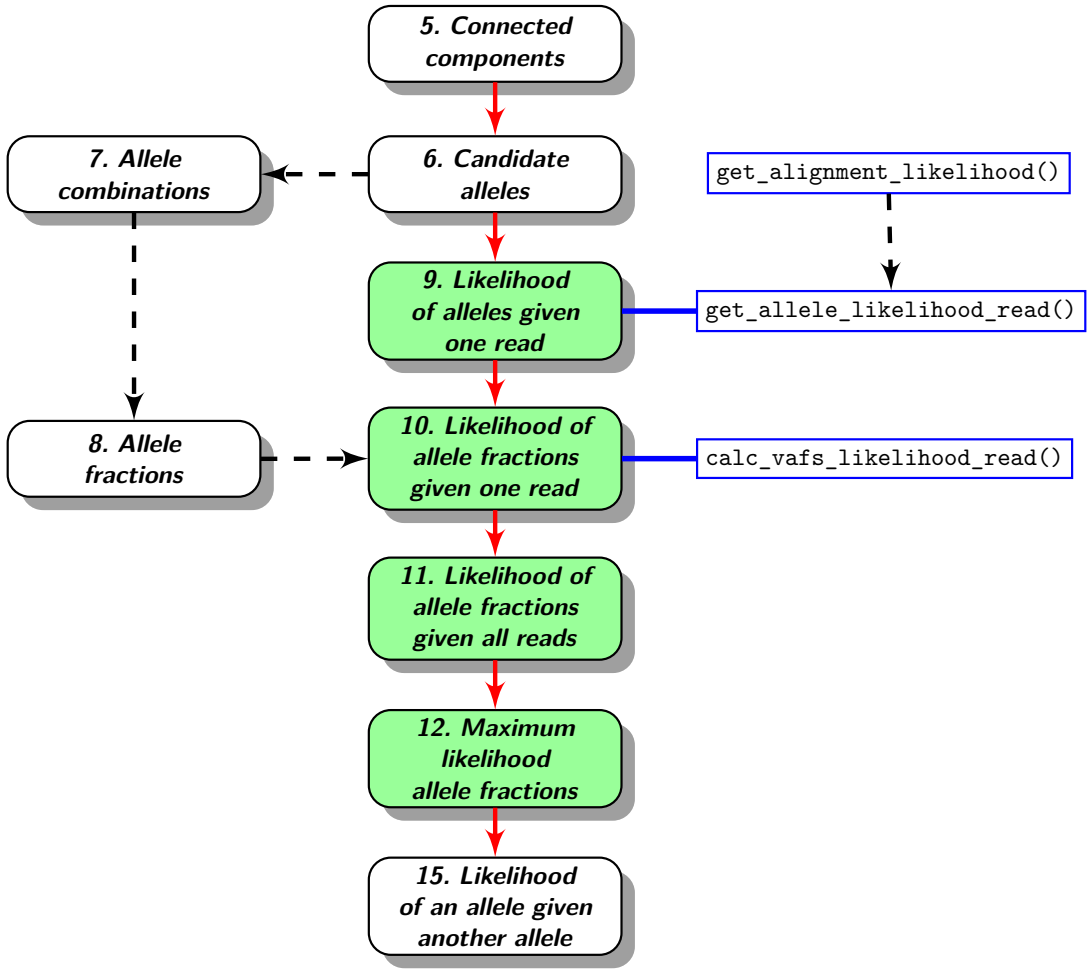
Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions



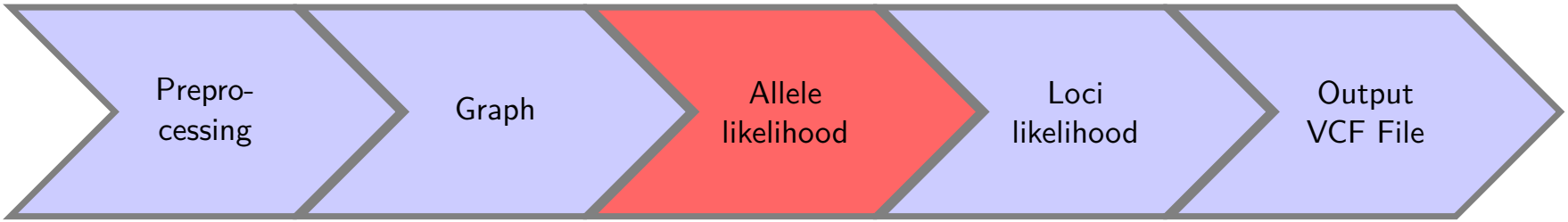


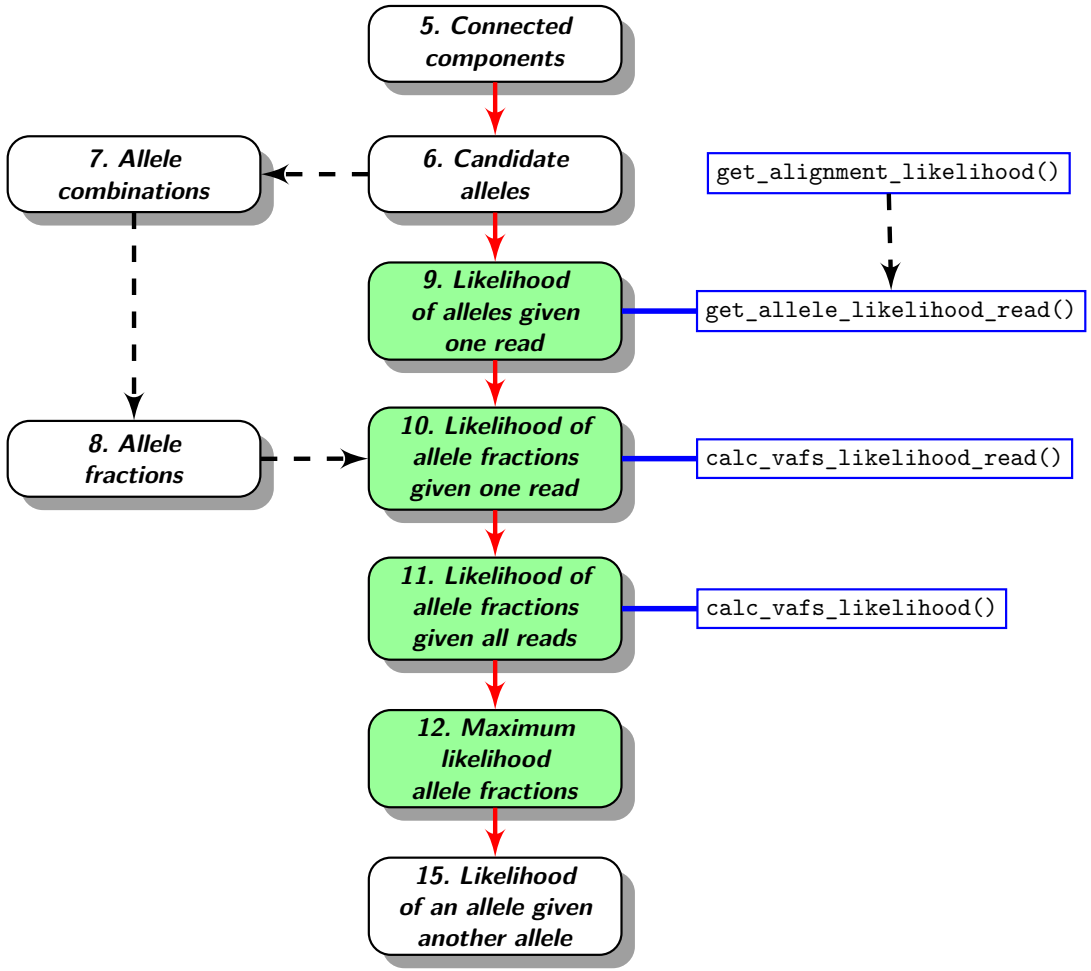
Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions



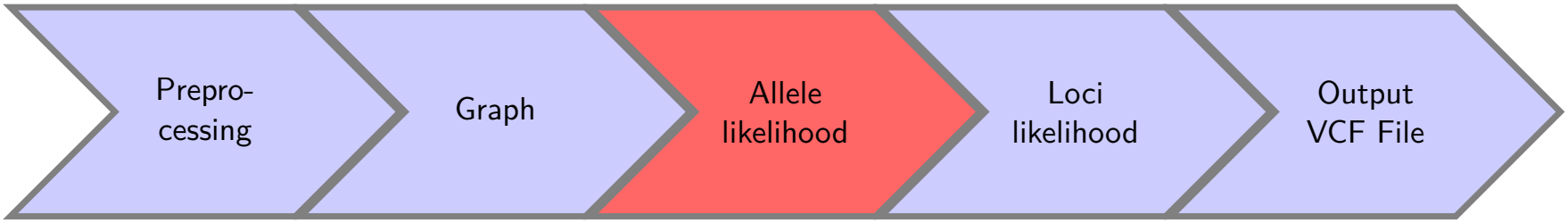


Implementierung - Likelihood der Allele-Fractions



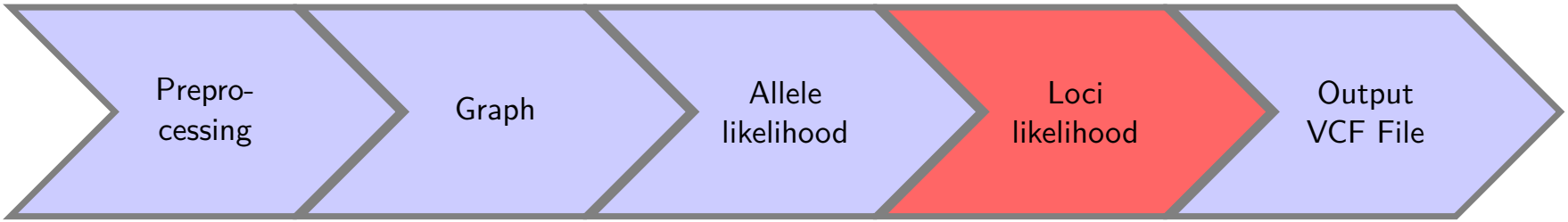


Laufzeit - Likelihood der Allele-Fractions

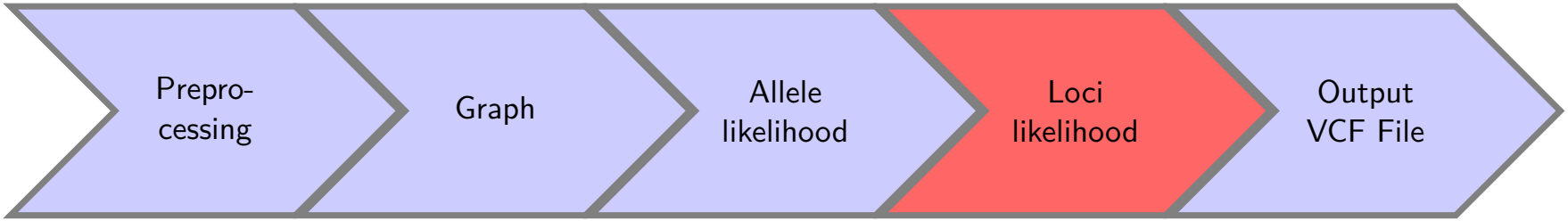


- `get_allele_likelihood_read()`:
  Eintrag existiert im Dictionary: $O(n \cdot |V_{C_i}|)$
  Likelihood muss berechnet werden: $O(n \cdot l \cdot |V_{C_i}|^2)$
- `get_alignment_likelihood()`: $O(l)$
- `calc_vafs_likelihood()`: $O(|V_{C_i}|)$
- `calc_vafs_likelihood_read()`: $O(n)$
- Maximumsbestimmung: $O(e^n)$

Model - Loci-Kombinationen

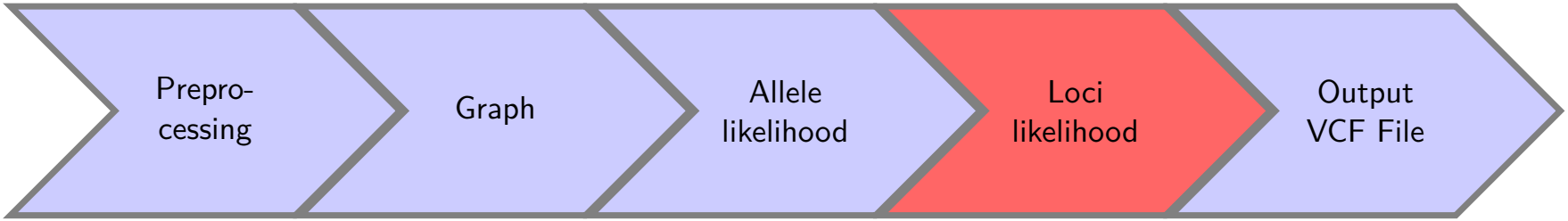


Model - Loci-Kombinationen



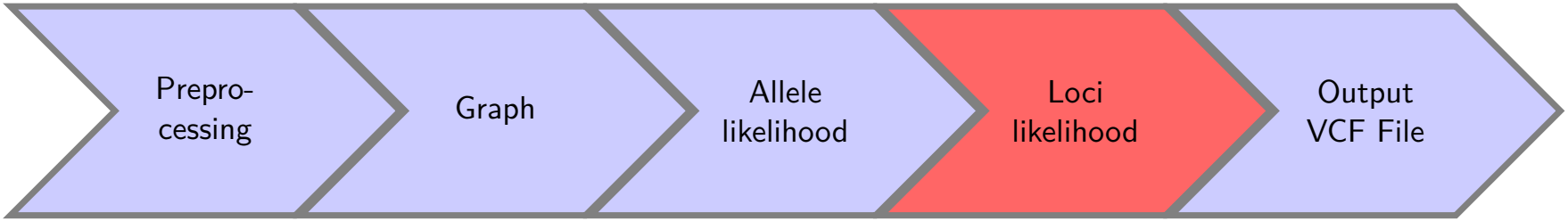
- Die Allel-Fraction mit maximaler Likelihood soll möglichen genomischen Loci zugeordnet werden

Model - Loci-Kombinationen



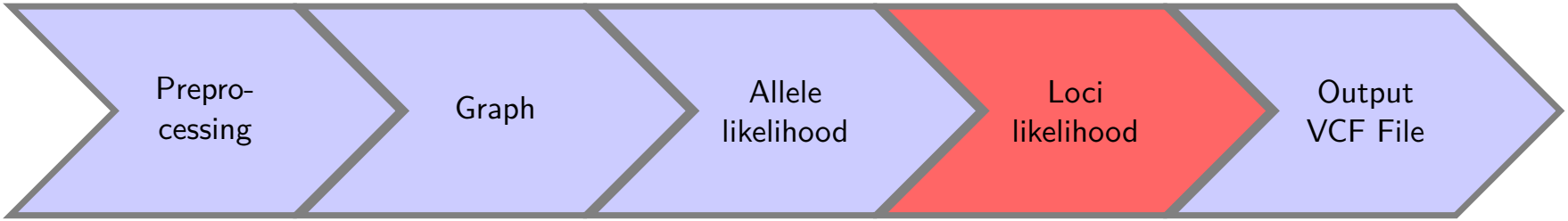
- Die Allel-Fraction mit maximaler Likelihood soll möglichen genomischen Loci zugeordnet werden
- in Abhängigkeit von Ploidie und Anzahl der Kandidatenallele können auch mehrere Loci in einer Zusammenhangskomponente vorkommen

Model - Loci-Kombinationen



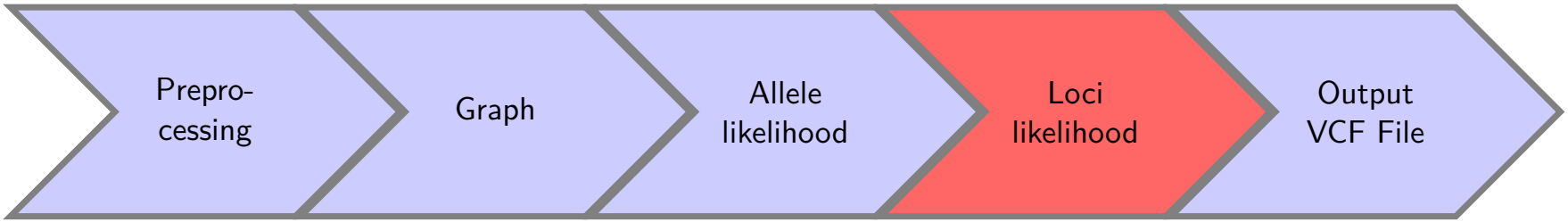
- Die Allel-Fraction mit maximaler Likelihood soll möglichen genomischen Loci zugeordnet werden
- in Abhängigkeit von Ploidie und Anzahl der Kandidatenallele können auch mehrere Loci in einer Zusammenhangskomponente vorkommen
- für alle Allelkombinationen müssen die möglichen Loci-Kombinationen der in ihnen enthaltenen Kandidatenallele gebildet werden

Model - Loci-Kombinationen



$\Rightarrow$ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Model - Loci-Kombinationen

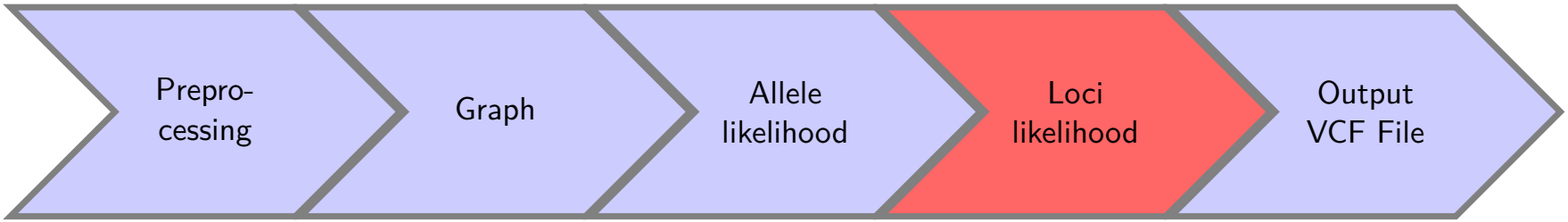


⇒ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Kombinationen der Allele:

[(0, 0, 0, 0), (0, 0, 0, 1), (0, 0, 0, 2), (0, 0, 1, 1), (0, 0, 1, 2),
(0, 0, 2, 2), (0, 1, 1, 1), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 2, 2), (0, 2, 2, 2),
(1, 1, 1, 1), (1, 1, 1, 2), (1, 1, 2, 2), (1, 2, 2, 2), (2, 2, 2, 2)]

Model - Loci-Kombinationen

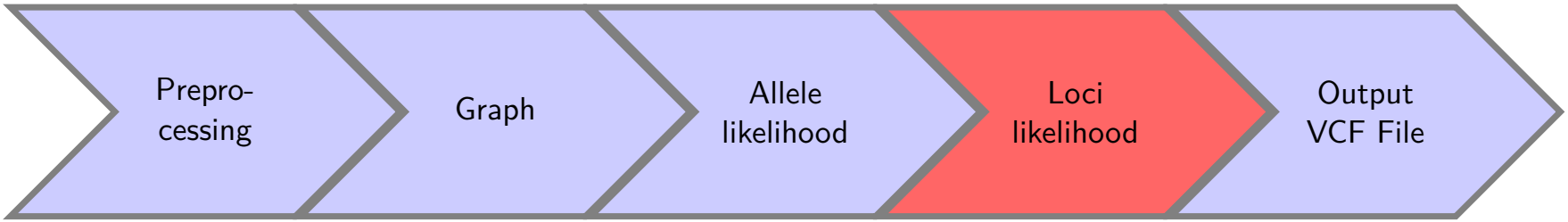


⇒ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Permutationen der Allele:

(1, 2, 1, 1), (2, 1, 0, 0), (2, 1, 1, 1), (0, 1, 2, 1), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 0, 0),
(2, 2, 1, 0), (0, 2, 2, 1), (2, 2, 0, 1), (1, 0, 2, 2), (0, 2, 0, 1), (2, 0, 0, 1),
(1, 0, 1, 0), (0, 2, 1, 2), (0, 0, 2, 0), (2, 2, 2, 1), (1, 1, 0, 1), (2, 0, 1, 1),
(2, 0, 2, 0), (0, 0, 2, 2), (1, 1, 2, 0), (1, 2, 1, 0), (2, 0, 2, 2), (2, 1, 1, 0),
(2, 1, 0, 2), (1, 2, 0, 1), (0, 1, 2, 0), (1, 2, 1, 2), (1, 2, 2, 1), (0, 1, 1, 1),
(1, 1, 1, 0), (0, 0, 0, 0), (2, 1, 1, 2), (2, 1, 2, 1), (1, 0, 0, 1), (0, 1, 0, 2),
(2, 2, 1, 2), (0, 2, 2, 0), (1, 0, 2, 1), (2, 0, 0, 0), (0, 2, 1, 1), (1, 1, 1, 2),
(0, 0, 0, 2), (0, 0, 1, 1), (1, 0, 1, 2), (2, 0, 0, 2), (0, 0, 2, 1), (1, 1, 2, 2),
(2, 1, 0, 1), (1, 2, 0, 0), (0, 1, 2, 2), (1, 2, 2, 0), (0, 1, 1, 0), (2, 2, 0, 0),
(0, 2, 0, 0), (2, 1, 2, 0), (1, 0, 0, 0), (1, 2, 0, 2), (0, 1, 0, 1), (2, 2, 1, 1),
(2, 2, 2, 0), (1, 1, 0, 0), (1, 0, 2, 0), (0, 2, 2, 2), (1, 2, 2, 2), (2, 2, 0, 2),...

Model - Loci-Kombinationen

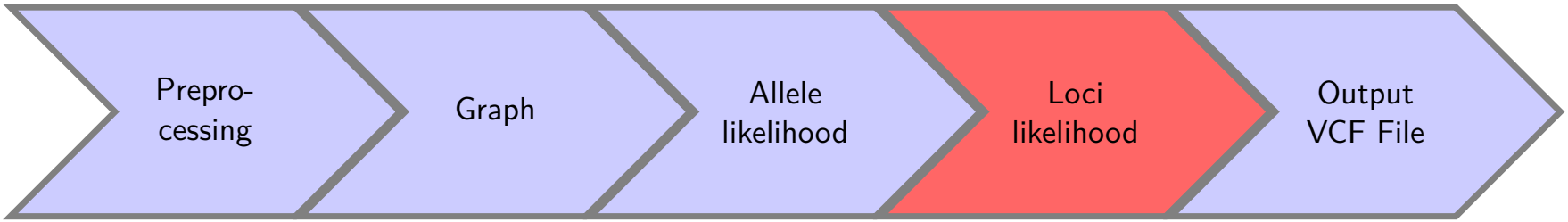


⇒ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Mögliche Loci-Kombinationen:

((0, 0), (0, 2)), ((1, 1), (1, 1)), ((0, 2), (0, 2)), ((1, 1), (2, 2)),
((0, 1), (0, 2)), ((1, 1), (1, 2)), ((1, 2), (2, 2)), ((1, 2), (1, 2)),
((0, 0), (1, 1)), ((0, 0), (2, 2)), ((0, 2), (1, 1)), ((0, 1), (1, 1)),
((0, 0), (0, 0)), ((0, 2), (2, 2)), ((0, 0), (1, 2)), ((0, 1), (2, 2)),
((2, 2), (2, 2)), ((0, 0), (0, 1)), ((0, 2), (1, 2)), ((0, 1), (1, 2)),
((0, 1), (0, 1))

Model - Loci-Kombinationen



⇒ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Kombinationen der Allele:

[... (0, 1, 1, 2), ...]

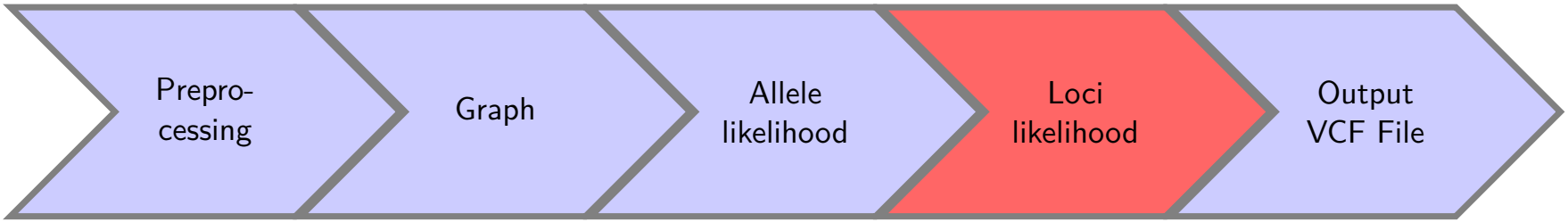
Permutationen der Allele:

(1, 0, 1, 2), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 2, 1), (1, 0, 2, 1), (2, 1, 1, 0), (1, 2, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (1, 2, 1, 0), (1, 1, 2, 0), (1, 1, 0, 2), (2, 0, 1, 1), (0, 2, 1, 1), ...

Mögliche Loci-Kombinationen:

((1, 0), (1, 2)), ((0, 1), (1, 2)), ((0, 1), (2, 1)), ((1, 0), (2, 1)), ((2, 1), (1, 0)), ((1, 2), (0, 1)), ((2, 1), (0, 1)), ((2, 1), (0, 1)), ((2, 1), (0, 1)), ((1, 2), (1, 0)), ((1, 1), (2, 0)), ((1, 1), (0, 2)), ((2, 0), (1, 1)), ((0, 2), (1, 1)), ...

Model - Loci-Kombinationen



⇒ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Kombinationen der Allele:

[... (0, 1, 1, 2), ...]

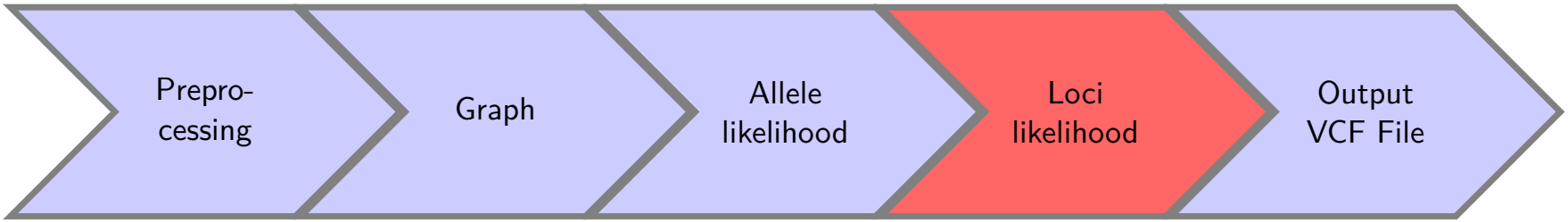
Permutationen der Allele:

(1, 0, 1, 2), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 2, 1), (1, 0, 2, 1), (2, 1, 1, 0), (1, 2, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (1, 2, 1, 0), (1, 1, 2, 0), (1, 1, 0, 2), (2, 0, 1, 1), (0, 2, 1, 1), ...

Mögliche Loci-Kombinationen:

((1, 0), (1, 2)), ((0, 1), (1, 2)), ((0, 1), (2, 1)), ((1, 0), (2, 1)), ((2, 1), (1, 0)), ((1, 2), (0, 1)), ((2, 1), (0, 1)), ((2, 1), (0, 1)), ((2, 1), (0, 1)), ((1, 2), (1, 0)), ((1, 1), (2, 0)), ((1, 1), (0, 2)), ((2, 0), (1, 1)), ((0, 2), (1, 1)), ...

Model - Loci-Kombinationen



⇒ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Kombinationen der Allele:

[... (0, 1, 1, 2), ...]

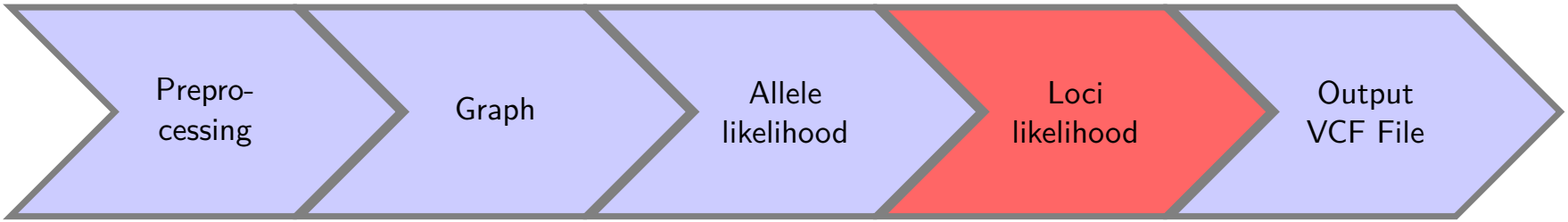
Permutationen der Allele:

(1, 0, 1, 2), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 2, 1), (1, 0, 2, 1), (2, 1, 1, 0), (1, 2, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (1, 2, 1, 0), (1, 1, 2, 0), (1, 1, 0, 2), (2, 0, 1, 1), (0, 2, 1, 1), ...

Mögliche Loci-Kombinationen:

((0, 1), (1, 2)), ((1, 2), (0, 1)), ((1, 1), (0, 2)), ((0, 2), (1, 1)), ...

Model - Loci-Kombinationen



⇒ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Kombinationen der Allele:

[... (0, 1, 1, 2), ...]

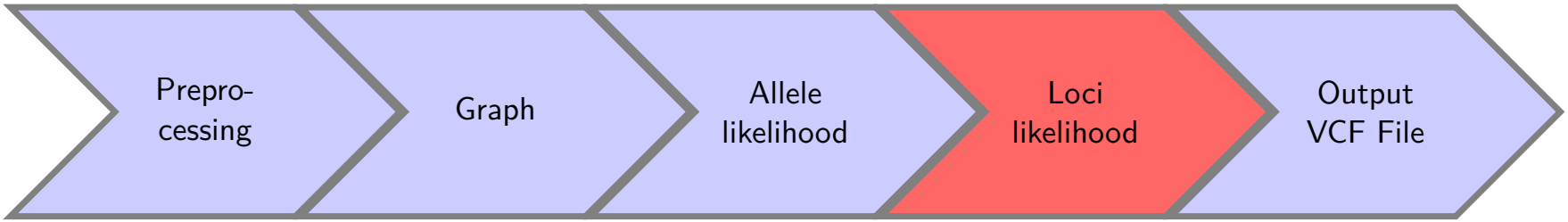
Permutationen der Allele:

(1, 0, 1, 2), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 2, 1), (1, 0, 2, 1), (2, 1, 1, 0), (1, 2, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (1, 2, 1, 0), (1, 1, 2, 0), (1, 1, 0, 2), (2, 0, 1, 1), (0, 2, 1, 1), ...

Mögliche Loci-Kombinationen:

((0, 1), (1, 2)), ((1, 2), (0, 1)), ((1, 1), (0, 2)), ((0, 2), (1, 1)), ...

Model - Loci-Kombinationen



⇒ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Kombinationen der Allele:

[... (0, 1, 1, 2), ...]

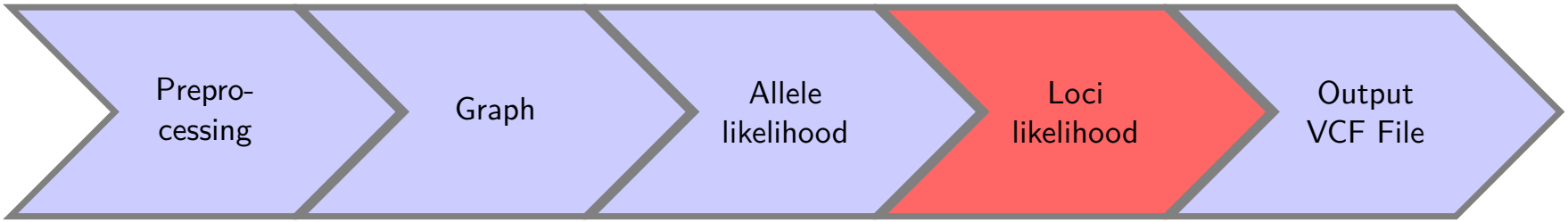
Permutationen der Allele:

(1, 0, 1, 2), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 2, 1), (1, 0, 2, 1), (2, 1, 1, 0), (1, 2, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (1, 2, 1, 0), (1, 1, 2, 0), (1, 1, 0, 2), (2, 0, 1, 1), (0, 2, 1, 1), ...

Mögliche Loci-Kombinationen:

((0, 1), (1, 2)), ((1, 2), (0, 1)), ((1, 1), (0, 2)), ((0, 2), (1, 1)), ...

Model - Loci-Kombinationen



⇒ **Beispiel:** $ploidy = 2, n_{cand} = 3, n_{alleles} = 4$:

Kombinationen der Allele:

[... (0, 1, 1, 2), ...]

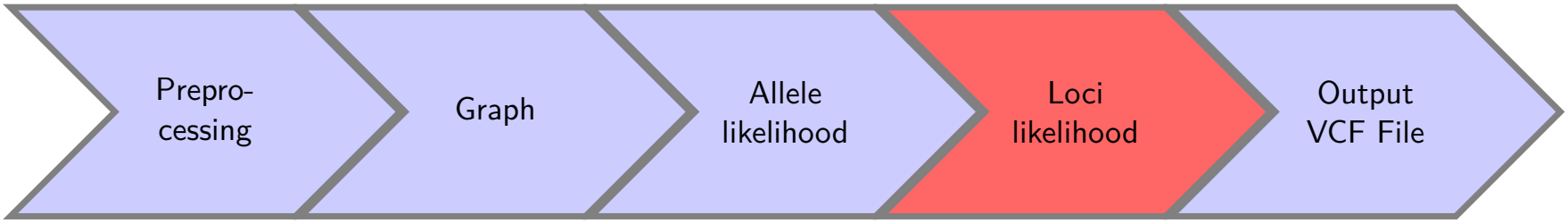
Permutationen der Allele:

(1, 0, 1, 2), (0, 1, 1, 2), (0, 1, 2, 1), (1, 0, 2, 1), (2, 1, 1, 0), (1, 2, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (2, 1, 0, 1), (1, 2, 1, 0), (1, 1, 2, 0), (1, 1, 0, 2), (2, 0, 1, 1), (0, 2, 1, 1), ...

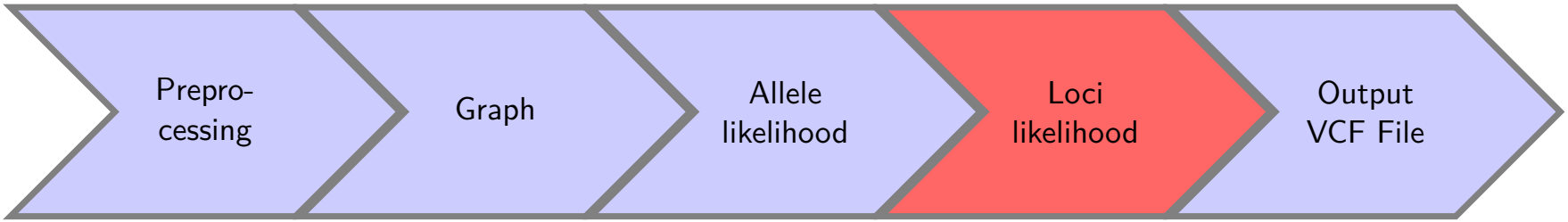
Mögliche Loci-Kombinationen:

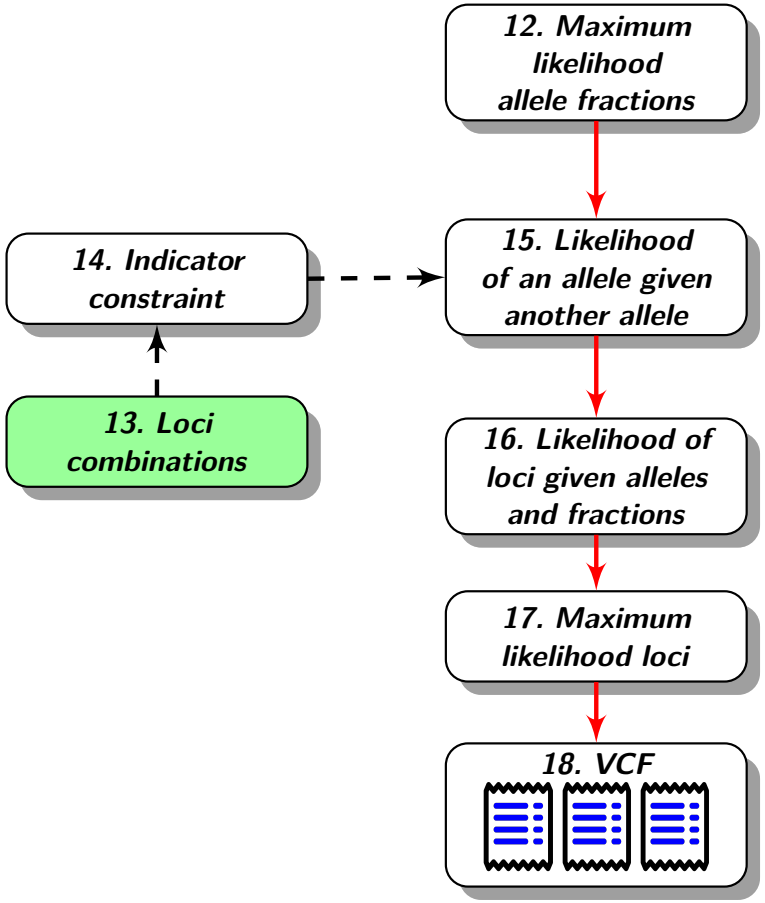
((0, 1), (1, 2)), ((1, 1), (0, 2)), ...

Implementierung - Loci-Kombinationen

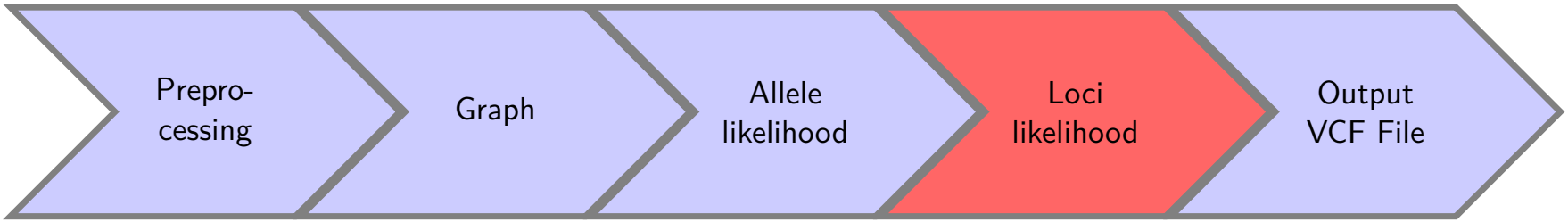


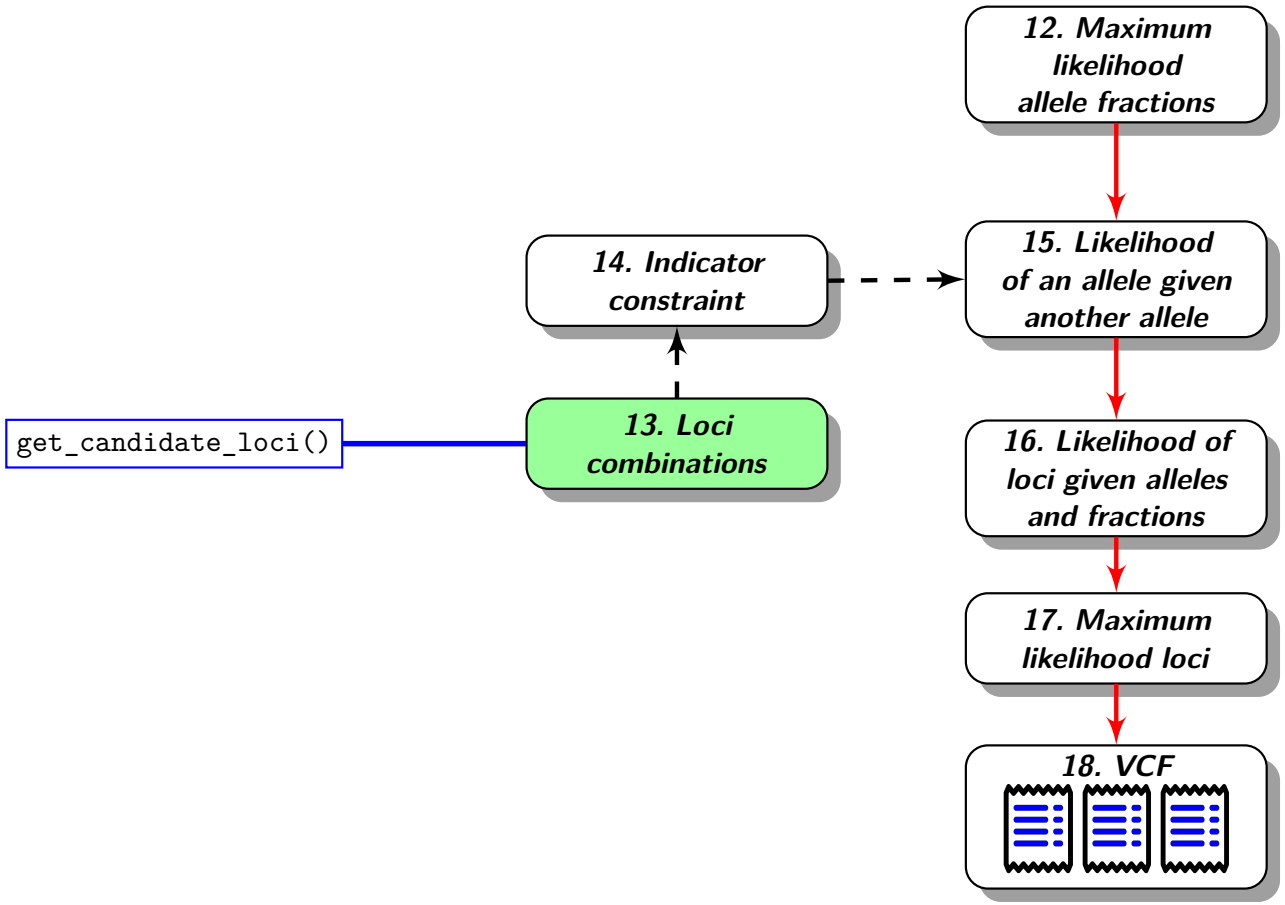
Implementierung - Loci-Kombinationen



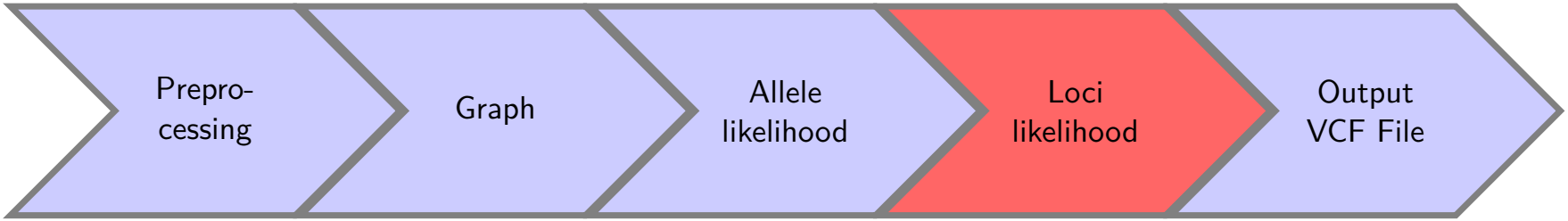


Implementierung - Loci-Kombinationen



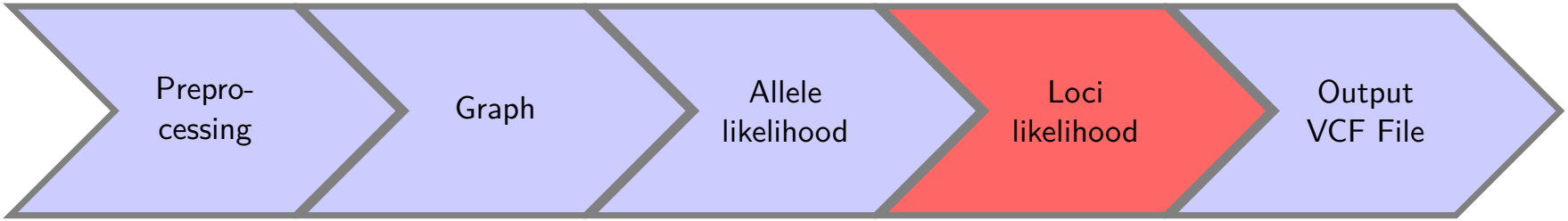


Laufzeit - Loci-Kombinationen

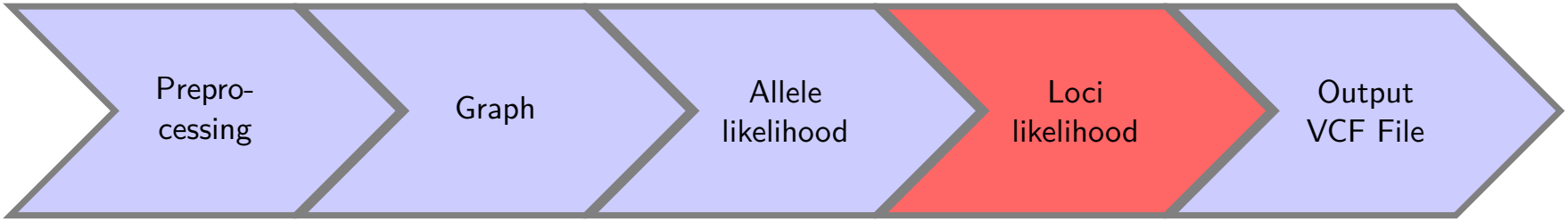


- eigentlich müssen alle Permutationen über allen Allelkombinationen gebildet werden
- wegen Indikatorfunktion genügt es die Permutationen nur über der Allele-Fraction mit maximaler Likelihood zu bilden
- Laufzeit von `get_candidate_loci()` beträgt dann $O(n! \cdot \log n)$

Model - Zuordnung der Loci

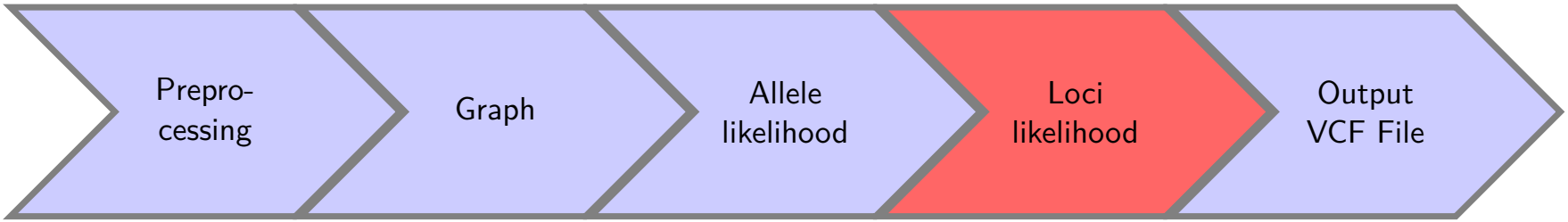


Model - Zuordnung der Loci



Prüfung jeder Loci-Kombination $L \in \{l_j \in \mathbb{N}^{\phi}_{\leq n} \,|\, j = 1, \ldots, g\}$, ob sie die ermittelte wahrscheinlichste Häufigkeitsverteilung der Kandidatenallele erfüllen kann:

Model - Zuordnung der Loci

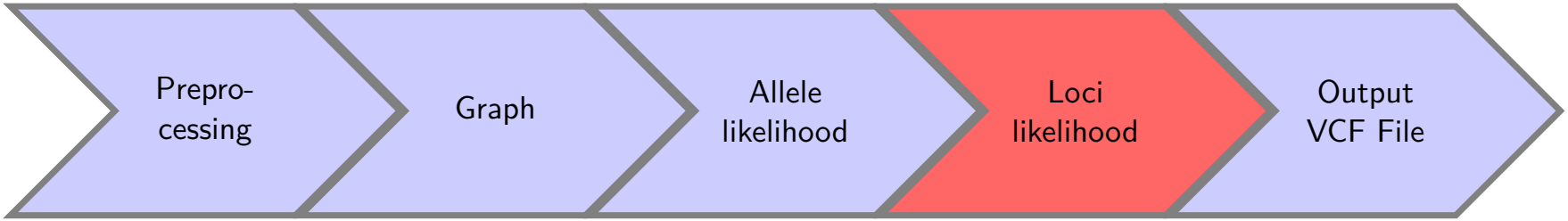


Prüfung jeder Loci-Kombination $L \in \{l_j \in \mathbb{N}^{\phi}_{\leq n} \,|\, j = 1, \ldots, g\}$, ob sie die ermittelte wahrscheinlichste Häufigkeitsverteilung der Kandidatenallele erfüllen kann:

Indikatorfunktion $z_L \in [0, 1]$

$$z_L = \prod_{i=1}^{n} 1_{\sum_{j=1}^{g} \sum_{k=1}^{\phi} 1_{l_{j,k}=i} = \theta_i \cdot g \cdot \phi}$$

Model - Zuordnung der Loci



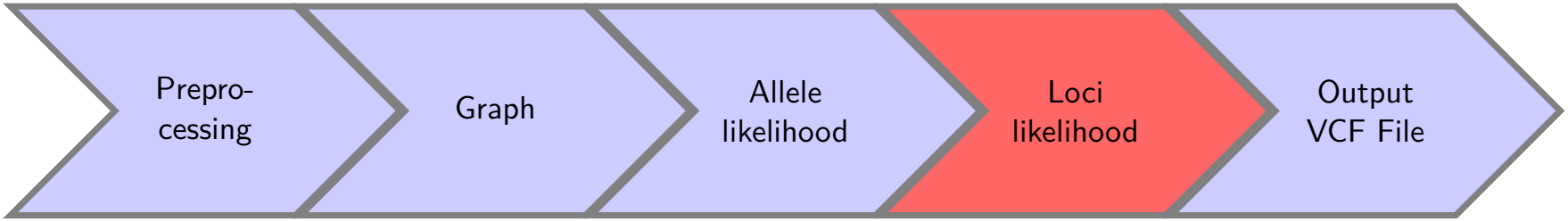
Prüfung jeder Loci-Kombination $L \in \{l_j \in \mathbb{N}^{\phi}_{\leq n} \,|\, j = 1, \ldots, g\}$, ob sie die ermittelte wahrscheinlichste Häufigkeitsverteilung der Kandidatenallele erfüllen kann:

Indikatorfunktion $z_L \in [0, 1]$

$$z_L = \prod_{i=1}^{n} 1_{\sum_{j=1}^{g} \sum_{k=1}^{\phi} 1_{l_{j,k}=i} = \theta_i \cdot g \cdot \phi}$$

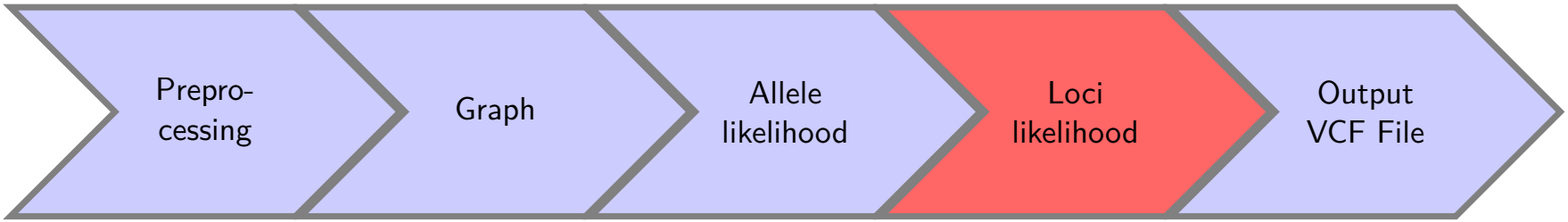
$\Rightarrow z_L = 1$, wenn die absolute Häufigkeit der einzelnen Kandidatenallele in einer Loci-Kombination, der Anzahl dieser Allele in der Allele-Fraction mit maximaler Likelihood entspricht

Model - Zuordnung der Loci



Bestimmung der Wahrscheinlichkeit wie die einzelnen Allele der Maximum-Likelihood-Allele-Fraction hinsichtlich der Heterozygotiewahrscheinlichkeiten η miteinander in Beziehung stehen:

Model - Zuordnung der Loci

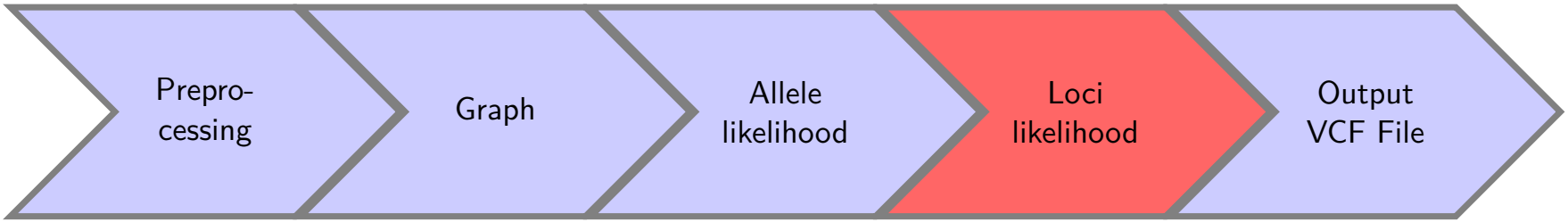


Bestimmung der Wahrscheinlichkeit wie die einzelnen Allele der Maximum-Likelihood-Allele-Fraction hinsichtlich der Heterozygotiewahrscheinlichkeiten η miteinander in Beziehung stehen:

Likelihood des paarweisen Vergleichs zweier Allele

$$Pr(T = a_{l_{j,2}}, S = a_{l_{j,1}}, \eta) = pairHMM_{\eta}(a_{l_{j,1}}, a_{l_{j,2}})$$

Model - Zuordnung der Loci



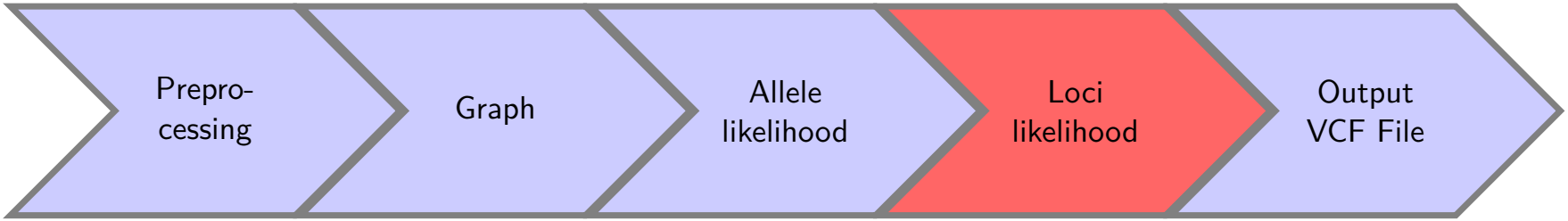
Bestimmung der Wahrscheinlichkeit wie die einzelnen Allele der Maximum-Likelihood-Allele-Fraction hinsichtlich der Heterozygotiewahrscheinlichkeiten η miteinander in Beziehung stehen:

Likelihood des paarweisen Vergleichs zweier Allele

$$Pr(T = a_{l_{j,2}}, S = a_{l_{j,1}}, \eta) = pairHMM_{\eta}(a_{l_{j,1}}, a_{l_{j,2}})$$

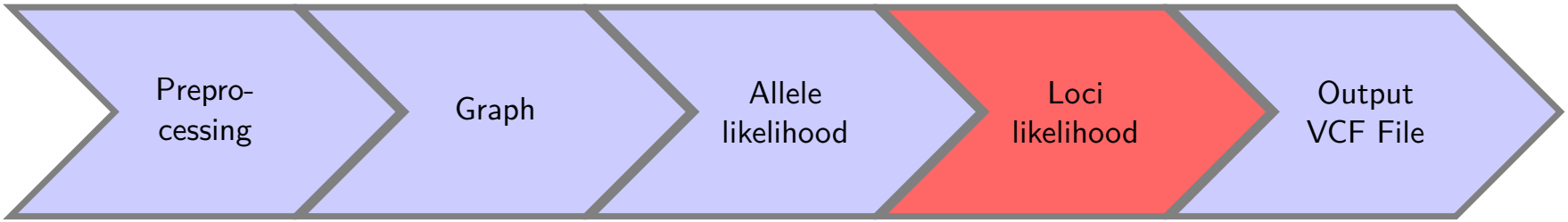
$\Rightarrow$ Wahrscheinlichkeit, dass zwei Allele $a_{l_{j,1}}$ und $a_{l_{j,2}}$ vom gleichen Locus l_j stammen

Model - Zuordnung der Loci



Bestimmung der Gesamtlikelihood einer Loci-Kombination, dass die enthaltenen Allele A bei gegebenen Heterozygotiewahrscheinlichkeiten in dieser Konstellation der Loci vorliegen:

Model - Zuordnung der Loci

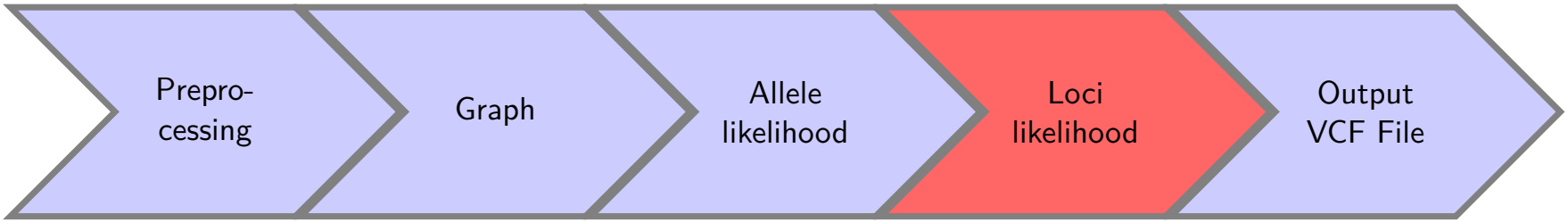


Bestimmung der Gesamtlikelihood einer Loci-Kombination, dass die enthaltenen Allele A bei gegebenen Heterozygotiewahrscheinlichkeiten in dieser Konstellation der Loci vorliegen:

Likelihood einer Loci-Kombination

$$Pr(\Theta, A \,|\, L = \{l_j \,|\, j = 1, \ldots, g\}) = z_L \cdot \prod_{j=1}^{g} Pr(T = a_{l_{j,2}}, S = a_{l_{j,1}})$$

Model - Zuordnung der Loci



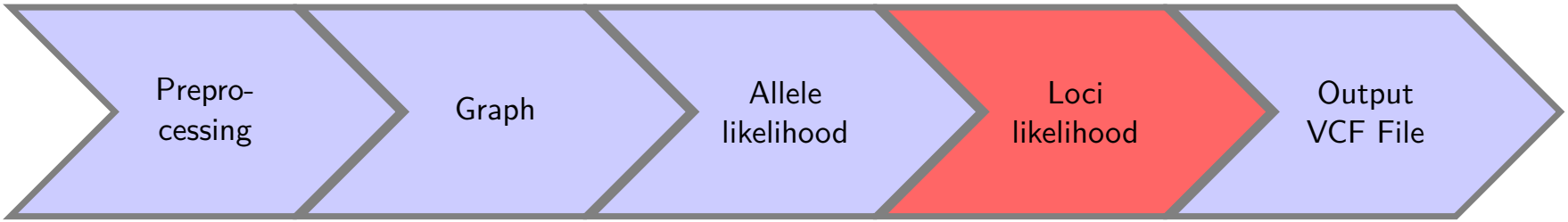
Bestimmung der Gesamtlikelihood einer Loci-Kombination, dass die enthaltenen Allele A bei gegebenen Heterozygotiewahrscheinlichkeiten in dieser Konstellation der Loci vorliegen:

Likelihood einer Loci-Kombination

$$Pr(\Theta, A \,|\, L = \{l_j \,|\, j = 1, \ldots, g\}) = z_L \cdot \prod_{j=1}^{g} Pr(T = a_{l_{j,2}}\,,\, S = a_{l_{j,1}})$$

$\Rightarrow$ L wird für jede Loci-Kombination durchgeführt, welche die Allele-Fraction mit maximaler Likelihood erklären kann

Model - Zuordnung der Loci



Indikatorfunktion $z_L \in [0, 1]$

$$z_L = \prod_{i=1}^{n} 1_{\sum_{j=1}^{g} \sum_{k=1}^{\phi} 1_{l_{j,k}=i} = \theta_i \cdot g \cdot \phi}$$

Likelihood des paarweisen Vergleichs zweier Allele

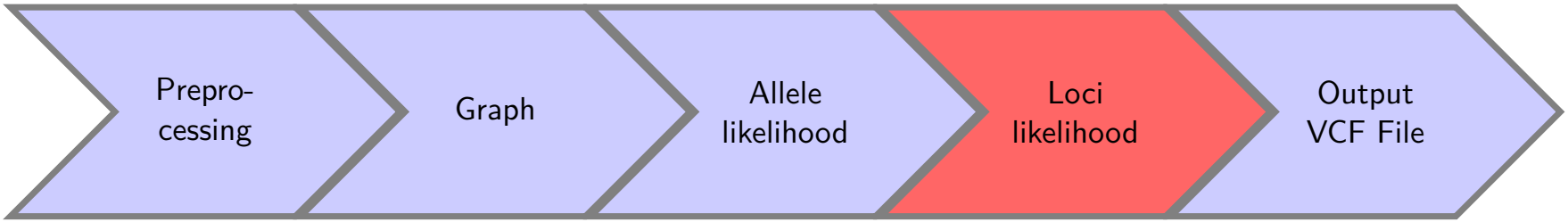
$$Pr(T = a_{l_{j,2}}, S = a_{l_{j,1}}, \eta) = pairHMM_{\eta}(a_{l_{j,1}}, a_{l_{j,2}})$$

Likelihood einer Loci-Kombination

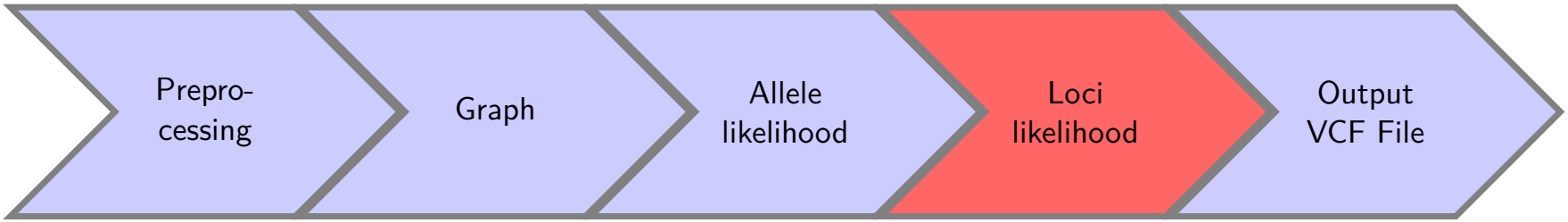
$$Pr(\Theta, A \mid L = \{l_j \mid j = 1, \ldots, g\}) = z_L \cdot \prod_{j=1}^{g} Pr(T = a_{l_{j,2}}, S = a_{l_{j,1}})$$

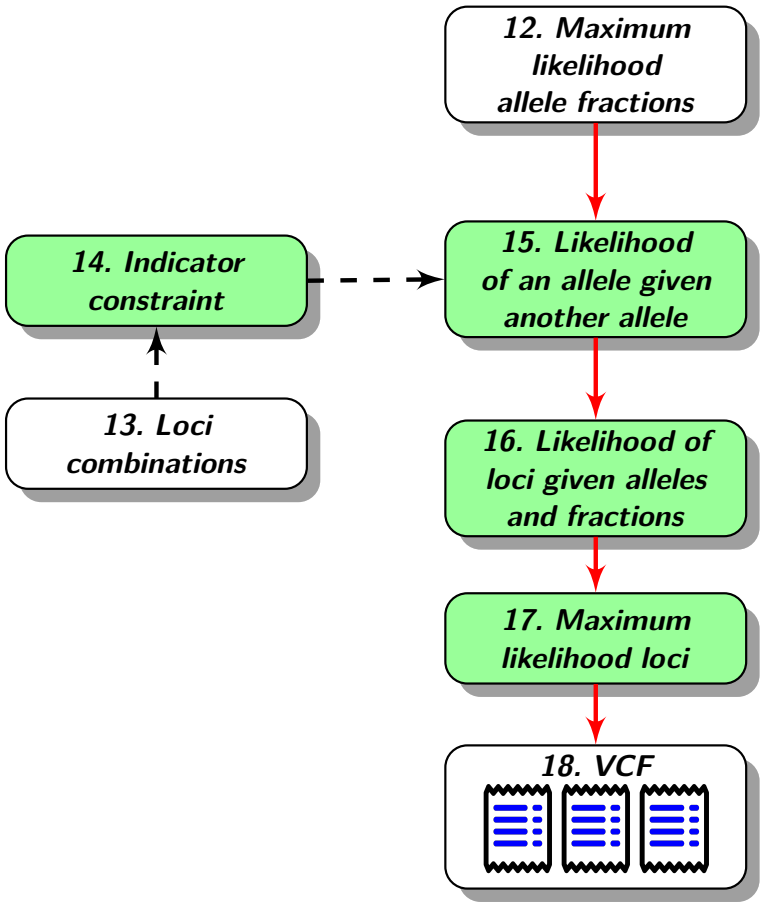
$\Rightarrow$ die Loci-Kombination mit maximaler Likelihood ist die wahrscheinlichste Loci-Zuordnung der Reads einer Zusammenhangskomponente

Implementierung - Zuordnung der Loci

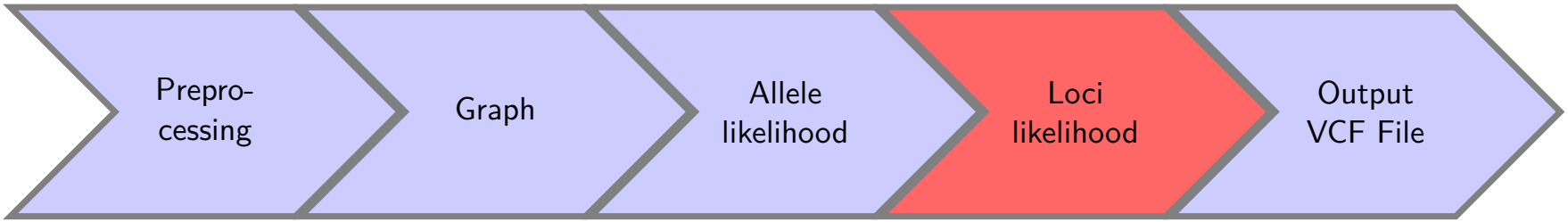


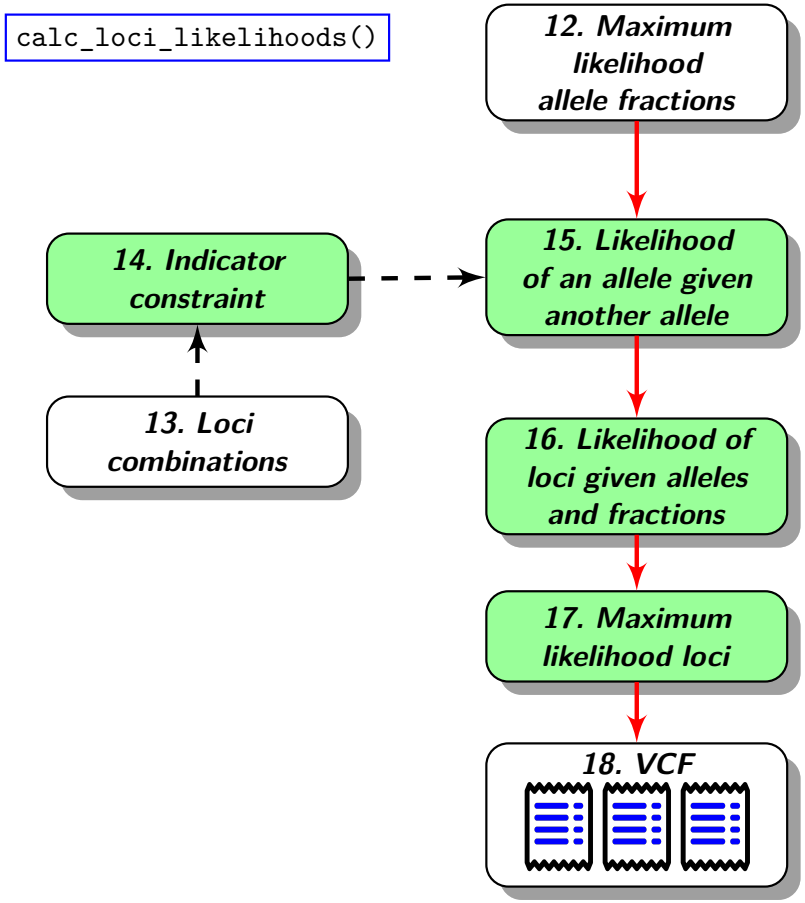
Implementierung - Zuordnung der Loci



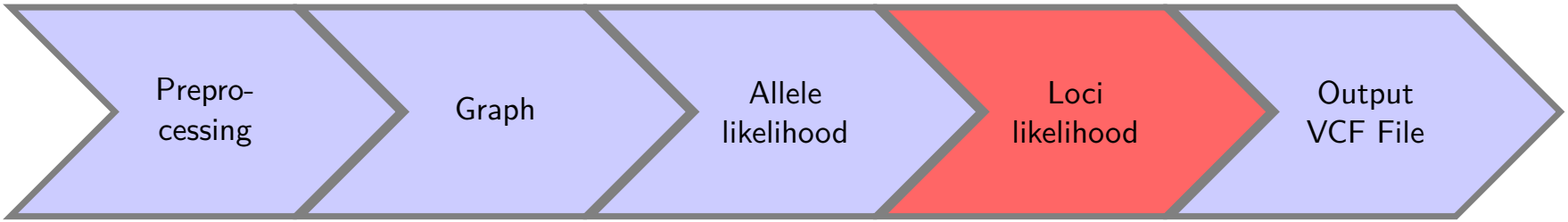


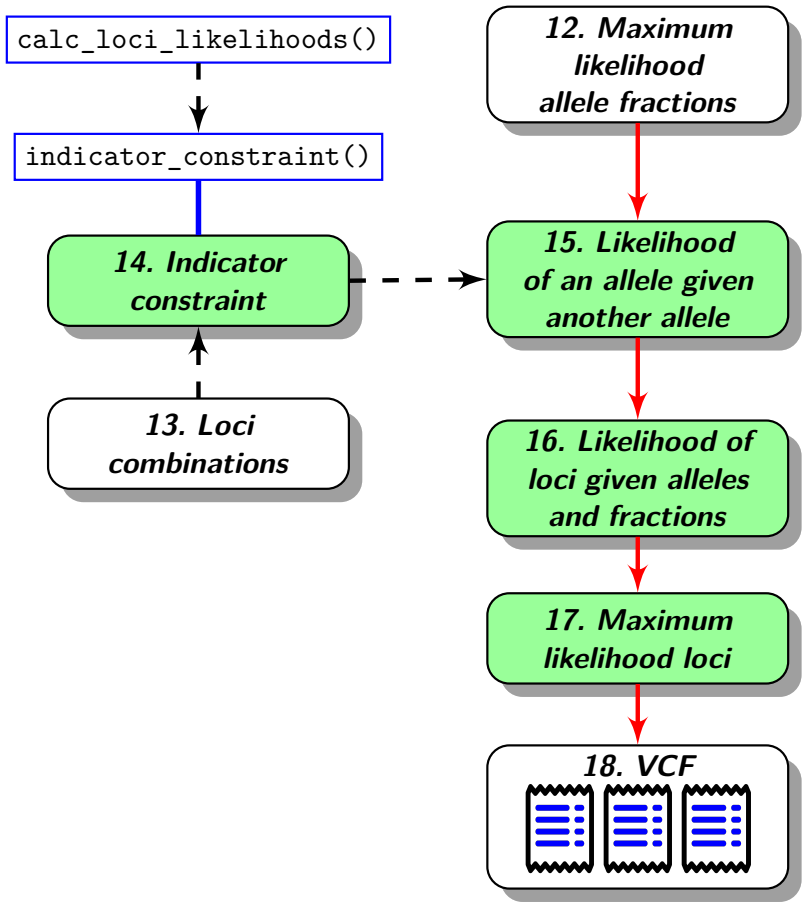
Implementierung - Zuordnung der Loci



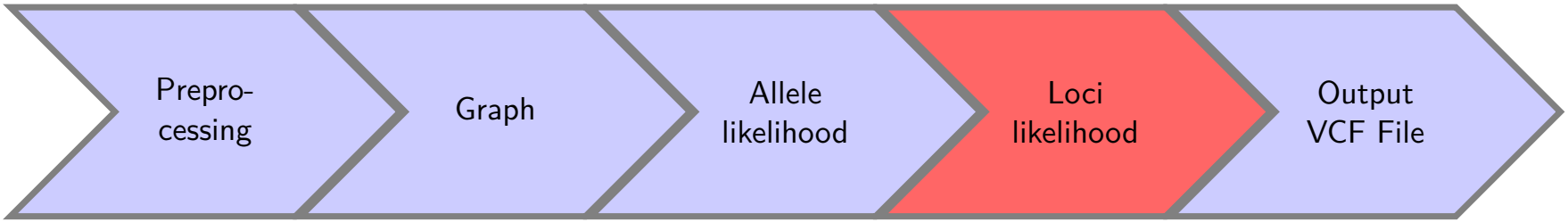


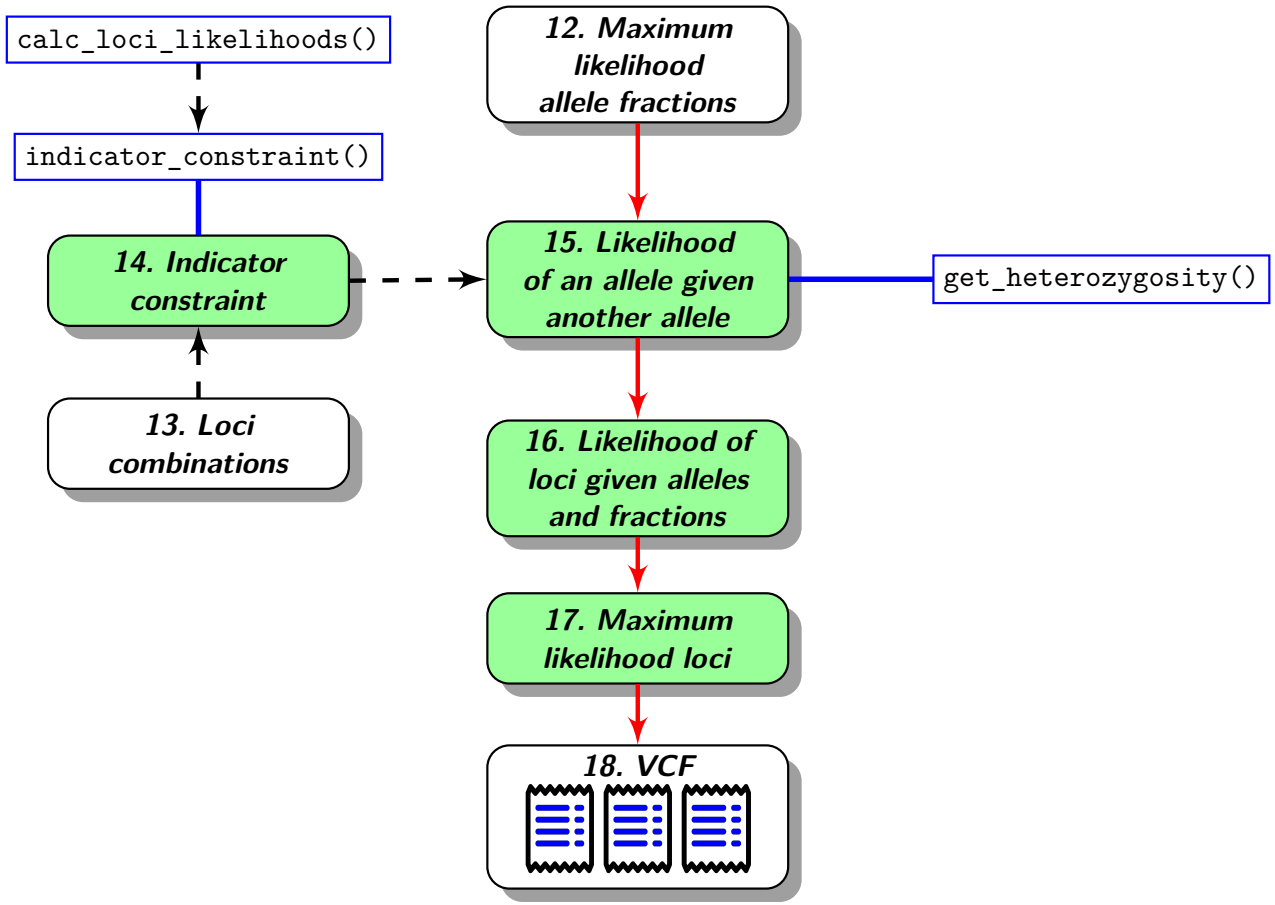
Implementierung - Zuordnung der Loci





Implementierung - Zuordnung der Loci

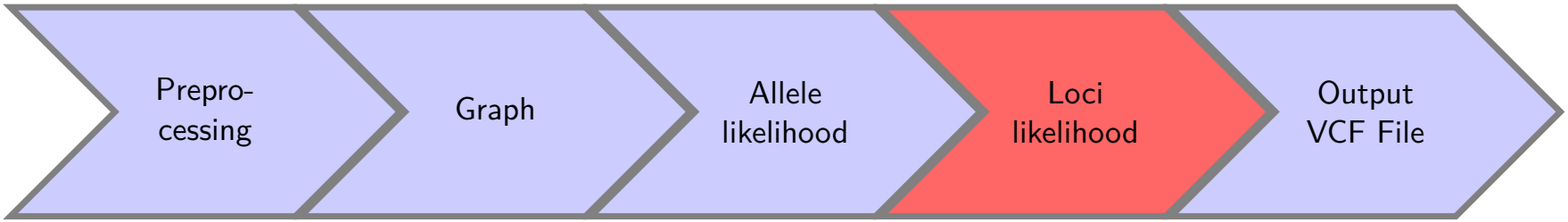


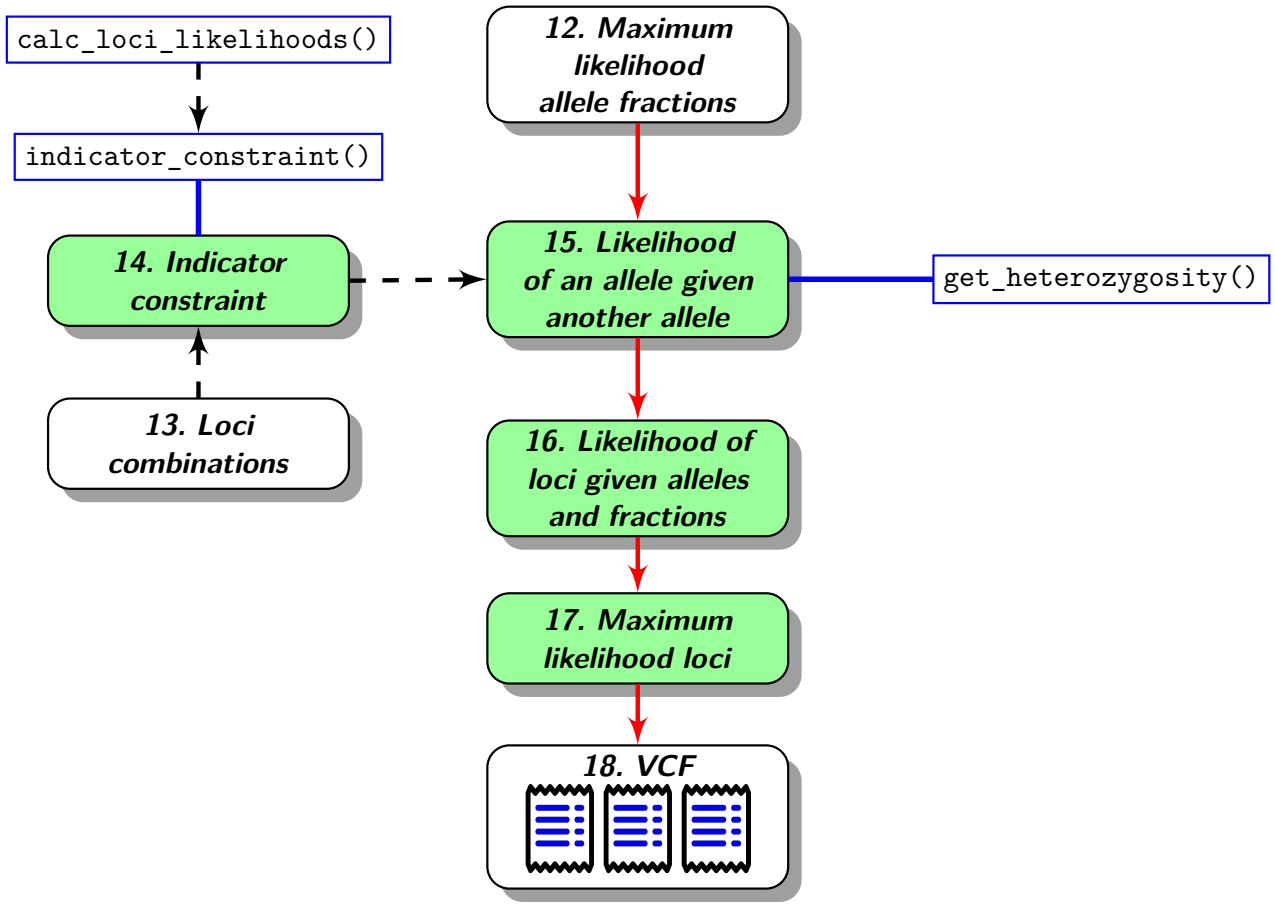


Implementierung - Zuordnung der Loci

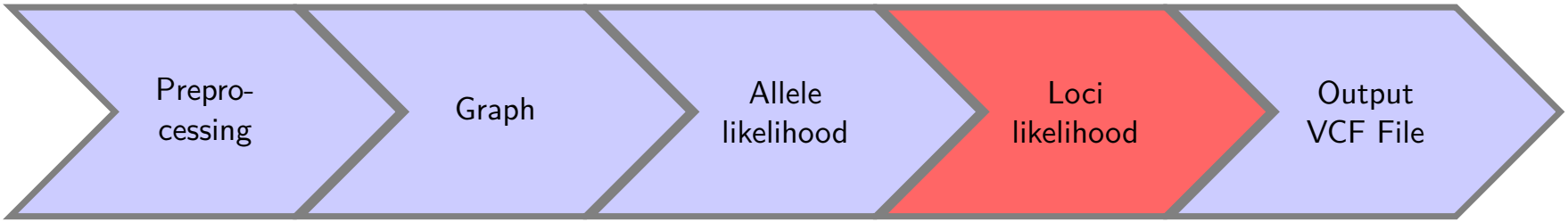
function GET_HETEROZYGOSITY(η_{sub}, η_{ins}, η_{del}, *cigar_tuples*, *reverse*)
    likelihood $\leftarrow 1.0$
    if reverse **then**
        swap values of η_{ins} and η_{del}
    end if
    for all (*operation*, *length*) $\in$ *cigar_tuples* **do**
        if *operation* $\in$ *match* **then**
            $likelihood \leftarrow likelihood \cdot (1 - (\eta_{sub} + \eta_{ins} + \eta_{del}))^{length}$
        end if
        if *operation* $\in$ *substitution* **then**
            $likelihood \leftarrow likelihood \cdot (\eta_{sub})^{length}$
        end if
        if *operation* $\in$ *insertion* **then**
            $likelihood \leftarrow likelihood \cdot (\eta_{ins})^{length}$
        end if
        if *operation* $\in$ *deletion* **then**
            $likelihood \leftarrow likelihood \cdot (\eta_{del})^{length}$
        end if
    end for
    return *likelihood*
end function

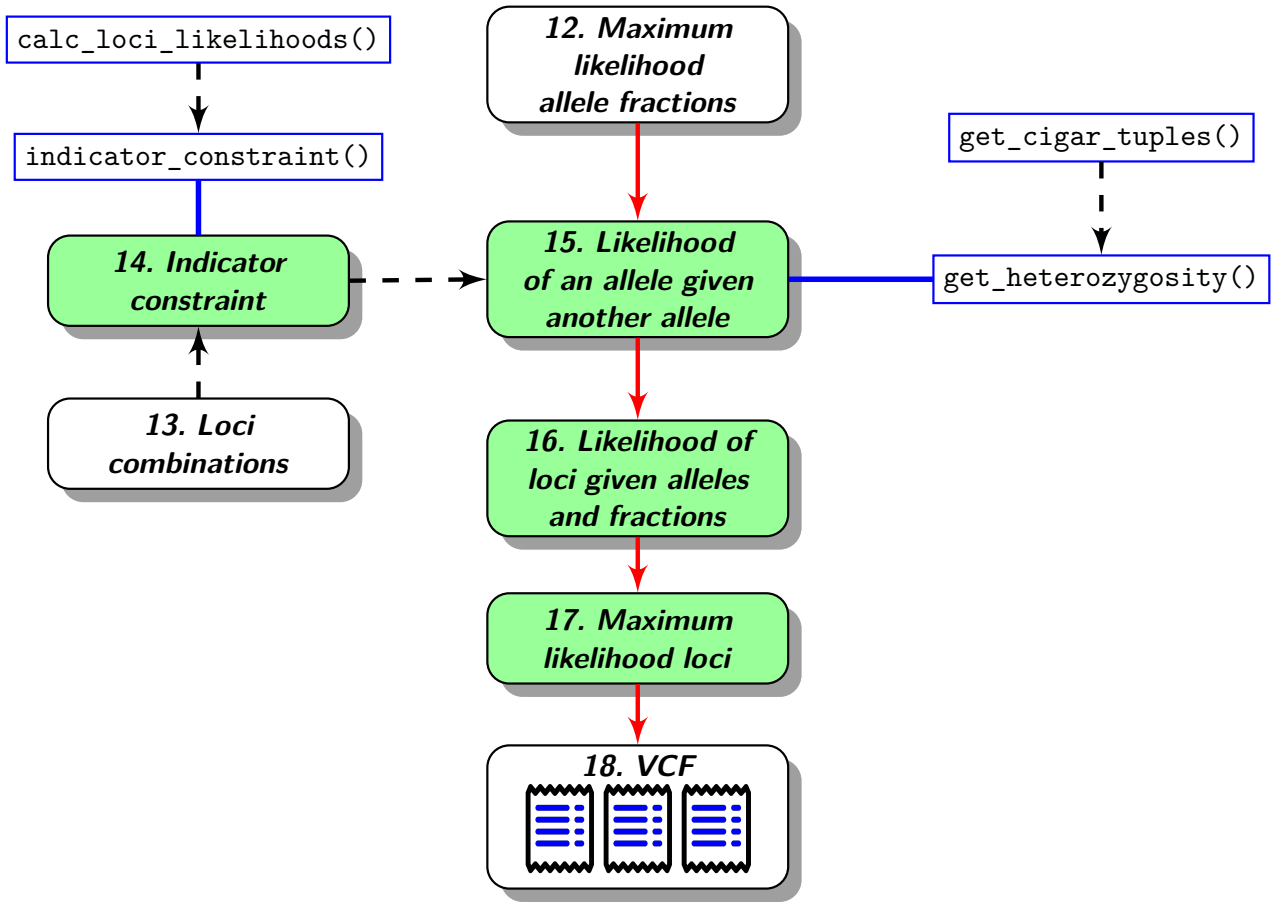
Implementierung - Zuordnung der Loci





Implementierung - Zuordnung der Loci

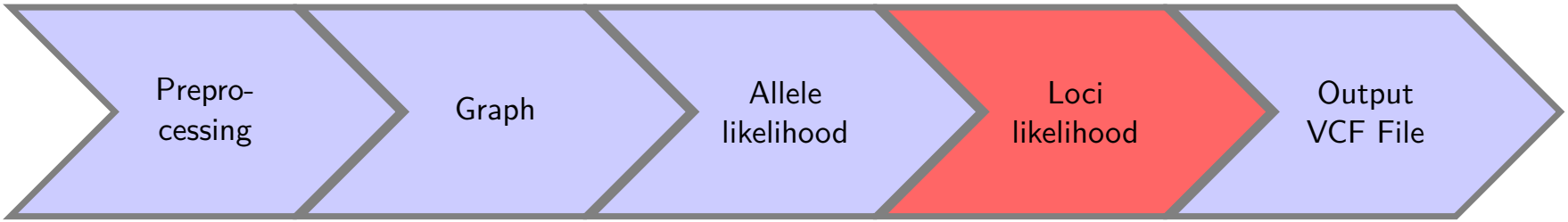


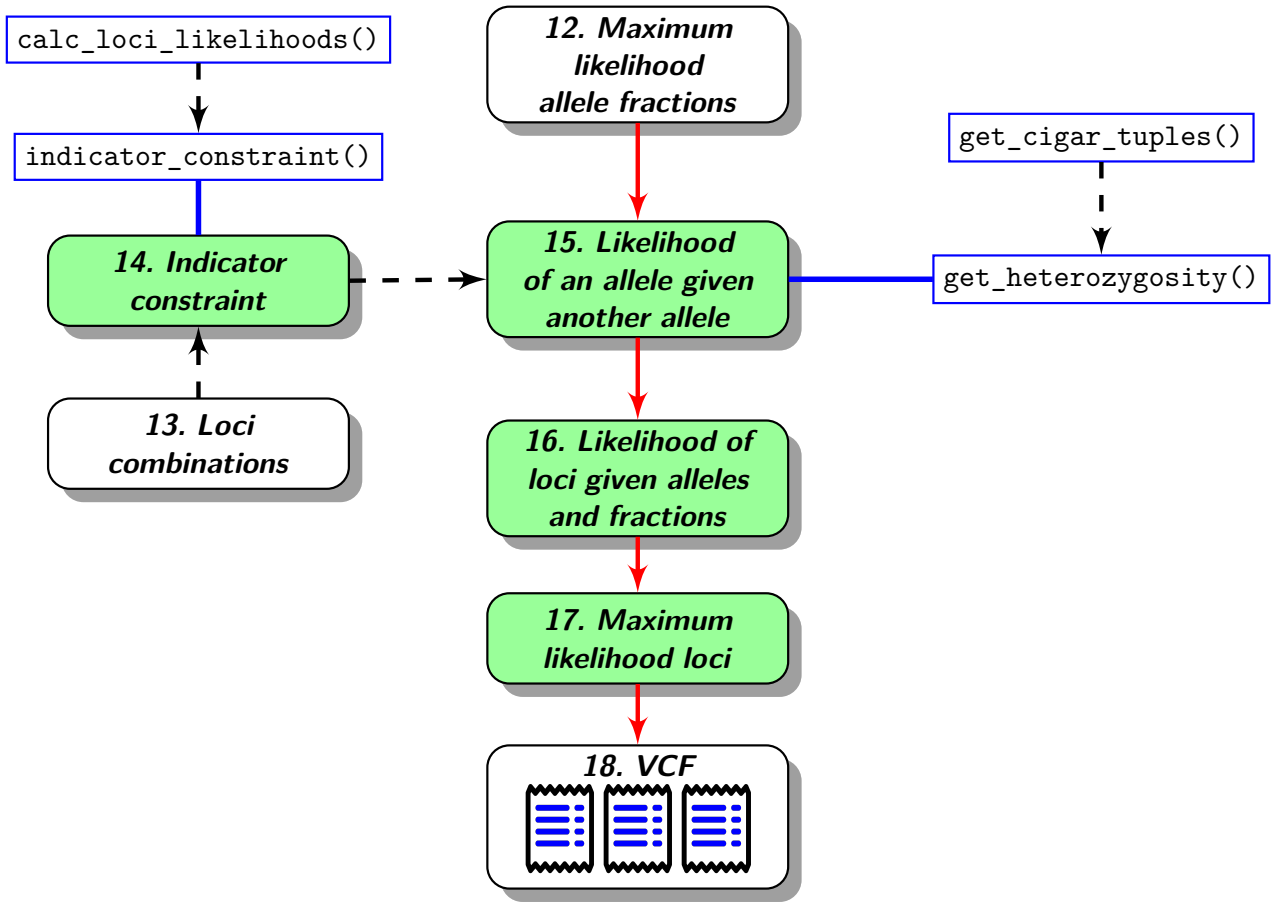


Implementierung - Zuordnung der Loci

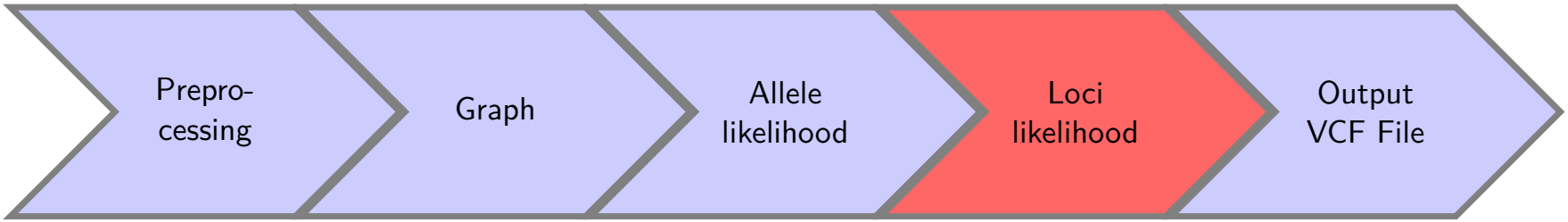
function GET_CIGAR_TUPLES(C_k, s_{query}, s_{ref})
  $R_{source} \leftarrow \{v_i \in C_k \wedge i, k \in \mathbb{N} \mid v_i[sequence] = s_{query}\}$
  $R_{target} \leftarrow \{w_j \in C_k \wedge j, k \in \mathbb{N} \mid w_j[sequence] = s_{ref}\}$
  for $v_i \in R_{source}$ **do**
    for $w_j \in R_{target}$ **do**
      if $(v_i, w_j) \in E_k$ **then**
        return ($E_k[(v_i, w_j)][cigar\_tuples]$, *False*)
      end if
      if $(w_j, v_i) \in E_k$ **then**
        return ($E_k[(w_j, v_i)][cigar\_tuples]$, *True*)
      end if
    end for
  end for
  return *None*
end function

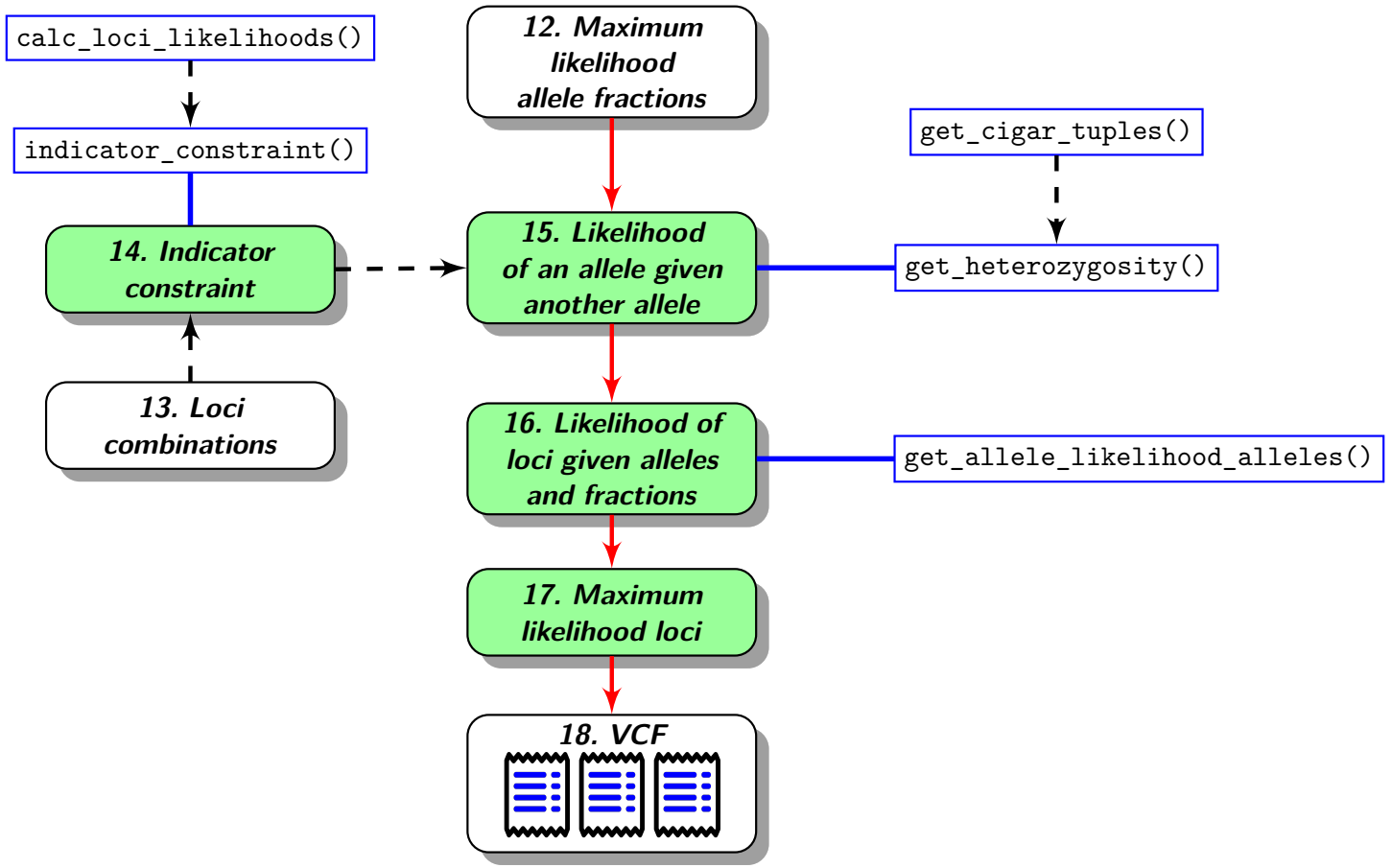
Implementierung - Zuordnung der Loci





Implementierung - Zuordnung der Loci

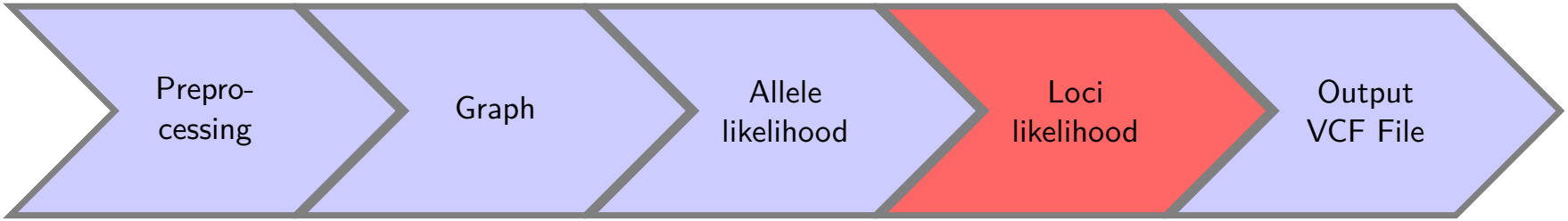




Implementierung - Zuordnung der Loci

function GET_ALLELE_LIKELIHOOD_ALLELES(C_k, S_{loc}, $dict_{loc}$)
  $likelihood \leftarrow 1.0$
  for $(s_{a_i}, s_{a_j}) \in S_{loc}$ **do**
    if $\exists(s_{a_i}, s_{a_j}) : ((s_{a_i}, s_{a_j}), L_{a_i,a_j}) \in dict_{loc}$ **then**
      $likelihood \leftarrow likelihood + L_{a_i,a_j}$
    else
      $cigar \leftarrow get\_cigar\_tuples(C_k, s_{a_i}, s_{a_j})$
      if *cigar* exists **then**
        $cig \leftarrow cigar[0]$
        $rev \leftarrow cigar[1]$
        $\eta_{rates} \leftarrow C_k[\eta_{sub}] \cup C_k[\eta_{ins}] \cup C_k[\eta_{del}]$
        $L_{a_i,a_j} \leftarrow log(get\_heterozygosity(\eta_{rates}, cig, rev))$
        $dict_{loc} \leftarrow dict_{loc} \cup ((s_{a_i}, s_{a_j}), L_{a_i,a_j})$
        $likelihood \leftarrow likelihood + L_{a_i,a_j}$
      end if
    end if
  end for
  return $e^{likelihood}$
end function

Laufzeit - Zuordnung der Loci



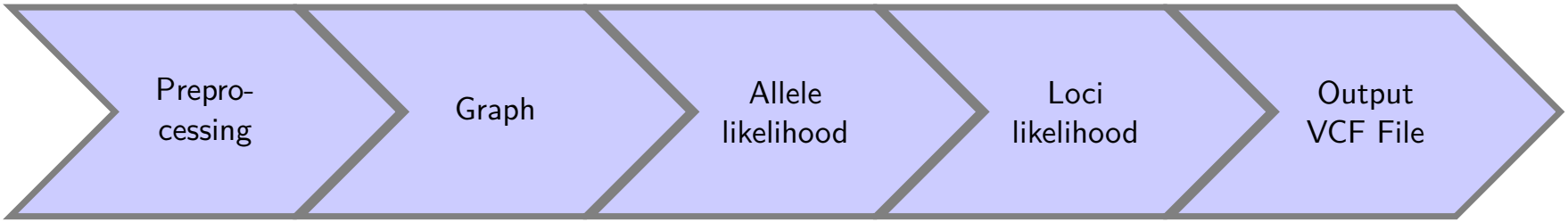
- `calc_loci_likelihoods()`: $O(n!)$
- `indicator_constraint()`: $O(n)$
- `get_cigar_tuples()`: $O(|V_{C_i}|^3)$
- `get_heterozygosity()`: $O(l)$
- `get_allele_likelihoods_allele()`:

  Likelihood und CIGAR-Tuples müssen für $\binom{n}{2}$ Elemente ermittelt werden, Laufzeitfaktor: $O(\binom{n}{2}) \in O(n^2)$

  Eintrag existiert im Dictionary für $n! - \binom{n}{2}$ Elemente, Laufzeitfaktor $O(n! - \binom{n}{2}) \in O(n! - n^2)$

- Maximumsbestimmung: $O(n!)$

Laufzeit - Gesamtlaufzeit

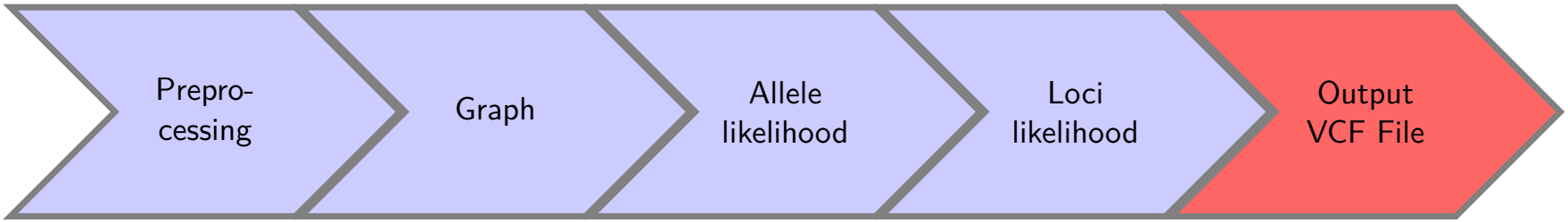


Laufzeit - Gesamtlaufzeit

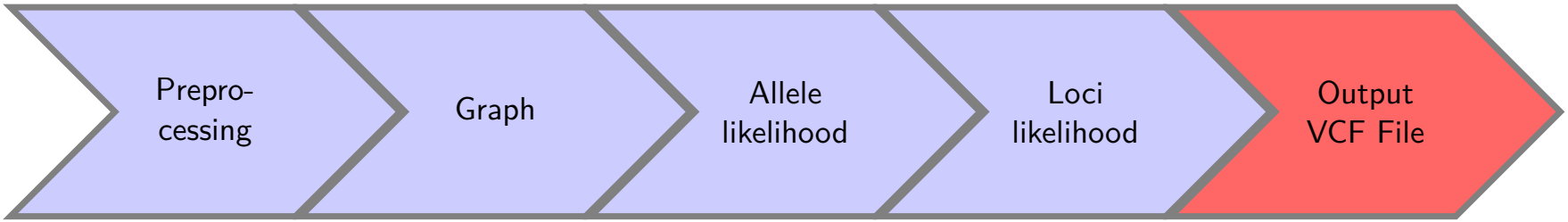
Laufzeit - Gesamtlaufzeit

- ddddddd

Model - Ausgabe im Variant Call Format

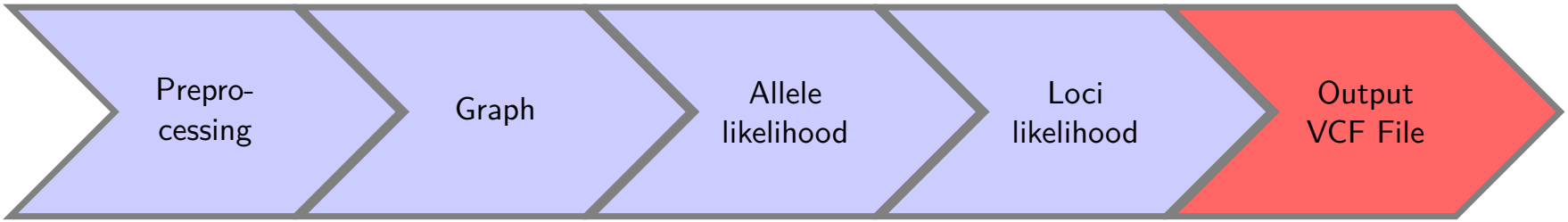


Model - Ausgabe im Variant Call Format



enthält die Loci mit den Sequenzen ihrer Allele und ihrem Genotyp

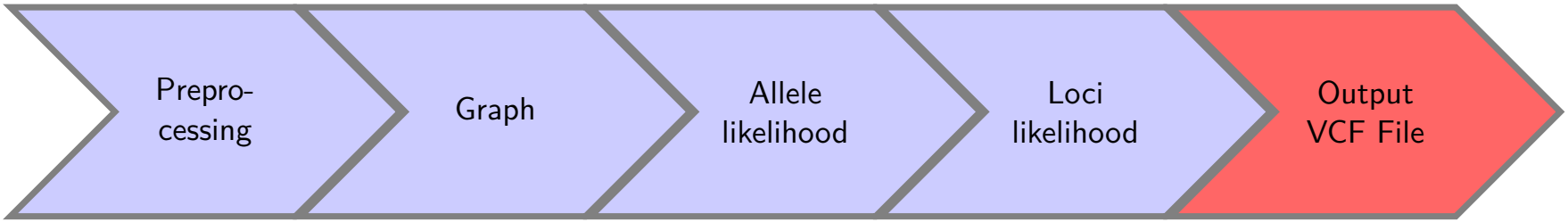
Model - Ausgabe im Variant Call Format



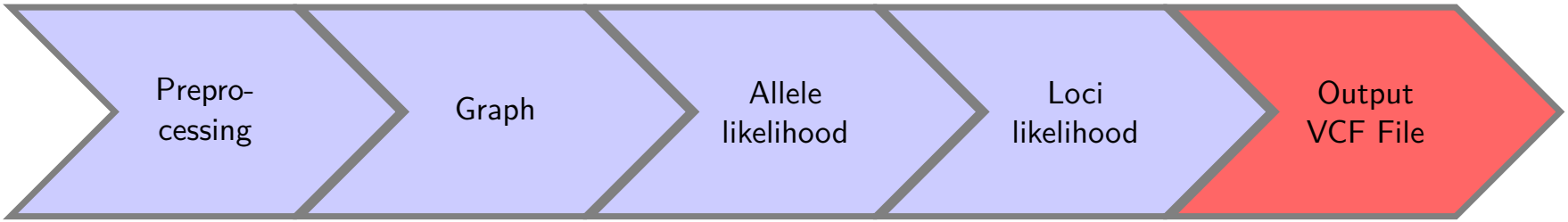
enthält die Loci mit den Sequenzen ihrer Allele und ihrem Genotyp

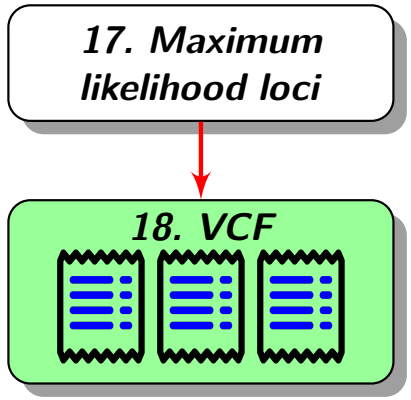
#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	A
LOC0	1	.	TTTGCATGTTGCGTCAGA	TTTGCATGTTGCGTCCGA	.	.	.	GT	0/1
LOC1	1	.	GGGTATCGCCTGTGGCTG	.	.	.	.	GT	0/0
LOC2	1	.	AAGGATCTTTGCCGACTT	.	.	.	.	GT	0/0
LOC3	1	.	GGCTAAGTTAACTTGAGA	.	.	.	.	GT	0/0
LOC4	1	.	GCGTCGAATCGGCACTCG	.	.	.	.	GT	0/0
LOC5	1	.	GTAAATCGATGCGGCGTG	.	.	.	.	GT	0/0
LOC6	1	.	GATGCCTGATGCGTCTTT	.	.	.	.	GT	0/0
LOC7	1	.	CGATCCCGCCATATGCAC	.	.	.	.	GT	0/0
LOC8	1	.	CCCCGACGAGTCTATCTC	.	.	.	.	GT	0/0
LOC9	1	.	TGACGCTTTGTTTATCTG	TGACGCTTTGATTATCTG, TTACGCTTTGTTTATCTG	.	.	.	GT	0/1
LOC10	1	.	TGACGCTTTGTTTATCTG	TGACGCTTTGATTATCTG, TTACGCTTTGTTTATCTG	.	.	.	GT	1/2
LOC11	1	.	TTTATACGCGGACACTCT	.	.	.	.	GT	0/0
LOC12	1	.	GTTTGGTTCACTGTCCTT	.	.	.	.	GT	0/0
LOC13	1	.	CGCCGTGTGTGTTTGCCA	CGCCGTGGGTGTTTGCCA	.	.	.	GT	0/1
LOC14	1	.	TGGTCGCCTTTTGCCAAT	.	.	.	.	GT	0/0
LOC15	1	.	AGCAATTTAAACCCGATA	.	.	.	.	GT	0/0

Implementierung - Ausgabe im Variant Call Format

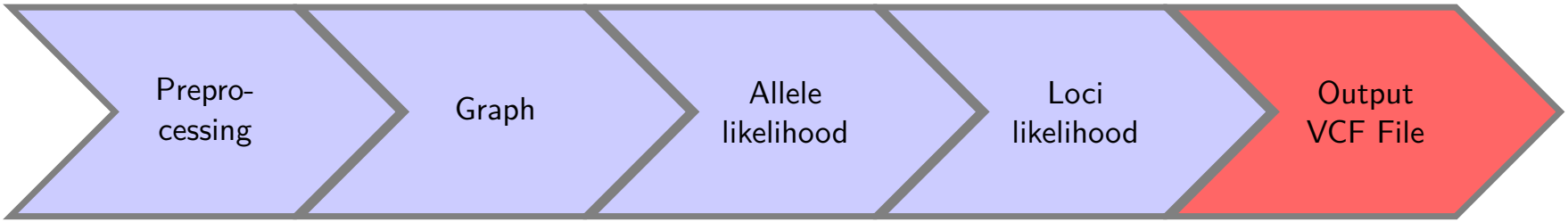


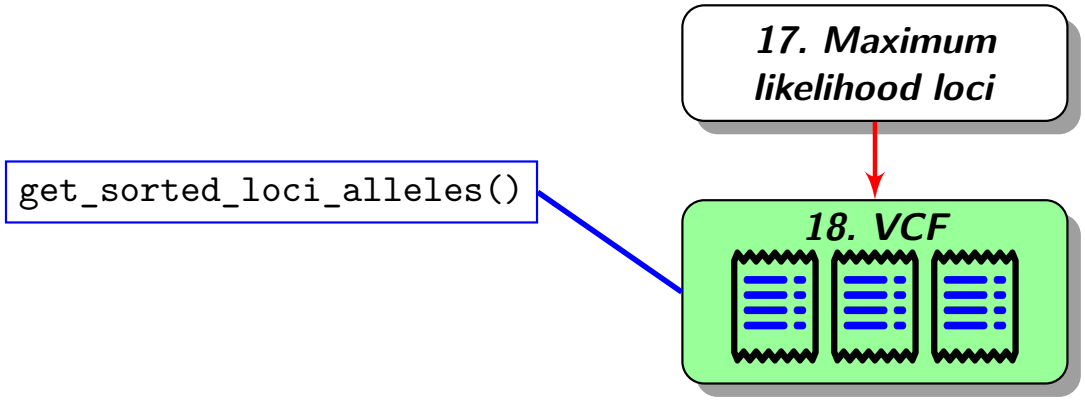
Implementierung - Ausgabe im Variant Call Format



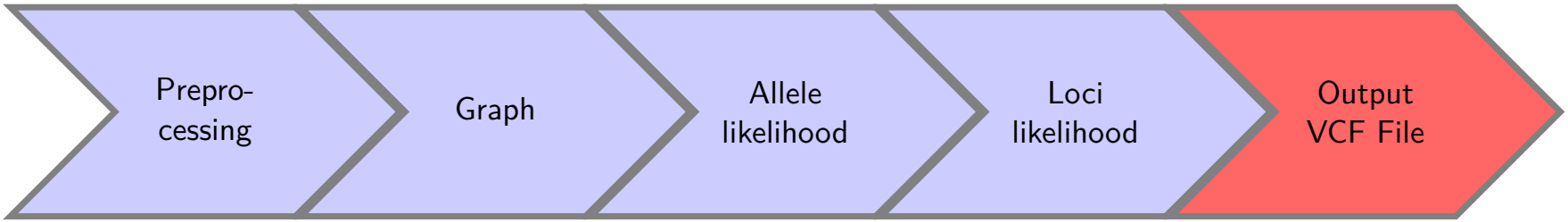


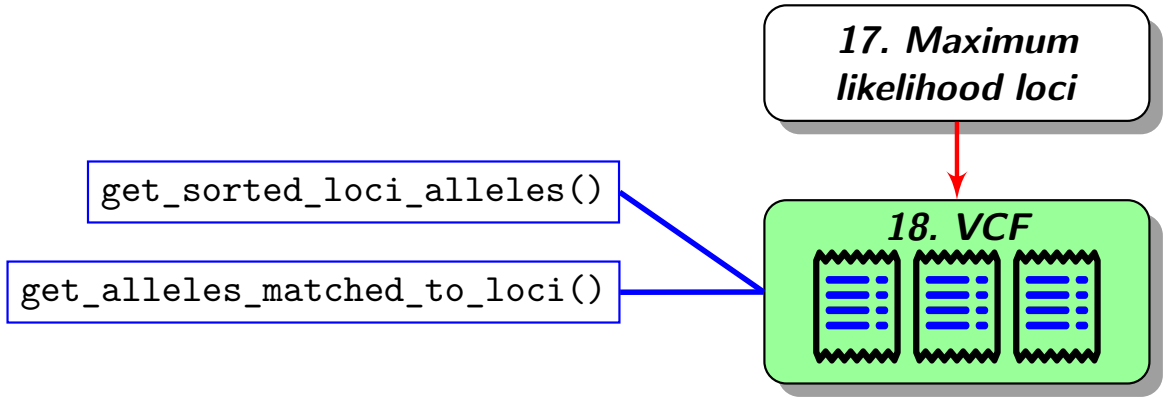
Implementierung - Ausgabe im Variant Call Format



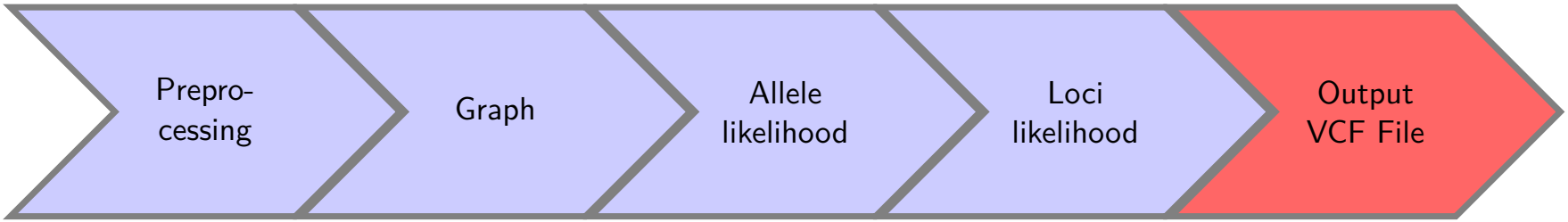


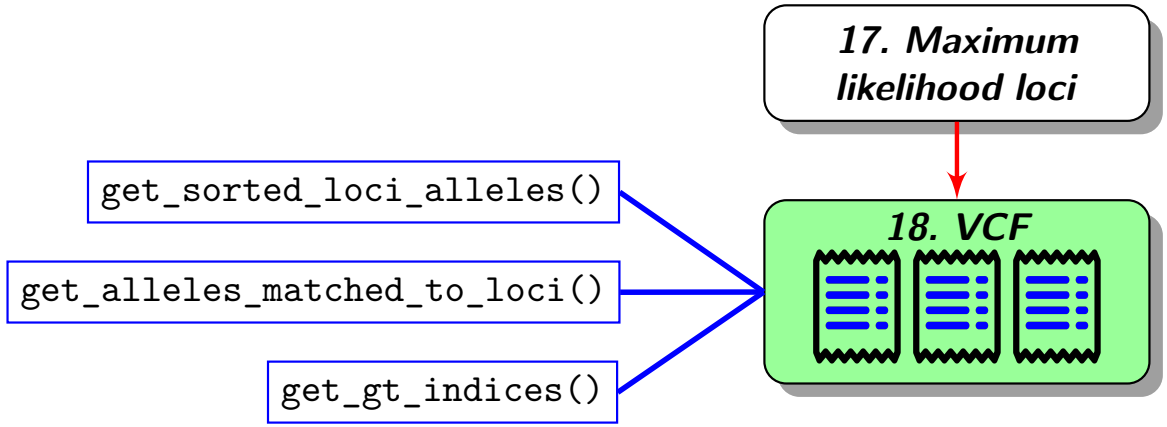
Implementierung - Ausgabe im Variant Call Format



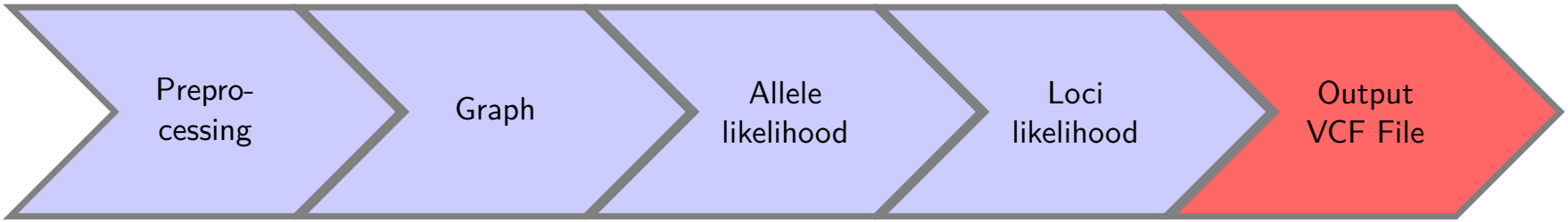


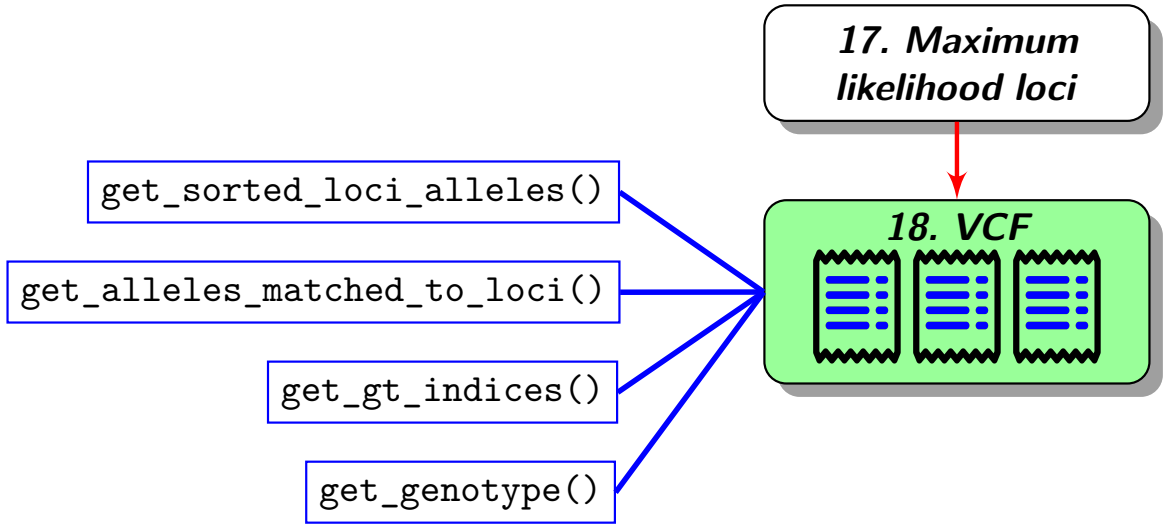
Implementierung - Ausgabe im Variant Call Format





Implementierung - Ausgabe im Variant Call Format





text

text

text

text

text

text

text

text

text

text

text

Bildquellen I

[1] Mouagip: *Aminoacids table.svg*. 2021. – source: `https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aminoacids_table.svg`

[2] Margulies, Elliott: *Transcription*. – source: `https://www.genome.gov/genetics-glossary/Transcription`

[3] Leja, Darryl: *Transfer RNA (tRNA)*. – source: `https://medlineplus.gov/genetics/understanding/basics/noncodingdna/`

[4] Margulies, Elliott: *Transfer RNA (tRNA)*. – source: `https://www.genome.gov/genetics-glossary/Transfer-RNA`

[5] Ruiz, Mariana: *DNA replication*. – source: `https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_replication_en.svg`

[6] Collins, Francis: *Mutation*. – source: `https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mutation`

Bildquellen II

[7] Enzoklop: *Polymerase Chain Reaction - Schematic mechanism of PCR*. – source: `https://en.wikipedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction-en.svg`

[8] Christoph Goemans, Norman M.: *Prinzip der DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode*. – source: `https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Didesoxy-Methode.svg`

[9] Derksen, Bryan: *EcoRI restriction enzyme recognition site with cleavage marked*. – source: `https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:SmaI_restriction_enzyme_recognition_site.svg`

[10] Derksen, Bryan: *EcoRI restriction enzyme recognition site.*. – source: `https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:EcoRI_restriction_enzyme_recognition_site.svg`

[11] Clark, Jonathan: *Schematic diagram of RADseq*. – source: `https://en.wikipedia.org/wiki/File:RADseq_schematic.pdf`

Weiteres Bildmaterial für die Erstellung des Workflowdiagramms

Diagramm: Alanis, Cristo J.: Schema of Labs on a class. source: `https://texample.net/tikz/examples/labs-schema/`.

Abbildung der DNA: Velickovic, Petar: Deoxyribonucleic acid (DNA). source: `https://github.com/PetarV-/TikZ/tree/master/DNA`.

Icon für VCF-Datei: Twitter, Inc., Mark Otto, and the Bootstrap authors: Bootstrap icons - receipt. source: `https://github.com/twbs/icons/blob/main/icons/receipt.svg`.