# Montagem de genomas e avaliação de qualidade da montagem

Desirrê Petters-Vandresen

Módulo I – Genômica no Estudo de Microrganismos

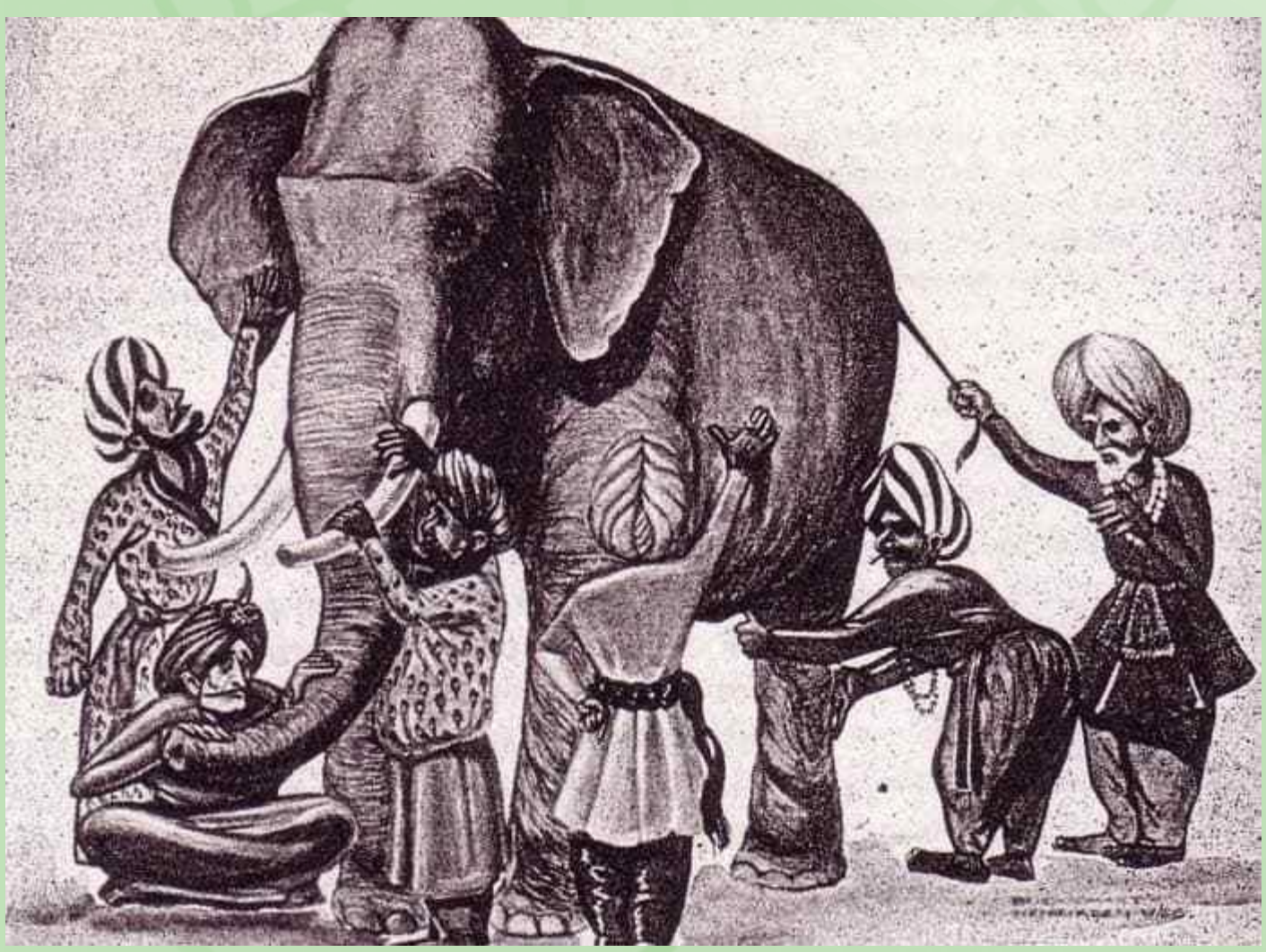
# Por que montar um genoma?

- Cenário ideal: sequenciar o genoma inteiro ou o maior tamanho de fragmento possível

- Condições reais: mesmo técnicas mais recentes como PacBio e ONT que sequenciam reads longos não são capazes de sequenciar cromossomos grandes inteiros

- Necessidade de utilizar os fragmentos obtidos para obter o genoma completo

- **Como organizar todos os fragmentos obtidos no sequenciamento na ordem biológica correta e formando uma sequência única e coesa?**

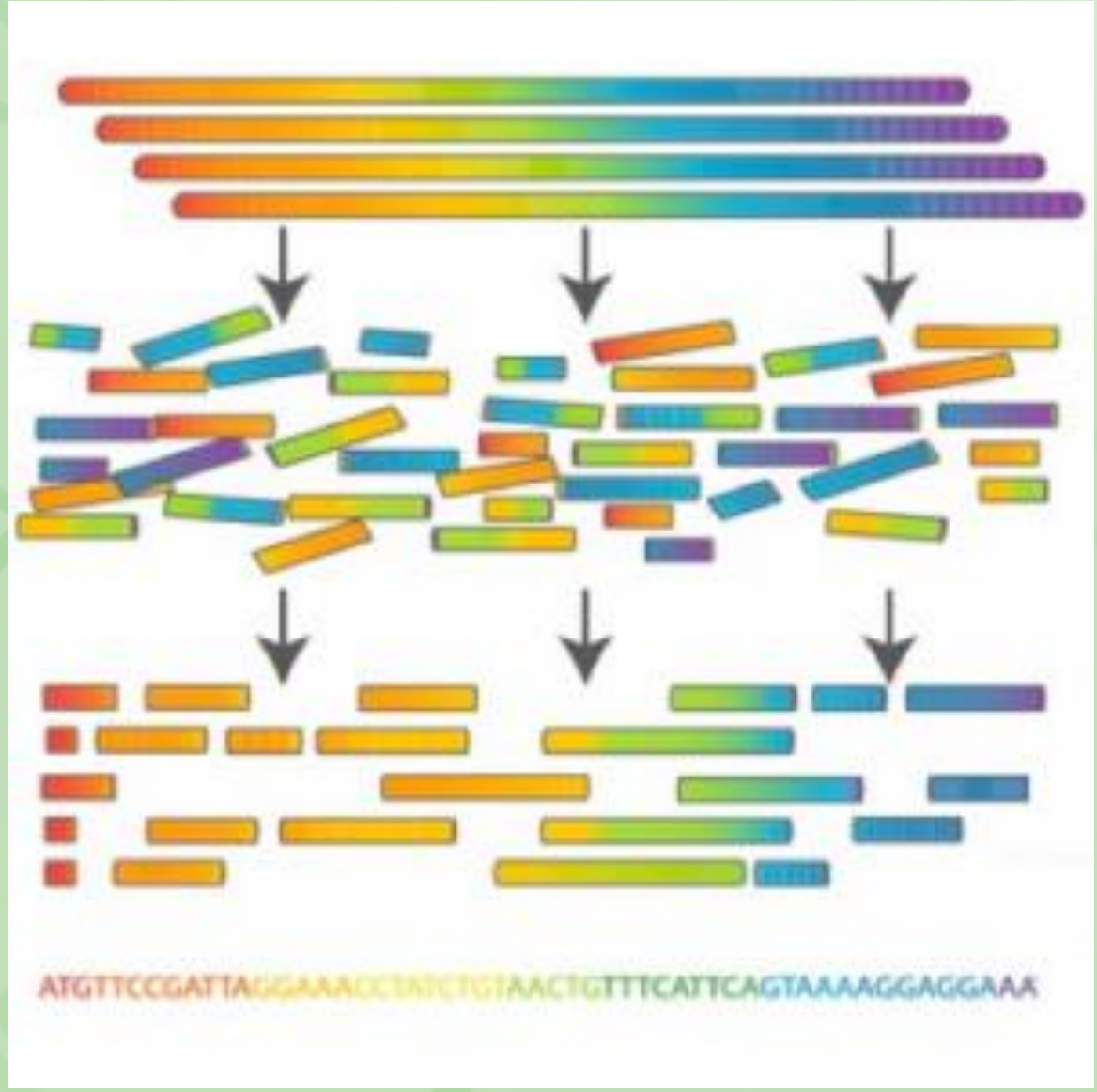


Referência da Imagem

# Montagem de genomas

- Utilização dos reads (fragmentos) e informações sobre regiões de sobreposição para produzir sequências únicas e contínuas (contigs)

- Diferentes algoritmos e estratégias possíveis




Adaptado de:
COMMINS et al. 2009. **Biological Procedures Online**. DOI: 10.1007/s12575-009-9004-1

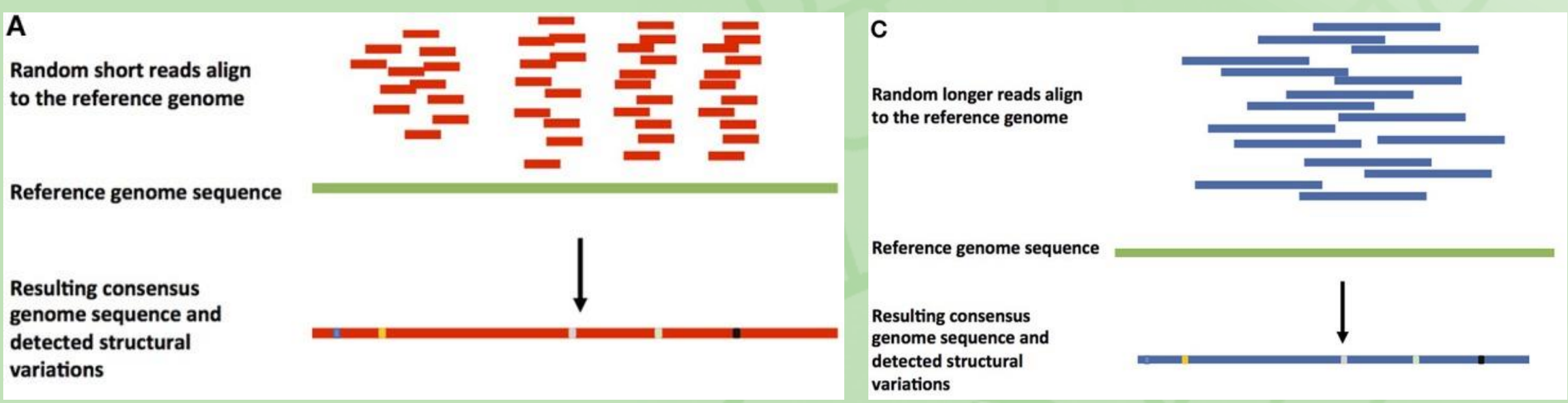
# Baseado em genoma de referência

- Alinhamento dos reads à um genoma de referência já montado, e partir dos alinhamentos construir os contigs

- Processo mais simples que uma montagem de novo

- Possibilidade de detecção de alguns tipos de variantes, porém pode mascarar grandes rearranjos estruturais

# Montagem guiada por genoma de referência

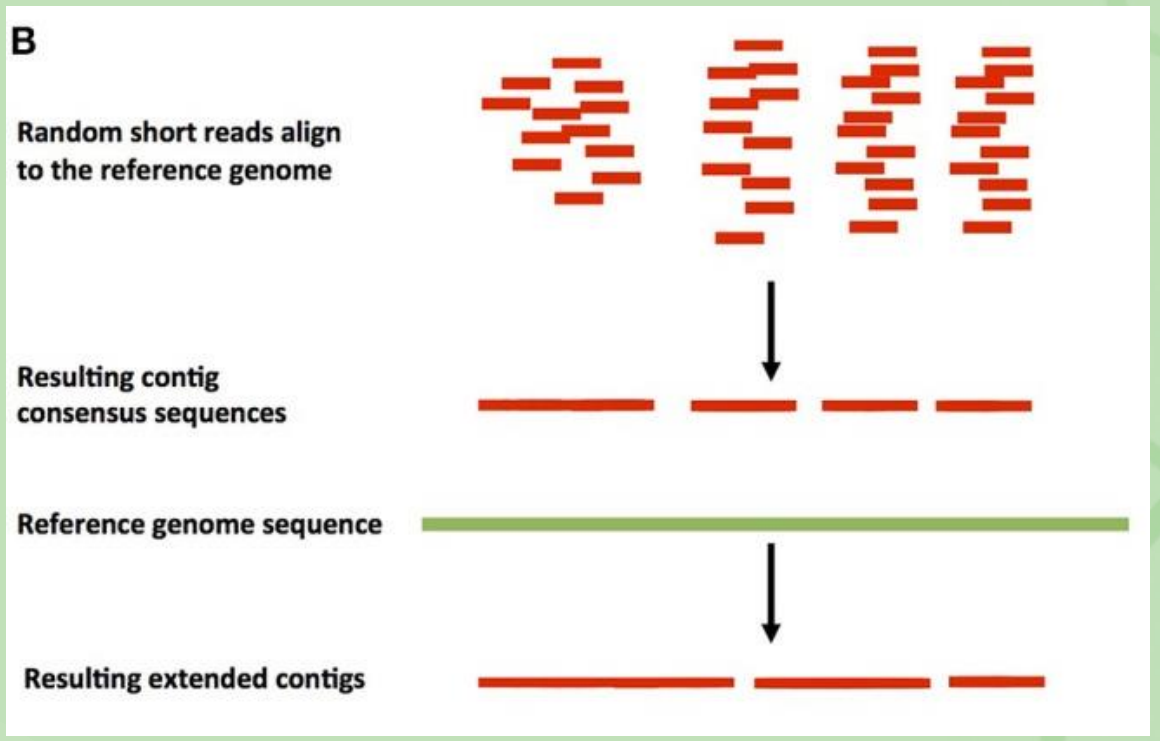


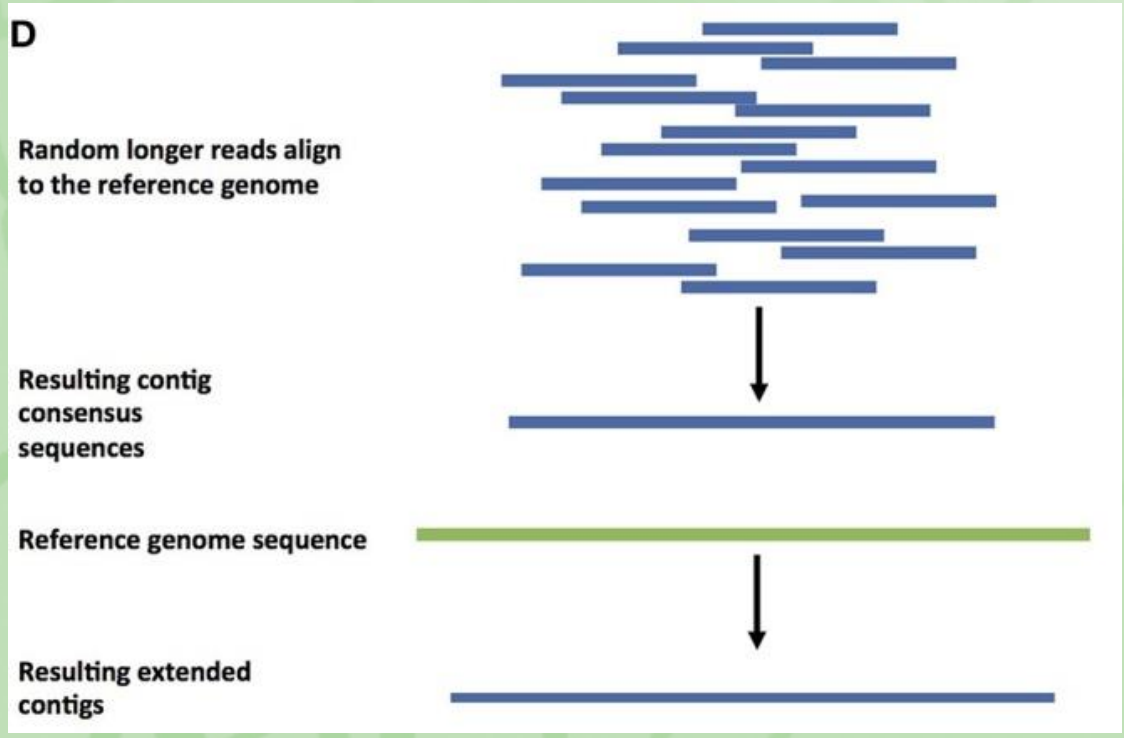

Adaptado de:
KYRIAKIDOU et al. 2018. **Frontiers in Plant Science**. DOI: 10.3389/fpls.2018.01660

- Alinhamento dos reads à um genoma de referência já montado, e partir dos alinhamentos construir os contigs

- Detecção de variações pontuais, como substituições ou rearranjos mais simples

# Montagem *de novo* guiada por genoma de referência




Adaptado de:
KYRIAKIDOU et al. 2018. **Frontiers in Plant Science**. DOI: 10.3389/fpls.2018.01660

- Montagem inicial dos reads gerando contigs iniciais
- Alinhamento dos contigs à um genoma de referência já montado, e partir dos alinhamentos extender os contigs iniciais em contigs maiores
- Detecção de variações pontuais, como substituições ou rearranjos mais simples

# *De novo*

- Reconstruir a sequência completa “do zero”, sem utilizar outro genoma como referência

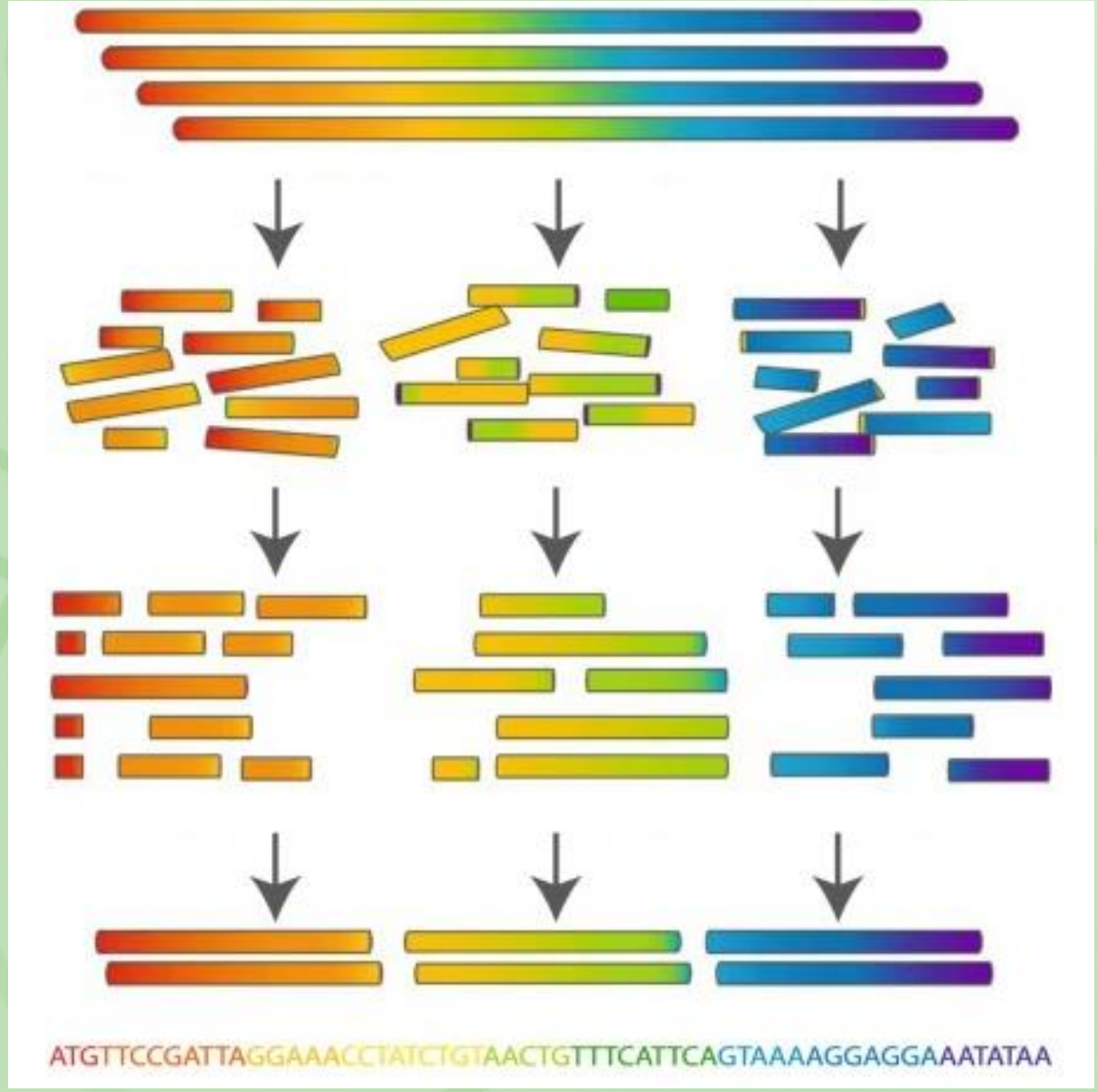
- Algoritmos
  - *Greedy*
  - Baseados em grafos

# Algoritmo Greedy

- Busca de ótimo local (em detrimento de ótimo global)

- **Passos gerais**
  - Cálculo da distância entre reads
  - Clusterização dos reads com maior sobreposição
  - Montagem de reads com sobreposição em contigs
  - Repetição dos passos anteriores até que contigs maiores não possam ser montados

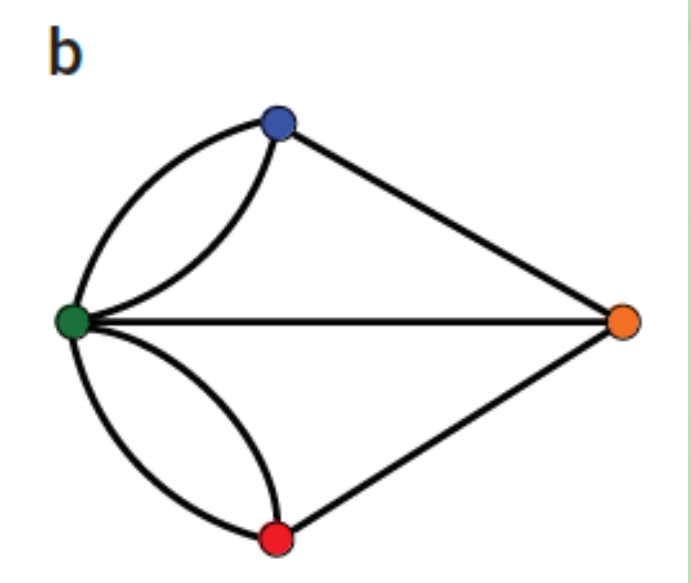
- **Problemas**
  - Não indicados para grandes conjuntos de dados (dificuldade de encontrar o ótimo global)
  - Dificuldade de montagem de regiões repetitivas




Adaptado de:
COMMINS et al. 2009. **Biological Procedures Online**. DOI: 10.1007/s12575-009-9004-1

# Baseado em grafos

- Problema das pontes de Königsberg (Kaliningrad, Rússia)
- Sete pontes sobre o rio Pregel unindo quatro partes da cidade
- É possível visitar todas as partes da cidade atravessando todas as sete pontes apenas uma vez e retornar ao local de partida?
- Aplicação de diferentes grafos em montagens de genomas

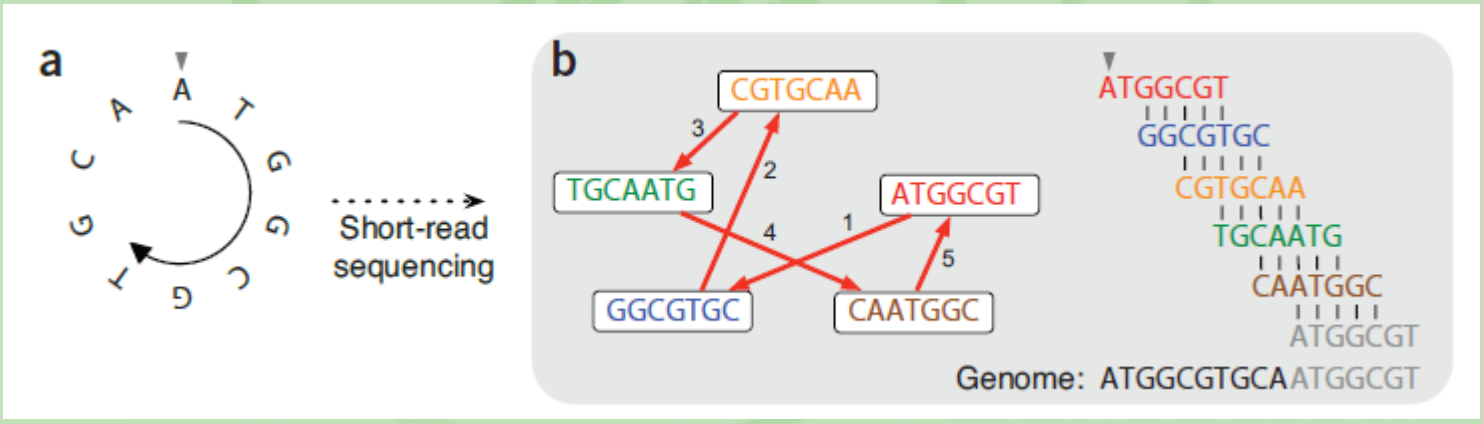




Adaptado de:
COMPEAU et al. 2011. **Nature Biotechnology**. DOI: 10.1038/nbt.2023

# Pensando a montagem de um genoma por meio de grafos

- Cada read é um nó e cada sobreposição entre reads é representada pela seta vermelha, juntando dois nós

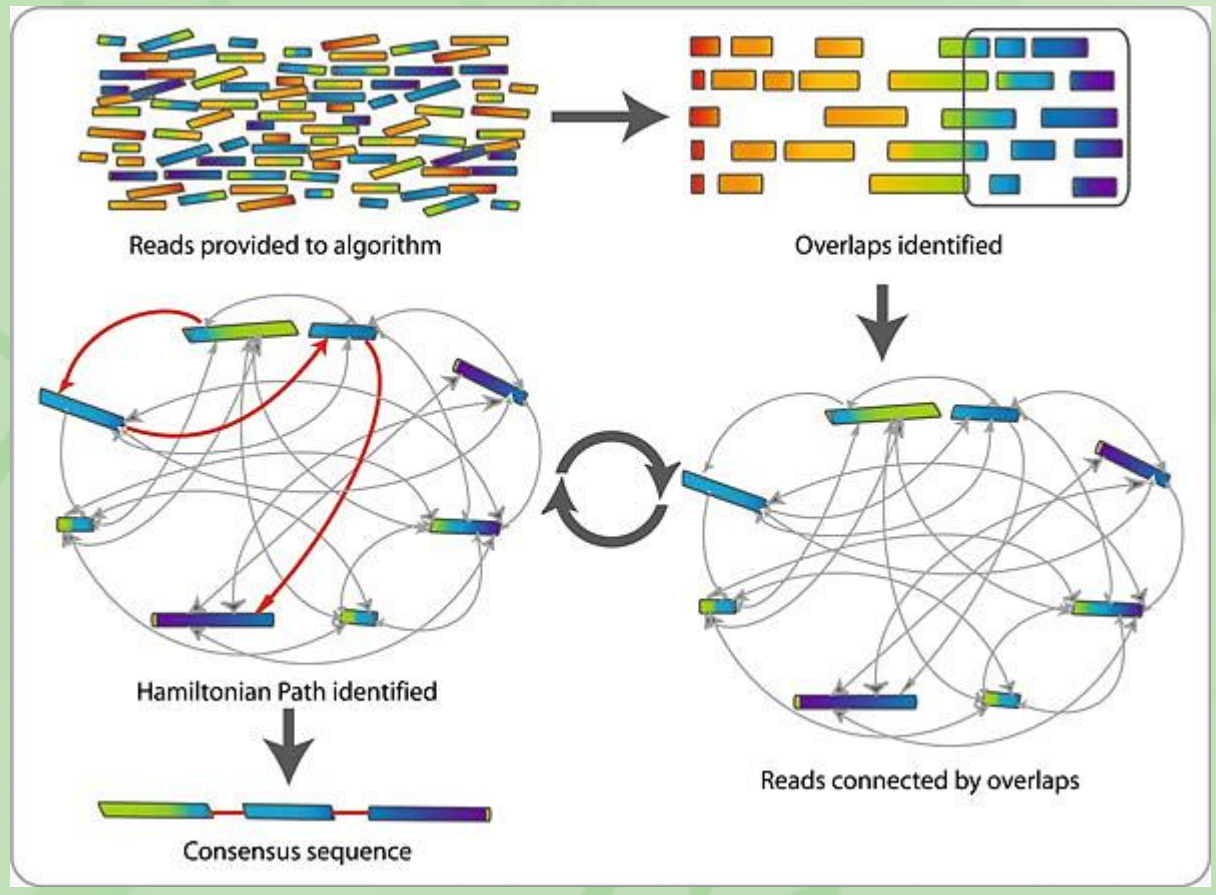
- Seguindo pela união entre os nós representada na figura, temos um caminho Hamiltoniano, passando por todos os nós apenas uma vez e terminando no nó inicial, e incluindo todos os reads




Adaptado de:
COMPEAU et al. 2011. **Nature Biotechnology**. DOI: 10.1038/nbt.2023

# Overlap-layout-consensus (OLC)

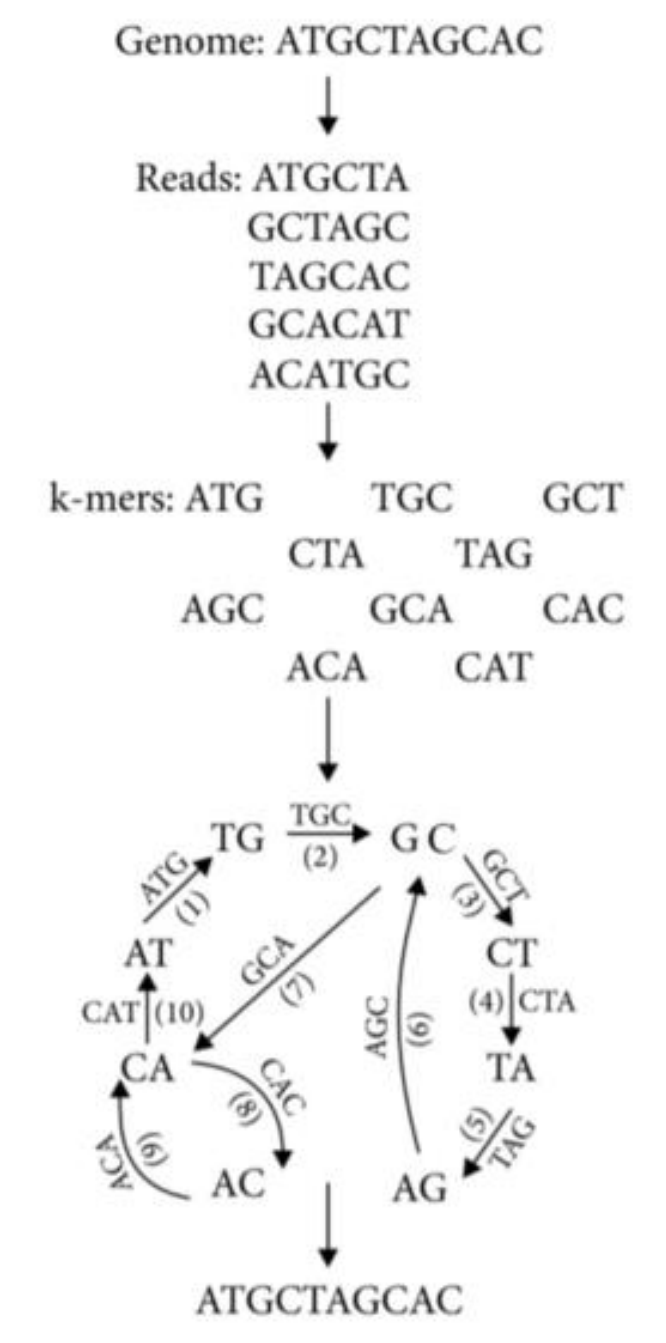
- Sobreposição entre os reads (similar ao algoritmo greedy)
- Grafo de sobreposições, em que cada read é um nó, conectados pelas sobreposições
- Encontrar o caminho passando **por todos os nós** para gerar contigs
- O caminho ideal seria um caminho Hamiltoniano: cada nó seria visitado apenas uma vez
- Computacionalmente difícil




Adaptado de:
COMMINS et al. 2009. **Biological Procedures Online**. DOI: 10.1007/s12575-009-9004-1

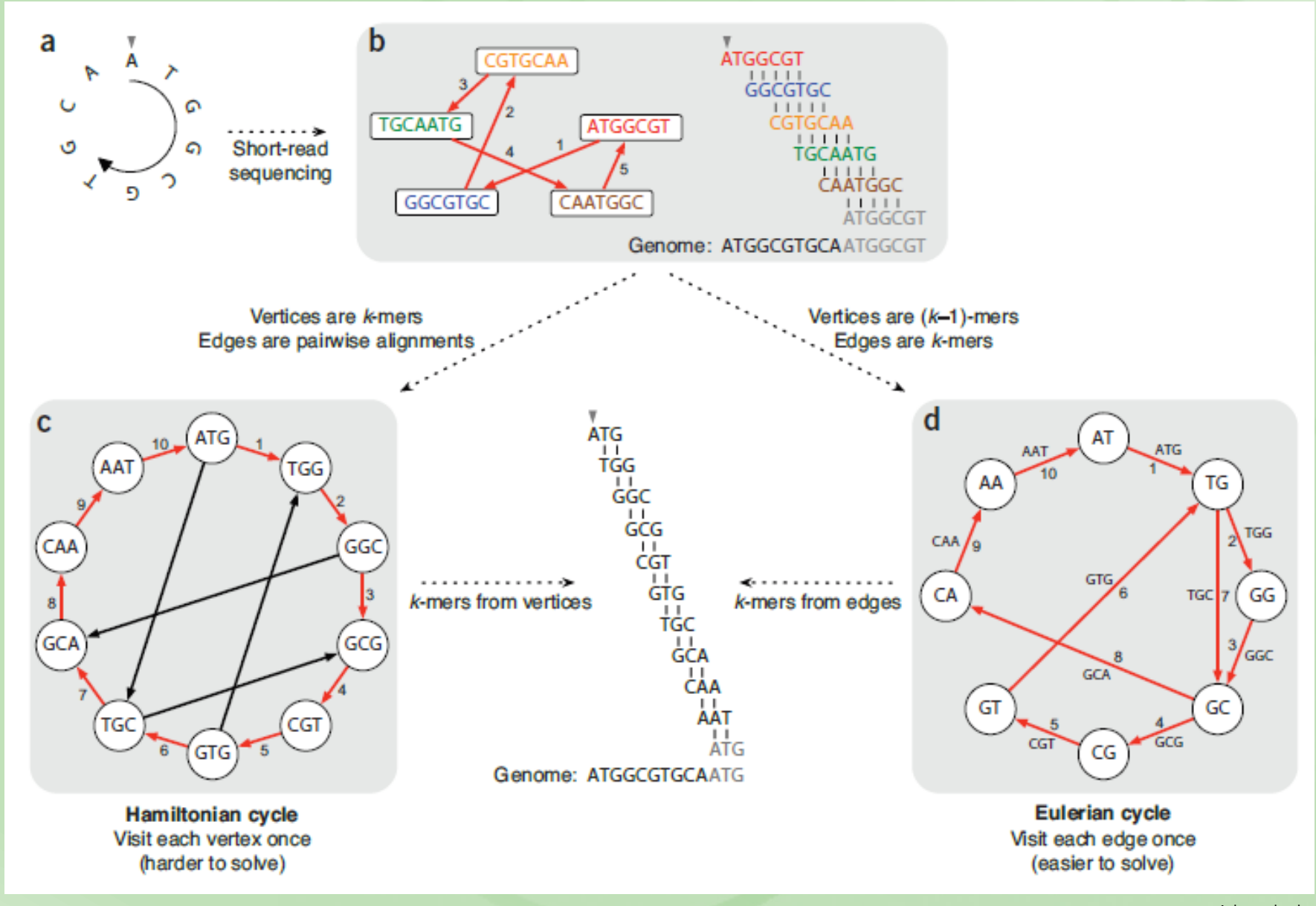
# Grafos De Bruijn

- Reads são quebrados em fragmentos de tamanhos específicos (k-mers)
- K-mers - 1 utilizados como nós na montagem do grafo
- Conexão entre os nós representadas pelos k-mers
- Encontrar o caminho passando **por todas as conexões** para gerar os contigs
- O caminho ideal seria um caminho Euleriano: cada conexão seria visitada apenas uma vez
- Computacionalmente mais fácil, há vários algoritmos eficientes para encontrar caminhos Eulerianos




Adaptado de:
MADURANGA et al. 2020. **Towards Data Science (Blog)**. Link do Post:

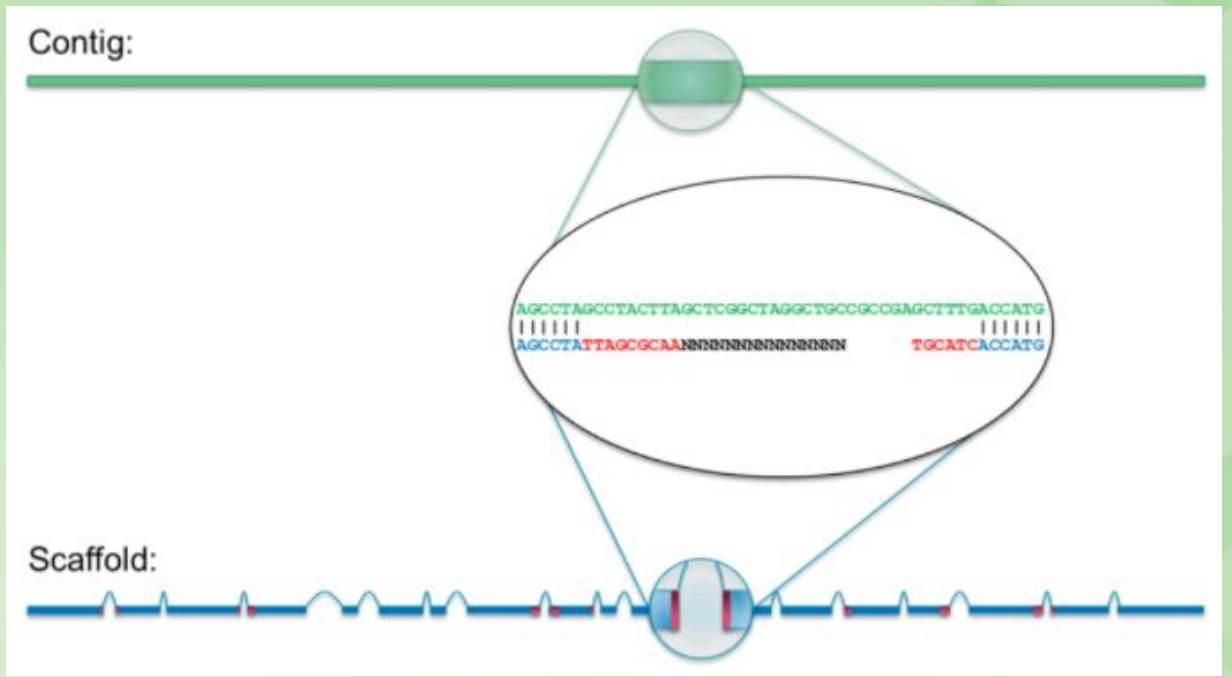
# Comparativo

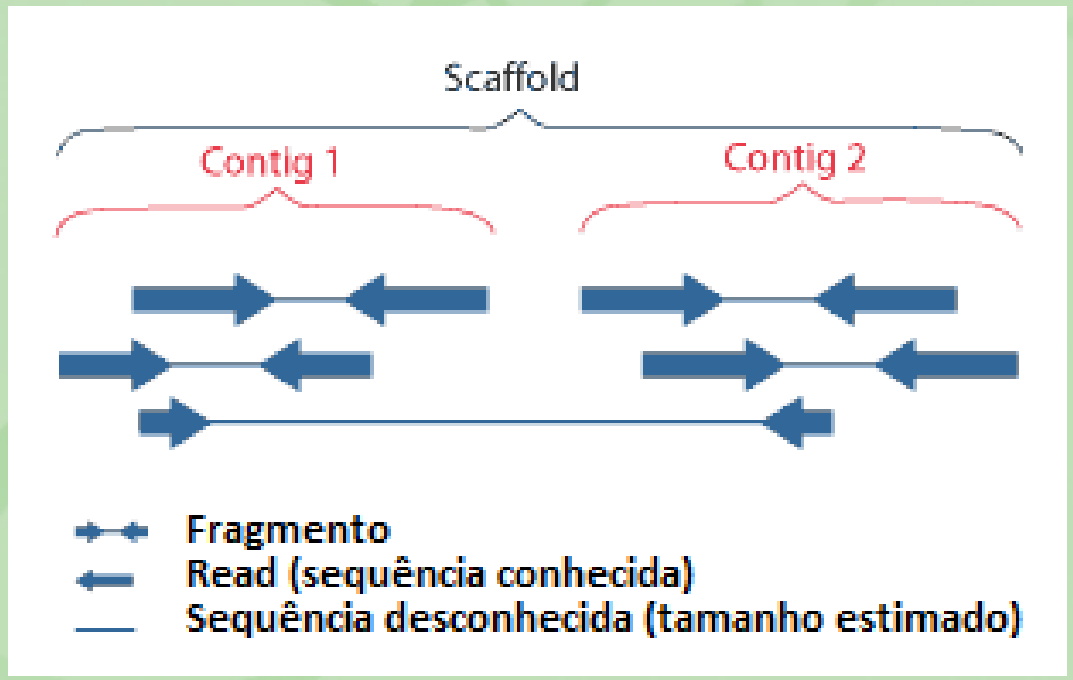



Adaptado de:
COMPEAU et al. 2011. **Nature Biotechnology**. DOI: 10.1038/nbt.2023

# Diferentes níveis de organização de uma montagem

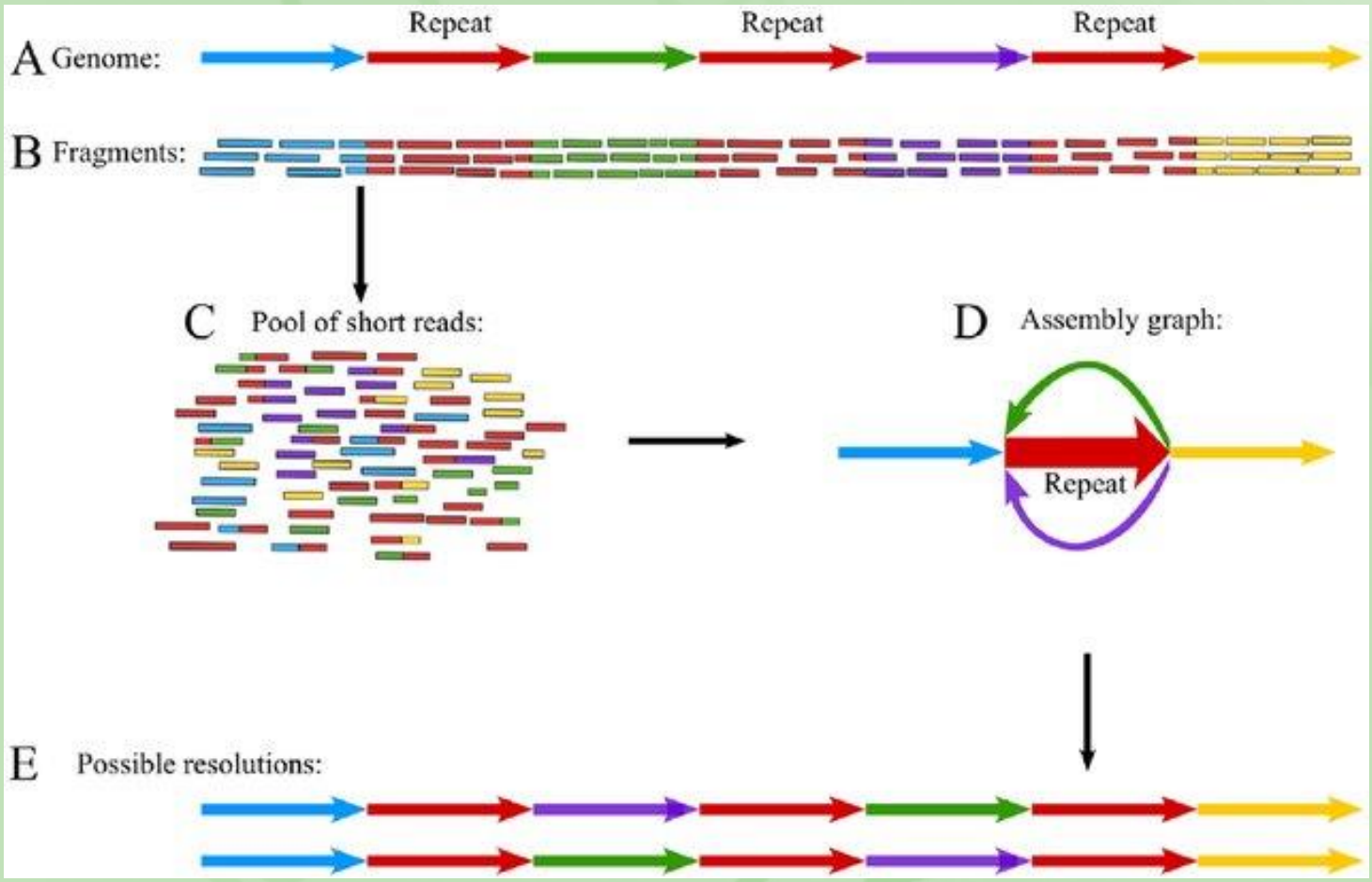
- Organização de contigs em scaffolds utilizando informações adicionais (ex: reads pareados)
  - Ausência de informações importantes
  - Tamanho dos gaps pode não ser o tamanho do gap real
  - Sequências adjacentes podem ter qualidade menor



# Problemas de montagem de regiões repetitivas

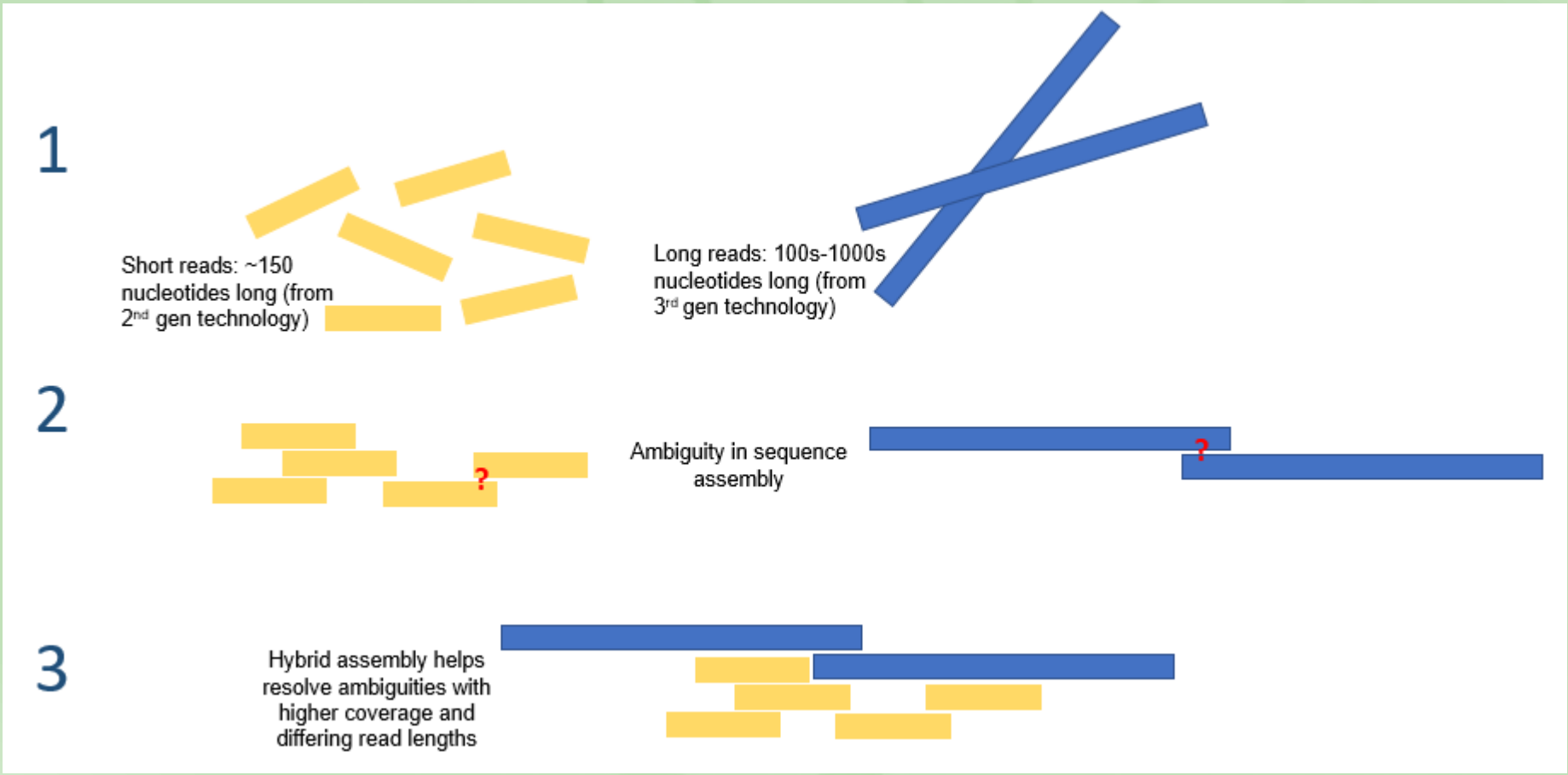
- Regiões repetitivas mais longas que o tamanho dos reads: ausência de informação sobre as regiões adjacentes para posicionamento correto durante a montagem




Adaptado de:
SIPOS et al. 2012. **PLoS ONE**. DOI: 10.1371/journal.pone.0043359

# Montagem híbrida (reads longos e reads curtos)

- Reads longos para organizar o genoma em maior escala
- Reads curtos para corrigir erros pontuais e aumentar a confiabilidade de cada base



# Genomas (Formato FASTA)

- **Linha 1:** identificador da sequência após o sinal de maior (>)
- **Linha 2:** sequência

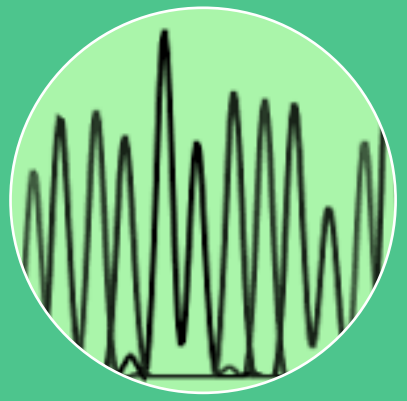
Em geral são arquivos longos e pesados, exigindo o uso de softwares para processar o arquivo completo e obter a informação de interesse

```
1  >scaffold_1
2  CCATGGCTGTCTTGCGATTGTCCAGGGCAGTCTTGACAGCAGGGGCAAGTTGCGCCGCCGCCCGTCCCTT
3  CTCAGTGTCTTCGAAGTTGAGGGAGACGATGACCCTGGTGTTGATGGGACTGTTGGTGTTCGCCGTGGAA
4  GCTTCGTCCTTCTTGCGCTTGGAGCCGGCCGACGCCGCCTTCTTGCGCTTGGCAATCTCCTCGGGATGCG
5  TGAGAATCTCTTCAATTTTTGCCATGAAGGCGTTCTCTTTCTCGATTTACGAGCGAACTTCCTCGTAGAA
6  TGCCGTGGCTACGCTTGACTCGGTCTTGAAGATGTTGTGGAGAGCCTTGCGGGTGGTCGTTCACGACGAA
7  GATGCAGAGAGGGCGCGGTCGTGGTTCTGCGCGATGGCGTTGCGGGTTGTCTTCGTCTTGTTGAACCAGT
8  TGCCGAACTGAATTACGTCGTCTTTCTTTGCCATCTTTTCCTCGGAGCTCATCGCTTCGATGGTGGCGGC
9  GTCATCCTTGCGCTTTTCGGCGGTCTCGTTTTTCTTCGTCTGGGTGACTTGCAGAAGTGCCTTTGCCCTC
10 AAAGCACTCATTCGGCGACTCTCCTGTTCCGCATCGACGACCTGGCGCCATTCCTGTGACGCATCGCTCA
```

# Como avaliar uma montagem?

## Contiguidade

- N50
- L50
- Quantidade de contigs/scaffolds
- Tamanho do maior contig/scaffold



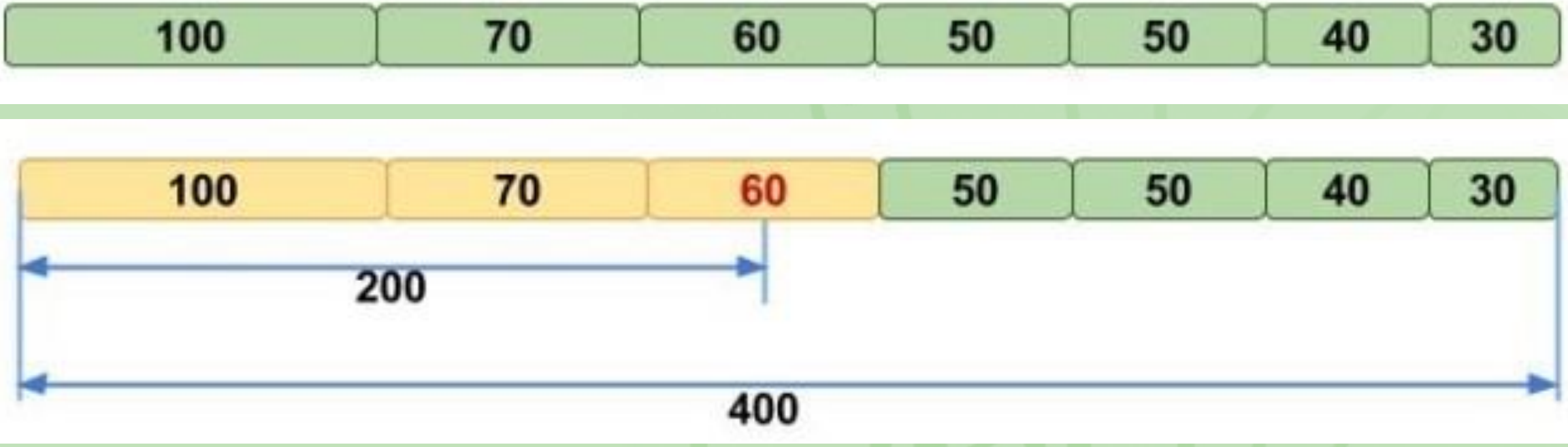
## Análise de bases

- Cobertura
- Conteúdo GC

## Análise de conteúdo

- Presença de telômeros
- Presença de genes conservados
- Comparação com genoma de referência
- Detecção de contaminantes pela distribuição do conteúdo GC
- Detecção de contaminantes por similaridade de sequência

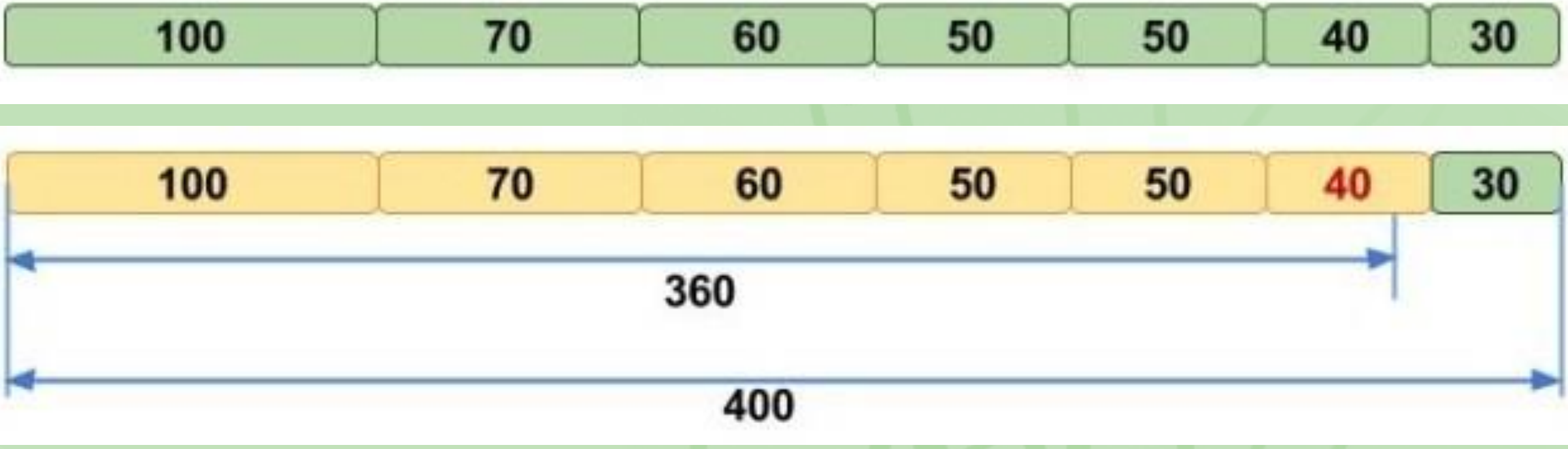
# Contiguidade – N50




- N50: metade da montagem (50%) é representada por contigs/scaffolds com um comprimento igual ou maior que 60Kb

Adaptado de:
VIDEVALL et al. 2017. **The Molecular Ecologist (Blog)**. Link do Post:

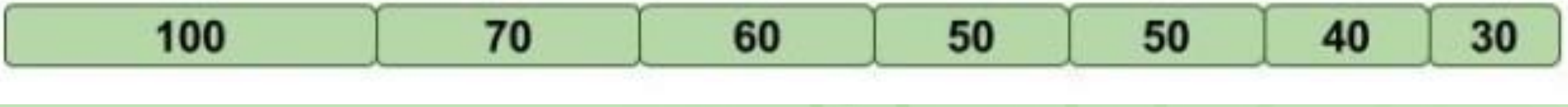
# Contiguidade – N90

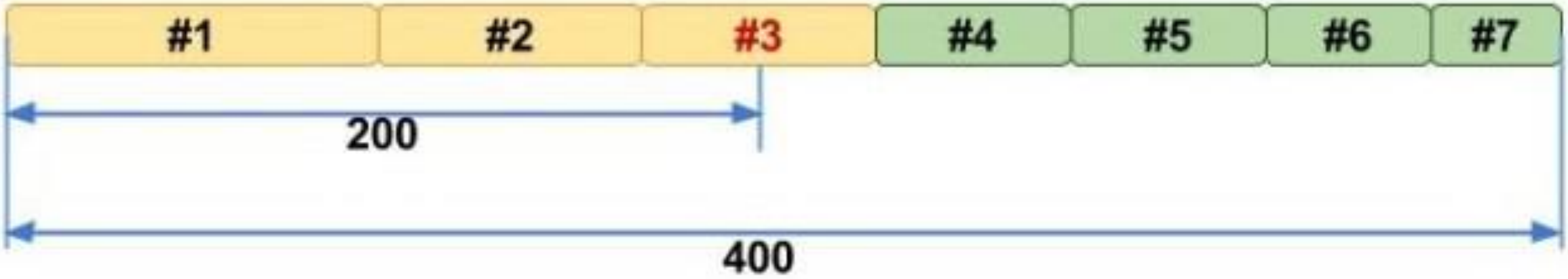



- N90: 90% da montagem é representada por contigs/scaffolds com um comprimento igual ou maior que 40Kb

Adaptado de:
VIDEVALL et al. 2017. **The Molecular Ecologist (Blog)**. Link do Post:

# Contiguidade – L50




- L50: metade da montagem está presente em 3 contigs/scaffolds

Adaptado de:
VIDEVALL, 2017. **The Molecular Ecologist (Blog)**. Link do Post:

# Análise de bases - cobertura

- A cobertura se refere à quantidade de vezes que o genoma foi sequenciado

- Alta cobertura: maior precisão e redução de erros nas montagens

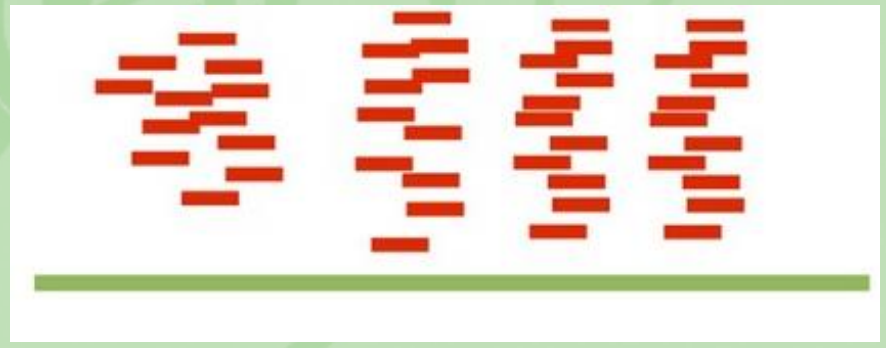
- $$Cobertura = \frac{Tamanho\ dos\ reads\ \times\ quantidade\ de\ reads}{Tamanho\ total\ do\ genoma}$$

# Análise de bases - cobertura

- Também é possível calcular a cobertura de alinhamento, re-alinhando os reads originais à montagem

- Há muitos reads que não foram alinhados?

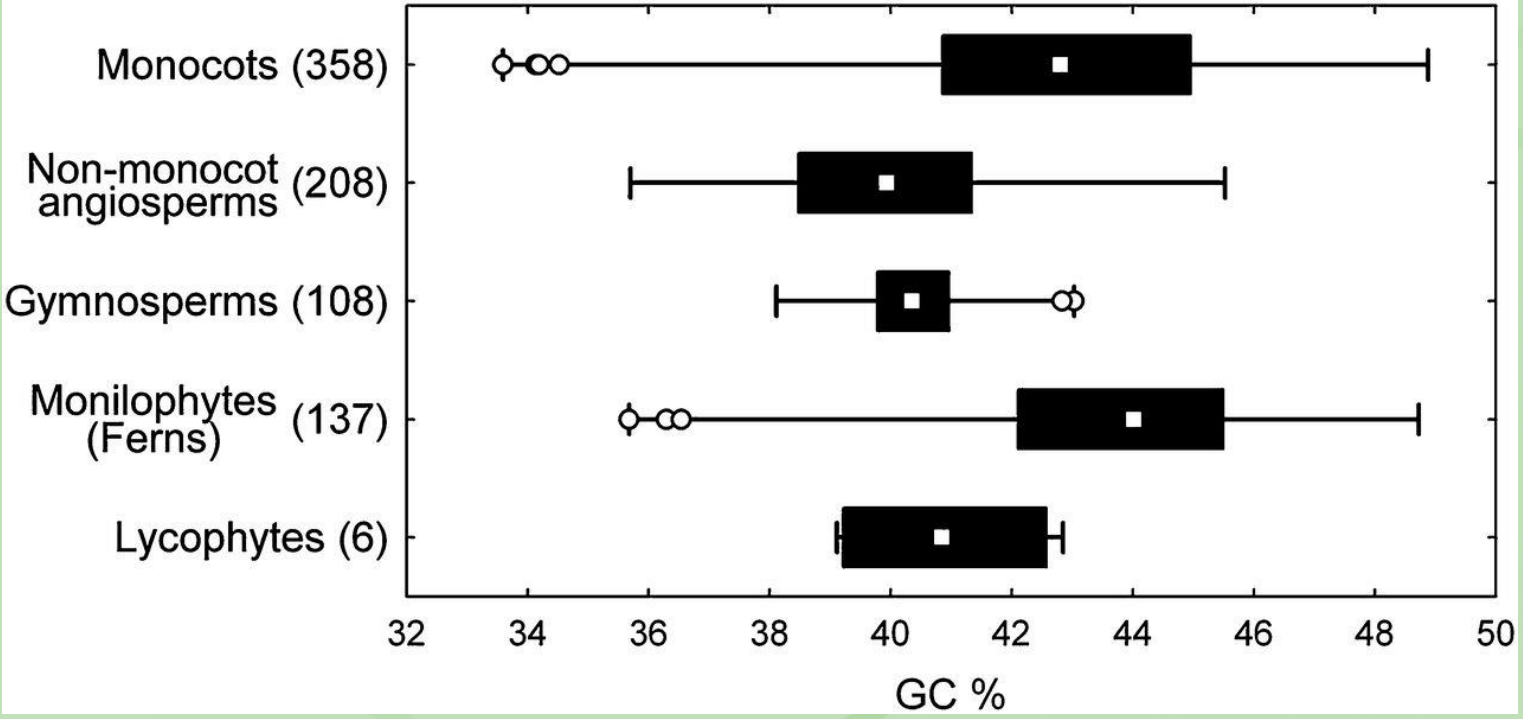
- Há regiões da montagem com poucos reads alinhados em relação às outras?



Adaptado de:
KYRIAKIDOU et al. 2018. **Frontiers in Plant Science**. DOI: 10.3389/fpls.2018.01660

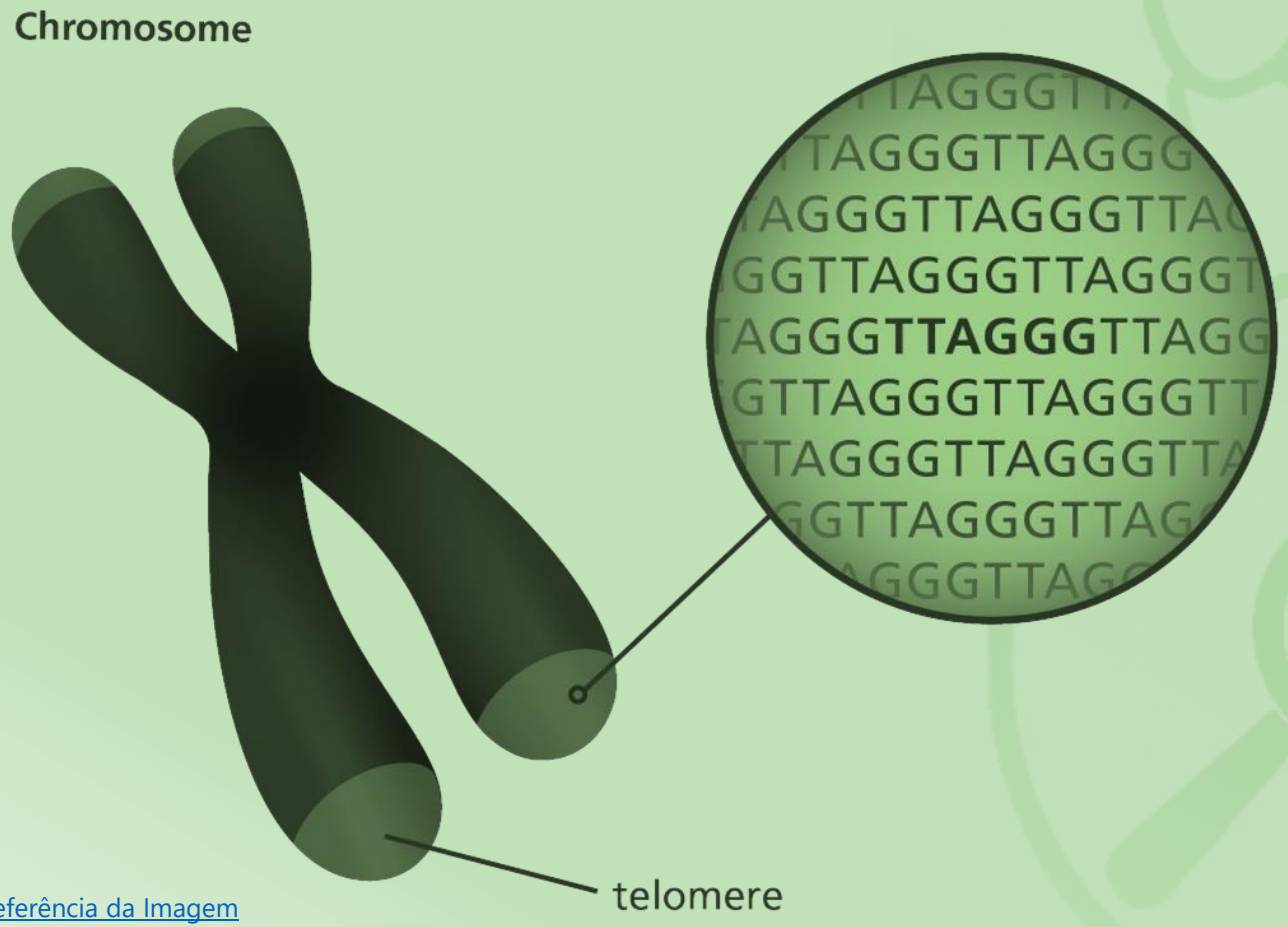
# Análise de bases – Conteúdo GC

- O conteúdo GC da montagem é similar ao conteúdo GC observado para outras linhagens da mesma espécie ou espécies próximas?




Adaptado de:
ŠMARDA et al. 2014. **PNAS**. DOI: 10.1073/pnas.1321152111

# Análise de conteúdo - Telômeros




Referência da Imagem

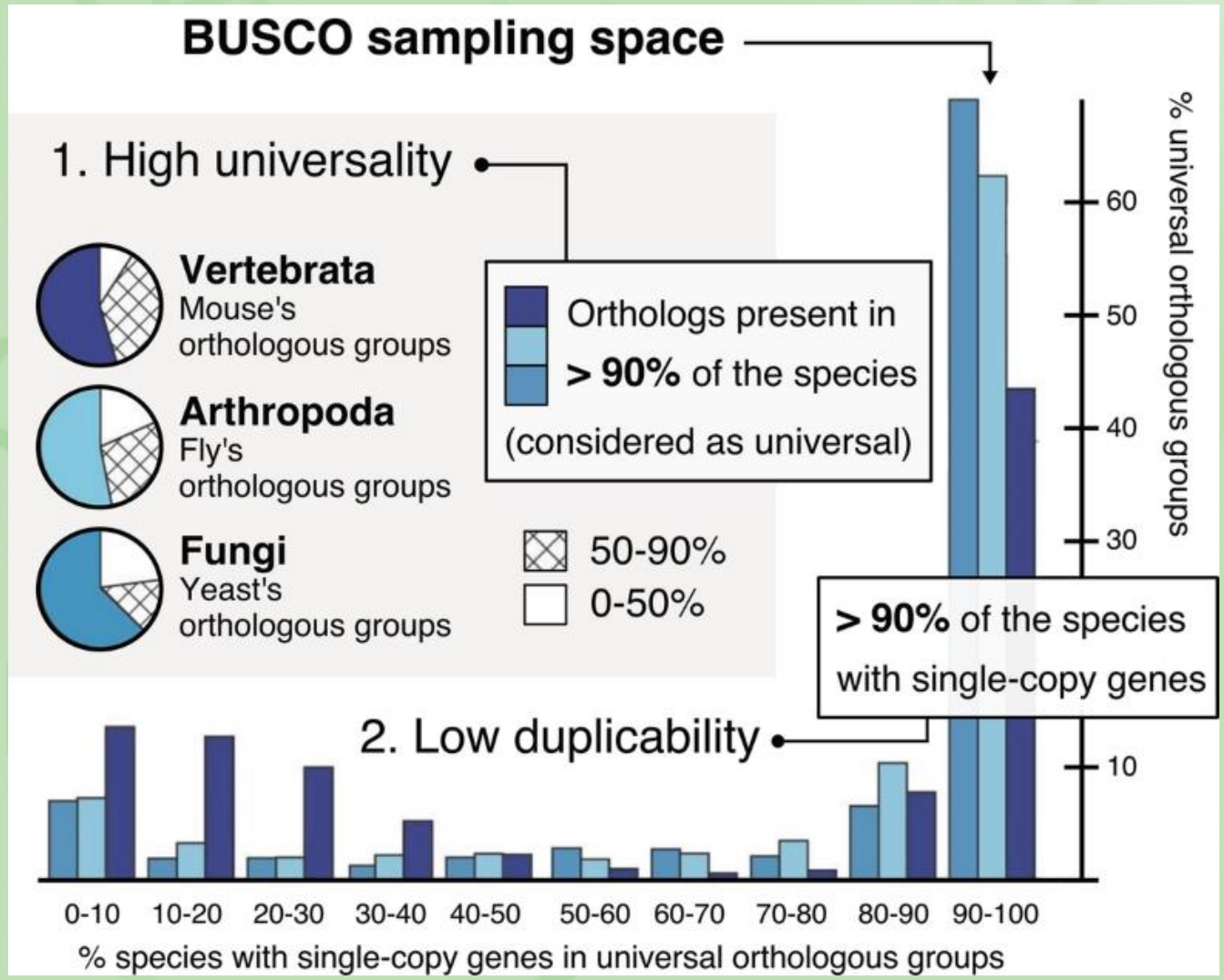
- Sequências repetitivas encontradas nas pontas dos cromossomos
- Função protetiva:
  - Impedem que os cromossomos se fusionem nas extremidades
  - Evitam que as sequências de DNA dos cromossomos sejam perdidas (os cromossomos perdem cerca de 25-200 bases por replicação)
- Presença de telômeros no início e fim de um contig/scaffold sugere que se trata de um cromossomo completo

# Análise de conteúdo – Genes conservados

- Avaliação do conteúdo gênico que seria o mínimo esperado em uma montagem ao considerar as relações evolutivas entre os organismos

- BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs), http://busco.ezlab.org/

  - Alta universalidade: Presente em 90% das espécies do grupo analisado
  - Baixa duplicabilidade: presente em cópia única em 90% das espécies do grupo analisado

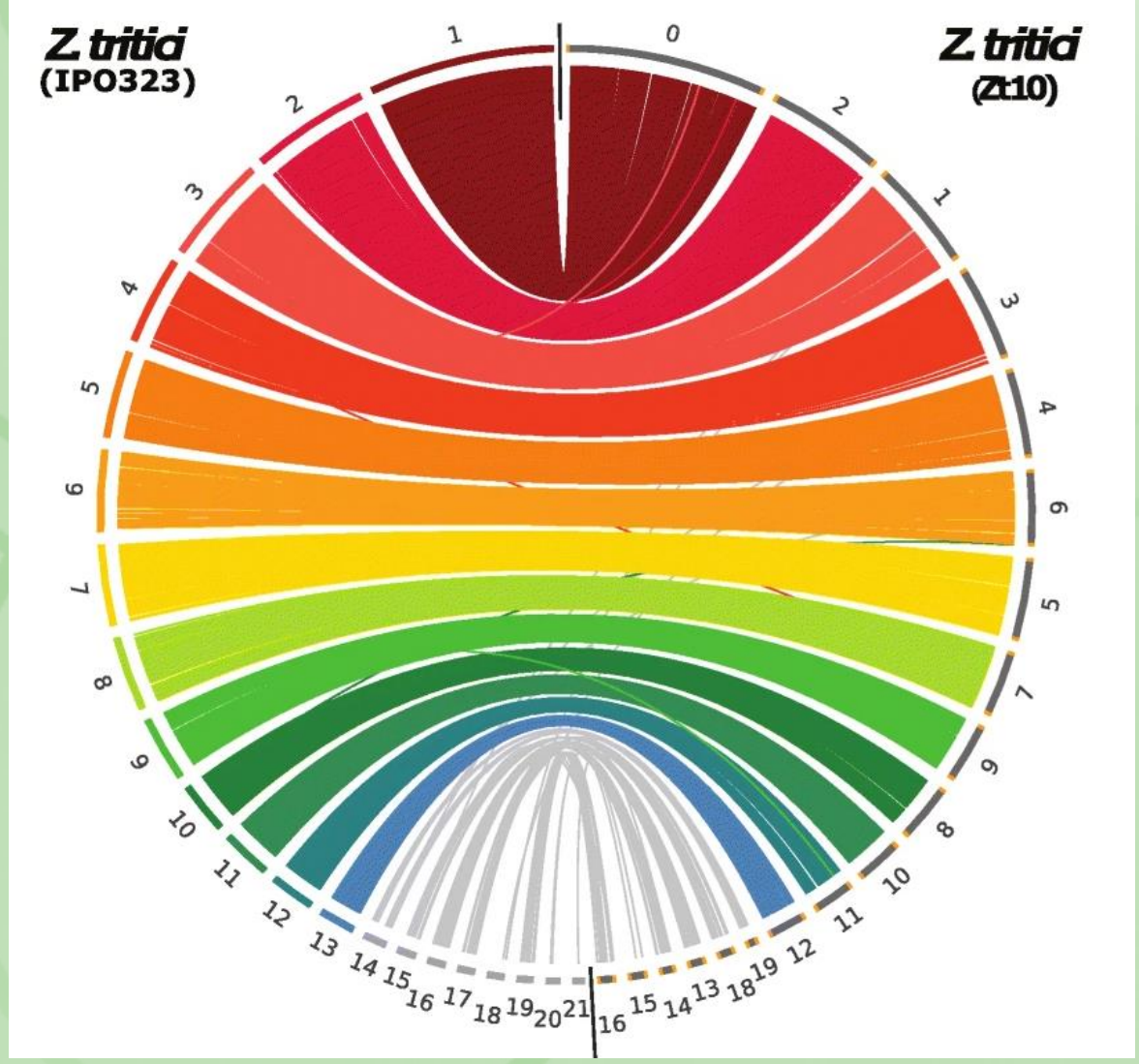



Adaptado de:
SEPPEY et al. 2019. **Methods in Molecular Biology**. DOI: 10.1007/978-1-4939-9173-0_14

# Análise de conteúdo – Comparação com genoma de referência

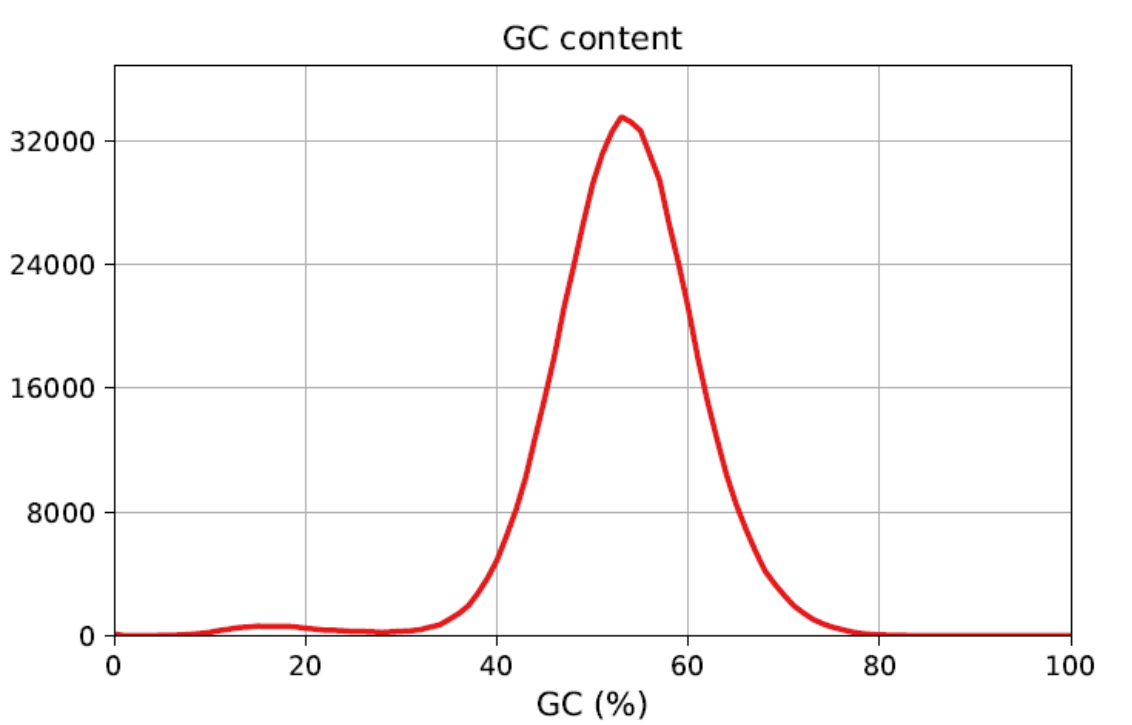
- Genes essenciais e conservados presentes na linhagem de referência estão presentes na nova montagem?

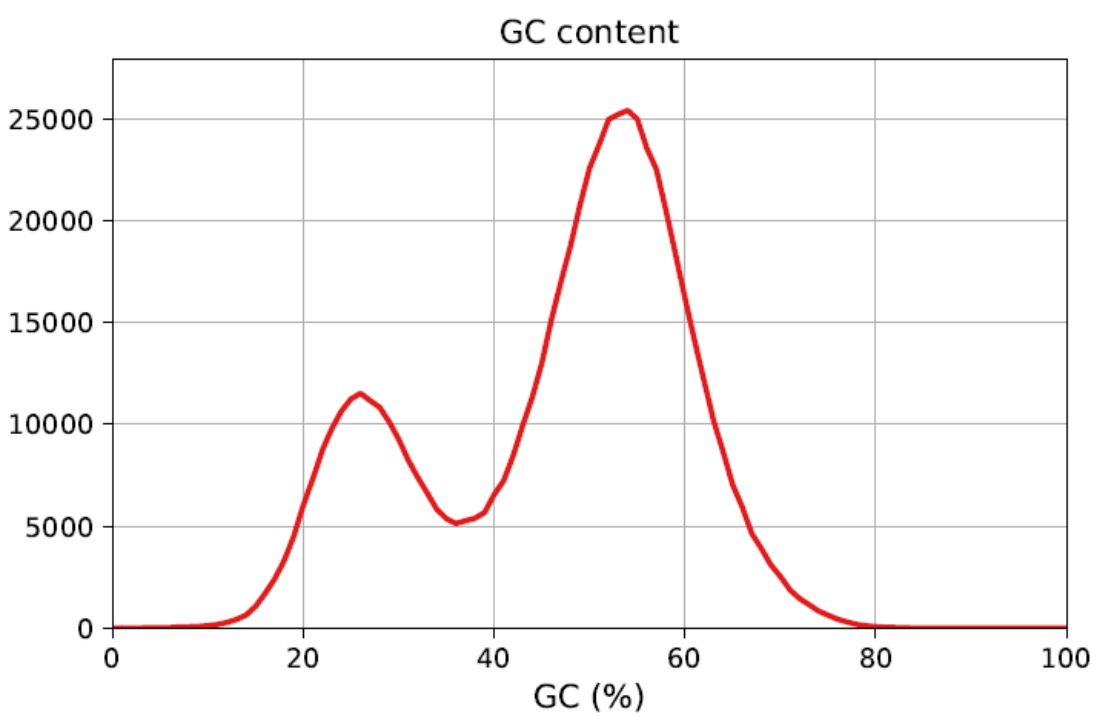
- A organização da nova montagem é similar à montagem de referência?




Adaptado de:
FEURTEY et al. 2020. **BMC Genomics.** DOI: 10.1186/s12864-020-06871-w

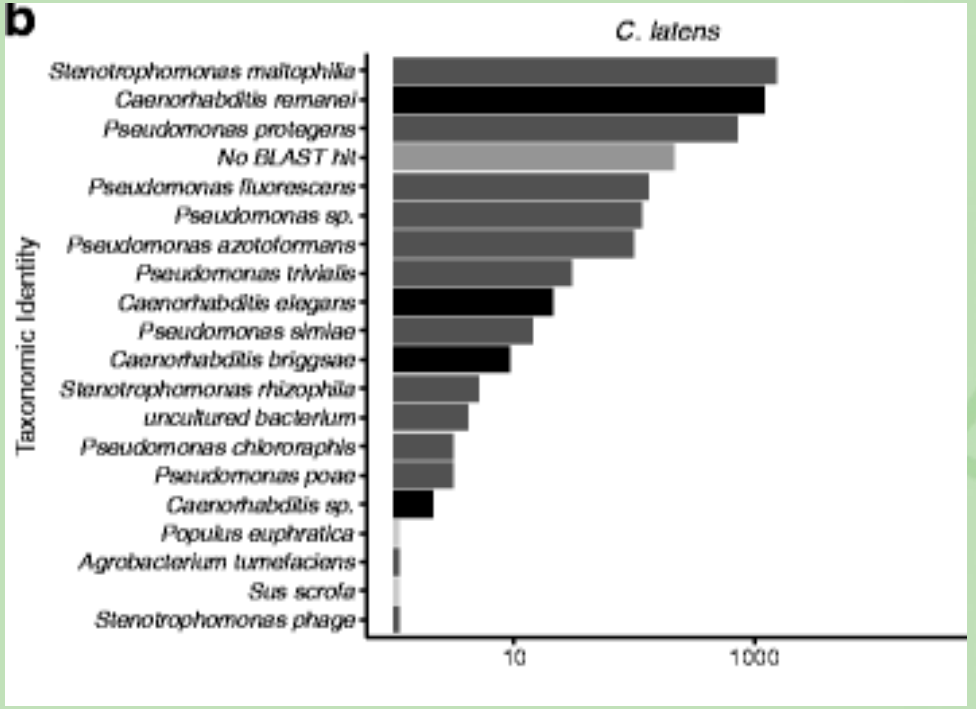
# Análise de conteúdo – Contaminantes (Distribuição do conteúdo GC)

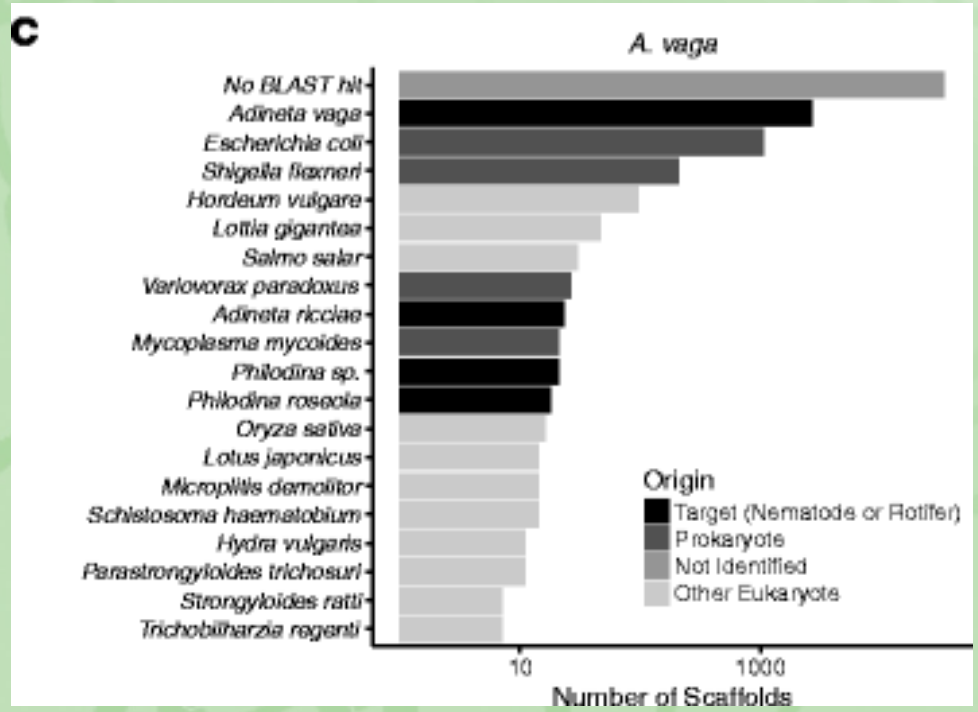



- Quantos picos são observados na distribuição de conteúdo GC?
- Mitocôndria, sequências repetitivas ou contaminação?

# Análise de conteúdo - Contaminantes

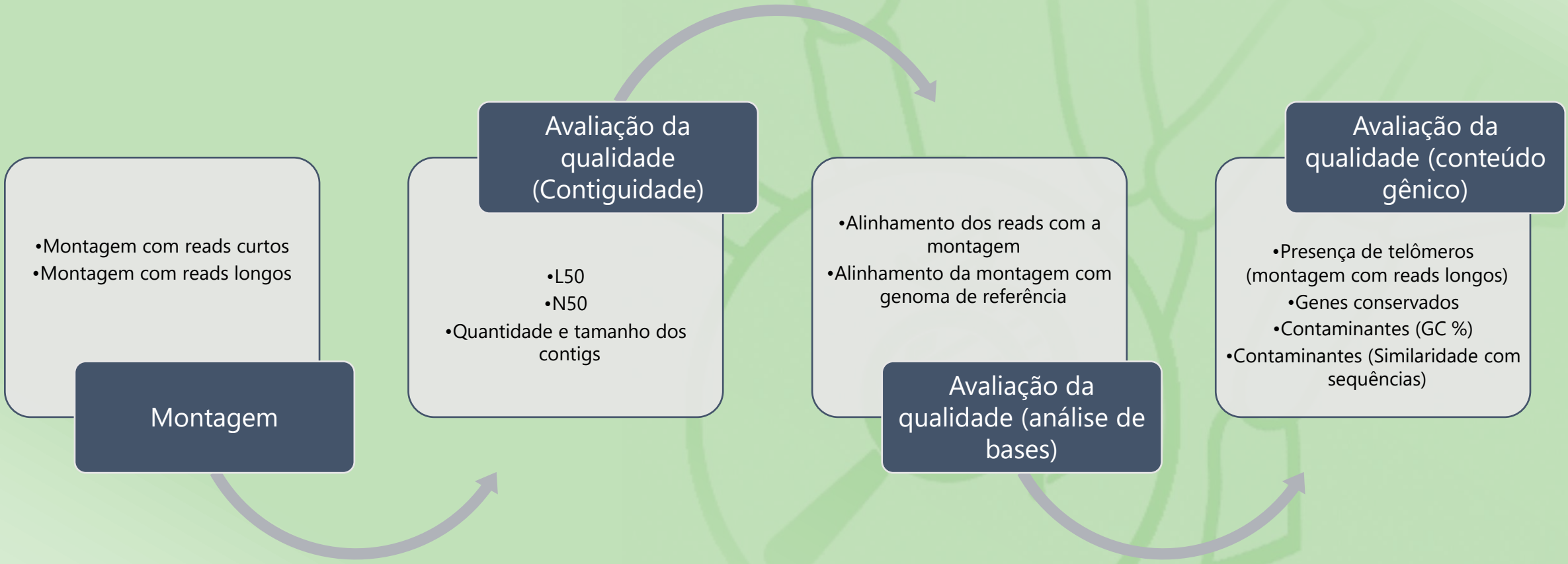



Adaptado de:
FIERST et al. 2017. **BMC Bioinformatics**. DOI: 10.1186/s12859-017-1941-0

- Há sequências de outros organismos na montagem?

- Uso do BLAST (sequência completa) ou Kraken (k-mers)


•Montagem com reads curtos
•Montagem com reads longos
Montagem
Avaliação da qualidade (Contiguidade)
•L50
•N50
•Quantidade e tamanho dos contigs
•Alinhamento dos reads com a montagem
•Alinhamento da montagem com genoma de referência
Avaliação da qualidade (análise de bases)
Avaliação da qualidade (conteúdo gênico)
•Presença de telômeros (montagem com reads longos)
•Genes conservados
•Contaminantes (GC %)
•Contaminantes (Similaridade com sequências)