# Bioinformatica

UniShare

Davide Cozzi
@dlcgold

# Indice

# Capitolo 1

# Introduzione

**Questi appunti sono presi a lezione. Per quanto sia stata fatta una revisione è altamente probabile (praticamente certo) che possano contenere errori, sia di stampa che di vero e proprio contenuto. Per eventuali proposte di correzione effettuare una pull request. Link:** `https://github.com/dlcgold/Appunti`.

# Capitolo 2

# Introduzione alla bioinformatica

La genomica ha dimostrato negli ultimi anni ha dimostrato una capacità incredibile di produrre dati e questo ha portato alla nascita del bioinformatico, che diventa un esperto della gestione di questi dati sia dal punto di vista algoritmico che dal punto vista sistemistico.
A partire dal 2000/2001 ma sopratutto poco prima del 2010 si ha una crescita dei **dati genomici** non indifferente. I dati genomici sono quelli provenienti dal sequenziamento del DNA. Negli ultimi anni questa crescita ha superato la curva della **legge di Moore** quindi la crescita in termini di hardware (che si stima migliorare ogni 18 mesi) non riesce più a soddisfare la stima di richiesta di hardware necessario per il sequenziamento. Questa stima di sequenziamento è basata su Illumina, che produce le più diffuse macchine fisiche per il sequenziamento. Case farmaceutiche e laboratori che studiano il sequenziamento hanno almeno una macchina Illumina. La quantità di dati ha raggiunto i livelli dei petabyte e quindi ci si aspetta (e in parte già è così) che l'hardware non sia più in grado di elaborare tali dati.
La bioinformatica riceve quindi questa tipologia di dati. La bioinformatica è cruciale nell'ambito della ricerca in biologia molecolare (riguardante prettamente DNA), dove sempre più si ha necessità dell'appoggio dell'informatica, avendo a che fare con dati, nel dettaglio grandi dati.
Un altro aspetto è quello legato alle nanotecnologie e alla così detta **DNA-based computation**. Un esempio è legato al fatto che ormai si è in grado di manipolare il DNA al punto di essere in grado di assemblarlo in laboratorio, tramite un meccanismo a *tiling (tasselli)*, dove il tiling tendenzialmente è una figura regolare (triangolare, rettangolare, esagonale, etc...) con cui si compone del materiale biologico. Si riescono a fare letteralmente figure con il DNA (anche stelle, smile etc...) ma, sopratutto di questi tempi, vaccini,

che sono appunto manipolazione genetica di DNA o RNA. **Questa parte non è trattata nel corso**.

## 2.1 Breve introduzione biologica

Nel corso tratteremo prevalentemente sequenze di DNA. All'interno della cellula si hanno i **cromosomi** e un **genoma** altro non è che la collezione di cromosomi all'interno di un individuo. Il singolo cromosoma è rappresentato da filamenti di DNA "attorcigliati". Il cromosoma sostanzialmente è formato dalla coppia di due filamenti che si uniscono in una parte centrale detta **centromero**. I cromosomi, dal punto di vista informatico, sono vere e proprie sequenze (con i 4 nucleotidi, adenina, citosina, guanina e timina, ricordando la complementarietà delle basi A-T C-G), anche se si hanno varie regole per gestire questa "semplificazione". Un altro aspetto è il passaggio dal DNA alle **proteine**, anche se nel corso non verrà trattata la **proteomica**, ovvero lo studio delle proteine in se. In merito al passaggio da DNA a proteine si ha che il DNA contiene i **geni** da cui poi derivano le proteine. Un gene può portare a più di una proteina e questo si è scoperto grazie al sequenziamento. Allo stato attuale per "leggere" il DNA di un individuo dobbiamo passare per macchine di sequenziamento che però non possono leggerlo interamente ma, prendendo il DNA da una provetta (anche a partire da una singola cellula nel **sequenziamento single-cell**), si ha in output un file con dei frammenti del DNA originale, replicati in coppie, dette **read**. Tramite vari algoritmi siamo poi in grado di arrivare a capire e studiare il DNA per poi arrivare, si spera, ad uno dei principali fini della bioinformatica, quello di curare la vita, tramite terapie mediche (si parla di **medicina traslazionale**, ovvero non curo un paziente tramite protocolli generali ma sulla base del DNA del paziente, che viene studiato ai fini di stabilire la migliore terapia, che diventa personalizzata per l'individuo). Le scoperte biologiche più attuali sono ottenute praticamente sempre grazie all'intervento anche dell'informatica e della bioinformatica.
Un esempio di uso delle sequenze è confrontare regioni genomiche di varie specie per valutare eventuali somiglianze. Un primo modo è diretto, un secondo è confrontare dopo l'allineamento, con l'inserimento di gap (studieremo la cosa nel dettaglio).
Il bioinformatico fornisce al biologo/biotecnologo la strumentazione necessaria per fare le varie analisi.

## 2.2 Progetto Genoma Umano

Un elemento chiave nella bioinformatica è il **Human Genome Project (*progetto genoma umano*)**, progetto partito prima del 2000 (la prima base è del 1990) con vari obiettivi:

- identificare tutti i circa 30.000 geni nel DNA umano
- determinare le sequenze dei 3 miliardi di coppie di basi chimiche che compongono il DNA umano
- memorizzare queste informazioni in banche dati/db
- migliorare gli strumenti per l'analisi dei dati

La bioinformatica è andata avanti quasi sempre con progetti globali e il Progetto Genoma Umano è stato il primo di questi progetti, diciamo che lì nacque la bioinformatica. Si hanno vari *milesstones*:

- *1990:* progetto avviato come sforzo congiunto del U.S. Department of Energy e del National Institutes of Health (NIH)
- *Giugno 2000:* completamento di una bozza di lavoro dell'intero genoma umano
- *Febbraio 2001:* vengono pubblicate le analisi della bozza di lavoro
- *Aprile 2003:* Il sequenziamento del Progetto Genoma Umano è completato e il progetto è dichiarato finito due anni prima del previsto

Quest'anno, nel 2020, è stato lanciato un progetto ulteriore in quanto ora si è anche in grado di sequenziare il DNA nei pressi dei **telomeri**, ovvero le terminazioni dei cromosomi, che sono le regioni più difficili da ricostruire tramite il sequenziamento. Per farlo si hanno algoritmi e software davvero molto sofisticati.
Vediamo qualche numero:

- il genoma umano contiene 3 miliardi ($3 \times 10^9$) di basi nucleotidiche chimiche che sono 4:
  - adenina (A)
  - citosina (C)
  - guanina (G)

  - timina (T)

- il gene mediamente è composto da 3000 basi, ma le dimensioni variano molto, con il più grande gene umano noto che è la Distrofina con 2.4 milioni di basi
- il numero totale di geni è stimato a circa 30000, molto inferiore alle stime precedenti da 80000 a 140000 (in quanto prima c'era il dogma che un gene codificasse una sola proteina, e si avevano circa 140000 proteine, che si conoscevano anche solo per le analisi del sangue)
- quasi tutte (99.9%) le basi nucleotidiche sono esattamente le stesse in tutte le persone. Basta lo 0.1% di differenze tra basi per "fare la differenza", anche differenziando predisposizioni geniche per una certa malattia
- le funzioni sono sconosciute per oltre il 50% del gene scoperto

Vediamo anche qualche numero (in stima) in merito agli organismi più studiati dai bioinformatici (spesso organismi con poche basi), più l'attualissimo *sars-cov-2*:

| organismo | numero basi | numero di geni |
|---|---|---|
| uomo (Homo sapiens) | 3 miliardi | 30000 |
| topo di laboratorio (M. musculus) | 2.6 miliardi | 30000 |
| arabetta comune (A. thaliana) | 100 milioni | 25000 |
| nematoda (C. elegans) | 97 milioni | 19000 |
| mosca della frutta (D. melanogaster) | 137 milioni | 13000 |
| lievito (S. cerevisiae) | 12.1 milioni | 6000 |
| batterio (E.coli) | 4.6 milioni | 3200 |
| Human immunodeficiency virus (HIV) | 9700 | 9 |
| sars-cov-2 | $\sim$27 milioni | $\sim$15 |

## 2.3 Variazioni

Una volta conosciuta la sequenza dell'uomo si è cercato di studiare quello 0.1% di differenze tra vari esseri umani. Queste differenze sono dette **SNPs (*single nucleotide polymorphisms*)** (*detti a voce "snips"*) che rappresentano la variabilità nella popolazione umana. Sono le differenze a livello di singolo nucleotide. Subito dopo il Progetto Genoma Umano è partito, sempre

tramite il National Institutes of Health (NIH), un progetto che confrontasse popolazione africana, asiatica e statunitense per calcolare queste differenze, individuate tramite tool informatici, tramite il cosiddetto **assemblaggio di aplotipi**, che è prettamente un problema informatico, *NP-complete*, la cui soluzione più recente è data da un **algoritmo parametrico**. Dagli aplotipi vengono estratti gli SNPs e questo sarà visto tra qualche lezione. Gli SNPs sono serviti a determinare differenze tra le varie popolazioni campione in merito, ad esempio alla predisposizione alla Talassemia nelle popolazioni mediterranee. Questi studi servono appunto capire le predisposizioni delle varie popolazioni. Se una popolazione ha, nella maggior parte dei casi, una certa base in una certa posizione allora si ha uno SNPs. Il famoso 0.1% forma questi SNPs, il 99.9% della popolazione porta il cosiddetto **allele di maggioranza** mentre lo 0.1% l'**allele di minoranza**.
Uno studio ha dimostrato che, in Italia, solo i Sardi hanno un profilo genetico ben definito, tutti gli altri sono dei "mix genetici" e questo si è scoperto studiando gli SNPs.
Dal Progetto genoma Umano si è poi passati a confrontare il genoma di piccolissimi campioni, ad esempio 1000 individui, con il 1000 Genomes Project, un altro progetto con sforzi internazionali, fatto per mappare le variazioni su una popolazione di 1000 individui. Si segnala che per sequenziare un individuo ci sono voluti 10 anni nel primo caso ma poi ci è voluto molto meno. Ora un singolo individuo si sequenzia in qualche ora, a costi molto ridotti.
Dal DNA si sono anche ricavati i flussi migratori avvenuti nel corso della storia.

## 2.4 Pangenoma

Si vedrà, durante il corso, che dire **il genoma è una singola sequenza**, è ormai sostanzialmente errato. Avendo sequenziato milioni di individui si parla di **pangenoma** e le analisi devono ormai essere fatte non su un singolo genoma di riferimento ma si usa quello abbinato a tutta la serie di 0.1% di SNPs individuati finora. Nel dettaglio un pangenoma è una collezione di genomi multipli che sono correlati tra loro (variando solo in pochi punti). Si ha il pangenoma dell'uomo, di un batterio etc...
Dal punto di vista informatico diciamo comunque che il DNA è una sequenza sotto l'assunzione della **complementarietà delle basi**:

- adenina e timina sono complementari
- citosina e guanina sono complementari

e questo mi permette di poter studiare solo uno dei due filamenti del DNA.

**Esempio 1.** *Sia data la sequenza:*

$$S = acctacga$$

*la complementare è:*

$$S' = tggatgct$$

Se prendo la sequenza (o meglio una porzione di essa) di $S_1$ di un individuo $h_1$ e la sequenza $S_2$ di un individuo $h_2$ avrò un alta somiglianza con eventualmente uno o più SNPs.

La posizione dello SNP è detto **locus**. Uno SNP si ha quando nel 99.9% dei casi tutti gli individui hanno una certa base in una data posizione, avendo l'*allele di maggioranza*, mentre lo 0.1% degli individui ne ha una diversa, avendo l'*allele di minoranza* (e lo rilevo confrontando una popolazione).

**Esempio 2.** *Si hanno:*

$$S_1 = acc\mathbf{t}acga$$

$$S_2 = acc\mathbf{g}acga$$

*ho uno SNP nel locus 4. Ipotizzando che il 99.9% degli individui siano come l'individuo con la sequenza $s_1$ ho che la base $t$ è un allele di maggioranza mentre la base $g$ è un allele di minoranza.*

L'uomo si dice essere **biallelico** in quanto le "opzioni" per una certa posizione sono solo due. Alcuni cambiamenti possono anche essere del tipo *inserzione/delezione* (anche per sequenze di più basi contigue), parlando di **variazioni strutturali** (che sono comunque più complesse e meno tipiche). Per rappresentare il fatto che si hanno più sequenze con queste variazioni, soprattutto se sono inserimenti e delezioni, ma considerando che il 99.9% delle basi è uguale (cercando quindi una rappresentazioni che ottimizzi questa cosa), rappresentando quindi un pangenoma, dal punto di vista computazionale è un **grafo**. Ogni sequenza identica collassa in un solo nodo, avendo poi singoli nodi per le variazioni.

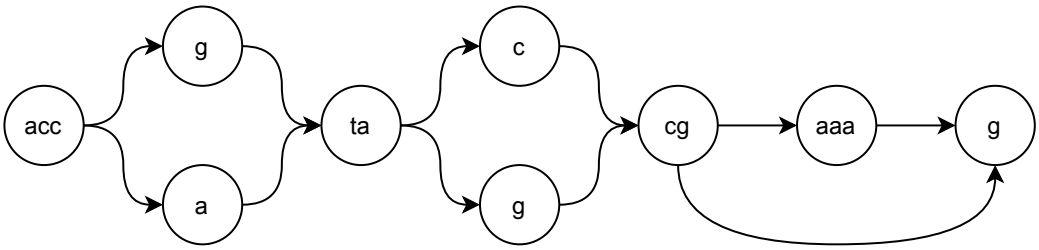
**Esempio 3.** *Ipotizzo di avere (con $-$ per indicare delezioni):*

$$S_1 = acc\mathbf{g}ta\mathbf{c}cg\mathbf{aaa}g$$

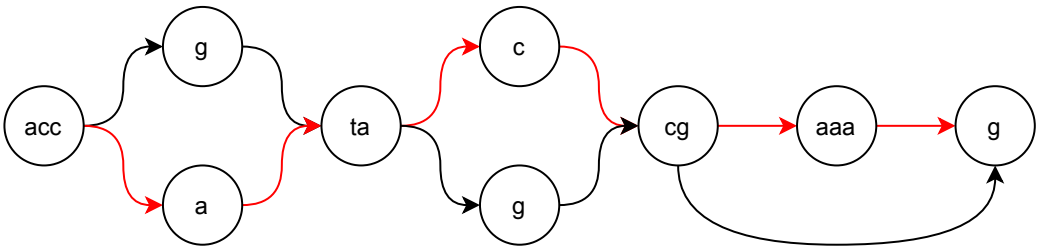
$$S_2 = acc\mathbf{a}ta\mathbf{g}cg\mathbf{aaa}g$$

$$S_3 = acc\mathbf{g}ta\mathbf{c}cg\mathtt{---}g$$

*E ottengo un grafo del tipo:*




Studiando i cammini dei grafi ottengo tutte le rappresentazioni.
Questa rappresentazione però ha dei difetti, in quanto potrei avere cammini che non rappresentano nessuna sequenza di partenza. Pensando all'esempio sopra potrei avere il cammino in rosso che non rappresenta nessuna delle tre sequenze:




Rappresento quindi più di quello che voglio rappresentare.
Un pangenoma è un grafo che rappresenta una popolazione senza fare grandi distinzioni, avendo percorsi che non sono riscontrabili in nessun individuo della popolazione. Si ha comunque che il concetto di sequenza non è più adeguato. Il grafo di una popolazione è enorme e comunque, tramite colori, si possono distinguere i vari percorsi della popolazione (distinguendo facilmente "tracce comuni"). Parlando quindi di **genoma di riferimento** o si parla di quello specifico di un individuo o si parla del pangenoma di una popolazione, con le varianti.
Dal punto di vista di *file* le varianti vengono date in un file **Variant Call Format (*VCF*)**. L'input classico dei software è quindi spesso un VCF, così come l'output.

## 2.5 Progetti attuali

Vediamo ora quali sono i grandi progetti su larga scala attualmente in corso:

- **The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer Analysis Project (*TCGA*)**, che cerca di costruire un catalogo delle caratteristiche

genomiche dei tumori, ovvero un catalogo delle mutazioni genomiche associate a tumori (ad esempio quello del seno si sa che è legato alla mutazione del gene BRCA che si sa bene dov'è)

- **The 1000 Genomes Project Consortium: A global reference for human genetic variation**, che cerca di ricostruire e raffinare un sequenziamento di diversi genomi per costruire un genoma di riferimento per una popolazione, nel dettaglio umana, (in formato VCF)
- **Trans-Omics for Precision Medicine**, il progetto per la medicina traslazionale
- **The Computational Pangenome Consortium**, che mira a studiare nuovi strumenti software che possano trattare il grafo del pangenoma visto che la maggioranza del software attuale ancora funziona su sequenze e non su grafi

## 2.6 Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento (che letteralmente significa "produrre la sequenza") solitamente si svolge concatenando diverse operazioni:

1. estrazione del DNA
2. si ha una "libreria preparatoria" dove si mette del materiale genetico su un materiale preparatorio
3. si ha un meccanismo di "copie" tramite PCR o simili
4. si mettono i sample genomici in una macchina di sequenziamento che produce in output i dati

Un genoma non può essere letto "nucleotide per nucleotide" e i biologi, con la tecnologia attuale producono le cosiddette **read** del DNA originali. Si hanno due tipi di read:

- **read**, dette anche **short read**, lunghe circa 100 basi. Illumina produce tendenzialmente 100 o al più 150 basi
- **long read**, lunghe circa 10000 basi (se non di più, anche 20000)

Per ottenere il sequenziamento si ha un processo in cui:

- si divide il genoma in due parti, "aprendo" il filamento di DNA per permetterne la lettura
- si ha la **generazione delle read** da copie multiple del genoma tramite un processo biologico svolto dai macchinari, che sfruttano processi chimici
- si ha poi **l'assemblaggio dei frammenti**, ovvero un processo computazionale dove tramite algoritmi si assemblano le varie read per ottenere il genoma di partenza, avendo che le read hanno pezzi in *overlap*

Il problema del sequenziamento risale alla fine degli anni settanta con Sander e Gilbert che avevano studiato un processo di replicazione dando le basi allo studio del sequenziamento.
Dopo il sequenziamento dell'uomo si è passati a sequenziare molti altri organismi.
Oggi il sequenziamento è reso semplice dalla tecnologia. Un esempio è la tecnologia MinION, così piccola sta stare in una mano, che produce *long read* (anche se comunque con diversi errori). MinION è una tecnologia di *Oxford Nanopore*. MinION è USB ed è fatta per biologi che devono sequenziare in situazioni d'emergenza (esempio banale un biologo in Africa in piena emergenza Ebola). L'elaborazione dati viene fatta da un server.
Il primo sequenziamento è costato 3 miliardi di dollari per diversi anni, ora si fa in meno di 40 ore a 5000 dollari. Di recente si è passati addirittura a poche ore per un costo di circa 1000 dollari. Tornando alla *legge di Moore* si ha che il costo è collassato rispetto alla legge e quindi la capacità delle tecnologie di sequenziamento è molto maggiore della capacità di processare i dati, per quanto visto ad inizio capitolo. Si hanno quindi tanti dati ma non si è in grado di elaborarli.
Si tratterà anche il **confronto di genomi** per studiare poi gli aspetti evoluzionistici, tramite **alberi evolutivi**, anche **alberi evolutivi tumorali**. Il **confronto tra sequenze** permette di studiare le evoluzioni, anche quelle tumorali, dove si hanno mutazioni radicali di DNA. Approfondiremo anche tali mutazioni e il loro effetto (basta il cambio di una base per portare, ad esempio, all'anemia falciforme). Studieremo quindi anche come fare gli **allineamenti**. Approfondiremo il discorso della **filogenesi** e della **filogenesi tumorale**.
Tutto questo, in questo ultimo anno, è stato applicato allo studio di **sars-cov-2**, avendo lo studio delle variazioni.
Verrà approfondito anche il discorso del **riarrangiamento**.

# Capitolo 3

# Grafi di assemblaggio

La prima tematica che affrontiamo è l'assemblaggio delle read tramite grafi. Per questo problema abbiamo quindi:

- **input**: collezioni di read (short read e/o long read)
- **output**: grafo di assemblaggio da cui estrarre un cammino o un'unica sequenza

Si hanno principalmente due tipi di grafo:

- **grafo di De Brujin (*DBG*)** (*si legge "grafo di de broin"*), che si prestano più per *short read* (da 100 o 150 basi)
- **grafo di overlap**, più comodo in caso di *long read*

Si useranno per questi scopi varie nozioni, tra cui:

- relazione di prefisso/suffisso tra k-mers
- relazione di prefisso/suffisso tra read
- Longest Common Prefix tra sequenze
- estrazione di cammino di Eulero dal grafo
- estrazione di cammino Hamiltoniano dal grafo
- Maximal Exact Matches (*SMEMs*)
- Burrows Wheeler Transform (*BWT*)
- indici succinti (come FM-Index)

- suffix tree e suffix array
- bloom filters, nati in ambito fisico e usati ora in ambito BigData
- min-hash e min-sketch, usati anche nelle reti neurali e nel Deep Learning quando si ha a che fare con grandi moli di dati

Studiare i grafi di assemblaggio può essere utile anche in ottica di applicare procedimenti simili ad altri problemi posti dai biologi.

## 3.1 Grafi in bioinformatica

In bioinformatica infatti uno strumento molto usato, anche oltre il sequenziamento, è quello dei **grafi**.
In letteratura la nozione di grafo compare nel 1735 con il **grafo di Eulero**, con Eulero che, si dice, fosse ossessionato dal problema dei **ponti di Königsberg**, volendo trovare il ciclo che attraversasse ogni ponte solo una volta. Ogni isola di Königsberg diventava un nodo e ogni ponte tra isole un arco tra nodi. Da qui la definizione del problema.

**Definizione 1.** *Il **problema del ciclo Euleriano** consiste nel trovare un ciclo in un grafo tale che visiti ogni arco una e una sola volta prima di tornare al punto di partenza. Si può passare dallo stesso nodo più volte.*
*Questo problema si dimostra risolvibile in **tempo lineare** sull'input $G = (V, E)$.*

Vediamo poi il "problema duale", quello in cui si vuole fare un cilo che non visiti due volte uno stesso nodo.

**Definizione 2.** *Il **problema del ciclo Hamiltoniano** consiste nel trovare un ciclo in un grafo tale che visiti ogni vertice una e una sola volta prima di tornare al punto di partenza.*
*Questo problema si dimostra essere **NP-complete**.*

La differenza di complessità di questi due problemi sarà qualcosa che bisognerà considerare parlando dello studio dei grafi in bioinformatica. Anche solo il problema dell'assemblaggio si vedrà è riducibile alla visita di un grafo (quindi non potremo formularlo come un problema di ciclo Hamiltoniano, la cui soluzione potrebbe richiedere anni).
La comparsa dei grafi nel mondo chimico è intorno a metà del 1800 con Cayley che li usò per rappresentare strutture chimiche, nel dettaglio usò **alberi** (che ricordiamo esserei grafi connessi aciclici) per contare gli isomeri strutturali.

In biologia l'uso dei grafi è stato introdotto a metà 1900 con l'esperimento di Benzer, che capì l'importanza dei grafi mentre cercava di distinguere quando determinati virus attaccano determinati batteri. Benzer è riuscito a mostrare che il DNA di questi virus era *lineare* mentre prima si congetturava che il DNA avesse delle biforcazioni. Per capire che non avesse delle biforcazioni ha sfruttato la capacità di alcuni geni dei virus di aggredire batteri, rappresentando la cosa coi **grafi ad intervallo**.

**Definizione 3.** *Nella teoria dei grafi, un* ***grafo d'intervallo*** *è il grafo d'intersezione di un multiinsieme di intervalli sulla linea reale. Ha un solo vertice per ciascun intervallo dell'insieme, e uno spigolo tra ogni coppia di vertici corrispondenti agli intervalli che intersecano.*
*In poche parole associo una lettera ad ogni intervallo e collego nel grafo i vertici corrispondenti alla lettera qualora i due intervalli abbiano sovrapposizioni.*

Il punto di svolta si ha però nel 1977 col sequenziamento e i due metodi di Sanger (che è tutti gli effetti il primo metodo di sequenziamento) e Gilbert, entrambi chimici. Entrambi i metodi generano frammenti etichettati di lunghezza variabile che vengono "letti" tramite elettroforesi.
*Non approfondiamo nel dettaglio i metodi, essendo prettamente chimici e biologici.*

### 3.1.1 Superstringhe e grafo di overlap

Siamo in ottica **short read sequencing** del **fragments assembly**.
L'assemblaggio dei frammenti del DNA è invece un problema prettamente computazionale, avendo l'assemblaggio dei singoli frammenti, ovvero delle **read** prodotte dal sequenziamento, anche in più copie, in un'unica sequenza genomica, detta **superstringa**. *Fino alla fine degli anni '90 l'assemblaggio di frammenti del genoma umano era visto come un problema intrattabile.*

**Definizione 4.** *Definiamo* ***stringa*** *come la concatenazione di simboli di un alfabeto $\Sigma$.*
*In bioinformatica spesso si ha $\Sigma = \{a, c, g, t\}$*

**Definizione 5.** *Definiamo il* ***shortest superstring problem (SSP)*** *come la ricerca, dato un insieme di stringhe, di trovare la più corta superstringa che le contiene tutte. So hanno quindi:*

- ***input****: una collezione $s_1, s_2, \ldots, s_n$ di stringhe che possono anche essere lunghe uguali o a lunghezza variabile*

- ***output**: una stringa $s$ che contiene tutte le stringhe $s_1, s_2, \ldots, s_n$ dell'input come sottostringhe tale che $|s|$, ovvero la lunghezza della stringa $s$, sia **minima***

*Questo problema è **NP-complete** e assume che non ci siano errori di sequenziamento nella produzione delle stringhe $s_1, s_2, \ldots, s_n$.*
***La shortest superstring potrebbe non essere unica**.*

**Esempio 4.** *Vediamo un esempio di shortest superstring. Si assume per semplicità alfabeto binario $\Sigma = \{0, 1\}$.*
*Si ha la collezione di stringhe binarie in input (che nel dettaglio sono tutte le possibili combinazioni di 3 simboli binari):*

$$C_I = \{000, 001, 010, 011, 100, 101, 110, 111\}$$

*Si può verificare che la shortest superstring è:*

$$s = 0001110100$$

Con la shortest superstring ho letteralmente assemblato le stringhe in input.
Le read determinano la **coverage (*copertura*)** del DNA. Per valutare il coverage vado a vedere ogni base da quante read è coperta. Con Illumina ho un coverage di almeno 50x, quindi ogni posizione è coperta da almeno 50 read (lunghe ciascuna $\sim$150 basi). Per poter ricostruire la sequenza di DNA originale serve una certa quantità di coverage. Una coverage bassa potrebbe impedire la ricostruzione. Illumina va dal 50x minimo anche a 80x. MinION, della Oxford Nanopore, produce long read anche di 20000 basi ma con basso coverage, anche 3x, ma avendo read lunghe si riesce comunque ad assemblare. Quindi se ho long read mi basta un basso coverage mentre se ho short read mi serve un elevato coverage, avendo un insieme di read molto "fitto" e con poca "sparsità", in quanto si avrebbero gap, con zone non coperte. Il coverage è comunque dato "per media" e quindi poter comunque avere buchi.
Il punto chiave che mi permette di ricostruire il DNA è la sovrapposizione tra le varie read. Il DNA inoltre ha ripetizioni e questo costituisce, purtroppo, un limite all'assemblaggio e in merito studieremo il **fragment assembly problem**, che serve anche in altri contesti, oltre a quello dell'assemblaggio del DNA. Fin'ora abbiamo anche trascurato anche un altro problema, gli **errori di sequenziamento**, dati dal fatto che il processo di sequenziare non è *ottimo*, ovvero privo di errori, dove con errore si intende che nel DNA si ha una certa base e nella read prodotta dal sequenziamento se ne ha un'altra. In fase di assemblaggio questo tipo di errore comporta che non si riesce a

sovrapporre bene le read, non potendo vedere più alcuni **overlap** tra coppie read. Si ha quindi **perdita di informazione dell'overlap** e diventa più complicato assemblare il DNA, non impossibile ma più complicato.

**Esempio 5.** *Si hanno un pezzo di DNA e tre read che sono sovrapponibili:*

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $DNA =$ | a | c | c | g | t | a | c | g |
| $R_1 =$ | a | c | c | g | t | | | |
| $R_2 =$ | | c | c | g | t | a | | |
| $R_3 =$ | | | | g | t | a | c | g |

*Possiamo quindi assemblare il pezzo di DNA.*
*Ma se ipotizziamo di avere un errore di sequenziamento con la terza base della seconda read:*

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $DNA =$ | a | c | c | g | t | a | c | g |
| $R_1 =$ | a | c | c | g | t | | | |
| $R_2 =$ | | c | c | **c** | t | a | | |
| $R_3 =$ | | | | g | t | a | c | g |

*Diventa più difficile assemblare.*

Il tasso di errore nei macchinari Illumina è dello 0.01%, avendo circa due errori per read lunga 150. Per MinION si ha un tasso d'errore anche di circa il 10%, quindi ogni 50 basi ho una serie d'errore. Di recente, in ambito long read, si stanno progettando i **PacBio HiFi** (con HiFi che qui sta per "high quality framents") che producono long read con tasso d'errore allo 0.1%, facendo ben sperare per il futuro.
Tra i primi informatici che hanno fatto sequenziamento abbiamo Eugene Myers che era un esperto di algoritmi su stringhe e di pattern matching (parte attiva nella creazione dei suffix array), nonché responsabile della creazione dell'algoritmo di assemblaggio (famoso anche per BLAST). Eugene Myers era un esperto del problema della shortest superstring. A partire dalla tecnica di costruzione della shortest superstring ha sviluppato l'algoritmo di assemblaggio. Vediamo quindi, in primis, come costruire la shortest superstring. Per farlo bisogna in primis capire come confrontare le varie stringhe in input e come "foldarle". Per farlo faccio l'overlap che però a questo punto necessita di una definizione formale.

**Definizione 6.** *Definiamo **overlap** tra una coppia di stringhe $s_i$ e $s_j$ in input come il più lungo prefisso di $s_j$ che ha un match perfetto (coincide) con un suffisso di $s_i$. Posso anche dire che è il più lungo suffisso di $s_i$ che ha un match perfetto con un prefisso di $s_j$, ribaltare la definizione non cambia. L'overlap tra le due stringhe si indica con:*

$$ov(s_i, s_j)$$

*Ricordiamo che una stringa la posso scrivere in modo scomposto in due modi:*

- $s_i = s'_i x$, *con $x$ suffisso*
- $s_j = x s'_j$, *con $x$ prefisso*

*Tendenzialmente si prende l'**overlap più lungo**.*

**Esempio 6.** *Siano:*

$$s_i = accgtgtgt$$

$$s_j = gtgtgtccaa$$

*Allora si ha che:*

$$ov(s_i, s_j) = gtgtgt$$

*con l'overlap lungo 6.*

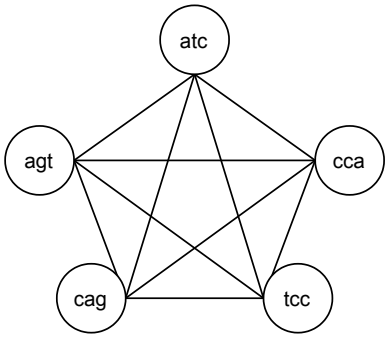
Proseguiamo quindi con il calcolo della shortest superstring dopo aver calcolato l'overlap di tutte le stringhe in input.
Creo un grafo con un nodo per ogni sequenza, etichettato con la sequenza stessa. Tracciamo quindi un arco tra due nodi sse i due nodi sono in overlap, associando all'arco la lunghezza dell'overlap.
Una tecnica per fare il grafo consiste in:

- collegare a priori di tutti i nodi ottenendo un grafo completo non orientato
- per ogni coppia di stringhe $s_i$ e $s_j$ metto l'arco pesato con l'overlap massimo $ov(s_i, s_j)$, dando anche direzione all'arco. Eventualmente posso anche dare doppio peso all'arco in base alla direzione. Si è ottenuto il **grafo di overlap**, che quindi è un grafo orientato (se in entrambi i versi non ho overlap lo lascio per praticità senza orientamento con peso 0)

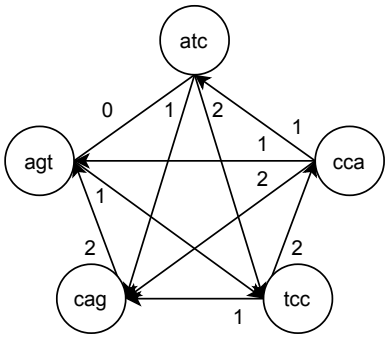
**Esempio 7.** *Sia la collezione di stringhe in input:*

$$C_i = \{atc, cca, cag, tcc, agt\}$$

*e costruisco il grafo completo come detto sopra:*




*Aggiungo quindi i pesi relativi agli overlap dando l'eventuale orientamento e ottengo il grafo di overlap:*




Per calcolare la shortest superstring dovremo calcolare un certo cammino sul grafo di overlap. Sicuramente un cammino che visita tutti i nodi mi porta ad avere una superstringa. Vediamo quindi una prima idea intuitiva:

**Esempio 8.** *Riprendendo il grafo di overlap dell'esempio precedente faccio:*

- *parto dal nodo atc e lo aggiungo alla superstringa, che per ora è* $s = atc$
- *seguo l'arco di peso 2 e arrivo in tcc*
- *aggiungo c (ovvero la parte non in overlap) alla superstringa, che per ora è* $s = atcc$
- *seguo l'arco di peso 2 e arrivo in cca*

- *aggiungo a (ovvero la parte non in overlap) alla superstringa, che per ora è $s = atcca$*
- *seguo l'arco di peso 2 e arrivo in cag*
- *aggiungo g (ovvero la parte non in overlap) alla superstringa, che per ora è $s = atccag$*
- *seguo l'arco di peso 2 e arrivo in agt*
- *aggiungo t (ovvero la parte non in overlap) alla superstringa, che per ora è $s = atccagt$*
- *mi fermo avendo visitato tutti i nodi*

*Alla fine ho:*

$$s = atccagt$$

*che so essere una superstringa.*

Si vede che il cammino, a conferma, tocca ogni vertice una e una sola volta, avendo un cammino Hamiltoniano ma, avendo i pesi, abbiamo a che fare con un **Traveling Salesman Problem (*TSP*)**. Dobbiamo però dimostrare che la superstringa ottenuta è anche la più breve.
Diamo però una piccola definizione formale del grafo di overlap.

**Definizione 7.** *Definiamo il **grafo di overlap** $G_{ov} = (V, E)$ tale che, data una collezione di stringhe $s_1, \ldots, s_n$:*

- *$V = \{s_1, \ldots, s_n\}$*
- *$E$ è definito in modo che ogni arco $(s_i, s_j) \in E$ è un arco orientato da $s_i$ a $s_j$ di peso $|ov(s_i, s_j)|$ (quindi pesato con la lunghezza dell'overlap)*

Si dimostra poi che il **cammino Hamiltoniano di massimo costo** "produce" una shortest superstring. Facciamo una dimostrazione non formale. Innanzitutto per "produce" si intende che, dato il cammino prodotto da Hamilton di massimo costo, con i vertici etichettati dalle stringhe $s_{i,1}, s_{i,2}, \ldots, s_{i,n}$, la superstringa si ottiene sapendo che una stringa $s_{i,j+1}$ che è ha un prefisso in overlap con al precedente stringa $s_{i,j}$ la si può scrivere come:

$$s_{i,j+1} = ov(s_{i,j}, s_{i,j+1}) \cdot x_{i,j+1}$$

Possiamo anche dire che:

$$r(s_{i,j}, s_{i,j+1}) = x_{i,j+1}$$

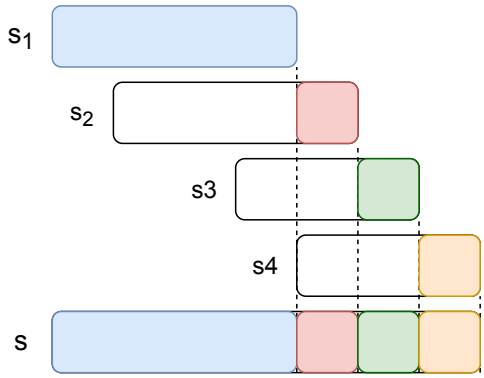



Figura 3.1: Esempio di formazione di una shortest superstring a partire da una collezione di stringhe sfruttando i "resti" degli overlap

indicando con $x_{i,j+1}$ la parte della stringa fuori dall'overlap, il "resto" possiamo dire. A questo punto so che la superstringa parte con $s_{i,1}$ e prosegue concatenando i vari $x_{i,j+1}$ (come si può vedere in figura 3.1):

$$s = s_{i,1} \cdot x_{i,2} \cdot x_{i,3} \cdot \ldots \cdot x_{i,n}$$

Bisogna dimostrare che il cammino Hamiltoniano di massimo peso coincide con la shortest superstring. Bisogna dimostrare che:

- un cammino Hamiltoniano di massimo peso calcolato come sopra è una superstringa, e questo di dimostra perché tocca ogni vertice e quindi ogni stringa che di conseguenza viene inclusa
- la superstringa appena calcolata è la più breve e per dimostrarlo si ha l'intuizione che se massimizzo l'overlap "globale" minimizzo la lunghezza della superstringa

Il calcolo della shortest superstring può quindi risolvere l'assemblaggio di stringhe anche se **si ricorda che il problema del cammino Hamiltoniano è NP-complete**.
La miriade di read però, quando ci lavorò per primo Eugene Myers, rendeva davvero difficile il calcolo (problema NP-complete e hardware storicamente poco potente). Servirono quindi anni per il primo calcolo, circa una quindicina, usando appunto il metodo della superstringa.
Si ha però un'euristica per calcolare la superstringa, usando un **algoritmo 2-approssimante** usando la **tecnica greedy**. In base a questa tecnica si sceglie sempre l'arco che pesa di più nel senso che ordino in ordine di peso tutti gli archi e faccio gli overlap tra le stringhe collegate. Dopo avere selezionato l'arco si prendono i due estremi e se ne fa la superstringa. Si continua

quindi cercando sempre gli archi che pesano di più creando poi la superstringa. **Non si vede nel dettaglio il funzionamento** e ovviamente non si ha la soluzione ottima e in realtà si congettura sia 2-approssimante ma non si ha una dimostrazione in merito, è un problema aperto da trent'anni e solo a livello sperimentale si è ipotizzata la 2-approssimazione.
Si ricorda che con il cammino Hamiltoniano ottimo si ottiene comunque una soluzione che potrebbe non essere unica.

### 3.1.2 Grafi di De Brujin e k-mers

Siamo sempre in ottica **short read sequencing** del **fragments assembly**. Il metodo della superstringa è stato quindi usato per l'assemblaggio del primo sequenziamento (quello con il metodo Sanger) ma l'appoggio ad un problema NP-complete (il *ciclo Hamiltoniano*) rendeva il tutto troppo dispendioso. Il primo *assemblatore*, quello di Celera, usava però questo metodo più lento per il *fragment assembly*.
Vediamo ora una soluzione diversa, basata sui **grafi di De Brujin** che invece come problema sottostante ha il *ciclo Euleriano* che sappiamo avere soluzione lineare.
Vediamo in primis qualche definizione.

**Definizione 8.** *Definiamo* ***k-mer*** *come è una sottostringa di lunghezza $k$. I k-mers sono quindi tutte le sottostringhe distinte di lunghezza $k$, non estraggo più volte lo stesso k-mer. Si segnala però che troppe ripetizioni dello stesso k-mer, che vengono trascurate, possono rendere difficile l'assemblaggio. Quindi il caso ideale è che tutti i k-mer estratti da una stringa siano distinti ma si seleziona il $k$ in modo che ci siano al più due o tre ripetizioni dello stesso k-mer nella sequenza.*

**Definizione 9.** *Data una stringa $s$ definiamo* ***spettro di $s$ di dimensione/ampiezza*** *$l$ è il* ***multiinsieme, avendo quindi ripetizioni****, di tutte le occorrenze di sottostringhe di lunghezza $l$ (gli l-mers) e si indica con:*

$$spectrum(s, l)$$

***Spesso lo spettro poi si rappresenta con i vari l-mer in ordine lessicografico****.*

**Esempio 9.** *Prendiamo una stringa $s$:*

$$s = tatggtac$$

*Fissiamo $k = 3$ e si ha lo spettro di dimensione 3:*

$$spectrum(s, 3) = \{tat, atg, tgg, ggt, gta, tac\}$$

*(che in questo caso, non avendo ripetizioni, è un insieme di 3-mers.)*

Dati i frammenti/read (che sono short read lunghe circa 150 basi) si estraggono da essi i **k-mers**, con $k$ usualmente pari a 32, 31 o 28 per avere il minor numero di ripetizioni (i numeri sono stati identificati sperimentalmente). Si segnala che questa "proprietà" di avere sequenze circa lunghe 32 che non si ripetono è probabilmente legata anche al fatto che il DNA, preso come sequenza di simboli, è difficile da comprimere con i tool standard (zip, uso della BWT etc...), creando non pochi problemi alle banche dati anche se ancora non si è scoperto bene ne perché ne come risolvere la cosa.
Il problema di assemblaggio diventa quindi ricostruire una stringa da un insieme di k-mer:

- **input**: un insieme di stringhe $s_1, s_2, \ldots, s_n$
- estraggo i k-mer da tutte le $s_i$ in input, per un $k$ fissato
- assemblo i k-mer usando i grafi di De Brujin

Ma prima di introdurre i grafi di De Brujin vediamo un esempio di cosa significhi assemblare k-mers, partendo dal caso **senza ripetizioni**, avendo quindi un **insieme di k-mers** e non uno **spettro** (che è un multiinsieme).

**Esempio 10.** *Si prenda in input una collezione di k-mers con* $k = 3$ *(quindi 3-mers):*

$$C = \{atg, agg, tgc, tcc, gtc, ggt, gca, cag\}$$

*Non essendo coincidenti se facessi gli overlap tra ogni coppia avrei al più overlap di lunghezza 2. Ipotizzando di fare il grafo di overlap avrei il seguente cammino Hamiltoniano (uno dei possibili):*

$$atg \to tgc \to gca \to cag \to agg \to ggt \to gtc \to tcc$$

*che produrrebbe la superstringa:*

$$s = atgcaggtcc$$

*Vedendo che anche con i k-mer posso ragionare in ottica di superstringa.*

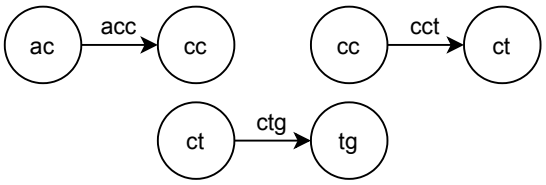
Ma con l'approccio che vogliamo ora non si passa per ogni vertice una e una sola volta ma per ogni arco una e una sola volta, usando il cammino Euleriano.
Dobbiamo fare si che quindi prendere ogni arco una e una sola volta corrisponde a prendere tutti i k-mers, avendo quindi che ogni arco deve essere

associato ad un k-mer. Costruiamo quindi un grafo che soddisfi queste condizioni (grafo che poi definiremo essere un **grafo di De Brujin**). Si ha quindi un grafo dove gli archi sono i k-mer mentre i vertici all'estremo di un arco sono etichettati con il prefisso di lunghezza $k-1$ e il suffisso di lunghezza $K-1$ del k-mer (quindi i suffissi e i prefissi unici formano l'insieme dei vertici). L'arco è orientato dal prefisso al suffisso.
In altri termini i vertici agli estremi di un arco etichettato con il k-mer $x$ altro non sono che i due unici (k-1)-mer estraibili da $x$.

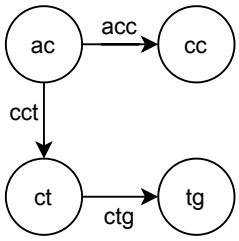
**Esempio 11.** *Prendendo una collezione di k-mer:*

$$C = \{acc, cct, cgt\}$$

*so che, per il grafo $G = (V, E)$, ho $E = C$ mentre per $V$ so che:*




*Quindi $V = \{ac, cc, ct, tg\}$.*
*Costruiamo quindi il grafo:*




*Quindi il cammino di Eulero (qui banale) e otteniamo la superstringa (e quindi l'assemblaggio) concatenando le etichette degli archi nell'ordine in cui vengono visitati, ragionando nello stesso modo in cui si faceva coi grafi di overlap, quindi partendo con la prima etichettata e proseguendo concatenando solo i resti dei vari overlap tra etichette degli archi:*

$$s = acctg$$

Si ha quindi che:

**Definizione 10.** *Un grafo $G = (V, E)$* ***orientato*** *è un* ***grafo di De Brujin*** *di ordine $k$ se:*

- *i vertici sono un sottoinsieme di* $\Sigma^{k-1}$*, ovvero* $V \subseteq \Sigma^{k-1}$
- $\forall u, v \in V$ *si ha che* $(u, v) \in E$ *se esiste una parola* $w \in \Sigma^*$ *tale che* $u$ *è (ha come etichetta) il prefisso di lunghezza* $k-1$ *di* $w$ *e* $v$ *è (ha come etichetta) il suffisso di lunghezza* $k-1$ *di* $u$

*Quindi possiamo dire che, in modo astratto:*

- *i vertici sono etichettati con un (k-1)-mer*
- *gli archi sono etichettati con un k-mer*

*Tali grafi sono stati introdotti dal matematico De Brujin nel 1946.*
*Questa è una definizione* ***edge-centric*** *in quanto i* ***k-mer*** *vengono usati per gli archi. Si può avere anche una definizione* ***node-centric*** *dove estraggo i nodi per poi ottenere gli archi, collegando due vertici quando il prefisso nel primo nodo coincide con il suffisso del secondo ma avendo i nodi etichettati coi k-mer. Non necessariamente il k-mer dell'arco potrebbe non esistere. Normalmente per l'assemblaggio si usa la versione edge-centric. L'edge-centric implica il node-centric ma non viceversa. In entrambi i casi etichetto l'arco con il resto/estensione.* ***Capire meglio!***

**Definizione 11.** *Si ha che un vertice è* ***bilanciato*** *sse,* $\forall v \in V$*:*

$$in(v) = out(v)$$

*con:*

- $in(v)$ *numero di archi entranti in* $v$
- $out(v)$ *numero di archi uscenti in* $v$

**Teorema 1** (Teorema di Eulero)**.** *Un grafo* ***connesso*** *è un* ***grafo Euleriano*** *sse suo ogni vertice è* ***bilanciato****.*

*Dimostrazione.* Vediamo le due direzioni della dimostrazione, avendo il *sse*.
Se si ha che per ogni arco entrante nel vertice $v$ deve esistere almeno un arco uscente da $v$ in quanto altrimenti mi "bloccherei" in un nodo, arrivando ad una contraddizione e non avendo quindi un cammino di Eulero. Quindi se non è bilanciato sicuramente non è Euleriano.
Se si ha un grafo bilanciato allora esiste (facciamo il caso "semplice") un ciclo Euleriano (e di conseguenza il caso "difficile" del cammino Euleriano). Infatti possiamo dare l'algoritmo che trova il ciclo Euleriano. Si ha quindi una **dimostrazione costruttiva**. Si ha quindi che:

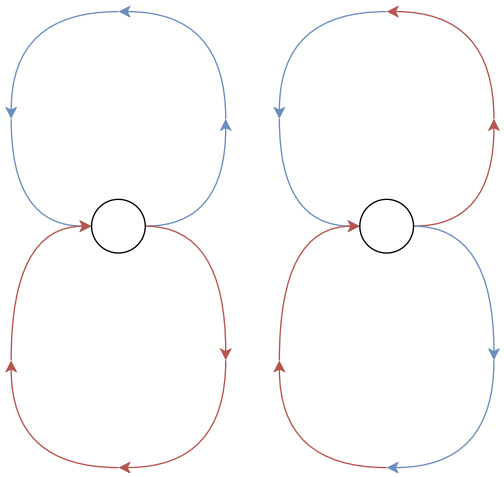


Figura 3.2: Idea del processo di apertura dei cicli dove si hanno due cicli, a sinistra in rosso e blu. Dopo l'apertura il cammino passa dal ciclo sopra a quello sotto, seguendo i colori nell'immagine a destra.

1. si parte da un vertice arbitrario $v$
2. si connette $v$ ad un altro vertice usando archi, si riparte da tale arco e si fa la stessa operazione. Si ripete l'operazione fino a che non si è formato un ciclo
3. alla fine o uso tutti gli archi o altrimenti chiudo un ciclo lasciando vertici non usati. Nel secondo caso ripeto lo step 1) cercando di usare altri archi non usati. Facendo la **decomposizione del grafo in cicli**. In caso mi fermo quando ho usato tutti gli archi ma mi trovo con tanti cicli. Per derivare un unico ciclo da due cicli sfrutto il vertice di congiunzione in modo che se entro partendo da un ciclo in quel nodo esco con l'arco che mi porta nell'altro ciclo, facendo la cosiddetta **apertura dei cicli** (vedere figura 3.2). Riassumendo si combinano due cicli in uno unico e si itera questo passaggio fino alla creazione di un singolo ciclo. *Per fare questo uso l'ipotesi che $G$ è bilanciato*

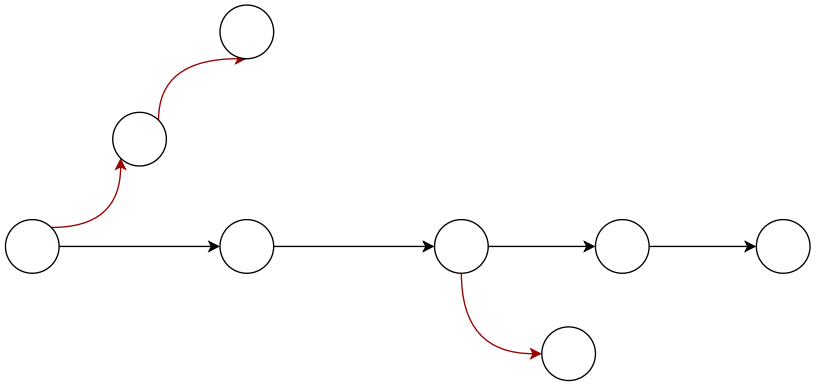
Questo algoritmo è lineare nella dimensione di un grafo, ovvero $O(|V| + |E|)$. □

Quindi per costruire il grafo di De Brujin:

- **input:** una collezione $F$ di frammenti
- si genera da $F$ l'insieme dei k-mer (non lo spettro)

- per ogni k-mer dell'insieme dei k-mer estraggo il prefisso e il suffisso di lunghezza $k-1$
- si verifica l'esistenza del cammino di Eulero. Quindi:
  - se esiste si prosegue
  - se non è bilanciato si deve passare alla cosiddetta **pulitura del grafo**, eliminando gli archi detti **tip** (comportando la rimozione anche del nodo "destinatario" del grafo). Potrei avere perdita di k-mer. Le tip solamente sono singoli archi ma porrebbero anche essere cammini.
    Si usa anche il concetto di **bubble**, come effetto degli errori di sequenziamento. Una bubble è una situazione in cui si viola il teorema di Eulero ma che si elimina essendo un errore di sequenziamento, **risolvendo la bolla**. Per capire quale sia l'errore di sequenziamento sfrutto il fatto che ho più read che coprono la stessa porzione, scegliendo la base che è più frequente. **Il $k$ condiziona le bolle oltre che alla connettività del grafo (*se è troppo grande rischio di non avere un grafo connesso*)**.
    Spesso si ha anche lo **scaffolding** per ottenere la connettività
- trovo il vertice "*head*" (l'unico che non ha vertici entranti) e il vertice "*tail*" (l'unico che non ha vertici uscenti), che saranno inizio e fine del cammino di Eulero
- si estrae il cammino di Eulero

**Esempio 12.** *Vediamo un esempio di tip, con le tip in rosso:*



*quindi gli archi in rosso e i nodi a cui puntano possono essere rimossi. Vediamo un esempio di bubble. Ipotizzo di avere:*

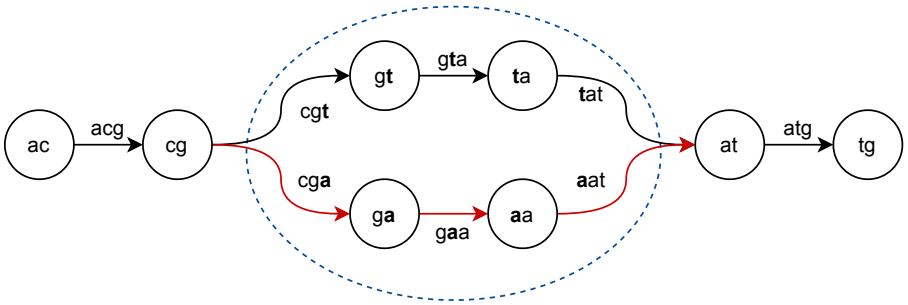
$$F = \{acgtatg, acgaatg\}$$

*Notiamo quindi che:*

$$acg\mathbf{t}atg$$

$$acg\mathbf{a}atg$$

*Ma sappiamo che, tra le varie read, la t occorre molto più frequentemente della a in quella posizione. Si assuma di avere $k = 3$. Ho quindi, con la bolla (notando come la sua presenza impedisce di avere un cammino Euleriano) segnalata dall'ovale:*




*(dove si nota come la k influisca sulla natura della bolla).*
*Avendo però che la t occorre più frequentemente in quelle posizioni posso rimuovere il cammino con gli archi rossi e i due nodi centrali.*

**Esempio 13.** *Sia:*

$$F = \{atgcc, caatg, gcgtt\}$$

*e sia $k = 3$.*
*Avendo lo spettro:*

$$\{atg, tgc, gcc, caa, aat, atg, gcg, cgt, gtt\}$$

*ho l'insieme dei k-mer, ovvero l'insieme degli archi del grafo, è:*

$$E = \{atg, tgc, gcc, caa, aat, gcg, cgt, gtt\}$$

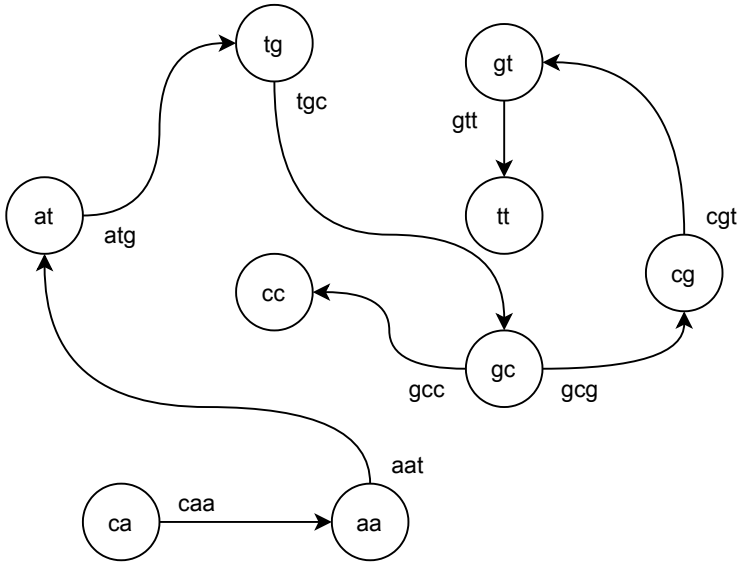
*Genero quindi i prefissi e i suffissi di lunghezza $k - 1$ di ogni k-mer:*

$$\{at, tg, tg, gc, gc, cc, ca, aa, aa, at, at, tg, gc, cg, cg, gt, gt, tt\}$$

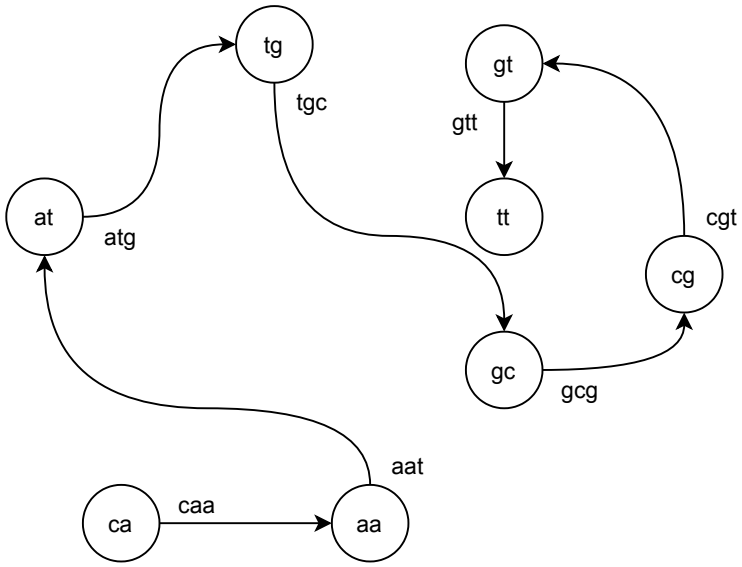
*e quindi l'insieme dei vertici è:*

$$V = \{at, tg, gc, cc, ca, aa, cg, gt, tt\}$$

*Avendo quindi il grafo:*




***Le etichette degli sono per pura comprensione.***
*Bisogna quindi capire se esiste un cammino di Eulero. Purtroppo si hanno i vertici con tt e con cc che creano problemi. Inoltre il vertice gc non è bilanciato. Quindi il grafo non ammette cammini di Eulero.*
*Elimino quindi un arco "problematico", quello tra gc e cc, ottenendo:*



*Dove ho un cammino Euleriano, partendo dal vertice ca e arrivando al vertice tt. Si compone così la superstringa, ovvero l'assemblaggio:*

$$s = caatgcgtt$$

**Definizione 12.** *Si indica con il termine **de novo** quando si fa una cosa "da zero".*
*Ad esempio si ha il **de novo genome assembly**.*

**Definizione 13.** *Si indica con il termine **reference bases** quando non si fa una cosa "da zero" ma si parte da una reference già preesistente.*

## 3.2 Note extra sui Grafi

I grafi di assemblaggio vengono usati anche nella **metagenomica**, ovvero lo studio di campioni di DNA di diversi organismi assieme. Questa cosa può essere utile quando il campione contiene vari organismi, si pensi ad esempio allo studio di un campione d'acqua o allo studio di un tampone faringeo.

**Definizione 14.** *Definiamo il paradigma **overlap-layout-consesus (OLC)**, proposto da Eugene Myers, come il paradigma per il quale si procede alla costruzione del grafo a partire da un insieme di read. Tramite le read si calcola poi il grafo di overlap per poi inferire il cammino, ovvero la **sequenza di consenso**. Il costo computazionale di calcolo non è indifferente.*
*Rispetto ai grafi di De Brujin è che possono immediatamente disambiguare brevi ripetizioni che i grafici di de Bruijn potrebbero risolvere solo nelle fasi successive.*

**Definizione 15.** *Definiamo formalmente il **grafo di overlap**.*
*Dato un insieme di read $R$ un grafo di overlap è un grafo orientato:*

$$G = (R, E)$$

*dove i vertici sono le read stesse e si ha un arco tra $r_i$ e $r_j$ sse un suffisso di $r_i$ è un prefisso di $r_j$, essendo in overlap. Il resto dell'overlap è detto $e_{ij}$ ed etichetta l'arco (e si nota che il prefisso di $r_i$ prima dell'overlap può essere usato come etichetta).*

Si ha che:

- un cammino nel grafo di overlap rappresenta una stringa che è ottenuta assemblando le read. Tale stringa è ottenuta tramite $r_1 e_{i1} e_{i2} \cdots e_{ik}$

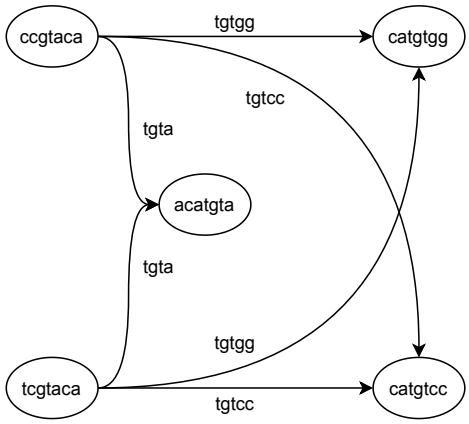



Figura 3.3: Esempio di grafo di overlap

- se un arco $(r_i, r_j)$ è un cammino con solo due vertici è la stringa $s = r_i e_{ij}$
- un arco $(r_i, r_j)$ è detto **riducibile** se esiste un percorso da $r_i$ a $r_j$, con anche altri vertici, che rappresenta la stessa stringa di $(r_i, r_j)$. Tali archi possono essere eliminati da un grafo di overlap ottenendo uno **string graph**, che offre una struttura più semplice e utile per la ricostruzione del genoma

Il grafo di overlap può essere usato per trovare le **varianti**.

**Definizione 16.** *Dato un insieme R di read si ha che un* ***edge-centric De Brujin Graph****:*

$$G = (V, E)$$

*di ordine k è un grafo dove i vertici sono i vari (k-1)-mer e si ha un arco tra u e v sse esiste un k-mer $w \in R$ tale che si il prefisso di lunghezza k-1 di w è uguale a u e il suffisso lungo k-1 di w è v. L'arco tra u e v è etichettato con l'ultimo carattere di v.*

Se teniamo conto che i k-mer sono ripetuti possiamo usare un **multigrafo**.

**Definizione 17.** *Un* ***multigrafo*** *è un grafo in cui gli archi sono specificati da un* ***multinsieme****, il che significa che lo stesso arco può essere ripetuto più volte.*

**Definizione 18.** *Definiamo* ***isola*** *in un grafo di De Bruijn sono un insieme di nodi isolati. Sono generate da k-mer non frequenti e quindi probabilmente sono errori di sequenziamento.*

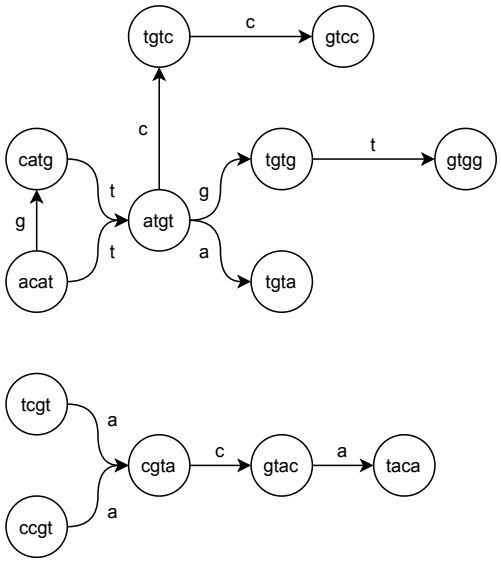



Figura 3.4: Esempio di grafo di De Bruijn con $k = 5$ edge-centric (anche se rappresentato non con l'intero 5-mer ma solo con il resto).

**Definizione 19.** *Definiamo **tip** in un grafo di De Bruijn come un nodo che si separa singolarmente con un arco dagli altri.*

I k-mer relativi a isole e tip vanno eliminati.
Se si ha che un k-mer è troppo ripetuto si è davanti probabilmente ad una **ripetizione**. L'uomo ha molti geni replicati, avendo magari varie versioni di un certo gene. Posso avere ripetizioni corte o molto lunghe.
Oltre alle bolle legate ad errori ho anche bolle legate magari al fatto che l'uomo è **diploide**, avendo **due copie** di ciascun cromosoma, una ereditata dalla madre e una dal padre, che possono avere comunque il 0.1% di differenza. Le read mi arrivano in eguale proporzione dai due cromosomi, sto assemblando quindi due fonti in una sola sequenza. Nelle banche solitamente si ha comunque solo l'**allele di maggioranza** (l'**allele**, dal punto di vista informatico, è la base variata a livello di cromosoma).
Vanno rimosse anche le **bubble** e i cammini vengono assemblate nelle stringhe dette **contigs**.
Un assemblatore che usa i grafi di De Brujin è davvero complesso.
Nell'ultimo periodo in realtà si lavora con una reference e con un file VCF contenente le varianti. Le read da cui si parte solitamente sono a lunghezza fissata.
In fase di metagenomica si parte da read "colorate" provenienti da diversi organismi. Si costruisce un **grafo di De Brujin misto** da cui si riesce ad

estrarre le sequenze delle singole specie. Per farlo si sfruttano varie informazioni, ad esempio la concertazione di copie di una certa read per le varie specie. Come informazione si usa anche il fatto che alcune specie hanno k-mer **unici**.
Diamo uno sguardo anche ai tempi computazionali, con $n$ basi, $g$ lunghezza del genoma e $a$ lunghezza overlap (con ST indichiamo con *suffix array*, con DP *programmazione dinamica* e con NE *senza errori*):

| | ***De brujin*** | ***Overlap*** |
|---|---|---|
| tempo | $O(n)$ | $O(n+a)$ ST, $O(n^2)$ DP |
| spazio | $O(n)$, $O(\min\{N, g\})$ NE, | $O(n+a)$ |

Normalmente il sequenziamento viene fatto tramite **elettroforesi** ma picchi irregolari portano sicuramente ad errori di sequenziamento.
Tornando al discorso **ripetizioni** si ha che essere conferiscono "confusione" all'assemblaggio.
**Risentire ultimi minuti lezione 16 marzo**
Potrei avere, con Illumina, buchi di read non coperti che vengono colmati in modo algoritmico, tramite **contigs** che si collegano in **supercontigs**. Questa operazione è detta **scaffolding**.

### 3.2.1 Sequenziamento per Ibridazione

**Sezione molto oscura.**
Per leggere porzioni di DNA si usa il **sequenziamento per ibridazione *SBH***, ad esempio per leggere le porzioni atta a capire il test di paternità. Viene fatta tramite **affymetrix chip**, ovvero una piastra di materiale plastico dove viene depositato, dentro celle, il DNA da studiare. Il DNA sfrutta la complementarietà delle basi e queste celle contengono particolari k-mer così che le celle mi restituiscono i k-mer completi, ottenuti tramite il processo chimico dell'ibridazione che fa attaccare basi complementari.

Si ha quindi il **SBH problem**, che consiste di ricostruire una stringa dai suoi l-mer, con:

- **input**: un insieme $S$ con tutti gli $l-mer$ di una stringa $s$
- **output**: una stringa $s$ tale che $Spectrum(s, l) = S$

Si usa il cammino Hamiltoniano per risolvere il problema oppure posso usare il cammino di Eulero usando i (k-1)-mer e il grafi di De Brujin.

# Capitolo 4

# I dati in Bioinformatica

Dobbiamo introdurre i dati fondamentali della bioinformatica, ovvero **DNA** (figura 4.1) e **RNA**, intese come molecole biologiche che vengono trattate come stringhe.
Il **DNA (*acido deossiribonucleico*)** è una molecola composta da nucleotidi, che è formato da:

- il deossiribosio, uno zucchero, **D**
- un gruppo fosfato, **p**
- una base azotata (Adenina, Citosina, Guanina, Timina). Citosina e Timina sono dette **piramidine**, le altre due **purine**

Si ha la cosiddetta **direzione 5'3'** per leggere le sequenze del DNA (avendo la direzione posso leggere in sequenza le basi, solitamente è dal basso all'alto).
I nucleotidi si legano tramite **legame fosfodiesterico tra D e P**.
L'unità di lunghezza di un molecola di DNA è il **base pair (*bp*)** (base pair in quanto il DNA è in se un'accoppiamento di basi a doppia elica), ovvero il numero delle basi.
Il **genoma** è la lunga molecola di DNA contenuta in ogni nucleo cellulare. Nel 1953 Watson e Crick hanno scoperto essere a doppia elica. Il genoma è frammentato in **cromosomi** (22 autosomi e i due cromosomi X e Y). Il più lungo cromosoma è il primo e il più corto è il ventiduesimo.
Tra le due catene di un genoma si ha che la Timina si appaia all'Adenina (e viceversa) mentre la Citosina alla Guanina (e viceversa), questa è la **regola delle basi complementari**. Se una catena ha la direzione 5'3' dall'alto verso il basso l'altra lo ha dal basso all'alto (ma sempre da 5' a 3') e viceversa. Si legge sempre in direzione 5'3' e si hanno così le **due sequenze primarie appaiate**, una detta **forward strand (+,1,+1)** e una detta **reverse**

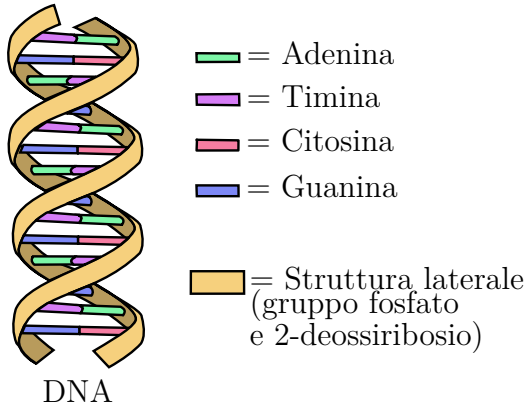



Figura 4.1: Rappresentazione grafica del DNA tratta da `https://it.wikipedia.org/wiki/DNA`

**strand (-,-1)**.
Tra Adenina e Timina abbiamo due legami idrogeno mentre tra Citosina e Guanina se ne hanno tre (si richiede quindi più energia per eventualmente separare).
Si ha quindi a che fare con un alfabeto $\Sigma = \{a, c, g, t\}$ o $\Sigma = \{A, C, G, T\}$ per costruire le sequenze. Data la sequenza primaria di una delle due catene del DNA genomico, la sequenza primaria della catena appaiata è ottenuta per mezzo di un'**operazione di reverse&complement**, ottenuta sostituendo alla catena primaria ribaltata ogni base con la complementare (potrei anche prima sostituire e poi invertire). Se prendo entrambe le stringhe le chiamo **paired strands**.
Aggiungiamo altre definizioni:

- una regione di DNA genomico che ha una certa funzione prende il nome di **locus**
- la sequenza primaria di un locus è chiamata **sequenza genomica**, che di fatto è una sottostringa del genoma di un organismo

Per l'**RNA (*acido ribonucleico*)** si ha una composizione di nucleotidi del tipo:

- il ribosio, uno zucchero, **D**
- un gruppo fosfato, **p**
- una base azotata (Adenina, Citosina, Guanina, Uracile)

| simbolo | sigla | nome | simbolo | sigla | nome |
|---|---|---|---|---|---|
| A | Ala | Alanina | M | Met | Metionina |
| C | Cys | Cisteina | N | Asn | Asparagina |
| D | Asp | Acido aspartico | P | Pro | Prolina |
| E | Glu | Acido glutammico | Q | GIn | Glutammina |
| F | Phe | Fenilalanina | R | Arg | Arginina |
| G | Gly | Glicina | S | Ser | Serina |
| H | His | Istidina | T | Thr | Treonina |
| I | Ile | Isoleucina | V | Val | Valina |
| K | Lys | Lisina | W | Trp | Triptofano |
| L | Leu | Leucina | Y | Tyr | Tirosina |

Tabella 4.1: Tabella con l'elenco degli amminoacidi

Anche per l'RNA si ha la **direzione 5'3'** e si ha un alfabeto $\Sigma = \{a, c, g, u\}$ o $\Sigma = \{A, C, G, U\}$. La vera differenza è che l'RNA è sempre in **singola catena**.
Una **proteina** p una catena di amminoacidi e la sua sequenza primaria è una stringa costruita su un alfabeto di 20 simboli che rappresentano i 20 **amminoacidi** presenti in natura. I **geni** è il "responsabili" della produzione di proteine, che poi "regolano" la vita. Ogni proteina è prodotta da un gene e un gene genera più proteine. **I geni sono il 10% del genoma**, quindi solo una piccola parte. Il gene è quindi un locus del genoma che esprime una proteina. La sequenza primaria del locus di un gene è la sequenza genomica del gene. Ogni gene ha un identificativo detto **HUGO NAME**, con una precisa nomenclatura che è "circa" un acronimo. Un gene può appartenere al genoma di diversi organismi.
Sia il forward strand che il reverse strand contengono geni e gli uni non c'entrano con gli altri (figura 4.2). L'uomo ha circa 20000 geni codificanti (più i cosiddetti **geni non codificanti** che hanno altri scopi), ciascuno che codifica una o più proteine. Ogni cellula contiene l'intero set di geni che regolano la vita dell'organismo, ma nelle varie cellule si **esprime** solo un sotto-set di geni mentre gli altri rimangono **inattivi**, è il **profilo di espressione**. Può variare anche la quantità di proteina espressa. In due cellule posso esprimere lo stesso gene che però porta a diverse proteine.
Si ha quindi:

1. il locus viene trascritto (con anche lo splicing) nell'm-RNA detto trascritto

2. il trascritto porta alla proteina

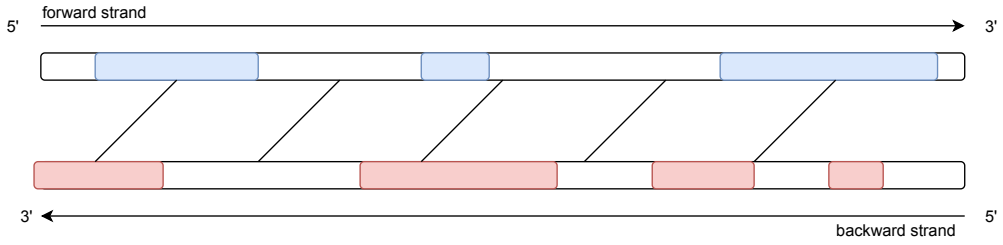



Figura 4.2: Rappresentazione stilizzata dei due strand con in azzurro e rosso, rispettivamente, i geni sul forward strand e sul backward strand

Per determinare la sequenza primaria di DNA e RNA usiamo il sequenziamento, producendo varie read e procedendo poi alla ricostruzione **in-silico**. Posso avere due tipi di output dal sequenziamento:

- **single-end reads**, che è un'unica sequenza
- **paired-end reads** e **mate-pair reads**, dove si parla di coppie di sequenze che sappiamo circa quanto distavano sulla sequenza originale

Per il sequenziamento ci sono stati vari step:

- **first generation**, per il **metodo Sanger** nel 1975. Si hanno:
  - read lunghe fino a 1000bp
  - elevata qualità
  - bassa coverage
  - costi elevati
- **second generation**, con le **Next-Generation-Sequencing (*NGS*) technologies**, dagli inizi degli anni 2000. Si hanno:
  - read corte, da 100bp a 400bp
  - alta coverage
  - bassi costi

  Tra le tecnologie *NGS* abbiamo:
  - Illumina (Solexa) con:
    - HiSeq System

        * Genome analyzer lix
        * **MySeq**, che produce read di 300bp, con il 99.90% di accuratezza, producendo 25 milioni di read per run
    - Ion Torrent-Life technologies con:
        * **Personal Genome Machine (*PGM*)**, che produce read di 200bp, con il 99.00% di accuratezza, producendo 11 milioni di read per run
        * Proton

  Per indicare i dati prodotti diciamo **NGS data**

- **third generation**, con le **Next Next-Generation-Sequencing technologies**, più avanti negli anni 2000. Si hanno:
    - read lunghe fino a 10000bp
    - qualità relativamente bassa

  Tra le tecnologie *Next-Next* abbiamo:

    - Pacific Biosciences con PacBio RS
    - Oxford Nanopore Technologies con:
        * GridION System
        * MinION

## 4.1 Formato FASTA/FASTQ

Vediamo il formato standard per sequenze primarie nucleotidiche:

- **FASTA** per le sequenze ottenute al metodo Sanger, quindi con pochi errori
- **FASTQ** per le sequenze ottenute con NGS. È un'evoluzione del FASTA in cui si associa alle sequenze dei reads un valore di qualità, uno per base

Il FASTA ha le seguenti caratteristiche:

- è un plain text

- ha la sequenza primaria (ma anche sequenze di amminoacidi) più eventuali informazioni extra a scelta. Si ha:
  - un header introdotto da > con tutte le informazioni extra in una sola riga (tra cui, volendo, cromosoma di partenza, indici di inizio e fine per specificare la porzione, ricordando che le posizioni sono 1-based, la "release", ad esempio tramite la sigla *GRC*, lo strand tramite +1 e -1 etc...)
  - la sequenza genomica separata in righe di 60 o 80 bp (quindi dopo 60 o 80 simboli vado a capo)
- è stato pensato come formato di input del software FASTA per l'allineamento
- ha come estensione `.fa` o `.fasta`

## 4.2 ENSEMBL

ENSEMBL è il **genome browser** attualmente più usato. Un genome browser è un database con associata un'interfaccia di esplorazione. È un progetto partito nel 1999 da **EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*)** e dal **Wellcome Trust Sanger Center**. Dal 2017 fa capo a **EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*)**, sempre di **EMBL**. Si hanno i dati di 250 specie di cordati, tra cui uomo, topo, ratto e zebrafish. Si hanno vari livelli di informazione (ovvero di annotazioni), tra cui; genoma, gene, proteina etc...
I genome browser sono consistenti rispetto a progetti di ricerca e analisi genomiche. SI può accedere, tra le altre cose a:

- la sequenza del genoma di una data specie o dei singoli cromosomi
- le sequenze dei geni annotati su di un genoma e i relativi trascritti espressi
- le variazioni annotate rispetto al genoma di riferimento che caratterizzano i singoli individui

**Le coordinate sono sempre rispetto alla catena forward**.
ENSEMBL si può raggiungere tramite `www.ensembl.org`.
Si ha anche il formato **EMBL** stesso, pensato originariamente per memorizzare sequenze nucleotidiche in banche dati che non erano db relazionali ed

erano senza accesso. Il file poteva essere scaricato tramite un ID e basta (era poi scopo del biologo e dell'informatico riutilizzarlo). Il file EMBL è pieno di informazioni, con in fondo la sequenza nucleotidica. Banche dati così ci sono ancora, come l'**ENA (*European Necleotide Archive*)**.