



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

Sommario	3
1 Introduzione	3
1.1 TransSNPs	3
1.2 Sbilanciamento allelico	3
1.2.1 Profilamento polisomico	3
2 Linee cellulari e condizioni	3
2.1 HCT116	3
2.1.1 DHX30	3
2.1.2 PCBP2	3
2.2 Trattamenti	4
2.2.1 DMSO	4
2.2.2 Nutlin	4
3 Processamento dei dati	4
3.1 Pre-processamento e allineamento dei dati RNA-seq	5
3.1.1 Trimmomatic	5
3.1.2 Star	6
3.1.3 Samtools	6
3.1.4 Deduplicazione e ricalibrazione	6
3.2 Analisi dei dati WES	7
3.2.1 Bedtools	7
3.3 Dati disponibili	7
3.3.1 Sequenze biologiche	7
3.3.2 Genoma di riferimento	7
3.3.3 Variant call	7
3.3.4 Struttura dei geni	7
3.4 Troncatura e allinamento	7
3.4.1 Troncatura	7
3.4.2 Allineamento	7
3.4.3 Ordinamento	7
3.4.4 Indicizzazione	8
3.5 Deduplicazione, riallinamento e recalibrazione	8
3.5.1 Deduplicazione	8
3.5.2 Riallineamento e recalibrazione	8
3.6 Ottenere le varianti alleliche	8
3.7 Ottenere i dati delle frazioni alleliche	8
3.7.1 Filtrare le frazioni alleliche	8
3.8 Ottenere gli SNP nel 3'-UTR	8

4	Analisi dei dati	8
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
	Bibliografia	8
A	Titolo primo allegato	10
A.1	Titolo	10
A.1.1	Sottotitolo	10
B	Titolo secondo allegato	11
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 di *WES*¹ sia in grado di fornire le istanze di espressione allelo-specifica. Questa pipeline viene definita basandosi su quella presentata in [3] 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. Ottenimento 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 [4]. In particolare nel caso di STAR² 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.

¹SEMPRE DEFINITO NEL CAPITOLO 1

²§3.1.2

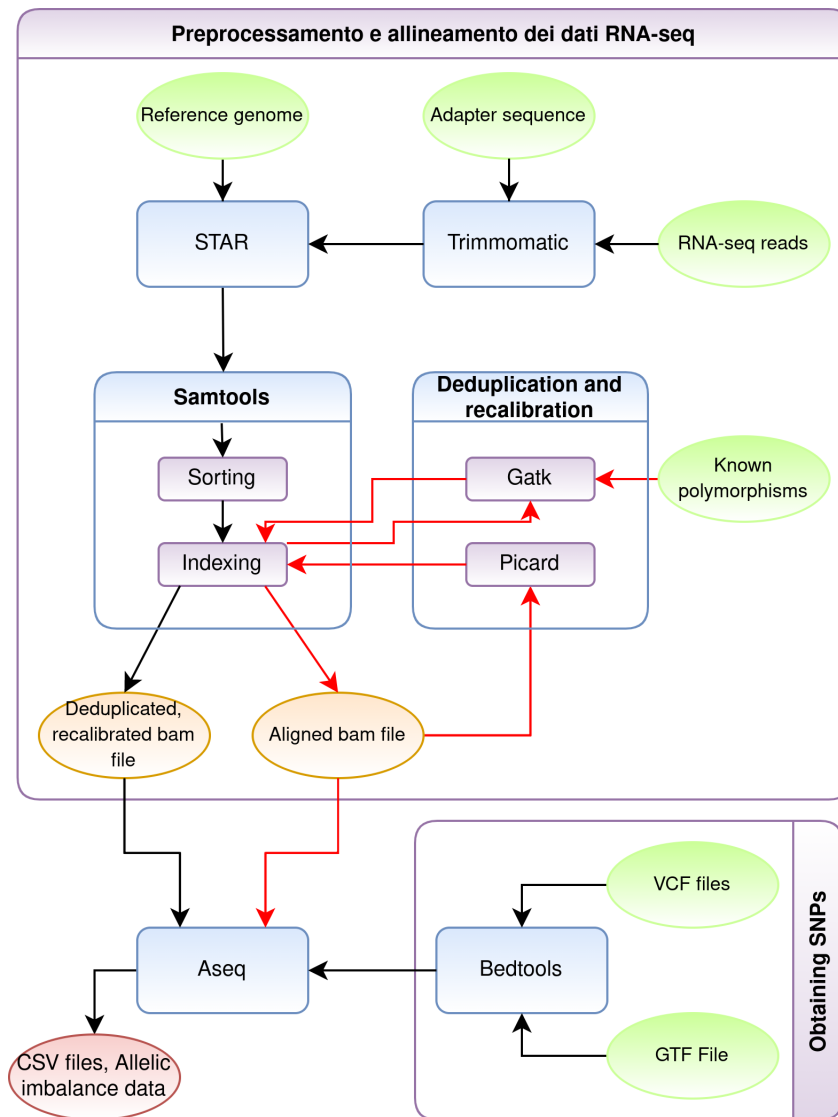


Figura 3.1: Pipeline per l'ottenimento dei dati di allelic imbalance

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 [1] 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-ends³ viene utilizzata la simple mode del tool. Questa scansiona ogni read⁴ 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

³Spiega cosa sono

⁴Non 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) [2] è il secondo tool della pipeline. Prende come input il file fastq generato da Trimmomatic e un genoma di reference⁵ 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 . MML 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 samtools⁶ 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 Star⁷ in modo da prepararli prima che possano essere utilizzati successivamente da ASEQ⁸. In particolare svolgono le operazioni di ordinamento, indicizzazione e compressione dei file di input. Questo avviene attraverso due programmi: samtools sort e samtools index. 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 ASEQ⁹ per generare i dati di sbilanciamento allelico.

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 star¹⁰. Questi due

⁵ Anche qui lo lascio in italiano?

⁶ Necessario citare i siti della documentazione

⁷ Mettere riferimento a Star

⁸ Riferimento ad ASEQ

⁹ riferimento ad aseq

¹⁰ Riferimento a star

passaggi vengono svolti attraverso una serie di tools eseguiti sequenzialmente come si nota nella figura 3.1.4.

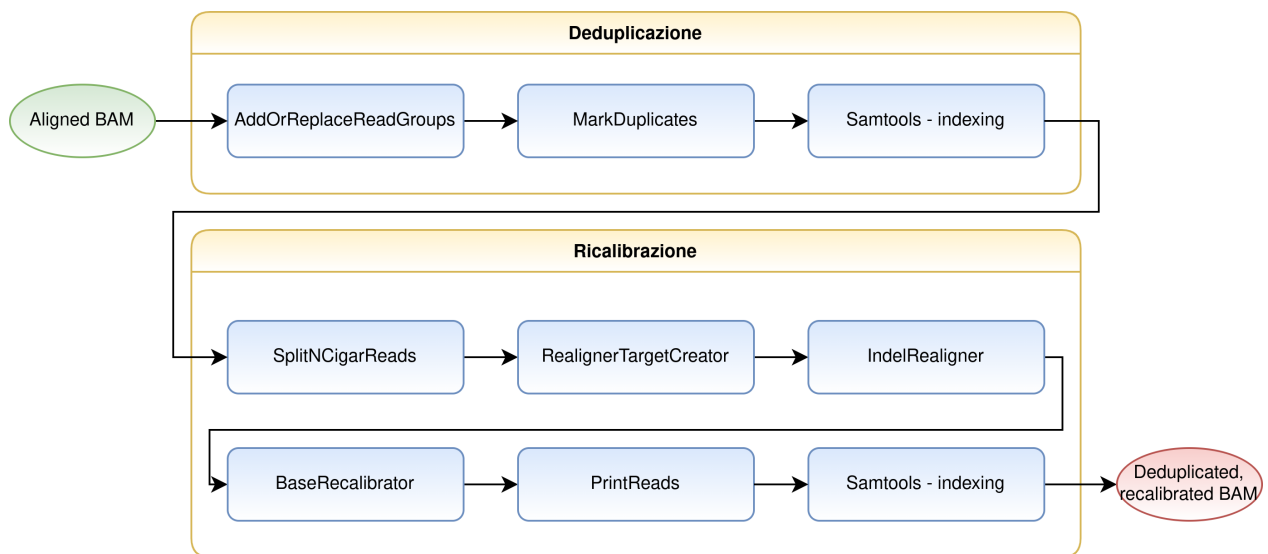


Figura 3.2: Pipeline di deduplicazione e ricalibrazione

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.

3.2 Analisi dei dati WES

3.2.1 Bedtools

3.3 Dati disponibili

3.3.1 Sequenze biologiche

Descrizione dei fastq.

3.3.2 Genoma di riferimento

Descrizione del genoma di riferimento.

3.3.3 Variant call

Descrizione dei vcf.

3.3.4 Struttura dei geni

Descrizione del gtf.

3.4 Troncatura e allineamento

Descrizione del processo e perchè viene fatto.

3.4.1 Troncatura

Trimmomatic, cosa fa come è stato usato.

3.4.2 Allineamento

STAR, cosa fa come è stato usato.

3.4.3 Ordinamento

SAMTOOLS SORT cosa fa come è stato usato.

3.4.4 Indicizzazione

SAMTOOLS index cosa fa come è stato usato.

3.5 Deduplicazione, riallineamento e recalibrazione

Descrizione del processo e perchè viene fatto

3.5.1 Deduplicazione

Come sopra.

3.5.2 Riallineamento e recalibrazione

Come sopra.

3.6 Ottenere le varianti alleliche

Intersezione tra VCF e GTF.

3.7 Ottenere i dati delle frazioni alleliche

ASEQ cosa fa come viene usato.

3.7.1 Filtrare le frazioni alleliche

Condizioni di filtraggio per i risultati di ASEQ.

3.8 Ottenere gli SNP nel 3'-UTR

Filtraggio del gtf e intersezione con i VCF

4 Analisi dei dati

4.1 Conta degli SNP trovati con ASEQ

Discussione dei risultati di ASEQ.

4.2 Considerazioni sulla recalibrazione

Discussione dei risultati di ASEQ prima e dopo la recalibrazione

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

Bibliografia

- [1] Anthony M. Bolger, Marc Lohse, and Bjoern Usadel. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15):2114–2120, 04 2014.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] O. Tange. Gnu parallel - the command-line power tool. *login: The USENIX Magazine*, 36(1):42–47, Feb 2011.

Allegato A Titolo primo allegato

A.1 Titolo

A.1.1 Sottotitolo

Allegato B Titolo secondo allegato

B.1 Titolo

B.1.1 Sottotitolo