

Introdução à Análise de Single-Cell com R

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal/RN - Brasil

Lukas Iohan



Natal, 2023

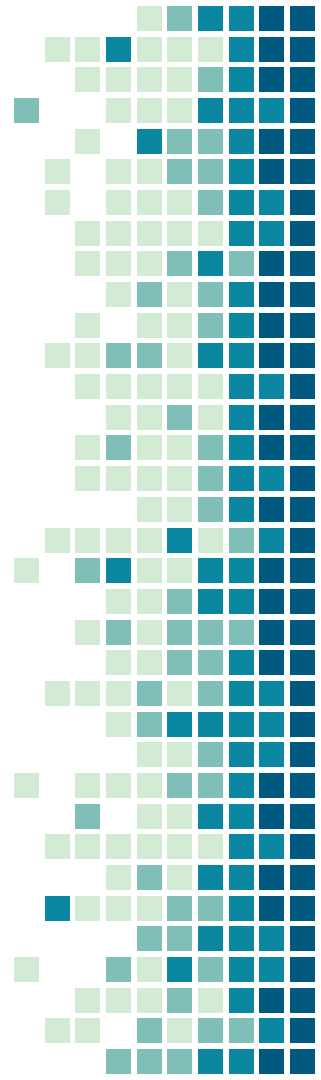
Single-cell RNA-seq

- Grupo de tecnologias e ferramentas de análise (em constante desenvolvimento) que tem como:
 - Input: células
 - Output: matriz de expressão



cells

genes				



O que é uma matriz de expressão gênica?

- **Expressão:** termo referente ao processo pelo qual a informação em um gene é usada para gerar mRNA (codantes e não-codantes).
- **Gene:** Termo descrito pela primeira vez em 1909 por Danish Wilhelm Johannsen (1857-1927). Seu significado evoluiu desde essa época.
- Matriz: Representação retangular de números.



Expressão Gênica

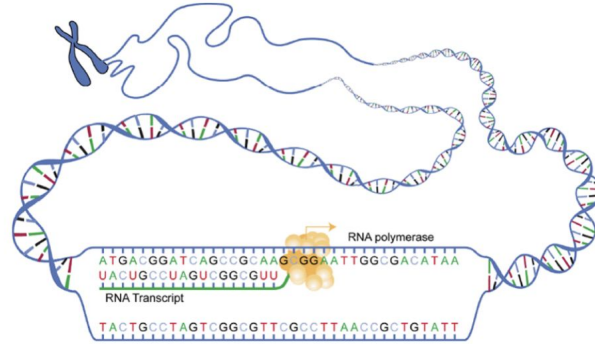


Fig 2. RNA Transcription: RNA polymerase binds to the template strand and transcribes pre-mRNA. Notice how the pre-mRNA has the same sequence as the coding strand.

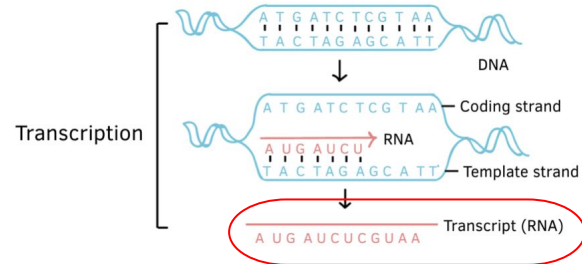


Fig 3. RNA Transcription II. Another diagram to help you visualize RNA transcription.

Por que Single-Cell?

- Métodos e técnicas de análise de expressão gênica (bulk RNA-Seq e Microarrays) utilizam expressão total da amostra.
- Falácia Ecológica: interpretação estatística de indivíduos advém de inferência a partir do grupo que o indivíduo está inserido.



Por que Single-Cell?

- O Brasil é o país do futebol, logo todo brasileiro gosta e sabe jogar futebol!!!

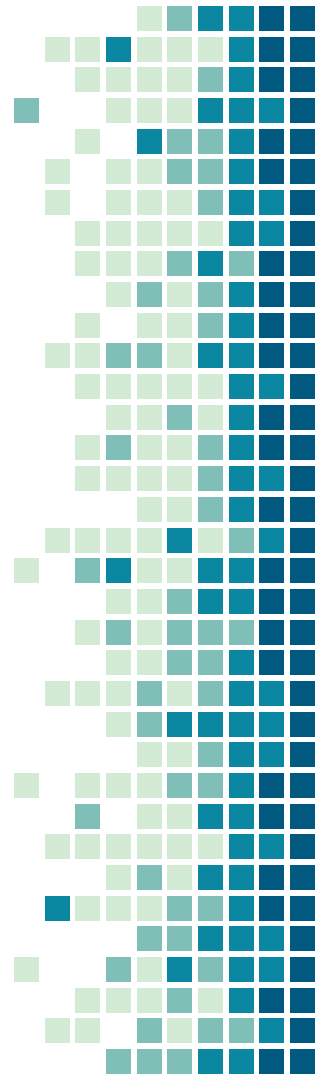
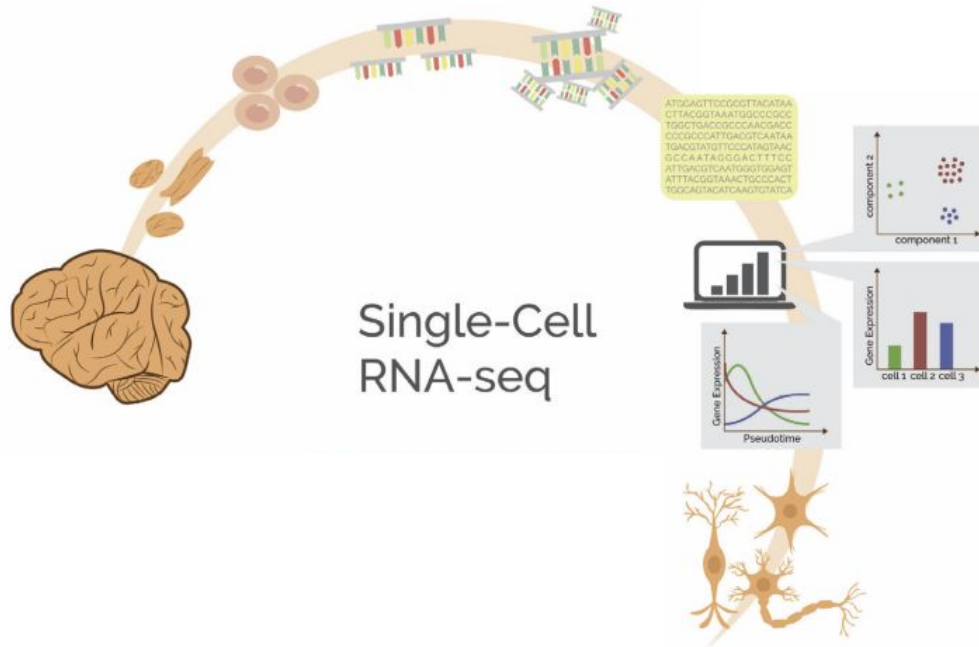


Por que Single-Cell?

Bulk RNA-seq



Por que Single-Cell?



Single-cell: propósito

- Quantificar expressão das partes de um órgão/tecido
- Identificar os diferentes tipos de células de um órgão/tecido
- Investigar a biologia molecular das células através de sua assinatura genética.
- Determinar diferentes trajetórias para cada grupo celular (pseudotime)
- Identificar biomarcadores em doenças



Single-cell: Etapas

1. Preparação do tecido
2. Isolamento e preparação da *library*
3. Sequenciamento
4. Análise computacional



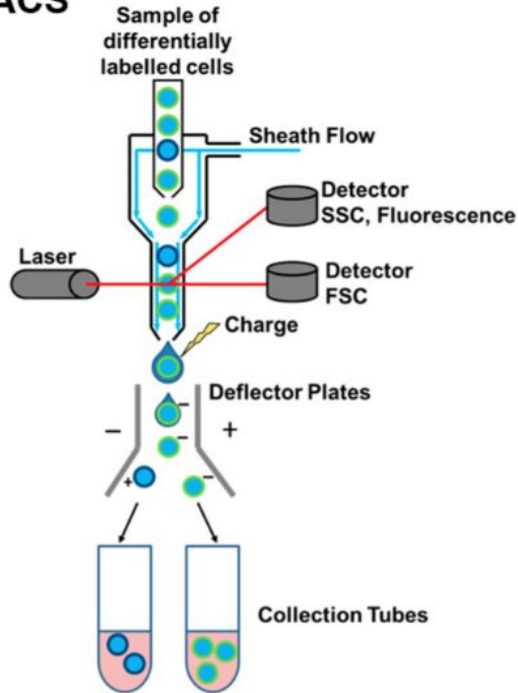
Single-cell: Preparação do tecido

Table 1: Tissue dissociation protocols

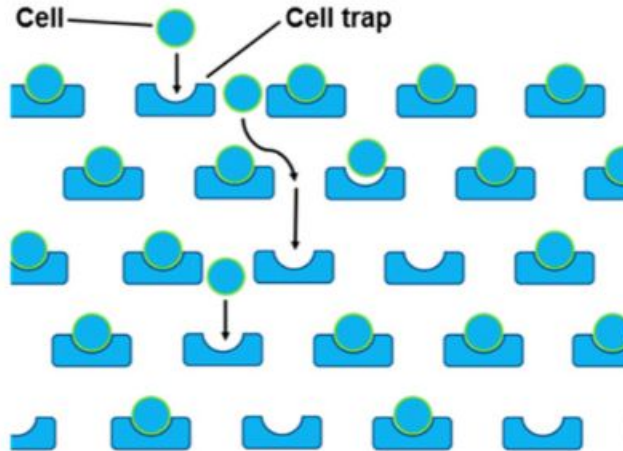
Method/protocol	Description	Example protocol/provider
Mechanical	Tissue is mechanically sheared and disrupted through cutting, dicing, pipetting, etc	Isolation of various hematopoietic lineages from bone marrow, spleen, or lymph nodes
Enzymatic	Tissues are incubated with various enzymes such as collagenase, trypsin, dispase, elastase, etc to cleave protein bonds	Worthington Biochemical Corporation
Combinatorial	Mechanical and enzymatic methods can be performed sequentially or simultaneously, with the aid of automated systems, for more extensive dissociation	Mitenyi gentleMACS

Single-cell: Isolamento e preparação da library

FACS

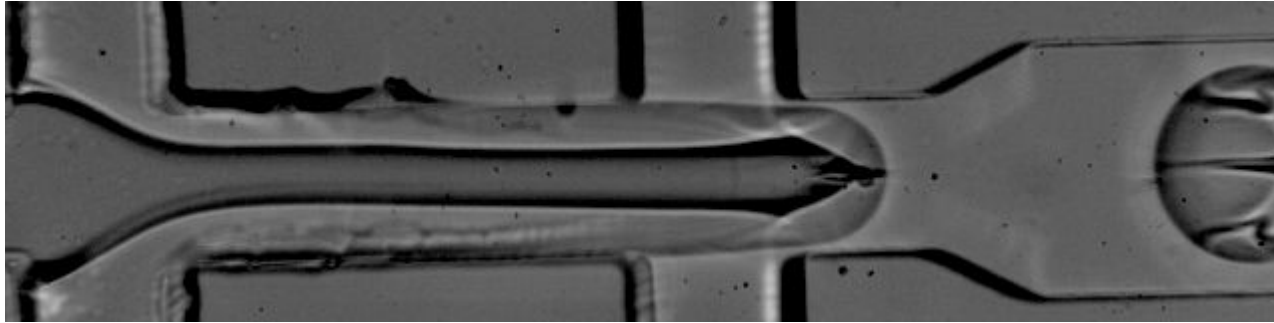


Microfluidics



Single-cell: Isolamento e preparação da library

Droplet-methods

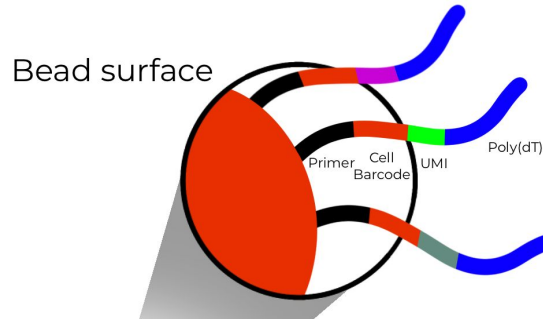
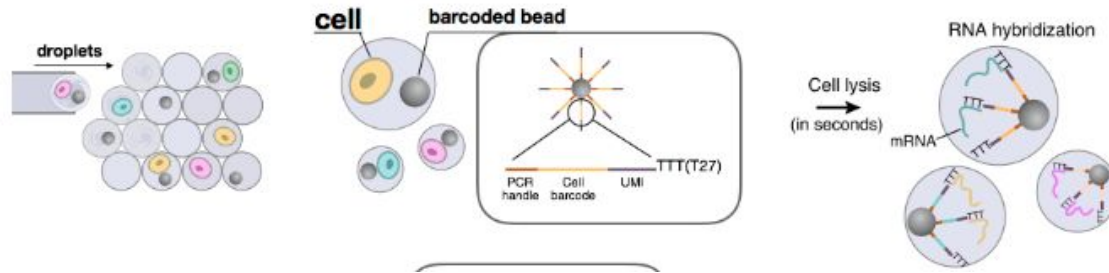


Single-cell: Isolamento e preparação da library

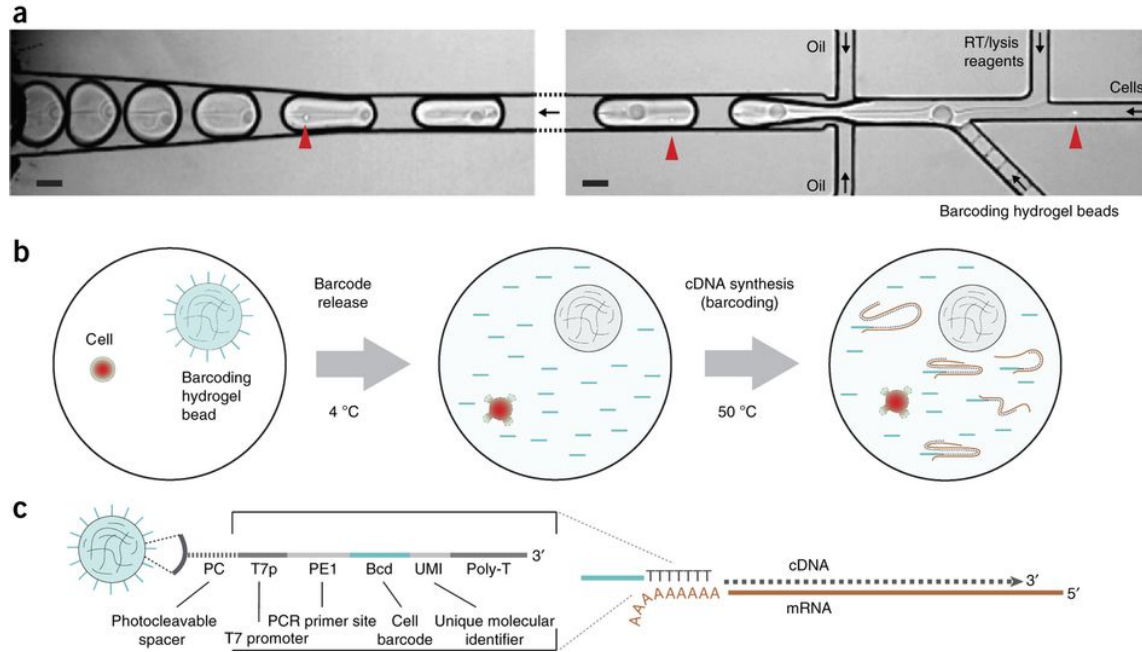
- Métodos de encapsulamento e compartimentalização
- Constituído de microcanais que comportam reagentes e as amostras
- Menor custo e maior quantidade de células analisadas



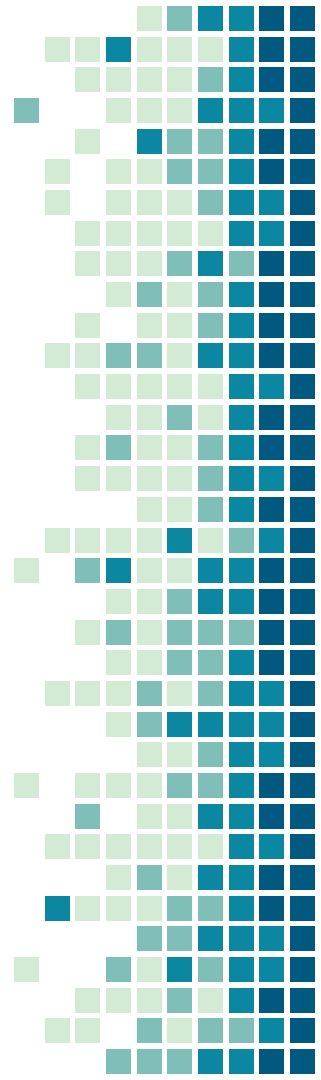
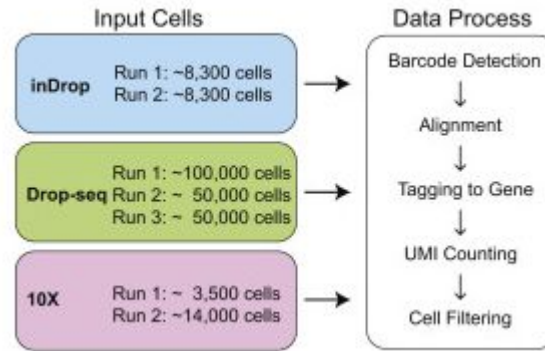
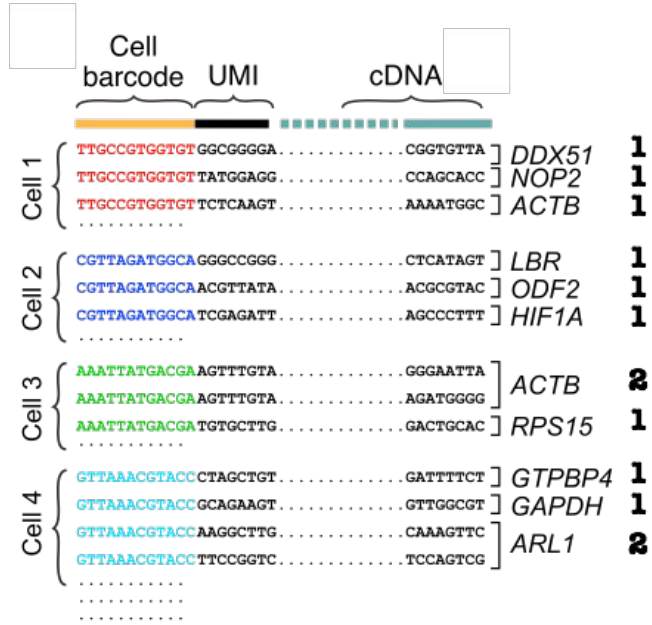
Single-cell: Isolamento e preparação da library



Single-cell: Isolamento e preparação da library



Single-cell: Isolamento e preparação da library



Single-cell: Sequenciamento



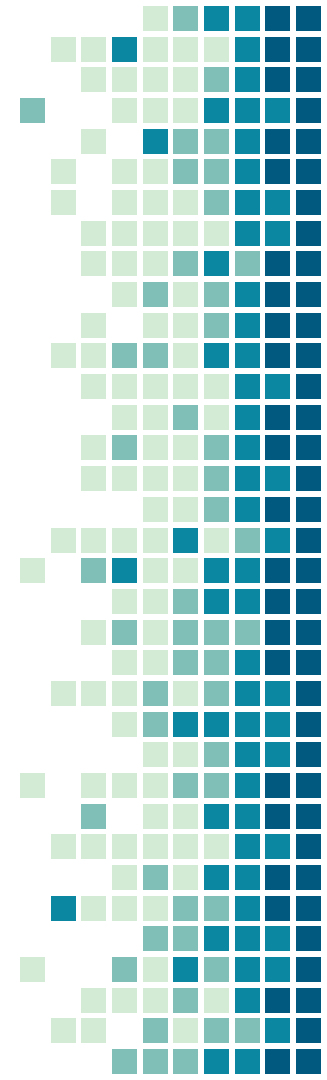
iSeq 100 System



NextSeq 550 System



NovaSeq 6000 System



Single-cell: Análise Computacional

1. Análise primária
2. Análise secundária
3. Análise terciária



Single-cell: Análise Computacional

1. Análise primária

- Conversão dos resultados do sequenciamento para o formato .fastq



Single-cell: Análise Computacional

2. Análise secundária

- Demultiplexing
- Alinhamento
- QC e subsetting
- Caracterização genética (expressão gênica, análise de variantes gênicas, etc) - Seurat/Scanpy



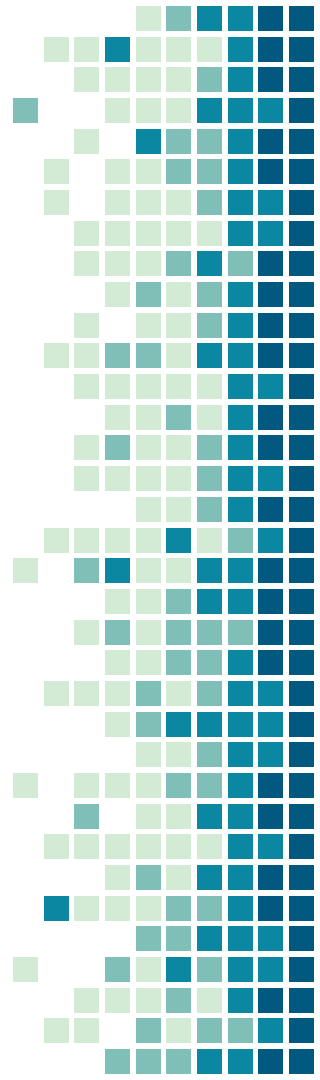
Single-cell: Análise Computacional

3. Análise terciária

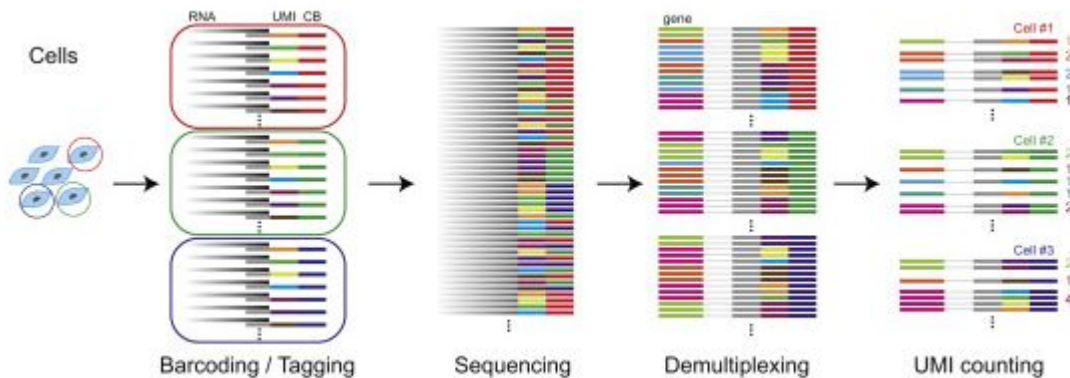
- Identificação dos grupos celulares
- Expressão diferencial
- Análises subsequentes (Regulons, Cell Communication, etc)



Single-cell: Análise Computacional



Single-cell: resumo

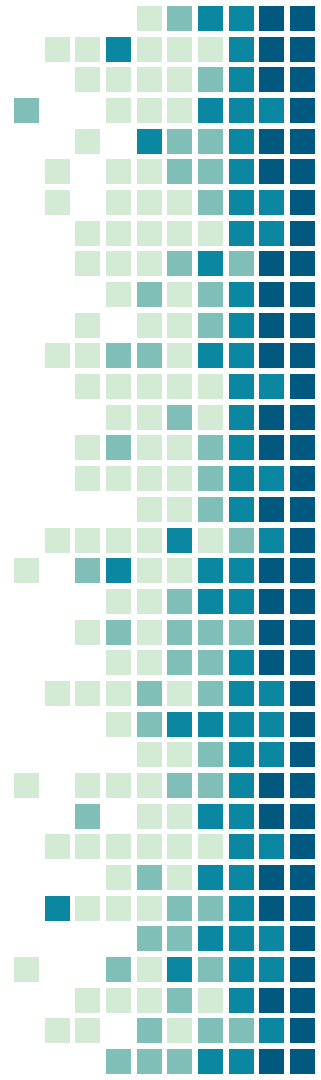
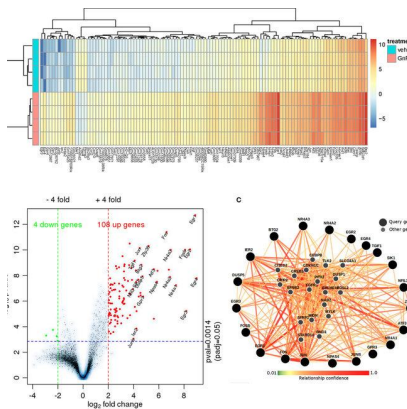


	cell_1	cell_2	cell_3
gene_1	8	12	27
gene_2	9	16	31
gene_3	13	6	33
gene_4	8	7	30
gene_5	13	7	37
gene_6	10	20	31
gene_7	9	9	31
gene_8	10	8	25
gene_9	10	7	24
gene_10	6	9	38

Análise



R e Python



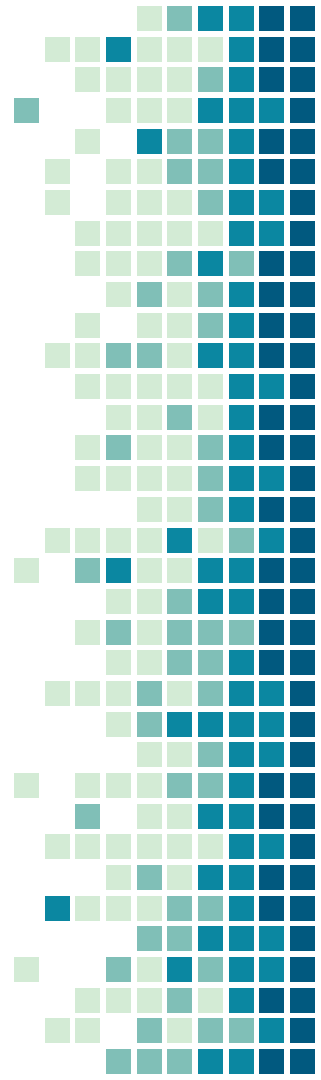
Single-cell: Análise com Seurat

- Pacote Seurat é um dos mais usados para análise de dados de single-cell
- Maioria dos algoritmos trabalham com a estrutura dos objetos Seurat
- Boa documentação
- Alternativas: Scanpy.



Single-cell: Análise com Seurat – Passos

1. Importar dados
2. Criar objeto
3. Subsetting
4. Normalização
5. Selecionar features
6. Clusterização
7. Expressão diferencial
8. Pseudotime



Single-cell: Análise com Seurat – Passos

- www.github.com/lukais-iohan/single_cell_minicourse



OBRIGADO!!!

