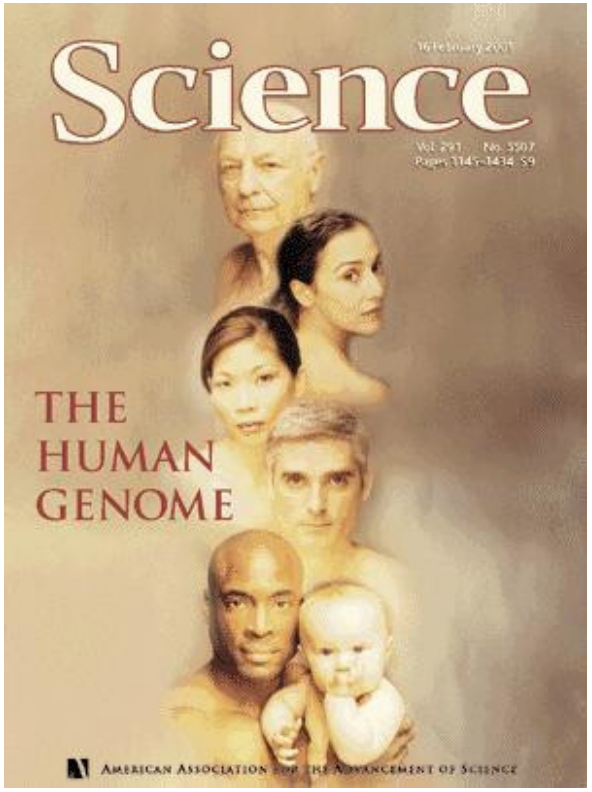
Sekvenovanie a zostavovanie genómov

(časť 2 - dlhé čítania)

Broňa Brejová

28.9.2023



Prehľad sekvenovacích technológií

Technológia	Dĺžka čítania	Chybovosť	Za deň	Cena za MB
1. generácia				
Sanger	do 1000 bp	$< 1\%$	3 MB	$4000
2. (next) generácia (cca od 2004)				
Illumina	2$\times$150bp (250bp)	$< 0.1\%$	150 GB	$0.03
3. generácia (cca od 2018)				
PacBio	cca 15 Kbp	$\approx$ 10%	700 GB	$0.02
PacBio HiFi	cca 15 Kbp	$< 1\%$	70 GB	$0.20
Oxford Nanopore	5-100+kbp	do 10%	50 GB	$0.02

Na minulej prednáške

- Genóm je potrebné zostaviť zo sekvenačných čítaní
- Zostavovanie genómov pomocou de Bruijnových grafov
- Nie je vhodné pre najnovšie technológie s dlhými a chybovými čítaniami
  - Rozklad na k-tice zahadzuje príliš veľa informácie
    (dĺžka čítania 10000+, k obvykle medzi 30 a 70)
  - Chybovosť okolo 10% robí de Bruijnov graf neprehľadným
    (pre $k = 31$, **každá** k-tica v priemere 3 chyby)

Prístup Overlap–Layout–Consensus

- **Overlap:** Nájdi prekryvy medzi čítaniami
  a zostav tzv. **graf prekryvov**
- **Layout:** Zjednoduš graf prekryvov a nájdi v ňom cesty, ktoré budú zodpovedať **kontigom**
- **Consensus:** Ku každému kontigu zostav sekvenciu, ktorá je konsenzom sekvencií čítaní, ktoré kontig tvoria
  (opravovanie lokálnych chýb)

Overlap: hľadanie prekryvov

```
CATCTCTAGGCCAGC
      ||||||  ||
      TAGGCCTGCTTCTTG
```

- špeciálny prípad zarovnávania sekvencií (nasledujúca prednáška)
- prekryvy **budú obsahovať chyby**
  (v našom prípade cca 1 chyba na 10 báz prekryvu)
- **čítaní je veľa:** $30\times$ pokrytie ľudského genómu
  $\Rightarrow$ cca 9 mil. čítaní dĺžky 10000
  nemôžeme porovnávať každé čítanie s každým
- praktický prístup:
  - rýchle predfiltrovanie **vhodných kandidátskych párov čítaní**
    (napríklad musia obsahovať dosť dlhú spoločnú k-ticu)
  - pomalšie zarovnávanie len pre kandidátske páry

Zostavenie grafu prekryvov

- Výsledok predchádzajúcej fázy:

  CATCTCTAGGCCAGC / TAGGCCTGCTTCTTG, prekryv 9 báz

  ...

- Zostavíme **graf prekryvov**:

  vrcholy: čítania ohodnotené hrany: prekryvy s dĺžkami

Príklad:

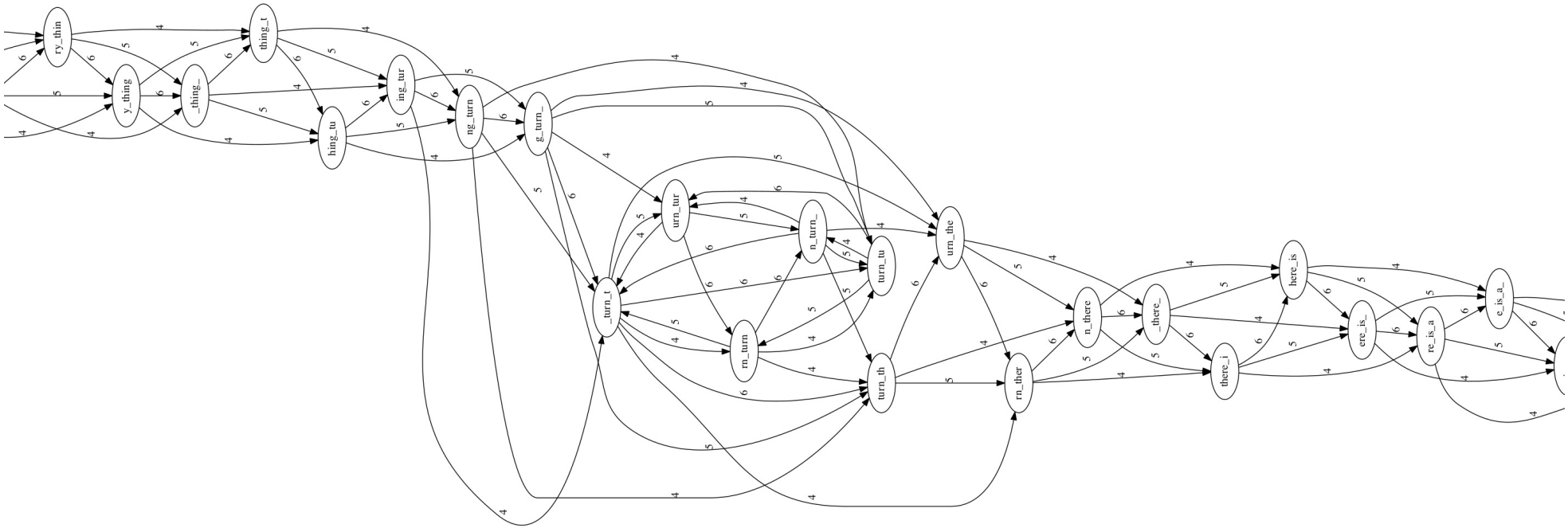
`to_every_thing_turn_turn_turn_there_is_a_season`

čítania dĺžky 7 písmen, minimálny prekryv 4

Príklad:

`to_every_thing_turn_turn_turn_there_is_a_season`

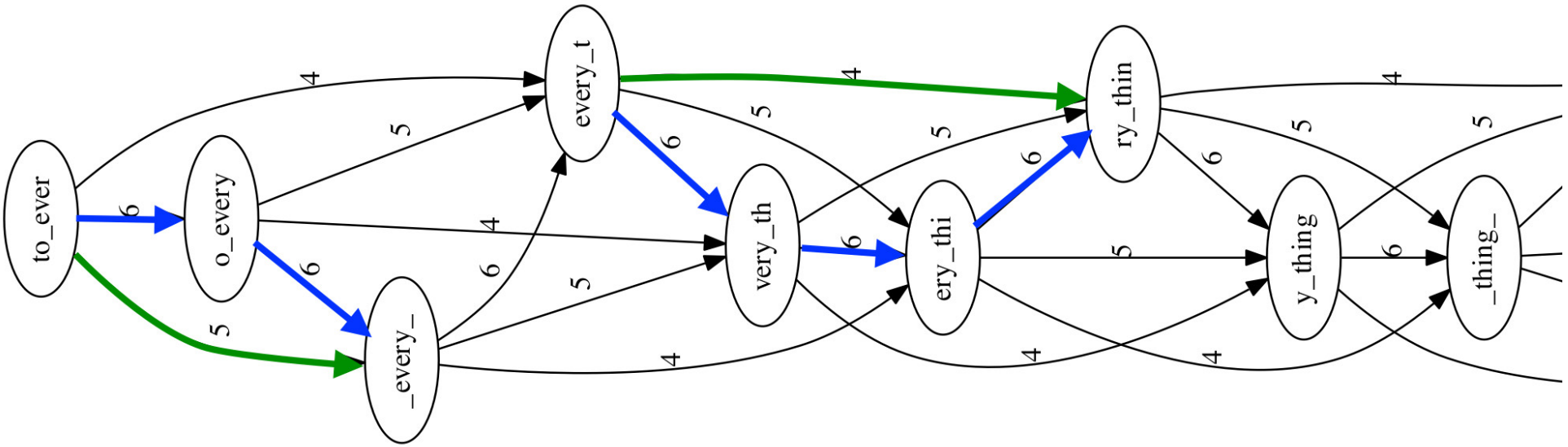
čítania dĺžky 7, minimálny prekryv 4



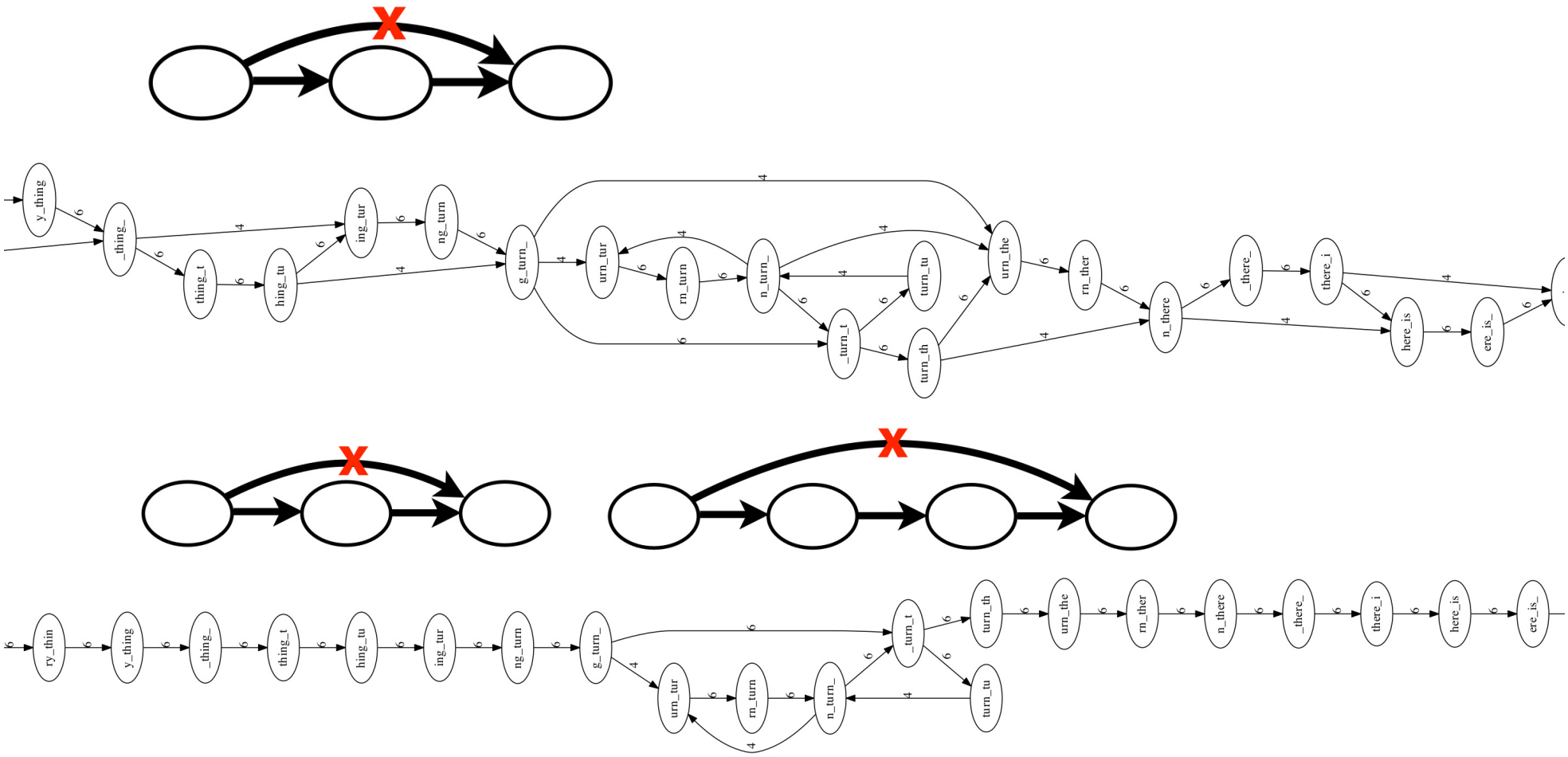
Príklad a obrázky Ben Langmead

Layout: Tranzitívne hrany

- Niektoré hrany sú nadbytočné, lebo hovoria to isté ako cesty z iných hrán



Layout: Odstránenie tranzitívnych hrán

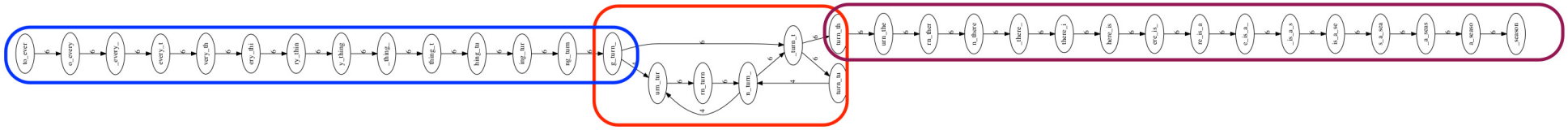


Layout: Rozdelenie na kontigy

Pôvodná sekvencia:

`to_every_thing_turn_turn_turn_there_is_a_season`

Nerozvetvujúce sa cesty reprezentujú kontigy



Výsledok:

Contig 1
`to_every_thing_turn_`

Contig 2
`turn_there_is_a_season`

Unresolvable repeat

Consensus: Získanie finálnej sekvencie

Ako sa líši de Bruijnov graf od grafu prekryvov?

de Bruijnov graf

- fixná dĺžka prekryvov
- zahadzujeme informáciu o kontinuite presahujúcej k znakov
- cesty reprezentujú genóm
- chyby $\Rightarrow$ bubliny a výbežky
- riešia sa v predspracovaní
- kontigy pokrývajú takmer všetky hrany

Graf prekryvov

- variabilná dĺžka prekryvov
- maximálne využitie informácie o prekryvoch
- cesty reprezentujú genóm
- chyby sú zväčša “schované”
- riešia sa dodatočne (consensus)
- treba odstraňovať tranzitívne hrany

Príklad: Skladanie genómu *Magnusiomyces capitatus*

(dĺžka genómu 19.6 Mbp, 4 chromozómy + mtDNA)

Technológia	Pokrytie	# kontigov	najväčší	N50
Illumina / Spades	250x	1102	172.6 Kbp	62.0 Kbp
PacBio / Canu	37x	17	4.7 Mbp	1.7 Mbp
PacBio + nanopore	65x	11	4.4 Mbp	2.0 Mbp

Zhrnutie

- Dlhé čítania nám umožňujú poskladať genómy do podstatne menej fragmentovanej podoby ako krátke čítania
- Na hľadanie prekryvov medzi čítaniami sú potrebné rýchle algoritmy (niektoré si ukážeme o dve prednášky)
- Grafy prekryvov a de Bruijnove grafy sa podobajú, existujú snahy o zjednotenie týchto dvoch konceptov

História sekvenovania genómov

1976	MS2 (RNA vírus) 40 kB
1988	projekt sekvenovania ľudského genómu (15 rokov)
1995	baktéria *H. influenzae* 2 MB, shotgun (TIGR)
1996	*S. cerevisiae* 10 MB, BAC-by-BAC (Belgicko, Británia)
1998	*C. elegans* 100 MB, BAC-by-BAC (Wellcome Trust)
1998	Celera: ľudský genóm do troch rokov!
2000	*D. melanogaster* 180 MB, shotgun (Celera, Berkeley)
2001	2x ľudský genóm 3 GB (NIH, Celera)
po 2001	Myš, potkan, kura, šimpanz, pes,. . .
2007	Watsonov a Venterov genóm (454)
2012	1000 ľudských genómov
2021	3,5 milióna genómov SARS-CoV-2
2021	UK Biobank 200,000 ľudských genómov + veľa ďalších dát
2022	Naozaj dokončený ľudský genóm (telomere to telomere)

Použitie NGS: Populačná genetika

- Sekvenujeme väčšinou krátke čítania z genómu určitého človeka
- Ako sa môj vlastný genóm líši od referenčného ľudského genómu?
- Ako jednotlivé genetické rozdiely ovplyvňujú fenotyp?
- Personalizovaná medicína
- Populačná štruktúra, história ľudstva
- Etické otázky

Problémy:

- Mapovanie čítaní na referenčný genóm
- Identifikácia rozdielov (malých a väčších)

Použitie NGS: Environmentálne sekvenovanie – Metagenomika

- Aké mikroorganizmy žijú v našich telách?
  črevná a žalúdočná flóra, ústna dutina, koža, . . .
- Diverzita mikroorganizmov v rôznych ekosystémoch
- Ťažké izolovať jednotlivé organizmy
- Sekvenujeme zmes čítaní z rôznych genómov
- Snažíme sa zostaviť aspoň krátke kontigy

Problémy:

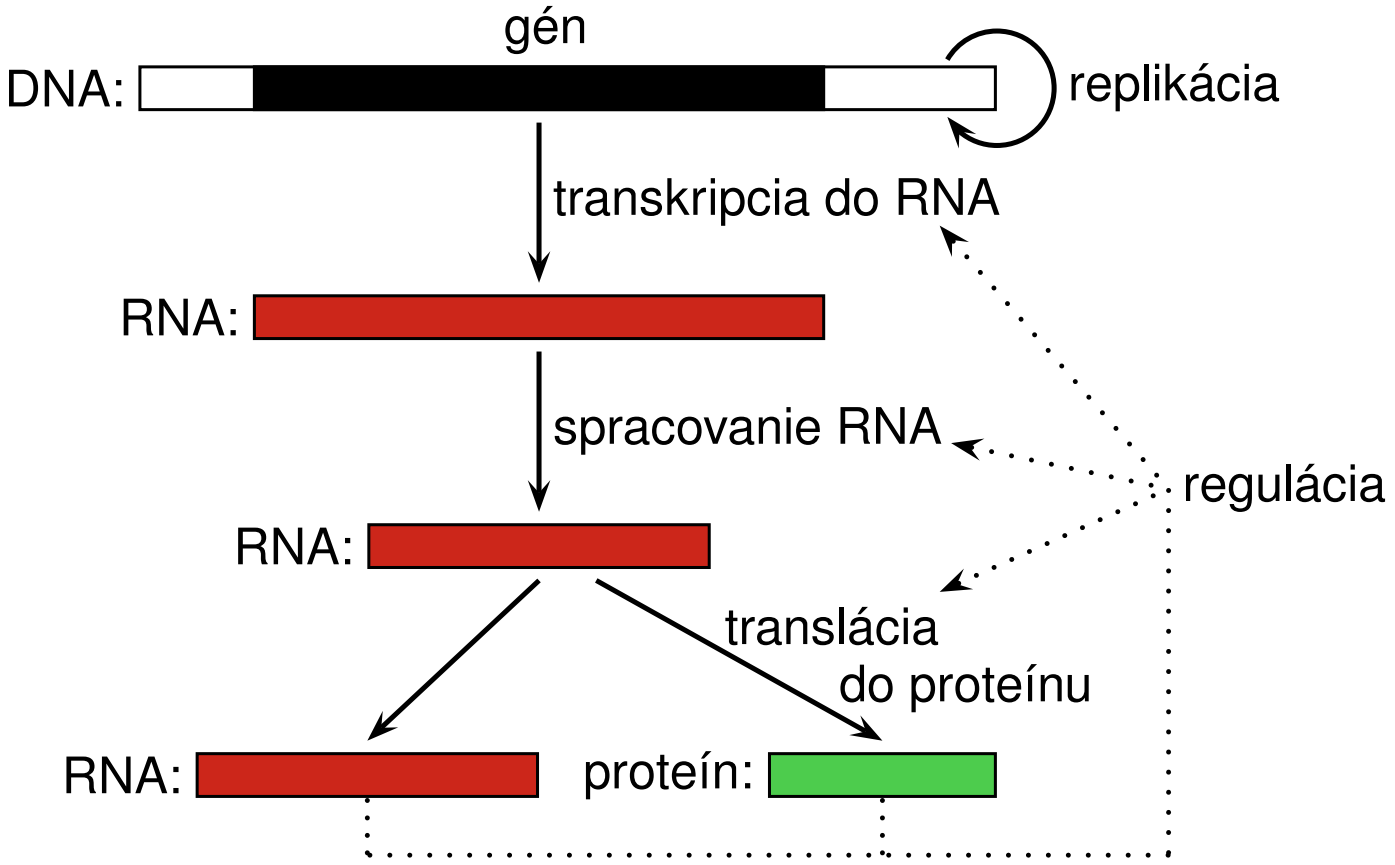
- Oddelenie čítaní/kontigov patriacich do rôznych genómov
- Porovnanie veľkého množstva čítaní s veľkou databázou známych genómov

Použitie NGS: Hľadanie génov, väzobných miest,...

- RNA-seq: Sekvenovať môžeme aj RNA, dostávame gény v genóme
- ChIP-seq: vyfiltrujeme kúsky DNA, na ktoré je naviazaný určitý proteín, sekvenujeme, mapujeme na genóm
- Veľa ďalších technológií mapujúcich pomocou sekvenovania modifikácie DNA, stav chromatínu, 3D rozmiestnenie a pod. (viď predmet Genomika)

Problémy:

- Opäť mapovanie čítaní na referečný genóm
- Identifikácia miest zostrihu
- Identifikácia väzobných miest podľa hĺbky pokrytia


gén
DNA:
replikácia
transkripcia do RNA
RNA:
spracovanie RNA
regulácia
RNA:
translácia
do proteínu
RNA:
proteín: