MO640 – Biologia Computacional

Zanoni Dias

Instituto de Computação – Unicamp

Segundo Semestre de 2018

Roteiro

Montagem de Fragmentos

- A tecnologia padrão de sequenciamento não permite obter fragmentos de DNA maiores que 1000 pares de bases.
- É possível obter fragmentos de DNA (um pouco) maiores, mas a um custo proibitivo.
- Na prática, muitas vezes precisamos obter a sequência de organismos de milhões de pares de bases.
- Montagem de fragmentos é a terefa de, dado um conjunto de fragmentos, reconstruir a sequência que originou os fragmentos (sequência alvo), com base nas sobreposições dos fragmentos.
- Montagem de fragmentos pode ser revolvido com estratégias convencionais de alinhamento múltiplo de sequências?
  - Não! Apesar de parecidos, os problemas tem diferenças importantes e usam técnicas distintas para obter soluções.

Principais Dificuldades

- Erros de sequenciamento.
- Orientação desconhecida dos fragmentos.
- Falta de cobertura da sequência original.
- Tamanho desconhecido da sequência original.
- Regiões repetidas na sequência original.
- Sequências quiméricas.
- Contaminação pelo vetor de sequenciamento.

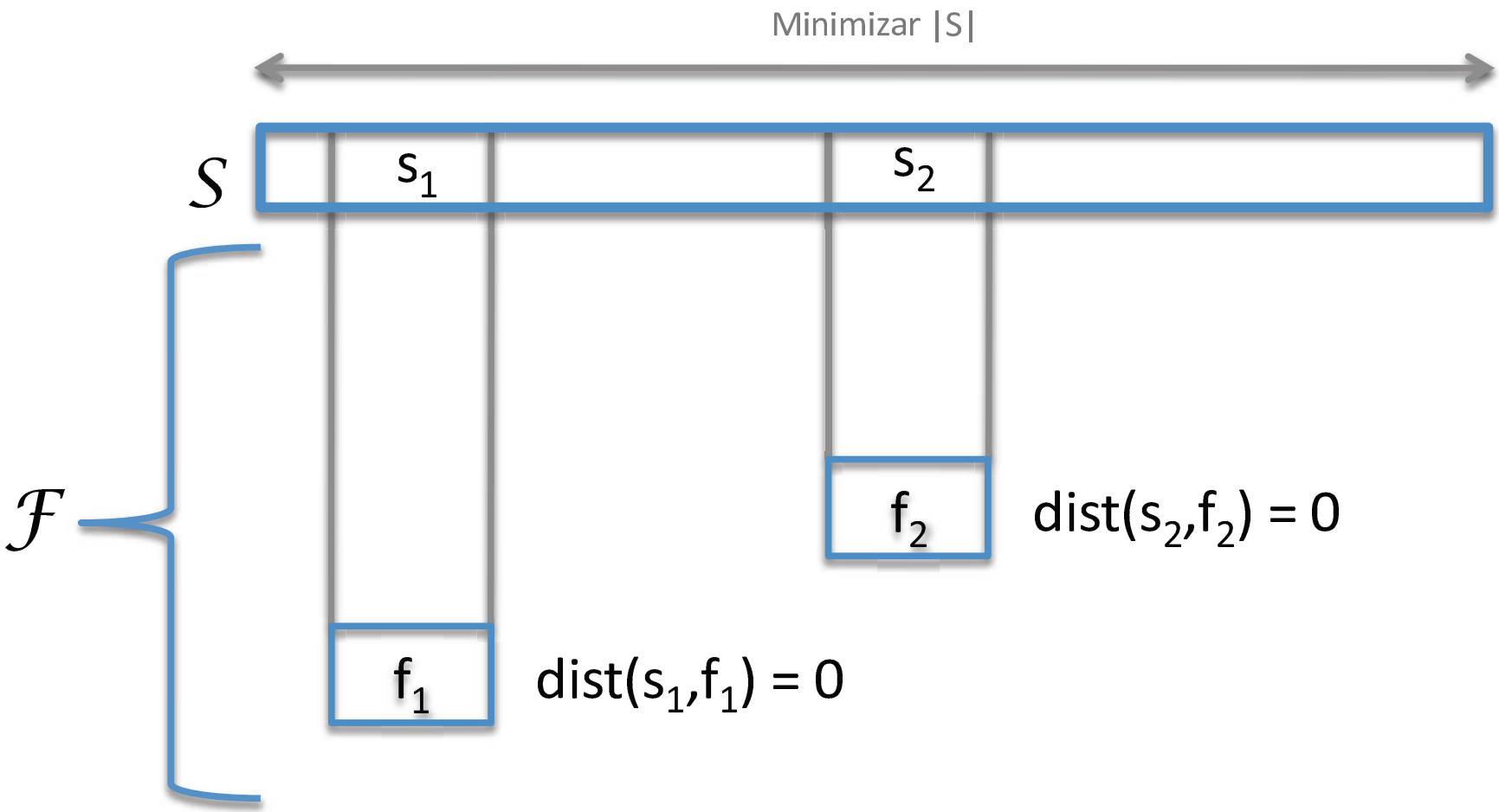
Modelos para Montagem de Fragmentos

- Modelos mais comuns:
  - *Shortest Common Superstring (SCS)*.
  - *Reconstruction*.
  - *Multicontig*.
- Todos estes modelos supõem que os fragmentos não possuem contaminações ou quimeras.

Shortest Common Superstring

- Dada uma coleção $\mathcal{F}$ de fragmentos, obter a menor sequência possível S, tal que para todo $f \in \mathcal{F}$, S é uma supersequência de f.
- Modelo essencialmente teórico, sem suporte a maioria dos problemas práticos.
- Pode não produzir a sequência original, devido a dificuldade de lidar com longos trechos repetidos.
- $SCS \in NP$-Completo.

Shortest Common Superstring



Reconstruction

- Dada uma coleção $\mathcal{F}$ de fragmentos e uma tolerância de erro ϵ ($0 \leq \epsilon \leq 1$), obter a menor sequência possível S, tal que para todo $f \in \mathcal{F}$, temos:

$$min(dist_s(f, S), dist_s(\overline{f}, S)) \leq \epsilon |f|$$

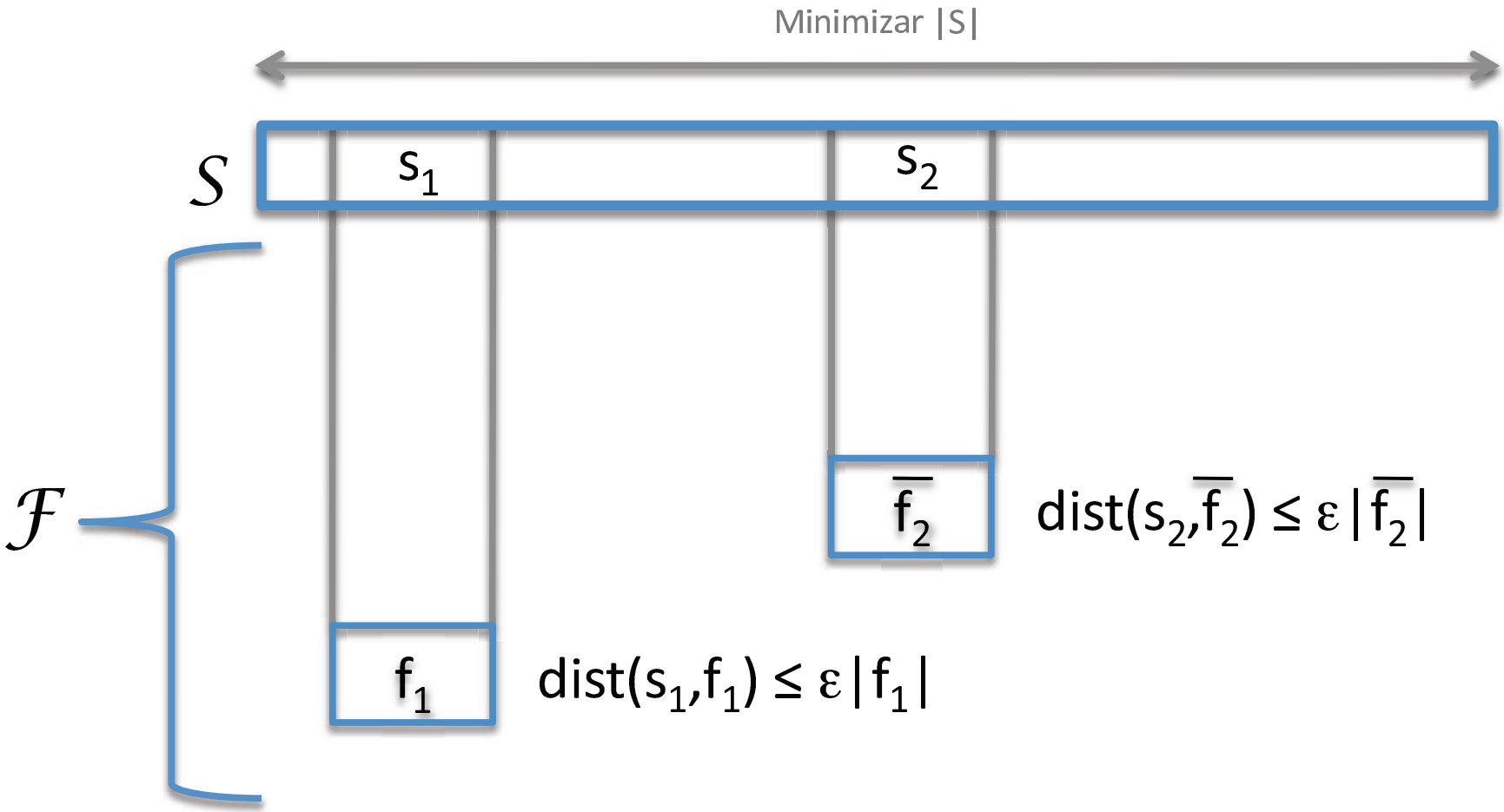
onde $\overline{f}$ é o complemento reverso de f e $dist_s$ é definida como:

$$dist_s(a, b) = min_{s \in S(b)} dist(a, s)$$

onde $S(b)$ é o conjunto das subsequências de b.

- *Reconstruction* é uma generalização de *SCS*.
- *Reconstruction* $\in$ *NP*-Completo.

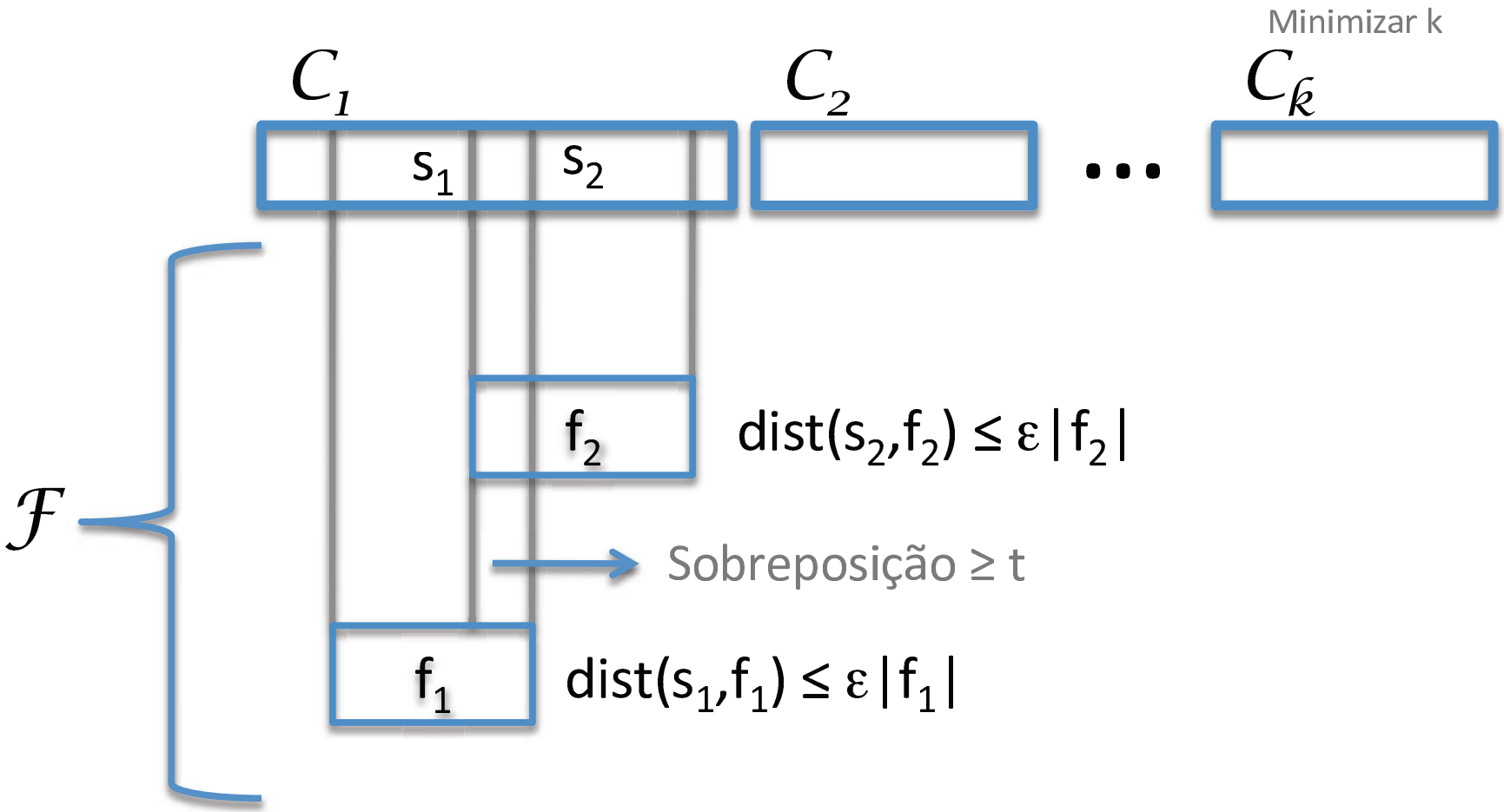
Reconstruction



Multicontig

- Dada uma coleção $\mathcal{F}$ de fragmentos, um inteiro $t \geq 0$ e uma tolerância de erro ϵ $(0 \leq \epsilon \leq 1)$, obter uma partição de $\mathcal{F}$ em um número mínimo de subcoleções, $\mathcal{C} = \{\mathcal{C}_1, \mathcal{C}_2, \ldots, \mathcal{C}_k\}$, tal que cada $\mathcal{C}_i$ (com $1 \leq i \leq k$) forma um *contig* com sobreposição mínima t entre os fragmentos e taxa de erro ϵ de cada fragmento em relação ao consenso do *contig*.
- Neste caso, cada *contig* representa uma sequência consenso para um subconjunto dos fragmentos.
- *Multicontig* $\in$ *NP*-Completo.

Multicontig



Calculando o Progresso da Montagem

- Seja:
  - n: número de fragmentos.
  - f: tamanho médio dos fragmentos.
  - T: tamanho da sequência alvo a ser montada.
  - t: sobreposição mínima entre dois fragmentos para montagem.
- A cobertura média (c) da sequência alvo pode ser calculada como:

$$c = \frac{nf}{T}$$

- O número esperado de subsequências contíguas montadas com sobreposição mínima t é dado por:

$$p = ne^{\frac{-n(f-t)}{T}}$$

- O número esperado de subsequências contíguas montadas por pelo menos 2 fragmentos, com sobreposição mínima t é dado por:

$$p' = ne^{\frac{-n(f-t)}{T}} - ne^{\frac{-2n(f-t)}{T}}$$

Calculando a Cobertura da Sequência Alvo

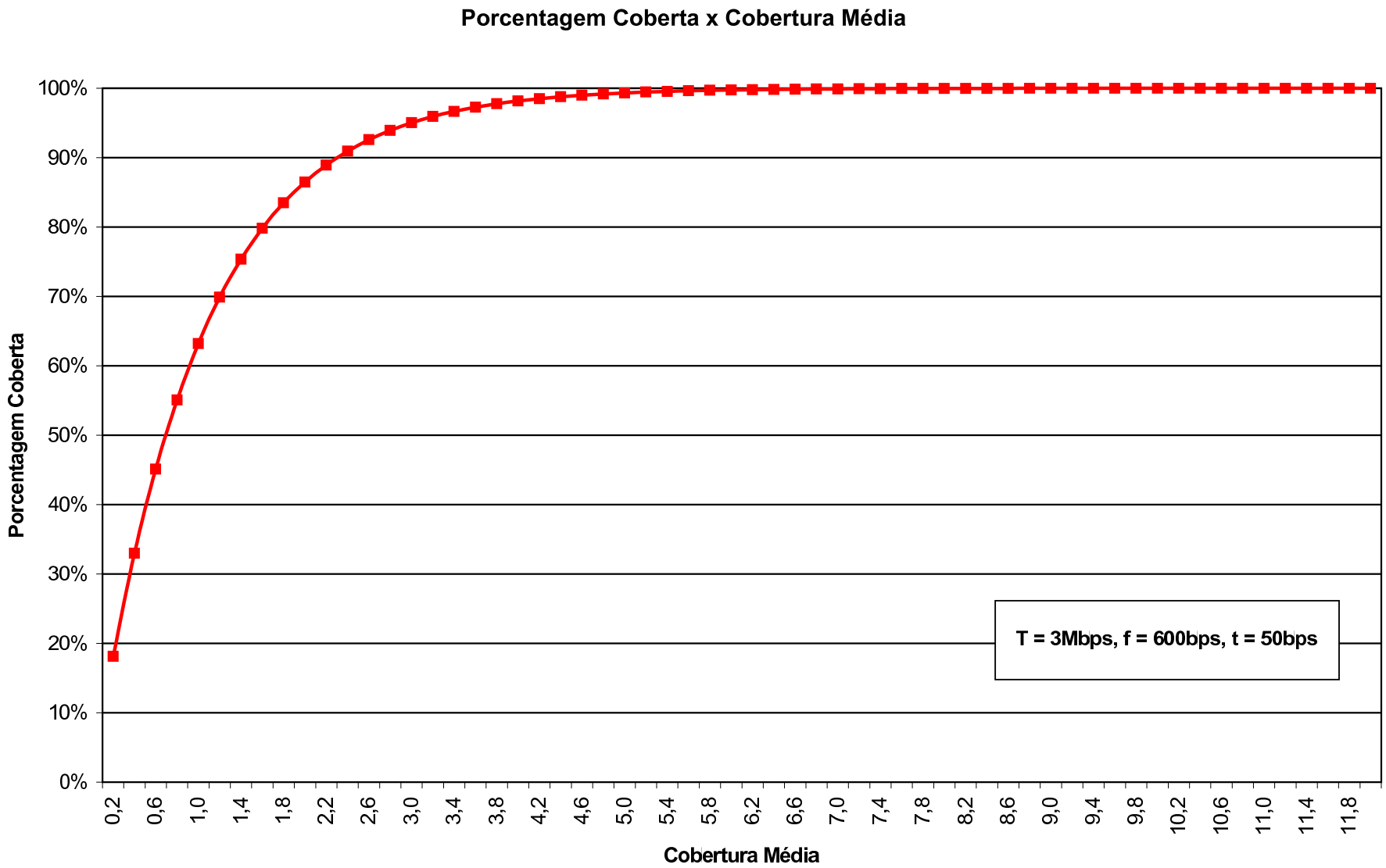
- A fração da sequência alvo coberta por exatamente k fragmentos é dado por:

$$r_k = \frac{e^{-c} c^k}{k!}$$

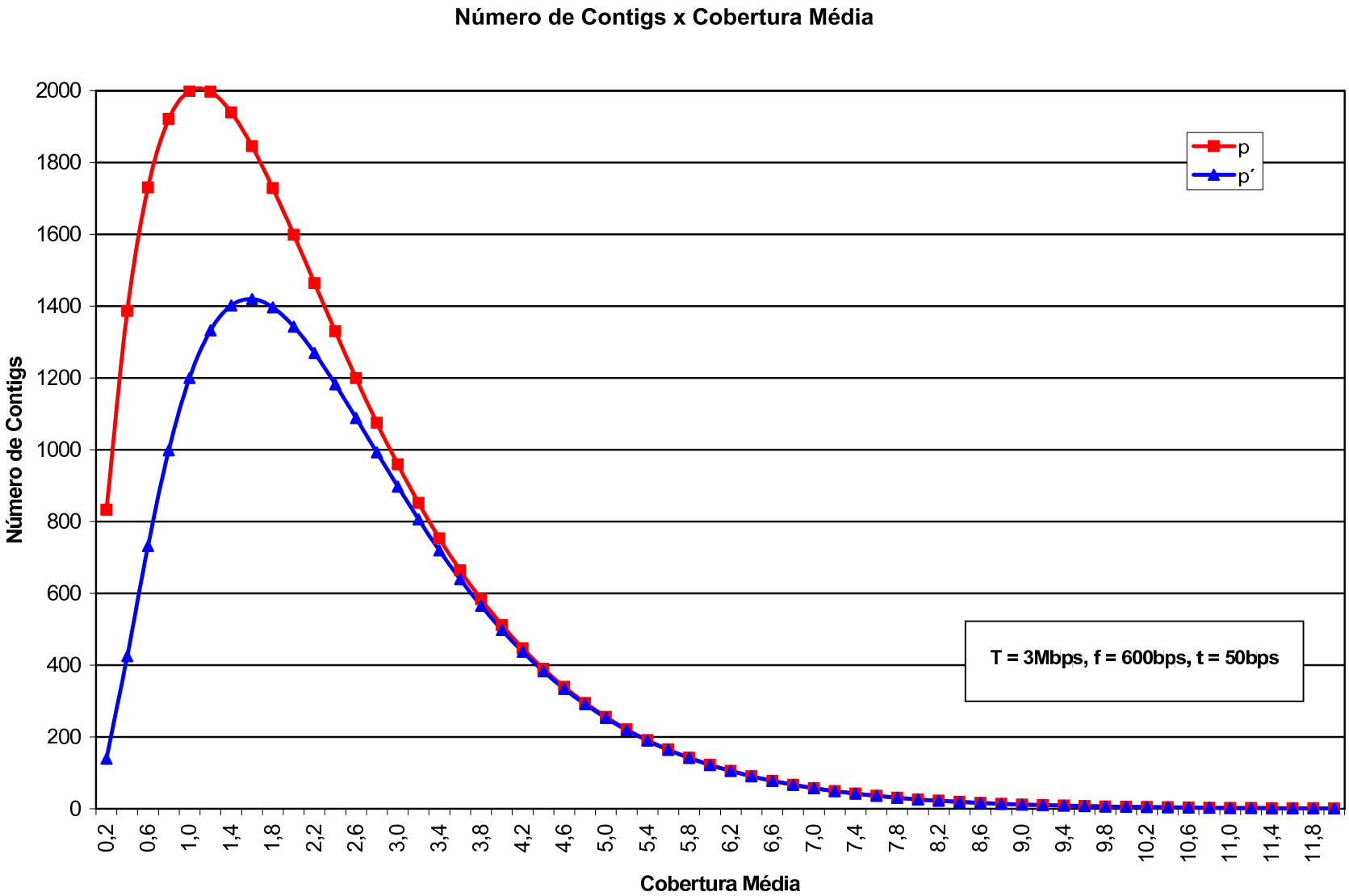
- A fração da sequência alvo coberta por pelo menos um fragmento é dado por:

$$r = 1 - \left(1 - \frac{f}{T}\right)^n$$

Calculando a Cobertura da Sequência Alvo



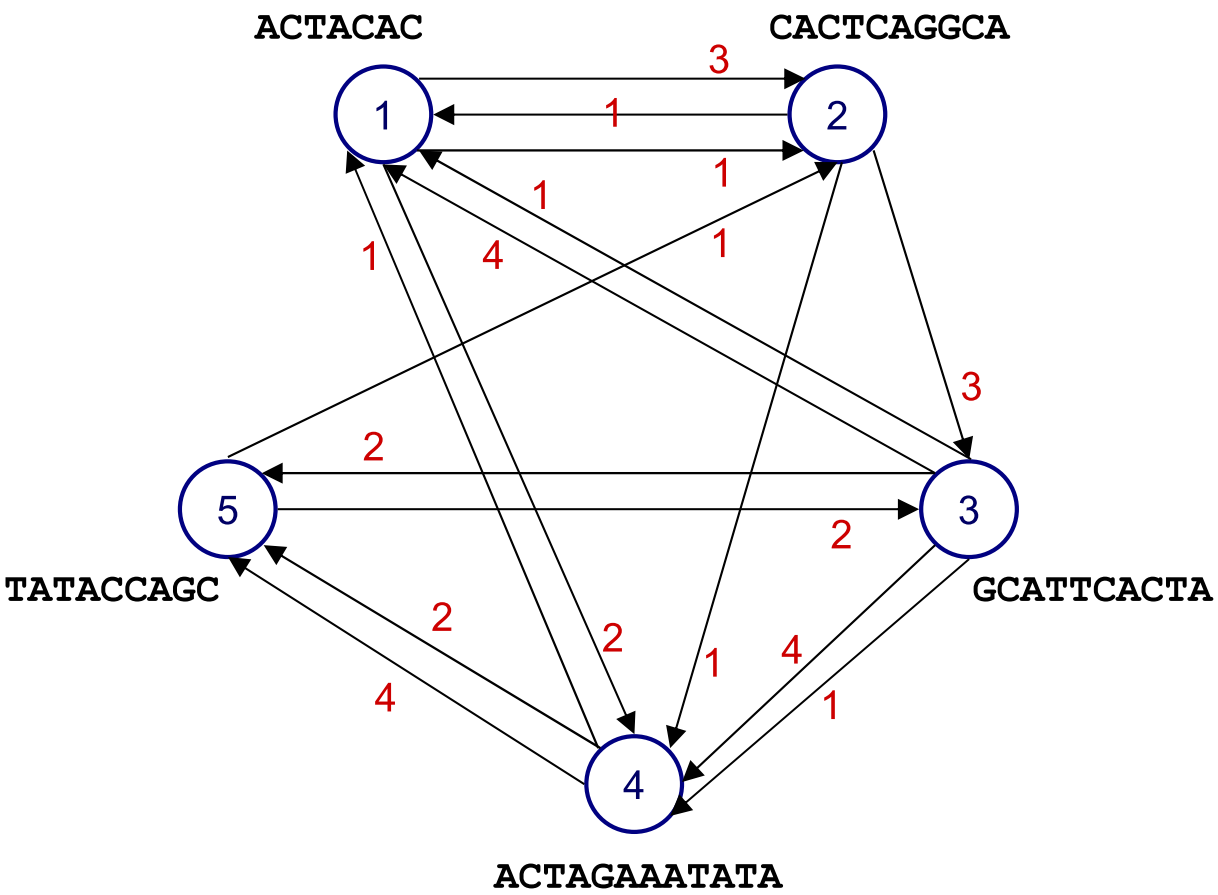
Calculando a Cobertura da Sequência Alvo



Representação de Sobreposição de Fragmentos

- Seja $\mathcal{F}$ uma coleção de fragmentos de tal forma que nenhum fragmento esteja completamente contido em outro fragmento.
- O Multigrafo de Sobreposição $\mathcal{OM}(\mathcal{F})$ (ou *Overlap Multigraph*) de uma coleção de fragmentos de sequências $\mathcal{F}$ é um multigrafo orientado e ponderado.
- O conjunto de vértices V representa cada um dos fragmentos $f \in \mathcal{F}$.
- Uma aresta entre os vértices a e b ($a \neq b$), com peso $t \geq 0$, existe se o sufixo do fragmento representado por a, com t caracteres, é um prefixo do fragmento representado por b.
- Por definição, $\mathcal{OM}(\mathcal{F})$ não admite autolaços.
- Podem existir múltiplas arestas entre dois vértices.
- Existe pelo menos uma aresta entre todo par de vértices (com $t = 0$).

Multigrafo de Sobreposição - $\mathcal{OM}(\mathcal{F})$

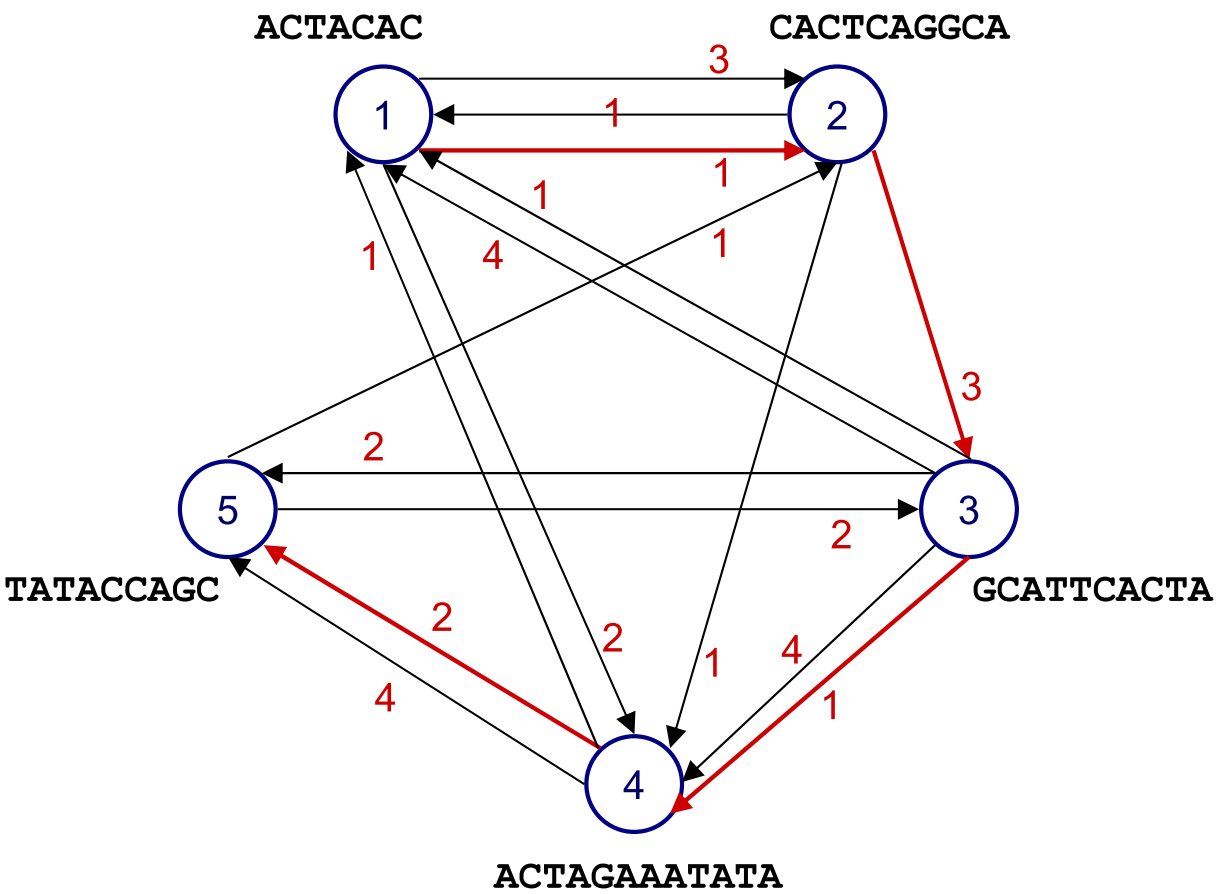


Sobreposição mínima: t = 1

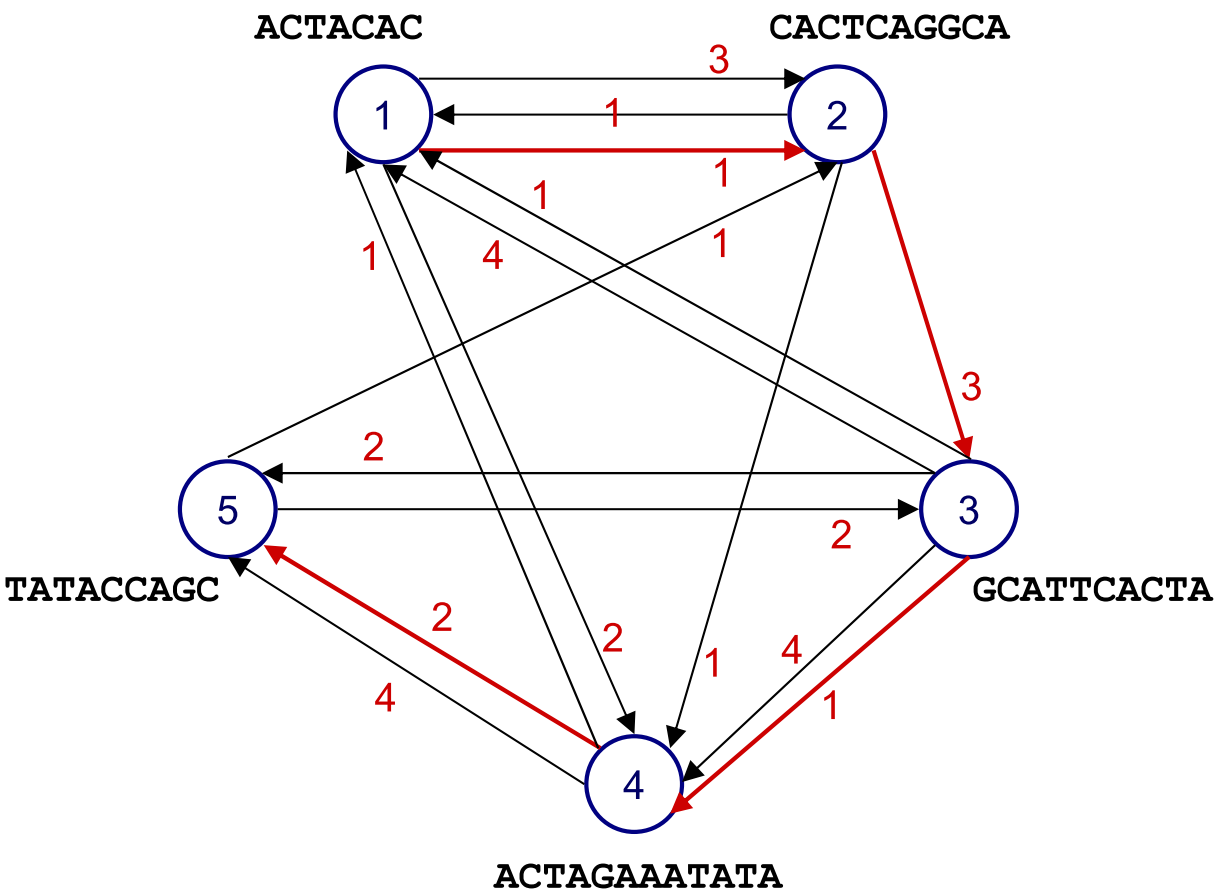
Caminhos e Supersequências

- Caminhos no Multigrafo de Sobreposição $\mathcal{OM}(\mathcal{F})$ representam supersequências envolvendo os fragmentos representados pelos vértices do caminho.
- Seja:
  - P: um caminho em $\mathcal{OM}(\mathcal{F})$.
  - $w(P)$: a soma dos pesos de todas as arestas de P.
  - $\mathcal{F}(P)$: o conjunto de fragmentos representados pelos vértices de P.
  - $||\mathcal{F}(P)||$: a soma dos tamanhos de todos os fragmentos de $\mathcal{F}(P)$.
  - $S(P)$: a sequência consenso originada por P.
- A seguinte relação é verdadeira:
  - $||\mathcal{F}(P)|| = w(P) + |S(P)|$
- Obter uma *SCS* para a coleção $\mathcal{F}$, é equivalente a encontrar um caminho de peso máximo que passe por todos os vértices de $\mathcal{OM}(\mathcal{F})$.
- Logo, uma solução para *SCS* pode ser obtida através de um Caminho Hamiltoniano Máximo no multigrafo $\mathcal{OM}(\mathcal{F})$.

Caminhos Hamiltonianos no Multigrafo de Sobreposição

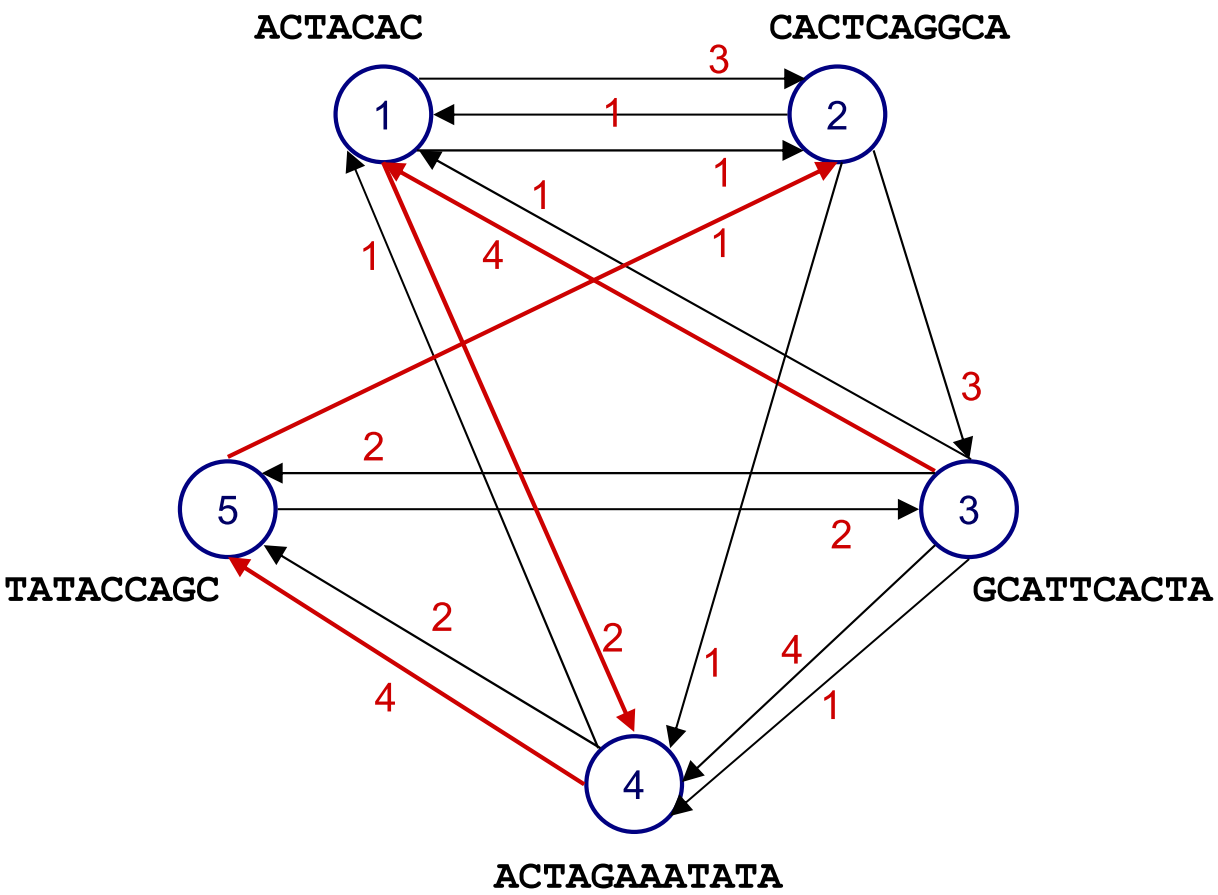


Caminhos Hamiltonianos no Multigrafo de Sobreposição

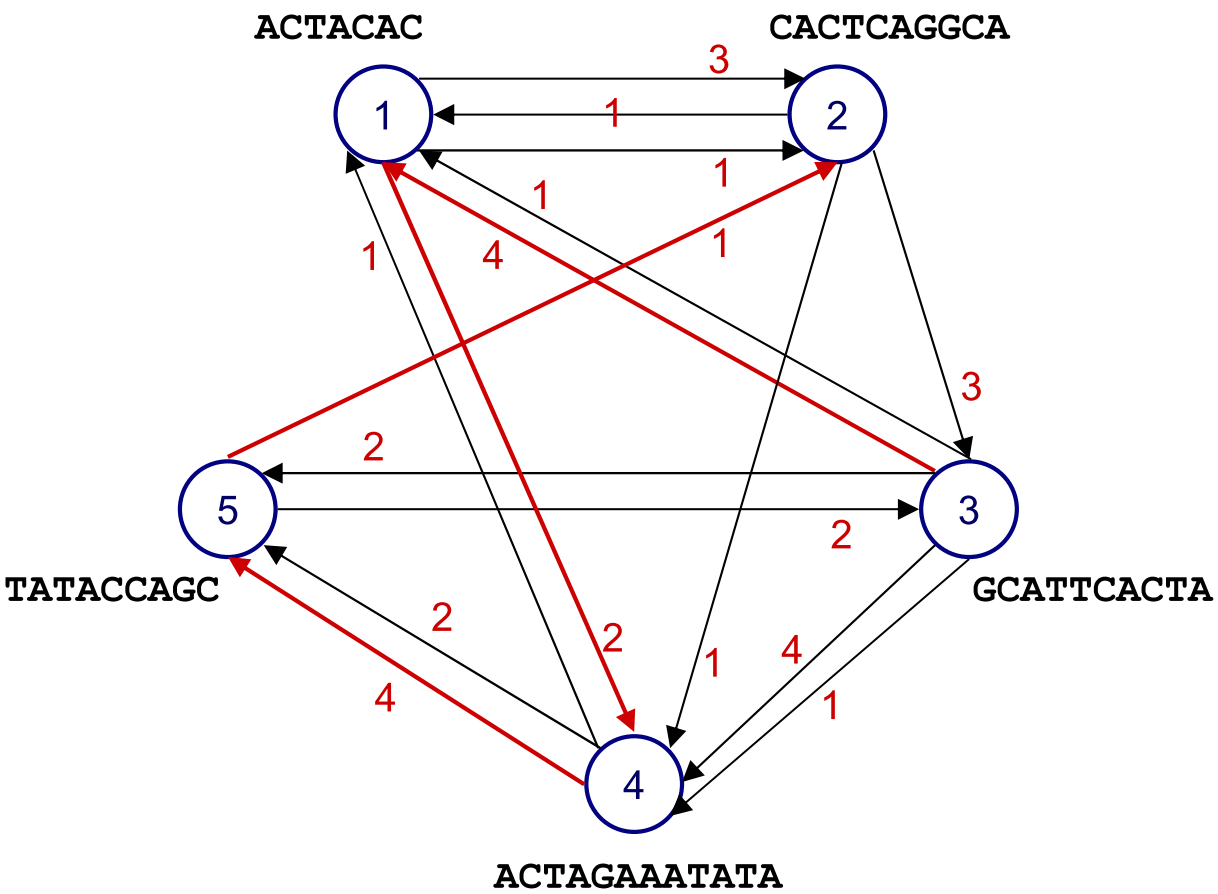


ACTACACACTCAGGCATTCACTACTAGAAATATATACCAGC

Caminhos Hamiltonianos no Multigrafo de Sobreposição

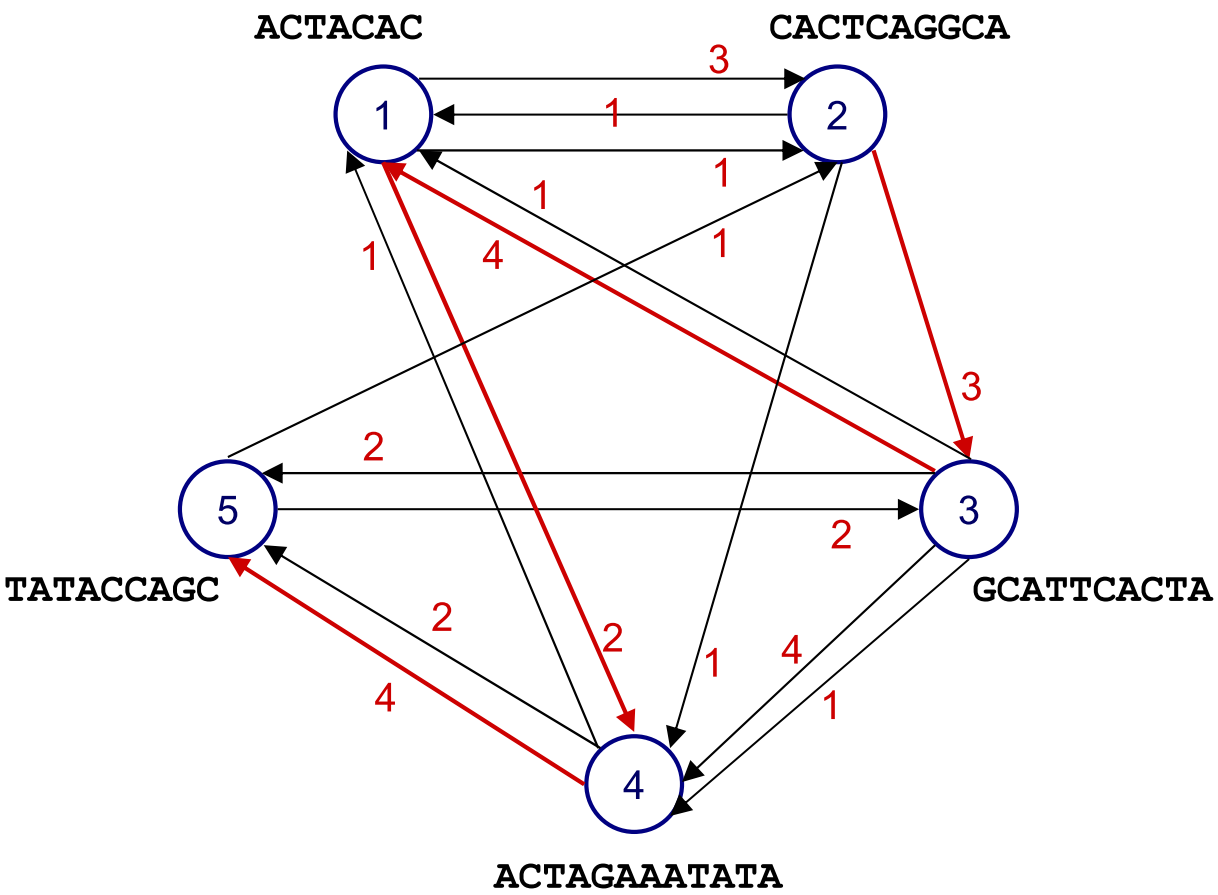


Caminhos Hamiltonianos no Multigrafo de Sobreposição

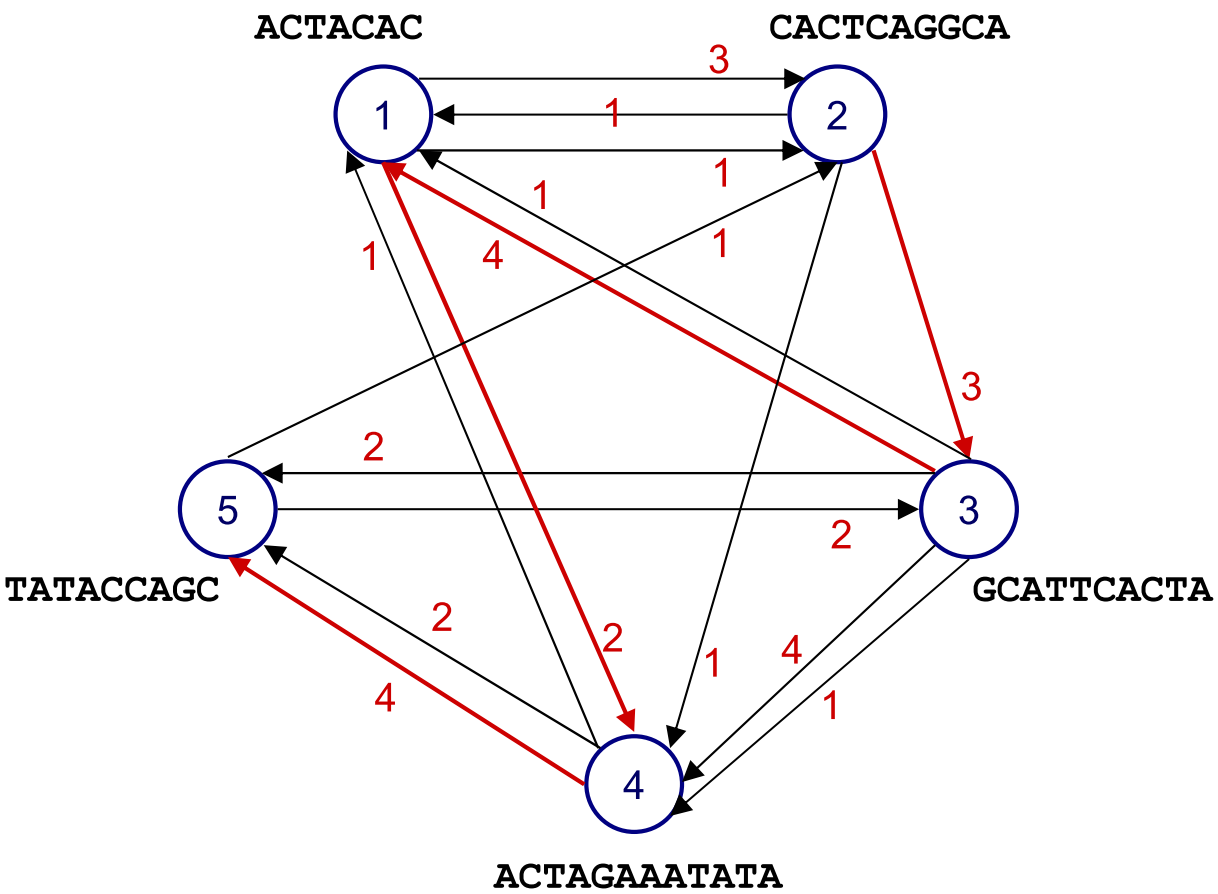


GCATTCACTACACTAGAAATATACCAGCACTCAGGCA

Caminhos Hamiltonianos no Multigrafo de Sobreposição

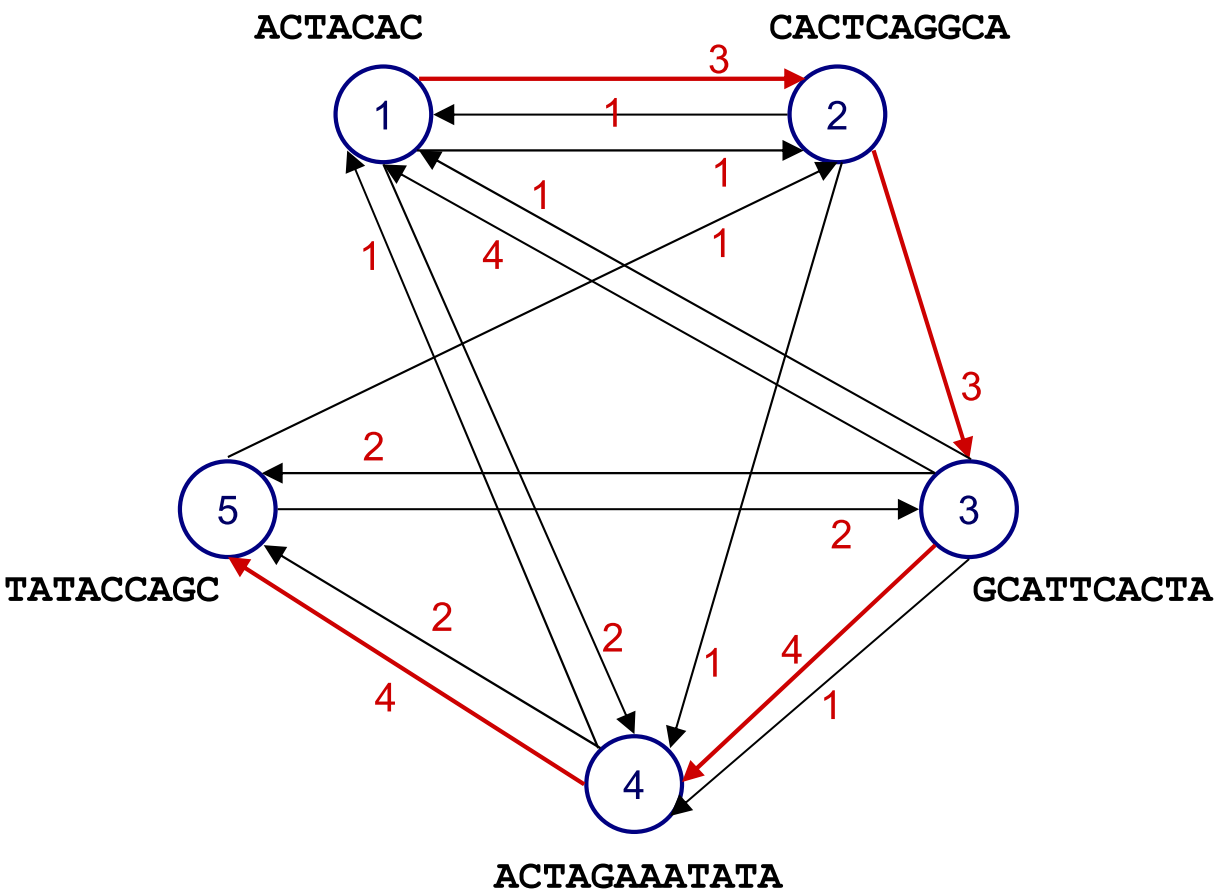


Caminhos Hamiltonianos no Multigrafo de Sobreposição

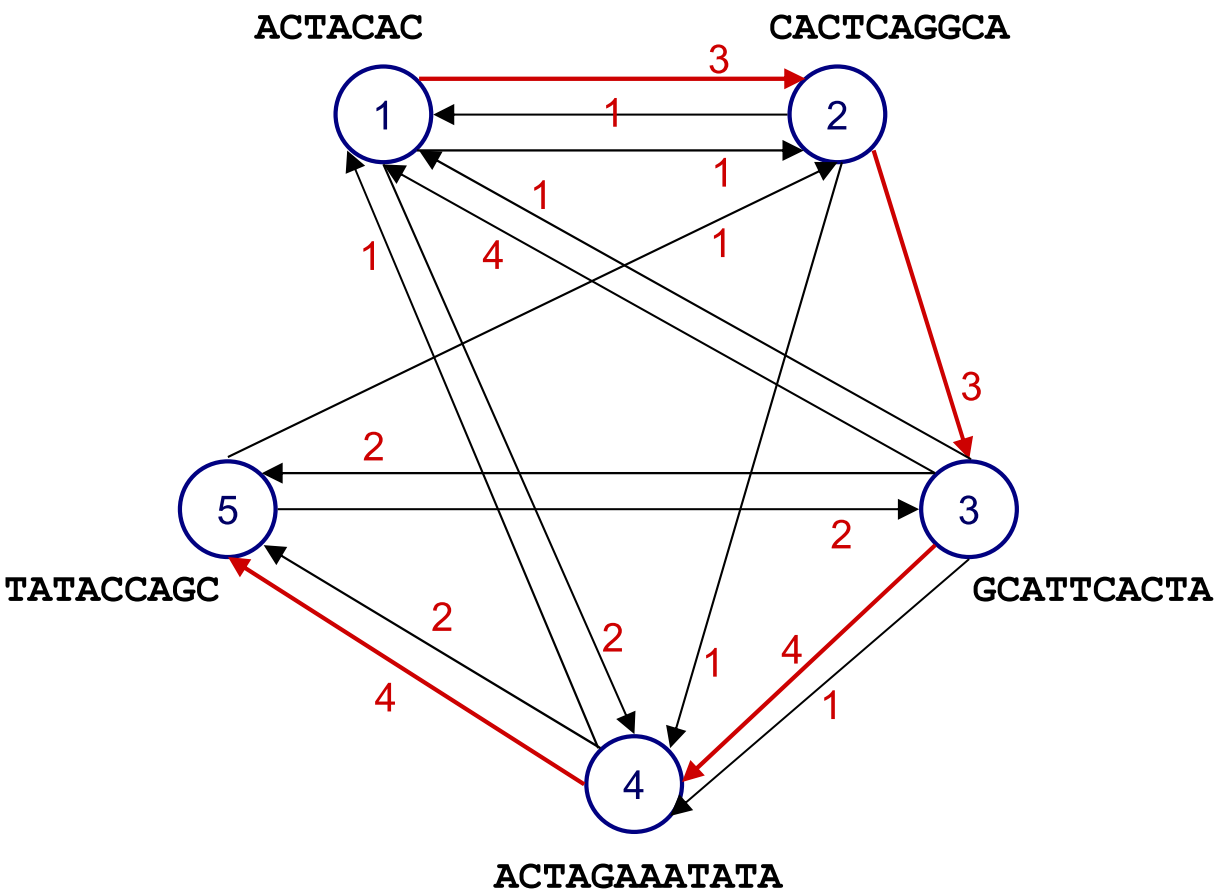


CACTCAGGCATTCACTACACTAGAAATATACCAGC

Caminhos Hamiltonianos no Multigrafo de Sobreposição



Caminhos Hamiltonianos no Multigrafo de Sobreposição

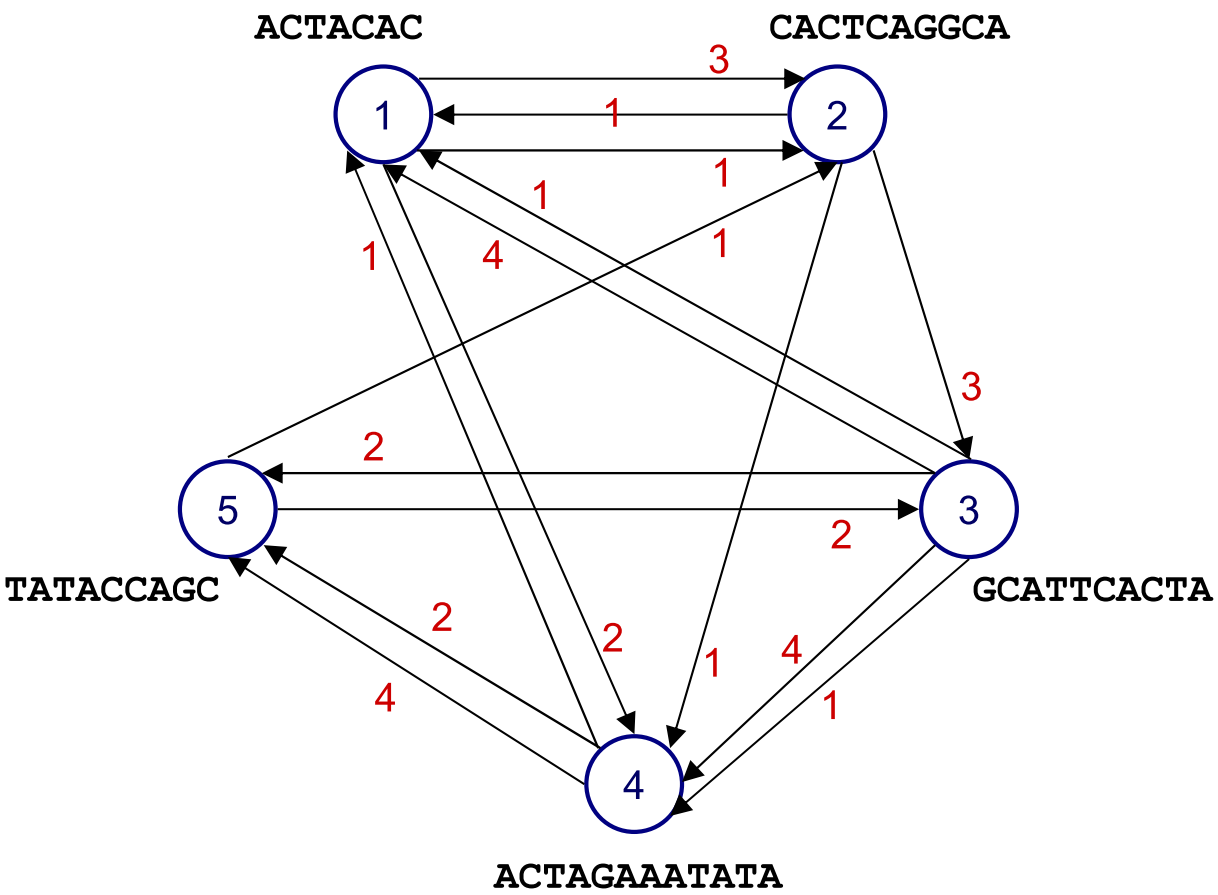


ACTACACTCAGGCATTCACTAGAAATATACCAGC

Algoritmo Guloso para Shortest Common Superstring

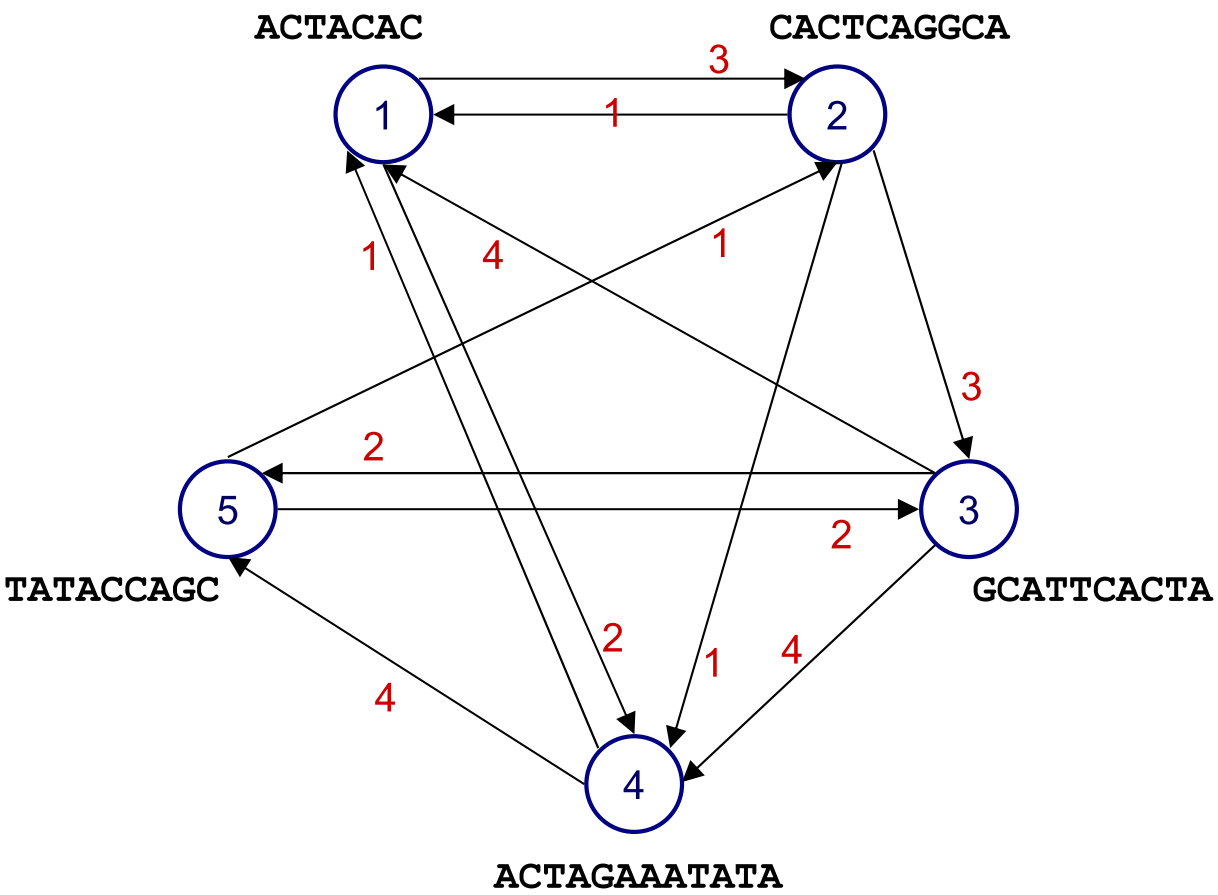
- Neste caso podemos trabalhar com o Grafo de Sobreposição $\mathcal{OG}(\mathcal{F})$ (*Overlap Graph*), que pode ser obtido a partir de $\mathcal{OM}(\mathcal{F})$ mantendo-se apenas a aresta mais pesada entre cada par de vértices.
- Algoritmos gulosos fazem escolhas locais ótimas.
- Para tentar maximizar o peso do caminho a ser montado, o algoritmo, a cada passo, escolhe a aresta válida mais pesada de $\mathcal{OG}(\mathcal{F})$.
- Uma aresta é dita válida se a inclusão dela na solução corrente respeita as seguintes condições:
  - Duas arestas não podem sair de um mesmo vértice.
  - Duas arestas não podem chegar em um mesmo vértice.
  - Nenhum ciclo pode ser formado.
- O algoritmo termina quando o caminho P contiver todos os vértices de $\mathcal{OG}(\mathcal{F})$.

Multigrafo de Sobreposição - $\mathcal{OM}(\mathcal{F})$



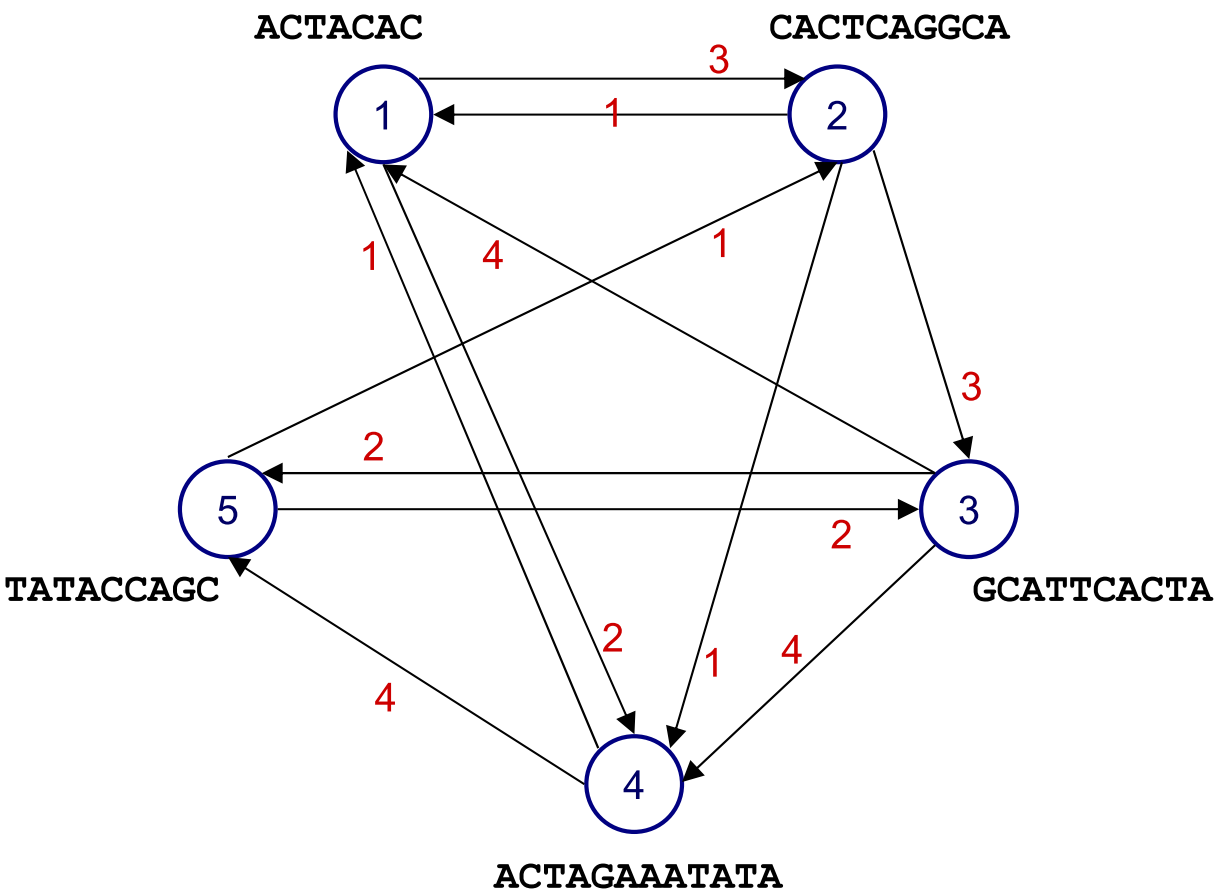
Sobreposição mínima: t = 1

Grafo de Sobreposição - $\mathcal{OG}(\mathcal{F})$



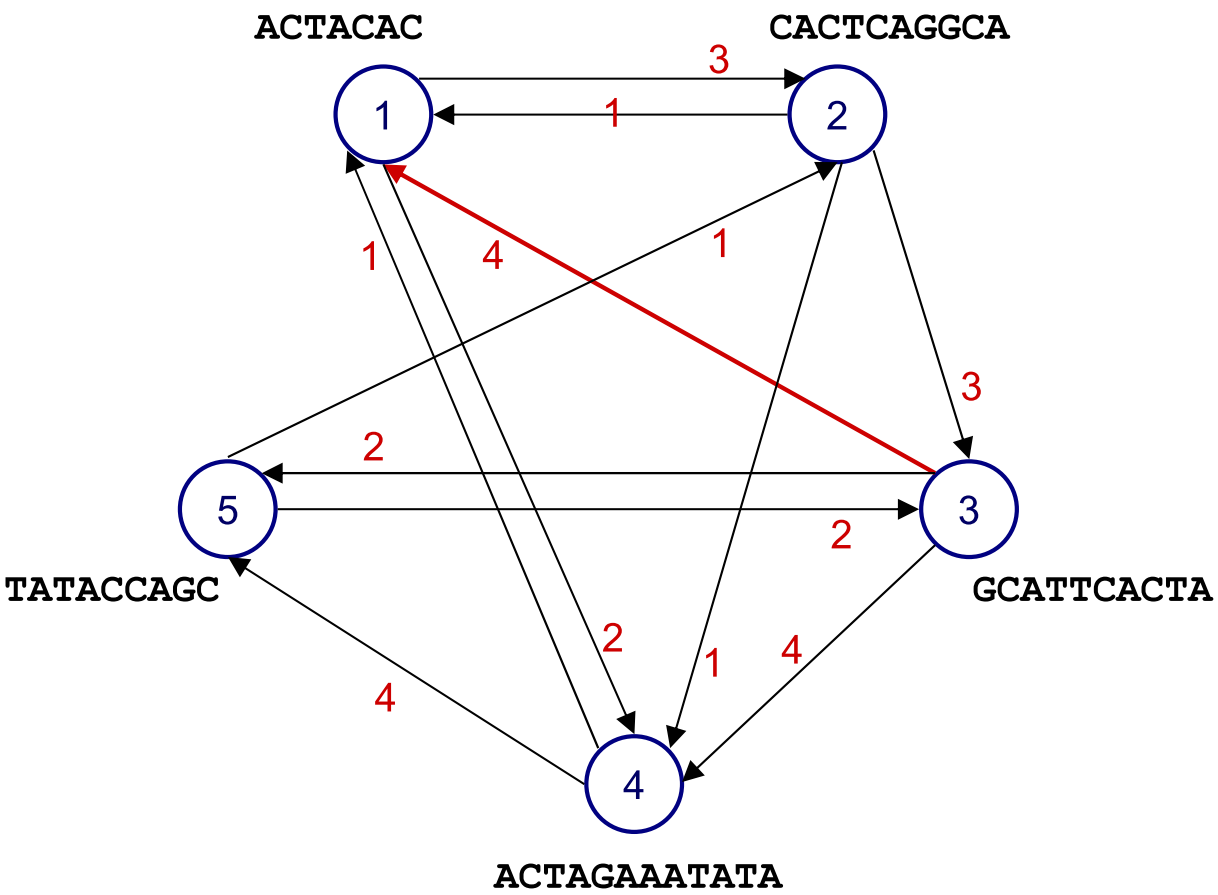
Sobreposição mínima: t = 1

Algoritmo Guloso para Shortest Common Superstring



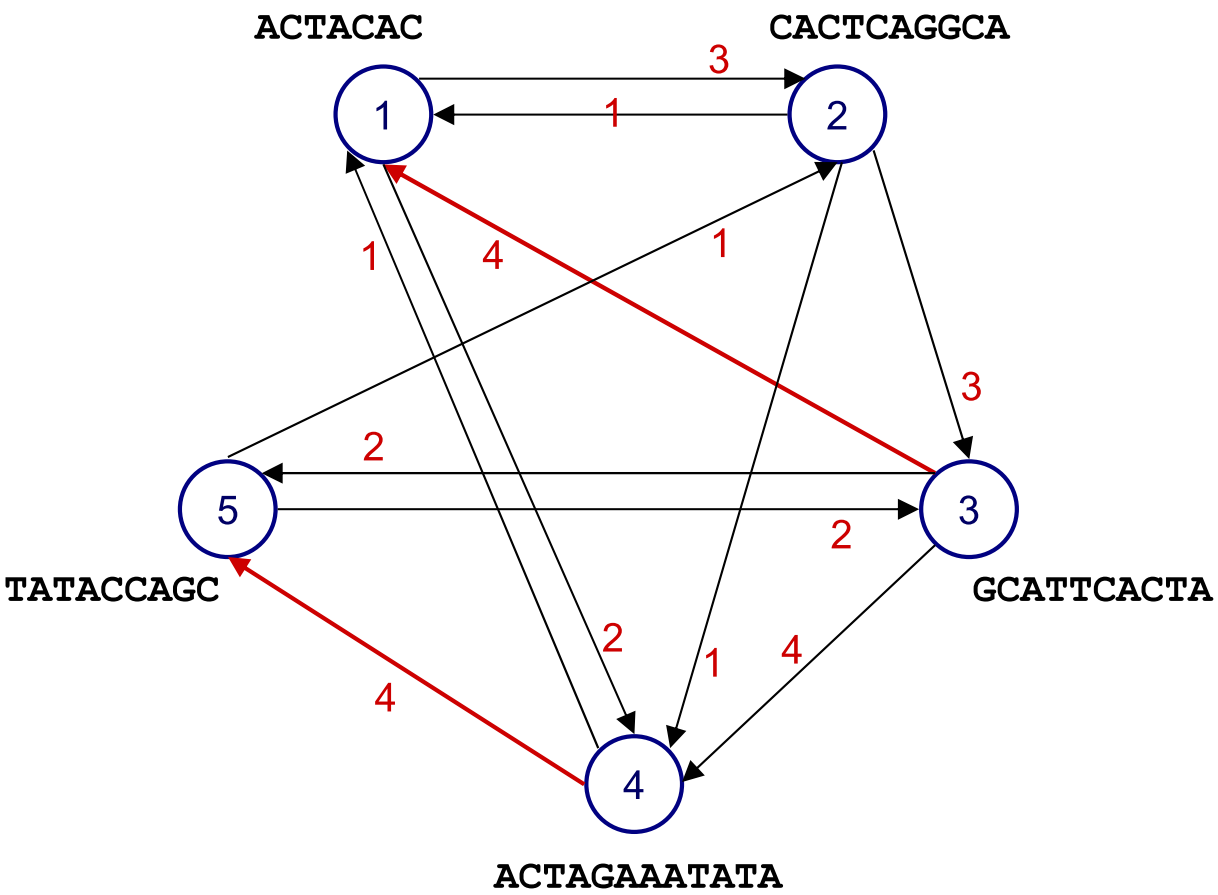
ACTACAC | CACTCAGGCA | GCATTCACTA | ACTAGAAATATA | TATACCAGC

Algoritmo Guloso para Shortest Common Superstring



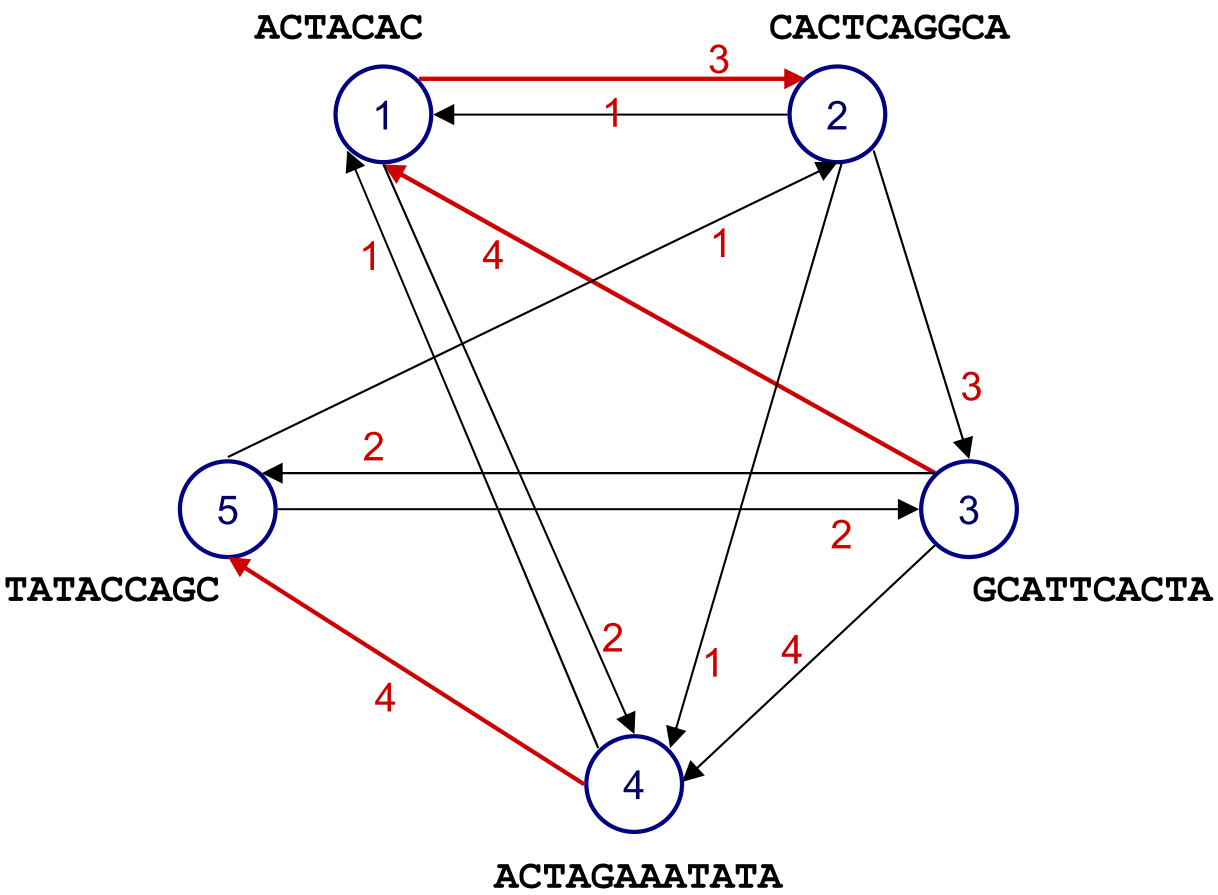
GCATTCACTACAC | CACTCAGGCA | ACTAGAAATATA | TATACCAGC

Algoritmo Guloso para Shortest Common Superstring



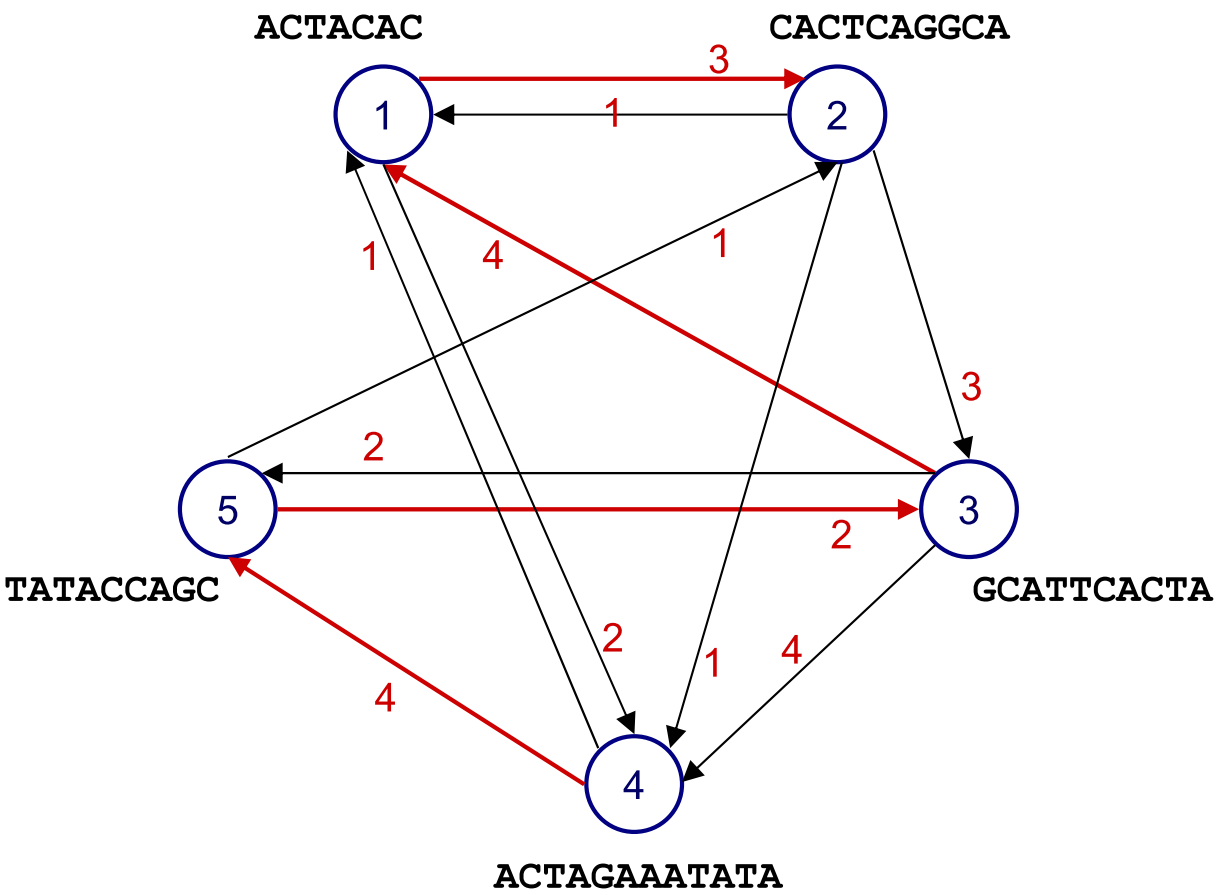
ACTAGAAATATA**CCAGC | GCATTC**ACTA**CAC | CACTCAGGCA**

Algoritmo Guloso para Shortest Common Superstring



ACTAGAAATATACCAGC | GCATTCACTACACTCAGGCA

Algoritmo Guloso para Shortest Common Superstring



ACTAGAAATATACCAGCATTCACTACACTCAGGCA

Algoritmo Guloso para Shortest Common Superstring

- Complexidade:
  1. Construir o grafo $\mathcal{OG}(\mathcal{F})$:
     - ⋆ Usando comparação par a par: $O(\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} f_i f_j + n^2)$ $= O(||\mathcal{F}||^2 + n^2)$.
     - ⋆ Usando árvores de prefixos: $O(||\mathcal{F}|| + n^2)$.
  2. Ordenar as arestas de $\mathcal{OG}(\mathcal{F})$ em função do peso:
     - ⋆ Usando heapsort: $O(n^2 \log n)$.
     - ⋆ Usando counting sort: $O(n^2 + ||\mathcal{F}||)$.
  3. Para toda aresta, testar se ela é válida:
     - ⋆ Usando conjuntos disjuntos: $O(n^2\alpha(n))$.
     - ⋆ Usando vetores auxiliares para armazenar os vértices iniciais e os vértices finais dos caminhos que passam por cada vértice: $O(n^2)$.
  4. Para toda aresta válida, expandir um caminho:
     - ⋆ Usando conjuntos disjuntos: $O(n\alpha(n))$.
     - ⋆ Usando vetores auxiliares para armazenar os vértices iniciais e os vértices finais dos caminhos que passam por cada vértice: $O(n^2)$.
  5. Dado o Caminho Hamiltoniano P construir a sequência $S(P)$: $O(||\mathcal{F}||)$.
  - ▸ Total: $O(||\mathcal{F}|| + n^2)$.

Algoritmo Guloso para Shortest Common Superstring

- Algoritmo proposto independentemente por Jorma Tarhio e Esko Ukkonen (1988) e Jonathan Turner (1989).
- Avrim Blum, Tao Jiang, Ming Li, John Tromp e Mihalis Yannakakis (1994) provaram que o algoritmo guloso é um algoritmo de aproximação com fator 4.
- Haim Kaplan e Nira Shafrir (2005) provaram que o algoritmo guloso é um algoritmo de aproximação com fator 3.5.

Conjectura

O algoritmo guloso para SCS é um algoritmo de aproximação com fator 2.

Algoritmos de Aproximação para SCS

- Avrim Blum, Tao Jiang, Ming Li, John Tromp e Mihalis Yannakakis (1994) apresentaram um algoritmo de aproximação com fator 3.
- Shang-Hua Teng e Frances Yao (1993) apresentaram um algoritmo de aproximação com fator $2 + 8/9$.
- Artur Czumaj, Leszek Gasieniec, Marek Piotrow e Wojciech Rytter (1994) apresentaram um algoritmo de aproximação com fator $2 + 5/6$.
- Chris Armen e Clifford Stein (1995) apresentaram um algoritmo de aproximação com fator $2 + 3/4$.
- Chris Armen e Clifford Stein (1996) apresentaram um algoritmo de aproximação com fator $2 + 2/3$.
- Elizabeth Sweedyk (1999) apresentou um algoritmo de aproximação com fator $2 + 1/2$.

Exercícios

Exercício

Mostre como adaptar o algoritmo guloso para Shortest Common Superstring para lidar com erros de sequenciamento.

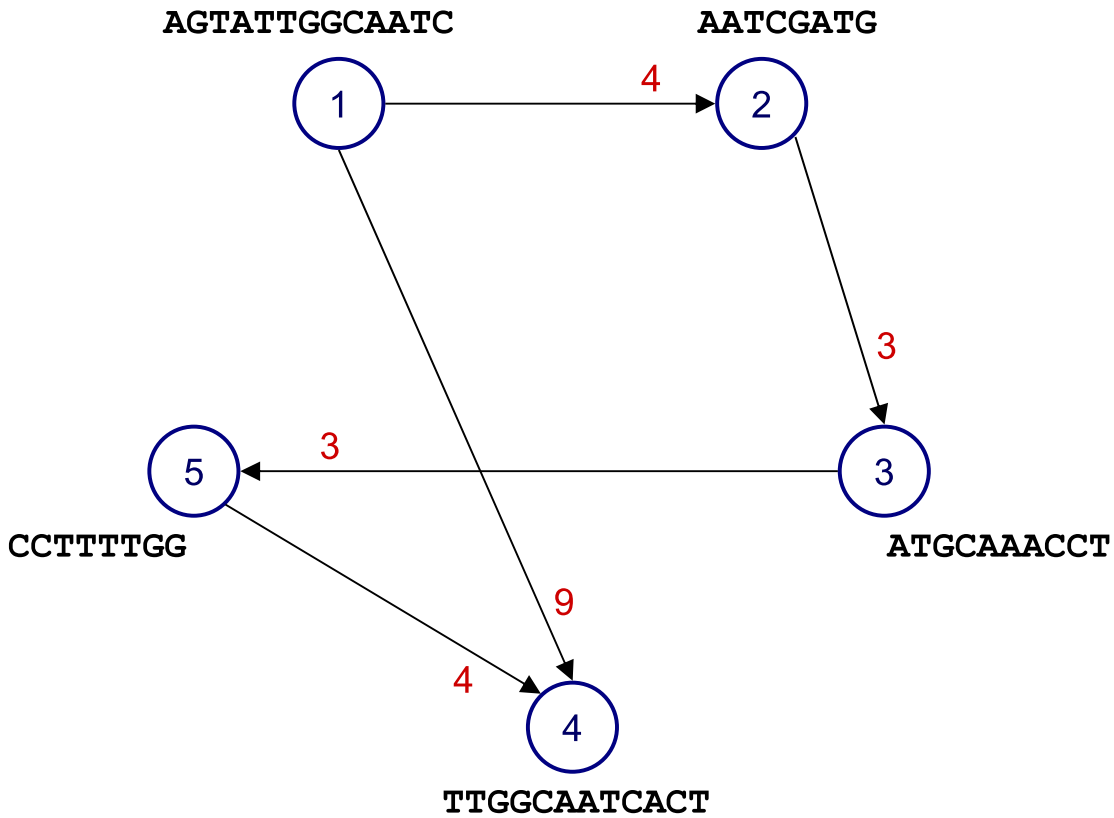
Exercício

Mostre como adaptar o algoritmo guloso para Shortest Common Superstring para lidar com orientação desconhecida dos fragmentos.

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos

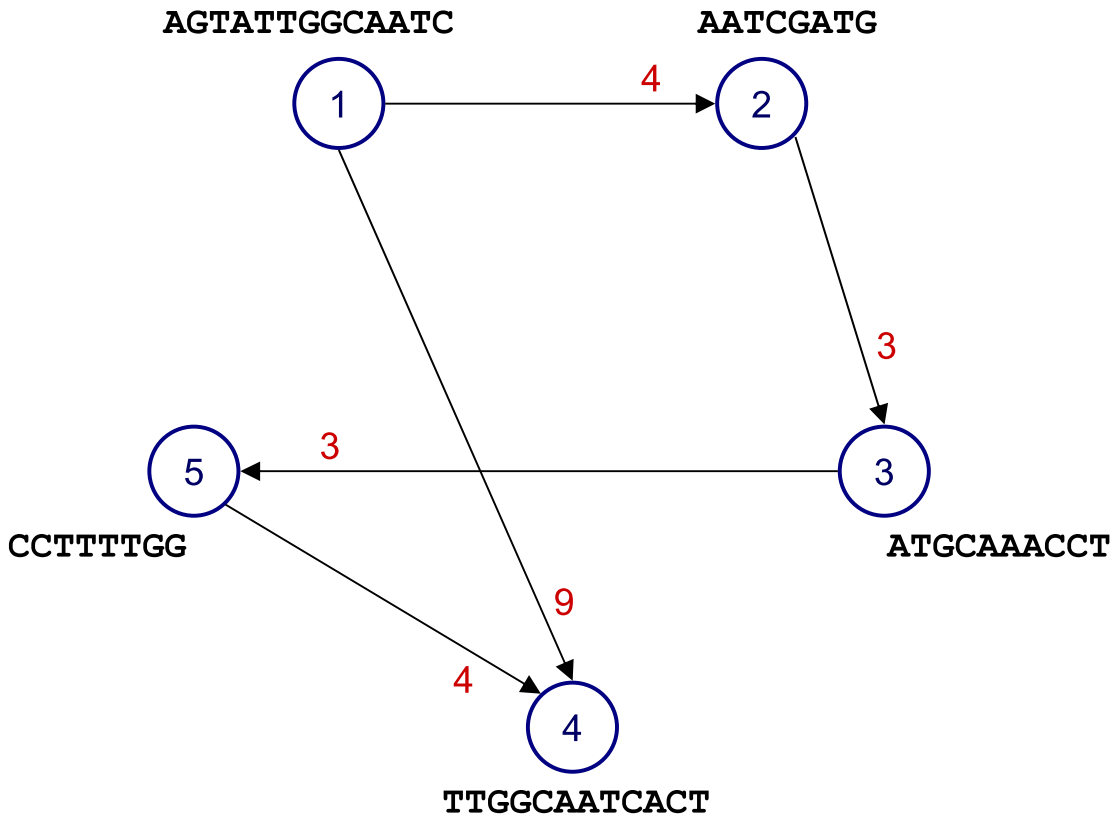
- Seja $\mathcal{F}$ uma coleção de fragmentos tal que nenhum fragmento esteja completamente contido em outro.
- Considere o grafo o $\mathcal{OG}(\mathcal{F}, t)$, que pode ser construído a partir de $\mathcal{OG}(\mathcal{F})$ removendo as arestas de peso menor do que t.
- Se $\mathcal{OG}(\mathcal{F}, t)$ possui um ciclo orientado, então existe uma repetição de tamanho maior ou igual a t na sequência original (S). Note que o contrário não é necessariamente verdade.
- Se a sequência original (S) for totalmente coberta por um único *contig*, com sobreposição mínima t entre os fragmentos, e sem nenhuma repetição de tamanho maior ou igual a t, então o grafo $\mathcal{OG}(\mathcal{F}, t)$ é acíclico, existe um único Caminho Hamiltoniano (P) em $\mathcal{OG}(\mathcal{F}, t)$ e $S = S(P)$.
- Neste caso, o Caminho Hamiltoniano em $\mathcal{OG}(\mathcal{F}, t)$, pode ser obtido através de uma ordenação topológica, em tempo $O(n^2)$.

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Algoritmo Guloso



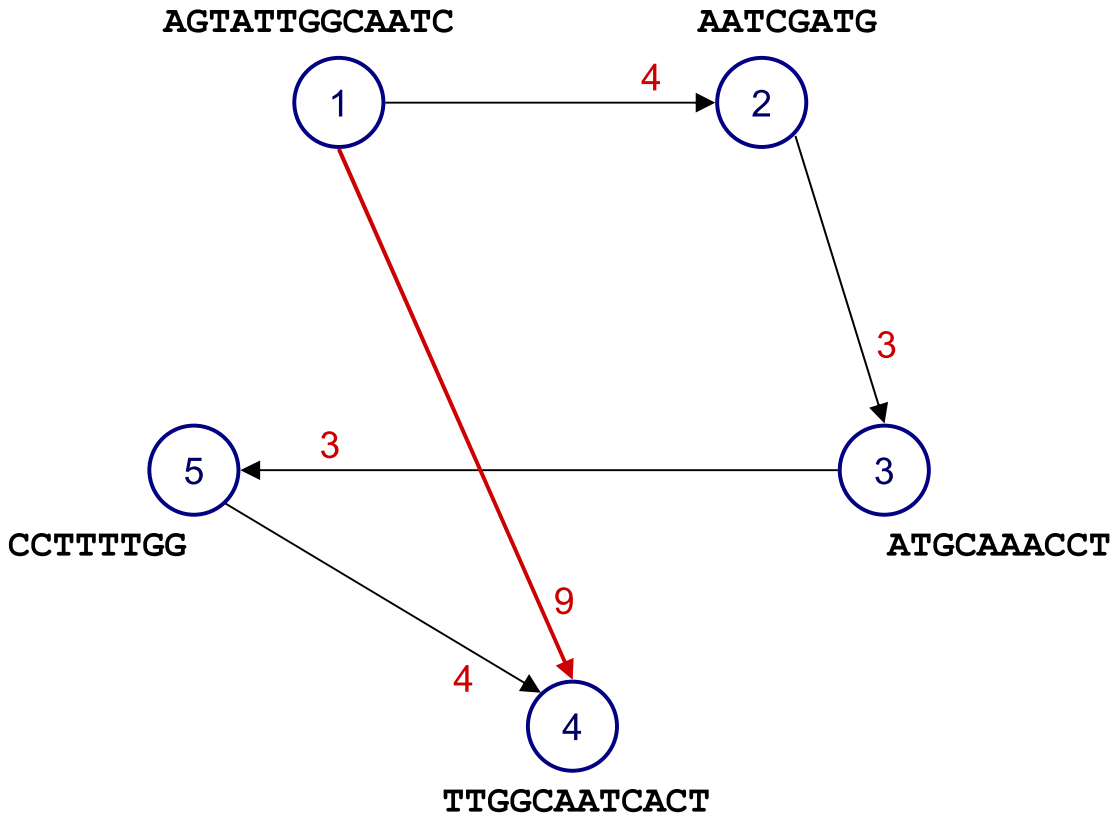
Sobreposição mínima: t = 3

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Algoritmo Guloso



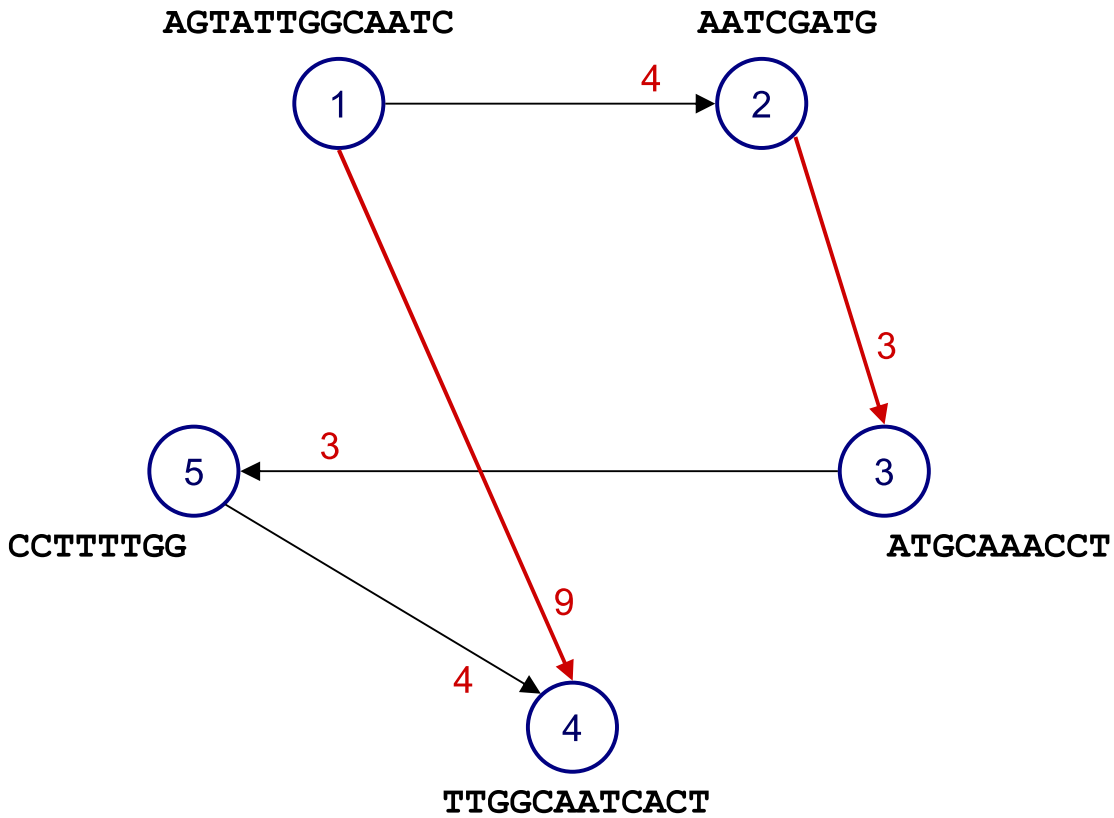
AGTATTGGCAATC | AATCGATG | ATGCAAACCT | TTGGCAATCACT | CCTTTTGG

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Algoritmo Guloso



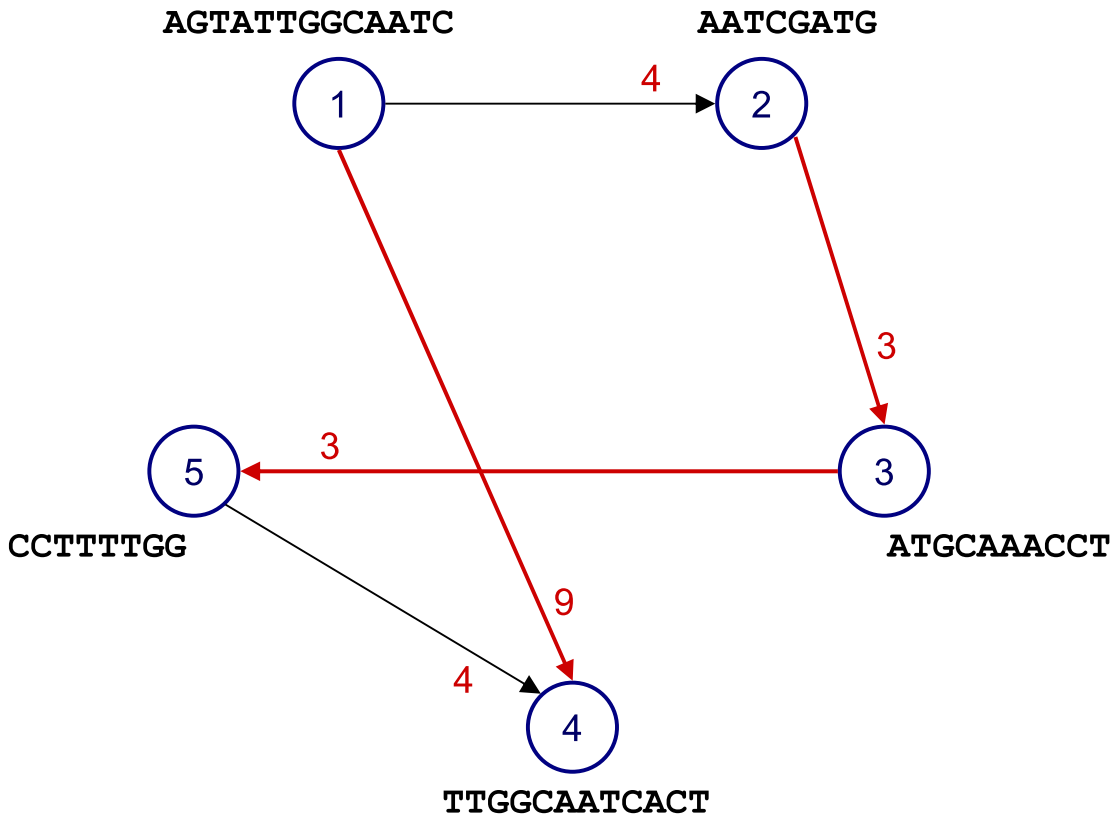
AGTATTGGCAATCACT | AATCGATG | ATGCAAACCT | CCTTTTGG

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Algoritmo Guloso



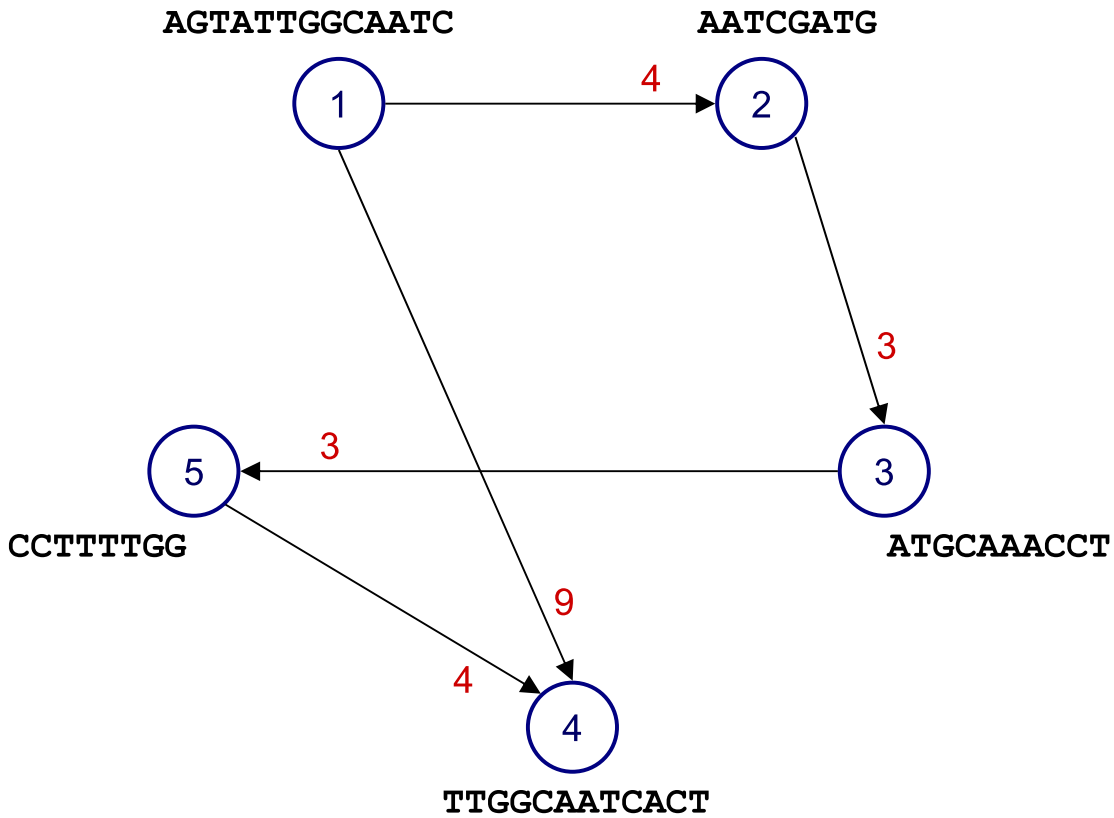
AGTATTGGCAATCACT | AATCGATGCAAACCT | CCTTTTGG

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Algoritmo Guloso



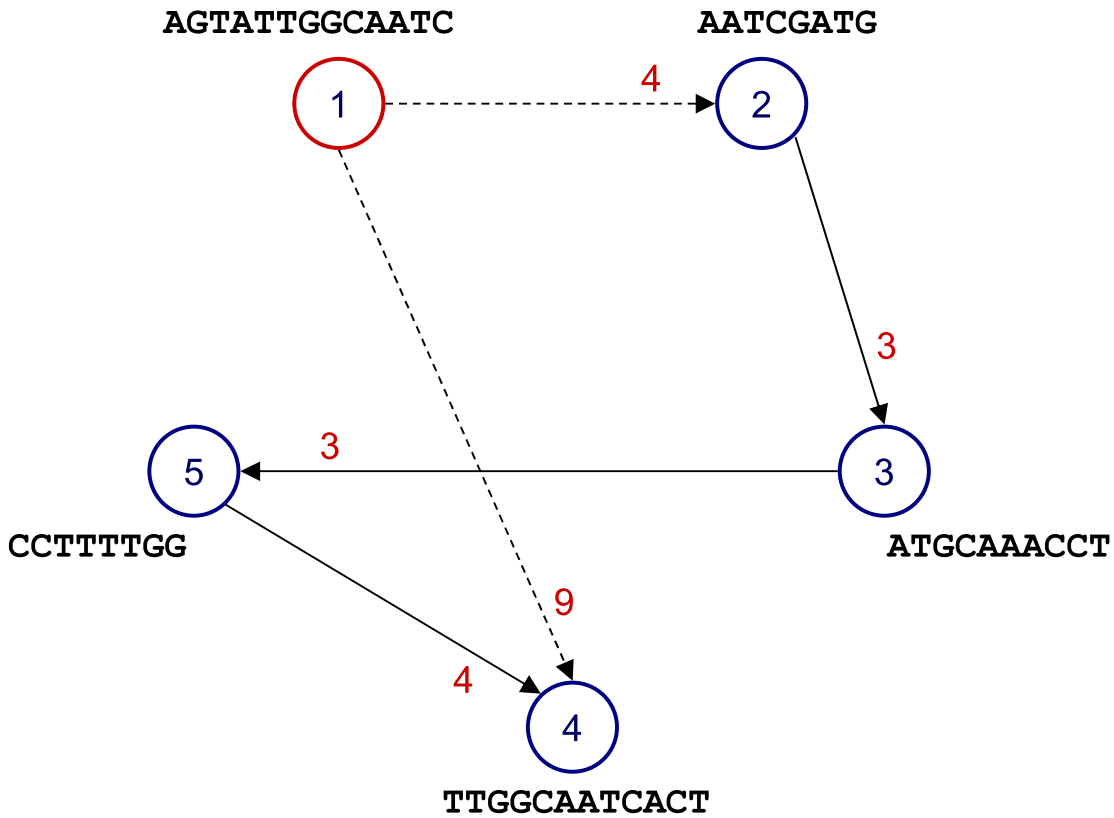
AGTATTGGCAATCACT | AATCGATGCAAACCTTTGG

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Ordenação Topológica



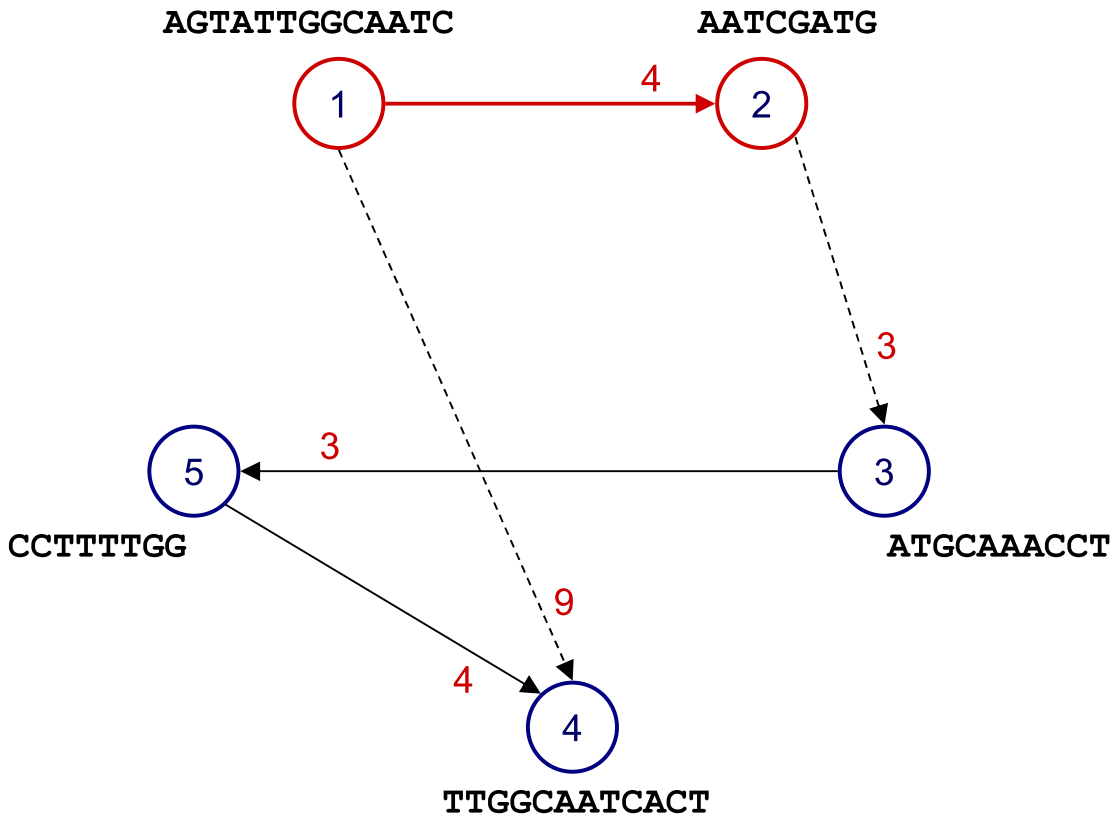
Sobreposição mínima: t = 3

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Ordenação Topológica



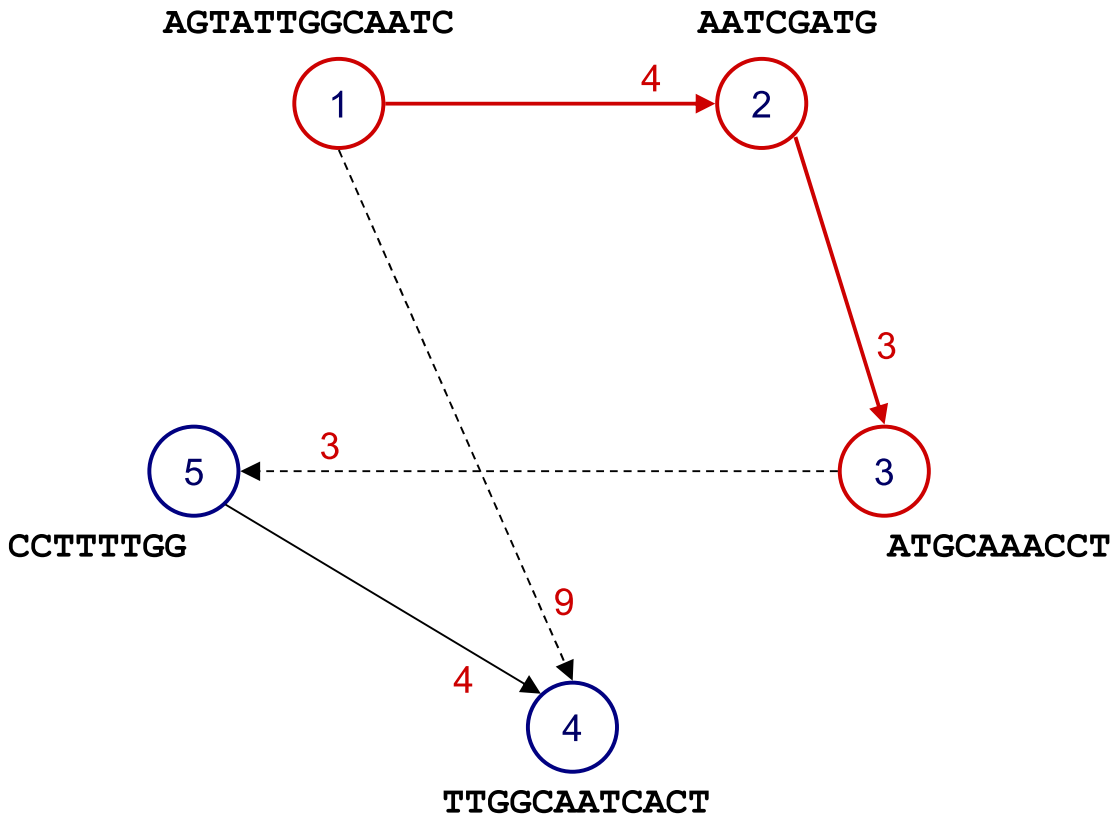
AGTATTGGCAATC

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Ordenação Topológica



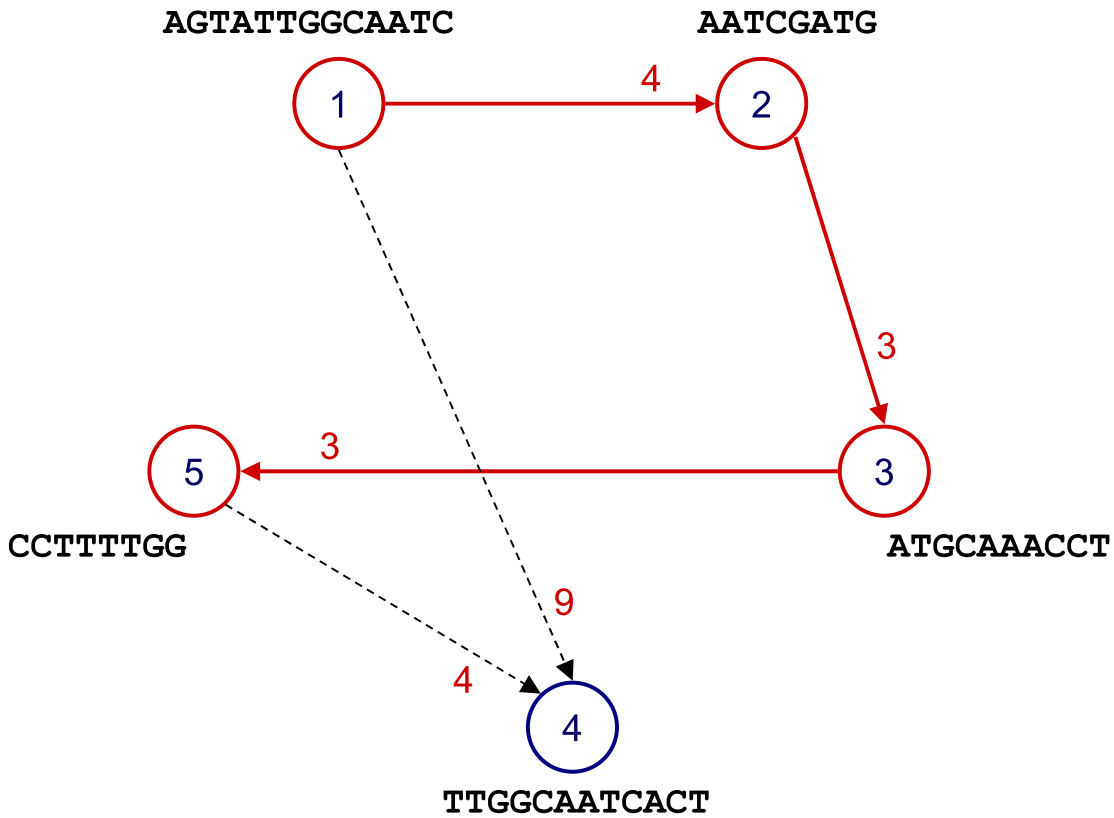
AGTATTGGCAATCGATG

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Ordenação Topológica



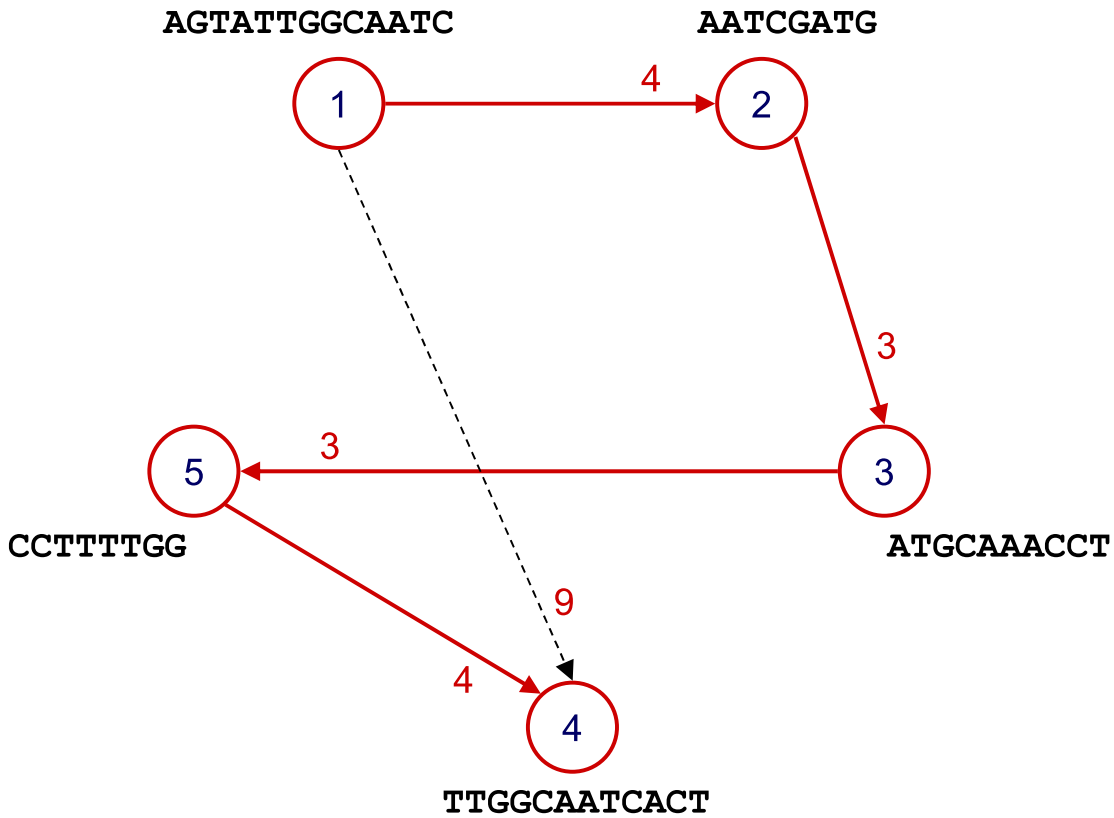
AGTATTGGCAATCGATGCAAACCT

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Ordenação Topológica



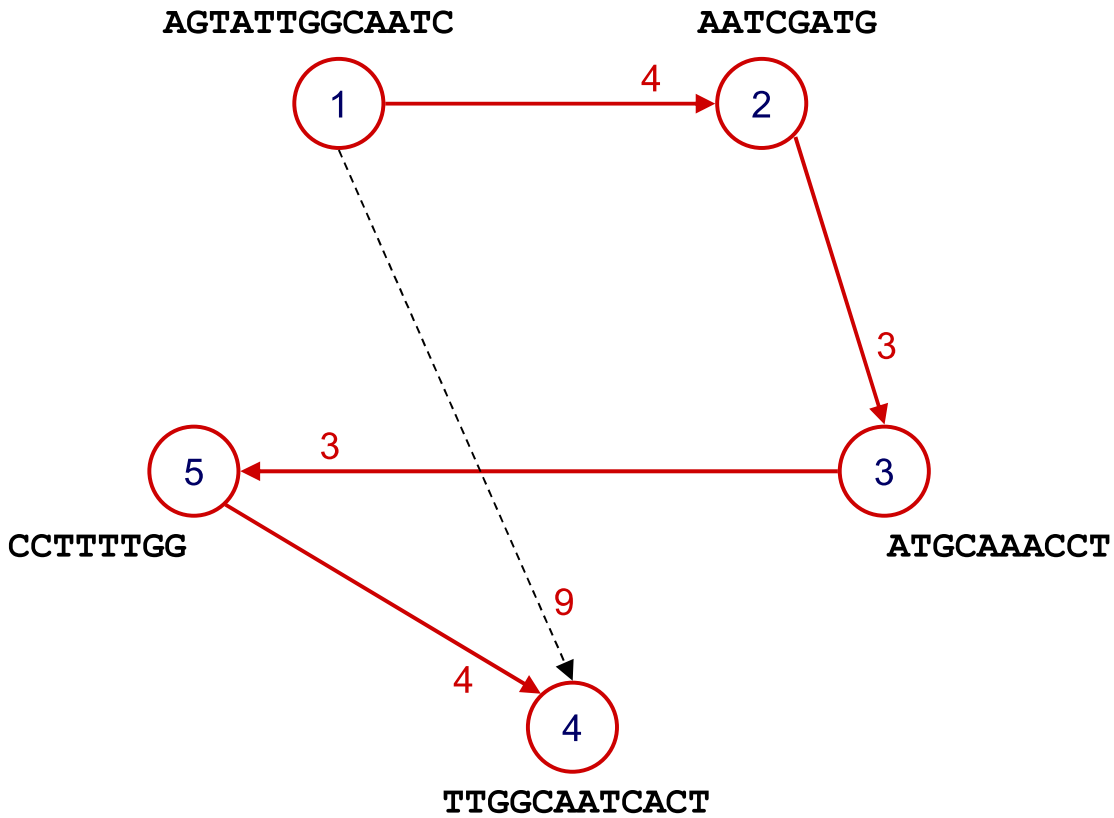
AGTATTGGCAATCGATGCAAACCTTTGG

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Ordenação Topológica



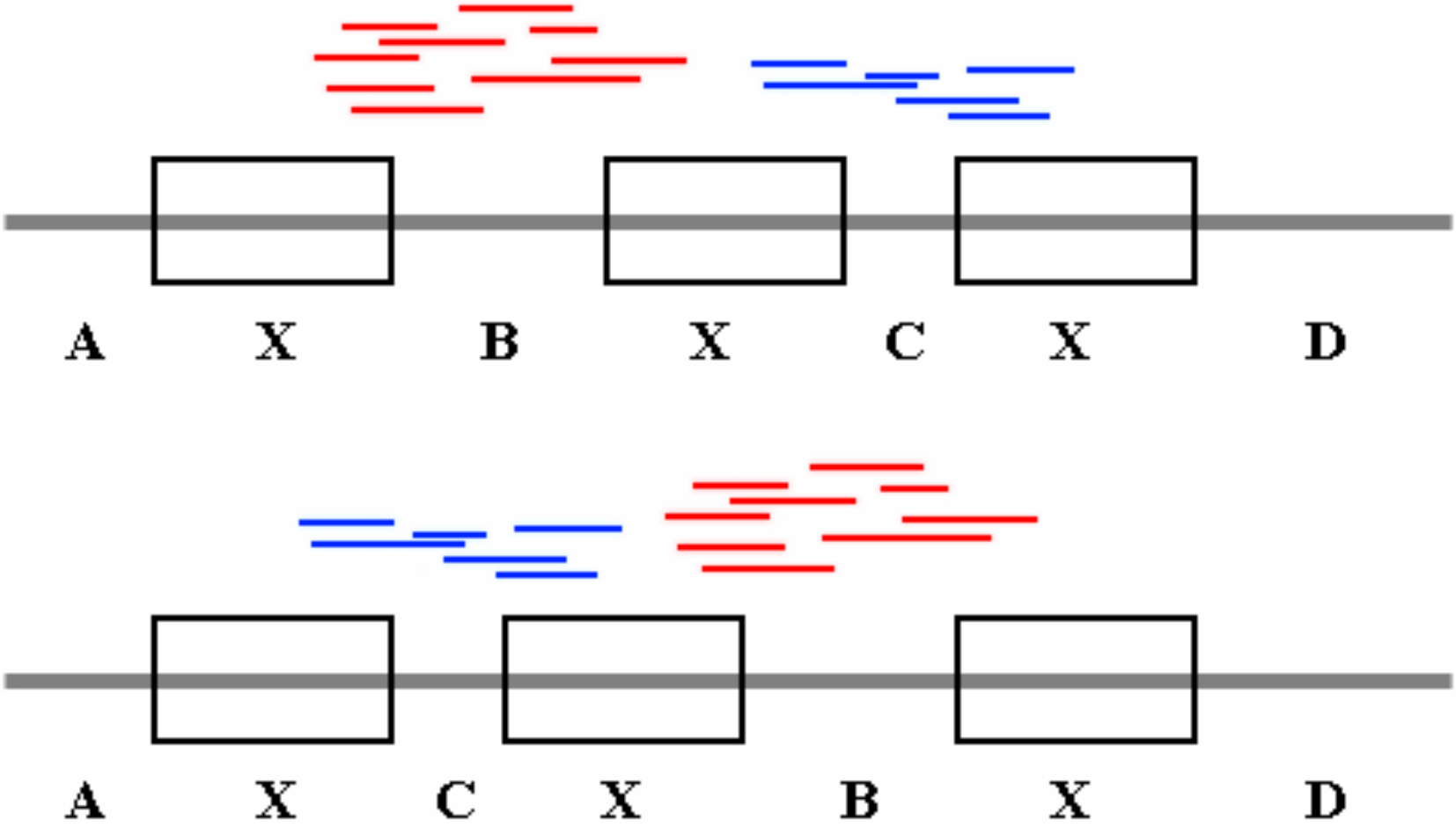
AGTATTGGCAATCGATGCAAACCTTTGGCAATCACT

Montagem de Fragmentos em Grafos de Sobreposições Acíclicos - Ordenação Topológica

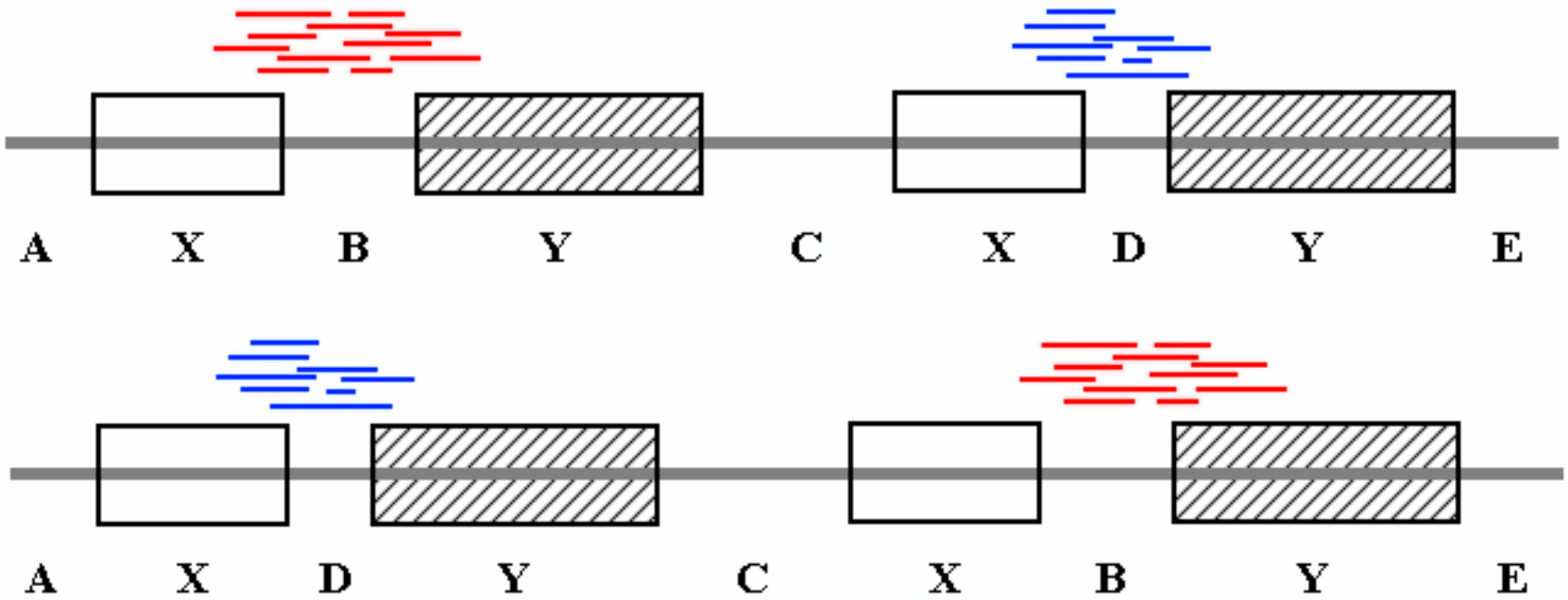


AGTATTGGCAATCGATGCAAACCTTTTGGCAATCACT

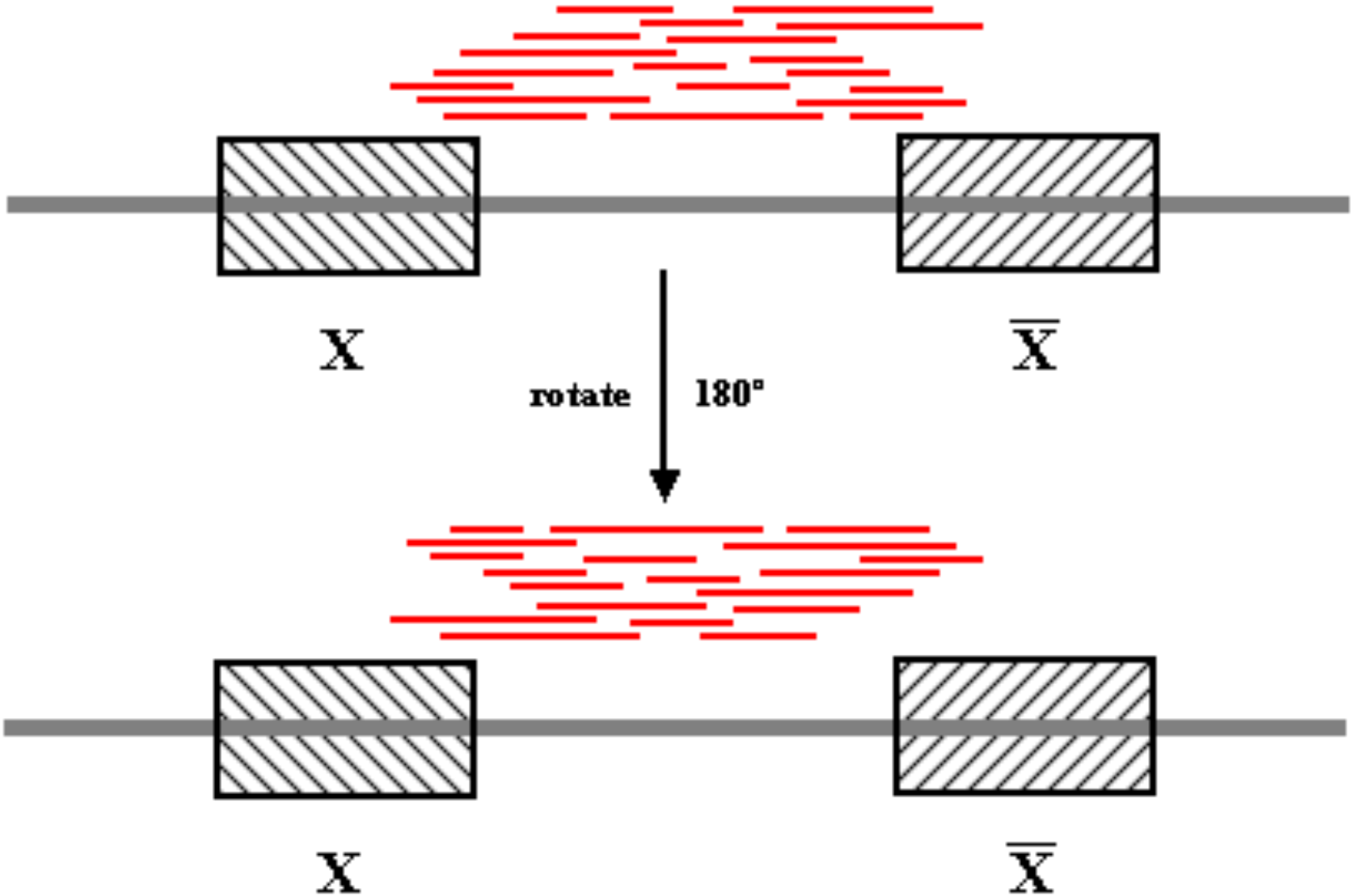
Problemas com Repetições



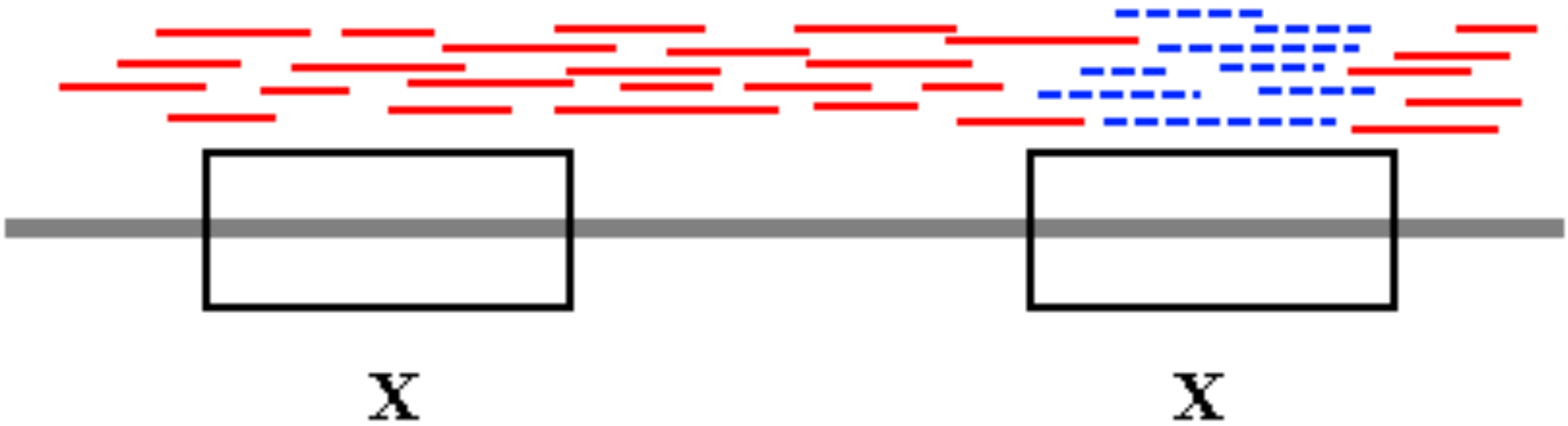
Problemas com Repetições



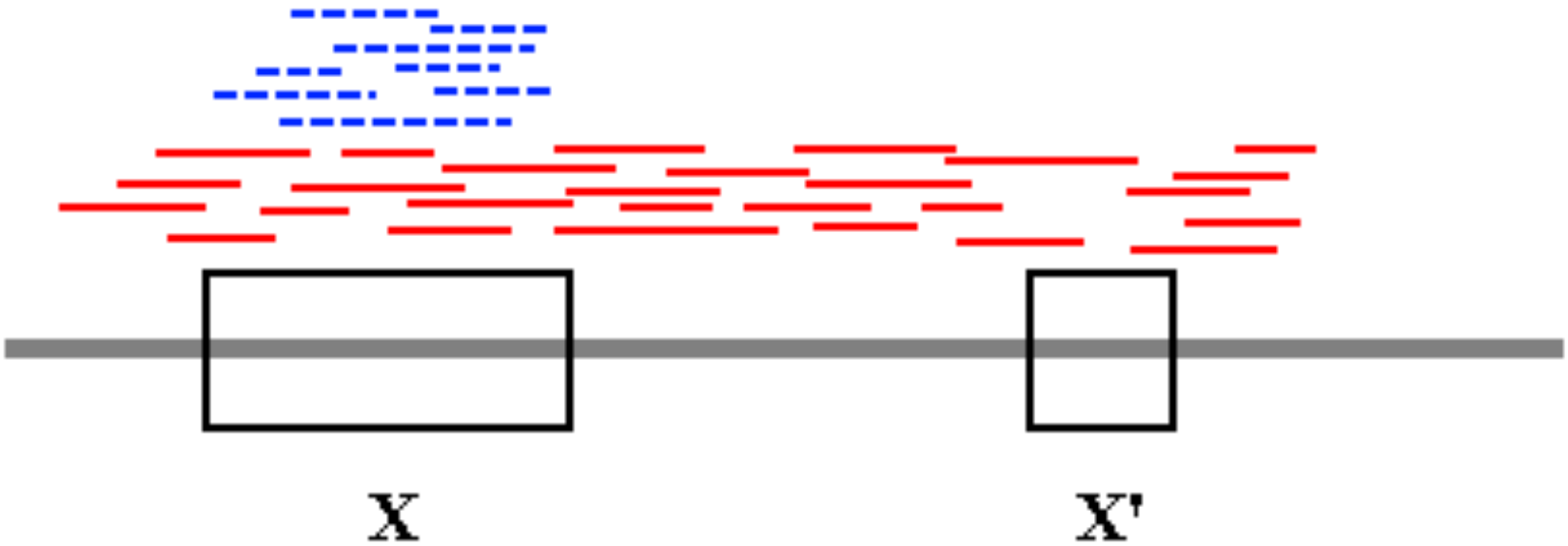
Problemas com Repetições



Problemas com Repetições



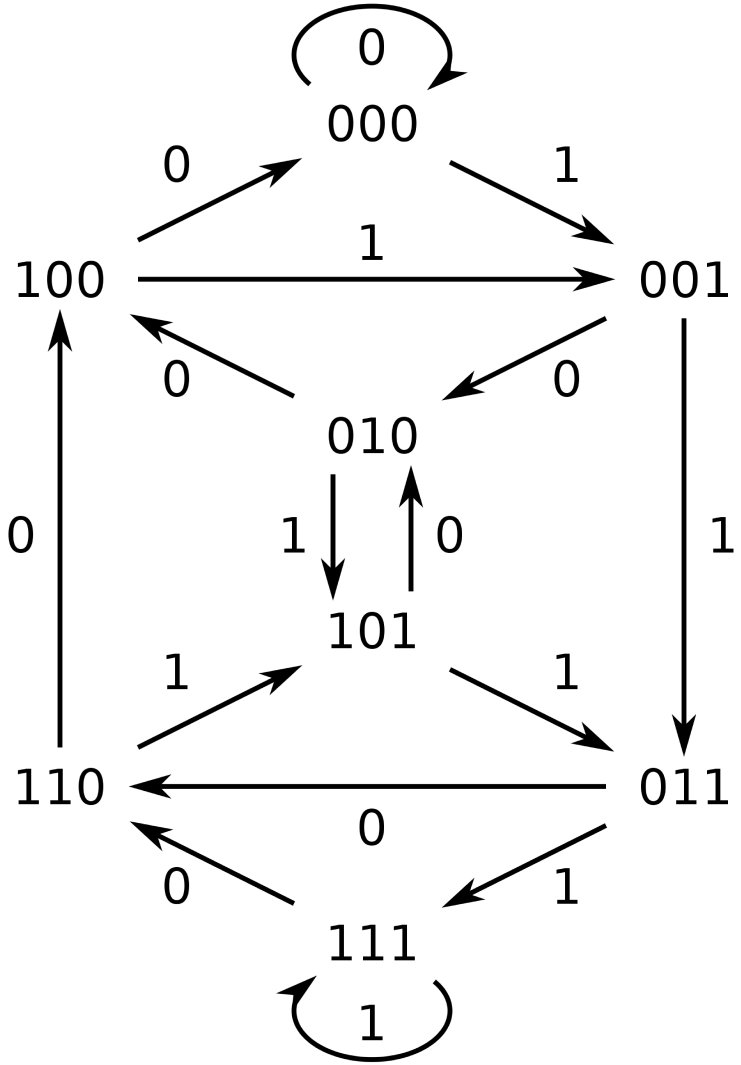
Problemas com Repetições



Grafo de Bruijn

- Dado um alfabeto $\mathcal{A}$ qualquer, um k-mer de $\mathcal{A}$ é definido com uma sequência de k caracteres de $\mathcal{A}$.
- O grafo de Bruijn de ordem k é um grafo orientado cujos vértices são todos os k-mers de $\mathcal{A}$ e existe uma aresta entre dois vértices x e y se e somente se os $k-1$ últimos caracteres de x forem iguais aos $k-1$ primeiros caracteres de y.
- Note que o grafo de Bruijn de ordem k possui $|\mathcal{A}|^k$ vértices e $|\mathcal{A}|^{k+1}$ arestas.
- O grafo de Bruijn possui algumas características interessantes. Por exemplo, ele é tanto hamiltoniano (admite circuito hamiltoniano) como euleriano (admite circuito euleriano).
- As novas técnicas de sequenciamento possuem algumas características importantes, como gerar fragmentos de tamanho fixo e (relativamente) pequenos.

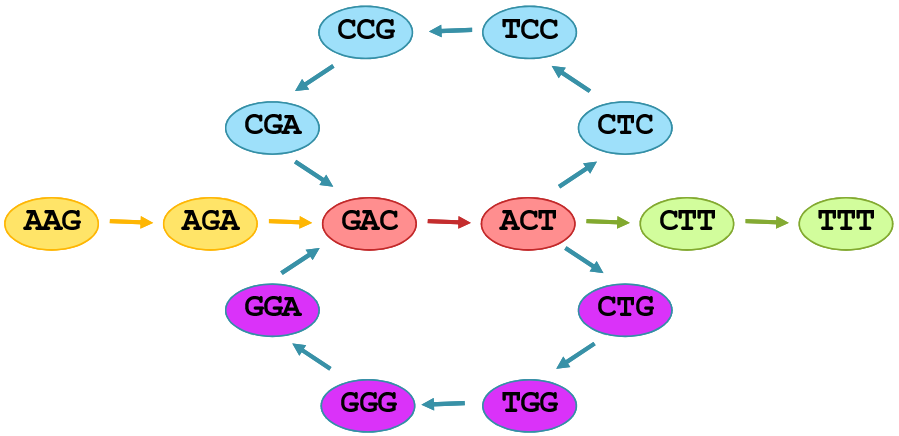
Grafo de Bruijn



Montagem de Fragmentos usando Grafos de k-Mers

- Sendo assim, dado um conjunto de fragmentos $\mathcal{F}$ sobre o alfabeto $\mathcal{A}$, todos de tamanho $k+1$, podemos gerar um grafo de k-mers $G(\mathcal{F})$, similar ao grafo de Bruijn: para cada $f \in \mathcal{F}$ adicionamos os vértices x e y (casos eles ainda não existam) e a aresta (x, y) tal que x é o vértice que representa o prefixo de tamanho k de f e y é o vértice que representa o sufixo de tamanho k de f.
- Neste caso, uma montagem dos fragmentos corresponde a um passeio que contenha todas as arestas deste grafo.
- Um grafo orientado admite um passeio que contem todas as arestas do grafo se e somente se o grafo reduzido (ou seja, o grafo onde todas as componentes fortemente conexas são reduzidas a um único vértice) for um grafo caminho.
- Usando a abordagem descrita acima é possível testar se um grafo possui um passeio que contem todas as arestas do grafo em tempo polinomial.

Montagem de Fragmentos usando Grafos de k-Mers



Fragmentos:

AAGA	TGGG	TCCG
AGAC	GGGA	CCGA
GACT	GGAC	CGAC
ACTG	ACTC	ACTT
CTGG	CTCC	CTTT

Montagens:

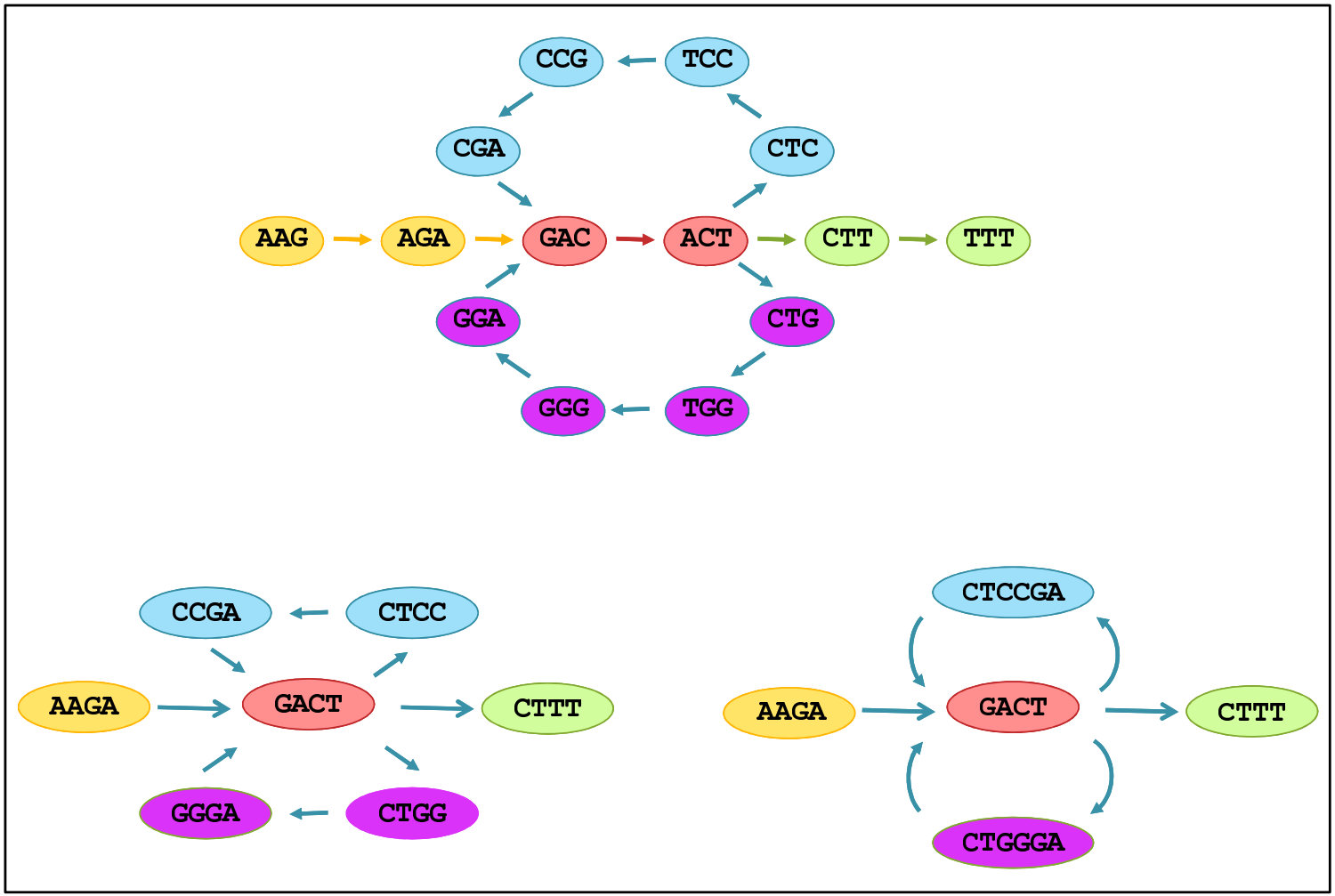
AAGACTCCGACTGGGACTTT

AAGACTGGGACTCCGACTTT

Montagem de Fragmentos usando Grafos de k-Mers

- O valor de k usado para definir o tamanho dos fragmentos tem um forte impacto na montagem:
  - Quanto menor o valor de k, maiores e mais frequentes serão os problemas com repetições.
  - Quanto maior o valor de k, mais difícil será o grafo conter um passeio que contenha todas as arestas.
- Dado um conjunto de fragmentos $\mathcal{F}$, tal que para todo $f \in \mathcal{F}$ temos que $|f| \geq k$, podemos obter um conjunto de fragmentos $\mathcal{F}'$, todos de tamanho k, equivalente em termos da montagem desejada. Para isso, basta, para cada $f \in \mathcal{F}$, adicionar em $\mathcal{F}'$ todas as $|f| - k + 1$ subscadeias de f de tamanho k.
- Note que as subsequências de f irão gerar um passeio em $G(\mathcal{F}')$.
- Para diminuir o tamanho do grafo $G(\mathcal{F})$, podemos transformar todo caminho simples (sem bifurcações) em um único vértice.

Montagem de Fragmentos usando Grafos de k-Mers



Montagem de Fragmentos usando Grafos de k-Mers

- Como vimos anteriormente, existem várias formas diferentes de modelar o problema de montagem de fragmentos.
- Por exemplo, ao modelar o problema de montagem de fragmentos como SCS (Shortest Common Superstring) conseguimos montar um grafo de sobreposições em tempo e espaço $O(||\mathcal{F}|| + n^2)$. Nesse caso desejamos encontrar um caminho hamiltoniano no grafo de sobreposições (problema NP-Difícil).
- Por outro lado, ao modelar o problema de montagem de fragmentos usando grafo de k-mers conseguimos construir o grafo de k-mers em tempo e espaço $O(||\mathcal{F}|| + k \times |\mathcal{A}|^k)$. Neste caso desejamos encontrar um passeio que contenha todas as arestas do grafo de k-mers (problema que possui solução polinomial no tamanho do grafo, caso exista tal passeio).

Exercícios

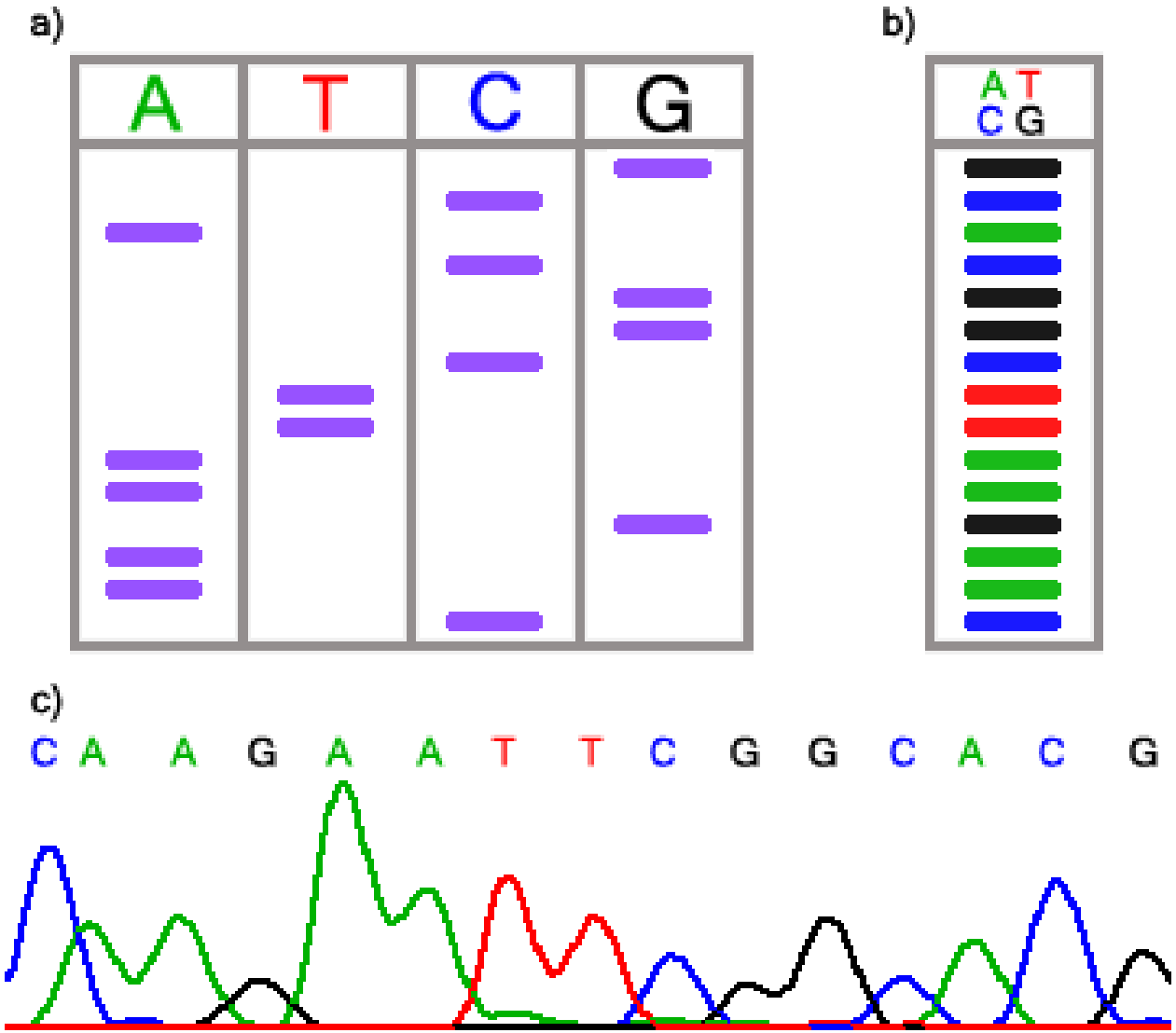
Exercício

Dada uma coleção de fragmentos $\mathcal{F}$ sobre um alfabeto $\mathcal{A}$, mostre como construir o grafo de k-mers em tempo e espaço $O(||\mathcal{F}|| + k \times |\mathcal{A}|^k)$.

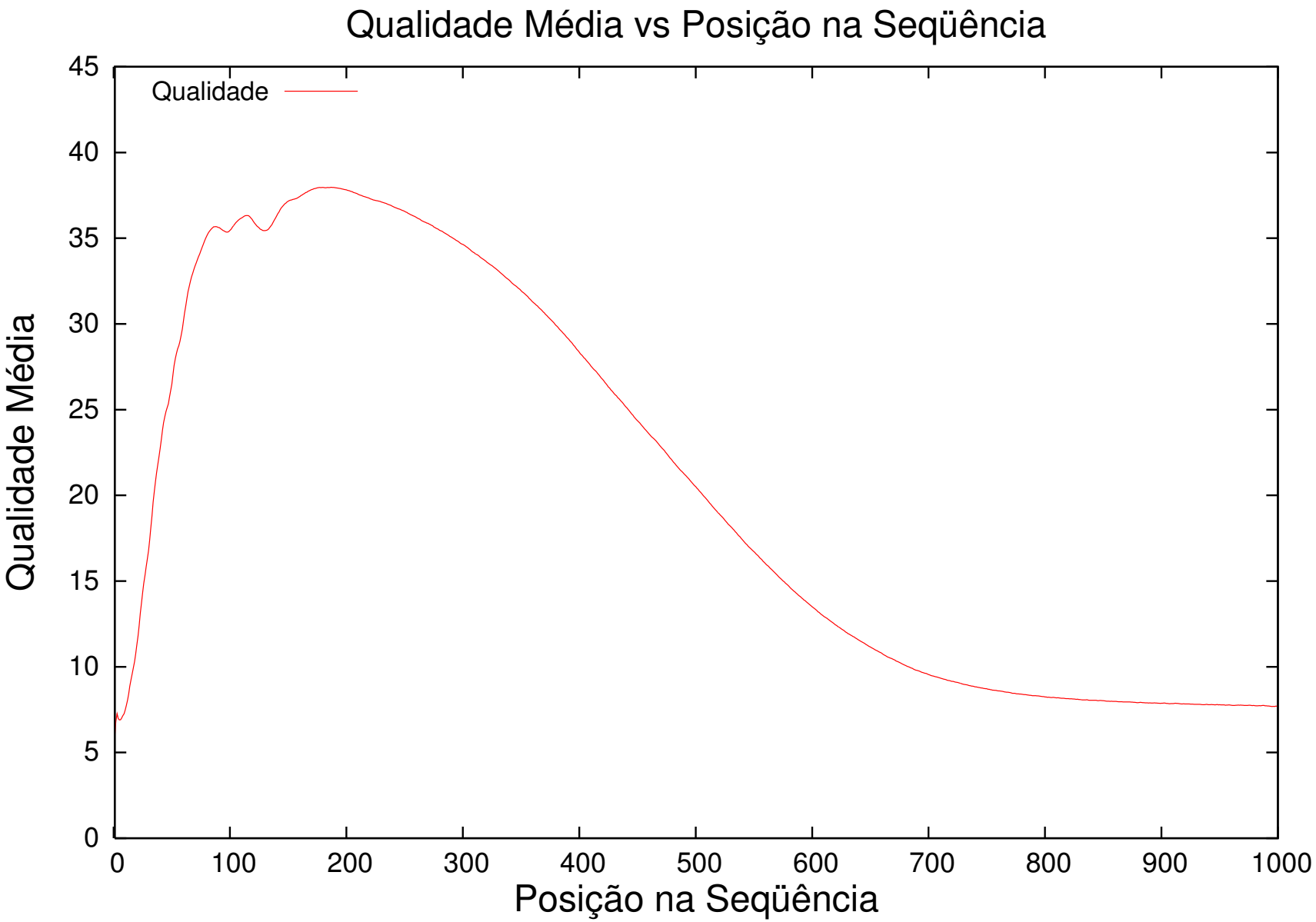
Exercício

Dada a coleção de fragmentos $\mathcal{F} = \{$`CTGCT`, `CTCGAC`, `CTCTCG`, `ACTGC`, `GCTCTC`$\}$, construa o grafo de 3-mers e determine a montagem destes fragmentos.

Base-Calling



Base-Calling: SUCEST



Phred

- Ferramenta de *base-calling* produzida por Phil Green, Brent Ewing, LaDeana Hillier e Michael Wendl (1998).
- O método é composto por 4 fases:
  - Predição das localizações dos picos.
  - Identificação dos picos observados.
  - Comparação entre os picos previstos e observados.
  - Verificação dos picos observados que não são compatíveis com os picos previstos.
- Phred associa um valor de qualidade para cada base da sequência lida:

$$Q = -10 \times \log_{10} P_e$$

  onde P_e é a probabilidade da base estar errada.
- Exemplo:
  - $Q = 10 \Longrightarrow P_e = 10\%$
  - $Q = 20 \Longrightarrow P_e = 1\%$
  - $Q = 30 \Longrightarrow P_e = 0.1\%$
- Phred pode ser usado para remover pontas de baixas qualidades.

Phrap

- Ferramenta de montagem de sequências produzida por Phil Green (1998).
- Principais características:
  - Usa a sequência inteira, não apenas os trechos de alta qualidade.
  - Usa a qualidade das sequências para obter uma montagem de alta qualidade.
  - Constrói os consensos dos contigs como um mosaico das partes de mais alta qualidade das sequências.
  - Atribui valores de qualidade para as sequências consenso.
  - Faz comparação entre as sequências usando uma variação do algoritmo de Smith-Waterman, onde as comparações são iniciadas apenas se existir um trecho idêntico de tamanho mínimo (por padrão 30), em ambas as sequências. A extensão do alinhamento é realizada usando apenas uma faixa restrita da matriz de Programação Dinâmica (por padrão, faixa de tamanho 14).

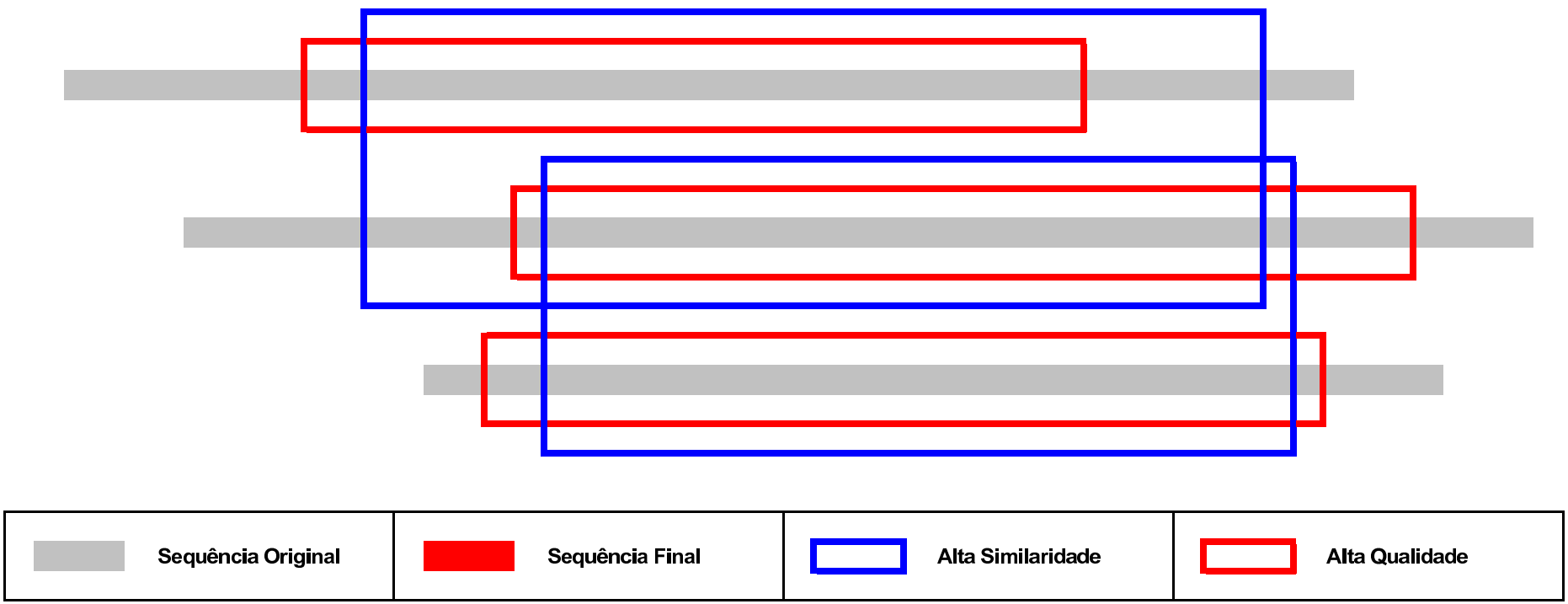
Consed

- Ferramenta de visualização e edição de montagens de sequências, com suporte a "fechamento" de montagem, desenvolvida por David Gordon, Chris Abajian e Phil Green (1998).
- Desenvolvido originalmente para dar suporte apenas ao Phrap.
- Hoje suporta uma vasta gama de montadores (que produzem arquivos no formato ace, lidos pelo Consed), inclusive os montadores desenvolvidos para as novas tecnologias 454 e Solexa (de sequências curtas e muitas curtas).

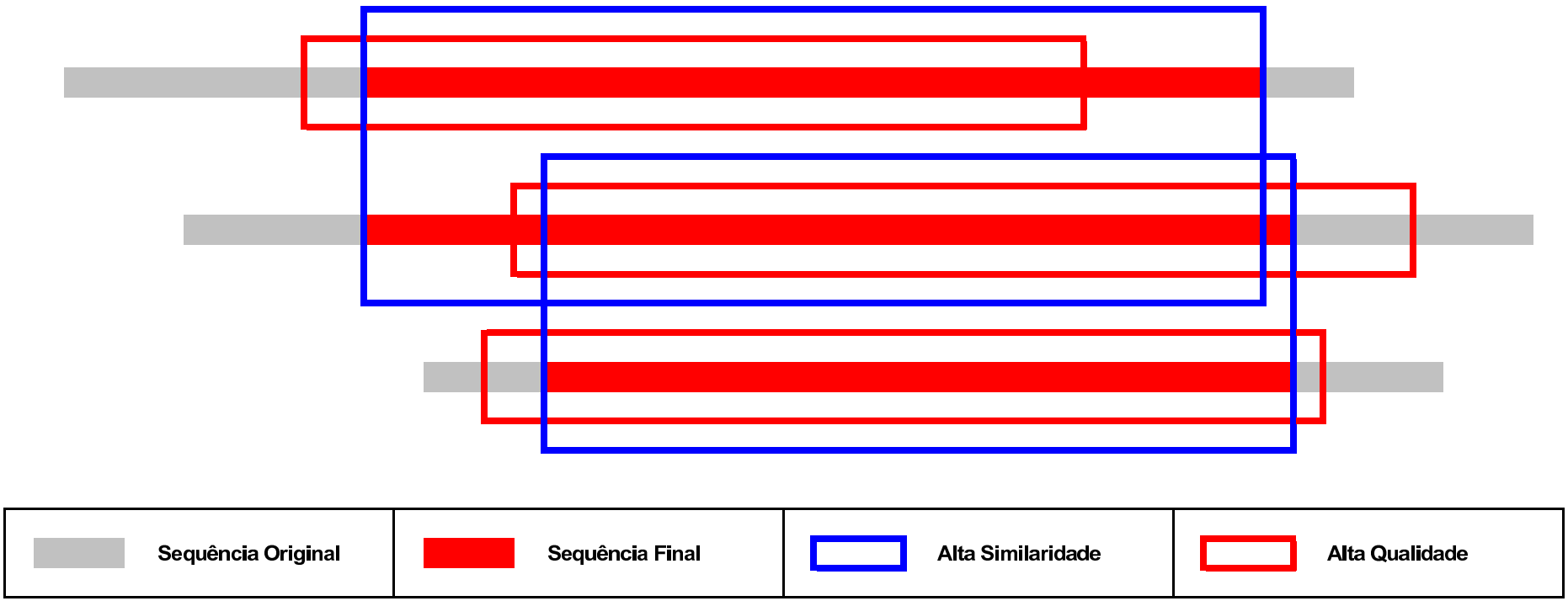
CAP3

- Ferramenta de montagem de sequências produzida por Xiaoqiu Huang e Anup Madan (1999).
- Passos principais:
  - Remoção das extremidades de baixa qualidade.
  - Identificação das sobreposição entre as sequências.
  - Remoção das falsas sobreposições.
  - Construção dos *contigs*.
  - Alinhamento múltiplo e geração da sequência consenso, considerando as somas das qualidades das bases de cada coluna.
- Sobreposições identificadas em duas fases:
  1. Alinhamento local ponderado restrito a uma faixa de tamanho k:
     - $Match' = Match \times min(q_1, q_2)$
     - $Mismatch' = Mismatch \times min(q_1, q_2)$
     - $Gap' = Gap \times min(q_1, q_2)$
  2. Alinhamento Global, restrito a uma faixa de tamanho $2k$, centralizado na posição inicial do alinhamento local ótimo calculado previamente.
- As distâncias mínimas e máximas entre cada par de sequências forward e reverse são usadas para auxiliar na montagem.

CAP3 - Remoção de Extremidades de Baixa Qualidades



CAP3 - Remoção de Extremidades de Baixa Qualidades



CAP3 - Construção da Sequência Consenso

- Calcula-se a soma ponderada das qualidades de cada um dos tipos de bases presentes na coluna.
- Considera-se peso 1 para cada pontuação máxima (em cada um dos sentidos de leitura) e $0,5$ para as demais qualidades.
- Para gaps, usa-se a pontuação média das bases que delimitam o bloco de gaps.
- A base de maior soma ponderada de qualidade é a escolhida para o consenso.
- A qualidade do consenso é calculada como a diferença entre a soma ponderada das qualidades da base escolhida subtraída das somas ponderadas das qualidades das demais bases daquela mesma coluna.
- Eventualmente, a base do consenso pode ter qualidade zero, indicando que as somas ponderadas das qualidades das demais bases possui soma maior ou igual a da base escolhida para o consenso.
- O CAP3 geralmente produz *contigs* mais curtos, porém de maior qualidade, quando comparados com os *contigs* gerados pelo Phrap.

CAP3 - Construção da Sequência Consenso

Consenso	A	35		T	5	
	Base	Qual	Peso	Base	Qual	Peso
→	A	30	1	A	30	1
→	A	20	0,5	T	30	1
→	C	10	1	T	20	0,5
→	A	20	0,5	A	20	0,5
←	A	20	1	A	20	1
←	A	10	0,5	A	10	0,5
←	T	30	1	T	30	1
	→	←	Total	→	←	Total
A	50	25	75	40	25	65
C	10		10			0
T		30	30	40	30	70
G			0			0