



# UNIVERSITÀ DI TRENTO

Dipartimento di Ingegneria e Scienza dell'Informazione

Corso di Laurea in  
Informatica

ELABORATO FINALE

## ANALYSIS OF RNA-SEQ TRANSCRIPTOMIC DATA FROM TOTAL AND POLYSOMAL mRNA FRACTIONS FROM AN EPITHELIAL CANCER CELL LINE

Supervisore

.....

Laureando

Giacomo Fantoni

Anno accademico 2020/2021

# Ringraziamenti

*...thanks to...*

# Indice

<b>Sommario</b>	<b>2</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>2</b>
1.1 TransSNPs . . . . .	2
1.2 Sbilanciamento allelico . . . . .	2
1.2.1 Profilamento polisomico . . . . .	2
<b>2 Linee cellulari e condizioni</b>	<b>2</b>
2.1 HCT116 . . . . .	2
2.1.1 DHX30 . . . . .	2
2.1.2 PCBP2 . . . . .	2
2.2 Trattamenti . . . . .	3
2.2.1 DMSO . . . . .	3
2.2.2 Nutlin . . . . .	3
<b>3 Processamento dei dati</b>	<b>3</b>
3.1 Pre-processamento e allineamento dei dati RNA-seq . . . . .	4
3.1.1 Trimmomatic . . . . .	4
3.1.2 Star . . . . .	5
3.1.3 Samtools . . . . .	5
3.1.4 Deduplicazione e ricalibrazione . . . . .	5
3.2 Ottenimento degli SNP di interesse . . . . .	7
3.3 Calcolo dei dati di sbilanciamento allelico . . . . .	8
<b>4 Analisi dei dati</b>	<b>8</b>
4.1 Conta degli SNP trovati con ASEQ . . . . .	8
4.2 Considerazioni sulla recalibrazione . . . . .	8
4.3 Ottenere i dati per gli SNP di interesse . . . . .	8
4.4 Analisi degli sbilanciamenti di frazione allelica . . . . .	8
4.5 Conclusioni . . . . .	8
<b>Bibliografia</b>	<b>8</b>
<b>A Titolo primo allegato</b>	<b>10</b>
A.1 Titolo . . . . .	10
A.1.1 Sottotitolo . . . . .	10
<b>B Titolo secondo allegato</b>	<b>11</b>
B.1 Titolo . . . . .	11
B.1.1 Sottotitolo . . . . .	11

# Sommario

Sommario è un breve riassunto del lavoro svolto dove si descrive l'obiettivo, l'oggetto della tesi, le metodologie e le tecniche usate, i dati elaborati e la spiegazione delle conclusioni alle quali siete arrivati.

Il sommario dell'elaborato consiste al massimo di 3 pagine e deve contenere le seguenti informazioni:

- contesto e motivazioni
- breve riassunto del problema affrontato
- tecniche utilizzate e/o sviluppate
- risultati raggiunti, sottolineando il contributo personale del laureando/a

## 1 Introduzione

Questo capitolo è volto a descrivere i processi biologici considerati durante il progetto. Cito principalmente dal draft paper sui transSNPS

### 1.1 TransSNPs

Definizione di SNP e loro impatto. Descrizione degli SNP considerati in questo esperimento.

### 1.2 Sbilanciamento allelico

Definizione di sbilanciamento allelico e perchè viene considerato.

#### 1.2.1 Profilamento polisomico

Come si identifica lo sbilanciamento allelico.

## 2 Linee cellulari e condizioni

Descrizione delle linee cellulari e dei materiali utilizzati.

### 2.1 HCT116

Descrizione della linea cellulare e motivazione del suo utilizzo.

#### 2.1.1 DHX30

Funzione di DHX30, cosa ne è stato fatto nei campioni e motivazioni dietro alla scelta.

#### 2.1.2 PCBP2

Funzione di PCBP2, cosa ne è stato fatto nei campioni e motivazioni dietro alla scelta.

## 2.2 Trattamenti

### 2.2.1 DMSO

Descrizione del trattamento e motivazioni.

### 2.2.2 Nutlin

Descrizione del trattamento e motivazioni.

## 3 Processamento dei dati

Dopo aver definito in §1 l'obiettivo di questo progetto si deve definire una pipeline che, da dati di sequenziamento di RNA e da una lista di SNP esonici sia in grado di fornire le istanze di espressione allele-specifica. Questa pipeline viene definita basandosi su quella presentata in [1] e si compone pertanto di tre fasi principali:

1. Pre-processamento e allineamento dei dati di RNA-seq, con eventuale deduplicazione e ricalibrazione.
2. Analisi di dati *WES* in modo da ottenere una lista di possibili SNP esonici da considerare.
3. Calcolo dei dati di sbilanciamento allelico.

La figura 3 è una visualizzazione della pipeline e dei tool utilizzati.

Essendo infine che questo lavoro prevede il processamento di un gran numero di file, unito al fatto che i tool utilizzati sono stati implementati con una integrazione con le pipe di unix e con la possibilità di essere eseguiti in multi-threading è stato di fondamentale importanza l'utilità `parallel` [2]. In particolare nel caso di STAR<sup>1</sup> è stato notato una diminuzione lineare delle performance per thread del tool. L'abbassamento delle performance è stato risolto grazie a `parallel`, lanciando più istanze parallele del tool, ognuna di esse con pochi thread. Si nota pertanto che `parallel` permette non solo un'elegante implementazione della pipeline, ma fornisce un livello di controllo tale da sfruttare completamente la potenza computazionale disponibile, riducendo in questo modo il tempo globale di esecuzione.

---

<sup>1</sup>§3.1.2

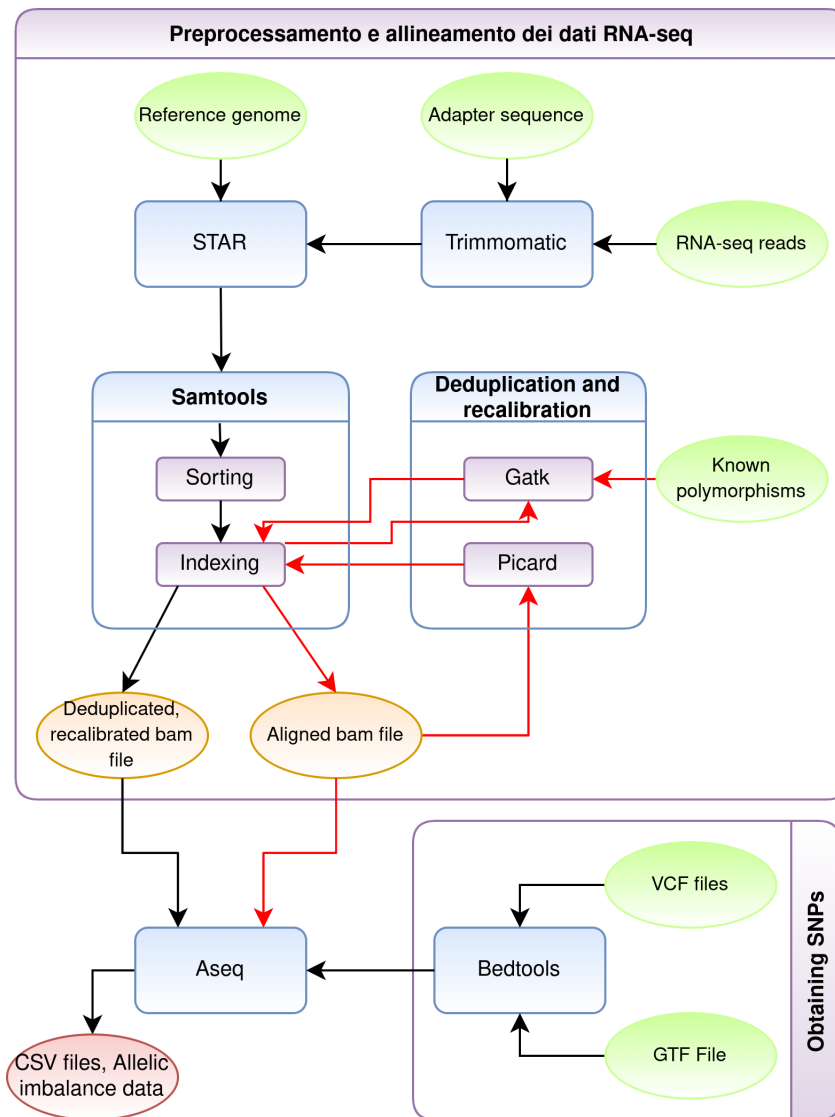


Figura 3.1: Pipeline per l'ottenimento dei dati di allelic imbalance

### 3.1 Pre-processamento e allineamento dei dati RNA-seq

Il primo passo della pipeline appena definita è il pre-processamento e l'allineamento dei dati RNA-seq. L'input della pipeline sono dei file *FASTQ*, ovvero file di testo che contengono i dati di sequenziamento raccolti in laboratorio tipicamente compressi. Questi file vengono modificati dai tool Trimmomatic, Star e Samtools in modo da produrre un output già utilizzabile per ottenere i dati di sbilanciamento allelico. Opzionalmente l'output può subire ulteriori modifiche prima di passare alla prossima fase: in particolare può essere deduplicato e ricalibrato.

#### 3.1.1 Trimmomatic

Trimmomatic [3] è il primo tool ad essere utilizzato. Il suo obiettivo è quello di eliminare dalle reads la sequenza adattatrice, o suoi frammenti, utilizzata per rendere possibile il sequenziamento. Essendo le RNA-seq fornite a single-ends<sup>2</sup> viene utilizzata la simple mode del tool. Questa scansiona ogni read<sup>3</sup> dalla terminazione 5' alla 3' per determinare la presenza della sequenza adattatrice. Utilizza il metodo "seed and extend" per trovare corrispondenze iniziali, anche non perfette, tra la read e la sequenza adattatrice. Successivamente svolge un allineamento locale e se questo ha uno score maggiore di una soglia viene rimosso insieme alla porzione successiva ad esso. Questa modalità permette di identificare ogni sequenza adattatrice in ogni luogo della read a patto che l'allineamento sia abbastanza lungo e la

<sup>2</sup>Punta a spiegazione nel capitolo 1

<sup>3</sup>Non so se metterla in italiano

read abbastanza accurata. Si nota però come nelle regioni dove solo una corta corrispondenza parziale è possibile come alle estremità della read e pertanto i contaminanti non possono essere identificati attendibilmente. Oltre alla rimozione delle sequenze adattatrici Trimmomatic tronca un'estremità secondo un algoritmo di filtraggio secondo qualità. Tra i metodi forniti dallo strumento è stato utilizzato quello del "sliding window quality filtering": scansiona la read dal 5' e rimuove la terminazione 3' quando la qualità media di un gruppo di basi scende sotto una soglia specificata. Il risultato di questo passaggio sarà un altro fastq file con le sequenze adattatrici rimosse.

### 3.1.2 Star

Star (spliced transcript alignment to a reference) [4] è il secondo tool della pipeline. Prende come input il file fastq generato da Trimmomatic e un genoma di reference<sup>4</sup> e allineando il primo al secondo. Questo tool è stato creato con l'obiettivo di allineare RNA-seq di media-grande lunghezza, a differenza dei suoi competitori che, essendo creati a partire da allineatori per dati di DNA, hanno un maggiore tasso di errore. Questo avviene a causa degli eventi di splicing che avvengono nella creazione delle molecole di mRNA. Star pertanto si prefigge di permettere un allineamento accurato di reads che contengono mal-accoppiamenti, inserzioni o delezioni causati da variazioni genomiche o errori di sequenziamento mappando contemporaneamente sequenze derivate da regioni genomiche non contigue unite da eventi di splicing. Per farlo utilizza un algoritmo in due fasi. La prima fase o *seed search* consiste della ricerca sequenziale di *Maximal Mappable Prefix MMP*. Data una sequenza  $R$ , una regione  $i$  e un genoma di reference  $G$ ,  $MMP(R, i, G)$  è la più lunga sottostringa  $(R_i, R_{i+1}, \dots, R_{i+MMP-1})$  che corrisponde esattamente a una o più sottostringhe di  $G$ .  $MMP$  è la massima lunghezza mappabile. Questo permette un'identificazione di giunzioni di splicing senza nessuna conoscenza a priori. L'implementazione attraverso *Uncompressed suffix arrays* causa alla complessità dell'algoritmo di scalare logaritmicamente con la lunghezza del genoma di reference. Gli array sono non compressi per permettere tempi di ricerca più veloci, ma causano un aumento del consumo di memoria. La seconda fase o *clustering, stitching and scoring* consiste nel costruire allineamenti dell'intera sequenza di reads unendo tutti i seed allineati al genoma nella prima fase. In primo luogo i seed sono raggruppati insieme secondo la vicinanza a un seed ancora selezionato limitando il numero di loci genomici a cui questo si allinea. Successivamente tutti i seed mappati nella *genomic window* sono uniti insieme assumendo un modello lineare locale di trascrizione. Questo processo di unione viene inoltre guidato da un sistema di punteggi che penalizza mal-accoppiamenti, inserzioni, delezioni e *splice junction gap*. Star ha come output un sam file, un file di testo delimitato da tabulazioni contenente una riga per allineamento con tutte le informazioni necessarie per la sua identificazione.

### 3.1.3 Samtools

I samtools [5] sono un insieme di programmi necessari per interagire con i dati di sequenziamento. Nella pipeline sono utilizzati per compiere delle operazioni sui sam file generati da Star<sup>5</sup> in modo da prepararli prima che possano essere utilizzati successivamente per generare i dati di sbilanciamento allelico<sup>6</sup>. In particolare svolgono le operazioni di ordinamento, indicizzazione e compressione dei file di input. Questo avviene attraverso due programmi: samtools sort [6] e samtools index [7]. Il primo ordina gli allineamenti secondo le coordinate di inizio e comprime implicitamente l'input in formato bam. Il secondo invece crea, a partire dall'output del programma sort un indice in formato bai di tale file, permettendo efficienti operazioni di accesso casuale al bam file. L'output finale è un bam file ordinato e indicizzato che può essere utilizzato come input di aseq.

### 3.1.4 Deduplicazione e ricalibrazione

La deduplicazione e la ricalibrazione sono due processi ulteriori di pre-processamento dei dati che tentano di risolvere errori presenti nei bam file che sono stati allineati attraverso star<sup>7</sup>. Questi due passaggi vengono svolti attraverso una serie di tools eseguiti sequenzialmente come si nota nella figura 3.1.4.

---

<sup>4</sup>Anche qui lo lascio in italiano?

<sup>5</sup>Vedi §3.1.2

<sup>6</sup>Vedi §3.3

<sup>7</sup>Vedi §3.1.2

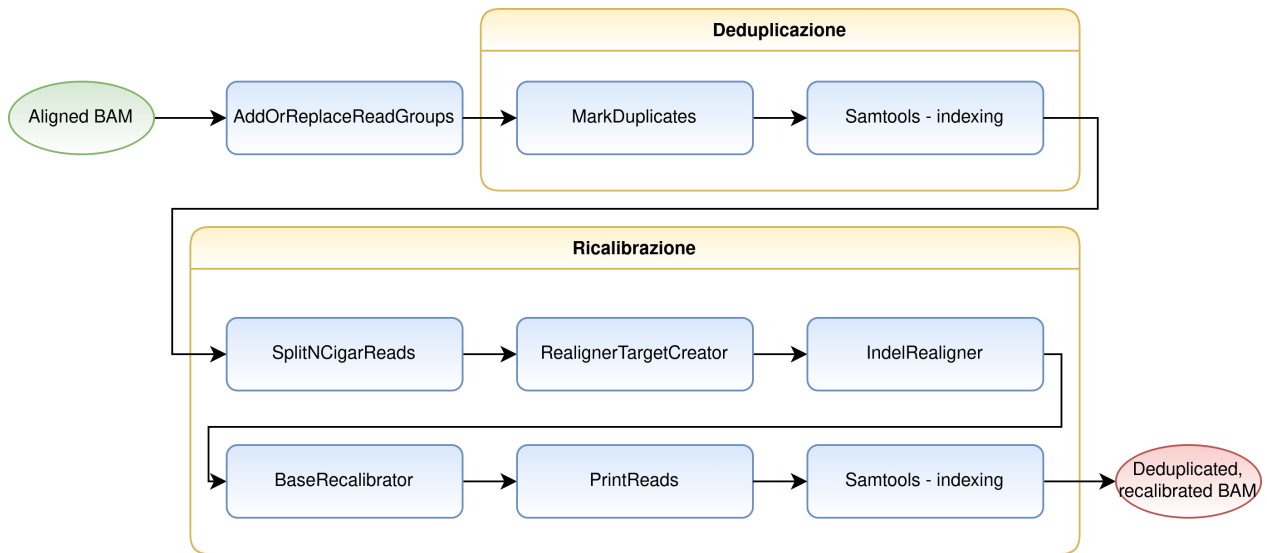


Figura 3.2: Pipeline di deduplicazione e ricalibrazione

Come si nota il primo passaggio viene svolto dal tool *AddOrReplaceReadGroups* di Picard[8], un passaggio di preparazione delle read necessario a tutti i tool successivi. Questo assegna tutte le reads in un file a un nuovo read-group settando un campo nel BAM file, in modo da assegnare tutte le reads a un genotipo specifico.

## Deduplicazione

Si definiscono come read duplicate in un BAM file delle read che si generano da un singolo frammento di RNA. Possono originarsi durante la preparazione del campione, per esempio durante la costruzione della libreria attraverso PCR o risultare da un singolo cluster di amplificazione, identificato incorrettamente come cluster multipli dal sensore ottico dello strumento di sequenziamento. Il processo di deduplicazione è stato svolto attraverso il *MarkDuplicates* di Picard. Il programma compara le sequenze nelle posizioni 5' sia delle reads che dei read-pairs. Dopo che ha trovato tutti le reads duplicate queste vengono ordinate secondo la somma dei punteggi di qualità delle basi. La read con il punteggio più alto viene considerata primaria, le altre duplicate. Grazie all'opzione *REMOVE\_DUPLICATE=true* tutte le sequenze duplicate vengono rimosse. Viene infine ricreato l'indice del BAM file attraverso *samtools index*.

## Ricalibrazione

La ricalibrazione viene svolta da una serie di tool facenti parte della suite Gatk [9]. Il processo si compone di diverse fasi:

1. Riallineamento degli indels.
2. Ricalibrazione delle basi basata sul punteggio di qualità.

Il primo passaggio, svolto dal tool *SplitNCigarReads*, progettato specificatamente per dati di RNA-seq è necessario per il corretto funzionamento degli step successivi. In un file BAM di RNA-seq infatti si trovano stringhe *CIGAR* che descrivono come una base in ogni reads è mappata. Il valore *N* corrisponde a una base saltata sul genoma di reference<sup>8</sup>. Nel caso di RNA-seq tali basi possono corrispondere o a sequence introniche, non presenti nel RNA a causa dello splicing o a sequenze di “overhang”<sup>9</sup>. *SplitNCigarReads* elimina le basi corrispondenti a una *N* creando dalla reads di partenza due reads, una a sinistra e una a destra della base rimossa. Come risultato gli esoni del RNA vengono separati in segmenti e gli overhang eliminati in modo da non causare falsi positivi.

<sup>8</sup>Probabilmente in italiano

<sup>9</sup>Magari una definizione di overhang



Dopo questo lavoro di processamento inizia la fase di riallineamento degli indels. Il riallineamento locale degli indels è necessario in quanto permette di correggere errori generati dall'allineatore genomico. Questi errori si generano in quanto gli allineatori genomici considerano ogni read indipendentemente e le strategie di assegnazione dei punteggi limitano la loro abilità di allineare accuratamente nella presenza di indels. Il processo di allineamento locale considera invece tutte le letture che attraversano una posizione in modo da ottenere un consenso di alto punteggio che supporta la presenza di un evento di indel. Il riallineamento viene svolto attraverso l'utilizzo di due tool: *RealignerTargetCreator* e *IndelRealigner*. Il primo prende come input un BAM file ordinato e indicizzato. A partire dal file genera un file di output formato da una lista a una colonna contenente gli intervalli, che rappresentano siti di indel potenziali. Se sono prossimali i siti sono uniti in un intervallo unico. Il secondo prende come input lo stesso BAM di *RealignerTargetCreator* e il file di intervalli appena generato e svolge un riallineamento locale sulle reads coincidenti con l'intervallo target usando consensi dagli indel presenti nell'allineamento originale. L'output è un BAM ordinato e indicizzato.

Il processo di ricalibrazione delle basi basato sul punteggio di qualità serve a risolvere errori generati durante il sequenziamento. Si definisce il punteggio di qualità di una base come una stima dell'errore emesso dalla macchina di sequenziamento: esprimono quanto questa è confidente che ha chiamato la base corretta ogni volta. Questi punteggi sono soggetti a varie sorgenti di errori tecnici dovuti alla fisica o alla chimica di come una reazione di sequenziamento funziona o a difetti nell'equipaggiamento. Gli errori portano pertanto a una sottostima o sovrastima (tipicamente la seconda) del punteggio di qualità fornito dal macchinario di sequenziamento. Per tentare di risolvere si utilizza machine learning per modellarli empiricamente a modificare i valori di qualità migliorarne la veridicità. La ricalibrazione delle basi avviene attraverso l'utilizzo di due tool. Il primo *BaseRecalibrator* costruisce un modello di covarianza da un BAM e da un insieme di varianti conosciute in un file VCF e lo salva in un file. Le varianti conosciute sono usate per mascherare basi ai siti di variazioni aspettate in modo da non considerarle come errori. Al di fuori di queste eccezioni ogni mal-accoppiamento viene contato come un errore. Per costruire il modello di ricalibrazione il tool tabula i dati del BAM secondo il read group, il punteggio di qualità, il ciclo della macchina che ha prodotto la base, la base corrente e successiva. Successivamente si conta il numero di basi e quanto spesso queste hanno un mal-accoppiamento con la base di reference. Il secondo tool *PrintReads* applica il modello creato dal primo al BAM di input, aggiornando così ai punteggi di qualità migliorati. Infine viene ricreato l'indice del BAM file attraverso *samtools index*.

In questo modo si è creato un file BAM pronto per essere utilizzato da ASEQ.

## 3.2 Ottenimento degli SNP di interesse

Una volta ottenuti i file di allineamento si rende necessario ottenere una lista di SNP dei quali si vuole ottenere il valore di sbilanciamento allelico. Per ottenere questi dati sono stati utilizzati un file GTF ottenuto da<sup>10</sup> contenente informazioni sulla porzione esonica del genoma umano e da un insieme di VCF divisi per cromosoma contenenti le informazioni riguardo le varianti ottenute negli esseri umani. Dopo aver ristretto i VCF agli SNP sono stati intersecati con il file GTF. L'intersezione è stata fatta dal tool *bedtools intersect*, facente parte della suite *bedtools*<sup>11</sup>. Questo tool ha permesso di trovare ogni record del VCF presente anche nel GTF. In questo modo è stato creato un insieme di file VCF, uno per ogni cromosoma, contenente ogni SNP presente nella parte esonica del genoma. La restrizione alla parte esonica del genoma non causa alcuna perdita di potere predittivo in quanto si stanno considerando dati di RNA-seq e permette una significativa diminuzione del carico computazionale svolto da *aseq*<sup>12</sup>. I VCF risultanti da questo processo sono pronti per essere utilizzati come input di *aseq*<sup>12</sup>.

---

<sup>10</sup>Mettere da dove si è ottenuto

<sup>11</sup>Inserisci sito

<sup>12</sup>riferimento ad *aseq*

### 3.3 Calcolo dei dati di sbilanciamento allelico

Per computare i valori di sbilanciamento allelico è stato utilizzato aseq [10]. Questo tool tenta di risolvere alcune limitazioni di altri programmi di analisi di espressione allelo-specifica. Non richiede infatti informazioni genomiche dei genitori dell'individuo e non si basa unicamente sui dati di RNA-seq. Aseq in particolare utilizza dati di sequenziamento di prossima generazione trascrittomici e genomici accoppiati per superare queste limitazioni. È stato implementato sfruttando l'API di samtools, permettendo rapide funzionalità di accesso casuale su file di allineamento indicizzati, combinandolo con il potere di computazione multi-threaded. Delle modalità che aseq fornisce è stata utilizzata quella principale di analisi ASE. Il preprocessing e allineamento dei dati RNA-seq ha portato alla creazione di due insiemi di file di allineamento in formato bam. Ogni campione<sup>13</sup> viene rappresentato nei due insiemi da un file in ognuno: uno dalla pipeline che termina con l'utilizzo di star<sup>14</sup>, mentre l'altro ha subito il processo di deduplicazione e ricalibrazione. Inoltre grazie ai file VCF si ha una lista degli SNP esonici nella specie divisi per cromosoma: i 22 autosomi, *X* e il DNA mitocondriale. Per ogni file di allineamento e per ogni file VCF si esegue aseq in modo da generare per ogni campione una lista di eventi di sbilanciamento allele-specifico divisi per cromosoma.

## 4 Analisi dei dati

### 4.1 Conta degli SNP trovati con ASEQ

Discussione dei risultati di ASEQ.

### 4.2 Considerazioni sulla ricalibrazione

Discussione dei risultati di ASEQ prima e dopo la ricalibrazione

### 4.3 Ottenere i dati per gli SNP di interesse

Discussione degli SNP con i dati necessari per lo studio e scelta degli SNP di interesse.

### 4.4 Analisi degli sbilanciamenti di frazione allelica

Analisi finali.

### 4.5 Conclusioni

---

<sup>13</sup>Riferimento a campione

<sup>14</sup>riferimento a star

# Bibliografia

- [1] Alessandro Romanel. Allele-specific expression analysis in cancer using next-generation sequencing data. *Krasnitz A. (eds) Cancer Bioinformatics. Methods in Molecular Biology*, 1878:125–137, 2019.
- [2] O. Tange. Gnu parallel - the command-line power tool. *login: The USENIX Magazine*, 36(1):42–47, Feb 2011.
- [3] Anthony M. Bolger, Marc Lohse, and Bjoern Usadel. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15):2114–2120, 04 2014.
- [4] Alexander Dobin, Carrie A. Davis, Felix Schlesinger, Jorg Drenkow, Chris Zaleski, Sonali Jha, Philippe Batut, Mark Chaisson, and Thomas R. Gingeras. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1):15–21, 10 2012.
- [5] Samtools. <http://www.htslib.org/>. ultimo accesso 01/08/2021.
- [6] Documentazione per samtools sort. <http://www.htslib.org/doc/samtools-sort.html>. ultimo accesso 01/08/2021.
- [7] Documentazione per samtools index. <http://www.htslib.org/doc/samtools-index.html>. ultimo accesso 01/08/2021.
- [8] Picard. <https://broadinstitute.github.io/picard/>. ultimo accesso 01/08/2021.
- [9] Gatk. <https://gatk.broadinstitute.org>. ultimo accesso 01/08/2021.
- [10] Alessandro Romanel, Sara Lago, D. Prandi, A. Sboner, and F. Demichelis. Aseq: fast allele-specific studies from next-generation sequencing data. *BMC Medical Genomics*, 8, 2015.

# Allegato A    Titolo primo allegato

## A.1    Titolo

### A.1.1    Sottotitolo

# Allegato B    Titolo secondo allegato

## B.1    Titolo

### B.1.1    Sottotitolo