

Assignment 1, Bioinformatics

Davide Cozzi, 829827

Indice

1	Esercizio 1	2
1.1	Versione 1	2
1.2	Versione 2	8
2	Esercizio 2	12
2.1	Versione 1	12
2.2	Versione 2	20
2.3	Versione 3	25
3	Esercizio 3	29
4	Esercizio 4	32
5	Link al codice	35

Capitolo 1

Esercizio 1

1.1 Versione 1

Si assumano stringhe su $\Sigma = \{a, c, g, t, A, C, G, T\}$ indicizzate a partire dalla posizione 0, per comodità. L'eventuale presenza di minuscole e maiuscole mischiate non si identifica come un problema e viene risolto portando tutto in minuscolo nell'algoritmo.

L'algoritmo si divide in due parti:

1. divisione in “token” delle due stringhe. A partire da ogni stringa si ottiene un vettore di sottostringhe di uguali caratteri
2. confronto dei due vettori di sottostringhe

Si procede specificando che:

- $length(X)$ restituisce la lunghezza di X , che sia una stringa o un vettore
- $push(X, Y)$ effettua l'operazione di **push** di Y nel vettore/stringa X
- $string(Y)$ effettua il cast di Y a **string**
- $lowercase(Y)$ porta Y in *lowercase*

Si ha quindi la prima parte dell'algoritmo, che effettua la divisione in “token”.

Esempio 1. Vediamo un esempio di input e output della funzione *Splitter*.

- **input:** "aaataaaggggccccctttttttttttcc"
- **output:** ["aaa", "t", "aaa", "gggg", "cccc", "ttttttttttt", "cc"]

Si ha quindi lo pseudocodice:

Algorithm 1 Algoritmo per lo split in “token” delle stringhe

```

1: function SPLITTER(s)
2:   result  $\leftarrow$  [ ]
3:   n  $\leftarrow$  length(s)
4:   if n == 1 then
5:     push(result, string(s[0]))
6:     return result
7:   end if
8:   tmp  $\leftarrow$  ""
9:   for i  $\leftarrow$  0 to n do
10:    if i > 0 and s[i - 1]  $\neq$  s[i] then
11:      push(result, tmp)
12:      tmp  $\leftarrow$  ""
13:    end if
14:    push(tmp, s[i])
15:    if i == (n - 1) then
16:      push(result, tmp)
17:    end if
18:  end for
19:  return result
20: end function

```

Nel dettaglio:

- alle righe 2-3 si inizializzano il vettore coi risultati e una variabile contenente la lunghezza della stringa
- alle righe 4-6 si controlla se la stringa è formata da un solo carattere e in tal caso tale carattere sarà l’unico elemento del vettore dei risultati. Dopo l’aggiunta l’esecuzione termina e viene restituito il vettore
- alla riga 8 si inizializza una variabile d’appoggio che di volta in volta tiene conto dei “token”

- alle righe 9-18 si identificano i vari “token” e li si aggiungono al vettore con il risultato della funzione. Si itera su tutta la stringa
- alle righe 10-13, a partire dal secondo carattere, qualora questo sia diverso dal carattere seguente, si aggiunge il “token” e si azzerla la variabile temporanea
- alla riga 14 si aggiunge il carattere letto alla attuale stringa temporanea
- alle righe 15-17 si verifica di essere arrivati alla fine della stringa e in tal caso si aggiunge la stringa temporanea al vettore dei risultati

Una volta ottenuto il vettore dei “token” delle due sequenze in input basta confrontare i due vettori.

Prima di vedere il confronto si specifica che:

- le due sequenze vengono trasformate in *lowercase* per praticità
- si assume che le due sequenze non possono essere stringhe vuote ε

Fatte queste assunzioni si può fare ancora un ultima osservazione prima di procedere con l’algoritmo. Qualora i due vettori prodotti dalla funzione **Splitter** fossero di lunghezza diversa allora l’algoritmo non potrà in nessun caso dire che ci sia stata un’“infezione” in quanto si assume che non ci siano né *delezioni* né *inserzioni* di basi. In altri termini qualora i due vettori siano di diversa cardinalità sicuramente non è avvenuta alcuna infezione, per come essa è stata definita. Vediamo ora le altre casistiche. Si itera contemporaneamente sull’elemento i -esimo dei due vettori e:

- se i due elementi i -esimi presentano il primo carattere diverso allora, date le premesse, si specifica che non può essere avvenuta un’infezione
- se i due elementi i -esimi presentano il primo carattere uguale allora si procede confrontando i due elementi i -esimi (si assuma X vettore relativo alla “sequenza originale” e Y vettore relativo alla sequenze che si vuole dimostrare l’eventuale infezione):
 - se il primo carattere è “a” allora la lunghezza di $Y[i]$ deve essere minore o uguale a 5 volte quella di $X[i]$, in quanto per ogni “a” in $X[i]$ posso avere al più 5 “a” in $Y[i]$

- se il primo carattere è “t” allora la lunghezza di $Y[i]$ deve essere minore o uguale a 10 volte quella di $X[i]$, in quanto per ogni “t” in $X[i]$ posso avere al più 10 “t” in $Y[i]$
- se il primo carattere è “c” o “g” allora la lunghezza di $Y[i]$ deve essere maggiore o uguale di quella di $X[i]$, in quanto per ogni “c” o “g” in $X[i]$ posso avere un numero indefinito di “c” o “g” in $Y[i]$

Si ha quindi il seguente pseudocodice dell’algoritmo, che ritorna \top o \perp a seconda che sia possibile che $seq2$ sia una versione infettata di $seq1$:

Algorithm 2 algoritmo di verifica dell’infezione

```

1: function CHECKINFECTION( $seq1, seq2$ )
2:   if  $length(seq1) == 0$  or  $length(seq2) == 0$  then
3:     return  $\perp$ 
4:   end if
5:    $vecseq1 \leftarrow Splitter(lowercase(seq1))$ 
6:    $vecseq2 \leftarrow Splitter(lowercase(seq2))$ 
7:    $check \leftarrow \top$ 
8:   if  $length(vecseq1) \neq length(vecseq2)$  then
9:     return  $\perp$ 
10:  end if
11:   $n \leftarrow length(vecseq1)$ 
12:  for  $i \leftarrow 0$  to  $n$  do
13:    if  $vseq1[i][0] \neq vseq2[i][0]$  or  $\neg check$  then
14:      return  $\perp$ 
15:    end if
16:    if  $vecseq1[i][0] == 'a'$  then
17:       $check \leftarrow (length(vecseq2[i]) \leq 5 \cdot length(vecseq1[i]))$ 
18:    else if  $vecseq1[i][0] == 't'$  then
19:       $check \leftarrow (length(vecseq2[i]) \leq 10 \cdot length(vecseq1[i]))$ 
20:    else
21:       $check \leftarrow (length(vecseq2[i]) \geq length(vecseq1[i]))$ 
22:    end if
23:  end for
24:  return  $check$ 
25: end function

```

Nel dettaglio:

- alle righe 2-4 si controlla che nessuna stringa sia ε . In tal caso si ritorna \perp , come da assunzioni, concludendo l'iterazione
- alle righe 5-7 si trasformano in lowercase le stringhe per comodità e si inizializza la variabile booleana che conterrà il risultato dell'algoritmo. Si noti che una volta diventata \perp non potrebbe più tornare \top
- alle righe 8-10 si verifica che i due vettori di "token" siano lunghi uguale. In caso contrario sicuramente non si ha una mutazione secondo le specifiche e si ritorna \perp , concludendo l'iterazione
- alla riga 11 si salva la lunghezza del primo vettore di "token", che a questo punto dell'esecuzione è pari a quella del secondo
- alle righe 11-23 si itera sui due vettori di "token" contemporaneamente, confrontando di volta in volta i due elementi i-esimi
- alle righe 13-15, qualora la variabile contenente il risultato sia \perp o qualora i due "token" i-esimi inizino con un carattere diverso (e quindi siano "token" di diversi caratteri), si ritorna \perp concludendo l'iterazione
- alle righe 16-22, avendo a questo punto dell'iterazione che i due "token" sono consistenti dal punto di vista del carattere, si verifica che lo siano anche secondo le assunzioni di lunghezza, precedentemente illustrate. Si aggiorna quindi la variabile contenente il risultato a seconda del controllo, che varia a seconda del carattere dei due "token" i-esimi

Esempio 2. *Qualche esempio:*

- **input:** "ATAGCTC" e
"AAATAAAGGGGCCCCCTTTTTTCC"
- **output:** \top

infatti (si usano i colori per rappresentare i vari "token" dei vettori):

ATAGCTC
AAATAAAGGGGCCCCCTTTTTTTTTTTTCC

D'altro canto vediamo un esempio in cui non si può dire di avere una mutazione:

- infatti (si usano i colori per rappresentare i vari “token” dei vettori):*

Avendo che il terzo “token” della prima stringa è **A** mentre quello della seconda stringa è **AAAAAA**, avendo che viene rotto il vincolo per il quale per ogni **A** posso avere al più 5 **A** nella mutazione.

infatti (si usano i colori per rappresentare i vari “token” dei vettori):

In quanto i due secondi “token”, *T* e *CC*, corrispondono a caratteri diversi.

1.2 Versione 2

Si assumano stringhe su $\Sigma = \{a, c, g, t, A, C, G, T\}$ indicizzate a partire dalla posizione 0, per comodità.

Indico anche una versione intuitivamente più semplice. In questo caso si scorre la sequenza che si suppone essere originale, tenendo conto dei caratteri uguali ripetuti. Appena si ha un cambio di carattere si verifica se, nella sequenza che si vuole dimostrare essere una mutazione di quella originale, si ha una corretta sequenza di caratteri, secondo le specifiche.

Si ha che:

- per comodità le sequenze sono riportate in lowercase e si assume che, in presenza di anche solo una sequenza nulla, l'algoritmo restituisce \perp
- **seq1** e **seq2** sono rispettivamente la sequenza originale e la sequenza che si vuole dimostrare essere la mutazione
- **co** e **cm** sono le variabili che ogni volta accumulano il conteggio dei caratteri uguali consecutivi, rispettivamente sulla sequenza originale e su quella che si suppone mutata
- *i* e *j* sono, rispettivamente, gli indici per la prima e per la seconda sequenza

In poche parole si itera sulla sequenza originale, aggiornando di volta in volta il contatore relativo finché si ha lo stesso carattere. Nel momento in cui si ha un cambiamento o si è arrivati all'ultimo carattere della sequenza si ferma il conteggio e si verifica il conteggio sulla seconda sequenza (anche in questo caso facendo attenzione a non andare *out of bounds*). Qualora la seconda sequenza presenti, all'indice a cui si è arrivati con l'algoritmo, un carattere diverso da quello della prima si può restituire \perp . Controllando la seconda sequenza si aggiorna il rispettivo contatore e l'indice. Una volta che anche sulla seconda sequenza si ha un cambio di carattere o si è arrivati alla fine si confrontano i due contatori secondo le specifiche (ad esempio se nella stringa originale avevo due "a" consecutive ne posso avere al più 10 in quella che si vuole verificare essere la mutazione). Finito questo controllo si azzerano i contatori e si verifica che, qualora la sequenza originale sia stata visitata interamente, anche la seconda sia conclusa. In caso contrario si restituisce \perp .

Si ha quindi il seguente pseudocodice.

Algorithm 3 algoritmo di verifica dell'infezione, seconda versione

```

1: function CHECKINFECTION(seq1, seq2)
2:   m  $\leftarrow$  length(seq1)
3:   n  $\leftarrow$  length(seq2)
4:   if m == 0 or n == 0 then
5:     return  $\perp$ 
6:   end if
7:   seq1  $\leftarrow$  lowercase(seq1)
8:   seq2  $\leftarrow$  lowercase(seq2)
9:   co  $\leftarrow$  0
10:  cm  $\leftarrow$  0
11:  j  $\leftarrow$  0
12:  for i  $\leftarrow$  0 to m do
13:    co  $\leftarrow$  co + 1
14:    if i == n - 1 or seq1[i]  $\neq$  seq[i + 1] then
15:      if seq1[i]  $\neq$  seq2[j] then
16:        return  $\perp$ 
17:      end if
18:      while j  $\neq$  n - 1 and seq2[j] == seq2[j + 1] do
19:        cm  $\leftarrow$  cm + 1
20:        j  $\leftarrow$  j + 1
21:      end while
22:      cm  $\leftarrow$  cm + 1
23:      j  $\leftarrow$  j + 1
24:      if seq1[i] == 'a' and  $\neg(cm \leq 5 \cdot co)$  then
25:        return  $\perp$ 
26:      else if seq1[i] == 't' and  $\neg(cm \leq 10 \cdot co)$  then
27:        return  $\perp$ 
28:      else if (seq1[i] == 'c' or seq1[i] == 'g') and  $\neg(cm \geq co)$  then
29:        return  $\perp$ 
30:      end if
31:      co  $\leftarrow$  0
32:      cm  $\leftarrow$  0
33:      if i == m - 1 and j  $\neq$  n then
34:        return  $\perp$ 
35:      end if
36:    end if
37:  end for
38:  return  $\top$ 
39: end function

```

Nel dettaglio:

- alle righe 2-6 si verificano che le lunghezze delle due sequenze siano consistenti con le assunzioni del problema. Qualora anche solo una stringa sia ε si ritorna \perp , terminando l'esecuzione
- alle righe 7-11 si pongono le stringhe in lowercase e si inizializzano le variabili come precedentemente specificato
- alle righe 12-39 si parte iterando sulla prima stringa, aggiornando il rispettivo contatore
- alle righe 14-38 si eseguono le varie operazioni se si ha un cambio di carattere nella prima sequenza o se si è arrivati alla fine della stessa
- alle righe 15-17, qualora si abbiano in confronto caratteri diversi per le due sequenze si ritorna \perp , interrompendo l'esecuzione
- alle righe 18-21 si itera sulla seconda stringa, aggiornando il rispettivo contatore fino a che si hanno caratteri uguali
- alle righe 22-23 si aumenta il contatore della seconda stringa in quanto l'iterazione non conta il j -esimo carattere prima di un carattere diverso e si aumenta l'indice di 1 in modo che punti al $(j + 1)$ -esimo carattere, quello diverso dal j -esimo
- alle righe 24-32 vengono effettuati i controlli tramite i contatori secondo le specifiche date per le mutazioni, aggiornando la variabile booleana (operazione in se superflua ma comoda dal punto di vista della chiarezza dell'algoritmo). Se i controlli non sono superati si ritorna \perp , interrompendo l'esecuzione
- alle righe 33-34 si azzerano i due contatori, in modo da poter iniziare un nuovo controllo con le nuove sequenze di caratteri
- alle righe 35-37 si verifica che, qualora l'indice che itera sulla prima stringa sia arrivato a puntare alla fine della stessa, l'indice della seconda deve fare lo stesso (ricordando che, a causa del $j \leftarrow j + 1$ in riga 23, la cosa è rappresentata da $j \neq n$ e non $j \neq n - 1$)

Dal punto di vista pratico questo secondo algoritmo evita la fase di preprocessing vista nel primo algoritmo con la funzione **Splitter**. Anziché avere a priori le sottostringhe di cui confrontare le lunghezze tiene conto di volta

in volta dei caratteri uguali consecutivi, confrontando i contatori (motivo per cui anche gli esempi possono essere riadattati anche a questa seconda versione). Dal punto di vista computazionale non si segnalano particolari differenze. Entrambe le versioni, nel caso peggiore, iterano su entrambe le stringhe, anche se bisogna segnalare che il primo algoritmo deve iterare anche sul vettore dei “token”.

Capitolo 2

Esercizio 2

2.1 Versione 1

Si assumano stringhe su $\Sigma = \{a, c, g, t, A, C, G, T\}$ indicizzate a partire dalla posizione 0, per comodità. L'eventuale presenza di minuscole e maiuscole mischiate non si identifica come un problema e viene risolto portando tutto in minuscolo nell'algoritmo.

Si fanno le seguenti assunzioni:

- si assume che le mutazioni siano solo cambi di base, non avendo quindi inserzioni o delezioni
- si assume che, non avendo inserzioni o delezioni, le due sequenze siano di egual lunghezza per poter avere un input valido per l'algoritmo
- si assume che si può avere una mutazione solo dopo almeno 5 basi non mutate
- si assume che la prima base della sequenza può mutare
- si assume che le sequenze siano tali per cui il loro *kmer-set* coincida con il loro *spettro* per $k = 6$ (scelta approfondita dopo). In altri termini le sequenze sono tali per cui si hanno solo *kmer* di lunghezza 6 univoci
- si assume, per pura semplicità, di avere in input sequenze lunghe almeno quanto un singolo *kmer*

In base alle assunzioni precedenti si può anche assumere che, calcolati i due *spettri*, che sono *spettri senza ripetizioni*, relativi alle due sequenze, si abbia

che essi siano di cardinalità uguale. Per verificare che il *kmer-set* sia della stessa cardinalità dello spettro basta verificare che, chiamando *kmers* il *kmer-set* (calcolato per un certo *k*) di una certa sequenza *seq*, non valga:

$$\text{length}(\text{kmers}) \neq \text{length}(\text{seq}) - (k - 1)$$

Procediamo quindi descrivendo l'idea dietro l'algoritmo. L'idea principale è quella di calcolare i *kmer* di una lunghezza *k* non causale e di evitare confronti inutili. Assumendo di avere che una mutazione è possibile sse almeno le 5 basi precedenti non sono mutazioni, in quanto dopo una mutazione abbiamo assunto esserci almeno 5 basi non mutate, sono di fronte ad un caso “limite” del tipo:

MBBBBBM

Indicando con *M* le mutazioni e con *B* le basi non mutate. Ne segue immediatamente che *kmer* calcolati con *k* = 6 sono i *kmer* di cardinalità massima tali per cui posso avere al più una singola mutazione per *kmer*.

Indicando con *seq1* la sequenza di riferimento e con *seq2* la sequenza mutata si ha quindi che, per le assunzioni fatte, posso fare un confronto “1:1” dei *kmer-set*, sapendo che essi sono di cardinalità uguale.

Si noti però che un confronto diretto sarebbe “inutile” in quanto, avendo sicuramente almeno 5 basi non mutate dopo una mutazione posso saltare il confronto di 5 *kmer*, in quanto tutti e 5 aggiungerebbero in coda una base sicuramente non mutata. Inoltre, per le assunzioni fatte, è possibile anche solo confrontare, di volta in volta, i due simboli finali dei due *kmer* e non i *kmer* interi in quanto tutto il prefisso del *kmer*, che termina in penultima posizione della stringa, è stato già verificato negli step precedenti. Qualora il simbolo finale sia diverso si è di fronte ad una mutazione e, avendo *kmer-set* di uguale cardinalità e quindi confrontando sempre i due *kmer* i-esimi, è possibile risalire all'indice della mutazione basandosi su tale *i* e sulla lunghezza dei *kmer*, quindi 6.

Una volta individuata la mutazione si procede a salvare in una struttura adeguata le seguenti informazioni:

- base presente nella sequenza di riferimento, **b1**
- base mutata presente nella seconda sequenza, **b2**
- indice della mutazione, **i**

In merito si assume che `newMutation(b1, b2, i)` restituisca una mutazione con le specifiche indicate come argomento.

Bisogna fare un'ultima osservazione. Si è assunto che la primissima base possa subire mutazione. Si verifica quindi se le due basi iniziali siano diverse e, qualora lo fossero, si aggiunge la mutazione e ci si sposta ai due *kmer* di posizione 1 nei due *kmer-set*, sapendo che essi non conterranno sicuramente la prima base delle rispettive sequenze e quindi, per le assunzioni fatte, continueranno a contenere al più una mutazione, nell'ultimo carattere. Dopo questa osservazione si procede regolarmente con l'algoritmo.

Per praticità l'algoritmo restituisce una tupla contenente:

1. il vettore delle mutazioni
2. un booleano che segnala se ci sono stati problemi dovuti alle assunzioni

Quindi si hanno vari casi:

- un vettore di mutazioni non nullo (in tal caso sicuramente il booleano presenta \top)
- un vettore di mutazioni nullo e in tal caso:
 - se il booleano è \top significa che le due sequenze rispettano i vincoli verificabili ma non si hanno mutazioni. In altri termini $seq1 = seq2$
 - se il booleano è \perp significa che qualche vincolo è stato infranto, ovvero stringhe di lunghezza diversa, stringhe nulle e stringhe che prevedono *kmer* non univoci

L'assunzione di avere distanza 5 tra ogni mutazione non viene verificata e viene assunta come assioma. L'algoritmo, per come costruito, ignorerebbe mutazioni distanti meno di 5 basi.

Vediamo quindi prima lo pseudocodice e poi qualche esempio.

Esplicitiamo prima la funzione `getKmers` che, data una sequenza *seq* e un intero *k*, restituisce un vettore di stringhe, che per le assunzioni è sia il *kmer-set* che lo *spettro*, mantenendo l'ordine. Quindi il *kmer* che nel vettore ha indice *i* è il *kmer* che inizia all'indice *i* della sequenza. Quest'ultimo ragionamento è possibile solo grazie alle assunzioni fatte: *kmer* non univoci non permetterebbero questo. Con $s[i, j]$ si intende la sottostringa di *s* dall'indice *i* all'indice *j* inclusi. Con $s[i,]$ si intende il suffisso di *s* che inizia all'indice *i*. Si noti che la funzione `getKmers`, così esplicitata, consumerebbe la sequenza e quindi la si “copia” in una sequenza temporanea *tmp*, su cui poi effettua le operazioni. Questo è superfluo in termini di pseudocodice ma mi è sembrato giusto segnalare la cosa. Nel codice Rust il problema è risolto passando un

clone() della sequenza. Si può pensare, volendo, ad un algoritmo che non consumi la stringa e che non richieda una copia della stessa.

Passiamo quindi allo pseudocodice, in primis della funzione che calcola lo *spettro*, che ricordiamo, per le assunzioni fatte, porterà ad uno *spettro* uguale al *kmer-set*.

Algorithm 4 Funzione di calcolo dei *kmer*

```

1: function GETKMERS(seq, k)
2:   tmp  $\leftarrow$  seq
3:   kmers  $\leftarrow$  [ ]
4:   while length(tmp)  $\geq k$  do
5:     push(kmers, tmp[0, k - 1])
6:     tmp  $\leftarrow$  tmp[1, ]
7:   end while
8:   return kmers
9: end function

```

Nel dettaglio:

- alla riga 2 si crea una variabile temporanea contenente la sequenza in input di modo che quest'ultima non venga consumata
- alla riga 3 si inizializza uno *spettro*, visto come vettore di stringhe, vuoto
- alle righe 4-7 si popola lo *spettro*. Si aggiunge al vettore il prefisso lungo *k*, quindi la sottostringa compresa tra 0 e l'indice *k* - 1, incluso. Si aggiorna quindi la stringa temporanea con il suffisso di indice 1 della stringa stessa. Il ciclo termina quando la stringa temporanea è di lunghezza inferiore al *k* richiesto

Passiamo ora allo pseudocodice principale.

Algorithm 5 Algoritmo basato su *kmer* per mutazioni

```

1: function CHECKMUTATION(seq1, seq2)
2:   if length(seq1)  $\neq$  length(seq2) then
3:     return ([ ],  $\perp$ )
4:   end if
5:   if length(seq1) == 0 or length(seq2) == 0 then
6:     return ([ ],  $\perp$ )
7:   end if
8:   muts  $\leftarrow$  [ ]
9:   i  $\leftarrow$  0
10:  n  $\leftarrow$  length(seq1)
11:  seq1  $\leftarrow$  lowercase(seq1)
12:  seq2  $\leftarrow$  lowercase(seq2)
13:  kmers1  $\leftarrow$  getKmers(seq1, 6)
14:  kmers2  $\leftarrow$  getKmers(seq2, 6)
15:  if length(kmers1)  $\neq$  n - 5 or length(kmers2)  $\neq$  n - 5 then
16:    return ([ ],  $\perp$ )
17:  end if
18:  if kmers1[0][0]  $\neq$  kmers2[0][0] then
19:    push(muts, newMutation(kmers1[0][0], kmers2[0][0], 0))
20:    i  $\leftarrow$  index + 1
21:  end if
22:  while i < length(kmers1) do
23:    if kmers1[i][5]  $\neq$  kmers2[i][5] then
24:      push(muts, newMutation(kmers1[i][5], kmers2[i][5], 5 + i))
25:      i  $\leftarrow$  i + 6
26:    else
27:      i  $\leftarrow$  i + 1
28:    end if
29:  end while
30:  return (muts,  $\top$ )
31: end function

```

Dove con i teniamo traccia dei $kmer$ da confrontare, eventualmente saltando i confronti superflui sopra descritti.

Nel dettaglio quindi:

- alle righe 2-4, qualora le stringhe siano di diversa lunghezza, come da assunzioni, si restituisce la coppia formata dal vettore di mutazione vuoto e \perp , quest'ultimo per segnalare che il confronto violava le assunzioni
- alle righe 5-7, qualora anche solo una delle due stringhe sia ε , si restituisce la coppia formata dal vettore di mutazione vuoto e \perp , quest'ultimo per segnalare che il confronto violava le assunzioni
- alle righe 8-10 si inizializza il vettore delle mutazioni, l'indice che tiene conto delle posizioni delle stesse e una variabile che tiene conto della lunghezza della prima stringa, che a questo punto dell'esecuzione abbiamo garanzia essere pari a quella della seconda
- alle righe 11-12, per praticità, si riducono le due sequenze al lowercase
- alle righe 13-14 si calcolano i due *spettri*, che, per il metodo di calcolo presentano $kmer$ ordinati. Si usa $k = 6$ come descritto precedentemente
- alle righe 15-17 si verifica che effettivamente i due *spettri* coincidano coi rispettivi $kmer-set$, come spiegato precedentemente. In caso contrario si restituisce la coppia formata dal vettore di mutazione vuoto e \perp , quest'ultimo per segnalare che il confronto violava le assunzioni
- alle righe 18-21 si risolve l'assunzione per la quale la prima base può subire una mutazione. Si verificano quindi i primi due caratteri dei primi due $kmer$ degli *spettri* delle due sequenze e, in caso di diversità, si aggiunge la mutazione al vettore delle mutazioni. Si incrementa quindi l'indice che tiene traccia della posizione delle mutazioni
- alle righe 22-29 si itera, sfruttando l'indice usato per tenere traccia delle mutazioni, per ogni coppia di $kmer$ i -esimi a partire dai due *spettri*
- alle righe 23-28 si aggiunge la mutazione qualora i due $kmer$ i -esimi presentino l'ultimo carattere diverso. Si aggiunge quindi la

mutazione tenendo conto dell'indice che rappresenta la mutazione (incrementato di 5 per rappresentare la corretta posizione della mutazione sulle stringhe). Si incrementa quindi di 6 tale indice per evitare controlli su coppie di *kmer* inutili. Qualora invece non si abbia una mutazione si incrementa semplicemente di 1 l'indice

- alla riga 30 si restituisce la coppia formata dal vettore di mutazione e \top . Si segnala che il vettore potrebbe essere comunque vuoto ma il booleano posto a \top segnala che le assunzioni, perlomeno quelle che è possibile controllare, sono state verificate e che quindi si hanno effettivamente due stringhe valide identiche

Vediamo quindi qualche esempio.

Esempio 3. *Siano date in input:*

- *atcttg cattaccgccccaatc*
- *atcttacattaccgtcccaacc*

Le due sequenze rispettano tutte le assunzioni.

Calcolati i kmer si procede con il confronto, sapendo che le due sequenze iniziano con la stessa base. L'indice dell'enumerazione corrisponde all'indice i dell'algoritmo.

0. confronto "atcttg" con "atctta". Ho un mismatch tra gli ultimi simboli "g" e "a", che sono all'indice 5 essendo noi al kmer di indice 0 (si ha infatti $5 + 0 = 5$). Aggiungo quindi la mutazione (**g, a, 5**) e aggiorno l'indice al valore $i + 6$, ovvero, in questo caso, 6. Salto quindi tutti i confronti e riparto dal 6
1. ~~confronto "tcttge" con "tcttae"~~
2. ~~confronto "cttgea" con "cttaca"~~
3. ~~confronto "ttgeat" con "ttacat"~~
4. ~~confronto "tgcaat" con "tacatt"~~
5. ~~confronto "geatta" con "acatta"~~
6. confronto "cattac" con "cattac". Non ho mismatch quindi faccio $i + 1$ e basta andando al confronto successivo
7. confronto "attacc" con "attacc". Non ho mismatch quindi faccio $i + 1$ e basta andando al confronto successivo

8. confronto "ttaccg" con "ttaccg". Non ho mismatch quindi faccio $i + 1$ e basta andando al confronto successivo
9. confronto "taccgc" con "taccgt". Ho un mismatch tra gli ultimi simboli "c" e "t", che sono all'indice 14 essendo noi al kmer di indice 9 (si ha infatti $5 + 9 = 14$). Aggiungo quindi la mutazione $(c, t, 14)$ e aggiorno l'indice al valore $i + 6$, ovvero, in questo caso, 15. Salto quindi tutti i confronti e riparto dal 15
10. confronto "acegce" con "acegte"
11. confronto "cegece" con "cegtee"
12. confronto "egeeee" con "egteee"
13. confronto "geeecc" con "gteeee"
14. confronto "eeceaa" con "teceaa"
15. confronto "cccaat" con "cccaac". Ho un mismatch tra gli ultimi simboli "t" e "c", che sono all'indice 20 essendo noi al kmer di indice 15 (si ha infatti $5 + 15 = 20$). Aggiungo quindi la mutazione $(t, c, 20)$ e aggiorno l'indice al valore $i + 6$, ovvero, in questo caso, 26. Essendo l'indice maggiore stretto della cardinalità del kmer-set, interrompo l'esecuzione, sapendo che comunque non potrei avere in ogni caso ulteriori mutazioni
16. confronto "ccaate" con "ccaace"

Esempio 4. Più brevemente vediamo un altro input:

- tatcttg cattaccg cccaatc
- gatctta cattaccgt cccaacc

In questo caso si noti come la prima base non combaci, si procede quindi salvando la mutazione $(t, g, 0)$ e facendo iniziare il confronto tra i kmer di indice 1, ovvero "atcttg" e "atctta", proseguendo poi come nell'esempio precedente.

2.2 Versione 2

Per pura curiosità si può fare anche un piccolo ragionamento ulteriore. Con le assunzioni date si può costruire un **grafo di De Bruijn** delle due stringhe e vedere che non si hanno cicli, non essendoci *kmer* ripetuti all'interno di ciascuna stringa. Le mutazioni possono essere quindi viste come le coppie di caratteri che etichettano l'inizio di una **bubble** nel grafo, ovvero le etichette degli archi di un nodo che ha due archi uscenti. Vista l'assenza di cicli, si ha che il primo *kmer* calcolato per ciascuna delle due sequenze (potrebbero essere due diversi) è un nodo privo di archi entranti, essendo quindi un nodo *source*, e l'ultimo nodo calcolato per ciascuna delle due sequenze (potrebbero essere due diversi) è un nodo privo di archi uscenti, essendo un nodo *sink*. Basta quindi percorrere un cammino dal primo nodo (al più del caso con mismatch in prima base che verrà trattato dopo) fino ad un nodo *sink*, privo di figli, e, ogni volta che si incontra un nodo con due figli, salvare la mutazione e proseguire su uno dei due cammini della **bubble**, indifferentemente. Qualora il cammino scelto si interrompa sappiamo che, in modo parallelo, anche l'altro cammino si interromperebbe e quindi possiamo concludere la computazione. Ogni avanzamento di nodo comporta l'incremento di indice utile a salvare la posizione della mutazione.

Qualora si abbia una mutazione nella prima base allora si avranno due nodi privi di archi entranti collegati a loro volta allo stesso nodo tramite i rispettivi archi uscenti. Si procede quindi aggiungendo la prima base delle etichette dei due nodi come mutazione, all'indice 0, e proseguendo con il ragionamento visto sopra a partire dal nodo a cui puntano.

I due grafi, per le stesse sequenze usate nei due esempi della prima versione, sono visualizzabili in figura 2.1.

Facciamo le seguenti assunzioni, a livello di pseudocodice, per comodità:

- la funzione `createDBG(v, k)` prende in input un vettore *v* di stringhe e un intero *k* e restituisce un oggetto rappresentante il *grafo di De Bruijn* costruito a partire dalle sequenze contenute in *v*. Tali sequenze sono in questo caso due e sono supposte valide secondo le assunzioni fatte all'inizio
- si supponga di avere un oggetto `dbg` rappresentante il *grafo di De Bruijn*. Si ha che la funzione `startNodes(dbg)` restituisce un vettore contenente i puntatori ai nodi iniziali/sources, ovvero i nodi senza archi entranti del *grafo di De Bruijn*. Per le assunzioni fatte, ho almeno un nodo iniziale e al più due nodi iniziali

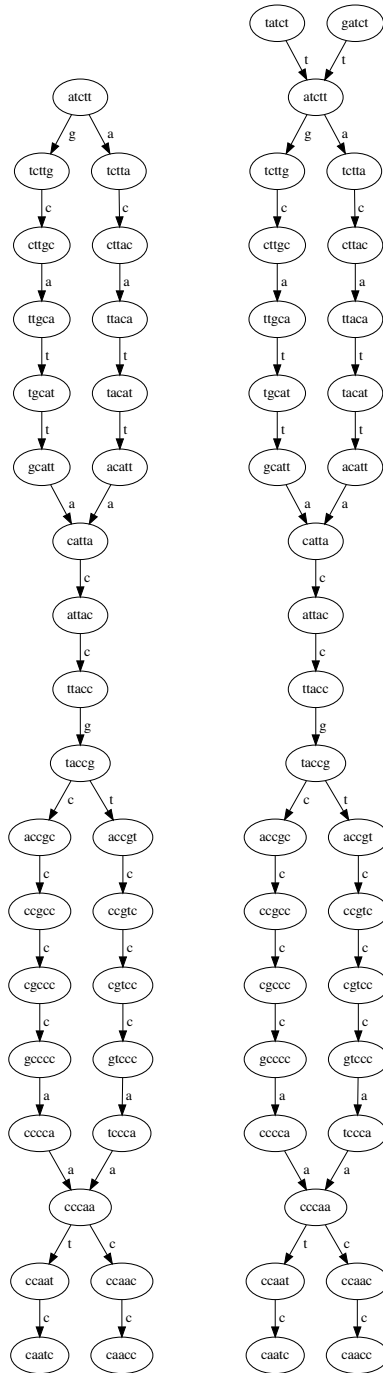


Figura 2.1: Grafi di De Bruijn relativi, rispettivamente, ai due esempi della “versione 1”

- si supponga che ogni nodo sia rappresentato da un oggetto e che, dato un nodo n si abbiano le seguenti funzioni:
 - `label(n)`, che restituisce il $(k-1)$ -mer che etichetta il nodo n
 - `outDegree(n)`, che restituisce il numero di archi uscenti dal nodo n . Se $n == null$ il metodo restituisce comunque 0
 - `outLabel(n)`, che restituisce un vettore con le etichette degli archi uscenti dal nodo n
 - `nextNodes(n)`, che fornisce un vettore di puntatori ai nodi successivi/figli di n

Vediamo quindi uno pseudocodice possibile per trovare le mutazione usando il *grafo di De Bruijn*. L'output è dello stesso formato del precedente algoritmo.

Algorithm 6 Algoritmo basato su *kmer* e *grafo di De Bruijn* per mutazioni

```

1: function CHECKMUTATION(seq1, seq2)
2:   if length(seq1)  $\neq$  length(seq2) then
3:     return ([ ],  $\perp$ )
4:   end if
5:   if length(seq1) == 0 or length(seq2) == 0 then
6:     return ([ ],  $\perp$ )
7:   end if
8:   muts  $\leftarrow$  [ ]
9:   seq1  $\leftarrow$  lowercase(seq1)
10:  seq2  $\leftarrow$  lowercase(seq2)
11:  i  $\leftarrow$  0
12:  dbg  $\leftarrow$  createDBG([seq1, seq2], 6)
13:  s  $\leftarrow$  startNodes(dbg)
14:  if length(s)  $\neq$  1 then
15:    push(muts, newMutation(label(s[0])[0], label(s[1])[0], 0))
16:    i  $\leftarrow$  i + 1
17:  end if
18:  curr  $\leftarrow$  s[0]
19:  while  $\top$  do
20:    if outDegree(curr) == 2 then
21:      l  $\leftarrow$  outLabel(curr)
22:      push(muts, newMutation(l[0], l[1], i + 5))
23:    end if
24:    if outdegree(curr) == 0 then
25:      break
26:    end if
27:    i  $\leftarrow$  i + 1
28:    curr  $\leftarrow$  nextNodes(curr)[0]
29:  end while
30:  return (muts,  $\top$ )
31: end function

```

Nel dettaglio, tralasciando quanto uguale alla prima versione:

- alla riga 11 si inizializza un indice che tiene conto della posizione della mutazione, tramite il numero di nodi del *grafo di De Bruijn* visitati

- alla riga 12 si crea il *grafo di De Bruijn* a partire dalla coppia di stringhe
- alla riga 13 si estrae il vettore di *nodi source*, senza archi entranti
- alle righe 14-17 si risolve l'assunzione per la quale la prima base può subire una mutazione. Qualora non si abbia un solo *nodo source* si aggiunge la mutazione che corrisponde ai primi simboli delle etichette di tali nodi, che possono essere solo due (non essendo uno) per le assunzioni fatte. Si incrementa quindi l'indice
- alla riga 18 si sceglie il primo *nodo source* (unico in assenza di mutazione in prima base) come nodo da cui far partire l'iterazione
- alle righe 19-31 si studia il grafo
- alle righe 20-27 qualora un nodo abbia due archi uscenti, essendo quindi in un nodo che inizia una **bubble**, si aggiunge la mutazione corrispondente alle etichette degli archi che portano a tali nodi. L'indice di tale mutazione è ottenuto tenendo conto dell'indice incrementato di 5, per lo stesso ragionamento della prima versione dell'esercizio
- alle righe 24-26 si interrompe lo studio del grafo qualora si sia giunti ad un *nodo sink*, senza archi uscenti. A questo è possibile solo grazie alle assunzioni fatte
- alle righe 27-28 si incrementa l'indice e ci si sposta al nodo successivo. Qualora fossimo in un nodo che inizia una **bubble** si sceglie di seguire uno dei due cammini, nel dettaglio il primo

Si noti che senza ulteriori assunzioni si perde esplicita referenza di quale base della mutazione appartiene alla sequenza di riferimento o a quella mutata, ma un controllo per capirlo è facilmente eseguibile usando l'indice della mutazione.

Esempio 5. Vediamo brevemente un esempio.
Siano date in input:

- *atcttgattaccgcccgaatc*
- *atcttacattaccgtcccaacc*

Si costruisce quindi il grafo a sinistra della figura 2.1.

Si parte dal nodo “atctt”. Si verifica che tale nodo ha due archi uscenti, etichettati con “g” e “a”. Si aggiunge quindi la mutazione (che avrà indice 5 essendo $i = 0$), si incrementa l’indice e si prosegue su uno dei due cammini, spostandosi su “tcttg”. Tale nodo ha un solo arco uscente quindi ci si sposta in “cttgc”. Si continua in questa maniera fino a che non si arriva ad un nodo privo di archi uscenti.

2.3 Versione 3

Potenzialmente, in fase di creazione del *grafo di De Bruijn*, potremmo tenere traccia degli archi che “saltano” le *bubble*, come in figura 2.2, per poter simulare qualcosa di analogo alla versione 1 dell’algoritmo, evitando di visitare nodi inutili. L’idea è quella di procedere saltando direttamente dall’inizio di una **bubble**, dopo aver aggiunto la mutazione, alla sua fine.

Ipotizziamo quindi che, in fase di costruzione del *grafo di De Bruijn*, ogni qual volta si riconosca l’inizio di una **bubble**, si provveda a creare, qualora la **bubble** si chiuda, un arco, di tipologia diversa rispetto a quelli standard del grafo (anche solo banalmente indicandolo con 2 anziché 1 nell’ipotetica matrice di adiacenza), che punti alla fine della **bubble** stessa. Ipotizziamo quindi l’aggiunta un metodo, dato un nodo n inizio di una **bubble** (quindi con `outDegree(n)==2`), che chiamiamo `toEndBubble(n)`. Tale metodo restituisce il nodo n' di fine **bubble** (il primo successivo con due archi entranti). Qualora `toEndBubble(n)` restituisca *null* si ha che la **bubble** non viene chiusa prima della fine del grafo, comportando che si è arrivati a fine computazione.

Il caso di prima base mutata rimane analogo alla versione precedente.

Il salto alla fine della **bubble** implica un comportamento pari a quello della prima versione dell’esercizio, comportando il medesimo aumento di indice per poter tener corretta traccia della posizione della mutazione.

Possiamo quindi indicare il nuovo pseudocodice dove si vedrà che la differenza rispetto alla versione 2 è che, qualora si sia in un nodo che inizia una **bubble**, il nodo seguente, dopo l’aggiunta della mutazione, non viene scelto come il primo di uno dei due cammini ma, alla riga 26, come il nodo che termina la **bubble**. L’indice viene incrementato in riga 27 di conseguenza. In generale si ha quindi un controllo che permette di capire se si è in un nodo che inizia una **bubble** o in uno con un solo nodo successivo e in tal caso si procede normalmente.

Algorithm 7 Algoritmo basato su *kmer*, *grafo di De Bruijn* e *bubble* per mutazioni

```

1: function CHECKMUTATION(seq1, seq2)
2:   if length(seq1)  $\neq$  length(seq2) then
3:     return ([ ],  $\perp$ )
4:   end if
5:   if length(seq1) == 0 or length(seq2) == 0 then
6:     return ([ ],  $\perp$ )
7:   end if
8:   muts  $\leftarrow$  [ ]
9:   i  $\leftarrow$  0
10:  seq1  $\leftarrow$  lowercase(seq1)
11:  seq2  $\leftarrow$  lowercase(seq2)
12:  dbg  $\leftarrow$  createDBG([seq1, seq2], 6)
13:  s  $\leftarrow$  startNodes(dbg)
14:  if length(s)  $\neq$  1 then
15:    push(muts, newMutation(label(s[0])[0], label(s[1])[0], 0))
16:    i  $\leftarrow$  i + 1
17:  end if
18:  curr  $\leftarrow$  s[0]
19:  while  $\top$  do
20:    if outDegree(curr)  $\neq$  2 then
21:      i  $\leftarrow$  i + 1
22:      curr  $\leftarrow$  nextNodes(curr)[0]
23:    else
24:      l  $\leftarrow$  outLabel(curr)
25:      push(muts, newMutation(l[0], l[1], i + 5))
26:      curr  $\leftarrow$  toEndBubble(curr)
27:      i  $\leftarrow$  i + 6
28:    end if
29:    if outDegree(curr) == 0 then
30:      break
31:    end if
32:  end while
33:  return (muts,  $\top$ )
34: end function

```

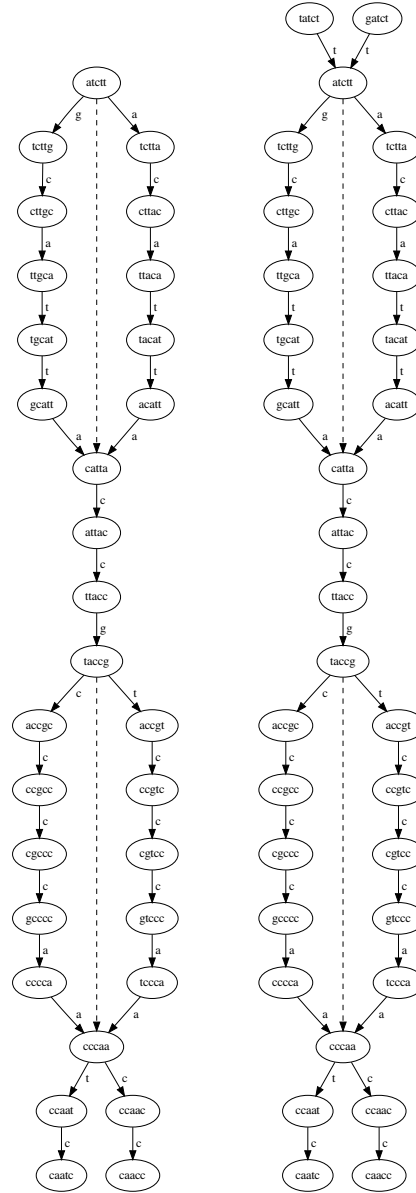


Figura 2.2: Grafi di De Bruijn relativi con i “salti” delle **bubble**, rispettivamente, ai due esempi della “versione 1”

Esempio 6. Vediamo brevemente un esempio.
Siano date le stringhe:

- *tatcttgcattaccgcccacaatc*

- *gatcttacattaccgtccaacc*

che sono relative al grafo di destra nella figura 2.2.

*Si segnala in primis la presenza dei due nodi iniziali “tatct” e “gatct” e quindi si provvede all’aggiunta della mutazione, di indice 0, con “t” e “g”. Ci si sposta quindi al nodo “atctt”, che presenta due archi uscenti. Essendo l’indice a 1 si aggiunge la mutazione a indice $1 + 5 = 6$ tra “g” e “a”. Sfruttando ora il “salto” della **bubble** ci si sposta al nodo “catta”. Tale nodo presenta un solo arco uscente e quindi di prosegue passando al nodo “attac”. Si prosegue così fino ad arrivare ad un nodo privo di archi uscenti, concludendo la computazione.*

Le due versioni coi *grafi di De Bruijn* sono state studiate per curiosità e per capire meglio la struttura, dal punto di vista didattico. Nel dettaglio, per questo problema, date le assunzioni, il calcolo del grafo comporta un costo computazionale aggiuntivo che risulta essere però superfluo.

Capitolo 3

Esercizio 3

La **distanza di Hamming** tra due stringhe, che si assumono di uguale lunghezza, è il numero di indici per i quali i due caratteri associati sulle due stringhe sono diversi. È quindi un conteggio delle sostituzioni necessarie per passare da una stringa all'altra.

Ipotizzando di voler studiare la distanza di Hamming tra due sequenze tramite la griglia estesa si può ipotizzare di ragionare solo in termini di una delle due sequenze, ovvero considerare i pesi degli archi in ottica di una sola delle due sequenze. Si associano quindi i seguenti pesi, come in figura 3.1:

- $w(diagonale) = 0$
- $w(verticale) = 0$
- $w(orizzontale) = 1$

o, in modo speculare se si vuole ragionare sull'altra sequenza:

- $w(diagonale) = 0$
- $w(verticale) = 1$
- $w(orizzontale) = 0$

Dove, in entrambi i casi, gli archi diagonali rappresentano un match mentre, a seconda, gli archi verticali o quelli orizzontali tengono conto dei mismatch. A questo punto si cerca il cammino di peso minimo che parte dal nodo *source*, posto in alto a sinistra, e arriva al nodo *sink*, posto in basso a destra. Essendo il nodo sink in posizione (n, n) , assumendo le due sequenze lunghe n , garantisco che, calcolando il cammino che parte dal nodo source $(0, 0)$ e arriva in quel nodo, si abbia il valore della distanza di Hamming, che prevede stringhe

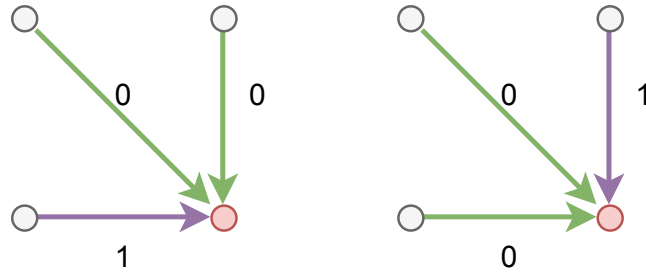


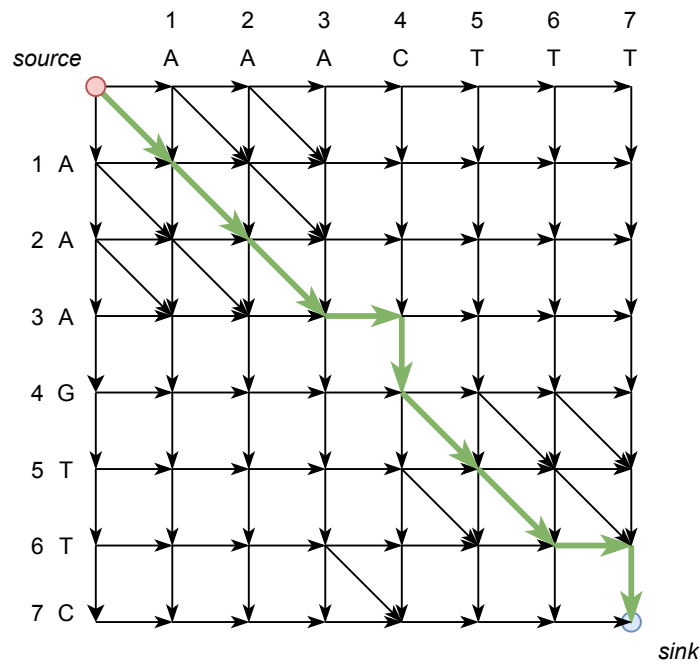
Figura 3.1: Rappresentazione grafica dei pesi degli archi.

di ugual lunghezza. I vari valori degli altri nodi sono da considerarsi “temporanei” e non rappresentanti una distanza di Hamming. Potenzialmente però tutti e soli i nodi (i, i) , con $i \in [1, n)$, oltre quindi al nodo sink, potrebbero essere i nodi di fine di potenziali cammini dal source per calcolare la distanza di Hamming tra le sottostringhe di lunghezza i delle due stringhe in input.

Esempio 7. *Prendendo, ad esempio, in input:*

- AAAGTTC
- AAAC TTT

Si ha un cammino minimo (non l'unico), assumendo costo degli archi in orizzontale pari a 1 e in verticale pari a 0, del tipo:



Dove in verde è segnato il cammino minimo scelto. Avendo solo due archi orizzontali, che ricordiamo avere peso 1 mentre gli altri hanno peso nullo, possiamo concludere che la distanza di Hamming tra le due stringhe è pari a 2.

Per il ragionamento fatto sopra, se mi fermassi in (3,3), per $i = 3$, avrei la distanza di Hamming tra AAA e AAA. Il cammino dal source a (3,3) è formato da sole diagonali e quindi ha costo 0, che è appunto la distanza di Hamming tra le due sottostringhe.

Capitolo 4

Esercizio 4

Il problema della **longest common substring** si pone l'obiettivo di estrarre, a partire da due stringhe di lunghezza arbitraria, anche non uguale, la sottostringa, comune ad entrambe, più lunga.

Dal punto di vista della griglia si assegnano i seguenti pesi (come da figura 4.1):

- $w(\text{diagonale}) = 1$
- $w(\text{verticale}) = -i$
- $w(\text{orizzontale}) = -j$

Dove gli archi diagonali rappresentano un match ed i e j sono gli indici che scorrono le due stringhe, ovvero rispettivamente sulle righe e sulle colonne.

Si assume che i nodi abbiano valore $x \geq 0$ quindi **qualora si ottenga un valore negativo come risultato dopo l'attraversamento dell'arco viene messo il valore 0**.

Quando si ha un match quindi il nodo finale ha valore pari a uno più il valore

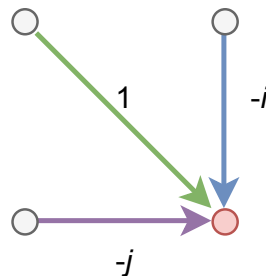


Figura 4.1: Rappresentazione grafica dei pesi degli archi. Si ricorda che nel nodo finale, in rosso, posso comunque avere solo valori ≥ 0

del nodo sorgente dell'arco diagonale.

Si ragiona quindi tenendo traccia del valore massimo raggiunto, tenendo traccia, per una maggior efficienza, anche delle coordinate. Una volta completata la griglia si avrà che il valore massimo corrisponde al nodo *sink* del cammino composto dalla più lunga sequenza possibile di archi diagonali consecutivi. Qualsiasi altra “operazione”, con archi orizzontali o diagonali, comporta infatti una perdita di punteggio e ogni volta che un cammino diagonale termina viene azzerato il punteggio, tramite pesi negativi pesati sugli indici. Azzerando ogni volta si permette di avere la costruzione di un eventuale cammino diagonale che assegna man mano il valore corrispondente alla lunghezza del cammino stesso, avendo che la diagonale pesa 1. Il valore massimo quindi altro non è che la lunghezza della *longest common substring*. Sapendo che archi diagonali corrispondono a match tra le due sequenze si ottiene che tale cammino corrisponde alla *longest common substring*.

Volendo si può scegliere di salvare in un vettore i valori massimi qualora coincidano, per ottenere eventuali più *longest common substring* qualora ce ne siano.

In altri termini si cerca il sottocammino più pesante.

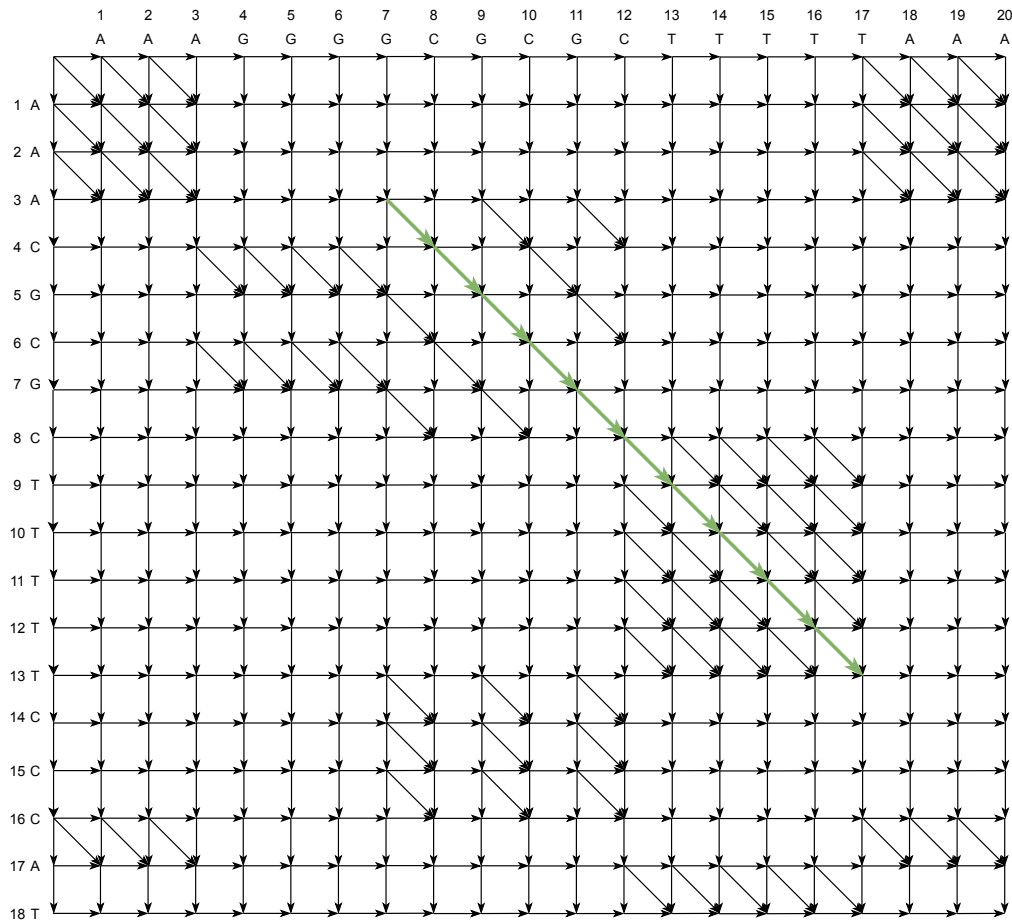
ipotizzando di non “azzerare” ogni volta in caso di mismatch otterrei comunque una griglia dover il nodo massimo mi permetterebbe di risalire la diagonale ritrovando la *longest common substring* ma tale nodo non potrebbe avere come valore la lunghezza della stessa, in quanto non ricomincerei il conto da 0 ogni volta che creo un nuovo cammino fatto di diagonali. Per ricostruire la *longest common substring* si parte dal nodo *sink*, come detto definito dal valore massimo calcolato. Si aggiunge il carattere corrispondente e si risale tutto il cammino diagonale, aggiungendo di volta in volta in testa il carattere letto. Ci si ferma quindi quando non si ha più un nodo il cui punteggio è stato ottenuto tramite un arco diagonale.

Esempio 8. Vediamo quindi un esempio pratico. Siano date:

- AAACGCGCTTTTCCCAT
- AAAGGGGCGCGCTTTTAAA

Capitolo 4. Esercizio 4

Si costruisce quindi la griglia e si identifica il cammino diagonale più lungo:



Ricostruendo si ha che tale cammino identifica un massimo pari a 10. Il sottocammino più pesante è quindi quello rappresentato in verde. Ipotizzando quindi di poter “risalire” la dialogale si ricostruisce:

CGCGCTTTTT

che è appunto la longest common substring delle due sequenze in input.

Capitolo 5

Link al codice

Durante lo svolgimento dell'assignment è stato elaborato anche il codice in *Rust* per i vari esercizi, con i vari unit test correlati. In merito al codice relativo ai grafi di De Bruijn si specifica che alcuni metodi sono possibili solo grazie alle assunzioni fatte in merito all'esercizio 2.

Il codice, insieme al \TeX di questa relazione, è disponibile nella repository (a partire dalla data di scadenza dell'assignment): https://github.com/dlcgold/es_bio.

Per eseguire i test:

```
> cd 1/esbio
> cargo test
```

Per eseguire i test con alcune stampe:

```
> cd 1/esbio
> cargo test -- --nocapture
```

Per visualizzare la piccola documentazione:

```
> cd 1/esbio
> cargo doc --open
```