Università degli Studi di Milano - Bicocca
Scuola di Scienze
Dipartimento di Informatica, Sistemistica e Comunicazione
Corso di laurea in Informatica

Inferenza di alberi tumorali tramite Particle Swarm Optimization

Relatore: Prof. Della Vedova Gianluca
Co-relatore: Dott. Ciccolella Simone

Relazione della prova finale di:
Castro Tenemaya Adrian David
Matricola 816015

Anno Accademico 2016-2019

Indice

Premessa

Il presente lavoro è frutto del lavoro svolto come tirocinio all'interno dell'Università di Milano-Bicocca, e viene anche utilizzato come tesi finale ai fini del conseguimento della laurea in Informatica. È però necessario chiarire che il progetto in questione non sarà abbandonato nè una volta terminata la stesura di questa relazione, nè dopo il conseguimento della laurea. È mia intenzione contribuire al meglio delle mie possibilità in quello che ritengo essere uno dei campi con il quale mi sento più legato, sia a livello di interesse professionale, che a livello strettamente personale: la ricerca sul cancro. Secondo il *National Cancer Institute*, nel 2012 sono stati riportati 14.1 *milioni* di nuovi casi, e di questi, 8.2 *milioni* hanno portato alla morte [1]. I dati mostrano anche quelli che può sembrare all'apparenza una realtà discordante: il numero totale di morti per cancro è in crescita, ma il rapporto delle morti per individuo sta calando [10]. Nel 1990, 161 persone su 100.000 nel mondo sono morte a causa del cancro. Nel 2016, questo numero è calato a 134 su 100.000. Questo miglioramento è dovuto indubbiamente ad un numero molto elevato di fattori, tra cui l'aumento della qualità di vita ed un migliore sistema sanitario, ma è anche grazie alla crescita incessante della ricerca sul cancro, ed ai campi sui quali essa si appoggia. Lo sviluppo di algoritmi sempre più efficienti e performanti, e l'utilizzo di calcolatori super-veloci, ha permesso a questo settore di ricerca di ottenere dei considerevoli risultati.

Con questo progetto spero, quindi, di aver dato un contributo in questo settore, anche se in una percentuale minuscola.

Ringraziamenti

Ai miei genitori Laura e José, per praticamente tutto;
A mia sorella Valeria;
Ai miei fantastici nonni;
Alla mia famiglia, vicina e lontana, per volermi bene sempre e comunque;
A Luca, Alessio, Lorenzo, Ilaria, Luisa, Davide, Nicoletta, Laura. Grandi amici senza i quali nulla di tutto questo sarebbe stato possibile;
A chi ha rallegrato le mie serate durante le feste a casa;
Alle bellissime e meravigliose persone che hanno contribuito, in maniera diretta ed indiretta, a farmi appassionare all'informatica e, in questo caso, alla bioinformatica;
A chi mi è stato vicino in tempi bui;
A Iris ed alla sua enorme pazienza nel sopportare le mie pessime battute.

Prefazione

Il presente lavoro è stato svolto sotto la guida ed il supporto di AlgoLab, laboratorio presso il dipartimento di informatica dell'Università di Milano-Bicocca, che ha lo scopo di progettare, studiare, analizzare ed implementare algoritmi efficienti per problemi computazionali. Il tirocinio è cominciato il 22 Marzo 2019, ed è stato condotto per la maggior parte in maniera autonoma, da remoto. Il problema affrontato è l'*inferenza di progressioni tumorali* su dati single-cell, al fine di determinare l'ordine e la frequenza con cui le variazioni somatiche vengono acquisite durante una progressione tumorale. Spesso ciò è basato sulla "Infinite Sites Assumption", dove le mutazioni possono solo essere acquisite, e mai perse. Lo stage si colloca nella ricerca del superamento di tale assunzione, utilizzando il modello della *filogenesi persistente*, dove ogni mutazione può essere persa al massimo una volta nell'intero albero. Più precisamente, si è investigata la tecnica *Particle Swarm Optimization*, un algoritmo di ottimizzazione di tipo euristico, ispirato al movimento degli sciami. I dati single-cell sono caratterizzati da un elevato tasso di errore e di valori mancanti: ciò rende inutilizzabili gli approcci noti in letteratura per i dati di *bulk sequencing*. In particolare, sono state analizzate quali strutture dati utilizzare per rendere l'algoritmo efficiente ed efficace, e quali operazioni considerare per inferire predizioni accurate.

Abstract

Al fine di ricostruire gli alberi filogenetici tumorali, negli ultimi anni si è fatto uso del modello *infinite-sites*, ipotizzando le progressioni tumorali come accumulazioni di mutazioni. Recenti studi che sfruttano la sequenziazione *single-cell* mostrano, evidenziando la presenza di perdite di mutazioni, come questa assunzione non si riveli sempre vera. La presenza di strumenti che possano fare inferenze sulle filogenesi di alberi genetici con perdite di mutazioni è però limitata.

In questo lavoro viene illustrato ed analizzato un nuovo strumento di analisi per l'inferenza di progressioni tumorali tramite *particle swarm optimization*.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Descrizione

Il cancro è la seconda causa più comune di morte [10], arrivando nel 2017 a contare il 17.08% delle morti nel mondo, per un totale di 8.93 *milioni* di decessi. Negli ultimi decenni, la ricerca scientifica ha fatto incalcolabili passi avanti per la lotta contro questa malattia, in tutte le sue forme. Dal primo sequenziamento del DNA al sequenziamento single-cell, in questo capitolo verranno introdotte ed analizzate le nozioni principali necessarie al fine di poter studiare, capire ed analizzare lo strumento sviluppato nel corso dello stage in oggetto.

1.2 Storia

Era il 1869 quando venne isolato per la prima volta nella storia dell'umanità l'*Acido Desossiribonucleico*, anche conosciuto come *DNA*. Il pioniere di questa scoperta è Friedrich Miescher (Figura 1.1), medico e ricercatore nato in Svizzera nel 1844. Durante il processo di scoperta, Miescher aveva realizzato che nonostante avesse proprietà simili alle proteine, la nuova sostanza – il DNA – non lo era. Prima di isolare le cellule dal pus presente nelle bende chirurgiche dell'ospedale in cui lavorava, Miescher fu molto attento ad assicurarsi che il materiale che stava utilizzando fosse fresco e non contaminato. Fu solo più tardi, nel 1871, che il ricercatore iniziò a lavorare sullo sperma di salmone, una specie di pesce che affluiva numerosa durante il periodo autunnale nella città di Basel.

Figura 1.1: Friedrich Miescher

1.3 Nozioni di biologia

Al fine di poter comprendere appieno il lavoro svolto, in questa sezione verranno trattate nozioni base di biologia, partendo dalla cellula fino alla rappresentazione in modello del DNA in essa contenuta.

1.3.1 La cellula

Le cellule costituiscono le fondamenta di tutti gli organismi viventi. Il corpo umano è composto da trilioni di cellule. Esse danno forma al corpo, estraggono le sostanze nutritive dal cibo, convertono quelle sostanze nutritive in energia, ed hanno delle funzioni specifiche. Le cellule contengono anche il materiale ereditario del corpo, e possono fare copie di loro stesse. Esse sono a loro volta costituite da diverse parti, tra le quali analizzeremo il nucleo e ciò che esso contiene, il DNA.

1.3.2 Il DNA

Il *DNA*, o *acido desossiribonucleico*, è il materiale ereditario degli organismi viventi presente in ogni cellula. La maggior parte del DNA è situato all'interno del nucleo della cellula (dove è chiamato *DNA cellulare*), ma può trovarsi anche all'interno dei mitocondri, organelli addetti alla respirazione cellulare. Le informazioni nel DNA sono conservate come un codice composto da quattro basi azotate: **adenina** (A) (Figura 1.3a), **guanina** (G) (Figura 1.3b), **citosina** (C) (Figura 1.3c), e **timina** (T) (Figura 1.3d). L'ordine, o la sequenza, di queste basi determina le informazioni disponibili per costruire e mantenere operativo un organismo.

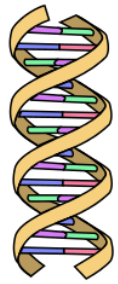
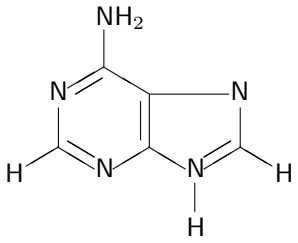
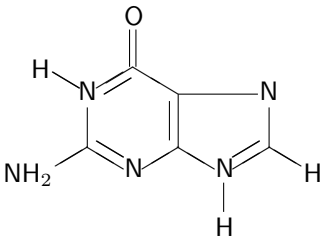


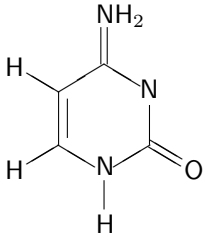
Figura 1.2: DNA



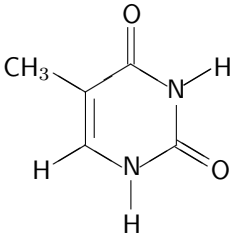
(a) Adenina (A)



(b) Guanina (G)



(c) Citosina (C)



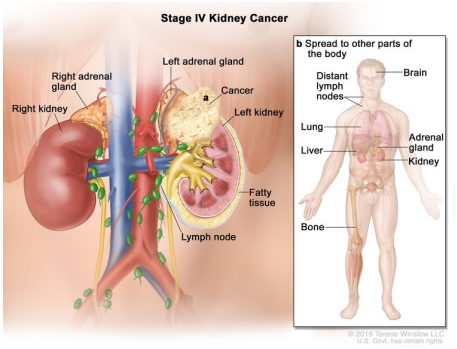
(d) Timina (T)

Figura 1.3: Basi azotate

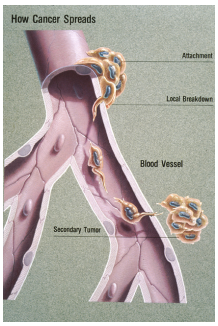
Tali basi si combinano tra di loro, A con T e C con G, in maniera tale da formare una coppia. Assieme ad uno zucchero (*desossiribosio*) ed una molecola di fosfato, le basi costituiscono quello che è definito un *nucleotide*. I nucleotidi si organizzano in uno scheletro zucchero-fosfato che si dispone in modo tale da formare una struttura a *doppia elica*.

Un'importante proprietà del DNA è che si può replicare, ovvero fare copie di se stesso. Uno qualunque dei due filamenti può essere utilizzato nel processo di duplicazione per ottenere una copia identica del DNA di partenza. Questa è una fase cruciale nella divisione di una cellula, poiché la nuova copia di essa deve avere lo stesso identico DNA della cellula di origine.

1.3.3 Cancro e tumore



(a) Cancro al rene



(b) Diffusione del cancro

Figura 1.4: Un cancro al rene ed un esempio di diffusione del cancro tramite vasi sanguini

Si stima che durante la replicazione solo una base su 10^9 [4] sia errata. Vari fattori possono influenzare questa delicata fase, come l'esposizione ad agenti chimici ed irradiazione. Questi errori molto spesso sono corretti in vari modi, ma quando questo non basta, possono essere la causa scatenante che porta una cellula a diventare *cancerogena*. In generale, una cellula è cancerogena quando inizia a moltiplicarsi senza controllo. Quando questo processo avviene in un tessuto solido come un organo (Figura 1.4a), muscolo od ossa, prende il nome di *tumore*. Ci sono due tipi di tumore: *maligno* (cancerogeno) e *benigno* (non cancerogeno). I primi possono invadere i tessuti circostanti del corpo e, mentre crescono, alcune cellule possono viaggiare nel sangue (Figura 1.4b) o altri mezzi a formare delle *metastasi*, dei tumori secondari. I tumori benigni d'altro canto conservano le caratteristiche del tessuto di origine e non hanno la tendenza ad invadere gli organi circostanti. Un tumore benigno non è quindi un cancro, ma una massa che può raggiungere dimensioni considerevoli, senza diffondersi in altre parti del corpo.

1.3.4 Eterogeneità Intra-Tumorale

Durante la divisione di una cellula, sia essa sana o tumorale, questa può acquisire delle mutazioni. Nel caso di cellule tumorali o cancerogene, può capitare che le mutazioni avvengano in posizioni diverse nel DNA sia tra tumori dello stesso tipo, *eterogeneità inter-tumorale*, che tra cellule appartenenti allo stesso tumore, *eterogeneità intra-tumorale*. L'acquisizione di mutazioni è randomica e derivante dalla crescente instabilità genomica[1] di ogni nuova generazione. Questo rappresenta un grande problema dal punto di vista della diagnosi e della terapia di cura per il cancro [11].

[1] Elevata frequenza di mutazioni nel genoma di una discendenza cellulare

1.4 Modelli di sostituzione

In filogenetica il DNA può essere rappresentato come una sequenza di simboli, utilizzando le basi (sottosezione 1.3.2) corrispondenti alle posizioni degli allineamenti come caratteri.

AGTCCAGGACAT GGCATTCAATCA

Figura 1.5: Esempi di sequenze di DNA

La Figura 1.5 rappresenta un esempio di *modello di sostituzione*, un modello che in biologia descrive il processo per cui una sequenza di simboli cambia in un'altra, modificandone i tratti che rappresenta. In cladistica[2] viene utilizzato per rappresentare delle caratteristiche presenti, utilizzando il carattere "1", o assenti, utilizzando il carattere "0", in una specie.

10011 01110

Figura 1.6: Esempio di modello di sostituzione in cladistica

L'esempio in Figura 1.6 può ipoteticamente rappresentare due specie: la prima può digerire i latticini, non depone uova, è una creatura a sangue freddo, vola e sa nuotare; la seconda non può digerire i latticini, può deporre uova, è una creatura a sangue caldo, vola e non sa nuotare. Lo stesso ragionamento può essere utilizzato per rappresentare le *mutazioni* presenti all'interno di una cellula nel caso di cellule tumorali (Tabella 1.1).

BBS4	CAMSAP1	DOCK3	EPHA10	EYA4	HIPK4	HIST1H2AG	INTS8	MAL2	MYOM3	OAZ3	PPIG	PTPRQ	RGS11	RYR3	SERPINF2	SMOC1	TTN	TUFT1	ZNF540
1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0

Tabella 1.1: Dataset di cellule tumorali e delle relative mutazioni

1.4.0.1 Tipi di modello di sostituzione

In biologia, al fine di poter spiegare le mutazioni che avvengono nel corso della vita di una cellula, si possono utilizzare due tipi di modello di sostituzione:

[2]Metodo di classificazione degli esseri viventi che si basa sul grado di parentela, ovvero sulla distanza nel tempo dell'ultimo progenitore comune

- modello a *finite-sites*
  esiste un numero finito di posizioni dove può avvenire una mutazione, ergo se un carattere è 0 ad un tempo t, può darsi che non è avvenuta nessuna mutazione, oppure che c'è stata una mutazione da 1 a 0, oppure che c'è stata una mutazione da 0, poi 1 ed infine a 0, e così via

- modello a *infinite-sites*
  esiste un numero infinito di posizioni dove può avvenire una mutazione, di conseguenza ogni mutazione deve avvenire *per forza* in una nuova posizione rispetto alle precedenti

1.4.1 Single-Cell Sequencing

La *single-cell sequencing* (SCS) è una tecnica che esamina le informazioni sulle sequenze di singole cellule con tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (*NGS*). Il processo dell'amplificazione del genoma[3], processo essenziale per la SCS, introduce una serie di tipi di rumore, che risulta in inferenze sbagliate sui genotipi. Gli errori comprendono: errori di perdita allelica (ADO), errori di falsi positivi (FPs) e regioni di scarsa copertura. ADO in particolare è un errore frequente nei dati SCS e contribuisce ad un numero considerevole di falsi negativi (FNs) nei dati. Gli algoritmi che verranno introdotti nel Capitolo 2 ed il lavoro di questa relazione introdotto nel Capitolo 3 cercano di mitigare questi problemi assumendo che questi errori avvengano uniformemente su tutti i valori della matrice in input, che rappresenta un modello di sostituzione analogo alla Tabella 1.1.

1.4.2 Clade

In filogenetica un clade è un gruppo di organismi che includono un antenato e tutti i discendenti di quell'antenato.

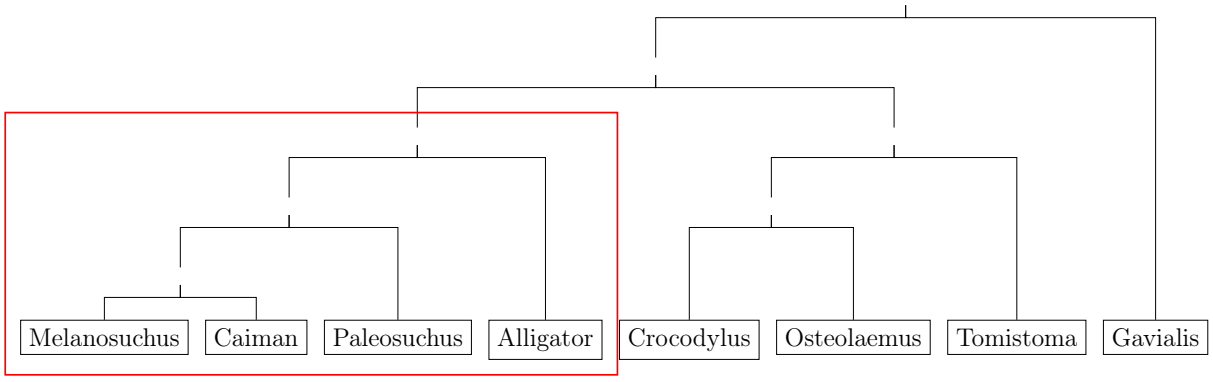


Figura 1.7: Esempio di clade

1.5 Richiami di ottimizzazione matematica

In questa sezione verranno trattate inizialmente nozioni base di ottimizzazione matematica, in particolare sulla ricerca locale dell'ottimo, per poi introdurre due tecniche di ottimizzazione che verranno utilizzate nel Capitolo 2.

[3]WGA: whole-genome amplification

1.5.1 Hill climbing

In matematica, *hill climbing* è un algoritmo di ricerca dell'ottimo, migliorando la soluzione ripetutamente fino a quando non si raggiunge un criterio di ottimalità. L'idea è quella di partire da una soluzione sub-ottimale, che per analogia viene paragonato al partire alla base della collina, per poi migliorare la soluzione ottimale, che viene comparato allo scalare la collina, fino al raggiuntimento di una condizione, cioè raggiungere la cima della collina. In maniera generale, si può modellare nella forma descritta in Algoritmo 1.

Algoritmo 1: Hill Climbing

```
1  inizializzazione
2  while non raggiunta condizione di ottimalità do
3  |  seleziona e applica nuova operazione
4  |  if nuovo stato è ottimo then
5  |  |  termina
6  |  end
7  |  if nuovo stato è migliore del precedente then
8  |  |  stato = nuovo stato
9  |  end
10 end
```

Esistono numerose variazioni di questo algoritmo, ma le più conosciute sono *simple hill climbing*, *steepest hill climbing* e *stocastic hill climbing*, applicate a seconda delle proprietà del problema in questione. Un esempio di funzione da ottimizzare, in questo caso massimizzare, può essere come quella rappresentata in Figura 1.8a, dove esiste un solo ottimo locale ($f(x, y) = 0$) cioè la funzione è monomodale[4]. In questo caso, il *simple hill climbing* e lo *steepest hill climbing* ottengono sempre il risultato migliore.

D'altro canto, funzioni plurimodali[5] come "Eggcrate" rappresentato in Figura 1.8b, dove le tecniche citate precedentemente falliscono miseramente. Entrano quindi in gioco algoritmi di ricerca locale che ammettono, con un certo grado di libertà, di accettare un risultato peggiore di quello attuale, nella speranza di non rimanere intrappolati in un ottimo locale.

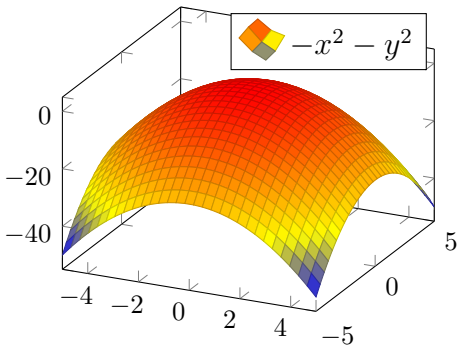
1.5.2 Simulated Annealing

Per cambiare e migliorare delle caratteristiche di un solido, in metallurgia viene utilizzata la tecnica della *ricottura* (in inglese "anneal"), dove i solidi come l'acciaio, bronzo o alluminio, vengono portati ad altissime temperature, per essere poi raffreddati ad una certa velocità chiamata *cooling rate*, che determina le caratteristiche finali del metallo. Alle alte temperature, gli atomi si muovono molto velocemente e rompono le strutture cristalline che avevano formato precedentemente. Mano a mano che la temperatura cala, gli atomi rallentano, e si recristallizzano.

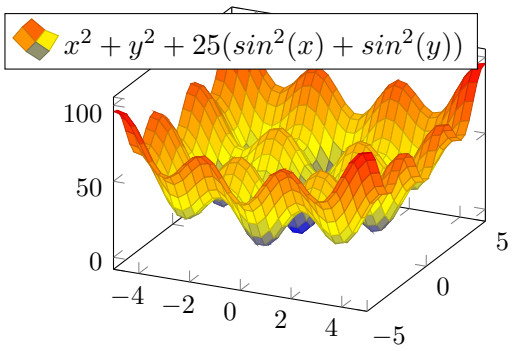
Analogamente, la tecnica matematica del *simulated annealing* è un algoritmo di ricerca che utilizza la temperatura per riuscire a scappare da eventuali ottimi locali. Quando la temperatura è alta, l'algoritmo è meno propenso ad accettare nuovi soluzioni, anche se migliori. Mano a mano che la temperatura diminuisce, la probabilità che si accetti una

[4]Una funzione monomodale è una funzione con un solo ottimo locale, che corrisponde anche all'ottimo globale della funzione stessa

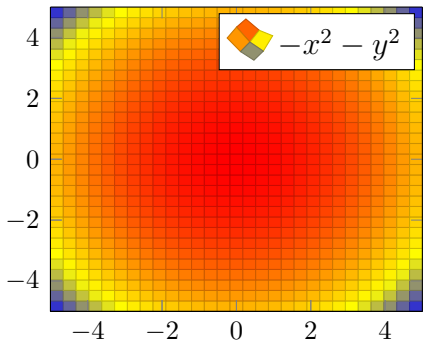
[5]Una funzione plurimodale è una funzione con più di un ottimo locale. Non è detto che esista un unico ottimo globale



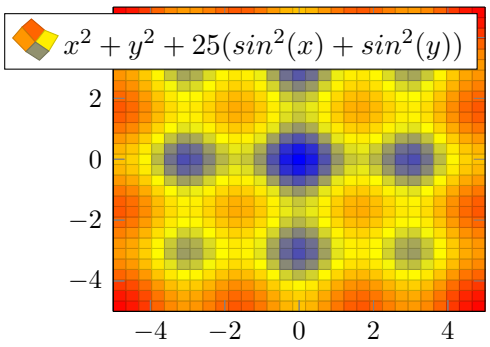
(a) Paraboloide, monomodale



(b) "Eggcrate", plurimodale



(c) Paraboloide, monomodale



(d) "Eggcrate", plurimodale

Figura 1.8: Esempi di funzione monomodale e plurimodale

soluzione migliore aumenta, fino al raggiuntimento della condizione di ottimalità, cioè quando la temperatura non può più scendere, ed il risultato non può che essere un ottimo locale.

Algoritmo 2: Simulated Annealing

```
1  best ← random()
2  T ← 1.0
3  T_min ← 0.0001
4  cooling_rate ← 0.9
5  while T > T_min do
6      new_best = neighbour(best)
7      ap ← acceptance_probability(best, new_best, T)
8      if ap > random() then
9          best ← new_best
10     T = T * cooling_rate
```

Questa funzione però molto spesso fallisce, specie se si cerca di ottimizzare una funzione plurimodale come in Figura 1.8b.

1.5.3 Particle Swarm Optimization

Un'altra tecnica di ricerca dell'ottimo è quella del *particle swarm optimization*. Questo algoritmo iterativo nasce inizialmente come simulazione del comportamente sociale di

stormi di uccelli che si sincronizzano in volo, o un branco di pesci alla ricerca di cibo [7]: membri individuali del branco possono trarre vantaggio dalle scoperte ed esperienze passate di tutti gli altri membri durante la ricerca del cibo, un vantaggio che può rivelarsi decisivo per superare la competizione. Questa è un'ipotesi fondamentale per poter definire il *particle swarm optimization*, ed in generale di tutti gli algoritmi dello stesso tipo, nella letteratura denominati *algoritmi genetici*.

Nell'algoritmo, il branco di pesci viene sfruttato come analogia per lo *swarm* (rappresentato in Figura 1.9), che indica l'insieme degli elementi appartenenti ad una popolazione, questi indicati come *particelle* dello swarm.

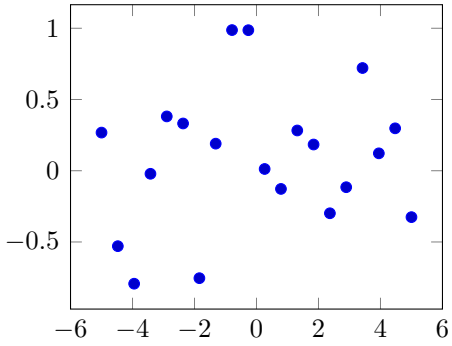


Figura 1.9: Esempio di swarm

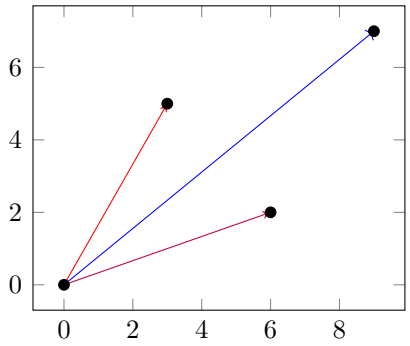


Figura 1.10: Somma vettoriale tra p_i e g

Ad ogni iterazione, la posizione di ogni particella viene aggiornata per ogni dimensione del problema, basandosi sulla migliore posizione della particella p_i e sulla migliore posizione globale dello swarm g (in Figura 1.10 si vede un esempio di questa combinazione, dove la posizione finale del vettore è data dalla combinazione di due valori). Questa combinazione dei due valori migliori risolve il problema di rimanere intrappolati in un ottimo locale che presentano gli algoritmi visti nella sottosezione 1.5.1. Con il proseguire dell'algoritmo sarà possibile osservare che le singole particelle mano a mano convergono verso un ottimo locale, o di più, se la funzione da ottimizzare è multimodale (come in Figura 1.8b). È possibile inoltre introdurre la *velocità* come parte dell'algoritmo, al fine di influire su quanto velocemente una particella si muove verso la soluzione, che in algebra vettoriale si traduce nella modifica del modulo del vettore di spostamento.

1.6 Nozioni Extra

In questa sezione verranno introdotti dei concetti aggiuntivi che non rientrano nelle sezioni sopracitate, e le cui basi si assumono essere già presenti per la comprensione degli stessi. Queste nozioni verranno utilizzate nei capitoli successivi per complementare la spiegazione di modelli, termini o algoritmi.

1.6.1 Catena di Markov

In teoria probabilistica, una *Catena di Markov* è un modello stocastico che descrive una sequenza di possibili eventi la cui probabilità dei singoli eventi dipende solo ed unicamente dallo stato dell'evento che lo precede. Questa definizione si traduce nell'assunzione che gli stati passati e futuri di ogni evento sono indipendenti rispetto alla storia di tutti gli eventi già avvenuti all'interno della catena.

Algoritmo 3: Particle Swarm Optimization

```
1  n = numero particelle
2  m = numero dimensioni dello spazio di ricerca
3  for i ← 1 to n do
4      x_i ~ U(b_low, b_up) ▷ Inizializzo ogni particella con un valore random
         nel mio spazio di ricerca, delimitato da un lower bound b_low ed
         un b_up
5      p_i ← x_i ▷ Inizializzo la posizione migliore della particella alla
         sua posizione iniziale
6      if f(p_i) > f(g) then
7          g ← p_i ▷ Aggiorno la posizione migliore globale
8      v_i ~ U(−|b_up − b_low|, |b_up − b_low|) ▷ Inizializzo la velocità iniziale
         della particella
9  while criterio di terminazione non soddisfatto do
10     for i ← 1 to n do
11         for d ← 1 to m do
12             r_p, r_g ~ U(0, 1) ▷ Parametri di casualità
13             v_{i,d} ← ωv_{i,d} + φ_p r_p(p_{i,d} − x_{i,d}) + φ_g r_g(g_d − x_{i,d}) ▷ Aggiorno la
                 velocità della particella
14             x_i ← x_i + v_i ▷ Aggiorno la posizione della particella
15             if f(x_i) > f(p_i) then
16                 p_i ← x_i ▷ Aggiorno la posizione migliore della particella
17                 if f(p_i) > f(g) then
18                     g ← p_i ▷ Aggiorno la posizione migliore dello swarm
```

Il modello è strutturato come una *macchina a stati finiti*, dove i rami che collegano uno stato ad un altro hanno un valore numero associato, chiamato la *probabilità di transizione*, che indica quanto è probabile passare allo stato di destinazione.

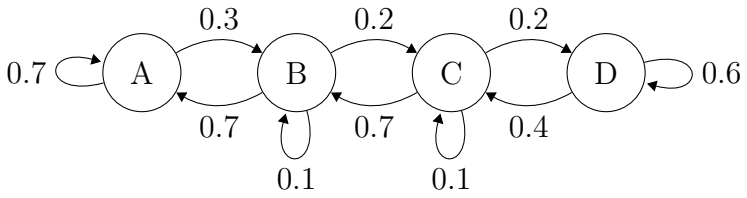


Figura 1.11: Esempio di catena di Markov

Una catena di Markov può essere vista anche come una sequenza di variabili aleatorie $X_0, X_1, X_2, \ldots$ che soddisfano la proprietà di indipendenza. Questa soddisfacibilità è definita come *Proprietà di Markov*:

$$P(X_n = i_n | X_{n-1} = i_{n-1}) = P(X_n = i_n | X_0 = i_0, X_1 = i_1, \ldots, X_{n-1} = i_{n-1}) \tag{1.1}$$

Le probabilità di transizione in un dato tempo t per ogni stato della catena possono essere rappresentate come una matrice P_t, denominata *matrice di transizione* e definita come segue:

$$(P_t)_{i,j} = \mathbb{P}(X_{t+1} = j | X_t = i) \tag{1.2}$$

Questo significa che ogni riga della matrice è un *vettore di probabilità*, e la somma dei suoi elementi è sempre 1.

Una matrice di transizione $P_t^{(k)} = P_t \cdot P_{t+1} \cdots P_{t+k-1}$ soddisfa quindi:

$$P_t^{(k)} = \begin{pmatrix} \mathbb{P}(X_{t+k} = 1 \mid X_t = 1) & \mathbb{P}(X_{t+k} = 2 \mid X_t = 1) & \dots & \mathbb{P}(X_{t+k} = n \mid X_t = 1) \\ \mathbb{P}(X_{t+k} = 1 \mid X_t = 2) & \mathbb{P}(X_{t+k} = 2 \mid X_t = 2) & \dots & \mathbb{P}(X_{t+k} = n \mid X_t = 2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \mathbb{P}(X_{t+k} = 1 \mid X_t = n) & \mathbb{P}(x_{t+k} = 2 \mid X_t = n) & \dots & \mathbb{P}(X_{t+k} = n \mid X_t = n) \end{pmatrix}. \tag{1.3}$$

Nell'esempio in Figura 1.11 la matrice di transizione a $k = 0$ è come segue:

$$P_t^0 = \begin{pmatrix} 0.7 & 0.3 & 0 & 0 \\ 0.7 & 0.1 & 0.2 & 0 \\ 0 & 0.7 & 0.1 & 0.2 \\ 0 & 0 & 0.4 & 0.6 \end{pmatrix} \tag{1.4}$$

1.6.1.1 Catena di Markov: Variante Monte Carlo (MCMC)

Il metodo *Monte Carlo* in statistica si basa sul campionamento casuale per ottenere dei risultati. Un esempio del loro utilizzo è dato dal calcolo dell'area di una funzione complessa: vengono generati n punti casuali, e si calcola quanti di questi rientrano all'interno della funzione della quale vogliamo calcolare l'area. Il numero di questi punti che ricade in questa categoria ci fornisce un grado di approssimazione proporzionale al numero di punti che generiamo per ottenere il risultato finale: più punti generiamo, più è accurata la stima dell'area, o più in generale, di qualunque cosa stiamo cercando di approssimare.

Volendo ad esempio stimare una distribuzione a posteriori[6] è possibile utilizzare una variante della Catena di Markov sfruttando le proprietà aleatorie del metodo Monte Carlo: la tecnica così ottenuta è definita una *Monte Carlo Markov Chain* (MCMC). Ogni valore generato è aleatorio, ma le scelte fatte per generare i valori successivi sono limitate dallo stato corrente e dalla distribuzione dei valori attuali. Una MCMC quindi può essere paragonata ad un cammino aleatorio[7] che con l'aumentare delle iterazioni converge alla distribuzione (o modello matematico) che si vuole stimare.

1.6.2 Likelihood

Uno dei problemi della genomica (ma anche di altri campi, come la linguistica [5]) è quello di ricostruire un albero filogenetico partendo da dati raccolti di caratteri appartenenti una popolazione. I dati in questione seguono il modello di sostituzione (sezione 1.4) ed i tratti possono essere qualunque aspetto della popolazione, come altezza, peso, capacità di volare o di respirare sott'acqua. Nel presente lavoro, la popolazione presa in analisi sono cellule, ed i tratti considerati sono le mutazioni acquisite, ed il problema si può interpretare come la ricerca del migliore albero filogenetico che meglio rappresenta il modello di sostituzione. Per stabilire come un albero è *migliore* di un altro, viene definita

[6] Distribuzione di una variabile aleatoria condizionata a delle informazioni rilevanti su di essa

[7] Modello matematico che descrive un processo stocastico come una successione di step aleatori all'interno di uno spazio matematico (e.g. $\mathbb{Z}$)

una funzione di *likelihood*, che esprime appunto quanto è probabile un particolare set di parametri stastistici (nel nostro caso la configurazione dei nodi dell'albero inferito) data il modello di sostituzione iniziale. Supponendo di aver generato un albero T con n nodi, un nodo per ogni mutazione, e ad ogni foglia può essere associata una cellula. Le cellule così assegnate avranno una serie di caratteri, che vengono acquisiti o persi una volta per ogni nodo padre.

a	b	c	d
1	0	0	0
0	1	0	0
1	0	1	0
1	0	1	1

Tabella 1.2: Modello di sostituzione

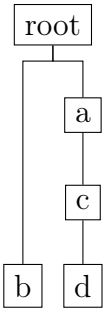


Figura 1.12: Esempio di albero inferito

Il calcolo della likelihood $\mathcal{L}$ si basa sulla probabilità condizionata della configurazione attuale dell'albero T dato il modello di sostituzione in input M, con n righe (una per ogni cellula) e m colonne (una per ogni mutazione), che si traduce in termini generali nella formula che segue:

$$\mathcal{L}(T) = \mathcal{L}(1) \cdot \mathcal{L}(2) \cdots \mathcal{L}(n) = P(M|T) = \prod_{j=1}^{m} P(M_j|T) \tag{1.5}$$

Spesso è utile riportare la somma logaritmica delle likelihood ad ogni posizione, poiché le probabilità condizionate di ogni nodo si traducono in numeri molto piccoli. La formula per il calcolo della *logaritmic likelihood* si traduce quindi come segue:

$$\ln \mathcal{L} = \ln \mathcal{L}(1) + \ln \mathcal{L}(2) + \ln \mathcal{L}(n) = \sum_{j=1}^{m} \ln \mathcal{L}(j) \tag{1.6}$$

1.6.3 Matching

Nella teoria dei grafi un *matching* M è definito come un sottoinsieme di coppie di nodi di un grafo $G = (V, E)$ tale per cui ogni coppia non è adiacente ad un altra, e nessuna coppia è un loop; ciò significa che nessuna coppia condivide un nodo.

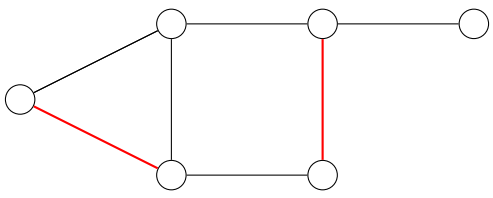


Figura 1.13: Esempio di matching

1.6.3.1 Maximum Weight Matching

Dato un grafo pesato $G = (V, E, w)$, con $w : E \to \mathbb{R}$, il *maximum weight matching* è un matching per cui la somma:

$$\sum_{e}^{E} w(e) \tag{1.7}$$

È massima.

Capitolo 2

Stato dell'arte

2.1 Introduzione

Con l'avvento delle tecnologie per il sequenziamento del DNA partendo da singole cellule (SCS), iniziano ad essere disponibili dati di alta qualità. Queste tecnologie forniscono il sequenziamento di dati da singole cellule, permettendo quindi di ricostruire l'albero filogenetico di una cellula. È però da tenere in considerazione l'alto tasso di errore associato a questo tipo di dati, innalzando di conseguenza il grado di difficoltà del processo di ricostruzione della filogenesi. In questo capitolo, verranno esaminate le tecnologie già presenti che hanno affrontato questa sfida, focalizzando l'analisi sul modello di ricerca dell'ottimo, del calcolo della *likelihood* dell'albero inferito e della complessità dell'algoritmo utilizzato.

2.2 SciTe [6]

SCITE (*Single-Cell Inference of Tumor Evolution*) usa un approccio basato sulla likelihood dell'albero inferito per fare una ricerca stocastica dell'albero migliore rispetto ai dati in input. Ricordando l'assunzione che le mutazioni siano indipendenti l'una dall'altra, dati i tassi di errore $\theta = (\alpha, \beta)$, la matrice M di partenza di dimensioni $n \times m$, dove n è il numero di cellule e m il numero di mutazioni, possiamo calcolare la likelihood come segue:

$$P(M|T, \sigma, \theta) = \prod_{i=1}^{n} \prod_{j=1}^{m} P(M_{i,j}|D_{i,j}) \tag{2.1}$$

Lo strumento è costruito attorno al funzionamento di una catena di Markov Monte Carlo (sottosottosezione 1.6.1.1) che permette di trovare l'albero migliore basandosi sulla likelihood calcolata, oppure basandosi sulla distribuzione a posteriori. Uno dei principali vantaggi indicati è quello della scalabilità lineare, proporzionale con il numero dei campioni.

2.2.1 Complessità

Ad ogni step, la MCMC impiega $O(mn)$ per calcolare la likelihood dell'albero, impiegando un tempos stimato di $O(mn^3ln(n))$ per una convergenza all'albero migliore. Il tempo è linearmente dipendente con il numero dei campioni e di mutazioni.

2.3 SiFit: inferring tumor trees from single-cell sequencing data under finite-sites models [13]

Il progetto *SiFit* affronta il problema presupponendo un modello a posizioni finite (*finite sites model*), quindi permettendo delle back-mutation[1]. Lo strumento accetta sia matrici binarie, con un set di valori possibili $\{0, 1, X\}$, che matrici ternarie, per le quali accetta il set di valori $\{0, 1, 2, X\}$, dove 0 denota un genotipo *reference* omozigota, 1 e 2 denotano un genotipo eterozigota ed omozigota *non-reference*, rispettivamente, e X denota la mancanza di informazioni.

Vengono principalmente usati due tipi di mosse: mosse di *prune and regraft* e mosse di *swap*. Le mosse di *prune and regraft* prevedono il cambiamento randomico della topologia dell'albero attraverso il riposizionamento di un sottoalbero all'interno (rSPR, *random Subtree Prune and Regraft*) e la lunghezza dei rami dell'albero (eSPR, *extending Subtree Pruning and Regrafting*). Le mosse di *swap* prevedono lo scambio di nodi interni all'albero (stNNI, *stochastic nearest-neighbour interchange*) e dei rami (rSTS, *random Sub-Tree Swapping*) [13, 8].

2.3.1 Complessità

Ad ogni passo dell'algoritmo proposto, calcolare la *likelihood* dell'albero è il processo più dispendioso. Per n singole cellule e m mutazioni, il calcolo della likelihood impiega $\mathcal{O}(nk^2m)$, dove k è il numero massimo di stati per mutazione, quindi $k = 3$ e $k = 2$ per una matrice ternaria e una matrice binaria in input, rispettivamente.

Il numero di iterazioni i è definito dall'utente, ottenendo quindi come complessità generale dell'algoritmo $\mathcal{O}(nk^2mi)$.

2.4 SASC - Inferring Cancer Progression from Single-Cell Sequencing while Allowing Mutation Losses [2]

In SASC (*Simulated Annealing Single-Cell* inference) viene utilizzato il modello *finite-sites* insieme al modello di Dollo-k. Il modello della Parsimonia di Dollo prevede che ogni mutazione può essere acquisita una sola volta, ma una perdita di una mutazione può accadere un numero indefinito di volte. La versione ristretta di Dollo-k assume che ogni mutazione possa essere acquisita una sola volta e persa al massimo k volte. Per trovare l'albero migliore il problema viene modellato sull'algoritmo euristico *simulated annealing* (sottosezione 1.5.2). Le mosse utili alla scalata della collina sono: *aggiunta di back-mutation*, *rimuzione di back-mutation*, *node switch* e *prune-and-regraft*.

Ad ogni riduzione della temperatura viene cercato un albero topologicamente vicino a quello attuale applicando una delle quattro operazioni precedenti, finché non si raggiunge la temperatura minima. La bontà dell'albero è definita dalla *likelihood logaritmica*, e viene calcolata ad ogni operazione effettuata sull'albero inferito nella seguente maniera:

$$\sum_{i}^{n}\sum_{j}^{m}\log(P(M_{i,j}|D_{i,j})) \tag{2.2}$$

[1] Mutazioni all'indietro, una mutazione viene persa durante la vita di una cellula

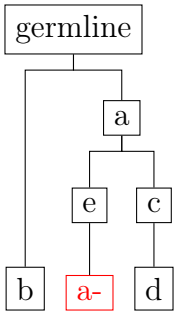


Figura 2.1: Esempio di back-mutation

È quindi intuibile definire il problema come un problema di ottimizzazione, in particolare di ricerca del massimo globale, andando quindi a definire la seguente funzione di ottimizzazione:

$$max \sum_{i}^{n} \sum_{j}^{m} \log(P(M_{i,j}|D_{i,j})) \tag{2.3}$$

2.4.1 Complessità

L'algoritmo Simulated Annealing impiega $O(\log t)$ step fino a quando non raggiunge la temperatura minima, con t ad indicare la temperatura di partenza, e per ogni step impiega $O(nm)$ per calcolare la likelihood logaritmica. Lo strumento genera inizialmente un albero con m nodi, con una complessità generale di m. In generale, SASC ha una complessità di $O(nm \log t + m)$.

Capitolo 3

Inferenza di Alberi Tumorali tramite Particle Swarm Optimization

In questa sezione verrà descritto lo strumento di inferenza di alberi tumorali tramite Particle Swarm Optimization (d'ora in poi **PSO**), le ipotesi effettuate, i risultati ottenuti ed eventuali conclusioni. Viene utilizzata la tecnica euristica Particle Swarm Optimization, descritta precedentemente nel sottosezione 1.5.3.

3.1 Ipotesi effettuate

Lo sviluppo di questo progetto è stato fortemente basato sullo strumento già esistente SASC (precedentemente descritto nella sezione 2.4). A fronte di ciò, molte premesse e funzioni utilizzate sono state riprese e riadattate alla tecnica adottata.

3.1.1 Metodo di ricerca dell'ottimo

Una delle premesse più importanti è quella della ricerca dell'albero con *likelihood logaritmica* più alta, associando quindi l'algoritmo ad una ricerca del massimo secondo la seguente funzione:

$$max \sum_{i}^{n} \sum_{j}^{m} \log(P(M_{i,j}|D_{i,j})) \tag{3.1}$$

Nella pratica, questa funzione si traduce nell'Algoritmo 4.

La funzione `genotype_profile(node)`, definita nell'Algoritmo 5, restituisce la lista delle mutazioni acquisite e non di *node*, sotto forma di modello di sostituzione (definito nella sottosottosezione 1.4.0.1), esplorando il nodo corrente e tutti i suoi antenati fino

alla radice.

Algoritmo 4: TreeLogLikelihood

```
1  matrix ▷ Matrice sulla quale fare l'inferenza
2  tree_nodes ▷ Lista dei nodi dell'albero
3  node_genotypes ← int[len(tree_nodes)][mutations] = 0 ▷ Ogni cella
     dell'array è impostata a 0
4  for i to len(tree_nodes) do
5  |  node_genotypes[i] ← genotype_profile(tree_nodes[i]) ▷ Ottengo la lista
   |    delle mutazioni acquisite dal nodo corrente
6  max_likelihood = 0
7  for i to cells do
8  |  best_lh ← −inf
9  |  for n to len(tree_nodes) do
10 |  |  lh ← 0
11 |  |  for j to mutations do
12 |  |  |  p ← prob(matrix[i][j], node_genotypes[n][j])
13 |  |  |  lh ← lh + log(p)
14 |  |  if lh > best_lh then
15 |  |  |  best_lh ← lh
16 |  |  max_likelihood ← max_likelihood + best_lh
17 return max_likelihood
```

Algoritmo 5: genotype_profile

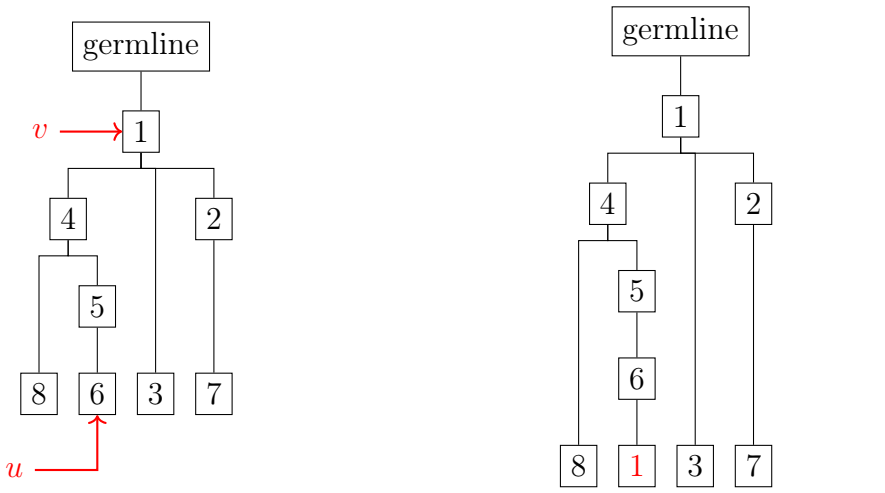
```
1  node ▷ Nodo di cui si desidera trovare la lista delle mutazioni
2  genotypes ▷ Lista dei genotipi, originariamente tutta a 0
3  if node.mutation_id == −1 then
   |  ▷ Il nodo è il nodo radice
4  |  return
5  if node.loss == true then
6  |  genotypes[node.mutation_id] ← genotypes[node.mutation_id] + 1
7  else
8  |  genotypes[node.mutation_id] ← genotypes[node.mutation_id] - 1
9  genotype_profile(parent(node), genotypes)
```

3.1.2 Operazioni di neighbourhood

Per le operazioni di neighbourhood sono state riprese le funzioni di SASC, ossia con l'utilizzo di quattro operazioni per la ricerca del massimo, ognuna selezionata in maniera equalmente casuale:

- Add back mutation
- Delete mutation
- Switch nodes
- Prune tree and regraft

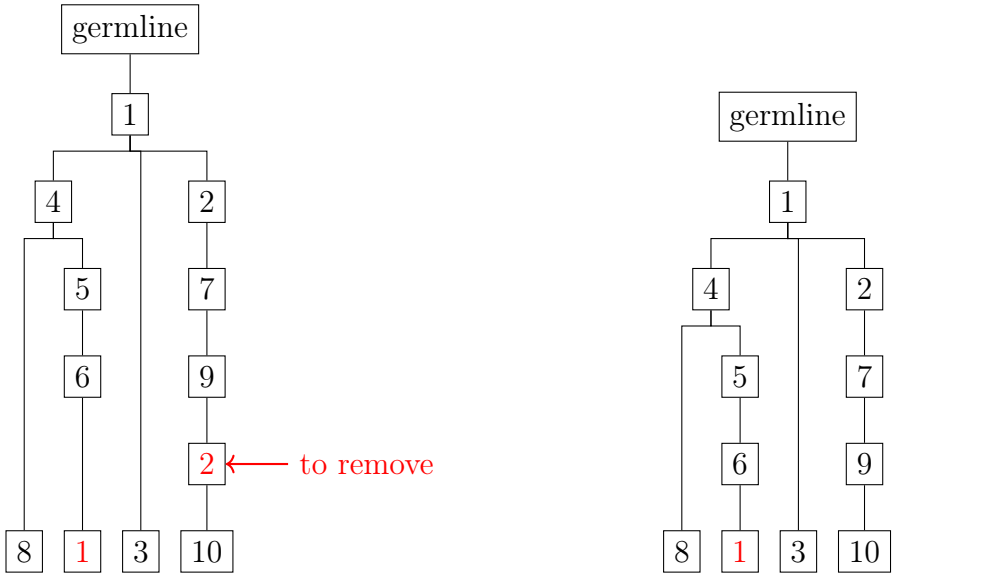
Add back mutation (Figura 3.1): se non si hanno già k mutazioni nell'albero corrente, viene selezionato un nodo casuale, u, con almeno due antenati. Si cercano quindi dei nodi candidati nel ramo del nodo corrente. I nodi candidati non devono essere delle back mutation a loro olta, essere il nodo radice, o essere già stato perso k volte. Se esistono dei nodi candidati, si sceglie un nodo casuale, v, tra questi. Se il nodo scelto non ha già subito una back mutation nel ramo corrente, allora ne viene aggiunta una al nodo scelto all'inizio dell'algoritmo.



(a) Selezione dei nodi (b) Aggiunta della back mutation

Figura 3.1: Add back Mutation

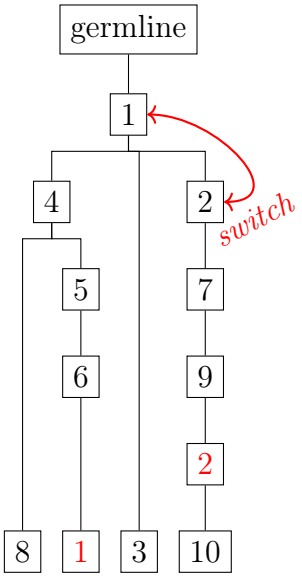
Mutation delete (Figura 3.2): se esistono delle back mutation, si sceglie randomicamente una tra queste, e la si elimina.



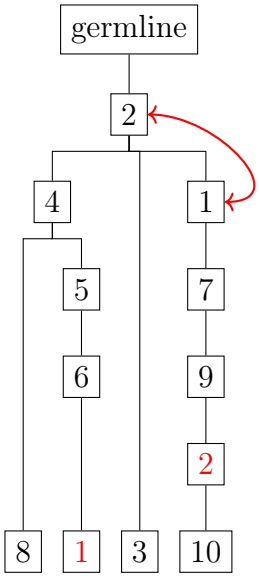
(a) Selezione della back mutation (b) Rimozione della back mutation

Figura 3.2: Delete back mutation

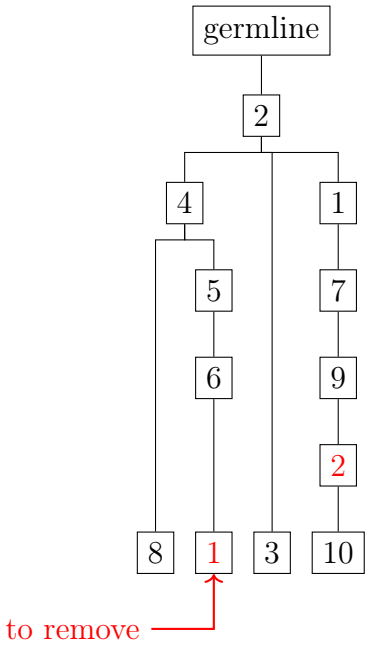
Switch Nodes (Figura 3.3): vengono cercati due nodi candidati in maniera casuale che non siano delle back mutation e vengono scambiati di posizione. Eventuali back-mutation non più valide vengono rimosse tramite la funzione `fix_for_losses(tree)`.



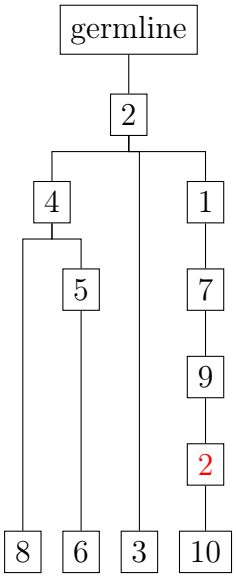
(a) Selezione di u, v



(b) Switch di u, v



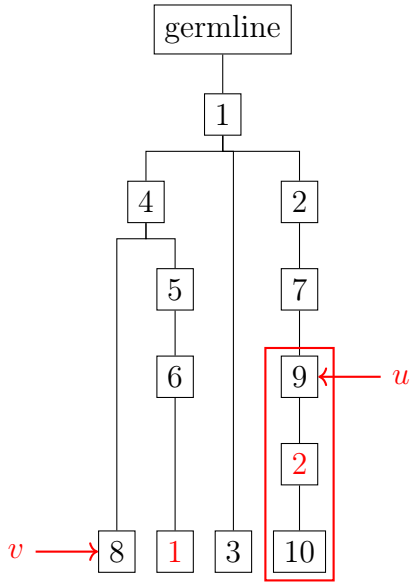
(c) Identificazione back mutation non valide



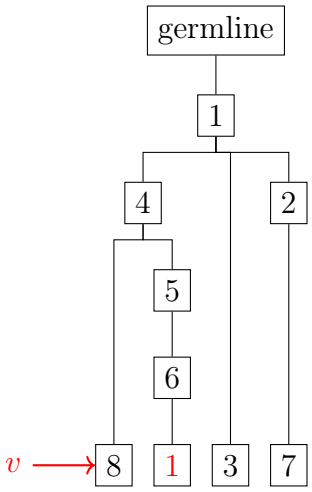
(d) Rimozione delle back mutation non valide

Figura 3.3: Switch nodes

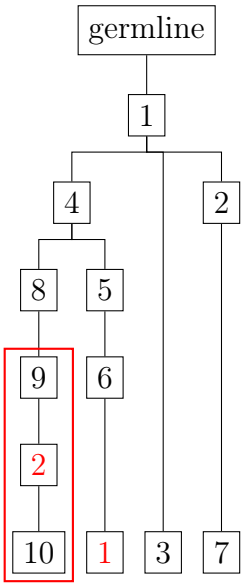
Prune tree and regraft (Figura 3.4): vengono selezionati in maniera casuale due nodi, u e v, che non siano delle back mutation. Il nodo u viene quindi staccato dal suo nodo padre, ed inserito come nodo figlio di v. Eventuali back-mutation non più valide vengono rimosse tramite la funzione `fix_for_losses(tree)`.



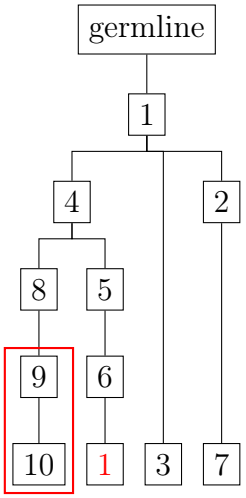
(a) Selezione di u, v



(b) Prune di u



(c) Regraft di u



(d) Rimozione delle back mutation non valide

Figura 3.4: Prune tree and regraft

3.1.3 Modello degli errori single-cell

I dati single-cell vengono rappresentati tramite un modello di sostituzione come quello illustrato nella sezione 1.4 tramite una matrice $M = n \times m$, con n cellule e m mutazioni. Viene poi utilizzata una matrice $D = n \times m$ è ricavata dall'osservazione dell'albero inferito, ed è una versione imperfetta del vero genotipo della matrice M. Per mitigare i problemi causati dalle tecniche di WGA (sottosezione 1.4.1) viene utilizzato il parametro α per indicare la probabilità di incontrare un falso positivo, quindi osservare un 1 quando in realtà questo è uno 0, e falsi negativi, cioè di avere la probabilità β di osservare uno 0 quando in realtà è un 1:

$$\begin{aligned} P(M_{i,j} = 0|D_{i,j} = 0) &= 1 - \alpha, & P(M_{i,j} = 0|D_{i,j} = 1) &= \beta, \\ P(M_{i,j} = 1|D_{i,j} = 0) &= \alpha, & P(M_{i,j} = 1|D_{i,j} = 1) &= 1 - \beta \end{aligned} \tag{3.2}$$

3.2 Strumenti Utilizzati

Lo strumento è stato sviluppato in Python. Inizialmente si era cercato di utilizzare Cython[1], poi abbandonato poiché lo studio di questo linguaggio di programmazione avrebbe ridotto il tempo utile alla vera e propria implementazione dello strumento. Si pensa però in futuro di riscrivere il codice utilizzando *C++*.

L'ambiente di sviluppo scelto è *Visual Studio Code*, con l'ausilio delle estensioni di debugging per Python. In generale sono sempre stati utilizzati strumenti che seguono la filosofia *Open Source*, di conseguenza questa tesi ed il codice sviluppato saranno entrambi disponibili liberamente sul profilo GitHub [3] del sottoscritto sotto licenza GPL3 e MIT rispettivamente.

I moduli e le librerie Python che sono state utilizzate sono elencate di seguito:

- random – modulo standard che implementa funzioni per la generazione di numeri pseudo-randomici
- multiprocessing – modulo standard utilizzato per implementare il supporto di parallelizzazione e gestione della concorrenza
- sys – modulo standard per accedere ad alcune variabili o funzioni di sistema
- time – modulo standard usato per accedere a funzioni relative al tempo, come l'accesso all'ora attuale, o per la misurazione dei tempi di esecuzione
- math – modulo standard che permette l'accesso a funzioni ottimizzate per il calcolo matematico
- copy – modulo standard utilizzato per copiare in profondità degli oggetti, con un nuovo puntatore all'oggetto
- * graphviz – modulo esterno per la visualizzazione ed il salvataggio su file dei grafi da formato graphviz[2]
- * ete3 – modulo esterno utilizzato come base di appoggio per le funzioni essenziali relative ai nodi di un albero, come la ricerca dei nodi e l'aggiunta o rimozione di essi
- * networkx – modulo esterno sfruttato per il calcolo del *maximum weight matching*

* Moduli esterni

Lo sviluppo e la fase di testing è avvenuto su una macchina dotata di processore *i7-6500U* (2.50 GHz, 4MB Cache), 8GB RAM DDR3L (1600 MHz).

3.2.1 Dati utilizzati

Per poter testare l'algoritmo ed il codice sviluppato su di esso è essenziale avere dei dati sia veri che simulati. A questo proposito sono stati utilizzati i dati simulati dal laboratorio di appartenenza del progetto, AlgoLab. Nelle seguenti sezioni verranno analizzati i dati relativi al file simulato presente nella directory del progetto `data/simulatex/exp1/sim1_scs.txt`.

[1] Un linguaggio di programmazione simile a Python, ma con il vantaggio di avere velocità simili a quelle ottenute da C

[2] Strumento che permette di disegnare rappresentare dei grafi utilizzando la notazione DOT, un linguaggio che descrive la struttura di grafi generici

3.3 Adattamento del problema a Particle Swarm Optimization

Una delle principali sfide in questo progetto è stata di riuscire a trovare un'interpretazione valida ed efficacie adatta alla tecnica euristica scelta, appunto il Particle Swarm Optimization, il cui funzionamento ed algoritmo sono descritti dettagliatamente nella sottosezione 1.5.3. Il modello più immediato da adattare al problema è quello di associare una particella dello swarm ad un albero sul quale vengono effettuate delle operazioni. Queste operazioni saranno ciò che determina il "movimento" della particella nello spazio. Lo swarm non è quindi altro che l'insieme degli alberi. L'implementazione può essere suddivisa in tre fasi:

1. Inizializzazione
2. Calcolo del movimento ed aggiornamento della particella
3. Aggiornamento della particella migliore dello swarm e della soluzione migliore della particella

3.3.1 Inizializzazione

Possiamo considerare una particella dello swarm come un albero, la cui posizione è determinata dalla configurazione dei suoi nodi. L'inizializzazione viene effettuata randomizzando la topologia di un albero binario T con m nodi, uno per ogni mutazione, con una funzione randomica[3]. In questo modo, viene ottenuta una topologia simile a quella rappresentata nella Figura 3.5. Il metodo di generazione dell'albero binario è ripreso da quello implementato su SASC, ed è descritto nell'Algoritmo 6.

Algoritmo 6: RandomTreeInit

```
1  m = numero di mutazioni r = radice dell'albero
2  tree = [1, ..., m] ▷ Vettore con tutti i nodi dell'albero
3  random.shuffle(tree) ▷ Il vettore dei nodi viene randomizzato
4  nodes ← [r]
5  append_node ← 0
6  while i < m do
7      newNode ← new Node(name = mutation_name(m), parent =
         nodes[append_node], mutationid = tree[i])
8      nodes.append(newNode)
9      i ← i + 1
10     if i < m then
11         newNode ← new Node(name = mutation_name(m), parent =
             nodes[append_node], mutationid = tree[i])
12         nodes.append(newNode)
13     append_node ← append_node +1
14     i ← i + 1
15 return r
```

La complessità di questo algoritmo è facilmente espressa da $O(m)$, poiché viene creato un nodo per ogni mutazione.

[3]In realtà la funzione è del tipo pseudo-randomica, utilizzando il generatore *Mersenne Twister* [9], ma non avendo problemi dal punto di vista della sicurezza o della riproducibilità, è stato pervenuto che per i nostri scopi è più che valido e sufficiente

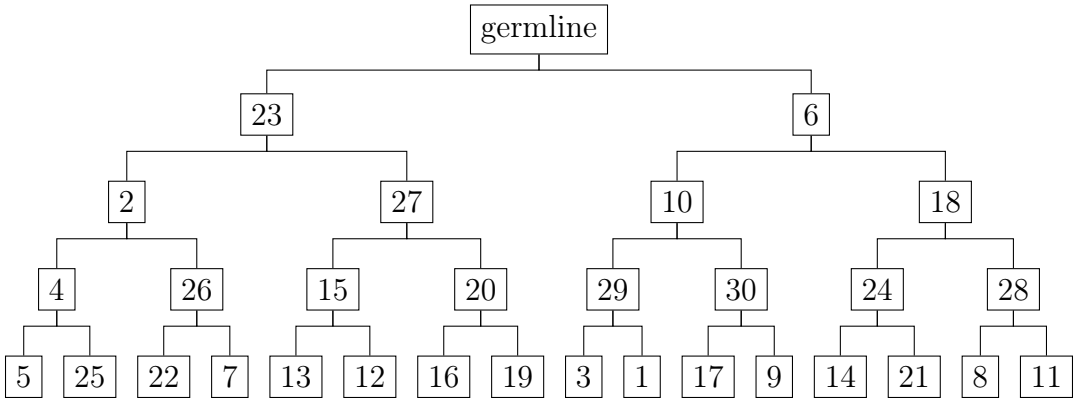


Figura 3.5: Esempio di topologia iniziale con $m = 30$

3.3.2 Calcolo del movimento di una particella

La seconda fase è il calcolo della velocità con la quale una particella si muove rispetto a p_i e g, cioè l'albero migliore che ha avuto la particella fino ad ora, e l'albero migliore in tutto lo swarm. Come parametro di paragone è definita la likelihood logaritmica descritta nell'Equazione 2.2.

Questo step è stato uno dei problemi principali da affrontare sin dal principio del progetto. Non è immediato trovare un modello diretto che rappresenti la velocità e la direzione di una particella verso gli alberi migliori p_i e g, data la natura non lineare del problema. Sono state, dunque, introdotte diverse metriche (o assenza di tali) per cercare di definire al meglio questo parametro in maniera tale che aderisse al meglio all'algoritmo scelto, quindi PSO. Nelle seguenti sottosezioni verranno descritti tali esperimenti, con risultati e considerazioni del caso.

La complessità della solo ricerca di un modello per il parametro della velocità ha portato a tralasciare, almeno temporaneamente, altri fattori presenti nel PSO originale, quali ad esempio l'*attrito* (ω) ed i *learning factors* (ϕ_p, ϕ_g), fattori moltiplicativi utili per velocizzare o rallentare il comportamento di scalata della collina dell'algoritmo.

3.3.2.1 Assenza del parametro di velocità

Nei momenti iniziali di questo progetto, come è stato descritto precedentemente, trovare una corrispondenza congeniale ed adeguata all'idea di *velocità* del PSO è stato impegnativo. Al fine comunque di poter dare un via al lavoro, una delle prime metriche adottate di velocità è stata la vera e propria assenza di tale metrica. I risultati descritti nella Tabella 3.1 possono sembrare promettenti, dato che comunque provano la funzionalità del programma, e che la likelihood aumenta. Quello che i dati non ci dicono è però qualcosa che possiamo intuire dall'intrinseco comportamento dell'assenza della velocità come metrica: siamo di fronte ad un semplice algoritmo di highest hill climbing, descritto nella sottosezione 1.5.1. Quello che succede quindi è che si cerca di migliorare l'algoritmo al primo miglioramento individuato, in questo caso corrisponde ad ogni volta che si trova una likelihood migliore. Questo può sembrare un ottimo risultato, ma è in realtà un problema. L'estrema e ripida scalata rischia di incastrare la ricerca in un ottimo locale, peggiorando considerevolmente le possibilità di trovare un albero filogenetico di **buona qualità**. È importante sottolineare la *bontà* del risultato, e non il basso valore della *likelihood*, in quanto questo è solo un valore indicativo della verosomiglianza dell'albero con i dati a nostra disposizione, ma non dell'effettiva qualità della loro rappresentazione. È molto meglio quindi cercare di trovare un albero filogenetico con una qualità migliore che quello con la likelihood più elevata.

L'algoritmo risultante per il calcolo della posizione della particella risulta quindi essere il

seguente:

Algoritmo 7: ParticleIteration

```
r ← random()
if r < .33 then
    tree ← p_i
else if r < .66 then
    tree ← g
else
    tree ← x_i
execute_random_operation(tree)
```

Particelle	Iterazioni	Likelihood Iniziale	Likelihood Migliore	CPU Time (s)
5	20	-8865.28530	-5807.87168	8.622138
10	20	-8865.28530	-3096.03633 (+87.59%)	17.478406 (+102.67%)
50	20	-8341.99269	-2258.47350 (+37.09%)	88.392956 (+405.73%)
85	20	-8341.99269	-1681.11579 (+34.34%)	153.431512 (+73.58%)
100	20	-8341.99269	-1650.24923 (+1.87%)	193.255694 (+25.96%)
150	20	-8163.91004	-1199.30190 (+37.60%)	275.721155 (+42.67%)
200	20	-7944.95031	-1173.53898 (+2.20%)	370.858453 (+34.50%)

Tabella 3.1: Risultati ottenuti con assenza della velocità

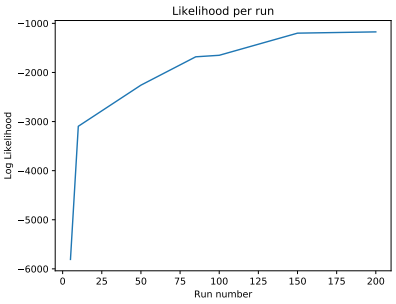


Figura 3.6: Grafico della likelihood sui vari parametri delle particelle con l'assenza della velocità

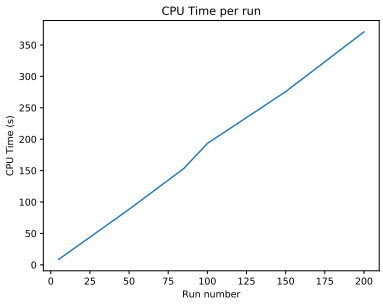


Figura 3.7: Grafico del tempo sui vari parametri delle particelle con l'assenza della velocità

3.3.2.2 Prima metrica per la distanza tra filogenie

Non avere un parametro della velocità è quindi un problema abbastanza importante, e preclude il poter continuare a sviluppare il progetto sotto le condizioni dello sviluppo di un algoritmo genetico di tipo PSO. Ci si è quindi concentrati sullo studio di una metrica che permetta di trovare la distanza tra due alberi filogenetici. Il risultato di tale lavoro è stata la formulazione dell'Equazione 3.4. Per il *max_weight_matching* (descritto nella sottosottosezione 1.6.3.1) si assume che il grafo $G = (V, E)$ sia formato da tutti i nodi del primo albero, T_1 e del secondo albero, T_2, in maniera tale da creare un *grafo bipartito*[4], e la funzione peso $w : E \to \mathbb{N}$ indica il numero di mutazioni comuni tra due clade (sottosezione 1.4.2). Il max weight matching

[4]Un grafo bipartito è un grafo tale che l'insieme dei suoi vertici si può partizionare in due sottoinsiemi tali che ogni vertice di una di queste due parti è collegate solo a vertici dell'altra

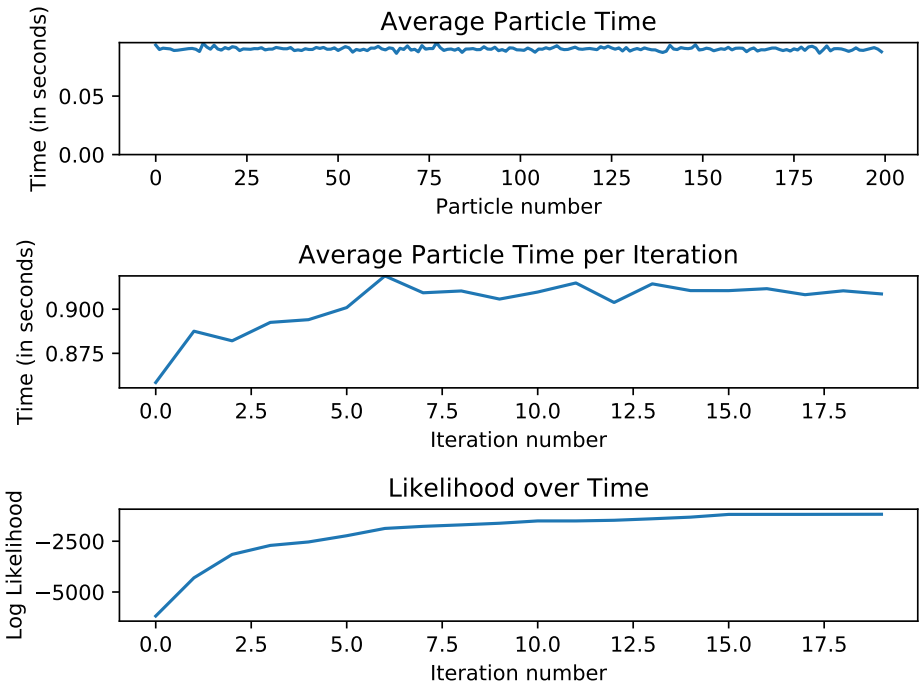


Figura 3.8: Grafici sui tempi e l'andamento della likelihood con assenza della velocità

restituisce un arco il cui peso è il massimo rispetto a quello di tutti gli altri archi presenti nel grafo bipartito. Il risultato della formula dovrebbe risultare 0 quando T_1, T_2 rappresentano lo stesso albero, mentre > 0 quando differiscono.

$$dist(T_1, T_2) = mutations - max\_weight\_matching(T_1, T_2) \tag{3.3}$$

Un'analisi più approfondita della formula fa però emergere un problema. La somma delle mutazioni comuni calcolata dalla funzione w cresce all'aumentare della profondita in cui si trova il nodo nell'albero, poiché acquisisce più mutazioni. Un esempio è rappresentato nella Figura 3.13.

Questo risulta in un calcolo della distanza che può risultare negativo, ed è quindi stato necessario adattare la metrica.

3.3.2.3 Seconda metrica per la distanza tra filogenie

L'analisi effettuata precedentemente ha portato alla formulazione di una nuova metrica (Equazione 3.4), stavolta rivelatasi corretta. D'ora in avanti verrà utilizzata questa metrica per la distanza tra due filogenie.

$$dist(T_1, T_2) = max\{\sum_{x \in T_1} m(x), \sum_{x \in T_2} m(x)\} - max\_weight\_matching(T_1, T_2) \tag{3.4}$$

L'algoritmo utilizzato per il maximum weight matching è quello presente all'interno della libreria networkx, richiamabile con `networkx.algorithms.matching.max_weight_matching(G)`, ed ha come complessità generale $O(n^3)$. A questo si vanno a sommare i tempi per il calcolo delle mutazioni in comune, che risulta essere $O(n^2 + nm)$ ed il calcolo del numero di mutazioni di un albero $O(n \cdot m)$. In totale, la complessità dell'algoritmo per il calcolo della distanza risulta essere $O(n^3 + n^2 + nm)$.

3.3.2.4 Hill climbing con considerazione della distanza

Ora che è stata definita una metrica per la distanza, è possibile iniziare a ragionare in maniera più analoga sulla velocità rispetto a quanto non si faceva prima. Si è pensato quindi di utilizzare

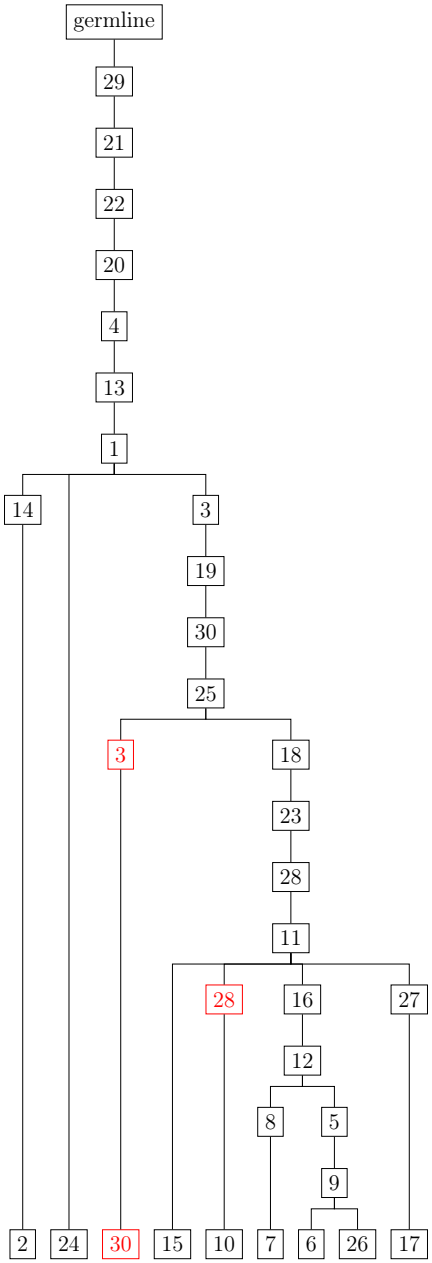


Figura 3.9: Miglior albero inferito con assenza della velocità

la nuova metrica introdotta per calcolare la distanza tra la particella attuale x_i e le due particelle migliori p_i e g, e scegliere il clade con meno mutazioni in comune tra l'albero meno distante tra i due. Il clade scelto randomicamente viene poi inserito randomicamente come figlio di un nodo dell'albero attuale, e le mutazioni duplicate rimosse. Nella teoria questo avrebbe dovuto portare ad un graduale avvicinamento della particella attuale verso l'ottimo, nella pratica l'implementazione seguita è risultata, ancora una volta, in un algoritmo di hill climbing. Eseguendo gli stessi test effettuati nella sottosottosezione 3.3.2.1 si ottengono i risultati rappresentati nella

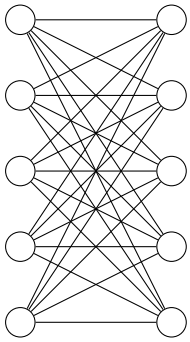


Figura 3.10: Esempio di grafo bipartito

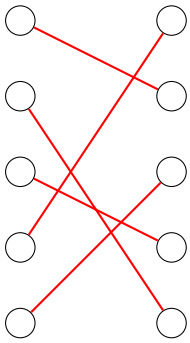


Figura 3.11: Esempio di grafo bipartito con max weight matching

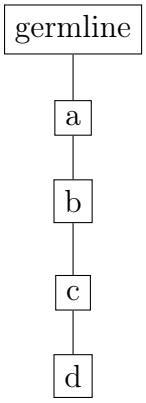


Figura 3.12: Somma delle mutazioni acquisite per $max(d) = 4$

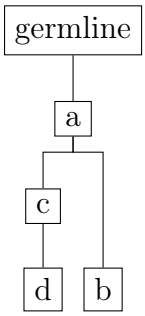


Figura 3.13: Somma delle mutazioni acquisite per $max(d) = 3$

Tabella 3.2.

Algoritmo 8: HillClimbDist

```
distance_particle ← dist(x_i, p_i)
distance_swarm ← dist(x_i, g)
max_weight_particle_clade ← max_weight_clade(dist(x_i, p_i))
max_weight_swarm_clade ← max_weight_clade(dist(x_i, p_i))
r ← random()
if r < .25 then
    tree ← p_i
else if r < .5 then
    tree ← g
else if r < .75 then
    tree ← x_i
else
    if distance_swarm > distance_particle then
        clade_to_attach ← max_weight_swarm_clade
    else
        clade_to_attach ← max_weight_particle_clade
    tree ← RandomTreeInit()
    attach_clade_and_fix_for_losses(tree, clade_to_attach)
execute_random_operation(tree)
```

Si può evidenziare dal test effettuato come i tempi siano quasi duplicati, quasi triplicati, relativamente al fatto che vengono effettuati dei test sulla distanza che incidono negativamente sulle prestazioni. È però da notare che questo aumento dei tempi non coincide con un miglioramento

Particelle	Iterazioni	Likelihood Iniziale	Likelihood Migliore	CPU Time (s)
5	20	-8865.28530	-7267.75496	19.66558
10	20	-8865.28530	-3207.95706 (+126.55%)	43.66173 (+122.02%)
50	20	-8341.99268	-2773.96311 (+15.65%)	239.89298 (+449.44%)
85	20	-8341.99268	-1664.407183 (+66.66%)	430.08543 (+79.28%)
100	20	-8341.99268	-1720.876536 (-3.28%)	602.24159 (+40.03%)
150	20	-8163.91004	-1594.589690 (+7.92%)	825.43232 (+37.06%)
200	20	-7944.95031	-1360.172665 (+17.23%)	1147.3371 (+39.00%)

Tabella 3.2: Risultati ottenuti con considerazione della distanza

sostanziale della ricerca dell'ottimo da parte dell'algoritmo, ma anzi, sia in media peggiorata. Questo può essere causa di vari fattori, tra cui la possibilità che l'algoritmo si comporti allo stesso modo di quello presentato nella sottosottosezione 3.3.2.1, ma l'introduzione di un nuovo passaggio dell'hill climbing abbia rallentato e peggiorato la scalata. Un esempio dell'albero inferito con 200 particelle è rappresentato nella Figura 3.17, mentre i dati relativi all'andamento del tempo di calcolo e della likelihood nel corso delle varie iterazioni sono rappresentati in Figura 3.20.

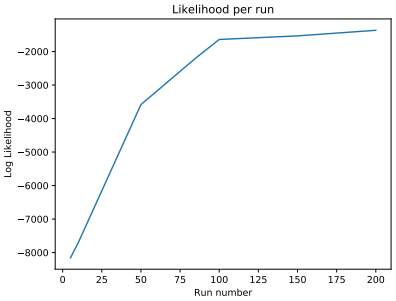


Figura 3.14: Grafico della likelihood sui vari parametri delle particelle con considerazione della distanza

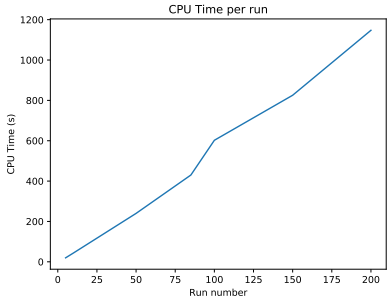


Figura 3.15: Grafico del tempo sui vari parametri delle particelle con considerazione della distanza

3.3.2.5 Clade casuali tra p_i e g come avvicinamento all'ottimo

Fin'ora nel progetto sono stati implementati algoritmi che assomigliavano per la natura del loro comportamento più ad una scalata della collina (hill climbing) che ad un PSO. È stato quindi un passo fondamentale quello di abbandonare totalmente la copia completa delle particelle migliori p_i e g, e di operare in maniera più sistematica. La metrica della distanza rimane invariata, ma è stata introdotta una primitiva logica di *velocità*. Ora l'Algoritmo 9 ad ogni iterazione calcola la distanza tra la particella corrente x_i, p_i e g. Utilizzando le distanze appena ottenute, vengono ricavate due liste di nodi, una per p_i ed una per g, i cui elementi hanno la caratteristica di avere un numero massimo di mutazioni minore alla loro distanza relativa alla particella corrente. Questo perché si è pensato che più la particella è distante da un ottimo, più nodi bisogna copiare

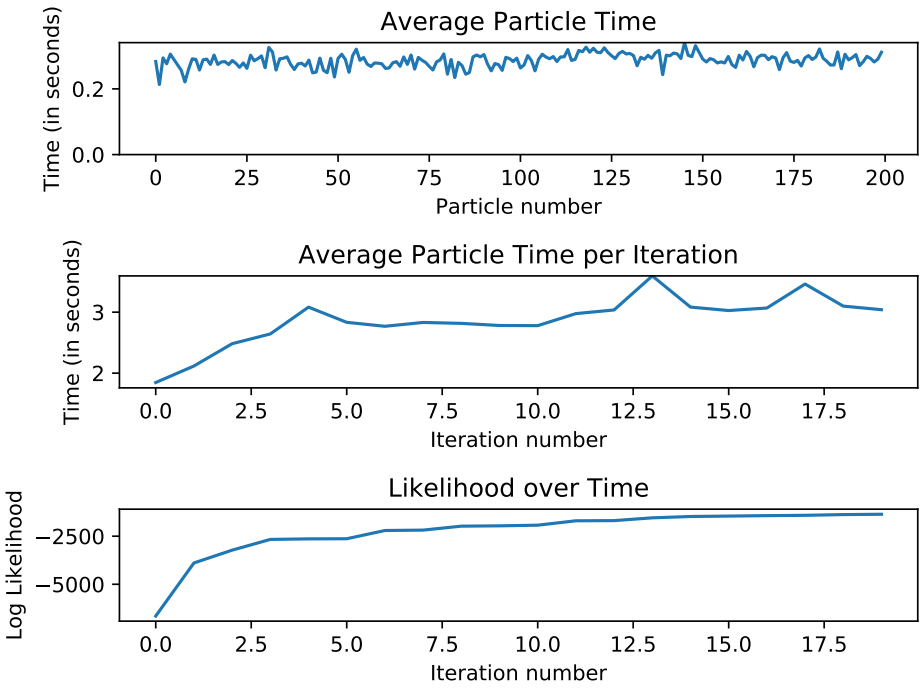


Figura 3.16: Grafici sui tempi e l'andamento della likelihood con il passare del tempo considerando la distanza

da quest'ultima affinché ci si possa avvicinare.

Algoritmo 9: CasualClades

```
1  distance_particle ← dist(x_i, p_i)
2  distance_swarm ← dist(x_i, g)
3  particle_clades ← get_clades_max_nodes(distance_particle)
4  swarm_clades ← get_clades_max_nodes(distance_swarm)
5  max_clades ← mc
6  if distance_particle < max_clades and distance_swarm < max_clades or
     len(particle_clades) == 0 and len(swarm_clades) == 0 then
7      tree ← x_i
8  else
9      clades_attach ← ()
10     if distance_particle == 0 or len(particle_clades) == 0 then
           ▷ Same tree as the best in current particle
11         pick random max_clades from swarm_clades
12     else if distance_swarm == 0 or len(swarm_clades) == 0 then
           ▷ Same tree as the best in swarm
13         pick random max_clades from particle_clades
14     tree ← x_i
15     for clade in clades_attach do
16         clade_to_attach ← random node from tree
17         attach_clade_and_fix(clade_to_attach, clade)
18     fix_for_losses(tree)
```

Analizzando i risultati ottenuti nella tabella Tabella 3.3, si può intuire come l'algoritmo sia migliorato sostanzialmente rispetto all'approccio descritto nella sottosottosezione 3.3.2.4: i tempi sono diminuiti in rapporto al numero di particelle ed alla likelihood ottenuta, ed ora le particelle

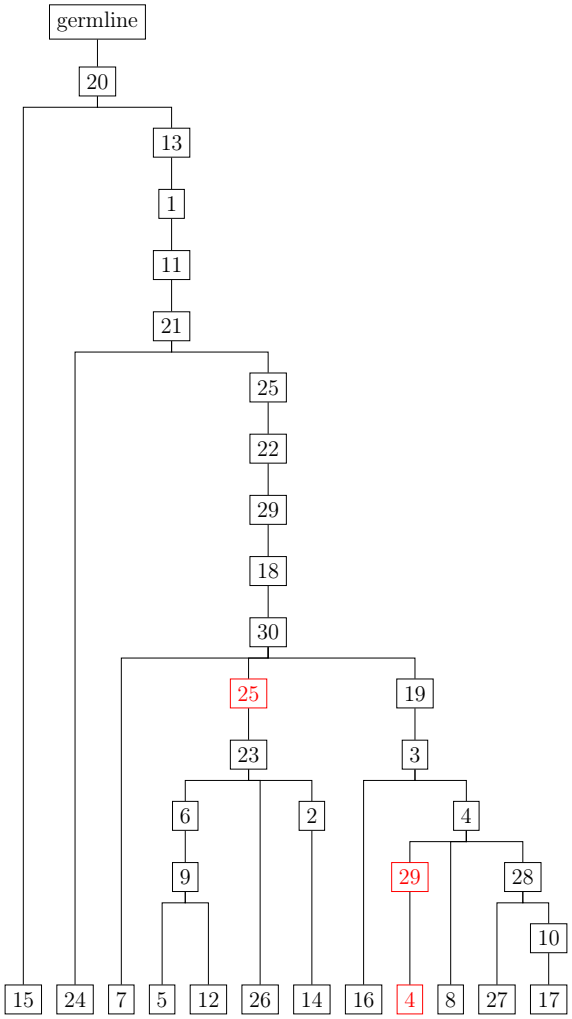


Figura 3.17: Albero inferito con la considerazione della distanza

si spostano effettivamente in maniera coerente rispetto al PSO. Si può chiaramente però notare come la likelihood finale per ogni iterazione si allontani sempre di più rispetto all'ottimo. Questo non è da considerarsi come un vero e proprio problema, poiché come è stato evidenziato nella sottosottosezione 3.3.2.1, è più importante la *bontà* del risultato, ed è quindi più importante permettere all'algoritmo di esplorare lo spazio di ricerca in maniera più ampia a discapito della velocità con la quale arriva all'ottimo vero e proprio.

Particelle	Iterazioni	Likelihood Iniziale	Likelihood Migliore	CPU Time (s)
5	20	-8865.28530	-4972.52779	21.037824
10	20	-8865.28530	-5267.6851 (-5.60%)	43.931567 (+108.82%)
50	20	-8341.99268	-2735.442262 (+92.57%)	230.71440 (+425.17%)
85	20	-8341.99268	-2308.64967 (+18.49%)	408.0308 (+76.86%)
100	20	-8341.99268	-1981.461396 (+16.51%)	487.68030 (+19.52%)
150	20	-8163.91004	-2131.475215 (-7.04%)	681.9648 (+39.84%)
200	20	-7944.95031	-1844.15747 (+15.58%)	974.8296 (+42.94%)

Tabella 3.3: Risultati ottenuti utilizzando clade casuali tra le particelle migliori per l'avvicinamento

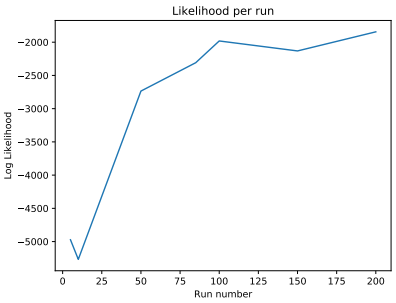


Figura 3.18: Grafico della likelihood utilizzando clade casuali tra le particelle migliori per l'avvicinamento

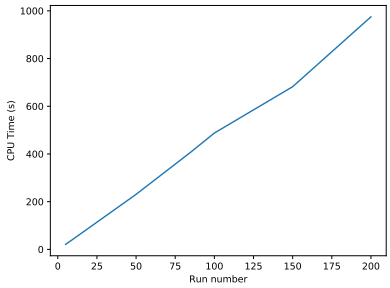


Figura 3.19: Grafico del tempo utilizzando clade casuali tra le particelle migliori per l'avvicinamento

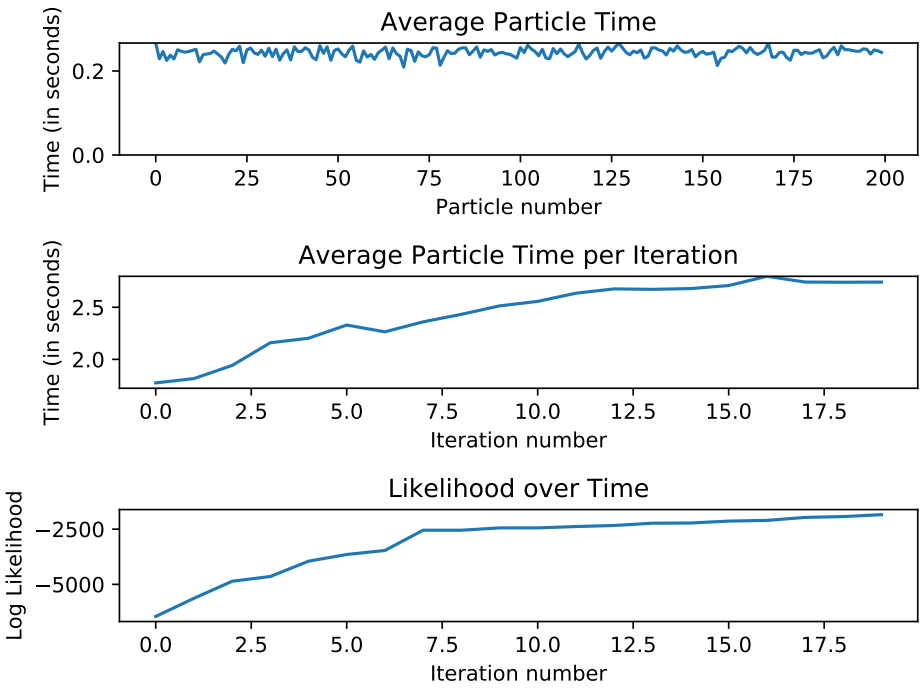


Figura 3.20: Grafici sui tempi ed il miglioramento della likelihood con il passare del tempo con il metodo nella sottosottosezione 3.3.2.5

3.3.3 Aggiornamento di p_i e g

Alla fine della fase del **calcolo del movimento ed aggiornamento della particella**, viene calcolata la *likelihood logaritmica* dell'albero appena inferito, e se questa è superiore al valore migliore della particella corrente, allora viene sostituito. Se ciò avviene, è possibile che il valore possa essere superiore anche a quello migliore dello swarm, ed in tal caso andrà a sostituirlo.

3.4 Considerazioni aggiuntive

Al fine di poter eseguire delle analisi e considerazioni sui risultati ottenuti sono stati fatti diversi accorgimenti sul progetto, di seguito analizzati.

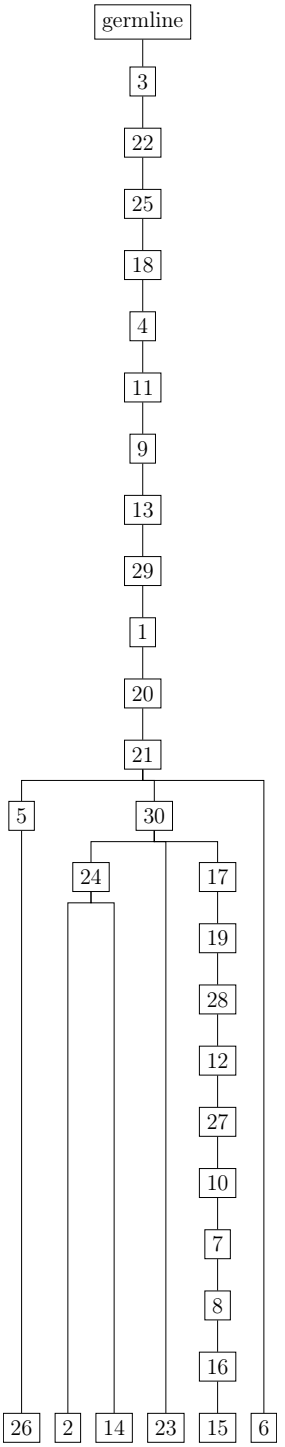


Figura 3.21: Albero inferito con il metodo nella sottosottosezione 3.3.2.5

3.4.1 Riproducibilità

Durante lo sviluppo di un software può capitare di dover rappresentare una situazione, come un bug, una feature, o un risultato particolare. Questa necessità dà luogo al problema della *riproducibilità*, che implica la possibilità allo sviluppatore o a terzi di poter eseguire il software con parametri comuni al fine di ottenere gli stessi risultati e situazioni. Questo obiettivo è stato raggiunto con diversi accorgimenti, come l'elevata flessibilità di configurazione da linea di comando (descritta in dettaglio nel sottosezione 3.4.2) e la possibilità di poter manipolare gli

eventi aleatori fissando un *seed*[5].

3.4.2 Guida allo strumento nello stato attuale

Lo strumento sviluppato ed aggiornato è disponibile su GitHub al seguente indirizzo:

https://github.com/IAL32/pso-cancer-evolution.

Allo stato attuale, lo strumento accetta i seguenti parametri dalla linea di comando:

- `-infile <infile>`
  file di input contenente la matrice iniziale sulla quale voler fare le inferenze
- `-mutfile <mutfile>`
  file di input contenente la lista dei nomi delle mutazioni da assegnare. Se non è fornito, viene generata una lista numerica
- `-particles <particles>`
  numero di particelle da utilizzare per il PSO
- `-iterations <iterations>`
  numero di iterazioni al quale fermarsi (*condizione di terminazione*)
- `-alpha <alpha>`
  frequenza di falsi negativi (default: 0.15)
- `-beta <beta>`
  frequenza di falsi positivi (default: 0.00001)
- `-k <k>`
  parametro per il modello di Dollo-k (default: 3)
- `-seed <seed>`
  seed da utilizzare per poter riprodurre errori e situazioni (default: -1, random)

Un esempio di esecuzione del programma da linea di comando è il seguente:

```
python main.py --infile "data/scg_gawad/pat4.txt" --mutfile "data/scg_gawad/
    ↪ pat4_mut.txt" --particles 500 --iterations 50 --alpha=0.25 --beta
    ↪ =0.00001 --k=3 --seed=1
```

È da notare che tutte le librerie vanno precedentemente installate in maniera appropriata all'interno del proprio ambiente di sviluppo.

3.4.3 Parallelizzazione

Tutti i test effettuati in questo capitolo sono stati effettuati seguendo l'algoritmo del PSO, cioè in maniera iterativa. È stato possibile implementare un sistema di parallelizzazione dei processi. Ogni processo può eseguire un'iterazione di una particella per volta, riducendo drasticamente i tempi di esecuzione.

Non viene però utilizzata la tecnica di parallelizzazione durante i test, poiché questa aggiunge un fattore di aleicità collegato alla terminazione anticipata dei processi. Questo fattore randomico è anche il motivo per cui, durante lo svolgimento del progetto, la modalità di parallelizzazione era disattivata in fase di debugging: non è possibile riprodurre un fenomeno quando si suddivide il workload su più thread, poiché il risultato è estremamente dipendente dalla terminazione anticipata o tardiva di un'operazione rispetto ad un'altra.

[5]Un numero, o vettore, utilizzato per inizializzare un generatore pseudo-casuale di numeri, come quello utilizzato dalla libreria *random* di Python

È inoltre da notare che nessun ambiente di sviluppo al momento è adatto al debugging di programmi con esecuzioni in parallelo, poiché esso comporterebbe riuscire a gestire output e gestione della memoria estremamente avanzato e complesso.

Capitolo 4

Risultati e conclusioni

4.1 Risultati su dati simulati

I test nel capitolo precedente sono stati effettuati su dati simulati generati dal laboratorio di ricerca AlgoLab, sede dello stage, per lo strumento SASC (sezione 2.4). Di questi dati è conosciuta la filogenia di partenza, rappresentata in Figura 4.1. Per la natura aleatoria e non deterministica della ricerca dell'euristica adottata, non è possibile garantire che una volta raggiunto un ottimo (locale o globale) questo corrisponda alla filogenia di partenza. In aggiunta, nei test che seguono in questo capitolo viene utilizzata la tecnica della parallelizzazione per ridurre i tempi di esecuzione.

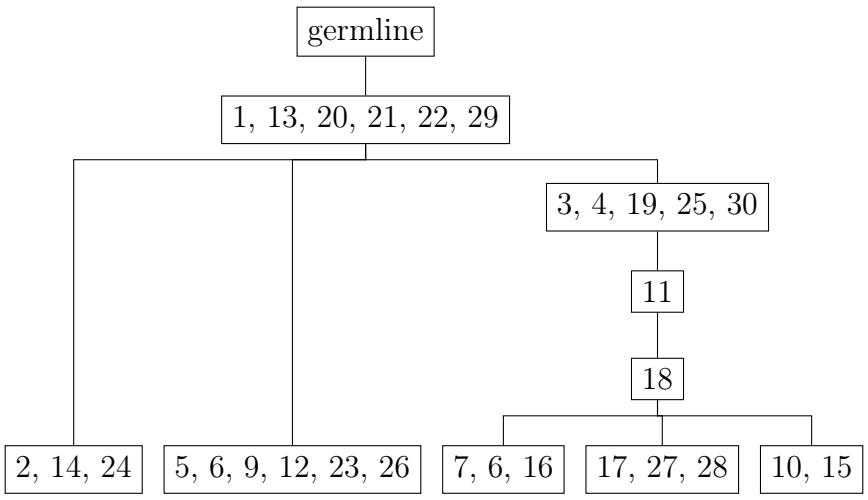


Figura 4.1: Filogenia generata di test

4.1.1 Modello di Dollo-k con $k = 0$

Avendo a disposizione una filogenia della quale si conosce la struttura finale, si è ritenuto utile eseguire lo strumento utilizzando il parametro k del modello di Dollo-k con valore 0, poiché l'albero di partenza non presenta back mutation. La Tabella 4.1 dei risultati mostra un'evidente peggioramento, a pari di parametri, dell'ultimo algoritmo sviluppato.

Tecnica	Tempo impiegato (s)	Likelihood Iniziale	Likelihood Finale
Assenza velocità, hill	2216	-7944.950318	-677.457346
Metrica distanza, hill	3742 (+68.86%)	-7944.950318	-689.933905 (-1.80%)
Clade casuali	4159 (+11.14%)	-7944.950318	-1121.068341 (-39.57%)

Tabella 4.1: Tabella di paragone delle tecniche utilizzate, $k = 0$

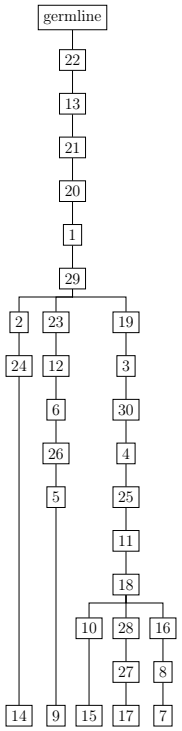


Figura 4.2: Albero inferito senza parametro della velocità, stile hill climbing, $k = 0$

4.1.2 Modello di Dollo-k con $k = 3$

Nella Tabella 4.2 sono messe a paragone le tecniche adottate nel capitolo precedente, quindi utilizzando come parametri di esecuzione dell'algoritmo: $\alpha = 0.25, \beta = 1 \cdot 10^{-5}, k = 3, seed = 1$, $particelle = 500$, $iterazioni = 50$. In particolare viene testata la performance sotto le condizioni del modello di Dollo-k con $k > 0$.

Tecnica	Tempo impiegato (s)	Likelihood Iniziale	Likelihood Finale
Assenza velocità, hill	2408	-7944.950318	-694.092758
Metrica distanza, hill	3890	-7944.950318	-790.961096
Clade casuali	3744	-7944.950318	-1123.840910

Tabella 4.2: Tabella di paragone delle tecniche utilizzate, $k = 3$

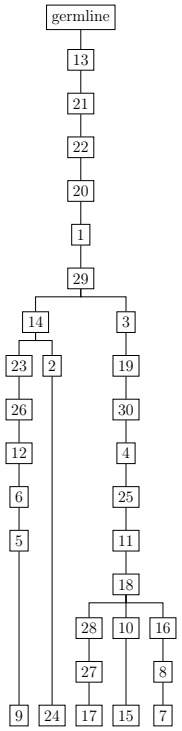


Figura 4.3: Albero inferito con la metrica della distanza, stile hill climbing, $k = 0$

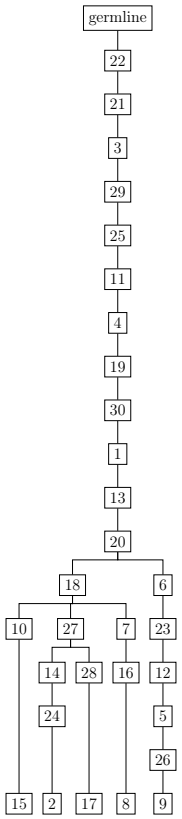


Figura 4.4: Albero inferito con la metrica della distanza e clade casuali, $k = 0$

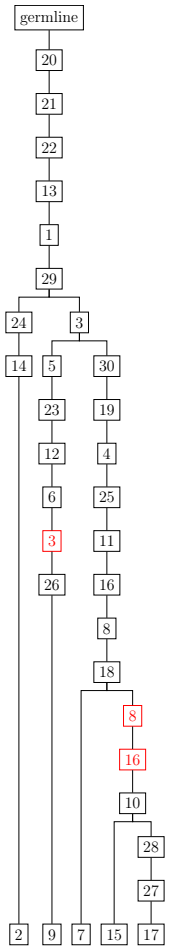


Figura 4.5: Albero inferito senza parametro della velocità, stile hill climbing, $k = 3$

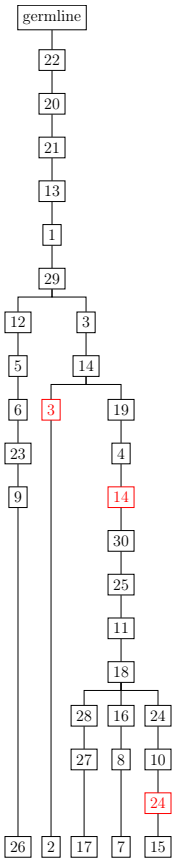


Figura 4.6: Albero inferito con la metrica della distanza, stile hill climbing, $k = 3$

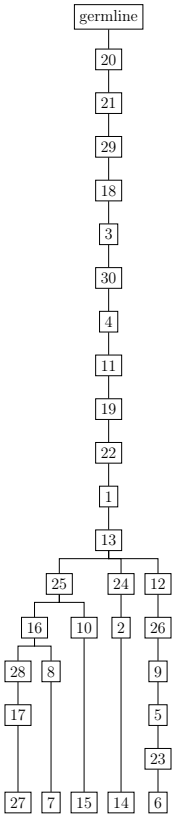


Figura 4.7: Albero inferito con la metrica della distanza e clade casuali, $k = 3$

Capitolo 5

Prospettive future

Sebbene si tratti di uno strumento ancora in fase embrionale, esistono tutti i presupposti per poter portare avanti il progetto al di là del contesto di stage. Ci sono molte vie ancora da esplorare, e tecniche da sperimentare.

Una delle sfide principali allo attuale del progetto è il tempo di calcolo dovuto agli algoritmi di operazioni sull'albero inferito. L'algoritmo potrebbe ad esempio essere migliorato notevolmente introducendo dei calcoli matriciali. Gli alberi inferiti possono infatti essere pensati come delle matrici $n \times m$, le cui righe subiscono delle modifiche in teoria prevedibili. Inoltre, lo strumento potrebbe essere riscritto totalmente in un linguaggio più veloce e performante, come *C++* oppure *Cython*[1].

Potrebbero inoltre essere utilizzati algoritmi di ricerca in concomitanza con il PSO, come uno studio sul design di circuiti analogici integrati [12] che ha utilizzato l'algoritmo del Simulated Annealing e il PSO.

Un'ulteriore passo in avanti potrebbe essere il tenere traccia delle likelihood passate e confrontarle tra i vari test, in maniera tale da poter verificare se e come delle inferenze vengono generate nello stesso modo, e quando.

Infine, sarebbe di essenziale aiuto creare un'interfaccia performante ed interattiva che permetta di integrare le varie tecniche utilizzate, e la visualizzazione in diretta delle operazioni subite dagli alberi utilizzati dall'algoritmo.

[1] Un linguaggio di programmazione che mira ad unire i vantaggi di Python con la performace di C

Elenco delle figure

Elenco delle tabelle

Bibliografia

[1] *Cancer Statistics*. URL: https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics.

[2] Simone Ciccolella et al. «Inferring Cancer Progression from Single-cell Sequencing while Allowing Mutation Losses». In: *bioRxiv* (2018). DOI: 10.1101/268243.

[3] *GitHub Profile - IAL32*. URL: https://github.com/IAL32.

[4] Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition - DNA Replication*. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9940/.

[5] Gerhard Jäger. «Global-scale phylogenetic linguistic inference from lexical resources». In: *Scientific Data* 5 (ott. 2018), 180189 EP -. DOI: 10.1038/sdata.2018.189.

[6] Katharina Jahn, Jack Kuipers e Niko Beerenwinkel. «Tree inference for single-cell data». In: *Genome Biology* 17.1 (mag. 2016), p. 86. ISSN: 1474-760X. DOI: 10.1186/s13059-016-0936-x.

[7] J. Kennedy e R. Eberhart. «Particle swarm optimization». In: vol. 4. Nov. 1995, 1942–1948 vol.4. DOI: 10.1109/ICNN.1995.488968.

[8] Clemens Lakner et al. «Efficiency of Markov Chain Monte Carlo Tree Proposals in Bayesian Phylogenetics». In: *Systematic Biology* 57.1 (feb. 2008), pp. 86–103. ISSN: 1063-5157. DOI: 10.1080/10635150801886156.

[9] Makoto Matsumoto e Takuji Nishimura. «Mersenne Twister: A 623-dimensionally Equidistributed Uniform Pseudo-random Number Generator». In: *ACM Trans. Model. Comput. Simul.* 8.1 (gen. 1998), pp. 3–30. ISSN: 1049-3301. DOI: 10.1145/272991.272995.

[10] Max Roser e Hannah Ritchie. *OurWorldInData - Cancer*. Lug. 2015. URL: https://ourworldindata.org/cancer.

[11] Giorgio Stanta e Serena Bonin. «Overview on Clinical Relevance of Intra-Tumor Heterogeneity». In: *Frontiers in Medicine* 5 (2018), p. 85. ISSN: 2296-858X. DOI: 10.3389/fmed.2018.00085.

[12] Tiago Oliveira Weber e Wilhelmus A. M. Van Noije. «Design of Analog Integrated Circuits using Simulated Annealing/Quenching with Crossovers and Particle Swarm Optimization». In: *Simulated Annealing*. A cura di Marcos de Sales Guerra Tsuzuki. Rijeka: IntechOpen, 2012. Cap. 11. DOI: 10.5772/50384.

[13] Hamim Zafar et al. «SiFit: inferring tumor trees from single-cell sequencing data under finite-sites models». In: *Genome biology* 18.1 (2017), p. 178. DOI: 10.1186/s13059-017-1311-2.