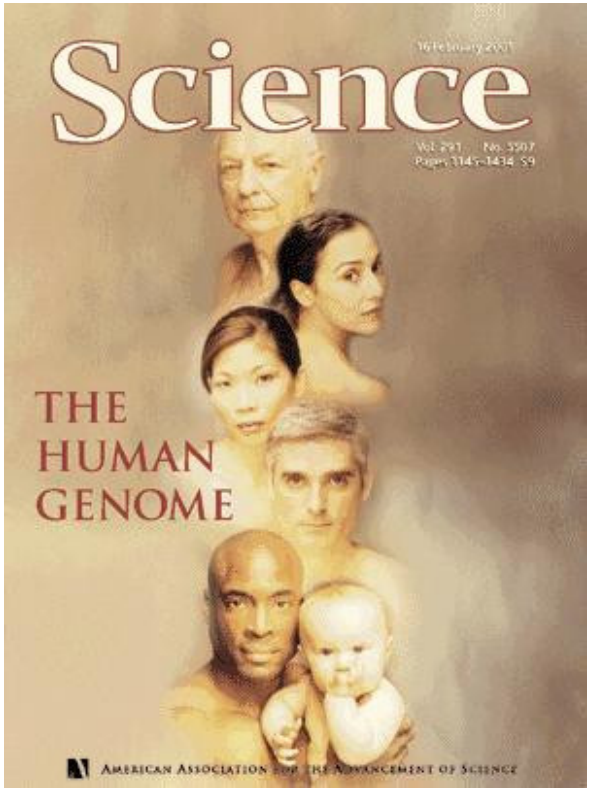
Sekvenovanie a zostavovanie genómov

(genome sequencing and assembly)

Tomáš Vinař

26.9.2024



Typický priebeh sekvenovania

1. Chromozómy náhodne rozsekáme na menšie kúsky
   (napr. pomocou sonikácie)

2. Menšie kúsky namnožíme
   (napr. pomocou PCR, bakteriálneho klonovania a pod.)

3. Konce týchto kúskov osekvenujeme niektorou zo sekvenovacích technológií
   $\Rightarrow$ mnoho krátkych reťazcov, ktoré nazývame **čítania**

4. Čítania **výpočtovo zostavíme** späť do chromozómov

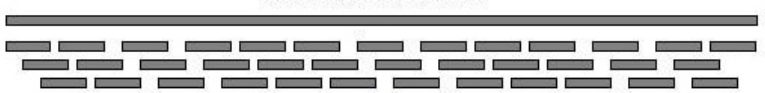
Prehľad sekvenovacích technológií

Technológia	Dĺžka čítania	Chybovosť	Za deň	Cena za GB
1. generácia				
Sanger	do 1000 bp	$< 1\%$	3 MB	$4 mil.
2. (next) generácia (cca od 2004)				
Illumina	300bp	$< 0.1\%$	2 TB	$3
3. generácia (cca od 2018)				
PacBio HiFi	cca 15 Kbp	$< 1\%$	360 GB	$15
Oxford Nanopore	5-100+kbp	$< 5\%$	50 GB	$10

Bioinformatický problém: Zostavenie genómu (sequence assembly)

- **Vstup:** krátke čítania sekvenovanej DNA
- **Cieľ:** zostaviť pôvodnú DNA

  — riadime sa zhodou v prekrývajúcich častiach čítaní
- Dôležité faktory:
  - **dĺžka genómu**
  - **dĺžka jednotlivých čítaní**
  - **pokrytie** (coverage) – koľko krát čítania pokrývajú genóm?



Formulácia problému (jednoduchá, ale nerealistická)

Najkratšie spoločné nadslovo (shortest common superstring)

Úloha: Daných je niekoľko reťazcov $S_1, S_2, \ldots S_n$ (čítania), nájdite **najkratší** reťazec S, ktorý obsahuje **každý** vstupný reťazec S_i ako (súvislý) **podreťazec**.

Motivácia: čo najviac využiť prekryvy medzi čítaniami

Príklad:

Vstup: $S_1 =$ GCCAAC, $S_2 =$ CCTGCC, $S_3 =$ ACCTTC

Výstup: $S =$ CCTGCCAACCTTC
(čítania spojené v poradí S_2, S_1, S_3)

Najkratšie spoločné nadslovo

- **Problém je NP ťažký**

  takže nepoznáme rýchly algoritmus, ktorý vždy nájde najlepšie riešenie

- **Jednoduchá heuristika:** opakovane nájdi dva reťazce, ktoré sa prekrývajú najviac a zlúč ich do jedného reťazca

- Príklad: CATATAT, TATATA, ATATATC

  Optimum: CATATATATC, dĺžka 10

  Heuristika: CATATATCTATATA, dĺžka 14

- V skutočnosti táto heuristika **aproximačný algoritmus:**

  Nájdené riešenie je najviac $3,5\times$ horšie ako optimálne

  T.j. je to 3,5-aproximačný algoritmus

  (možno aj 2-aproximačný, otvorený problém)

- Existuje aj 2,5-aproximačný algoritmus

Najkratšie spoločné nadslovo: Čo sme nezahrnuli do formulácie

- V sekvenovaní sa vyskytujú chyby
- Polymorfizmus
- Orientácia čítaní (vlákno, strand)
- Kontaminácia cudzou sekvenciou, chiméry
- Viac chromozómov, neúplné pokrytie čítaniami
- Repetitívna sekvencia (sequence repeats, opakovania)

  cca 50% ľudského genómu

  Príklad: 10xTTAATA, 10xATATTA, 3xTTAGCT

  TTAATATTAGCT?

  TTAATATTAATATTAATATTAATATTAGCT?

  TTAATATTA + ATATTAGCT?

Čo sme nezahrnuli do formulácie: kvalita báz

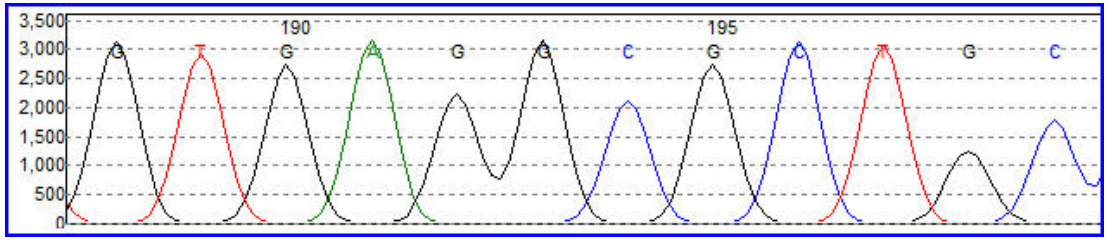
- K čítaniam máme väčšinou informáciu o **kvalite báz**

  Aká je pravdepodobnosť, že daná báza je správna?

- Báza s kvalitou $q \Rightarrow$ pravdepodobnosť chyby $10^{-q/10}$

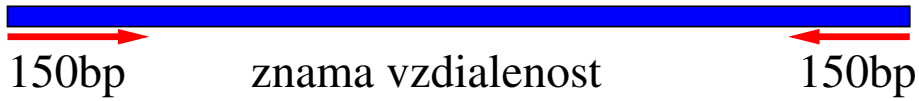
  napr. báza s $q = 40$ je správna s pr. 99.99%

Príklad výsledku Sangerovho sekvenovania (trace):



Najkratšie spoločné nadslovo: Zľahčujúce faktory

Prídavná informácia: spárované čítania (pair-end reads)



Zjednodušenie: nemusíme spojiť všetko do jedného reťazca,

spájame len časti spojené viacerými čítaniami

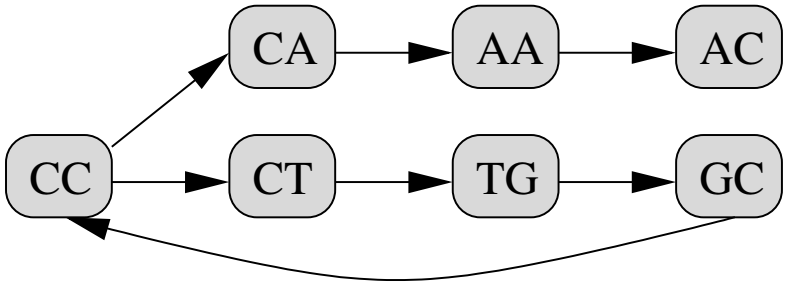
Konzervatívny prístup (radšej menej pospájať, ale nerobiť chyby)

Najkratšie spoločné nadslovo: Zhrnutie

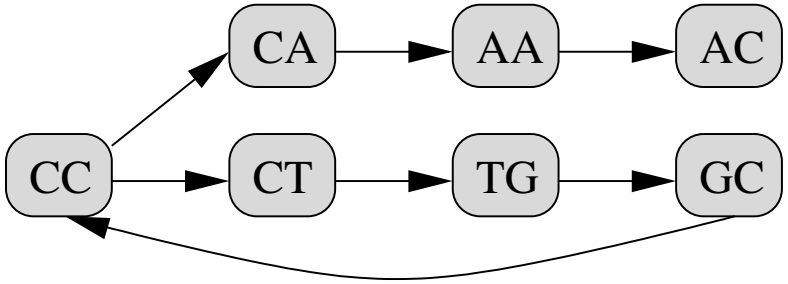
- Nerealistická formulácia, ťažký výpočtový problém
- Ale teoretický problém môže poskytnúť nejaký posun k pochopeniu skutočného problému
- Overlap-Layout-Consensus prístup
  motivovaný greedy algoritmami pre najkratšie spoločné nadslovo
  (budúci týždeň)

Skladanie krátkych čítaní: de Bruijnove grafy

- Nasekajme čítania na (prekrývajúce sa) kúsky dĺžky k
- Zostavme z nich **de Bruijnov graf**
  - **vrcholy:** podreťazce dĺžky k všetkých čítaní
  - **hrany:** nadväzujúce k-tice v rámci každého čítania (s prekryvom $k-1$)
  - Graf je orientovaný (hrany majú smer)
- **Príklad:** $k = 2$, čítania: CCTGCC, GCCAAC



Ako použiť de Bruijnove grafy?



- jediný chromozóm a žiadne "nejednoznačné" k-tice

  $\Rightarrow$ zostavenie = **Eulerovská cesta**

  (cesta v grafe, ktorá použije každú hranu práve raz)

- Eulerovskú cestu možno nájsť v čase $O(m+n)$

- v realistickom prípade:

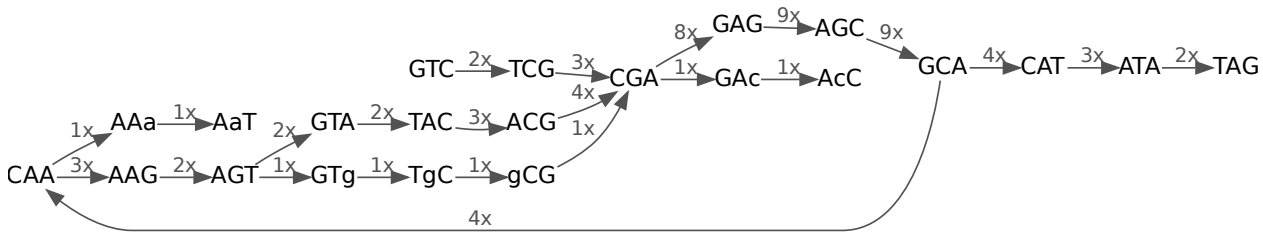
  zostavenie genómu zodpovedá niekoľkým

  pochôdzkam v de Bruijnovom grafe (nazývame **kontigy**),

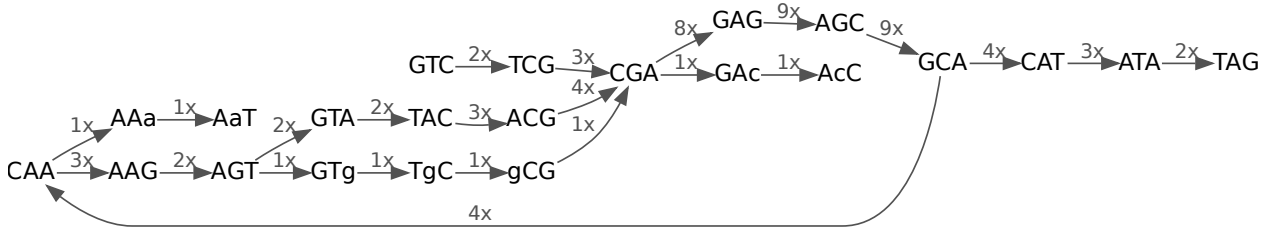
  ktoré dohromady pokrývajú veľkú časť hrán

Príklad: sada čítaní a zodpovedajúci deBruijnov graf

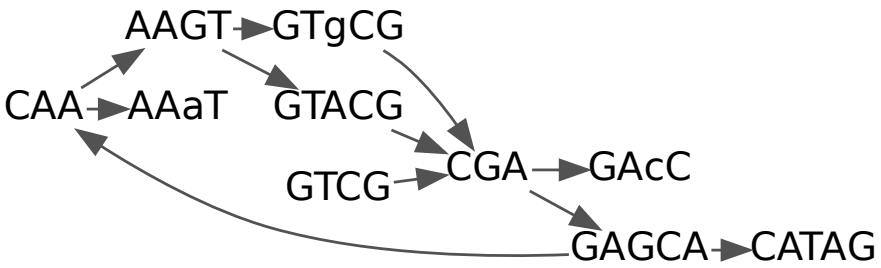
```
GTCGAGCAAGTACGAGCATAG
 TCGAGCA      AGCATAG
    AGCAAaT   AGCATAG
GTCGAcC  GTACGAG
GTCGAGC   TACGAGC
  CGAGCAA  ACGAGCA
        AGTgCGA
      CAAGTAC
     GCAAGTA GAGCAT
   GAGCAAG   GAGCATA
          TACGAGC
```



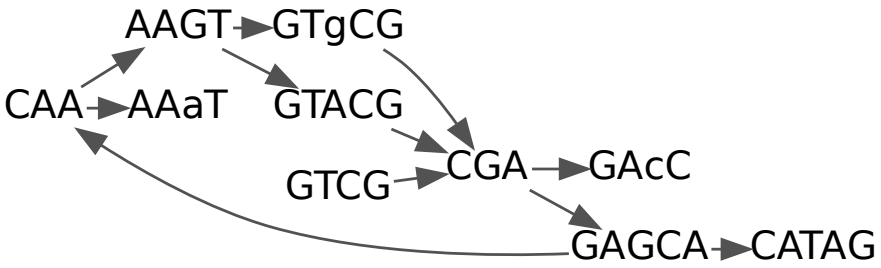
Príklad: zjednodušovanie de Bruijnovho grafu



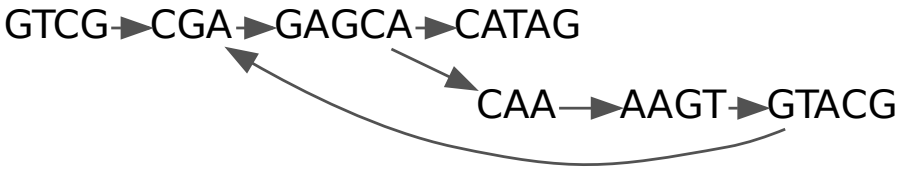
Spojíme jednoznačné cesty do vrcholov



Príklad: odstraňovanie chýb z de Bruijnovho grafu



Odstránenie chýb (výbežkov a bublín s nízkym pokrytím)



Spájaním dostaneme 4 kontigy (pôv. GTCGAGCAAGTACGAGCATAG)

Typické výsledky zostavovania genómov

- Veľa **kratších kontigov**,
  niekedy spájané do väčších celkov (**scaffolds**) pomocou ďalšej informácie
  (napr. spárované čítania, čítania 3. generácie)
- Niektoré časti nemožno jednoznačne zostaviť z dôvodu **dlhých opakujúcich sa sekvencií**

Príklad: človek chr14, 88 Mbp, $70\times$ pokrytie

Metóda	Počet kontigov	Chýb	N50 po korekcii
Velvet (základný de Bruijn)	>45000	4910	2.1 kbp
Velvet (scaffolding)	3565	9156	27 kbp
AllPaths-LG	225	45	4.7 Mbp

N50: kontigy s touto alebo dlhšou dĺžkou pokrývajú 50% genómu

korekcia: rozsekneme všetky zle spojené kontigy

Zhrnutie

- Sekvenovanie genómu je zložitý proces, v ktorom hrá bioinformatika dôležitú úlohu
- Illumina nízka cena, krátke čítania
- Problém zostavovania genómu, najkratšie spoločné nadslovo
- Praktické riešenie pre krátke čítania: de Bruijnove grafy
- V zostavenej sekvencii môžu byť chyby, medzery, viaceré kontigy
- Na budúce: ako sa vysporiadať s dlhými čítaniami 3. generácie?
- Pokrytie genómu a veľkosť čítania hrajú najdôležitejsiu úlohu pri tom, ako fragmentovaný bude výsledok:
  - pre Sanger: 7-10$\times$ pokrytie
  - pre NGS: 40-70$\times$ pokrytie
  - pre 3. generáciu: 30$\times$ pokrytie

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)