Universitat Oberta de Catalunya

Desarrollo de un pipeline Bioinformático:

Análisis basado en un panel de genes sobre cáncer de pulmón.

David Masip Galaso

Máster Universitario en Bioinformática y Bioestadística UOC - UB

Computación e Inteligencia artificial en problemas biológicos y clínicos

Consultora: Romina Astrid Rebrij

Contenido

- Objetivos
- Alcance y riesgos
- Fase analítica I y II
- Conclusiones

Objetivos

- Por qué cáncer de pulmón?
- Panel de genes específico
- Punto partida → Archivos en bruto “fastq”
- Plataforma utilizada → R y otros SW de visualización

Alcance y riesgos

- Uso de R como herramienta vehicular
- Librerías R y Bioconductor:
  - Lectura - ShortRead
  - Calidad - Fastq files Quality Check
  - Conversión - SAMtools
  - Alineamiento - Bowtie2
  - Anotaciones – Galaxy
  - Variaciones – Galaxy/UCSC Genome

- Fastq files + Index files
    - No FASTA – No SAM
  - Familiarización Bioconductor

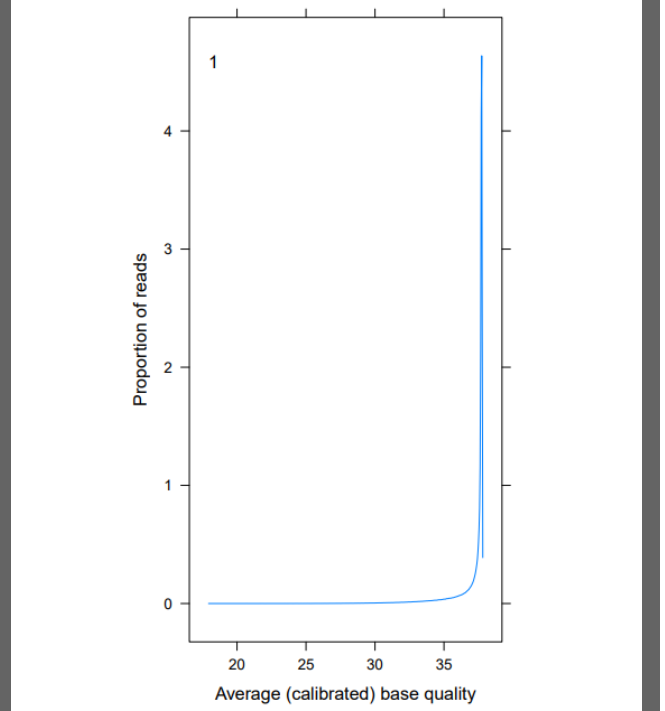
Fase analítica I

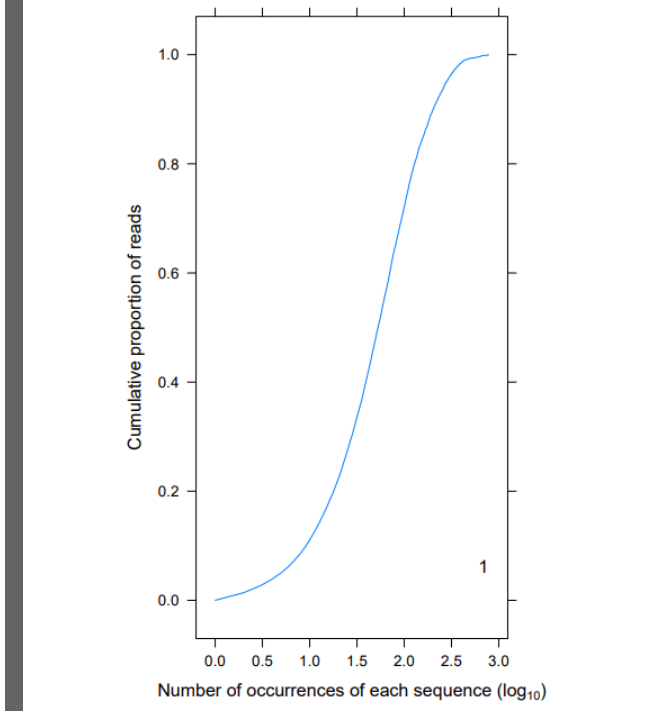
- Origen Datos:
  - MiSeq Illumina
  - Tipo datos: Extensión .fastq
  - Longitud: 76 pb + índice (8pb)
- Control Calidad previo Illumina:
  - “Filtrado de calidad” → Alta calidad lecturas

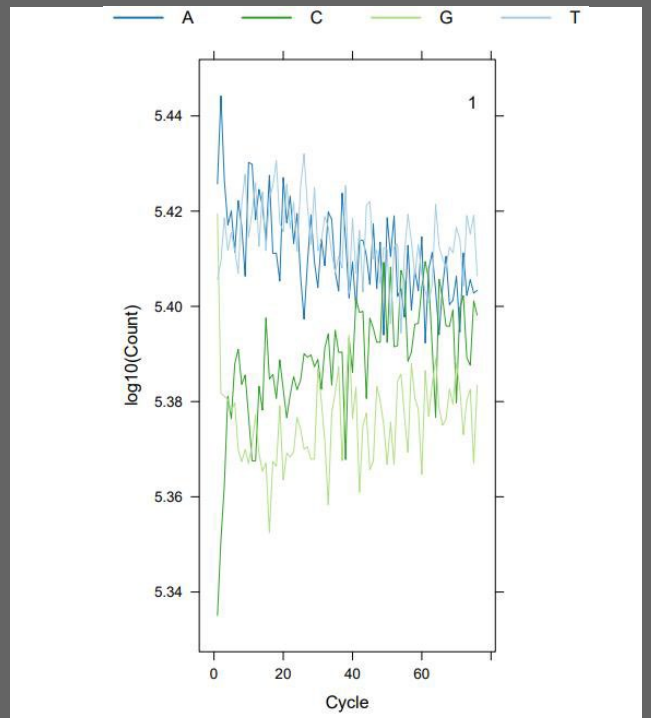
Measure	Value
Filename	15-0991_S1_L001_R1_001_fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	2228315
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	76
%GC	48

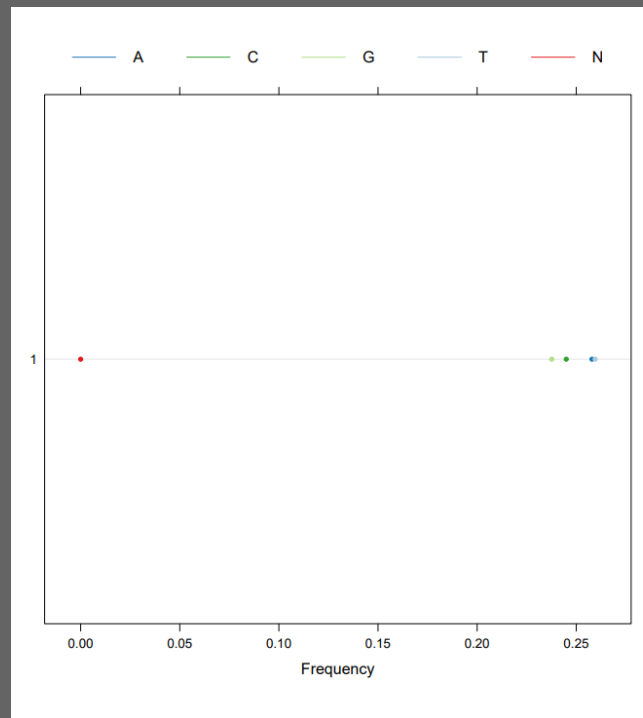
Lectura de datos

- Lectura de datos mediante Shortread
- Ejemplo:[1] 76
  CTTAAAACTGATTTTACATGGTACATGAA
  ACAAGGCAAATAACTGCGATTTTTTTCTT
  CCTTCTGCTCCTTCCCCT
- Análisis de calidad [1]
- Distribución lecturas [2]
- Frecuencia de llamadas por base [3]



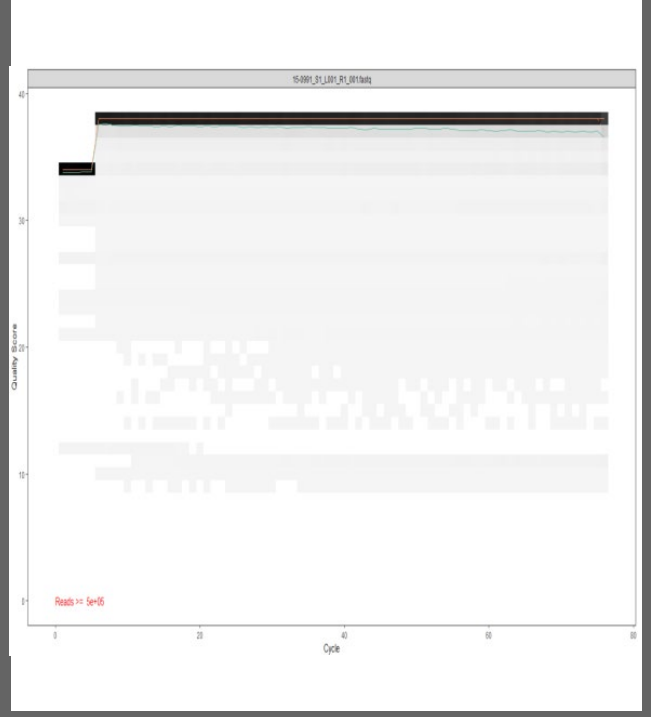


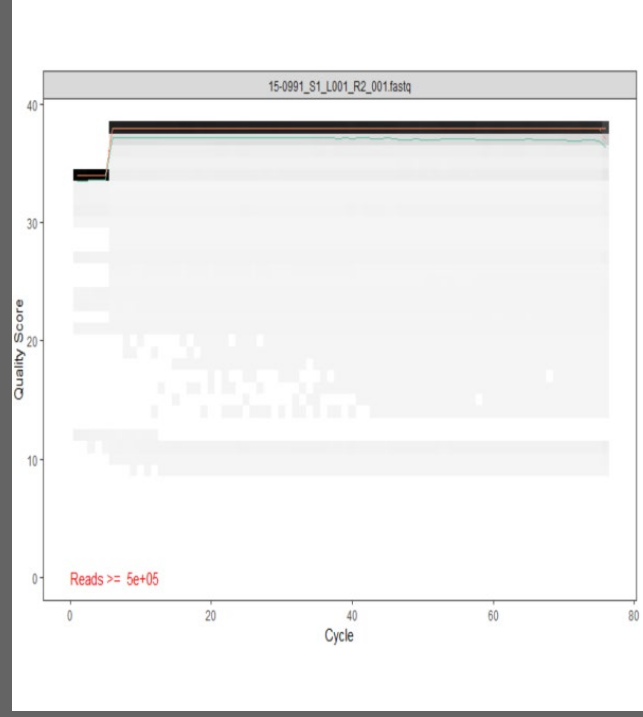


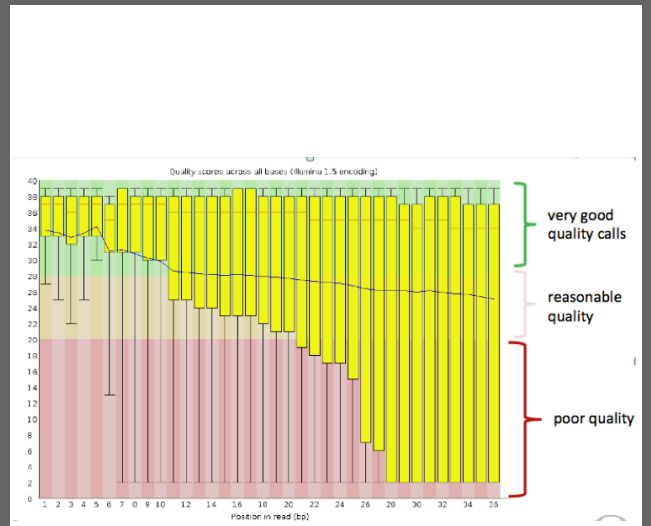


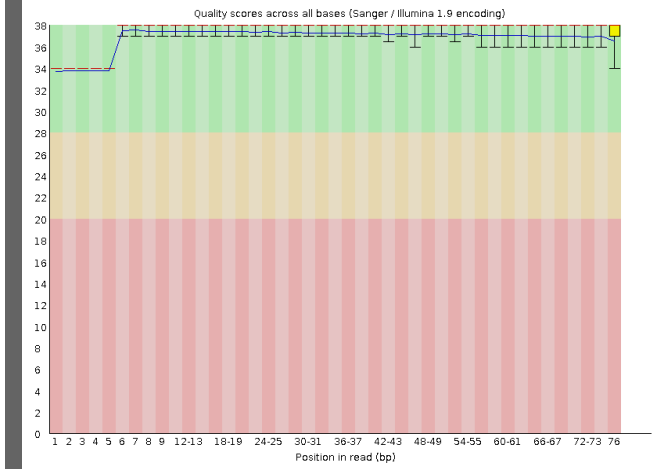
Control de calidad

- Contaminación y distribución
  - Anverso y Reverso [1][2]
- Gráfico de caja QC [3]
- Gráfico de caja Real [4]









Fase analítica II

- Transformación e inspección de BAM files
- Preparación de datos y observación de opciones:
  - BLAST/BLAT → Poderosos pero inadecuados
  - BWA/Bowtie2 → SW más usado para NGS
- Mapeo en un genoma de referencia
- Visualización de anotaciones y variants mediante navegador genómico (IGV)

Preparación de datos y Genoma de referencia

- Uso SAM/BAM files para alineamiento
  - Conversión con Galaxy → Rápido y eficaz
- BAM File
  - Sección encabezado
  - Sección de alineación (11 campos obl)
- Preparación Genoma de referencia
  - GRCh37.hg19
  - Alineamiento chr10

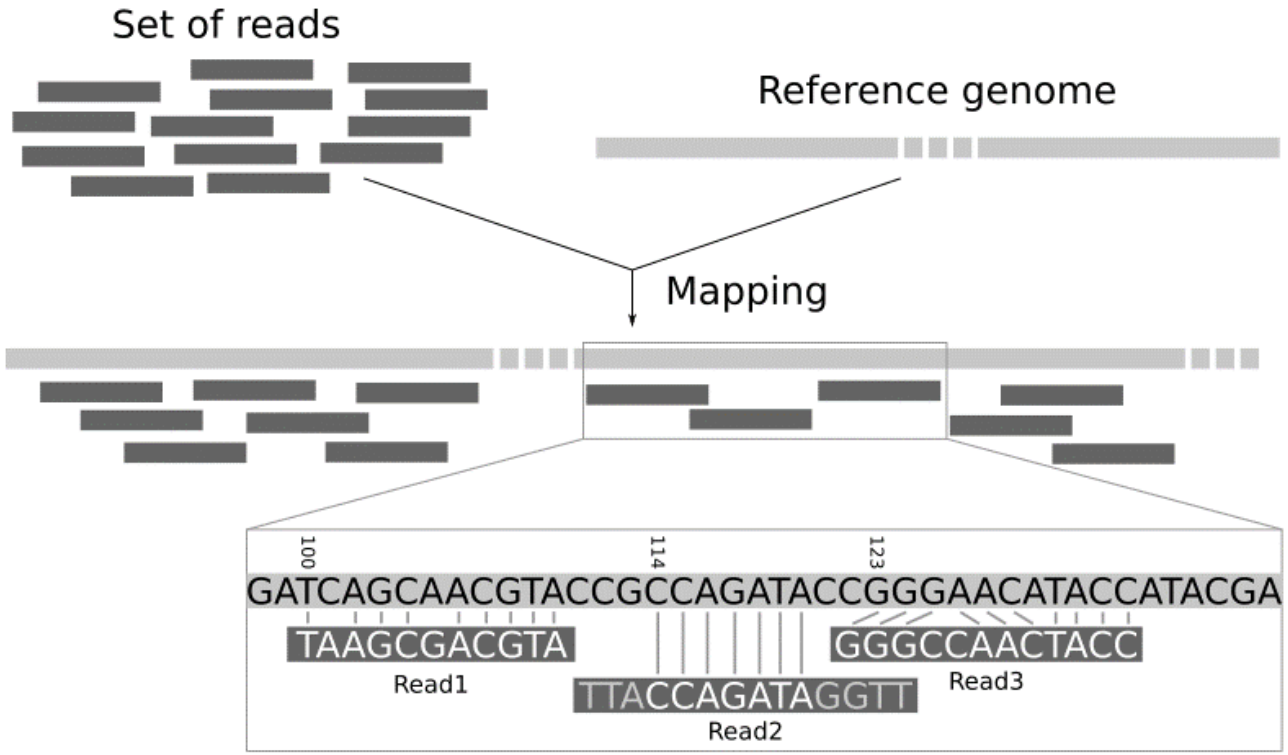
@SQ SN:chr10 LN:135534747

QNAME: M01621:321:000000000-BV2JC:1:2108:23966:23449
FLAG: 16
RNAME: chr10
POS: 1739232
MAPQ: 42
CIGAR: 76M
MRNM: *
MPOS: 0
ISIZE: 0
SEQ:
CTTCTTCTGATGTGGCCCAGGGAAGCCAAAAGATTGGACACCCCTGATCTAAAGGTTTTCATTTCTGTTTCTT
CTC
QUAL:
FGFGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGFGGGGGFGGGGGGGGGGGGGGGGFGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGGGGCCCCC

Col	Field	Type	Brief Description
1	QNAME	String	Query template NAME
2	FLAG	Integer	bitwise FLAG
3	RNAME	String	References sequence NAME
4	POS	Integer	1- based leftmost mapping POSition
5	MAPQ	Integer	MAPping Quality
6	CIGAR	String	CIGAR String
7	RNEXT	String	Ref. name of the mate/next read
8	PNEXT	Integer	Position of the mate/next read
9	TLEN	Integer	observed Template LENgth
10	SEQ	String	segment SEQuence
11	QUAL	String	ASCII of Phred-scaled base QUALity+33

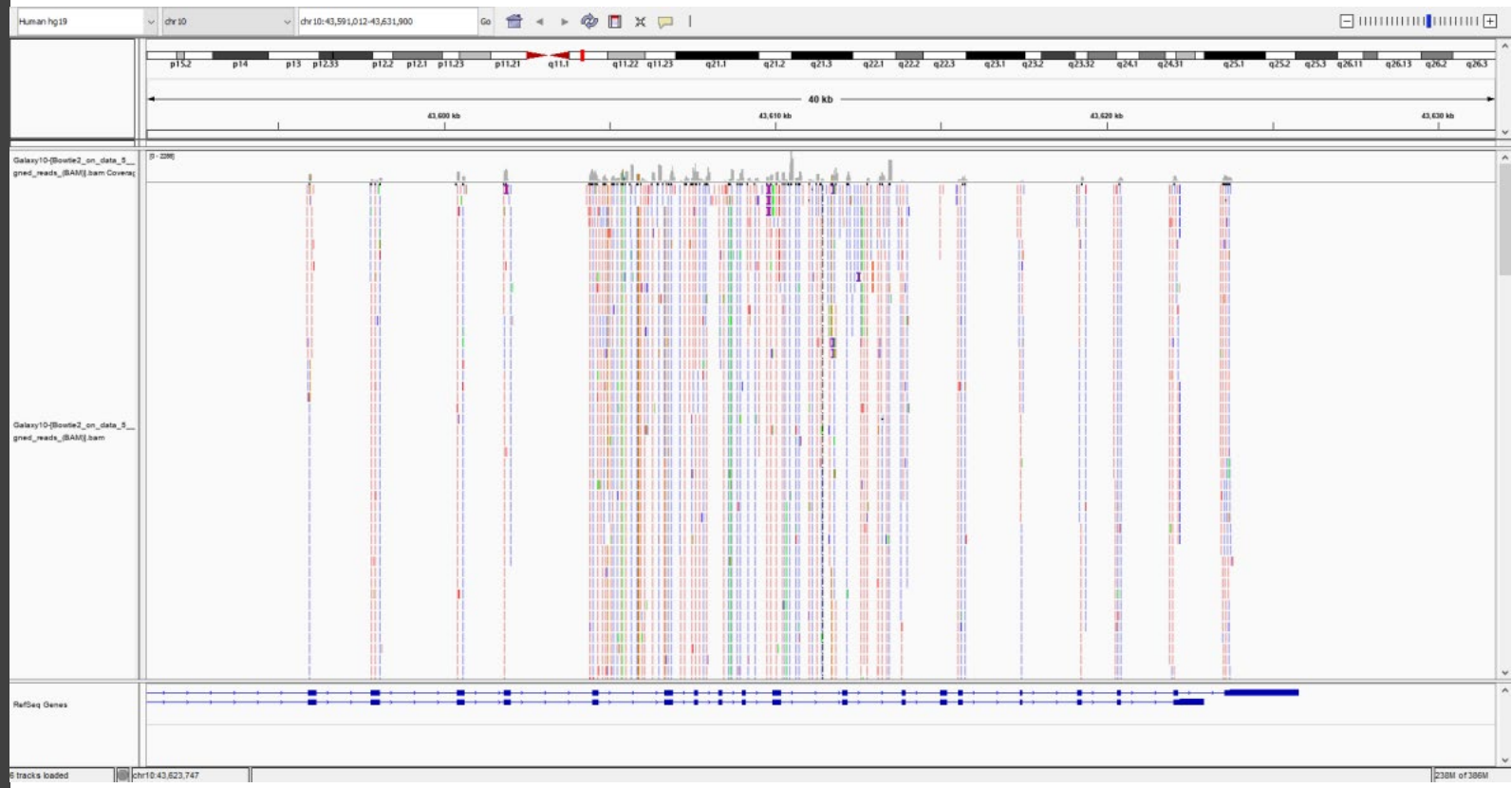
Mapa leído en Genoma de referencia

- Utilidades del mapping:
  - Alineación con genoma de referencia.
  - Alinea la lectura, permite ver desajustes, indeles y recortes de fragmentos cortos.
  - Verificación de estadísticas de mapeo.
- Reacción en cadena de polimerasa (PCR).
- Errores de secuenciación.
- Errores de asignación.



Anotaciones

- Uso de anotaciones con datos biológicos relevantes
- Ayuda a científicos:
  - Entendimiento
  - Estructura
  - Funcionamiento
- Parte principal:
  - Localización de genes y proteínas



Anotaciones

- Entrada/Muestra
  - Ensamble de alta calidad > 90%
  - SW utilizado dependerá:
    - Tipo de datos utilizados
    - Objetivo de anotación
    - Recursos disponibles

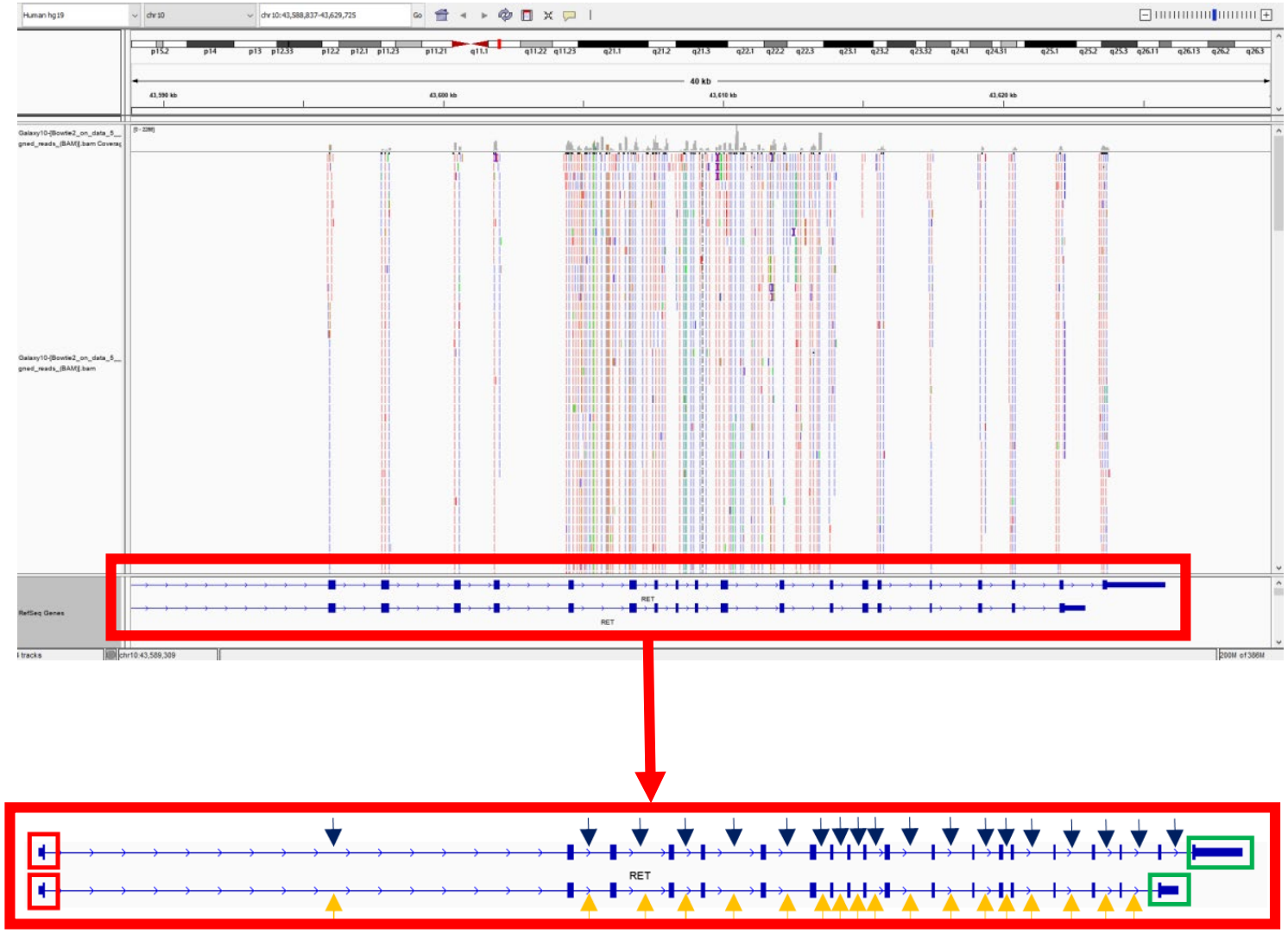
```
2228315 reads; of these:
  2228315 (100.00%) were unpaired; of these:
    4428 (0.20%) aligned 0 times
    2139611 (96.02%) aligned exactly 1 time
    84276 (3.78%) aligned >1 times
99.80% overall alignment rate
```

- Fuentes de error más frecuentes:
  - No filtrar las regiones en el genoma que no contienen genes.
  - Fallo al elegir los programas computacionales.
  - Los datos de referencia contienen errores.
  - Se utiliza un genoma de referencia con anotaciones erróneas.
  - Aplicaciones Predicción de genes Predicción de funciones de genes.

- Anotaciones → Aplicaciones en investigación:
  - Desarrollo de hipótesis
  - Análisis de genómica comparativa
  - Medio importante para anotación de otros genomas
- Alineación → Infinidad de posibilidades:
  - Lookseq, IGV, Jbrowse, Genome Workbench

Anotaciones

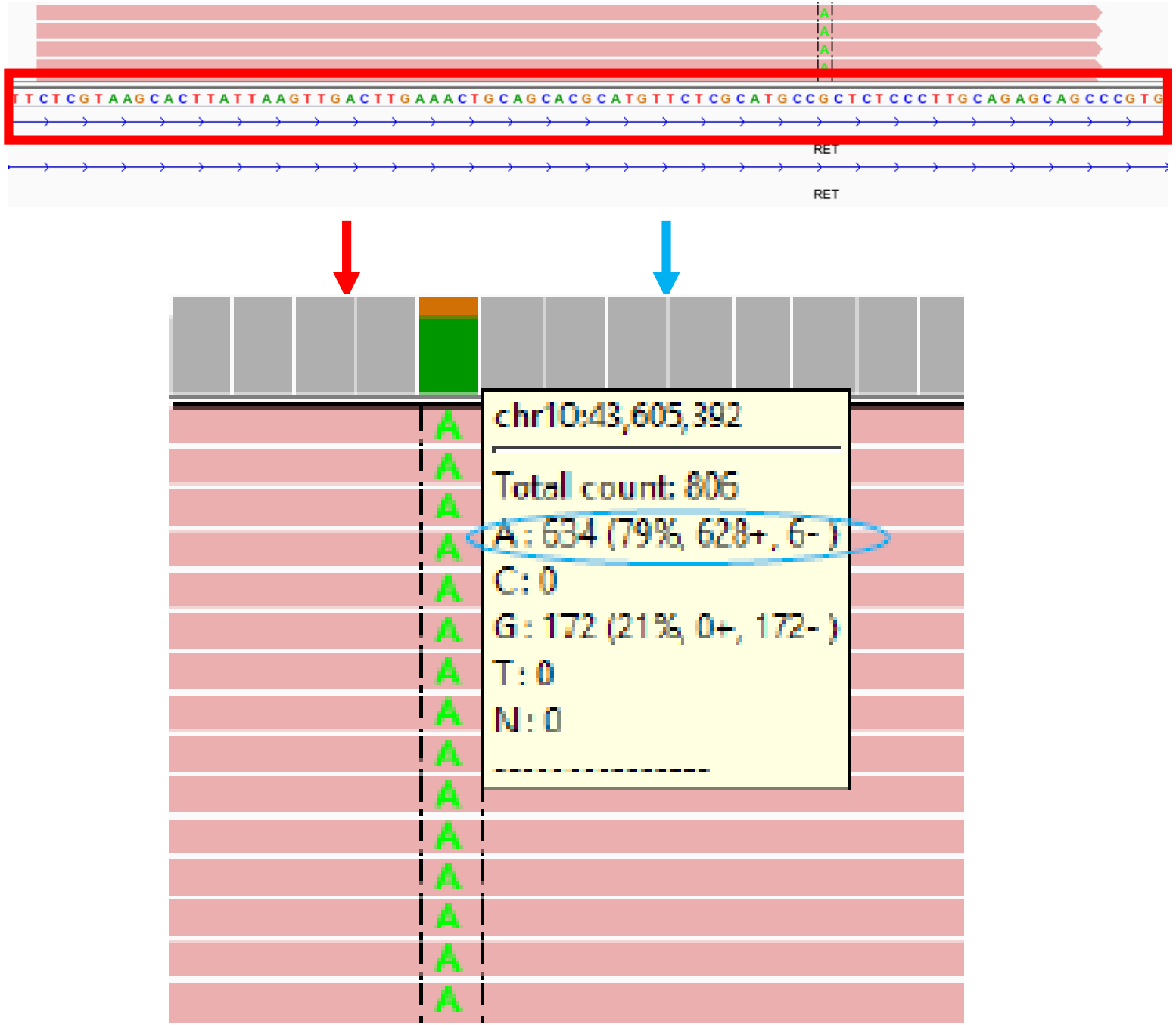
- Carga datos: BAM + BAI
- IGV: Parte superior muestra extensión cromosoma entera
- Encontrar foco secuencia: chr10 – posición
- Parte inferior – Referencia con Gen/Genes asociados: RET
  - 2 posibles variaciones
  - 5’ UTR en la parte izquierda (roja)
  - 3’ UTR en la parte derecha (verde)
  - Diferencia de exones e Intrones en 2 variaciones del Gen RET



Por defecto, el string está representado de 5’ a 3’, pero si se selecciona la señal, se gira hacia el reverso.

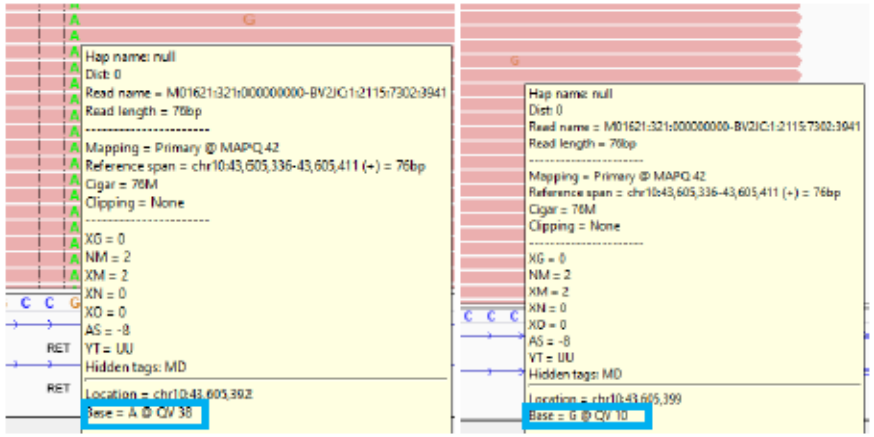
Anotaciones

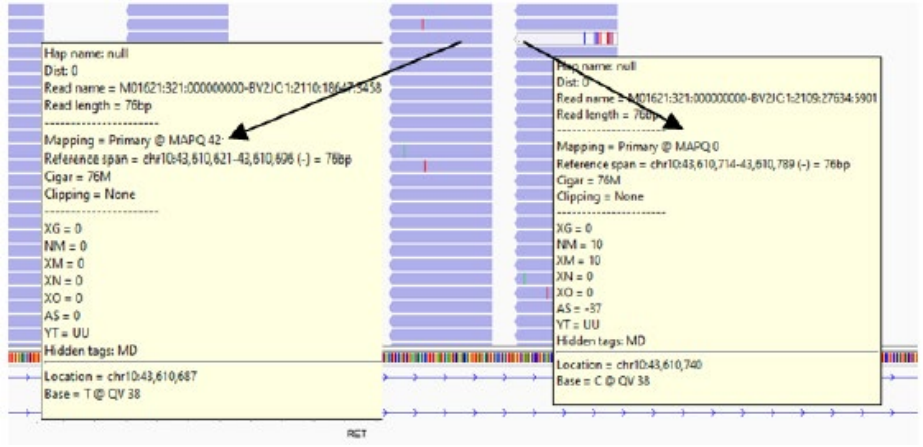
- Visualización → Zoom in
  - Genoma referencia vs lecturas
- Alineaciones referenciadas
  - Amplitud barra superior
- Eventos interesantes → Color
  - Caso particular → Calidades de mayor intensidad a menor
  - Heterocigoto SNP → Secuencia que afecta a una sola base o polimorfismo de nucleótido simple

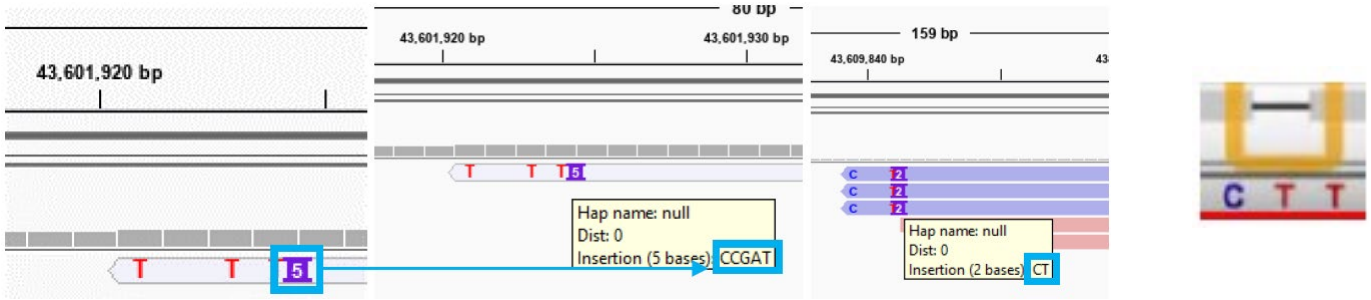


Anotaciones

- Intensidad de color → mayor intensidad → mayor calidad
- Misma lectura → Mapping distinta calidad. Ejemplo 42 vs 0
- Inserciones
- Delecciones

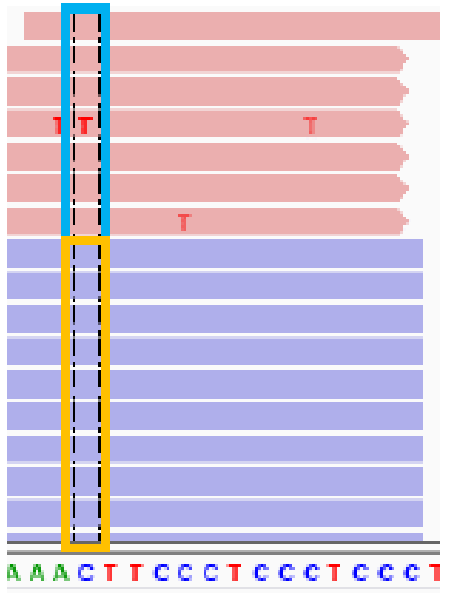






Anotaciones

- SNP potencial sin llamadas a umbral de representación y genoma de ref.
- Evitar falsos positivos → Color lecturas: Anverso y Reverso
- Ejemplo: No hay SNP en reverso pero si posible Heterocito SNP → True → Espera Timina en reverso. Al ser inexistente → FALSO POSITIVO
- SNP más destacados → Galaxy



1	2	3	4	5	6
chr10	1739232	c	1	^K,	E
chr10	1739233	t	1	,	G
chr10	1739234	t	1	,	F

dónde:

Column	Definition
1	Chromosome
2	Position (1-based)
3	Reference base at that position
4	Coverage (# reads aligning over that position)
5	Bases within reads where (see Galaxy wiki for more info)
6	Quality values (phred33 scale, see Galaxy wiki for more)

Variantes

- Eliminación variantes fuera regiones codificantes.
- Visualización lecturas para eliminar posibles errores se secuenciación.
- Detección SNP tras mapeo de lecturas frente genoma ref.
- Obtención archivo .vcf con variants y archive BAM/BAI con lecturas alineadas → Permite conocer núm lecturas respaldan cada SNP

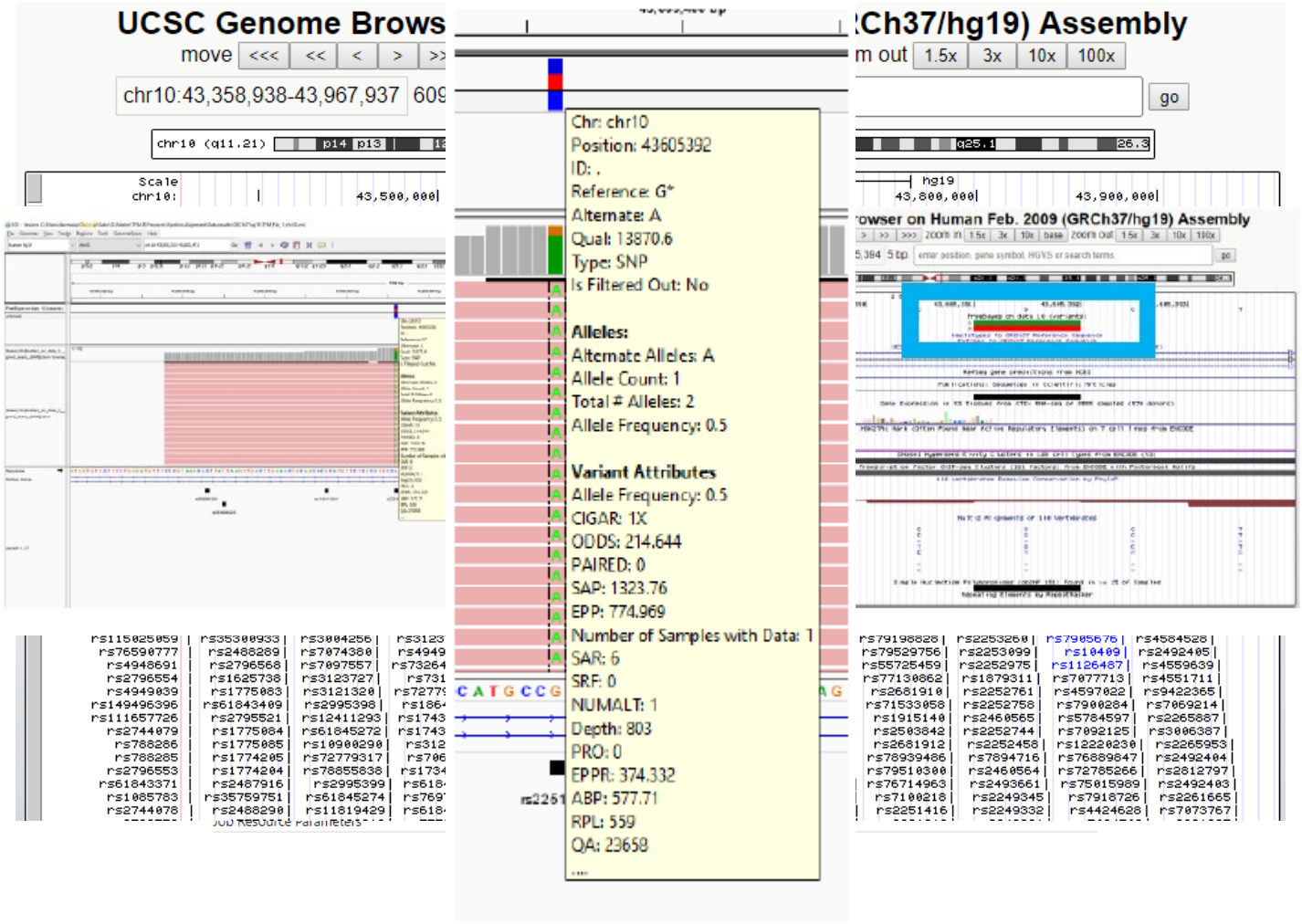
- Chr 10 → Longitud aprox 128mb → 1,3M. Se reduce para mostrar detalle

- Filtrar variantes que no se vayan a mostrar, debido a errores de secuenciación por ejemplo, fuera zona codificante, etc.

- Creación Pileup:
  - Filtrado 6 columnas
  - Sin reporte posiciones mayor cobertura 30
  - Reporte sólo variantes

Variantes

- FreeBayes → Evalúa probabilidad de cada genotipo posible para cada pos genoma ref.
- Exportación vcf para obtención variantes en zona analizada.
- Evaluación variantes:
  - SNP Rojos → cambios en los aminoácidos.
  - SNP Verde → variantes sinónimas.
  - SNP Azul → regiones traducidas o empalmadas.
  - SNP Negro → Regiones de intrones.



Variantes

- Filtrado y evaluación del impacto de variantes → Análisis localización SNP
- Según impacto funcional:
  - SNPs sinónimos: no causan alteración de la secuencia de proteína codificada por ese gen.
  - SNPs missense que sí alteran la secuencia de proteína.
  - SNPS que producen la ganancia de un codón STOP.
  - SNPs que producen la pérdida de un codón de inicio.
  - SNPs en una región de secuencias repetitivas.
  - SNPs o en una región no codificante.

- Las anotaciones por dbSNP:
  - RET (NM_020630): synonymous_variant S (TCC) --> S (TCG)
  - RET (NM_020975): synonymous_variant S (TCC) --> S (TCG)

  - RET (uc010qez.1) synonymous_variant S (TCC) → S (TCA) → STOP
  - RET (uc010qez.1) synonymous_variant S (TCC) → S (TCG) → Cysteina [15]
  - RET (uc001jal.3) synonymous_variant S (TCC) → S (TCA) → STOP
  - RET (uc001jal.3) synonymous_variant S (TCC) → S (TCG) → Cysteina[15]
  - RET (uc001jak.1) synonymous_variant S (TCC) → S (TCA) → STOP
  - RET (uc001jak.1) synonymous_variant S (TCC) → S (TCG) → Cysteina[15]

Validación y Efectos Biológicos

- Comparación variantes obtenidas con anotadas en bbdd dbSNP.
- BBDD dbSNP → archivo público gratuito.
  - Variación genética dentro y entre especies
- Caso Particular → Variaciones en intrones. Rs2251674
- Variante → Relación con cancer tiroides de origen folicular y polimorfismo en RET.
- Asociación haplotípica → Susceptibilidad sobre cancer tiroides

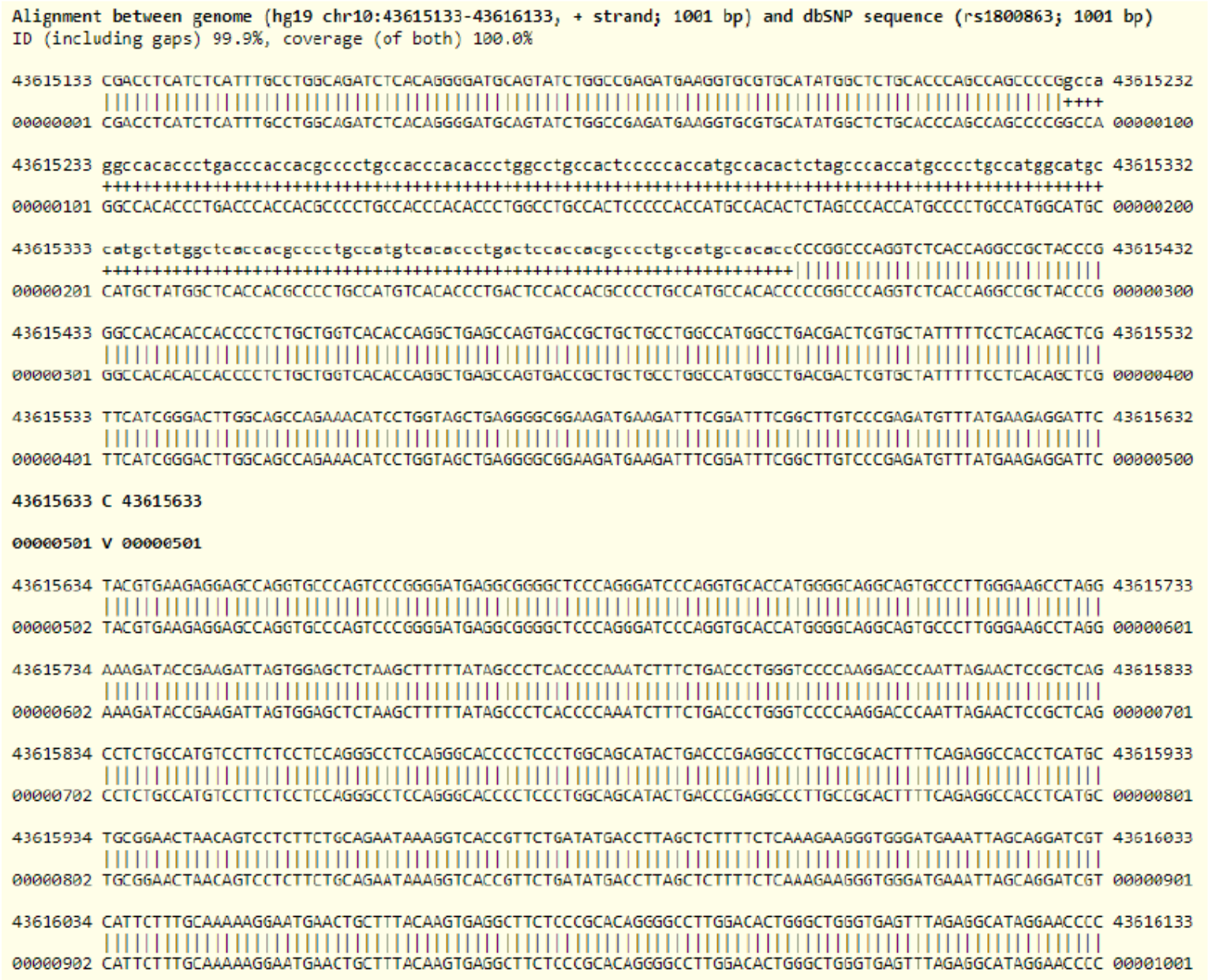


Figura 63. Alineación entre el genoma (hg19 chr10: 43604892-43605892, cadena +; 1001 pb) y la secuencia dbSNP (rs2251674; 1001 pb)

Conclusiones

1. Representación Pipeline a partir datos tipo Fastq.
2. Posibilidad de guía útil genérica para cualquier tipo de estudio
3. Representación Gráfica gracias a SW: R, IGV, Genome Browser