II. Obtención de un dataset de Variantes a partir de datos de secuenciación - WGS

Maria José Ruiz, Lorena Lorenzo, Enrico Bazzicalupo

Estación Biológica de Doñana CSIC

Buenas Practicas para un proyecto de Bioinformatica

Crear una **carpeta** para el proyecto

Utilizar **control de cambios** en la carpeta para volver a versiones anteriores

Conservar los **datos en multiples copias** en sitios diferentes (discos duros, nubes, servidores)

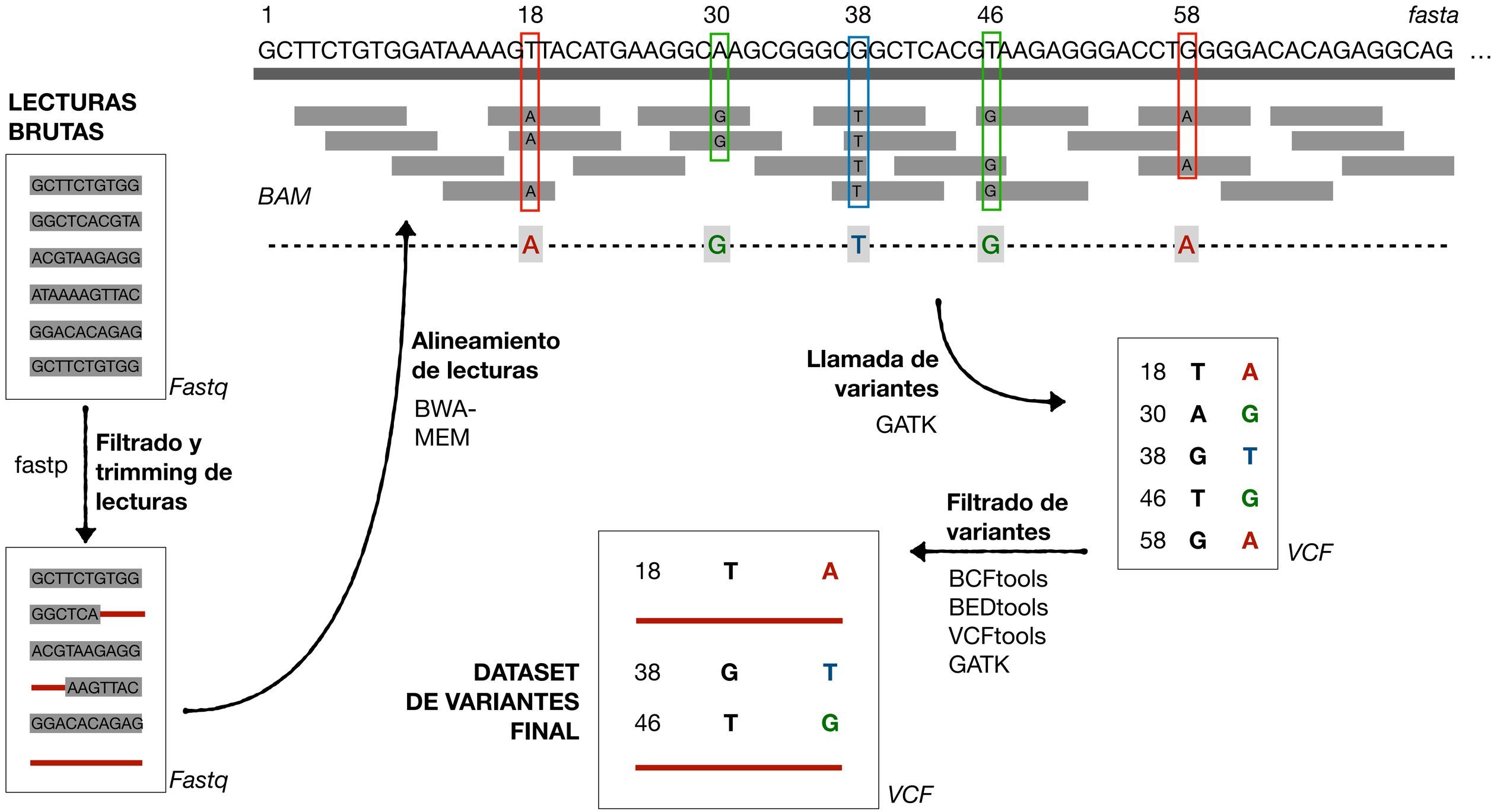
Scripts bien comentados y claros - como y porque hacemos las cosas

Tener un registro del orden y en que hacemos las cosas - **markdown como un cuaderno** / material y métodos

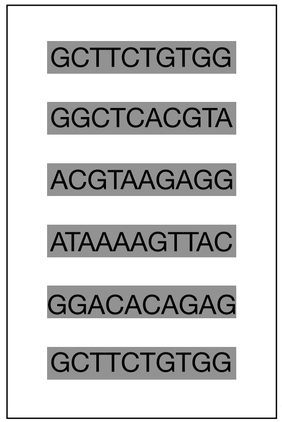
Registro de las versiones de los programas que vamos a utilizar (util para métodos y repetibilidad)

Con mas experiencia: crear **entornos** para análisis o proyectos (conda, docker)

https://rfortherestofus.com/2021/02/how-to-use-git-github-with-r


1
18
30
38
46
58
fasta
GCTTCTGTGGATAAAAGTTACATGAAGGCAAGCGGGCGGCTCACGTAAGAGGGACCTGGGGACACAGAGGCAG ...
BAM
A
G
T
G
A
LECTURAS BRUTAS
GCTTCTGTGG
GGCTCACGTA
ACGTAAGAGG
ATAAAAGTTAC
GGACACAGAG
GCTTCTGTGG
Fastq
fastp
Filtrado y trimming de lecturas
GCTTCTGTGG
GGCTCA
ACGTAAGAGG
AAGTTAC
GGACACAGAG
Fastq
Alineamiento de lecturas
BWA-MEM
Llamada de variantes
GATK
18 T A
30 A G
38 G T
46 T G
58 G A
VCF
Filtrado de variantes
BCFtools
BEDtools
VCFtools
GATK
DATASET DE VARIANTES FINAL
18 T A
38 G T
46 T G
VCF

LECTURAS BRUTAS



Fastq

Secuenciación con Illumina

LECTURAS BRUTAS

GCTTCTGTGG

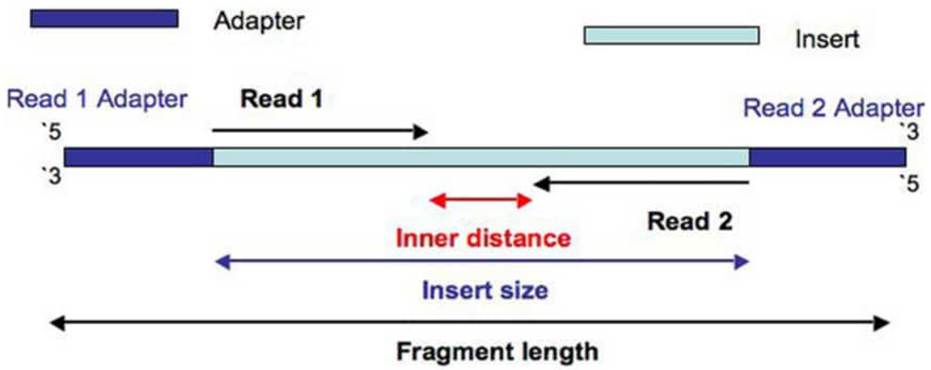
GGCTCACGTA

ACGTAAGAGG

ATAAAAGTTAC

GGACACAGAG

GCTTCTGTGG



Información sobre **Lectura 1** y **Lectura 2** obtenida del secuenciador y guardada en formato **FASTQ**

```
@ERR000589.41 EAS139_45:5:1:2:111/1
CTTTCCTCCCTGCTTTCCTGGCCCCACCATTTCCAGGGAACATCTTGTCAT
+
3IIIIIIIIIIIII>1IIIFF9BG08E00I%IG+&?(4)%00646.C1#&(

@ERR000589.42 EAS139_45:5:1:2:1293/1
AGTTGTTAAAATCCAAGCCAATTAAGATAGTCTTATCTTTTTAAAAGAAAT
+
IIIIIGII.AIIII=?I9G-/II=+I=4?761BA2C9I+5A711+&>1$/I
```

El formato FASTQ

(Fasta + Quality)

Cada secuencia está dividida en 4 filas en el FASTQ:

Primera linea:

- identificador de la secuencia
- empieza siempre con **@**
- contiene información sobre la secuencia

Segunda linea:

- secuencia de nucleótidos

Tercera linea:

- un **+** separador

Cuarta linea:

- valores de calidad de llamada de cada nucleótido

Puntuación de Calidad de los Nucleótidos

```
@ERR000589.41 EAS139_45:5:1:2:111/1
CTTTCCTCCCTGCTTTCCTGGCCCCACCATTTCCAGGGAACATCTTGTCAT
+
3IIIIIIIIIIIII>1IIIFF9BG08E00I%IG+&?(4)%00646.C1#&(

@ERR000589.42 EAS139_45:5:1:2:1293/1
AGTTGTTAAAATCCAAGCCAATTAAGATAGTCTTATCTTTTTAAAAGAAAT
+
IIIIIGII.AIIII=?I9G-/II=+I=4?761BA2C9I+5A711+&>1$/I
```

A cada nucleótido corresponde una puntuación de calidad asignada por la maquina de secuenciación

Codificada por uno de 41 símbolos

Q-score o ASCII una idea numerica de la calidad (Q-score mas usado ahora)

Como se traduce en Q-score en probabilidad de error?

Symbol	ASCII Code	Q-Score
!	33	0
"	34	1
#	35	2
$	36	3
%	37	4
&	38	5
'	39	6
(	40	7
)	41	8
*	42	9
+	43	10
,	44	11
-	45	12
.	46	13
/	47	14
0	48	15
1	49	16
2	50	17
3	51	18
4	52	19
5	53	20

Symbol	ASCII Code	Q-Score
6	54	21
7	55	22
8	56	23
9	57	24
:	58	25
;	59	26
<	60	27
=	61	28
>	62	29
?	63	30
@	64	31
A	65	32
B	66	33
C	67	34
D	68	35
E	69	36
F	70	37
G	71	38
H	72	39
I	73	40

Controles de Calidad de un FASTQ

Qué buscamos en nuestro FASTQ?

- **Calidad** de las bases
- **Longitud** de la lectura
- **Sesgos** en la secuencia
- Presencia de **adaptadores**
- Secuencias **repetidas**
- Contenido de bases **G** y **C**
- Numero de bases sin llamar **(N)**
- Lecturas **duplicadas**

Siempre puede haber excepciones en base a lo que estamos mirando: DNA? RAD-seq? RNA?

```
@ERR000589.41 EAS139_45:5:1:2:111/1
CTTTCCTCCCTGCTTTCCTGGCCCCACCATTTCCAGGGAACATCTTGTCAT
+
3IIIIIIIIIIIII>1IIIFF9BG08E00I%IG+&?(4)%00646.C1#&(

@ERR000589.42 EAS139_45:5:1:2:1293/1
AGTTGTTAAAATCCAAGCCAATTAAGATAGTCTTATCTTTTTAAAAGAAAT
+
IIIIIGII.AIIII=?I9G-/II=+I=4?761BA2C9I+5A711+&>1$/I
```

Herramienta Bioinformática →

FastQC

Control de calidad **estandarizado** y **sencillo** para datos de secuenciación masiva.

Proporciona una **resumen gráfico** de la información más relevante para tomar decisiones sobre cómo tratar tus lecturas.

Resultados de FASTQC

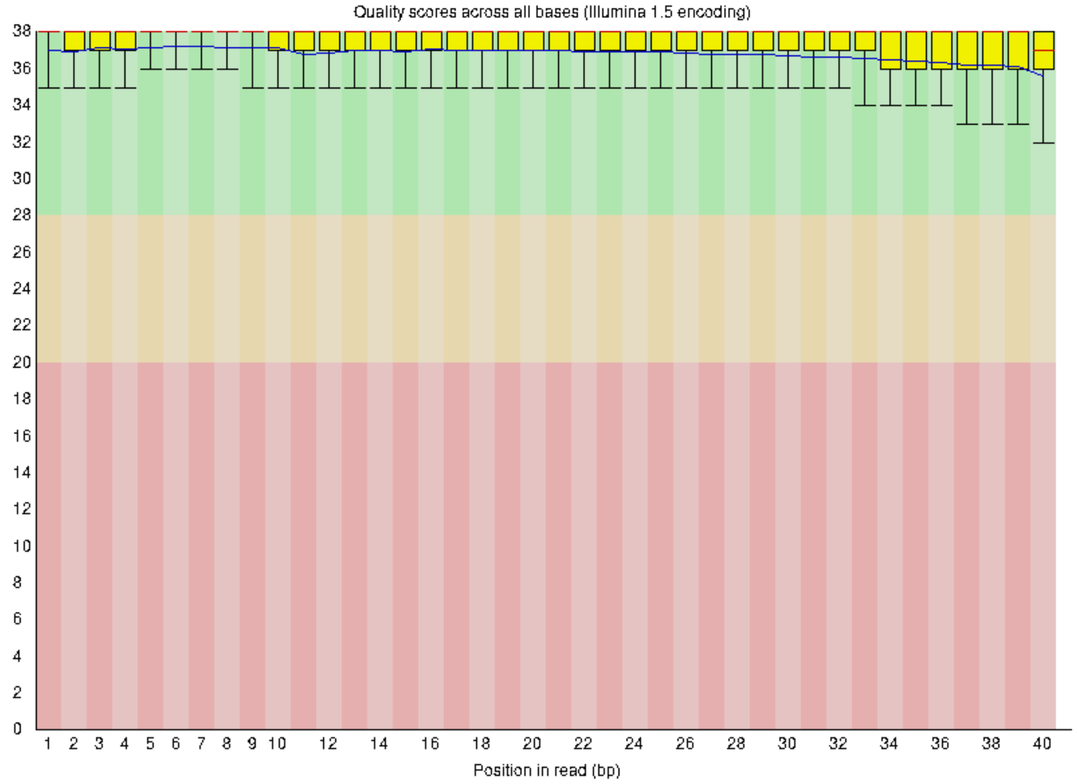
Basic Statistics

Measure	Value
Filename	RNA-Seq.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	100000
Total Bases	4 Mbp
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	40
%GC	47

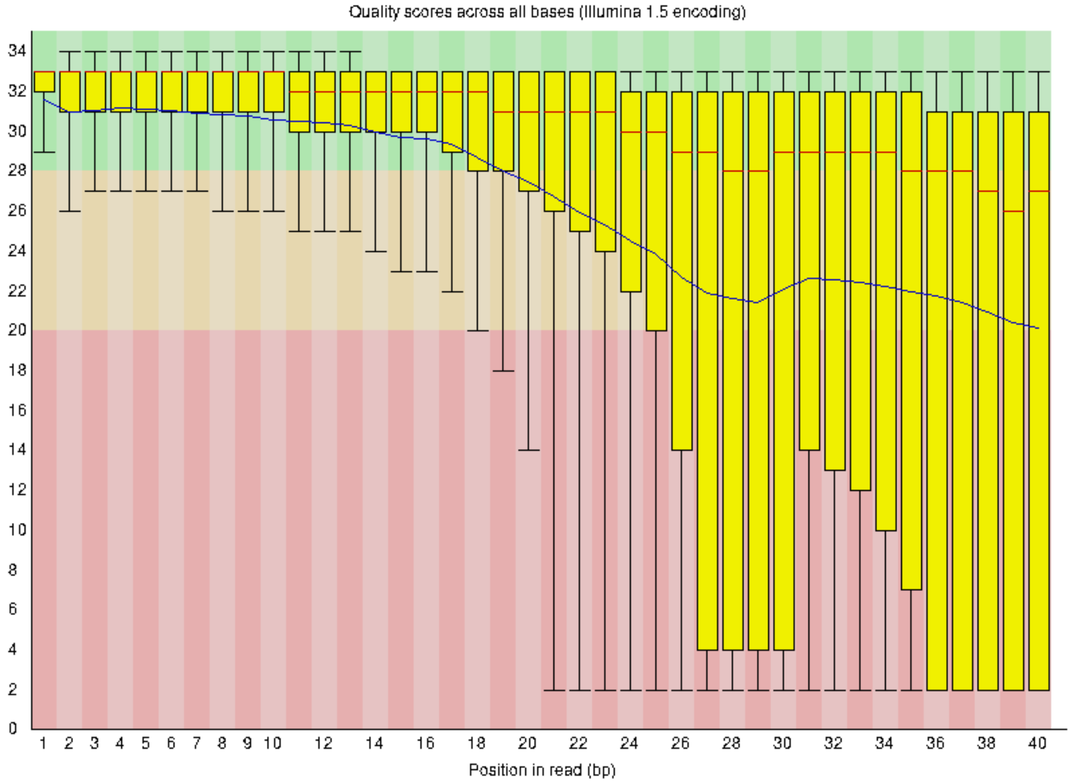
Resultados de FASTQC

- **Calidad** de las bases

Per base sequence quality

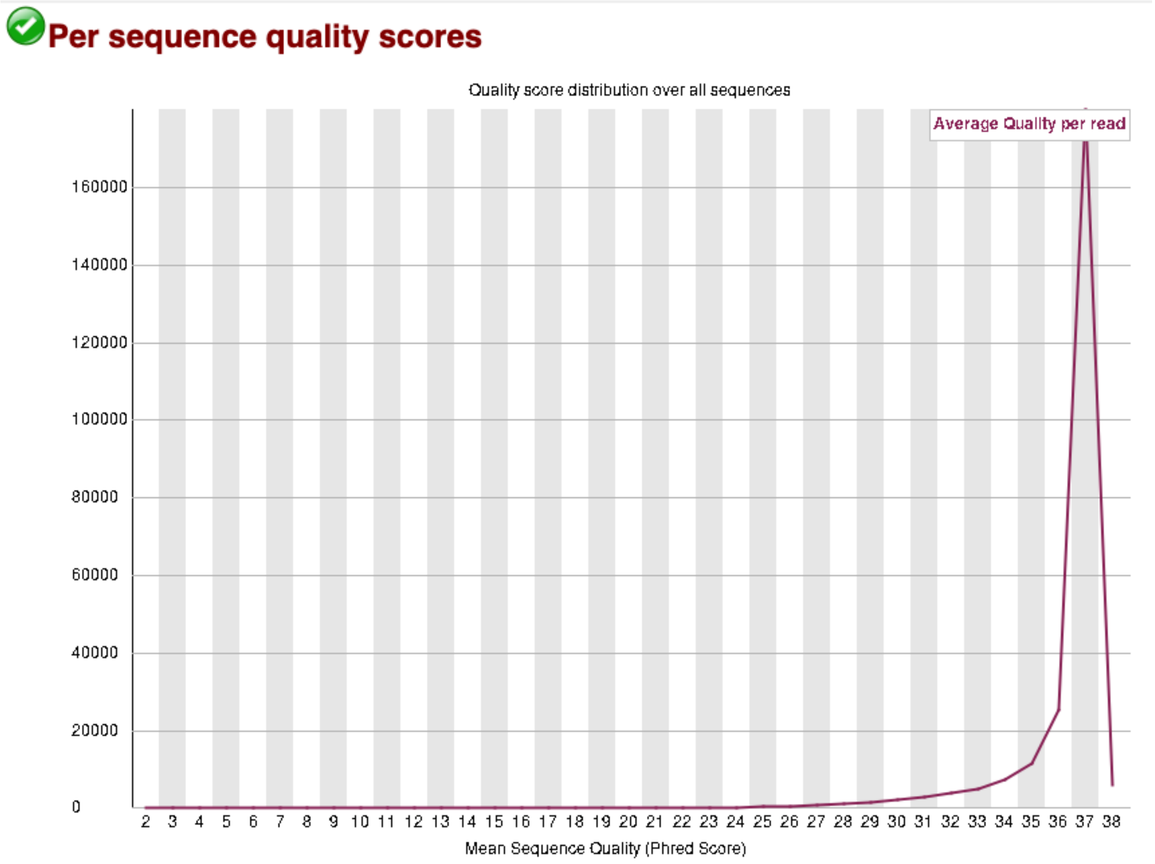


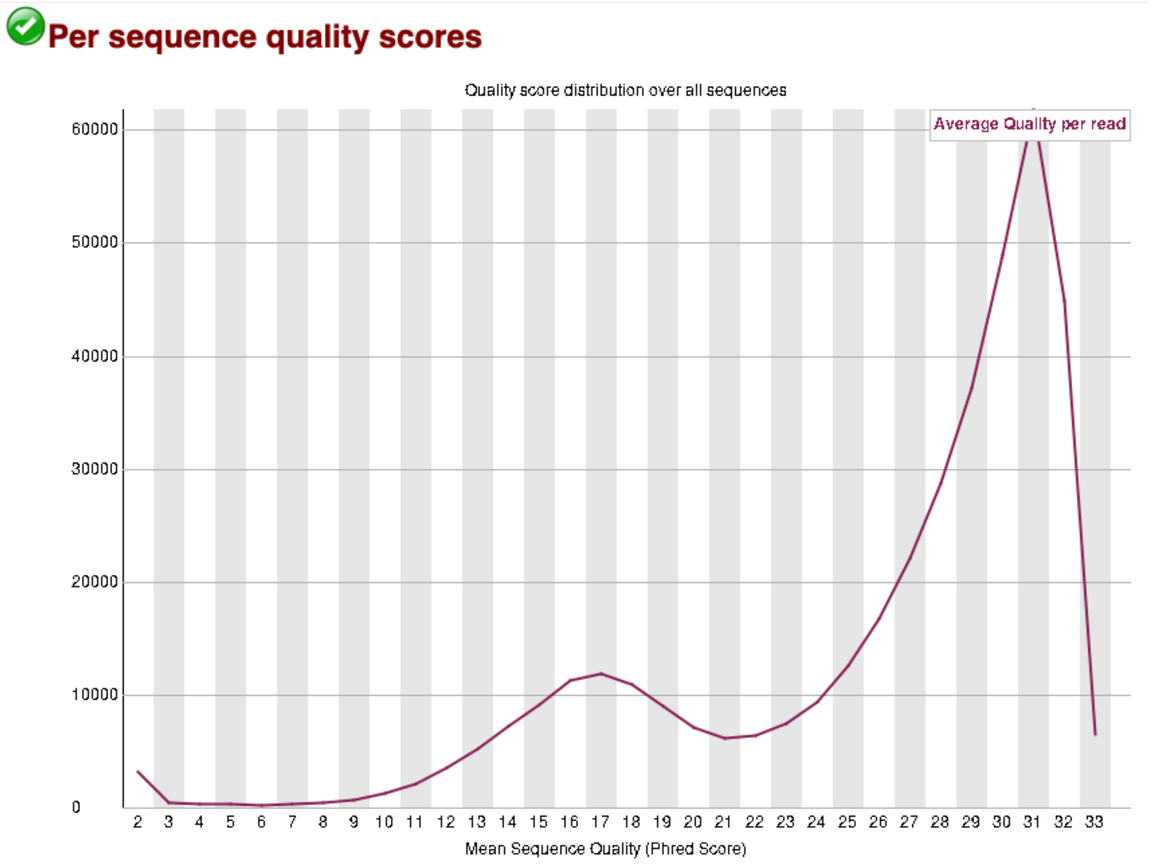
Per base sequence quality



Resultados de FASTQC

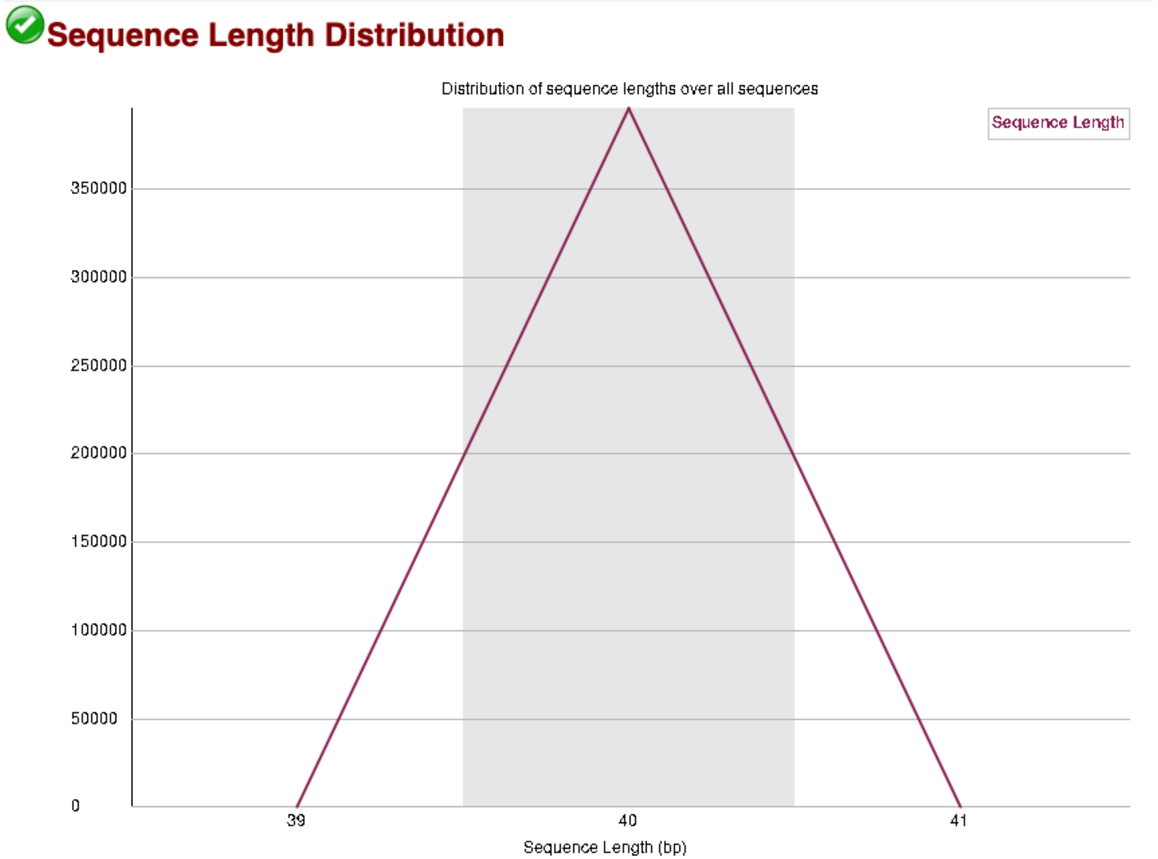
- **Calidad** de las bases

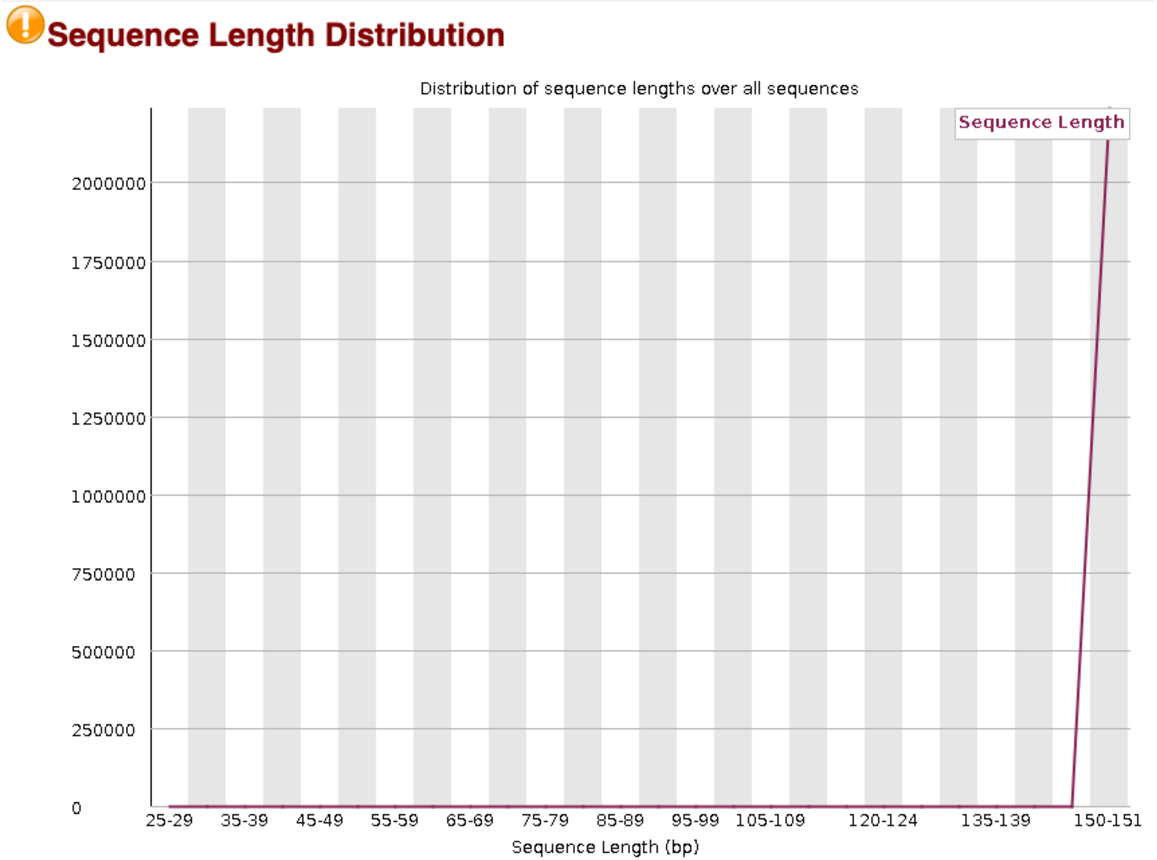




Resultados de FASTQC

- **Longitud** de la lectura

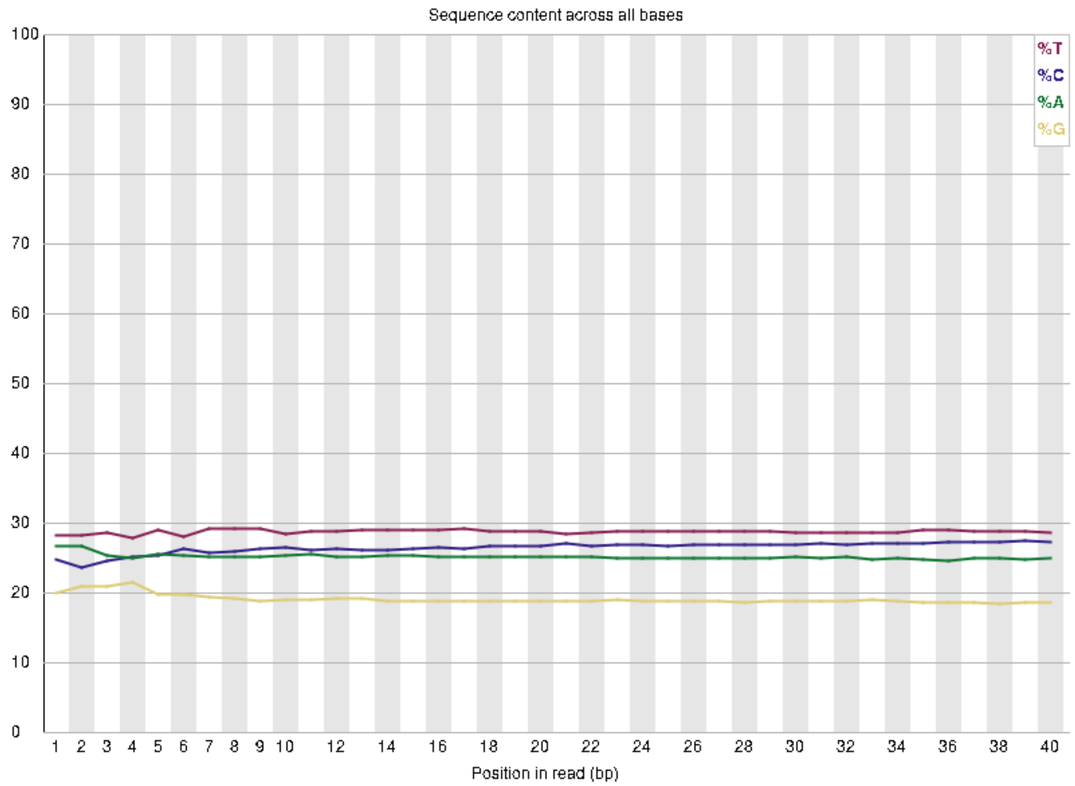




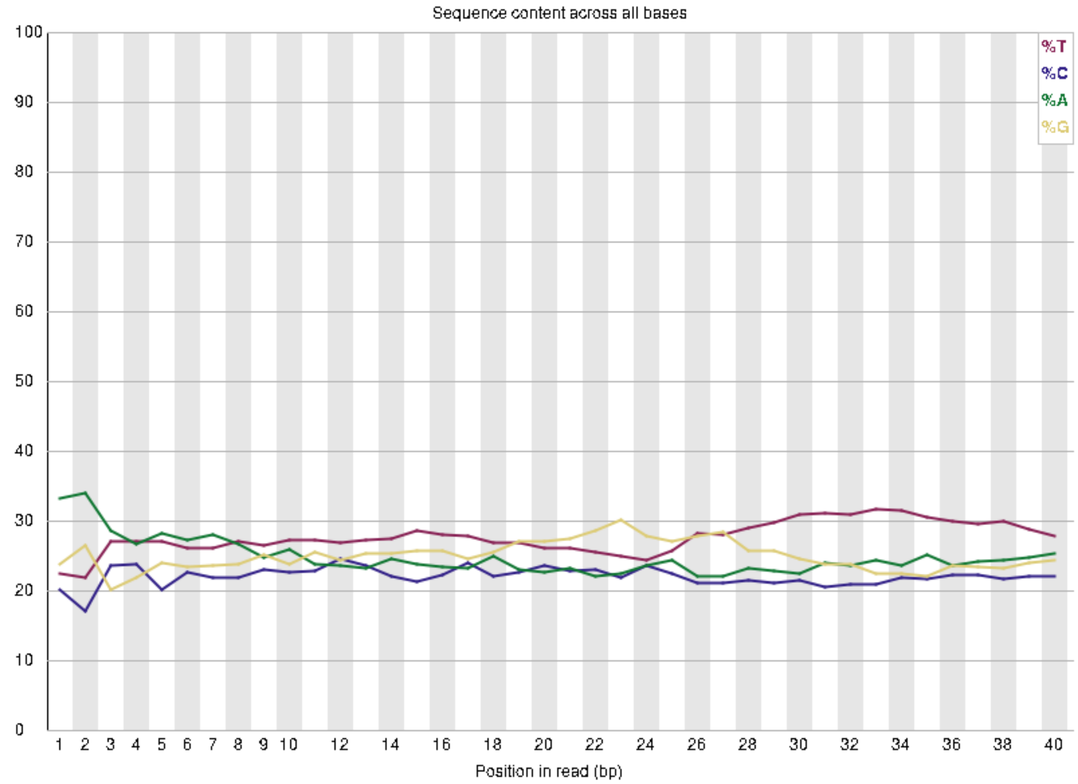
Resultados de FASTQC

- **Sesgos** en la secuencia
- Contenido de bases **G** y **C**

Per base sequence content



Per base sequence content

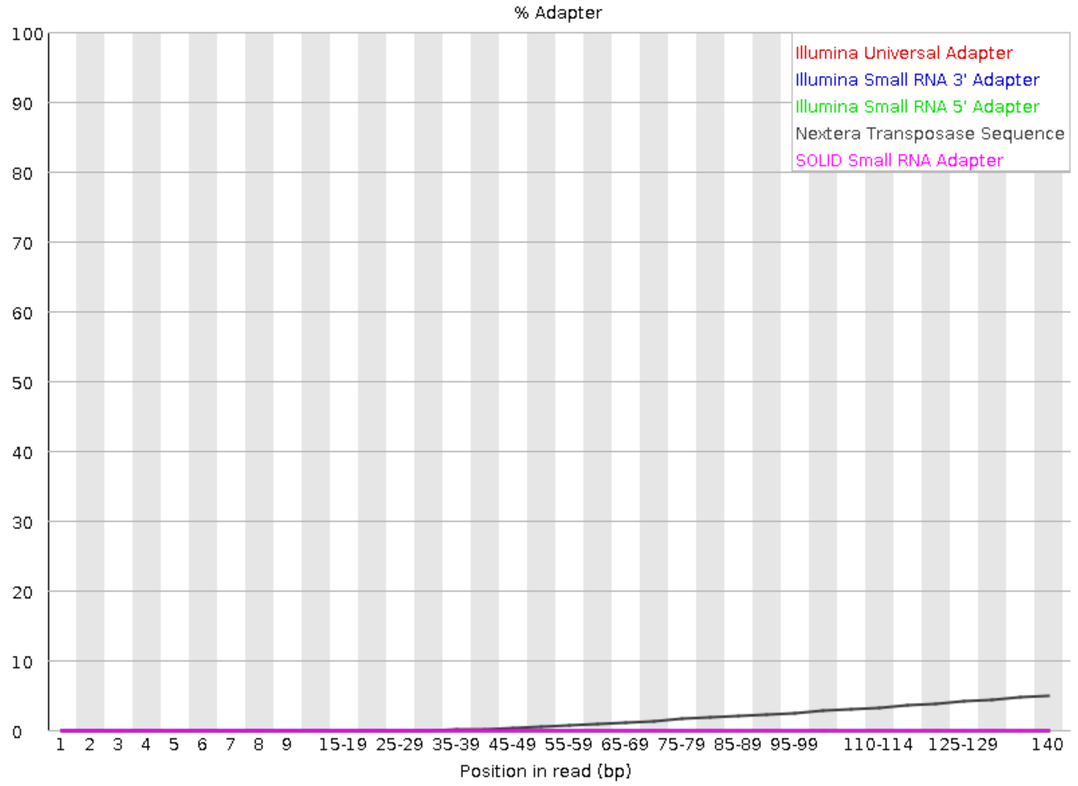


mas sesgada aun

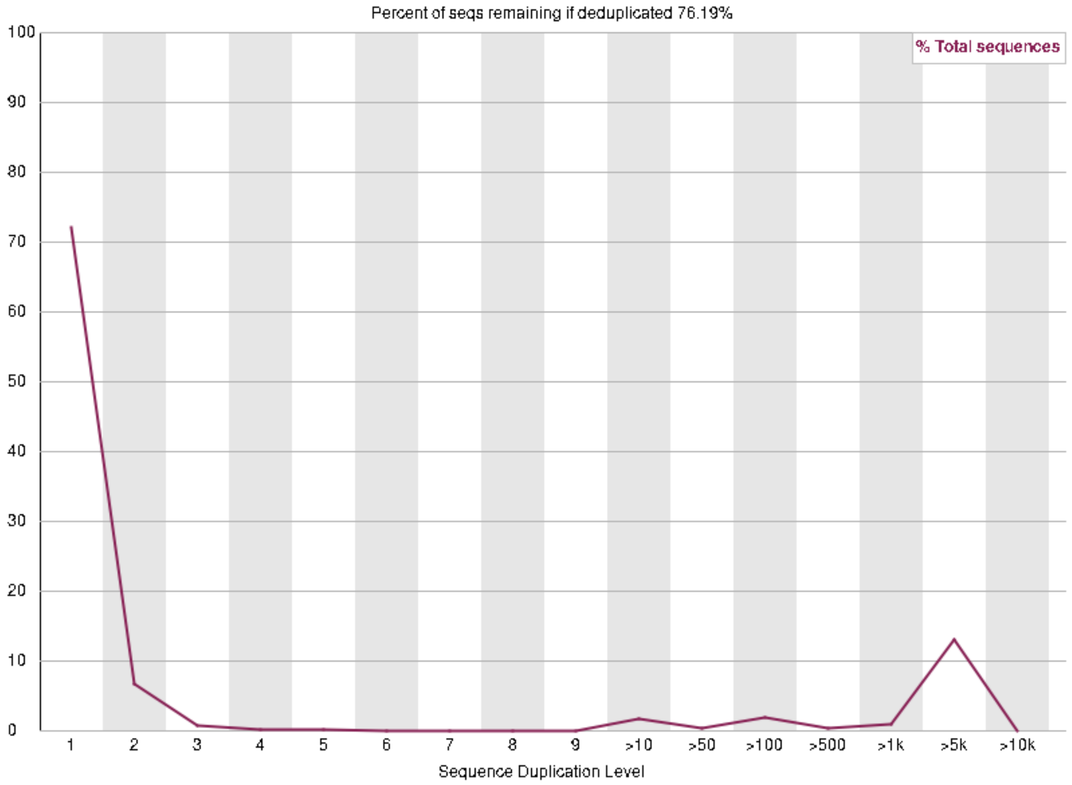
Resultados de FASTQC

- Presencia de **adaptadores**
- Secuencias **repetidas**

Adapter Content



Sequence Duplication Levels

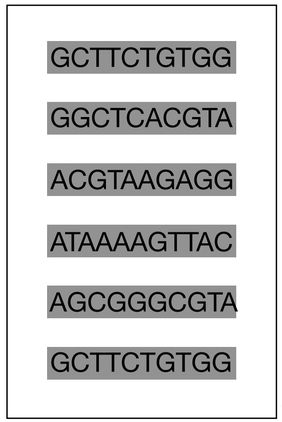


Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
GATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAGACCGATCT	8122	8.122	Illumina Paired End PCR Primer 2 (100% over 40bp)
GATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAGATCGGAAG	5086	5.086	Illumina Paired End PCR Primer 2 (97% over 36bp)
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTAC	1085	1.085	Illumina Single End PCR Primer 1 (100% over 40bp)

Hemos analizado la calidad de nuestras lecturas.
Qué hacemos ahora?

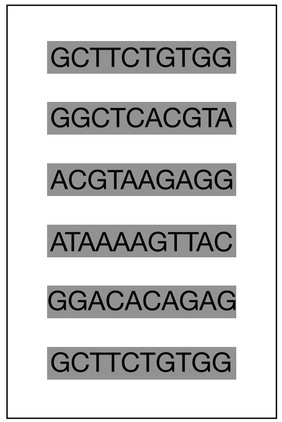
LECTURAS BRUTAS



Fastq

Hemos analizado la calidad de nuestras lecturas.
Qué hacemos ahora?

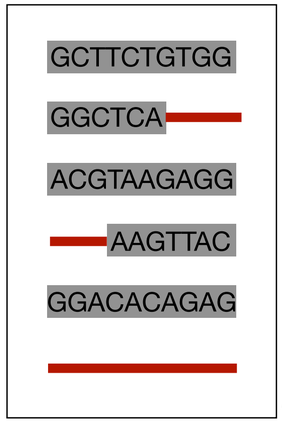
LECTURAS BRUTAS



Fastq

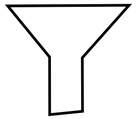
fastp

Filtrado y trimming de lecturas



Fastq

Trimming de lecturas:
- adaptadores
- cadenas de polyX
- corte a los lados



Filtrado de lecturas:
- calidad promedia
- longitud
- duplicados
- sobrerepresentadas

Corrección de errores:
- usando solape con la pareja

Resultados resumidos en un **informe**

Herramienta Bioinformática

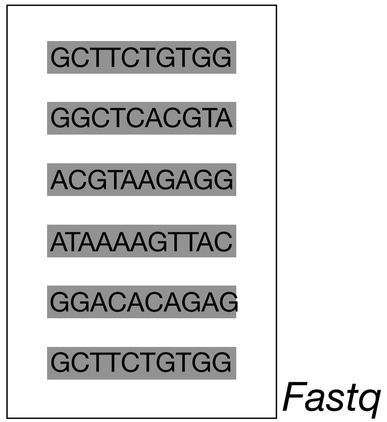
fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor

Shifu Chen[1,2,*], Yanqing Zhou[1], Yaru Chen[1] and Jia Gu[2]

[1]Department of Bioinformatics, HaploX Biotechnology, Shenzhen 518057, China and [2]Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China

*To whom correspondence should be addressed.

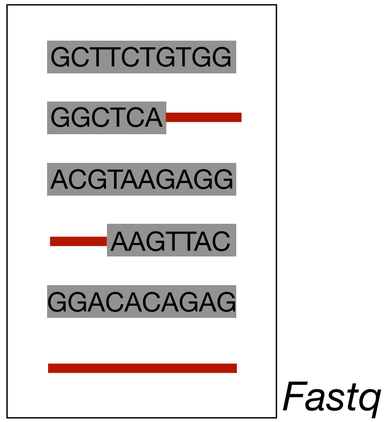
LECTURAS BRUTAS



Fastq

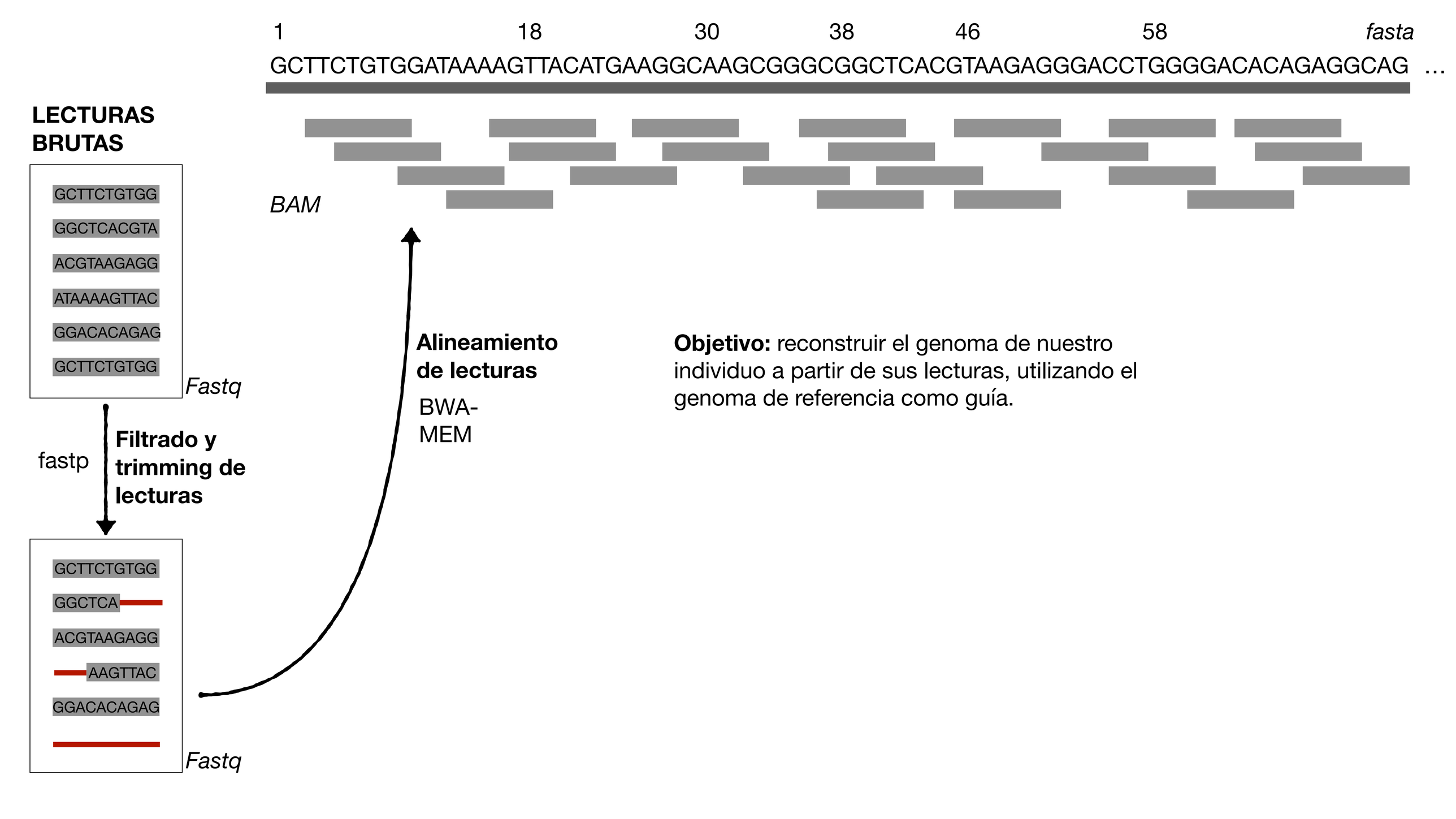
fastp

Filtrado y trimming de lecturas



Fastq

Con nuestras lecturas limpias podemos proceder a su análisis!


1
18
30
38
46
58
fasta
GCTTCTGTGGATAAAAGTTACATGAAGGCAAGCGGGCGGCTCACGTAAGAGGGACCTGGGGACACAGAGGCAG
...
BAM
LECTURAS BRUTAS
GCTTCTGTGG
GGCTCACGTA
ACGTAAGAGG
ATAAAAGTTAC
GGACACAGAG
GCTTCTGTGG
Fastq
fastp
Filtrado y trimming de lecturas
GCTTCTGTGG
GGCTCA
ACGTAAGAGG
AAGTTAC
GGACACAGAG
Fastq
Alineamiento de lecturas
BWA-MEM
Objetivo: reconstruir el genoma de nuestro individuo a partir de sus lecturas, utilizando el genoma de referencia como guía.

1 18 30 38 46 58 *fasta*

GCTTCTGTGGATAAAAGTTACATGAAGGCAAGCGGGCGGCTCACGTAAGAGGGACCTGGGGACACAGAGGCAG …

Genoma de Referencia

Secuencia de nucleótidos de un individuo representativo de una especie

“Mosaico haploide”

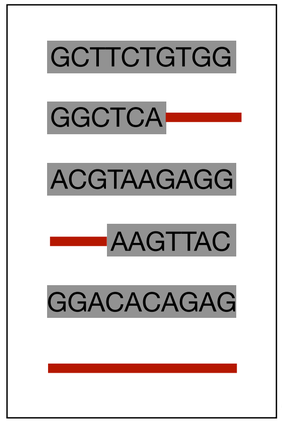
En formato **FASTA**

Dividido por contig / scaffold / cromosoma

dibujo contig scaffold cromosoma

Permite ordenar y comparar secuencias de nuestros individuos secuenciados

se dividen en draft y high quality



Fastq

1 18 30 38 46 58 *fasta*

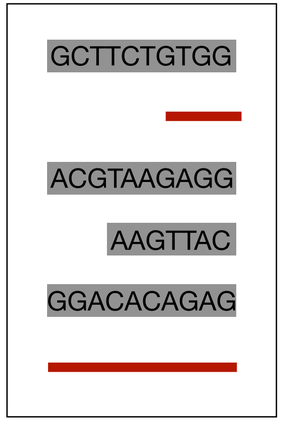
GCTTCTGTGGATAAAAGTTACATGAAGGCAAGCGGGCGGCTCACGTAAGAGGGACCTGGGGACACAGAGGCAG …

Alineamiento

Herramienta Bioinformática

Burrows-Wheeler Aligner

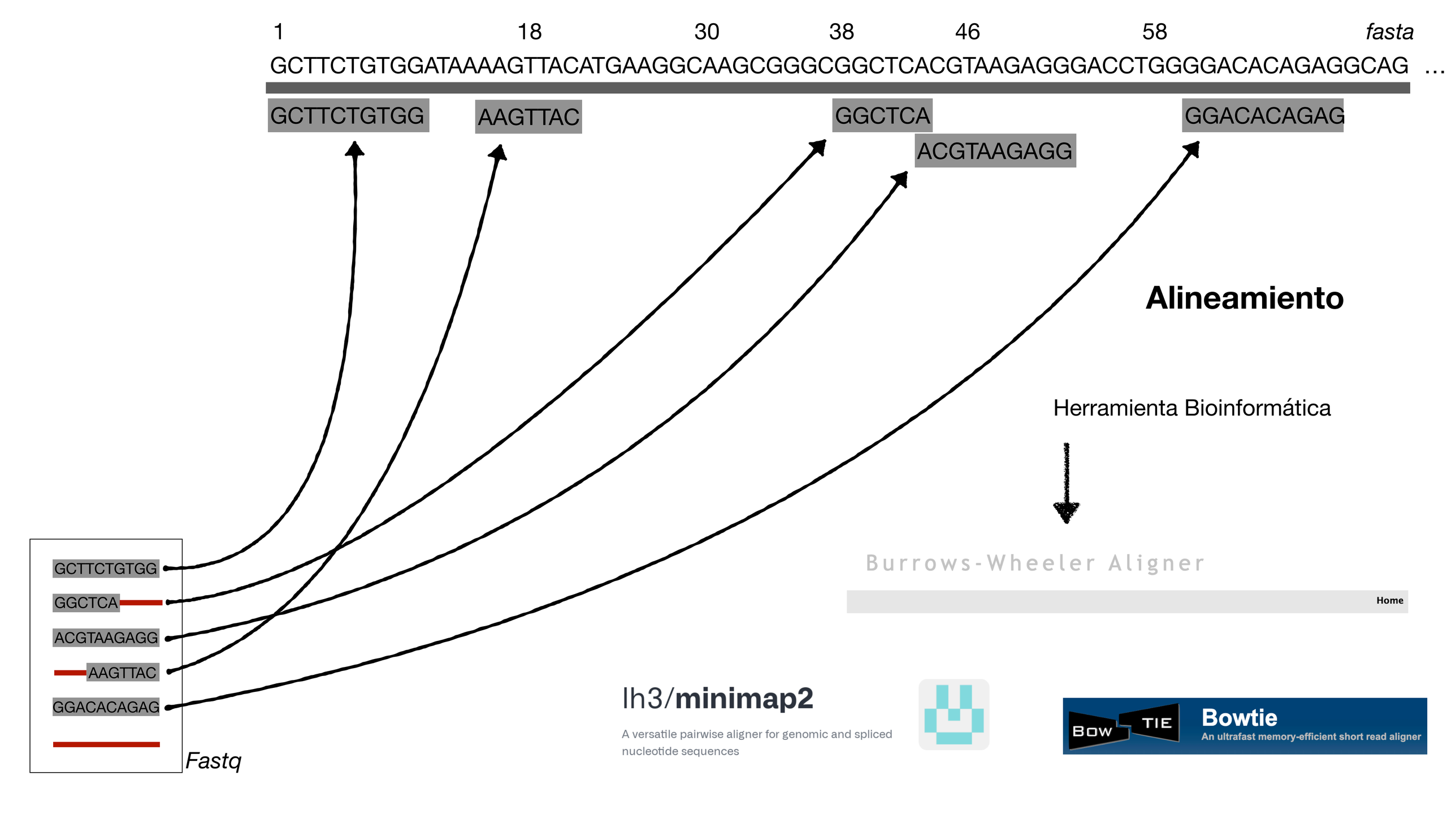
Home

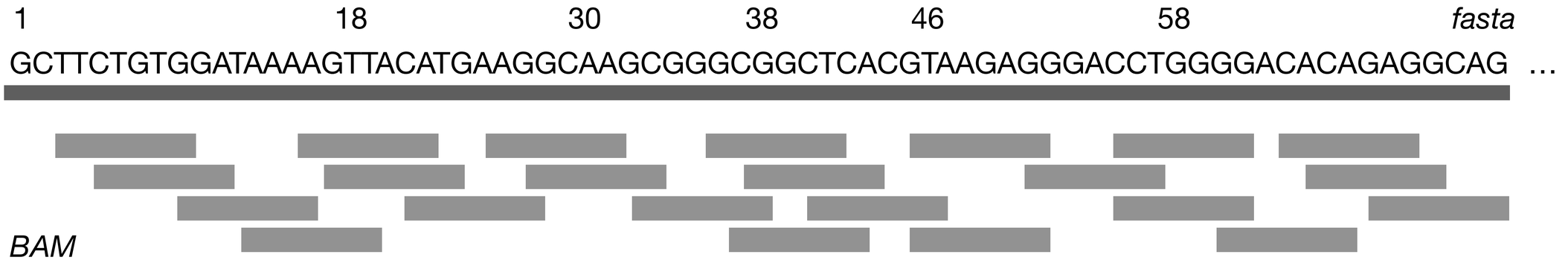


Fastq

lh3/**minimap2**

A versatile pairwise aligner for genomic and spliced nucleotide sequences


1
18
30
38
46
58
fasta
GCTTCTGTGGATAAAAGTTACATGAAGGCAAGCGGGCGGCTCACGTAAGAGGGACCTGGGGACACAGAGGCAG ...
GCTTCTGTGG
AAGTTAC
GGCTCA
ACGTAAGAGG
GGACACAGAG
Alineamiento
Herramienta Bioinformática
Burrows-Wheeler Aligner
Home
GCTTCTGTGG
GGCTCA
ACGTAAGAGG
AAGTTAC
GGACACAGAG
Fastq
lh3/minimap2
A versatile pairwise aligner for genomic and spliced nucleotide sequences
BOW TIE
Bowtie
An ultrafast memory-efficient short read aligner



El formato BAM

Versión comprimida de un **SAM** (Sequence Alingnment Map)

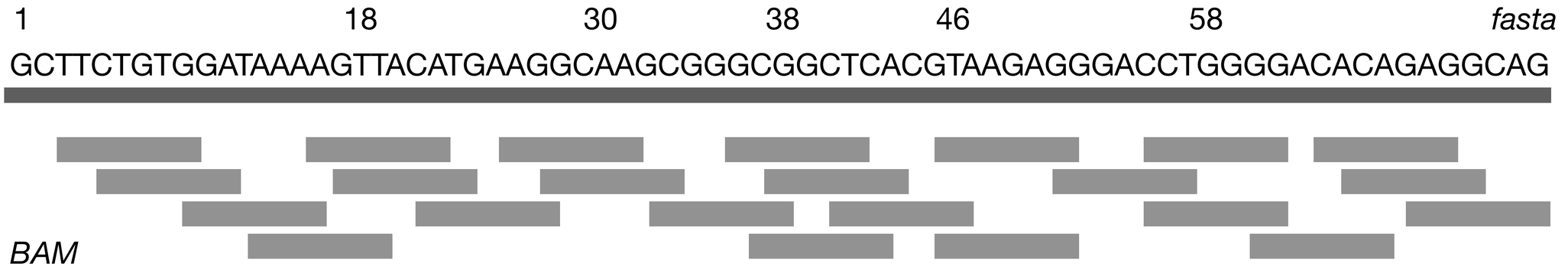
Almacena información sobre donde secuencias alinean a un genoma de referencia

Cabecero:

- filas que empiezan con **@**
- metadatos sobre el alineamiento

Alineamiento:

- minimo de **11 columnas** separadas por tabulador
- columnas adicionales facultativas



El formato BAM

Versión comprimida de un **SAM** (Sequence Alingnment Map)

Almacena información sobre donde secuencias alinean a un genoma de referencia

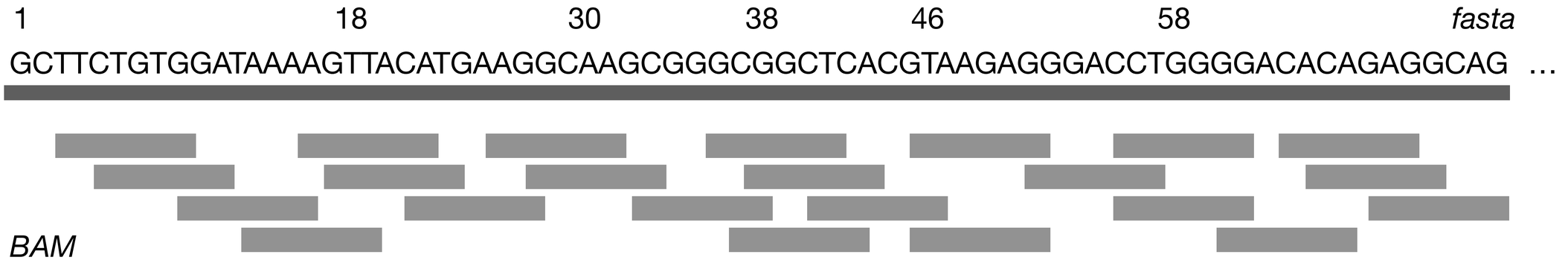
Cabecero:

- filas que empiezan con @
- metadatos sobre el alineamiento

Alineamiento:

- minimo de **11 columnas** separadas por tabulador
- columnas adicionales facultativas

1. **QNAME**: Nombre codificado del fragmento de ADN. Las lecturas/ segmentos con el mismo QNAME se consideran provenientes del mismo fragmento: r1 y r2, la misma lectura alineanda en otro sitio del genoma.
2. **FLAG**: Suma de números que describen características de la lectura alineada. https://en.wikipedia.org/wiki/SAM_(file_format)#Bitwise_flags
3. **RNAME**: Nombre de la secuencia de referencia del alineamiento. Un segmento no alineado (sin coordenadas) tiene un '*' en este campo.
4. **POS**: Coordenada de alineamiento de la base más a la izquierda en la secuencia de referencia. Lecturas no alineadas tienen POS=0
5. **MAPQ**: Calidad de mapeo. Es igual a -10 log10 Pr {la posición de mapeo es incorrecta}, redondeado al entero más cercano. Un valor 255 indica que la calidad de mapeo no está disponible.
6. **CIGAR**: **C**oncise **I**diosyncratic **G**apped **A**lignment **R**eport. Parejas de numero-operador que describen el alineamiento https://www.drive5.com/usearch/manual/cigar.html
7. **RNEXT**: Nombre de la secuencia asociada a esta ('=' si es el mismo)
8. **PNEXT**: Posición de la secuencia asociada a esta.
9. **TLEN**: Longitud del fragmento de ADN, el número de bases desde la base mapeada más a la izquierda hasta la base mapeada más a la derecha. La secuencia más a la izquierda es positiva, la más a la derecha es negativa.
10. **SEQ**: Secuencia de la lectura.
11. **QUAL**: ASCII de la calidad de las bases, como en el FASTQ



El formato BAM

Versión comprimida de un **SAM** (Sequence Alingnment Map)

Almacena información sobre donde secuencias alinean a un genoma de referencia

Cabecero:

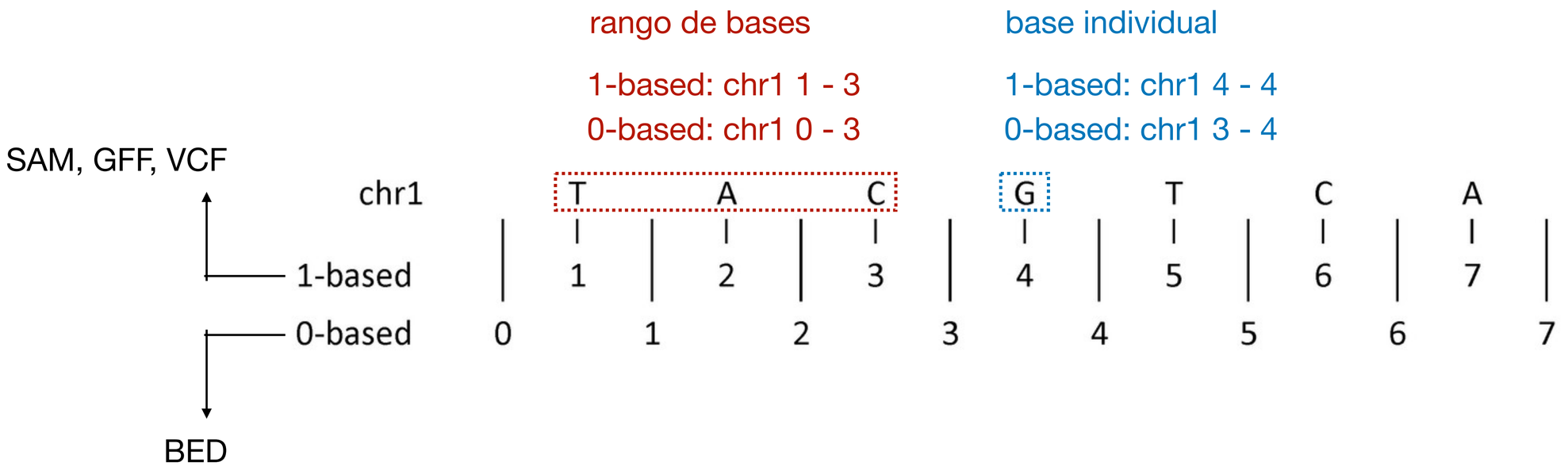
- filas que empiezan con **@**
- metadatos sobre el alineamiento

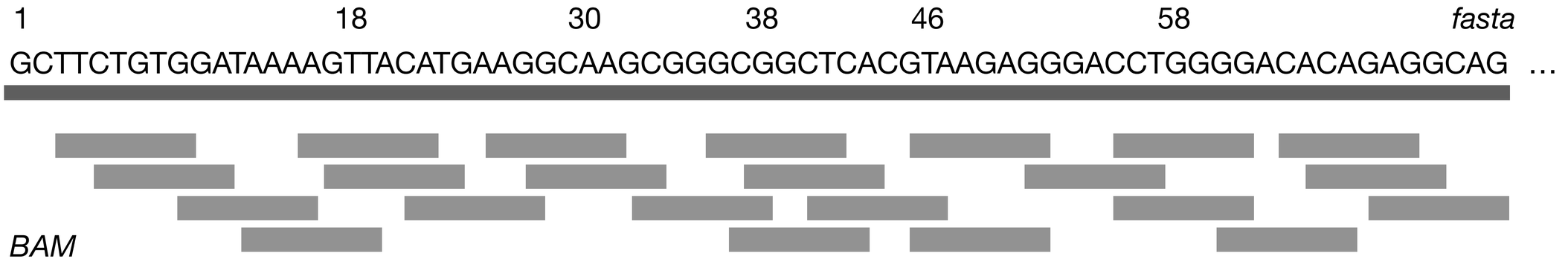
Alineamiento:

- minimo de **11 columnas** separadas por tabulador
- columnas adicionales facultativas

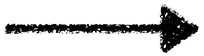
1. **NM**: número de mismatches (cambios)
2. **MD**: cadena descriptiva de los cambios
3. **MC**: CIGAR de la pareja
4. **MQ**: calidad de mapeo de la pareja
5. **XA**: alineamientos alternativos (chr,pos,CIGAR,NM;)

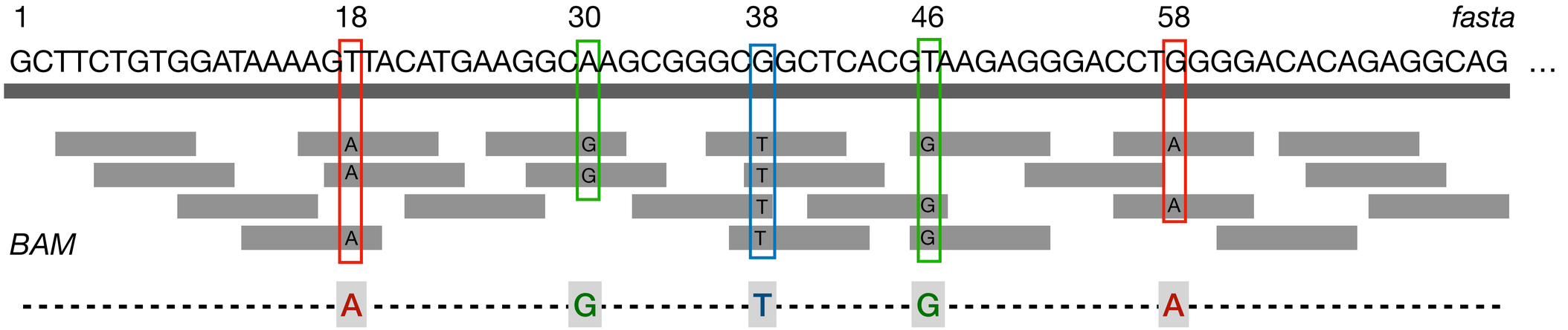
Formatos 0-based vs **Formatos 1-based**





Como visualizarlo?

Herramienta Bioinformática 



Llamada de Variantes

Objetivo: identificar regiones del genoma donde nuestros individuos difiere del genoma de referencia

Procedemos en dos pasos:

- Identificación de **variantes** del genoma **de cada individuo**, conservadas en formato *GVCF*
- Unión de las variantes individuales en un **única base de datos**, conservadas en formato *VCF*

Herramienta Bioinformática

gatk

freebayes
deepvariant
...

HaplotypeCaller → CombineGVCFs → GenotypeGVCFs

de BAM a GVCF

juntamos multiples GVCF

de GVCF a VCF

Formatos GVCF y VCF

Genome **V**ariant **C**alling **F**ormat:

Informa sobre **si y dónde cambian** las secuencias de uno o más individuos con respecto al genoma de referencia.

Las regiones no variantes (bloques) se forman juntando intervalos consecutivos para los cuales la calidad del genotipo está dentro de un rango especifico.

Variant **C**alling **F**ormat

Informa sobre **dónde cambian** las secuencias de uno o más individuos con respecto al genoma de referencia.

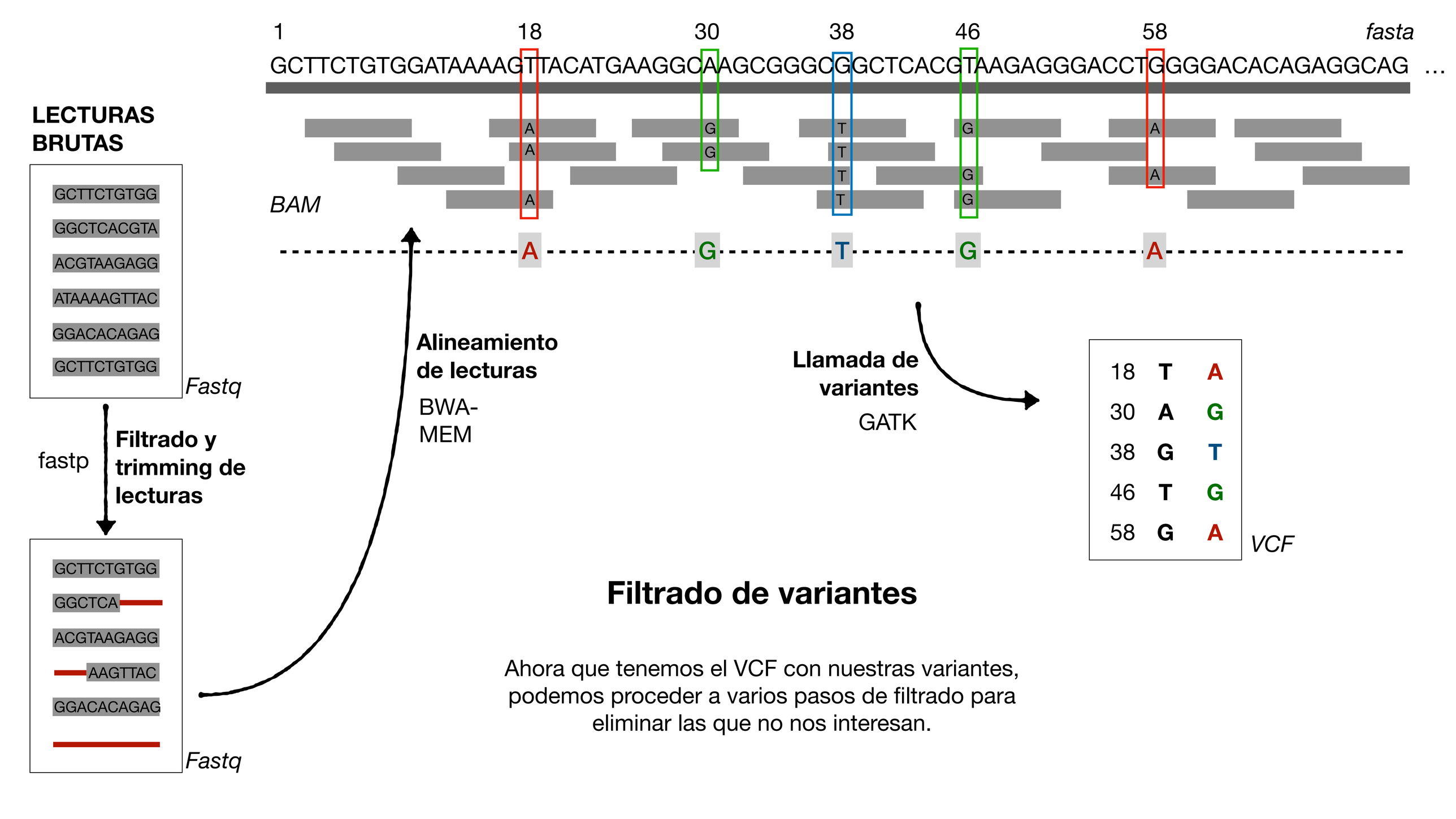
Cabecero:

- filas que empiezan con **#**
- **describe las columnas** de la tabla que sigue
- información adicional sobre **cómo se ha generado** y **qué contiene** el file (comando, contigs, etc.)
- en GVCF, información sobre como se juntan **bloques** en función de su **calidad**

Tabla:

- **9** columnas descriptiva de la **región genómica** (bloque o variante)
- **1** columna **para cada individuo** con información sobre **su genotipo** en la región

1. **CHROM**: nombre del contig/scaffold/cromosoma
2. **POS**: posición dentro del contig/scaffold/cromosoma (1-based)
3. **ID**: identificador especifico de la región
4. **REF**: secuencia de referencia en la posición
5. **ALT**: secuencias alternativas observadas en la posición
6. **QUAL**: calidad de la inferencia de la región
7. **FILTER**: informa sobre los filtros no pasados por la región o PASS si todos los filtros se han pasado
8. **INFO**: columna extensible con información adicional sobre la región genómica. Sub-columnas separadas por ‘;’ , identificadas al principio (e.g. AF=0.05;AN=5) y descriptas en el cabecero
9. **FORMAT**: columna extensible que informa sobre el formato y el contenido de las columnas de genotipo de los individuos (10+)
10. + **SAMPLEs**: valores definidos en la columna FORMAT para cada individuo (genotipo, numero de lecturas con cada alelo etc.)



Filtrado de variantes

Ahora que tenemos el VCF con nuestras variantes, podemos proceder a varios pasos de filtrado para eliminar las que no nos interesan.

Filtrado de variantes

Regiones:
- baja complejidad / repetitivas
- paralogos
- genes

Tipos de variante:
- INDELs
- no-bialelicas
- fijadas

Valores cuantitativos:
- calidad
- missing
- profundidad
- heterozigosidad / hardy-weinberg