

Grigio: domande ridondanti

Blu: domande negli esami passati

Rosso: poco approfondite

- Autore: Stefano Borzì -

- Descrivere il processo di trascrizione e di splicing alternativo

Lo splicing è un processo che avviene successivamente alla trascrizione, esso è necessario per rimuovere le sequenze non codificanti, ovvero gli **introni**, di solito gli introni iniziano per GT e finiscono per AG

Lo splicing avviene nello Spliceosoma, consiste nel taglio della giunzione 5' in modo da liberare la sequenza da un introne e poi successivamente questa sequenza si ripiega su se stessa connettendosi ad un nucleotide "A", ovvero ad una sequenza di ramificazione per poi tagliare un taglio nella giunzione 3'.

Lo **splicing alternativo** consiste nel creare diversi RNA da uno stesso trascritto.

Uno stesso gene può quindi codificare proteine diverse dette isoforme, ad esempio, il gene BAX ha 5 isoforme.

Infine, gli mRNA maturi, provvisti di 5' cap, coda di Poli(A) e privi degli introni, vengono esportati dal nucleo nel citoplasma.

Nel citoplasma avviene la **traduzione**, ovvero il processo di sintesi delle proteine a partire dai codoni specificati nella sequenza di mRNA.

- Descrivere l'algoritmo GASOLINE per l'allineamento locale di reti biologiche.

Greedy: usa un approccio greedy seed-extend per cercare i sottografi partendo da un allineamento di un singolo nodo (seed)

Stochastic: usa il **Gibbs sampling**, un metodo stocastico di campionamento per la ricerca del mapping ottimale tra i nodi

L'algoritmo consta in due fasi principali:

- **fase bootstrap:** ricerca allineamento iniziale ottimale dei nodi (seed)

- **fase iterativa:**

- **extension step:** estendi l'allineamento massimizzando la densità locale dei nodi
- **removal step:** rimuovere i nodi già allineati che contribuiscono meno alla qualità dell'allineamento corrente
- iterare i due passi precedenti k volte

Gibbs sampling

Fase bootstrap:

- 1) Sia M una catena di Markov in cui gli stati sono tutte le combinazioni possibili degli N nodi

- 2) scegliere randomicamente una rete A

- 3) per $i = 1, 2, \dots, k$

- estrarre in maniera random A_i e sostituirlo con un nodo random X seguendo una probabilità di transizione

- 4) restituire A

Iterando un numero elevato di volte la fase 3) si ottiene una catena di Markov con allineamenti dei nodi ottimali delle relative reti.

Fase iterativa: è analoga alla fase bootstrap eccetto il passo 1) dove la catena di Markov M contiene come stati le combinazioni ottimali dei nodi

- Descrivere una tecnica per l'estrazione di biomarcatori da dati RNASeq.

I biomarcatori sono espressioni geniche significative per la funzione della struttura a cui appartengono, studiando la loro struttura è possibile creare tramite essi dei classificatori per poter caratterizzare la funzionalità di alcune strutture.

Per identificare i biomarcatori bisogna:

- Individuarli
- Discretizzarli
- Costruire dei classificatori

Normalmente i singoli biomarcatori non sono sufficienti per classificare una determinata classe, quindi, vengono usate opportunamente delle reti PPI in supporto alla classificazione.

Possiamo distinguere due tecniche per l'identificazione dei biomarcatori:

Network-based Classification: un approccio greedy

Data una rete PPI e due matrici che descrivono classi ed attività dei geni, l'algoritmo calcola il Discriminative Score $S(M)$ ed aggrega i nodi con il criterio di ottenere lo score localmente massimale.

Per fare ciò si può adottare un approccio greedy, ovvero:

- selezionare randomicamente k nodi
- aggregare i nodi k ad altri nodi del “**d-vicinato**” (vicini ad essi) con score maggiore tra i nodi circostanti ai k nodi
- eseguire iterativamente il secondo passo fino a quando i nodi non possono più incrementare una soglia r il proprio score

OptDis

Si basa sul calcolo del Discriminative Score e sul paradigma color-coding, essa ha lo scopo di ottenere la sotto-rete ottimamente discriminativa.

Questa tecnica ha il vantaggio di avere un numero fissato di iterazioni che dipende dalla probabilità di errore.

Quindi, data una rete PPI G , due matrici A ed A' , una sottorete S ed un peso w che permette di calcolare uno score, appunto un peso, di una determinata sotto-rete rispetto alle altre, l'algoritmo calcola la sotto-rete S con peso migliore.

Definiti k colori, dove $k \geq |S|$, trovare la sotto-rete S con peso massimale.

L'algoritmo consiste nell'assegnare randomicamente ad ogni nodo uno dei k colori definiti e di verificare se è presente un percorso con nodi di colori diversi che forma una sotto-rete S massimale.

Complessità $O(n2^k)$

" Descrivere l'RNAi

RNAi = RNA Interference, un suo uso tipico è il knock-down artificiale dei geni, ovvero il silenziamento dell'espressione di uno più geni per studiarne gli effetti e le conseguenze e di conseguenza le funzioni svolte.

I siRNA sono molto utilizzati per l'RNA Interference.

(RNAi non è trattato approfonditamente nelle slide 2018/2019)

" Dare i dettagli dell'algoritmo di allineamento pairwise globale di sequenze.

" Descrivere gli step per l'estrazione di biomarcatori da dati di espressione.

- Descrivere l'algoritmo per l'allineamento multiplo di sequenze ClustalW.

L'algoritmo ClustalW si basa sulla costruzione dell'albero filogenetico ottenuto mediante l'algoritmo Feng-Doolittle.

Feng-Doolittle consiste nel calcolare i $\binom{k}{2}$ allineamenti pairwise convertendo i loro score in distanza e costruire su di essi un albero filogenetico.

ClustalW calcolati gli allineamenti secondo Feng-Doolittle si costruisce una matrice di tutte le sequenze con entry la distanza delle sequenze.

Successivamente costruisce un albero filogenetico ed utilizza il **neighbour-joining** per unire mano mano gli allineamenti meno "distanti" nell'albero.

Iterando questo procedimento è possibile trovare l'allineamento ottimale.

ClustalW è stato sostituito da Clustal Omega, algoritmo disponibile nella banca dati EMBL.

- Descrivere i passi per l'estrazione di biomarcatori candidati da dati di espressione genica.

- Descrivere l'algoritmo dt-hybrid per la predizione di interazioni drug-target

Reti di associazione «**drug-target**»: lega farmaci (drugs) che targettano lo stesso gene (o proteina) e geni (o proteine) targettate dalla stessa drug (grafo bipartito).

(non trattati approfonditamente nelle slide 2018/2019)

1. Definire il concetto di GAP e dare l'algoritmo di allineamento pairwise di sequenze biologiche.

Per effettuare un allineamento di stringhe è necessario che le stringhe siano della stessa lunghezza (della stessa cardinalità $\rightarrow |S1| = |S2|$), quando ciò non accade è possibile aggiungere un "GAP", ovvero uno "spazio" indicato dal simbolo "-" per colmare questo problema e poter allineare correttamente le sequenze.

In bioinformatica il GAP è utilizzato per colmare e/o predire la struttura di una determinata sequenza originale in modo da considerare alcune mutazioni di delezione o inserzione avvenute nella sequenza.

Inserire il GAP però, non è una buona norma, perché si rischia di modificare la struttura di una sequenza senza conoscerla originalmente in dettaglio, per questo l'inserimento del GAP o l'estensione dei GAP negli algoritmi di allineamento vengono "penalizzati" durante il calcolo della similarità (o della distanza) tra sequenze, infatti:

GOP: GAP Opening Penalty

GEP: GAP Expansion Penalty

dove solitamente $GOP > GEP$ in modo da evitare l'inserimento e quindi anche una possibile espansione del GAP inserito.

L'algoritmo di allineamento Pairwise è usato per allineamento non-multiplo, quindi tra due sole stringhe ed ha l'obiettivo di valutare la similarità tra due stringhe in modo di comprendere la *filogenesi molecolare* o la *caratterizzazione di alcune proteine con funzione ignota*.

Esso si basa su una funzione di scoring, come per esempio una funzione scoring basata su metrica **crisp** che, confrontando due sequenze, prevede di dare un punto ad ogni match e 0 per ogni mismatch.

Esempio: abcdba S1
 amb-ba S2

$f(S1, S2) = 3$ (solo 3 match, il resto mismatch)

altre metriche possono basarsi sulla distanza di editing tra stringhe per calcolare appunto la distanza o la similarità.

Un allineamento Pairwise ottimale è un allineamento con massima similarità (o minima distanza).

Formula per il calcolo dello score:

$$\sum_i^l \sigma(S_1'[i], S_2'[i])$$

dove $l = |S'| = |T'|$

Un algoritmo basato su Pairwise è Needleman-Wunsch che adotta la programmazione dinamica per effettuare un allineamento globale.

La programmazione dinamica consta nel scomporre un problema in sotto-problemi, risolvere ottimamente i sotto-problemi per risolvere il problema originario.

Sotto-problema per valutare se aggiungere un gap:

$$\begin{aligned} &\sigma(S[i], T[i]) \\ &\sigma(S[i], "-") \\ &\sigma("-", T[i]) \end{aligned}$$

L'algoritmo utilizza il sotto-problema per poi calcolare una matrice $n \times m$ ($|S| = n$, $|m| = T$) mediante la seguente formula

$$V(i, j) = \max(\begin{aligned} &\sigma(S[i-1], T[j-1]) + \sigma(S[i], T[j]) \\ &(\sigma(S[i-1], T[j]) + \sigma(S[i], "-")) \\ &(\sigma(S[i], T[j-1]) + \sigma("-", T[j])) \end{aligned})$$

$$\text{caso base: } V(i, 0) = \sum_{k=0}^i \sigma(S_k, -) \quad V(0, j) = \sum_{k=0}^j (-, T_k)$$

Una volta calcolati i valori della matrice si considera il valore in basso a destra della matrice e mediante **traceback** si calcola lo score migliore che si può ottenere dall'allineamento.

Una variante di Needleman-Wunsch, **Smith-Waterman**, permette di calcolare localmente l'allineamento ottimale

2. Dare l'algoritmo per l'allineamento multiplo locale di sequenze basato su Gibbs Sampling. Descrivere la sua estensione alle reti biologiche

3. Descrivere il processo di splicing alternativo.

1. struttura del gene

I geni sono l'unità ereditaria e funzionale degli organismi viventi, esso è costituito da **esoni**, **introni**, **sequenze regolatrici ecc.**

In particolare i geni contengono le informazioni delle proteine che si verranno a creare tramite essi. Queste informazioni sono contenute negli esoni, tranne negli esoni UTR (esoni presenti all'inizio del gene o alla fine del gene in 5'/3').

Distinguiamo geni codificanti che vengono trascritti in mRNA e geni non codificanti che danno vita ai ncRNA.

Le informazioni all'interno dei geni sono rappresentate dai **nucleotidi (ATGC)**.

I geni, possono essere inoltre distinti in **3 tipi di geni**, in base alla tipologia essi contribuiranno alla produzione di vari tipi di RNA (tRNA, mRNA, snRNA, snoRNA, ecc.)

Nei geni sono presenti sequenze regolatrici come i **“promotori”**, sequenze di nucleotidi come **TATA, CAAT, GC** ecc. i quali hanno come compito quello di farsi riconoscere come “sequenza di inizio” per indicare dove iniziare la trascrizione.

Altri tipi di sequenze regolatrice sono gli **enhancers**, che permettono di amplificare la trascrizione, ed i **silencers** che reprimono il processo di trascrizione.

Fin'ora sono state definite varie sequenze presenti nei geni eucariotici, nei geni dei procarioti la struttura del gene è più semplice, in particolare, è rilevante l'insieme di geni regolatore detto **“operone”**. I geni dell'operone codificano determinate proteine.

Nei procarioti sono presenti le sequenze regolatrici.

2. Descrivere il processo di trascrizione e pre-processing dell'mRNA

3. Cosa sono i mRNA? Qual è il loro ruolo? come avviene il processo di biogenesi?

Trascrizione: processo in cui vengono trascritti gli mRNA, tipi di RNA che contengono al loro interno le informazioni che verranno utilizzate durante la traduzione per produrre proteine. Questo processo si distingue in 3 fasi sia per i procarioti che per gli eucarioti:

Inizio: gli mRNA contengono al loro interno informazioni di sequenze di DNA, le sequenze di DNA vengono trascritte mediante l'RNA polimerasi che, si lega ad un filamento di DNA subito dopo la separazione in due filamenti del DNA. Durante questa fase, viene creata una bolla di trascrizione e l'RNA polimerasi non appena incontra una “sequenza di consenso” (sequenza contenuta nei filamenti di DNA che indica la possibilità di iniziare la trascrizione), inizia a sintetizzare i primi trascritti (mRNA) su “stampo del DNA”.

Per trascrivere un determinato filamento, detto “senso”, viene utilizzato il suo “stampo”, ovvero, il filamento antisenso complementare al filamento senso in modo che l'mRNA conterrà al suo interno il filamento senso basandosi sullo stampo (sul complementare) del filamento antisenso.

La fase di inizio nei procarioti è analoga a quella degli eucarioti a eccezione che:

- negli eucarioti sono presenti tre tipi di RNA polimerasi
- esistono delle sequenze regolatrici: silencers=reprimono la trascrizione, enhancers=amplificano la trascrizione

Allungamento: l'RNA polimerasi si sposta lungo il filamento di DNA (analogo negli eucarioti). L'enzima responsabile della trascrizione si sposta dalla sequenza 5' verso la sequenza 3'.

Terminazione: la trascrizione termina quando l'RNA polimerasi incontra una sequenza di terminazione (negli eucarioti solo nel caso dell'RNA polimerasi 2 sono state individuate sequenze di terminazione).

Maturazione dell'RNA

- **Capping & poliadenilazione**

Prima dello splicing della sequenza viene aggiunta all'estremità 5' dell'mRNA un cappuccio (CAP) per dare maggiore stabilità all'mRNA e migliorare l'esportazione dell'mRNA nel citoplasma.

Inoltre, viene aggiunta all'estremità 3' una coda di poli(A), detta poliadenilazione, il responsabile di questa aggiunta è l'enzima poli(A) polimerasi.

- **Splicing**: durante lo splicing vengono rimossi gli introni (geni non codificanti) in modo da poter selezionare solo gli esoni (ma non gli esoni UTR, anch'essi geni non codificanti), coloro i quali contengono le informazioni codificanti che verranno poi utilizzate per la sintesi proteica.

4. Descrivere algoritmo MIDClass

L'algoritmo MIDClass ha l'obiettivo di ottimizzare i dati, estratti mediante tecniche MicroArray, per poi utilizzarli durante la costruzione di classificatori.

MIDClass consiste nei seguenti passi:

- INPUT: matrice di miRNA (microarray)
- riduzione dei campioni per classe
- discretizzazione dei dati
- filtraggio dei geni
- eliminazione dei geni non discriminanti
- trovare il maximal frequent itemset
- estrazione delle regole di associazione
- validare i dati mediante KFCV o LOOCV

Microarray: gli mRNA si legano ai filamenti di DNA, in base a questo comportamento, è possibile simulare l'appaiamento mRNA-DNA tramite una griglia microscopica dove inserire le sequenze di DNA per poi portare gli mRNA ed aspettare che si leghino alle sequenze.

Questi mRNA vengono preventivamente colorati con coloranti rosso-verde Cy3/Cy5 per poi essere individuati con laser in modo da digitalizzare la sequenza sotto-forma di immagine, poi convertita in matrice basandosi sui colori degli mRNA.

Nel caso di MIDClass gli RNA utilizzati sono i microRNA.

Discretizzazione:

x_i, y_i = campioni e relative classi di appartenenza

$\Phi_m(x_i)$ = rappresenta l'espressione del campione x per il gene m .

Per discretizzare i valori Φ_i possiamo utilizzare una delle seguenti tecniche:

• Equal Width Interval Bin

- discretizziamo il range di una variabile continua in B bin
- dato l'intervallo in cui sono contenuti i valori di $\Phi_i, [v_i^{min}, v_i^{max}]$, l'ampiezza di ogni bin è definita dalla differenza del massimo e del minimo valore nell'intervallo in rapporto al numero di

$$\text{bin } (B) \quad \delta_i = \frac{v_i^{max} - v_i^{min}}{B}$$

- il valore discretizzato del paziente j è così assegnato \rightarrow sia k il valore in cui cade $\Phi_i(x_j)$, il valore discretizzato sarà $k + (M*i)$

• Recursive Minimal Entropy Partitioning and Iterative Dicotomizer 3 Discretizer (ID3)

Dati i valori di $S_i = \{ \Phi_i(x_1), \dots, \Phi_i(x_n) \}$ si partizionano in intervalli T_i calcolandone l'entropia, successivamente si ripartizionano/modificano gli intervalli di valori T_i in base all'entropia.

Analogamente per **ID3** si ordinano i valori $S_i = \{ \Phi_i(x_1), \dots, \Phi_i(x_n) \}$, si calcolano i punti di mezzo (si creano degli intervalli T_i), per ciascuno di questi calcoliamo l'entropia e scegliamo come cutting point quello in cui abbiamo minima entropia ottenendo così due intervalli \rightarrow procediamo ricorsivamente sui due intervalli.

• Unparametrized Supervised Discretization

Divide i valori in intervalli dove ogni intervallo è un intervallo puro (contiene solo valori della stessa classe).

Problema → troppi intervalli! → possiamo unire gli intervalli adiacenti se l'intervallo adiacente (o finale?) ha la stessa classe di occorrenze +1 e la goodness dell'intervallo finale ha una goodness maggiore della media delle goodness (goodness = parametro di valutazione).

Discriminant Gene Filtering: mediante diversi criteri vengono eliminati i geni non discriminanti. Dati v = valore discretizzato e k = classe, il criterio su cui si basa il filtraggio dei geni è il seguente:

$$\log_2 \frac{\text{numero di valori discretizzati uguali a } v \text{ nella classe } k}{\text{numero di valori uguali a } v \text{ nelle altre classi}}$$

- 0 se v ha la stessa frequenza nelle varie classi;
- >1 se v compare di più nella classe k rispetto alle altre;
- <-1 se v compare di più nelle altre classi piuttosto che in k ;

Frequent itemset

Obiettivo: individuare un pattern che si presenta frequentemente nei dati → estrapolare regole di associazione.

Definiamo:

$I = \{ i_1, \dots, i_n \}$ → insieme di oggetti

D = insieme di transazioni su I

k-itemset = itemset di lunghezza k

Supporto(X) = frazione di transazioni contenente X

minsupp = soglia minima di supporto

confidenza = probabilità condizionata che indica quanto robusta è una implicazione (minconf)

Date delle regole di associazione $X \rightarrow Y$ possiamo definire supporto e confidenza, definiti questi due valori possiamo individuare gli itemset frequenti in base ad una soglia (minsupp → supporto minimo).

Trovati gli insiemi frequenti, è possibile dedurre delle regole di associazione.

MIDClass – A priori

L'algoritmo costruisce i singoli insiemi frequenti, a partire da questi costruisce le coppie di insiemi frequenti, dalle coppie costruisce le triple di insiemi frequenti, fino ad arrivare a k -uple di insiemi frequenti in cui non esistono itemset frequenti costituite da $k + 1$ elementi;

Per ottenere dei classificatori con dati multi-classe è possibile utilizzare i seguenti algoritmi:

- **OVA = one-vs-all**, date k classi, costruire k classificatori, confrontare i risultati e prendere il più "alto".
- **AVA = all-vs-all**, date k classi la strategia AVA consiste nel creare tutti i possibili classificatori binari tra le coppie di k classi. Si sceglie come risultato il consenso tra i classificatori.

Validazione dei classificatori:

- **K-fold Cross-validation:** si divide il dataset in k gruppi con la stessa numerosità e si utilizza ad ogni iterazione un k gruppo come validation set, il resto come training set

- **Leave-one-out Cross-Validation:** si estrae un solo elemento dal dataset, esso verrà usato come validation set, il resto come training set ad ogni iterazione.

5. Descrivere algoritmo Gasoline per allineamento reti

6. Illustrare procedimento per estrazione di espressioni geniche da dati NGS a partire dalle reads grezze

NGS è un nuovo modo di analizzare il DNA, un nuovo strumento per il progetto genoma umano. Richiede molta potenza computazionale, quindi infrastrutture in cui eseguire processi parallelizzabili per elaborare dati.

Per estrarre le espressioni geniche da reads grezzi NGS prevede la rappresentazione dei dati mediante un formato, l'applicazione di filtri e controlli di qualità sui dati.

Per rappresentare le sequenze di DNA è possibile utilizzare un formato come FASTQ (standard de facto) o GFF3,

FASTQ rappresenta i dati mediante:

- ID della sequenza
- sequenza del DNA
- "+" con opzionalmente l'id della sequenza
- quality score

Per quantizzare il quality score è possibile usare Phred33 (o Phred64), ovvero, convertire i caratteri nel valore numerico corrispondente alla tabella ASCII aggiungendo 33 (o 64).

FASTQC → permette di eseguire dei controlli di qualità ai dati e fornisce degli strumenti per eseguire analisi su formati SAM, BAM o FASTQ.

Quality Trimming: essa è un'operazione che permette di filtrare i dati eliminando le sequenze di DNA con quality score basso.

ERNE e Trim Galore, sono due strumenti che permettono di effettuare quality trimming sui dati.

Alignment against reference genome

Prima di utilizzare algoritmi di allineamento sui dati, è opportuno eseguire un pre-processing sui dati in modo da indicizzarli (processo di INDEXING) per poter leggere i dati velocemente.

Ecco alcune metodi di indexing:

- **Hash Table:** organizzare i dati mediante tabella hash

SEED (K=5)	Values
AAAAA	34,10000,...
AAAAC	3120,440,...
AAAAG	...
AAAAT	...
AAACA	...
...	...
TTTTT	4591923,12,...

- **Suffix Array:** organizza i dati utilizzando degli indici particolari per velocizzare l'accesso ai singoli dati.

Esempio: tabella1 [i, A] dove i=indice A=stringhe

tabella2 [i, SA, A[SA[i]]] → SA = numero di occorrenze della stringa A[SA[i]]

i	A[i]	i	SA	A[SA[i]]
0	acaacatat\$	0	2	aaacatat\$
1	caaacatat\$	1	3	aaacatat\$
2	aaacatat\$	2	0	acaacatat\$
3	aaacatat\$	3	4	acatat\$
4	acatat\$	4	6	atat\$
5	catat\$	5	8	at\$
6	atat\$	6	1	caaacatat\$
7	tat\$	7	5	catat\$
8	at\$	8	7	tat\$
9	t\$	9	9	t\$
10	\$	10	10	\$

- **Burrows Wheeler Transforms:** data una stringa G viene creata una matrice con tutte le possibili combinazioni dei caratteri della stringa, successivamente le stringhe vengono ordinate in colonna in ordine alfabetico.

Di questa matrice viene salvato l'indice delle righe e l'ultima colonna .

BW Transforms è reversibile e permette l'indicizzazione anche nei dati compressi.

Altri algoritmi per l'estrazione di NGS reads sono BowTie, Tophat ecc.

1) processo trascrizione e maturazione dell'RNA messaggero

2) Struttura del gene

3) cosa sono i microRNA, la loro funzione e come si formano

I microRNA, detti anche miRNA, sono dei filamenti di RNA che regolano l'espressione genica al livello post-trascrizionale.

I miRNA permettono di correggere o fermare la traduzione per preservare la stabilità del processo di sintesi proteica.

Un microRNA può avere più target mRNA con cui interagire ed un mRNA può interagire con più miRNA.

I trascritti primari dei miRNA sono detti primiRNA, essi contribuiscono alla formazione dei microRNA e, durante la formazione dei miRNA, vengono tagliati dall'enzima Drosha che li divide in filamenti detti pre-miRNA analogamente ai siRNA i quali si formano mediante un'operazione simile effettuata dall'enzima Dicer.

Un miRNA maturo viene poi inglobato in una struttura denominata RISC dove potrà svolgere il suo ruolo di regolatore di espressioni geniche al livello post-trascrizionale.

Esistono diverse banche dati che contengono informazioni sui miRNA come miRBase, miRTarBase, miRandola, ecc.

4) descrivere algoritmo MIDClass

5) descrivere algoritmo Grammy

GRAMMy: framework sviluppato per la stima dei Genomi Relativi, utilizzato per l'analisi metagenomica.

Esso è basato su Mixture Model theory per ottenere accurate e robuste stime.

(non è stato trattato approfonditamente nelle slide 2018/2019)

6) estrazione delle reads dell'ngs

Appello 1 Marzo 2019

- Parlare della trascrizione e della traduzione, come vengono coinvolti gli mRNA ed i micro RNA.
 - Descrivere l'algoritmo MITHrIL
 - Cos'è l'allineamento multiplo di sequenze, per cosa viene usato, inoltre, trattare un algoritmo.
- (le altre 3 richieste non le ricordo 😊)