SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**FAKULTET ELEKTROTEHNIKE I RAČUNARSTVA**

**DOKUMENTACIJA**

# Pronalazak mutacija pomoću treće generacije sekvenciranja

*Kseniia Ikonnikova i Heidi Sokolovski*

Voditelj: *Krešimir Križanović*

Zagreb, svibanj, 2023.

## Sadržaj

# 1. Uvod

Treća generacija sekvenciranja je revolucionirala područje bioinformatike. Prethodne generacije su generirale kratka i precizna očitanja. Za razliku od njih, očitanja treće generacije su duga i obuhvaćaju velike dijelove molekule DNA. Ta tehnologija značajno je poboljšala sposobnost točne identifikacije i karakterizacije različitih mutacija u genomu.

U ovom radu se opisuju algoritmi za pronalazak mutacija pomoću treće generacije sekvenciranja i vizualiziraju na jednostavnom primjeru. Osim toga se proučava vrijeme izvođenja i utrošak memorije te uspoređuje točnost rezultata ove implementacije i izvorne.

# 2. Opis algoritama

## 2.1 Generiranje minimizera

Za pronalazak mutacija u genomu koriste se minimizeri. Minimizeri su manji dijelovi sekvence duljine *k* poznati kao *k*-meri. Biraju se svakih *w* *k*-mera. Od njih se odabere jedan abecedno minimalan *k*-mer te je to minimizer. Dijele se na unutarnje i krajnje minimizere na početku i kraju niza. Osjetljivi su na umetanja i brisanja [1].

Prvi algoritam je zaslužan za stvaranje potrebnih minimizera. On se primjenjuje na referentnom genomu i na svakom pojedinom očitanju. Zbog toga što DNA molekula ima dva lanca, postoji mogućnost da nisu sva očitanja s istog lanca. Kako bi se pokrio i taj slučaj, osim generiranja minimizera za dobiveno očitanje, generiraju se minimizeri i za njegov reverzni komplement. Naravno nije potrebno napraviti isto i za referentni genom.

Algoritam je rješiv u O(n) vremenu.

Za stvaranje minimizera potrebne su veličina minimizera *k*, broj uzastopnih *k*-mera koje gledamo *w* te sekvenca iz koje se vade minimizeri.

Algoritam radi tako da se najprije inicijalizira lista minimizera, pomoćna lista i spremi početni minimizer.

Prva *for*-petlja služi za pronalazak krajnjih minimizera s početka sekvence s indeksom većim od 1 i manjim od *w*. U pomoćnu listu se dodaju minimizeri jedan po jedan pri svakom prolasku petlje. Trenutni minimizer je minimum svih koji se nalaze u pomoćnoj petlji. Ako je trenutni minimizer različit od prethodnog, dodaje se u listu minimizera te prethodni postane trenutni.

Druga *for*-petlja služi za pronalazak unutarnjih minimizera. Najprije obriše nulti element s pomoćne liste. Ostatak petlje je jednak prvoj.

Treća i zadnja *for*-petlja je za krajnje minimizere na kraju sekvence. U njoj se ne dodaju elementi u pomoćnu listu, ali sve ostalo je kao u drugoj petlji.

Vraćeni rezultat je lista minimizera.

U nastavku je primjer na kojemu je pokazano kako algoritam radi. Traže se (3, 3)-minimizeri za sekvencu = „GTCATGCACG”.

Minimizeri su prikazani masnim, zelenim slovima.

| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| G | T | C | A | T | G | C | A | C | G |
| **G** | **T** | **C** | | | | | | | |
| **G** | **T** | **C** | A | | | | | | |
| G | T | **C** | **A** | **T** | | | | | |
| | T | C | **A** | **T** | **G** | | | | |
| | | C | **A** | **T** | **G** | C | | | |
| | | | **A** | **T** | **G** | C | A | | |
| | | | | T | G | **C** | **A** | **C** | |
| | | | | | G | C | **A** | **C** | **G** |
| | | | | | | C | **A** | **C** | **G** |
| | | | | | | | **A** | **C** | **G** |

Vraćeni rezultat je: („GTC”, 0), („CAT”, 2), („ATG”, 3), („CAC”, 5) i („ACG”, 7).

### 2.2 Najdulji rastući podniz (*Longest Increasing Subsequence, LIS*)

Potrebno je pronaći podniz danog niza tako da su elementi podniza poredani, od najnižeg prema najvišem i u kojemu je podniz najdulji mogući. U podnizu ne trebaju svi elementi biti susjedni niti jedinstveni. Algoritam je rješiv u vremenu O(nlogn) [2].

Korišten je postojeći pseudokod [3].

Pronađu se poklapanja minimizera te se od tih poklapanja treba naći LIS nad pozicijama u drugom nizu.

Najprije se trebaju inicijalizirati varijable. Varijabla *p* je lista iste veličina kao početna lista minimizera u kojoj se pohranjuju prethodni indeksi elemenata LIS-a. Varijabla *m* je lista veća od *p* za jedan i služi za pohranu indeksa koji predstavljaju kraj rastućih

podniza drugačijih duljina. Varijabla *l* služi za praćenje duljine LIS-a. Sve je postavljeno na nula.

Zatim se u *for*-petlji prolazi po svim elementima liste minimizera. Varijabla koja predstavlja lijevi dio je postavljena na jedan, dok je varijabla za desni dio postavljena na vrijednost *l*. Koristi se binarno pretraživanje kako bi se našla nova *l* pozicija gdje se trenutni element liste minimizera može umetnuti u LIS. Ažurira se vrijednost prethodnog indeksa u p na poziciju novi *l* manje jedan od liste *m*. Ako je novi *l* veći od starog, stari postaje novi.

Nakon petlje se kreira nova lista za pohranu LIS-a. Varijabla *k* se inicijalizira na poziciju *l* liste *m*. U for-petlji se iterira unazad od pozicije *l* manje jedan do nule. Postavlja se sljedeći LIS element i ažurira *k* u prethodni pohranjen u listi *p*.

Vraća listu u kojoj je pohranjen najdulji rastući podniz.

U nastavku slijedi primjer nad listom minimizera = („CAT”, 2, 1), („CAT”, 2, 5), („ATG”, 3, 3), („CAT”, 7, 1), („CAT”, 7, 5).

**Inicijalizacija:**

[(„CAT”, 2, 1), („CAT”, 2, 5), („ATG”, 3, 3), („CAT”, 7, 1), („CAT”, 7, 5)]

p = [0, 0, 0, 0, 0]

m = [0, 0, 0, 0, 0]

**Prva *for*-petlja:**

| | | |
|---|---|---|
| Iteracija 0: | Iteracija 2: | Iteracija 4: |
| p = [0, 0, 0, 0, 0] | p = [0, 0, 0, 0, 0] | p = [0, 0, 0, 0, 2] |
| m = [0, 0, 0, 0, 0] | m = [0, 0, 2, 0, 0, 0] | m = [0, 3, 2, 4, 0, 0] |
| Iteracija 1: | Iteracija 3: | Iteracija 5: |
| p = [0, 0, 0, 0, 0] | p = [0, 0, 0, 0, 0] | p = [0, 0, 0, 0, 2] |
| m = [0, 0, 1, 0, 0, 0] | m = [0, 3, 2, 0, 0, 0] | m = [0, 3, 2, 4, 0, 0] |

**Druga *for*-petlja:**

| Iteracija 0: | Iteracija 1: | Iteracija 2: |
|---|---|---|
| LIS = [0, 0, („CAT”, 7, 5)] | LIS = [0, („ATG”, 3, 3), („CAT”, 7, 5)] | LIS = [(„CAT”, 2, 1), („ATG”, 3, 3), („CAT”, 7, 5)] |

Dobiveni najdulji rastući podniz nad pozicijama u drugom nizu je LIS = [(„CAT”, 2, 1), („ATG”, 3, 3), („CAT”, 7, 5)].

## 2.3 Poravnanje

Poravnanje je najkompleksniji dio kod problema pronalaska mutacija korištenjem minimizera. Kompleksnost proizlazi iz postojanja umetanja i brisanja. Oni mijenjaju broj gena u sekvenci te ih je iz tog razloga teško odrediti. Problem se pokušava riješiti na dva načina. Prvi način je pokušati samostalno odrediti gdje bi mogla biti umetanja, brisanja ili supstitucije. Drugi način je korištenjem dinamičkog programiranja koje bi trebalo dati točniji rezultat.

Kod prvog načina bez dinamičkog programiranja, ideja je bila usporediti duljine dijelova sekvence između pronađenih zajedničkih minimizera. Ako je duljina jednaka, pretpostavlja se mogućnost postojanja supstitucije te se bilježe svi geni s niza očitanja. U slučaju da je dio referentnog genoma veći od dijela očitanja, smatra se postojanje brisanja gena. U suprotnom se smatra umetanje.

Kod supstitucije je jednostavno usporediti dva jednaka niza, ali kod brisanja i umetanja situacija nije toliko trivijalna. Najjednostavniji način koji je bio korišten je prolaženje onim dijelom koji je kraći te za svaki gen pronaći indeks prvog gena koji se pojavljuje u duljem dijelu. Ako takav gen ne postoji ili ako postoji, ali se nalazi predaleko tako da je broj neposječenih gena kraćeg dijela veći od u tom slučaju broja neposječenih gena duljeg dijela, onda se gen zapisuje na trenutnu poziciju te se smatra supstitucijom.

Slijedi primjer.

| AATG i CACC | | | | AATG i CT | | | | CT i AATG | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | A | T | G | A | A | T | G | C | - | T | - |
| C | A | C | C | C | - | C | - | A | A | T | G |

Drugi način koristi dinamičko programiranje. Algoritam koji se koristi se zove Smith-Waterman. On služi za lokalno poravnanje sekvenci što znači da ne gleda sekvencu u cijelosti. Algoritam su prvi predložili Temple F. Smith i Michael S. Waterman 1981. godine [4]. Smith-Waterman algoritam je varijacija Needleman-Wunsch algoritma. Međutim, za razliku od Needleman-Wunsch-a, postavlja negativne vrijednosti bodovanja ćelija matrice na nulu što rezultira vidljivim lokalnim poravnanjima [5]. Algoritam je kvadratne kompleksnosti i zato nije jako pogodan za velike probleme.

Prvo je potrebno odrediti matricu supstitucija i vrijednost kazne za umetanja i brisanja. Svakoj supstituciji baza je dodijeljena vrijednost. Podudaranja dobiju pozitivne vrijednosti, a razlike dobiju negativne. Ako je podudaranju dana vrijednost 1, a razlici -1, matrica će biti sljedeća:

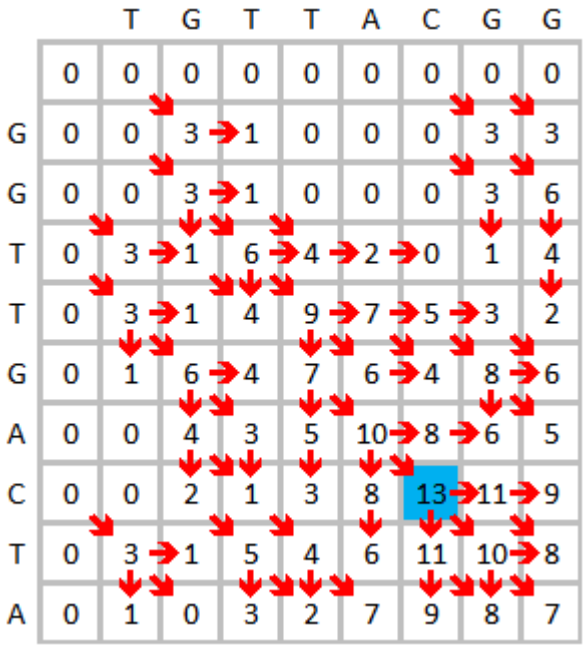
| | A | C | G | T |
|---|---|---|---|---|
| A | 1 | -1 | -1 | -1 |
| C | -1 | 1 | -1 | -1 |
| G | -1 | -1 | 1 | -1 |
| T | -1 | -1 | -1 | 1 |

Nakon toga se treba inicijalizirati matrica bodovanja. Njene dimenzije su duljina prve sekvence uvećano za jedan naspram duljine druge sekvence uvećano za jedan. Elementi nultog retka i stupca se inicijaliziraju na nulu. Taj dodatan redak i stupac omogućavaju poravnanje na bilo kojoj poziciji. Inicijalizirana matrica je sljedeća:

| | | $b_1$ | ... | $b_m$ |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0 | ... | 0 |
| $b_1$ | 0 | | | |
| ... | ... | | | |
| $b_n$ | 0 | | | |

Nakon toga se obavlja bodovanje. Boduje se svaki element od lijeva na desno, gore prema dolje. Ako su sve vrijednosti za pojedinu ćeliju negativne, onda se piše nula. Inače se uzima najveća zaračunata vrijednost i bilježi njegovo podrijetlo.

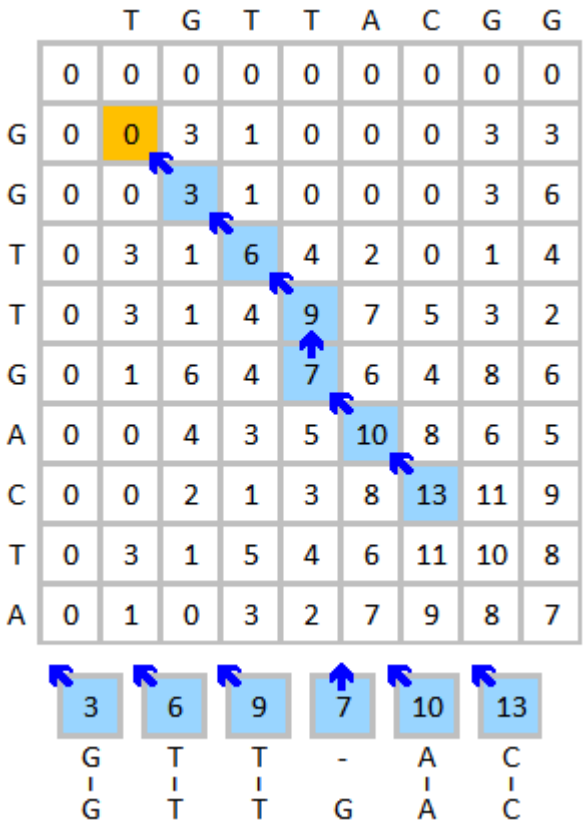
Za sekvence TGTTACGG i GGTTGACTA, matrica bodovanja je sljedeća:




Sl. 1 – prikaz bodovanja pomoću matrice

Na kraju ostaje pronaći element s najvećim rezultatom i od njega rekurzivno putujući unazad, graditi niz. Dobiveni niz je traženo lokalno poravnanje. Uspješno su pronađene supstitucije, umetanja i brisanja.

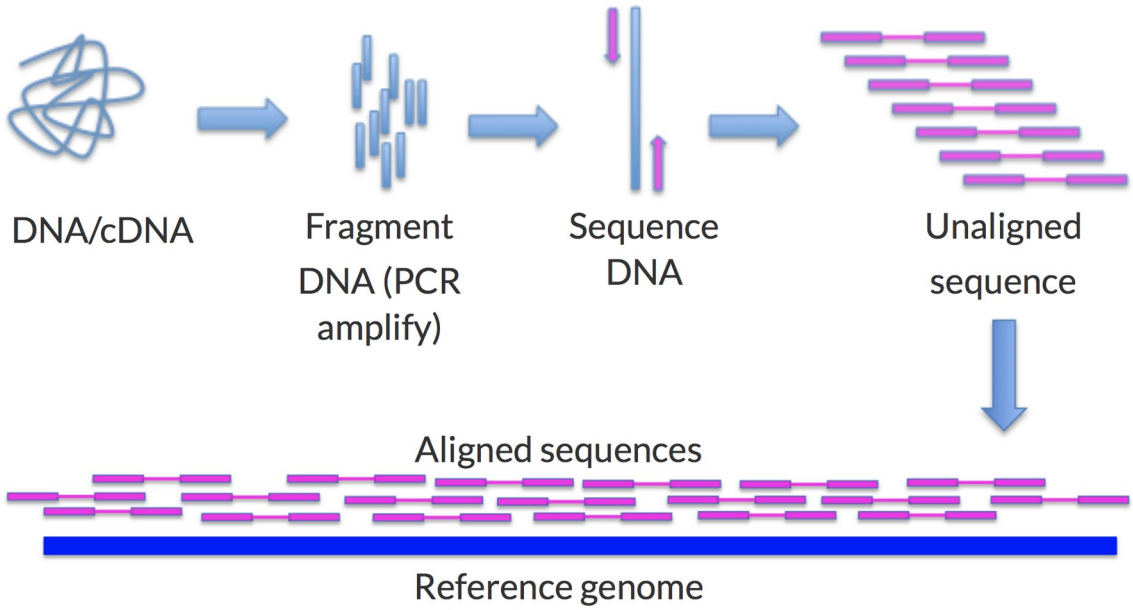
Na slici se može vidjeti izgrađeni niz i kako on služi u poravnanju.




Sl. 2 – prikaz poravnanja korištenjem Smith-Waterman algoritma

## 2.4 Pronalazak mutacija

Nakon poravnanja svih očitanja s referentnim genomom i pronalaska umetanja, brisanja i supstitucije, ostaje pronaći koji geni su mutacije.




Sl. 3 – prikaz poravnanja sekvenci očitanja s referentnim genomom

Mutirani geni se pronalaze na način da se za svaki gen u referentnom genomu pogleda stupac koji sadrži presjek očitanja na odabranoj poziciji. Zatim se odabere gen najveće frekvencije. On ima najveću vjerojatnost da je točan gen. Ako se odabrani gen razlikuje od gena na referentnom genomu na istoj poziciji, onda je to mutacija. Mutacije mogu biti umetanja, brisanja i supstitucije.

## 3. Zaključak

## 4. Literatura


Pisana djela:

[1] Roberts, M., Hayes, W., Hunt, B. R., Mount, S. M., Yorke, J. A., Reducing storage requirements for biological sequence comparison, Institute for Physical Science and Technology, University of Maryland, College Park,Vol. 20 no. 18 2004, pages 3363 3369 doi:10.1093/bioinformatics/bth408

[2] Schensted, C. (1961), "Longest increasing and decreasing subsequences", Canadian Journal of Mathematics, 13: 179–191, doi:10.4153/CJM-1961-015-3

[3] Longest increasing subsequence, Wikipedia, 24. veljača 2023., link: <https://en.wikipedia.org/wiki/Longest_increasing_subsequence>
datum pristupa: 31. svibanj 2023.

[4] Smith, Temple F. & Waterman, Michael S. (1981). "Identification of Common Molecular Subsequences". Journal of Molecular Biology. 147 (1): 195–197. CiteSeerX 10.1.1.63.2897. doi:10.1016/0022-2836(81)90087-5. PMID 7265238.

[5] Gagniuc, Paul A. (2021). Algorithms in bioinformatics : theory and implementation (1st ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. pp. 1–528. ISBN 978-1-119-69800-5. OCLC 1240827446.

Slike:

[Sl. 1 i Sl. 2] Smith–Waterman algorithm, Wikipedia, 19. veljača 2023., link: <https://en.wikipedia.org/wiki/Smith–Waterman_algorithm>

datum prisutpa: 31. svibanj 2023.

[Sl. 3] Reference Genomes and Genomics File Formats, Rockefeller University, Bioinformatics Resource Centre, 7. ožujak 2023. link: <https://rockefelleruniversity.github.io/Genomic_Data/presentations/slides/GenomicsData.html#1>

datum prisutpa: 31. svibanj 2023.