

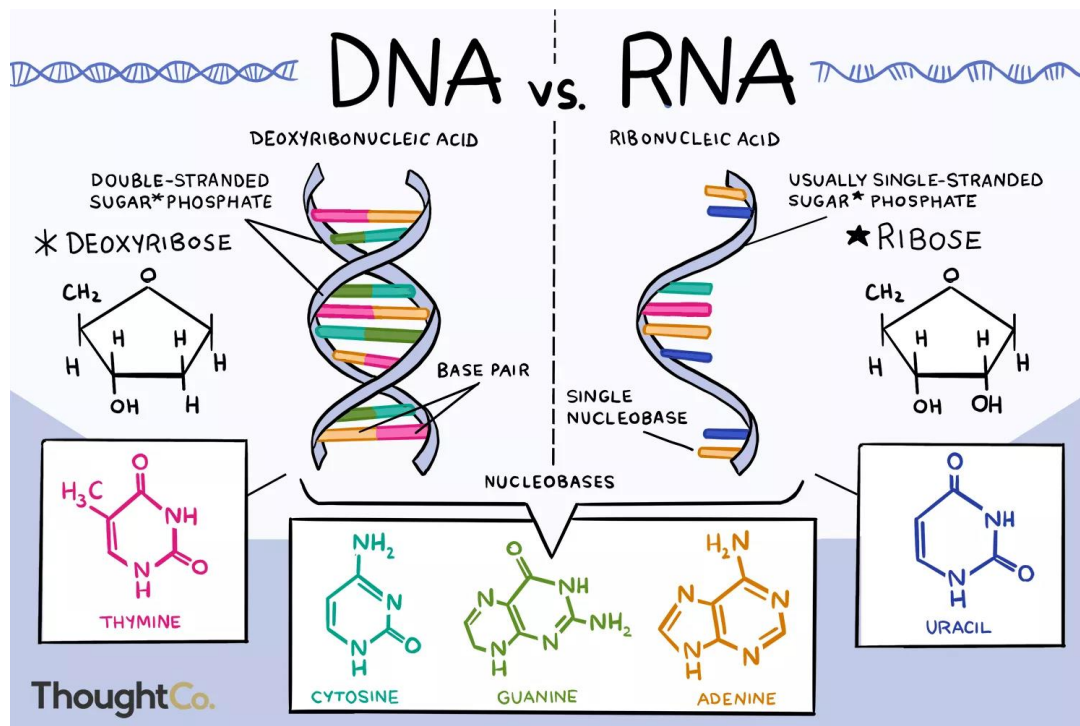
СЕКВЕНЦИРОВАНИЕ ОТ N ДО Y

Анастасия Жарикова
azharikova89@gmail.com
ФББ МГУ - 13 марта 2024



СЕКВЕНИРОВАНИЕ

- Установление последовательности нуклеиновых кислот (с белками тоже можно, но иначе)





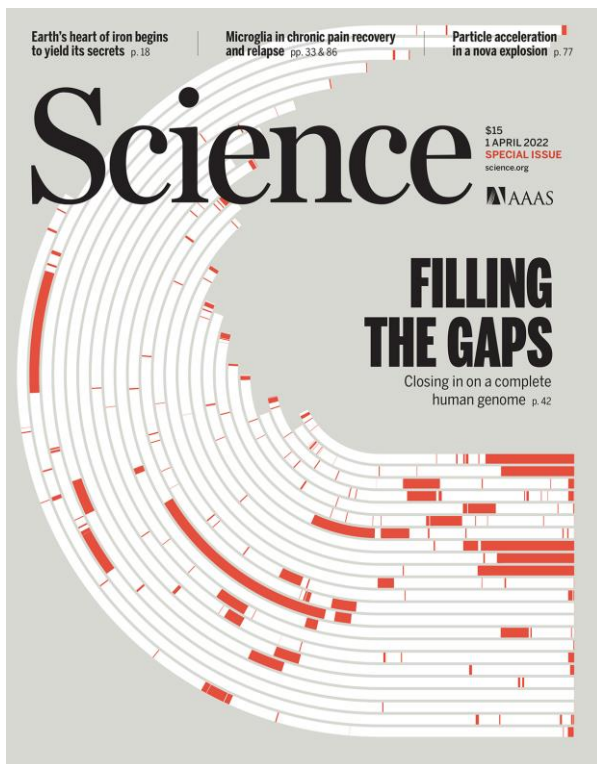
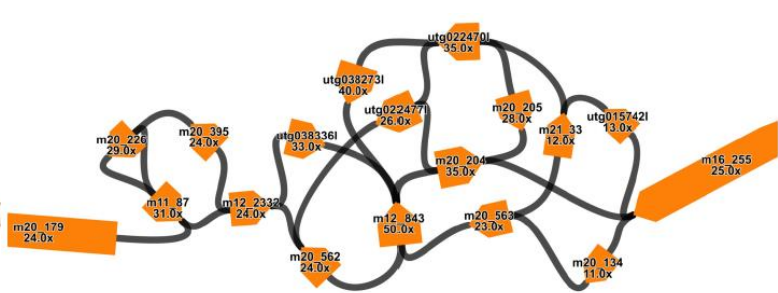
ЧТО КОНКРЕТНО

- ДНК: секвенировать весь геном

Откуда взять геном?

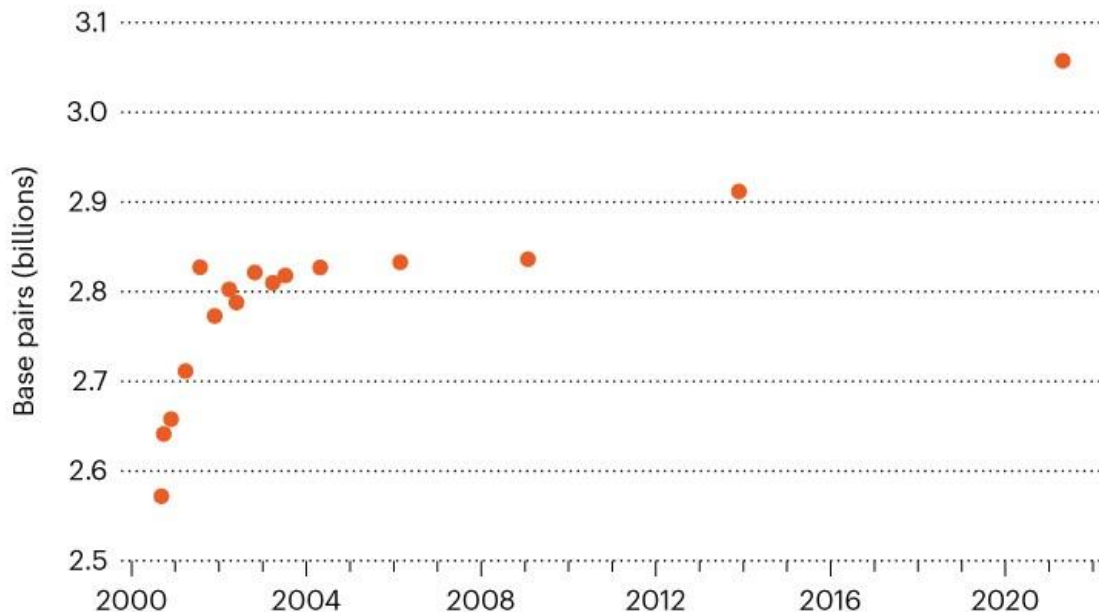
Нужно выделить ДНК

T2T



COMPLETING THE HUMAN GENOME

Researchers have been filling in incompletely sequenced parts of the human reference genome for 20 years, and have now almost finished it, with 3.05 billion DNA base pairs.



0.3% of sequence might still have errors. Includes X but not Y chromosome. Count excludes mitochondrial DNA.

©nature

<https://www.science.org/toc/science/376/6588>

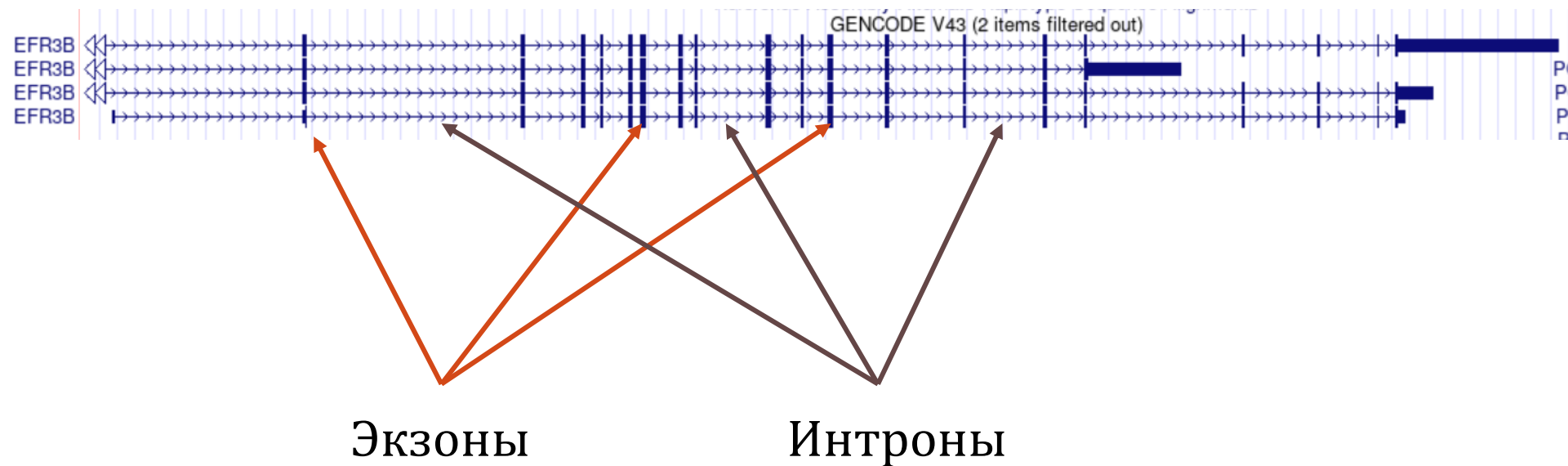


А ЕСЛИ НЕ ВЕСЬ ГЕНОМ?

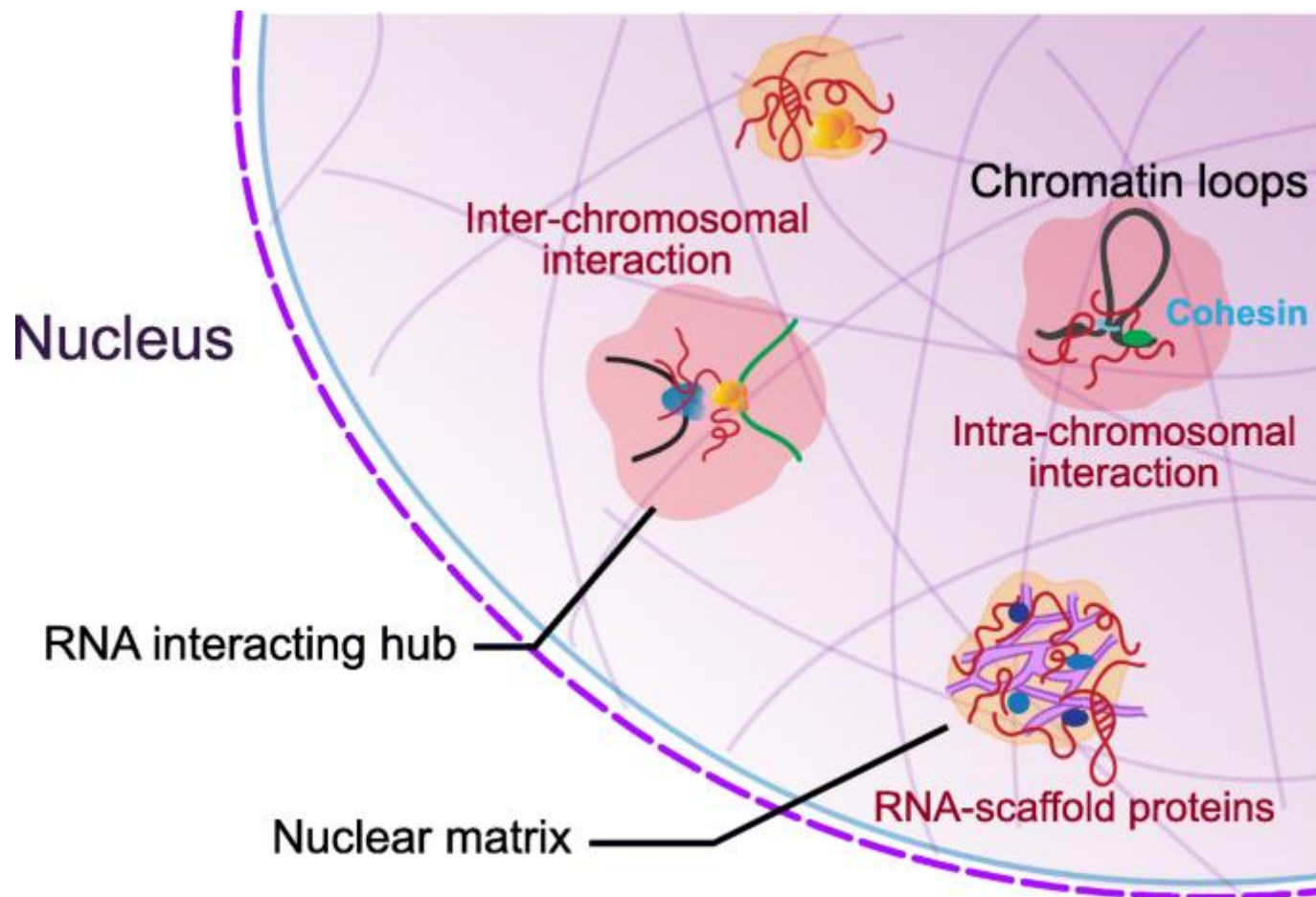
- Какие фрагменты ДНК есть смысл секвенировать?

ЭКЗОМ

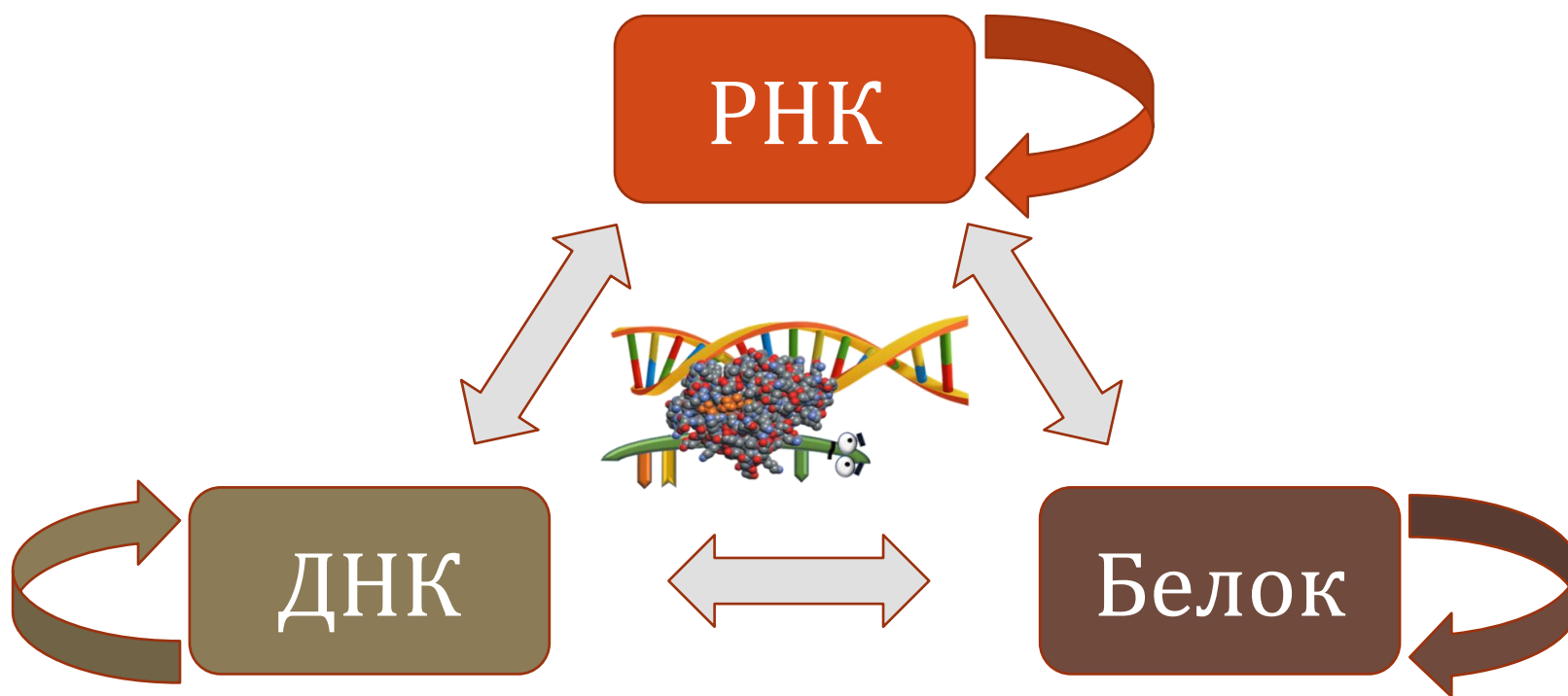
- Экзоны белок-кодирующих генов
- ~1-2% от всего генома



МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

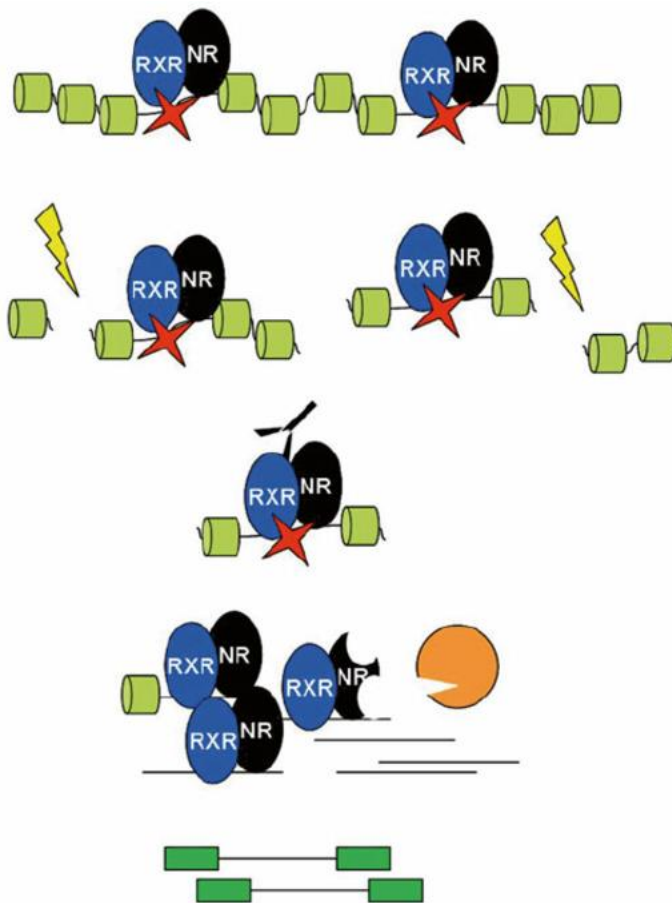


МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ



CHIP-SEQ

- ДНК-белок



1. Chromatin crosslinking



2. Chromatin shearing



3. Immunoprecipitation



4. De-crosslinking

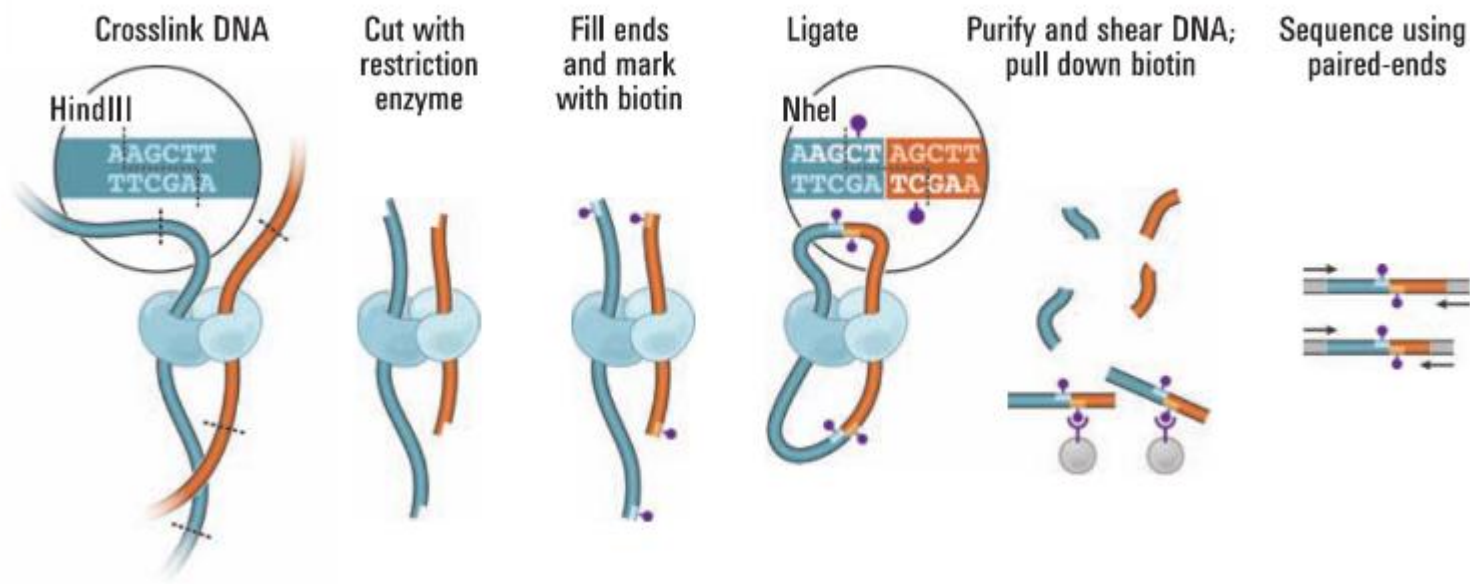


5. Library preparation



HI-C

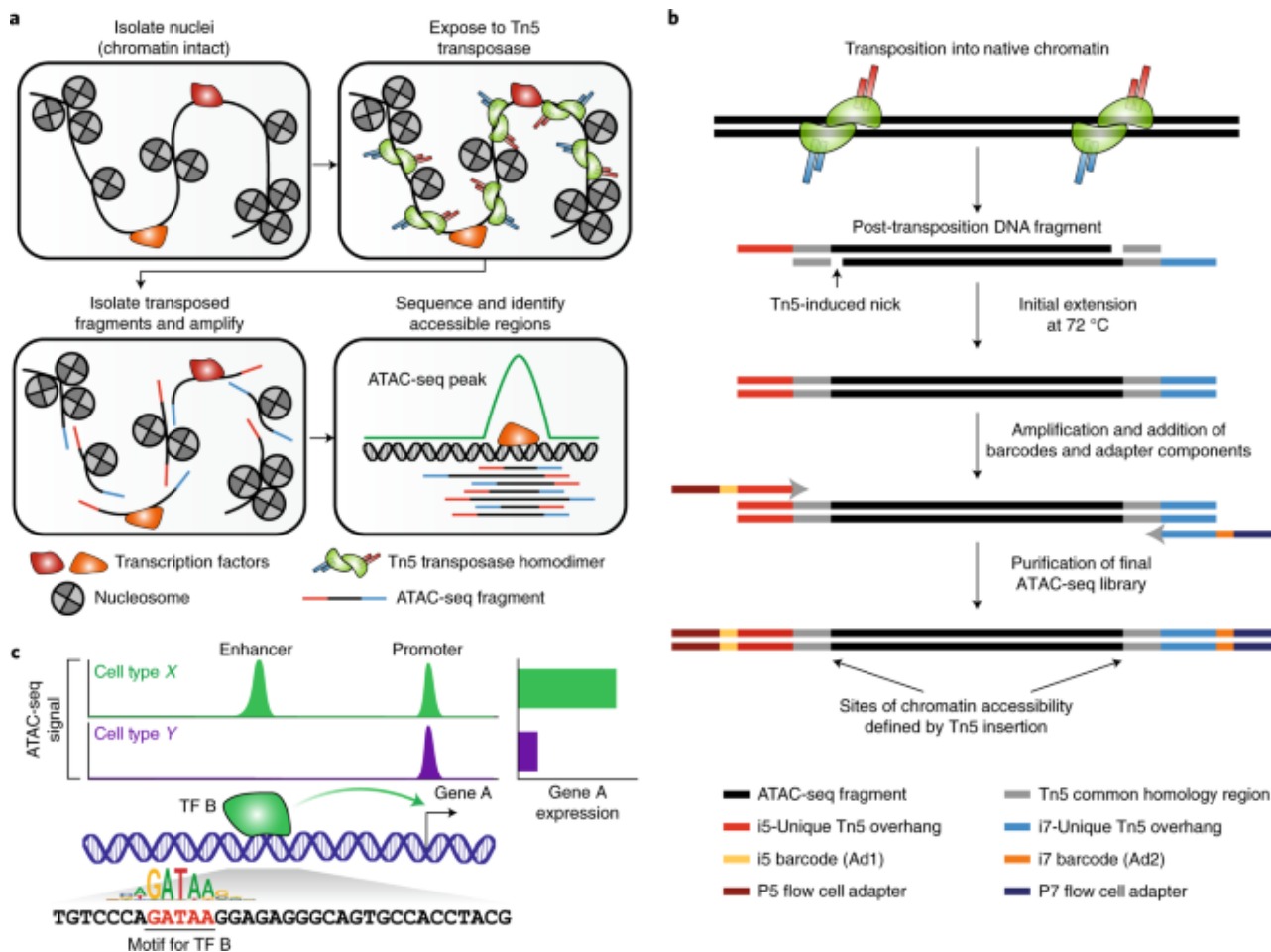
- ДНК-ДНК



Lieberman-aiden et al., 2009

ATAC-SEQ

▪ Доступность хроматина





RNA-SEQ

- Секвенирование РНК
- Illumina умеет секвенировать только ДНК
- Что делать?

RNA-SEQ

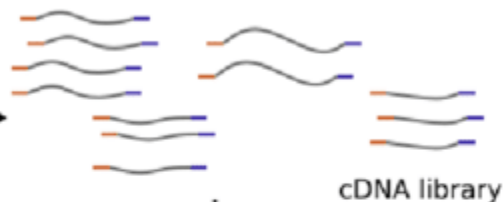
Sample of interest



Extract total RNA
and enrich targets



Fragment, reverse transcribe,
ligate adapters, amplify

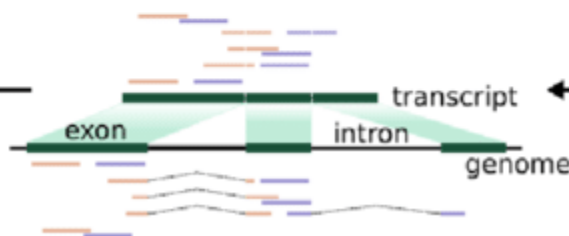


cDNA library

Data analysis

- differential expression
- variant calling
- annotation
- novel transcript discovery
- RNA editing
- ...

Transcriptome/genome
mapping



Sequencing



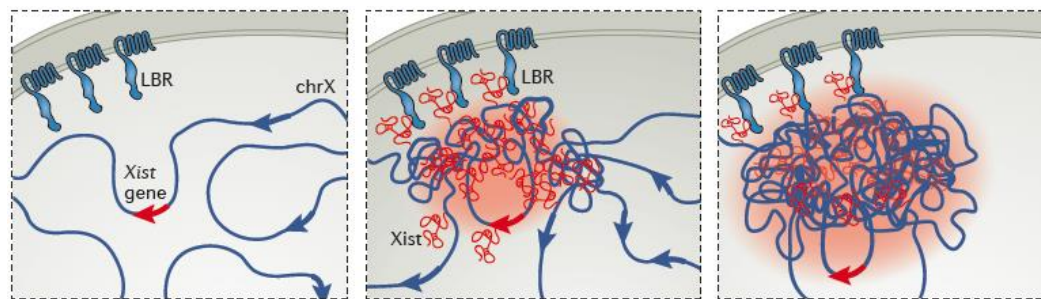


ТИПЫ РНК В КЛЕТКЕ

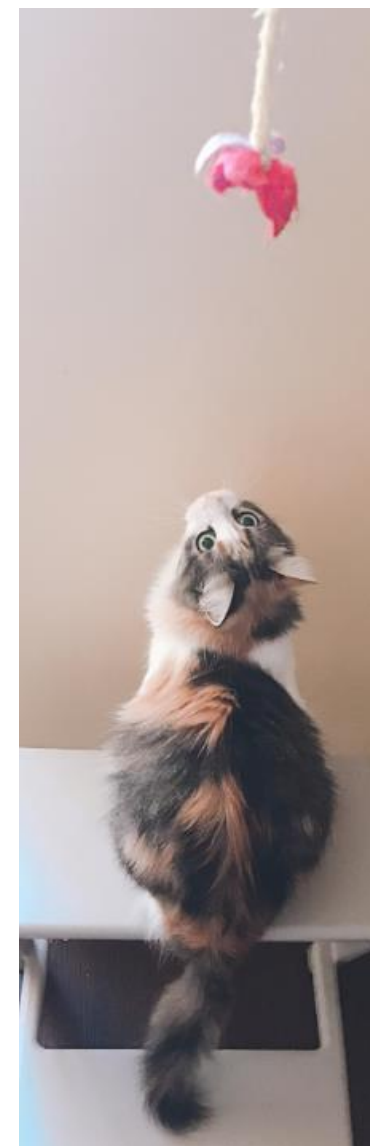
- Тотальная
- полиА
- Без фракции рРНК
- По размеру:
 - Малые (snRNA, microRNA, ...)
- По внутриклеточной локализации:
 - Ядерные
 - Цитоплазматические

ЗАЧЕМ УБИРАТЬ МРНК?

XIST – инактивация X хромосомы у самок млекопитающих



Engreitz et al., 2016



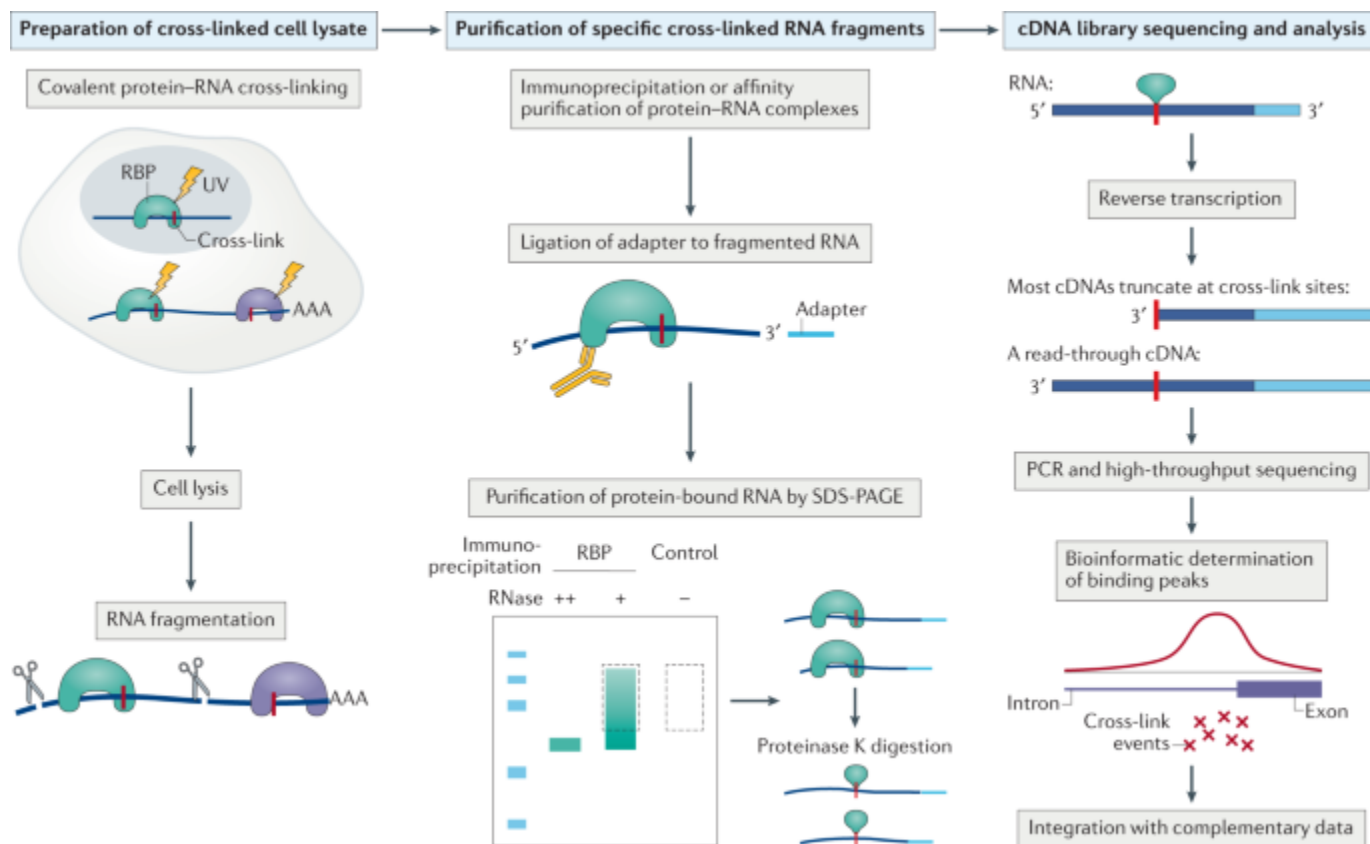


ПРОЦЕСС

- Подготовка нужной фракции РНК
- Проверка качества РНК
- Обратная транскрипция => кДНК
- Фрагментация (~200-300 нукл)
- Секвенирование
- Реплики

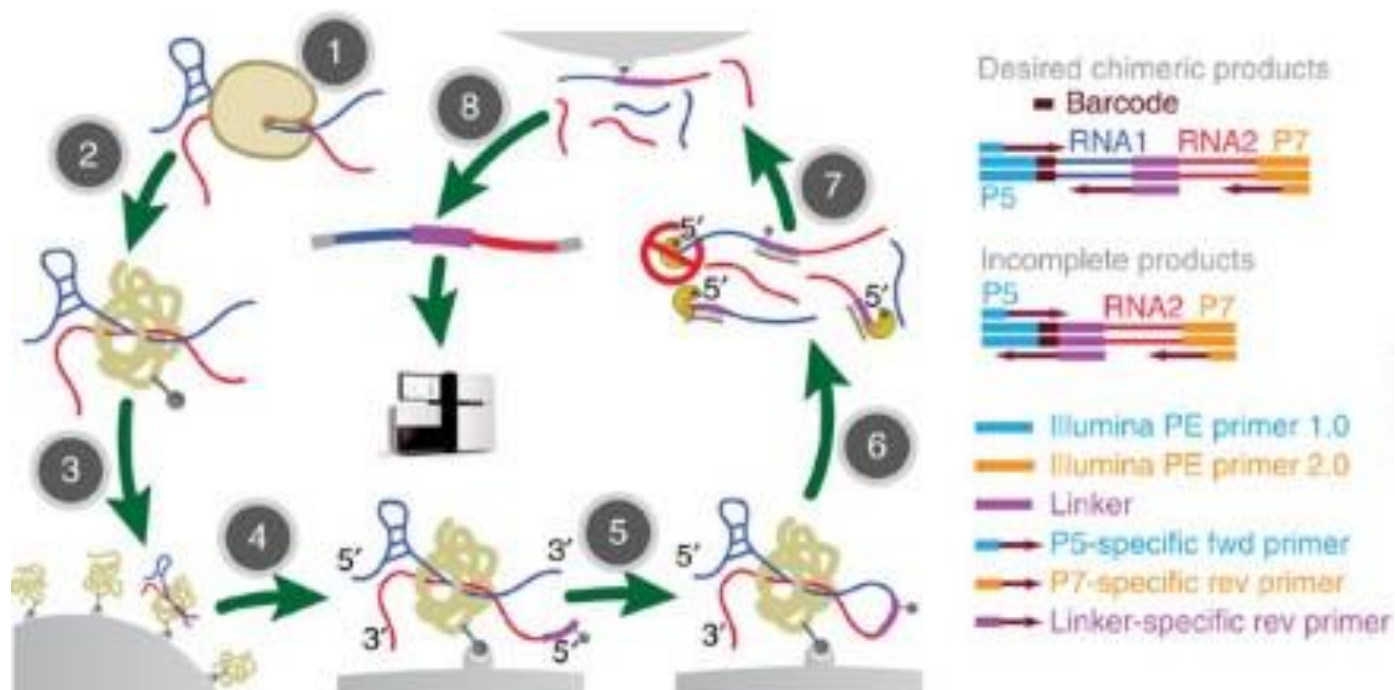
ECLIP

■ РНК-белок



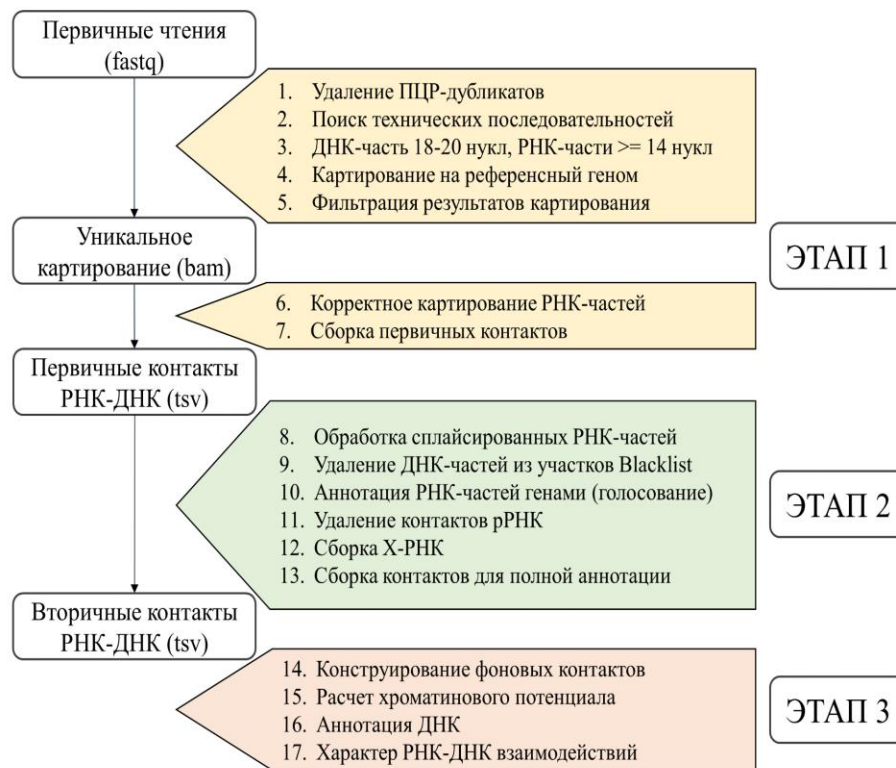
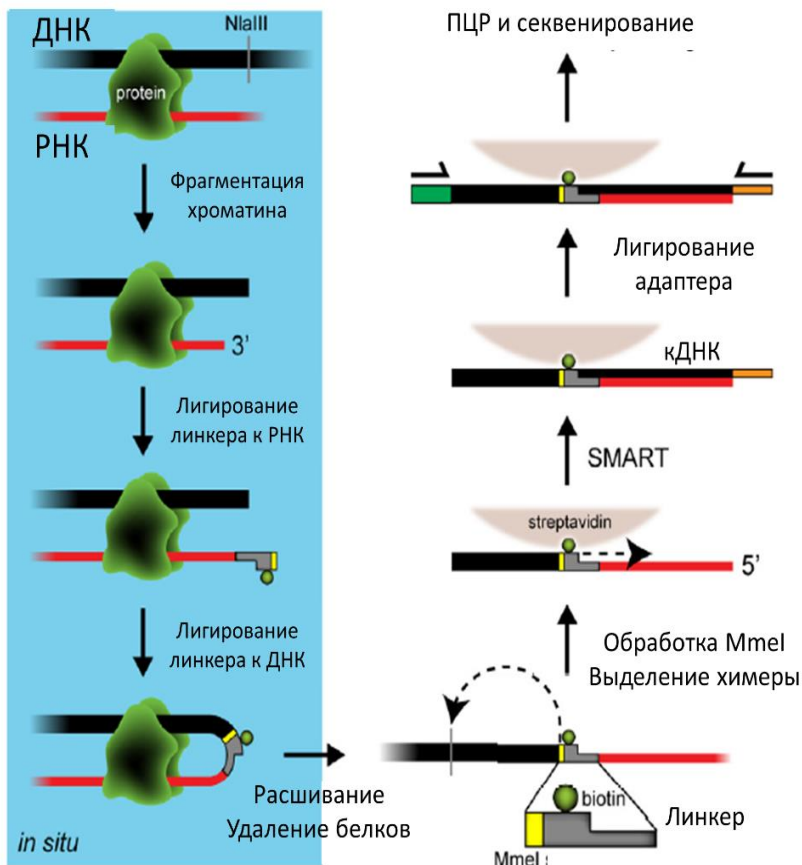
MARIO

- PHK-PHK



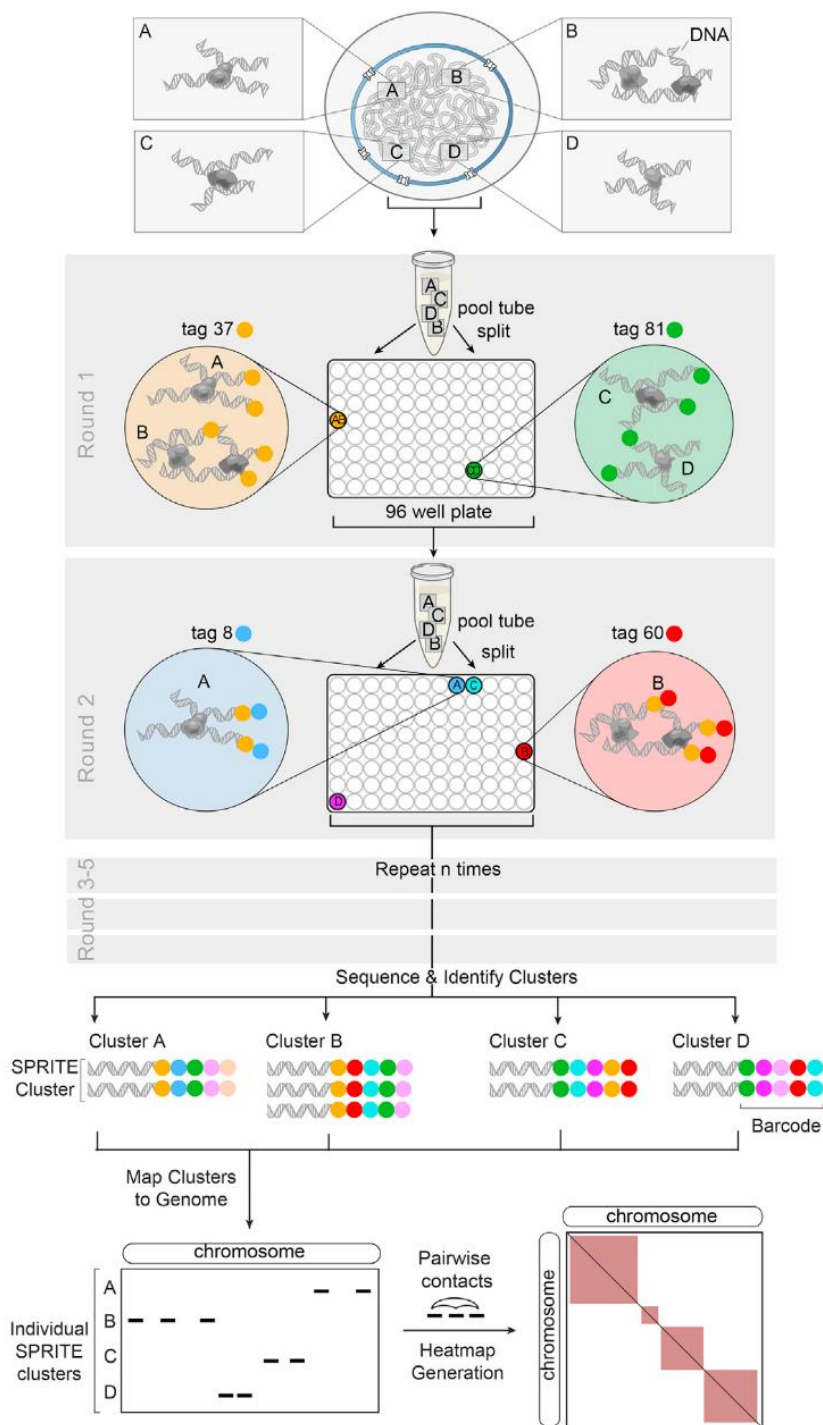
RED-C

■ РНК-ДНК

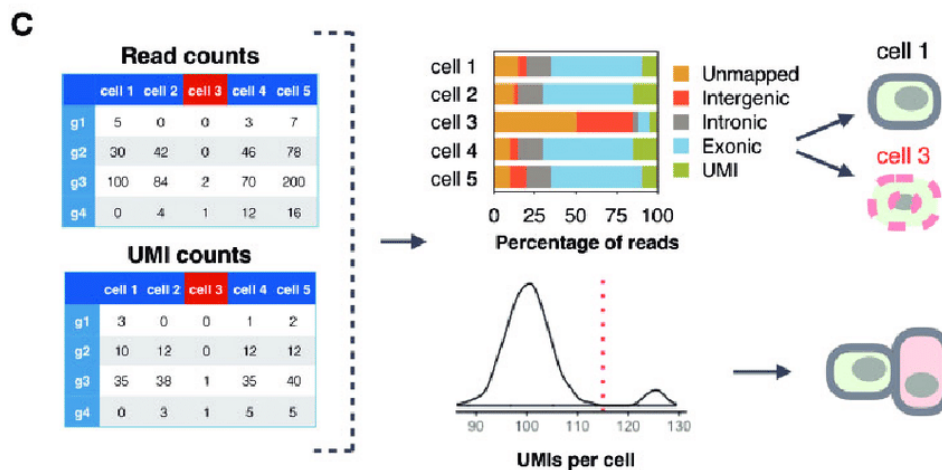
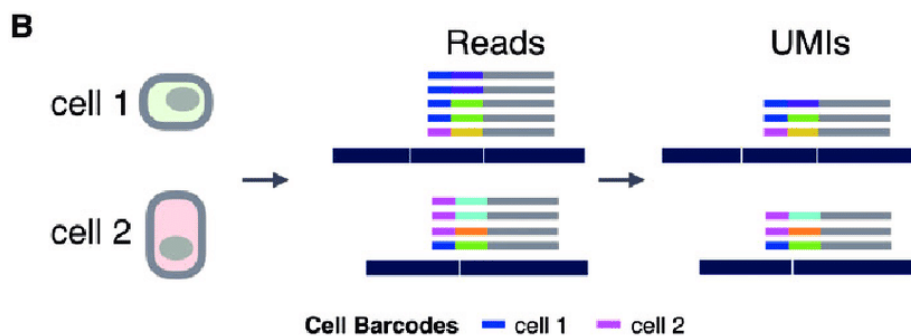
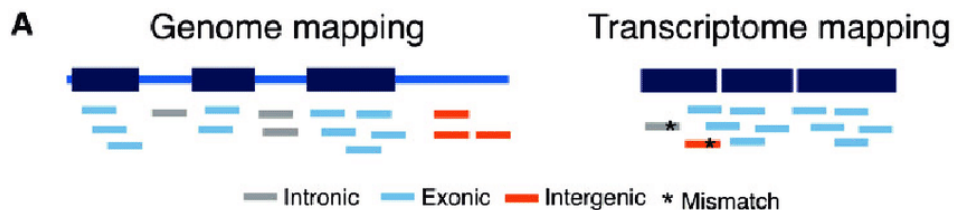


RD-SPRITE

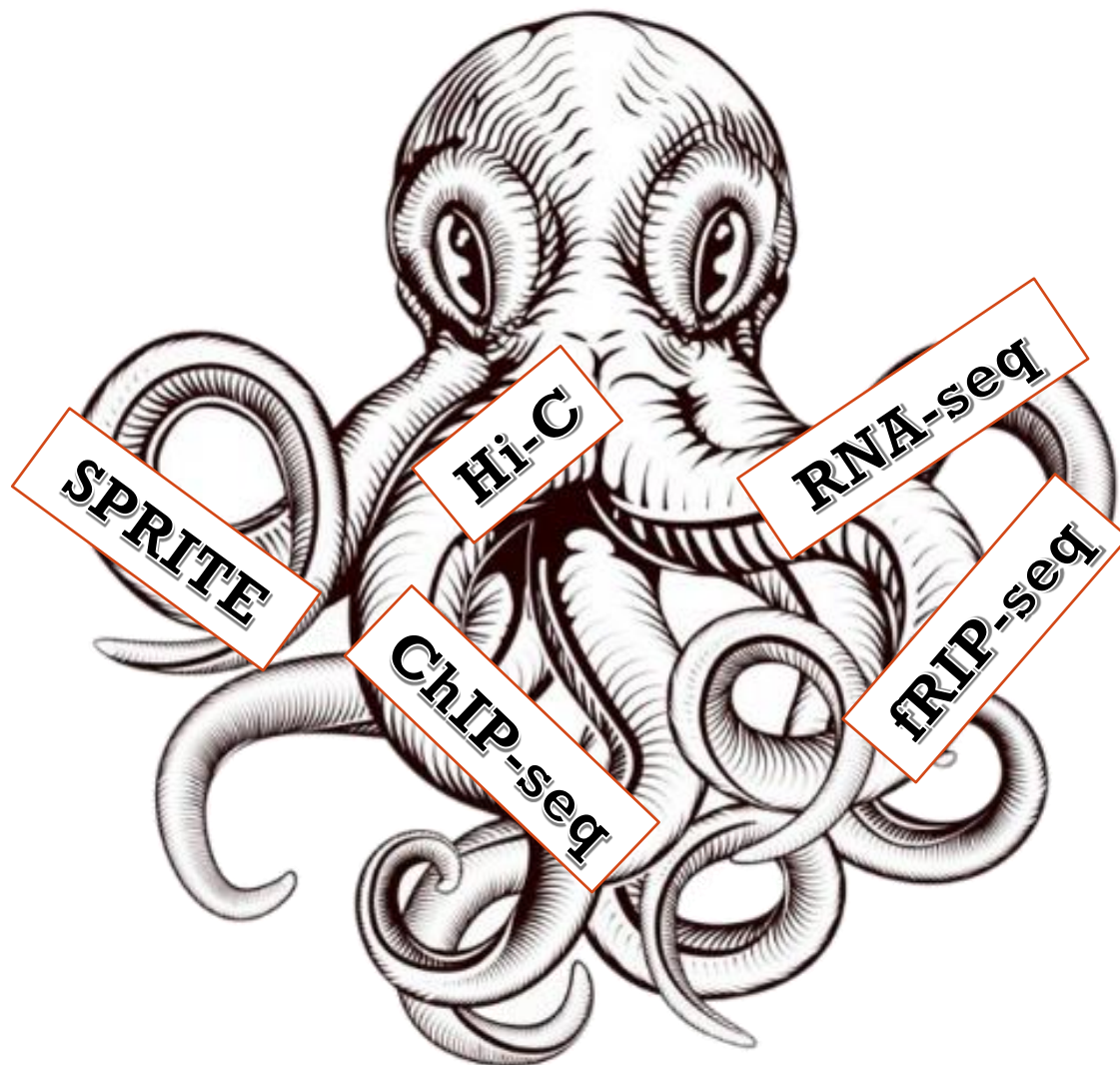
- интегратомика



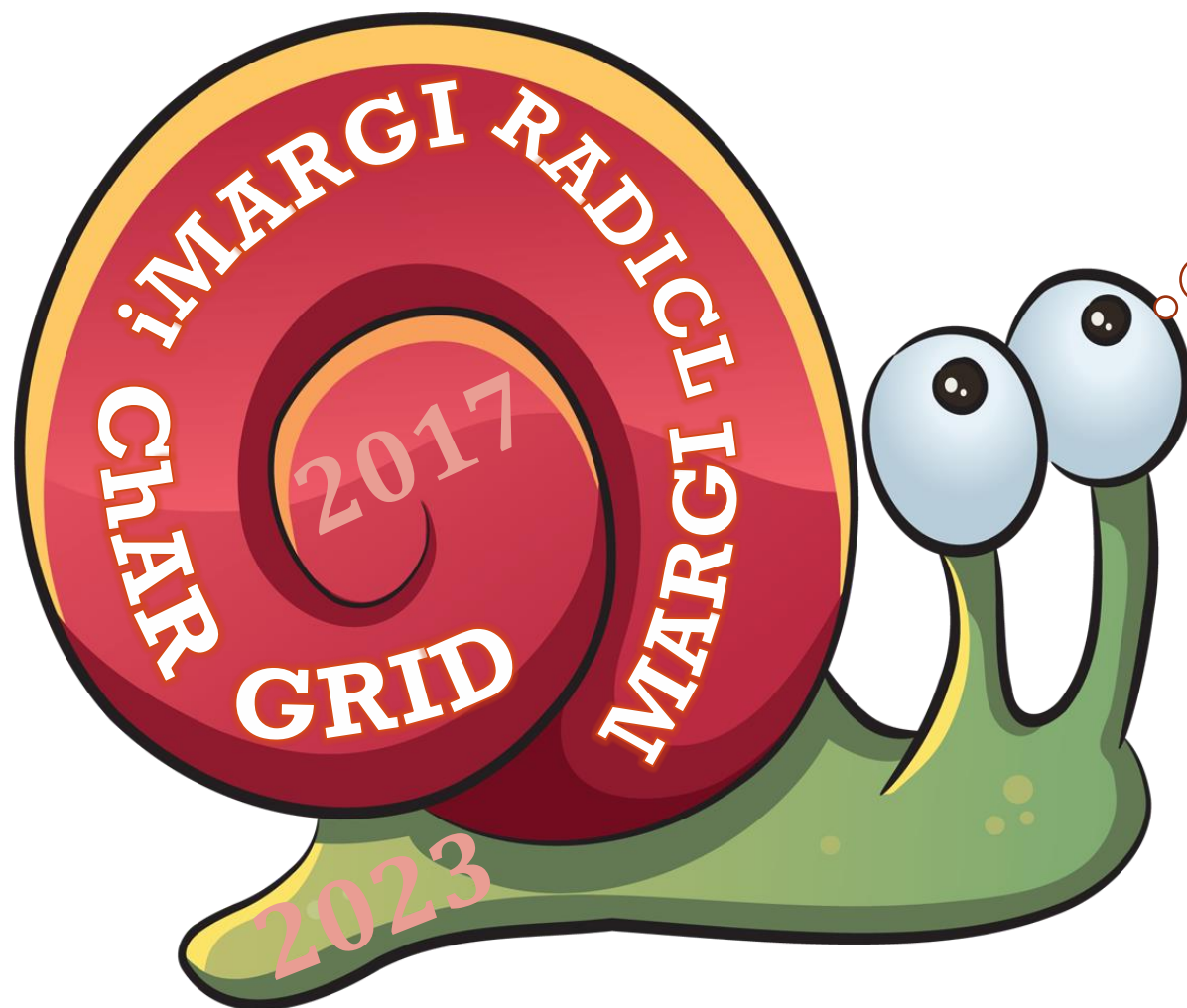
SINGLE CELL



МНОГОСЕК




ОДНО И ТО ЖЕ...





ENSEQLOPEDIA

- <http://enseqlopedia.com/>



Enseqlopedia
Contribute to our growing
glossary of genomics.



386
NGS methods

- RNA-Protein Interactions
 - AGO-CLIP
 - CLASH
 - CLIP-Seq or HITS-CLIP
 - DLAF
 - eCLIP
 - hiCLIP
 - iCLIP
 - miR-CLIP
 - miTRAP
 - PAR-CLIP
 - PIP-Seq
 - Pol II CLIP
 - RBNS
 - Ribo-Seq or ARTSeq
 - RIP-Seq
 - TRAP-Seq
 - TRIBE
 - BrdU-CLIP
 - HiTS-RAP
 - irCLIP



ЗАЧЕМ

- Зачем биоинформатику знать, что в пробирке?

ОТ ЭТОГО ВСЕ ЗАВИСИТ

- От протокола пробоподготовки зависит биоинформатический анализ
- Какой брать референсный геном (или не брать?)
- Как выстраивать протокол обработки данных?
- Какую задачу вообще решаем?
- Как лучше визуализировать результаты?



ВСЕ СДЕЛАНО ДО НАС ENCODE

- <https://www.encodeproject.org/>

The screenshot displays the ENCODE project website interface, organized into a grid of resource cards. The top navigation bar includes three main categories: Functional genomics (blue), Functional characterization (orange), and Encyclopedia of elements (green). Below this, the resources are categorized into three main color-coded sections: blue, grey, and red.

Functional genomics	Functional characterization	Encyclopedia of elements
Rush Alzheimer's	EN-TEx	Deeply profiled cell lines
Protein knockdown (Degron)	Computational and integrative products	Human donors
ENCORE	Stem cells development	Imputed experiments
Immune cells	Mouse development	Reference epigenome
Functional genomic series	Single-cell experiments	RNA-seq
Region search	Encyclopedia browser	ChIP-seq experiments

ENCODE

Showing 17208 results

List Report Download Visualize

(:)

ASSAY →	TF ChIP-seq	Histone ChIP-seq	DNase-seq	total RNA-seq	Mint-ChIP-seq	polyA plus RNA-seq	ATAC-seq	microRNA-seq	scRNA-seq	snATAC-seq	eCLIP	DNAme array	small RNA-seq	WGBS	long read RNA-seq	ChIA-PET	RAMPAGE	RNA microarray	genotyping array	CAGE	microRNA counts	RNA Bind-n-Seq	Repli-seq
tissue	439	2175	945	447		399	225	305	393	283	2	121	67	162	112	1	104	2	7	17	101		
dorsolateral prefrontal cortex	59	188	56	120				43							9								
adrenal gland	8	39	33	26		11	8	23	59	15	2	5	2	5	19		4				2		
heart left ventricle	16	84	10	9		2	15	5	54	65		3		4	4		2				2		
heart	6	81	39	21		16	7	25	40	8			1	10	6		2				8		
liver	42	91	24	3		20	8	7	8	8		1	1	9			2				7		
cell line	2836	773	180	136	54	155	124	39	6	32	250	87	110	18	56	104	29	67	73	50	8		92
K562	750	19	4	17		15	4	2		3	145	3	7	1	4	9	1	9	2	9	1		6
HepG2	814	15	2	6		11	2	2		3	105	3	3	2	3	4		6	2	6	1		6
GM12878	190	15	1	5		13	2	2	2	3		3	6	1	4	4	1	7	2	6	1		6
MCF-7	150	18	4	1		4	1	2		3		2	7		1	4		2	2	3	1		6
HEK293	204	6									2					2		1	2				
primary cell	74	506	558	241	715	136	71	52	3	29		38	24	7	6	60	16	57	37	30	1		12
naive thymus-derived CD4-positive, alpha-beta T cell		16	16	5	74	8	2	2		2						2							
T-cell		11	62	7	18	1	6							1		4							
naive thymus-derived CD8-positive, alpha-beta T cell			13	2	66	6	3	1		1						1							
CD14-positive monocyte	2	21	8		41	8				2			1	1						1			

Унификация и единообразие!!!!

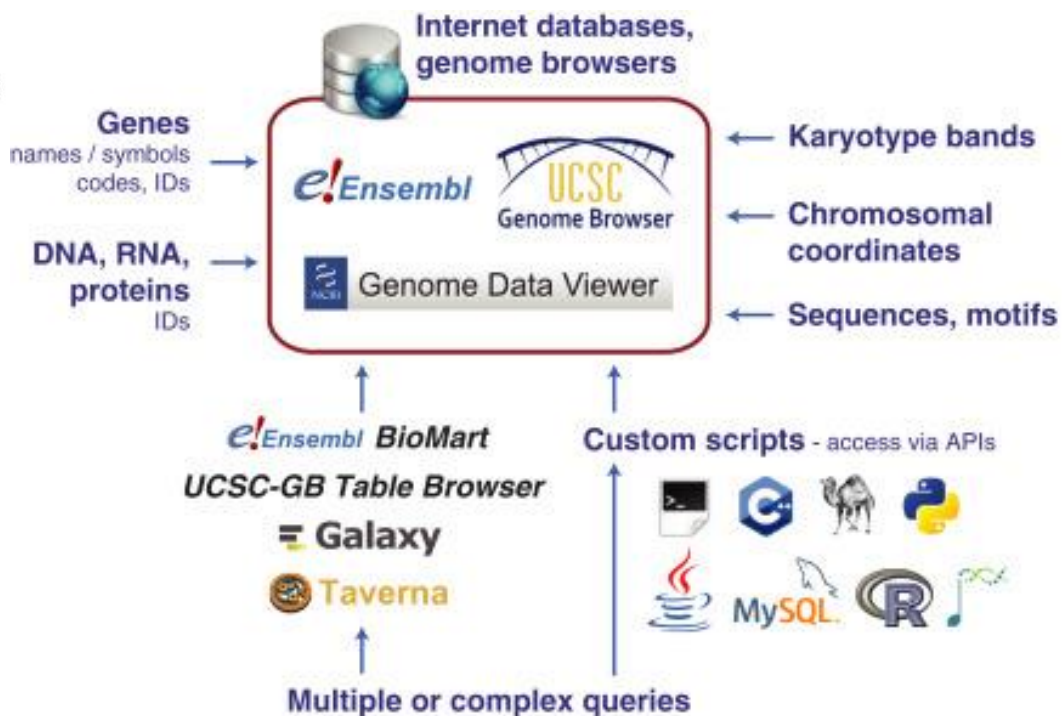
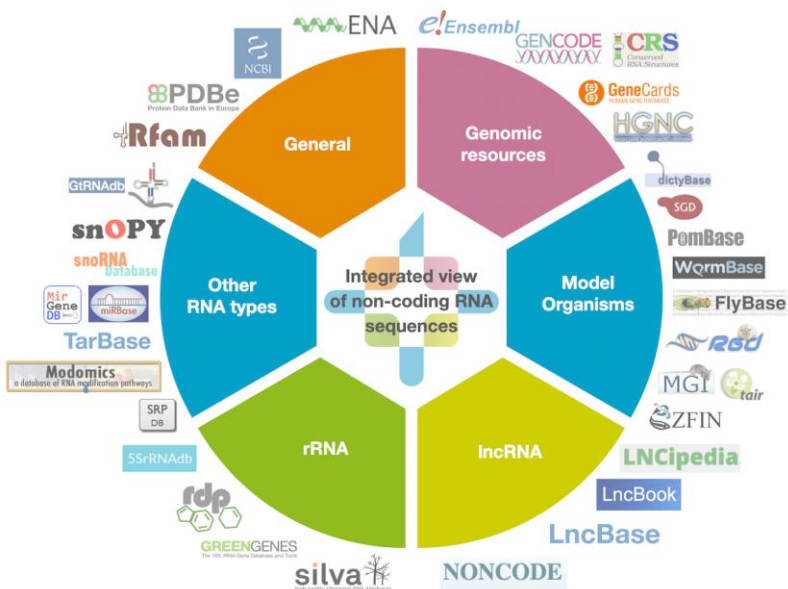


ЧТО ДАЛЬШЕ?

- Результаты анализа:
 - Дифференциально экспрессирующиеся гены
 - Таргеты транскрипционных факторов
 - ...

Нужна какая-то аннотация, анализ сопредставленности, просто информация о гене или белке, ...

РАЗНООБРАЗИЕ БАЗ ДАННЫХ



Это еще далеко не все



GENECARDS

- <https://www.genecards.org/>

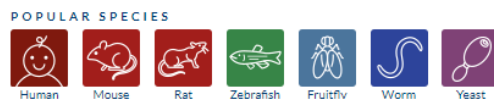
Jump to section	Aliases	Disorders	Domains	Drugs	Expression	Function	Genomics	Localization	Orthologs
	Paralogs	Pathways	Products	Proteins	Publications	Sources	Summaries	Transcripts	Variants
Research Products	Antibodies	Assays	Proteins	Inhib. RNA	CRISPR	Exp. Assays	miRNA	Drugs	Animal Models
	Cell Lines	Clones	Primers	Genotyping					

GeneCards Version 5.15 (Updated: Mar 27, 2023)

Total genes	415,866	Category	# of Genes
HGNC approved	43,617	Protein-coding	21,667
Disease genes	19,871	ncRNA genes	292,110
Hot genes	500	lncRNAs	130,578
		piRNAs	111,811
		miRNAs	6,904
		rRNAs	1,272
		tRNAs	1,160
		snoRNAs	1,905
		SRP_RNAs	9,022
		circRNAs	120
		Other ncRNAs	29,338
		Functional elements	76,694
		Pseudogenes	22,201
		Genetic loci	1,387
		Gene clusters	10
		Uncategorized	1,797

ГЕНОМНЫЙ БРАУЗЕР

- <https://genome.ucsc.edu/index.html>

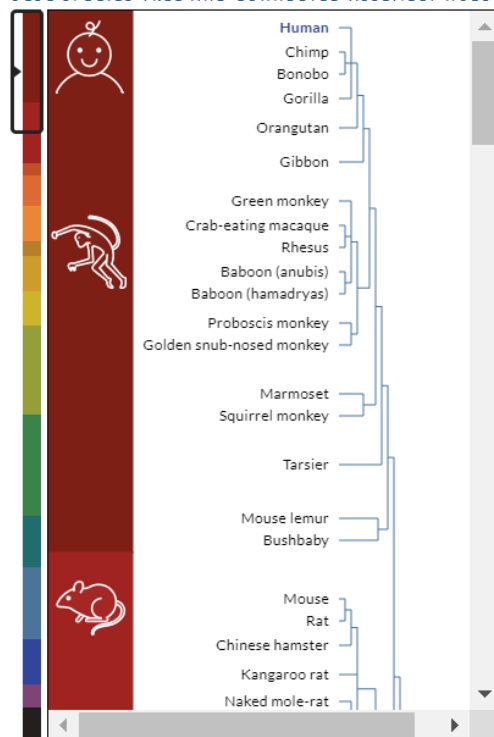


Search through thousands of genome browsers

Enter species, common name or assembly ID

[Unable to find a genome? Send us a request.](#)

UCSC SPECIES TREE AND CONNECTED ASSEMBLY HUBS



Human Assembly

Dec. 2013 (GRCh38/hg38) ▾



Position/Search Term

Enter position, gene symbol or search terms

Current position: chr2:25,160,915-25,168,903 [↗](#)

Human Genome Browser - hg38 assembly

UCSC Genome Browser assembly ID: hg38

Sequencing/Assembly provider ID: Genome Reference Consortium

Assembly date: Dec. 2013 initial release; June 2022 patch release

Assembly accession: [GCA_000001405.29](#)

NCBI Genome ID: 51 (Homo sapiens (human))

NCBI Assembly ID: [GCF_000001405.40](#) (GRCh38.p14, GCA_000001405.29)

BioProject ID: [PRJNA31257](#)

Search the assembly:

- **By position or search term:** Use the "position or search term" marker names; or keywords from the GenBank description or [information](#).
- **By gene name:** Type a gene name into the "search term" box, [information](#).
- **By track type:** Click the "track search" button to find Genom

Download sequence and annotation data:

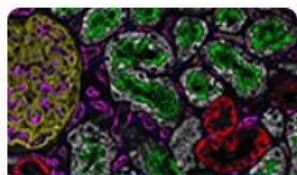
- **Using rsync** (recommended)
- **Using HTTP**
- **Using FTP**
- **Data use conditions and restrictions**
- **Acknowledgments**

Assembly Details

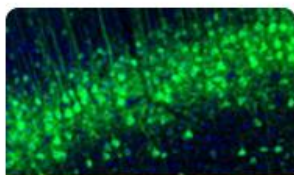
The GRCh38 assembly is the first major revision of the human genome source for human genome assembly data submitted to GenBank. It is a version confusion. Hence, the GRCh38 assembly is referred to as "HG38".

HUMAN PROTEIN ATLAS

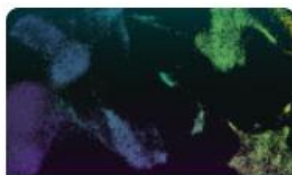
- <https://www.proteinatlas.org/>
- Не только protein



TISSUE



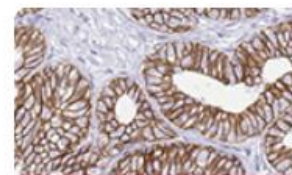
BRAIN



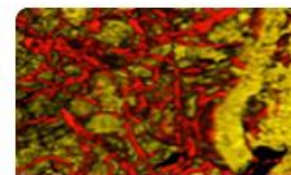
SINGLE CELL TYPE



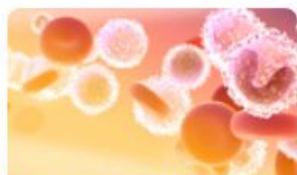
TISSUE CELL TYPE



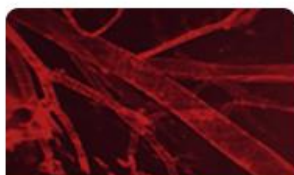
PATHOLOGY



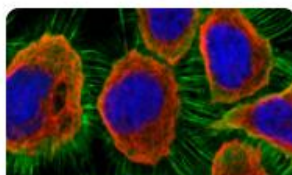
DISEASE



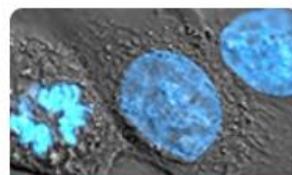
IMMUNE CELL



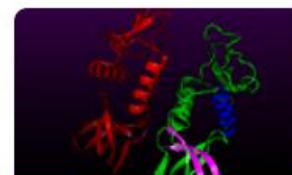
BLOOD PROTEIN



SUBCELLULAR



CELL LINE



STRUCTURE



METABOLIC

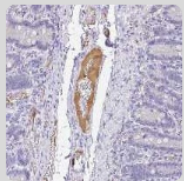
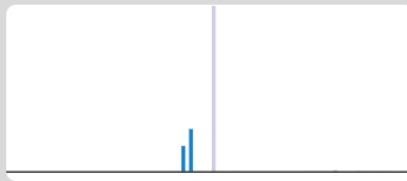
HUMAN PROTEIN ATLAS

APOB



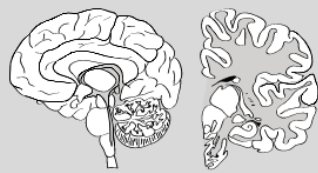
- PROTEIN SUMMARY
- SECTION OVERVIEW
- RNA DATA
- ANTIBODY DATA Y

TISSUE¹


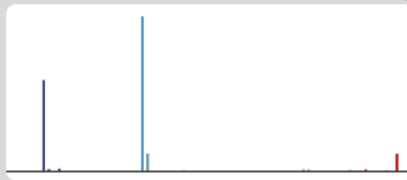
Tissue expression cluster ¹	Liver - Metabolism (mainly)
Tissue specificity ¹	Group enriched (Intestine, liver)
Protein expression ¹	Distinct positivity in plasma.

BRAIN¹



Human regional specificity ¹	Not detected
Pig regional specificity ¹	Not detected
Mouse regional specificity ¹	Not detected

SINGLE CELL TYPE¹

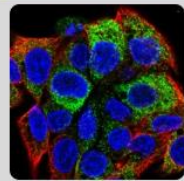
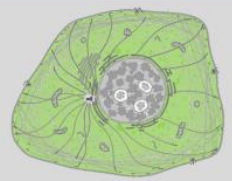



Single cell type expression cluster ¹	Hepatocytes - Metabolism (mainly)
Cell type specificity ¹	Group enriched (Hepatocytes, Proximal enterocytes)

TISSUE CELL TYPE¹

- Adipocytes (Subcutaneous)
- Adipocytes (Visceral)
- Adipocytes (Breast)
- Hepatocytes

SUBCELLULAR¹

Main location ¹	Localized to the Vesicles, Cytosol
----------------------------	------------------------------------



ЧТО ДЕЛАТЬ

- Если сразу МНОГО генов?
- Анализ обогащения наборов
- Гены аннотированы и сгруппированы
- Например: участвуют в определенном метаболическом пути
- Статистический метод, который определяет, что гены из заранее заданного набора встречаются в вашем списке чаще, чем вы бы ожидали по случайным причинам (перепредставлены)



STRING

- <https://string-db.org/>

Version: 11.5

LOGIN | REGISTER | SURVEY

STRING

Search | Download | Help | My Data

Protein by name >

Multiple proteins >

Proteins by sequences >

Proteins with Values/Ranks >

Protein families ("COGs") >

Pathway / Process / Disease **New** >

Annotate your proteome **New** >

Organisms >

Examples >

Random entry >

SEARCH

Single Protein by Name / Identifier

Protein Name: (examples: #1 #2 #3)

Organisms:

auto-detect ▼

[Advanced Settings](#)

SEARCH

STRING

Node Color



colored nodes:
query proteins and first shell of interactors



white nodes:
second shell of interactors

Node Content



empty nodes:
proteins of unknown 3D structure



filled nodes:
some 3D structure is known or predicted

Known Interactions

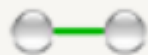


from curated databases



experimentally determined

Predicted Interactions



gene neighborhood



gene fusions



gene co-occurrence

Others



textmining



co-expression



protein homology

STRING



- Viewers ▾
- Legend >
- Settings >
- Analysis >
- Table >
- + More
- Less



Network

Summary view: shows current interactions. Nodes can be moved; popups provide information on nodes & edges.



Experiments

Co-purification, co-crystallization, Yeast2Hybrid, Genetic Interactions, etc ... as imported from primary sources.



Databases

Known metabolic pathways, protein complexes, signal transduction pathways, etc ... from curated databases.



Textmining

Automated, unsupervised textmining - searching for proteins that are frequently mentioned together.

currently showing



Cooccurrence

Gene families whose occurrence patterns across genomes show similarities.



Coexpression

Proteins whose genes are observed to be correlated in expression, across a large number of experiments.



Neighborhood

Groups of genes that are frequently observed in each other's genomic neighborhood.



Fusion

Genes that are sometimes fused into single open reading frames.

KEGG

- Метаболические пути
- <https://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>



KEGG - Table of Contents

KEGG2 PATHWAY BRITE MODULE KO GENES COMPOUND NETWORK DISEASE DRUG

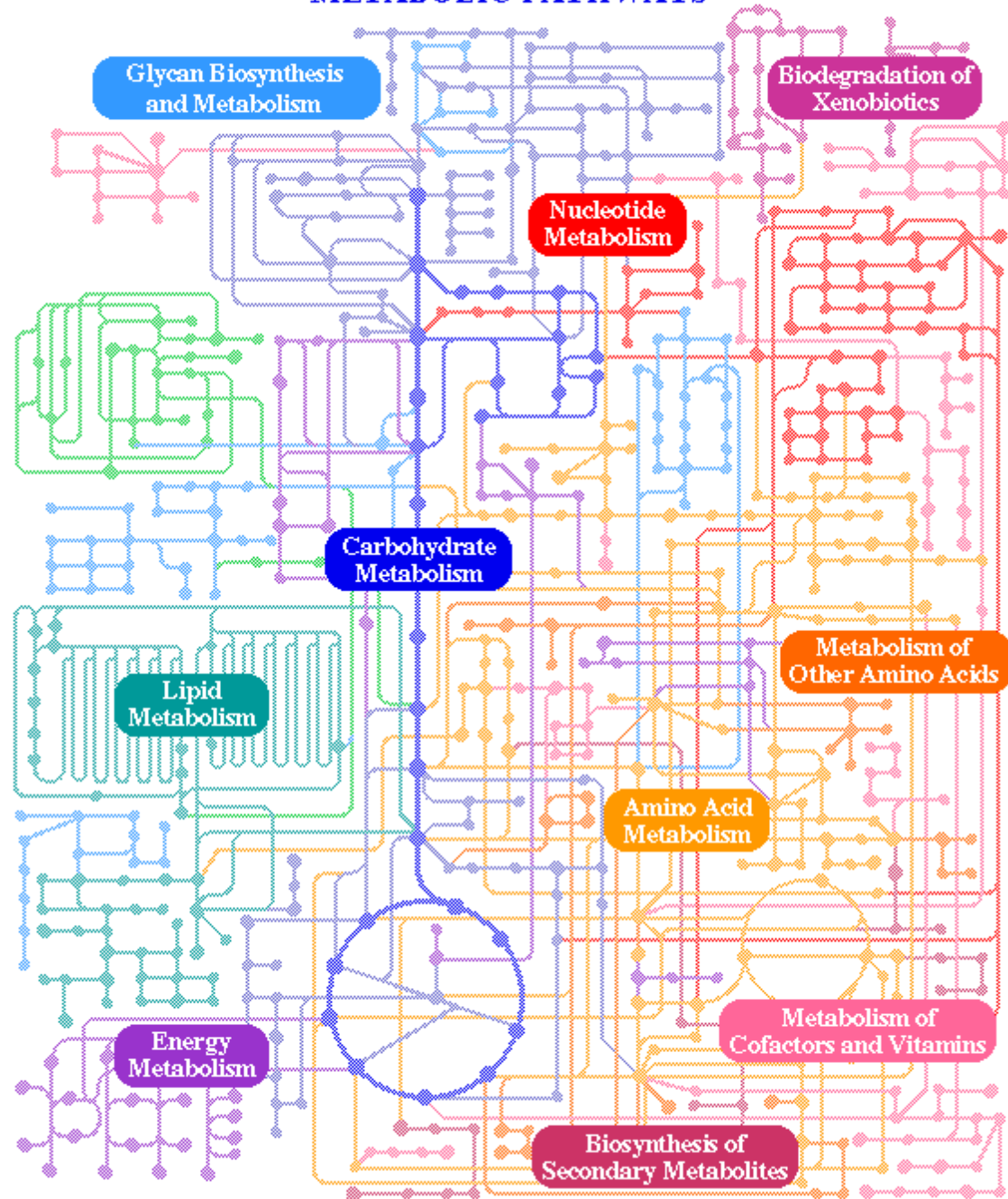
Search references cited in KEGG

Number of references (2023/4/1)

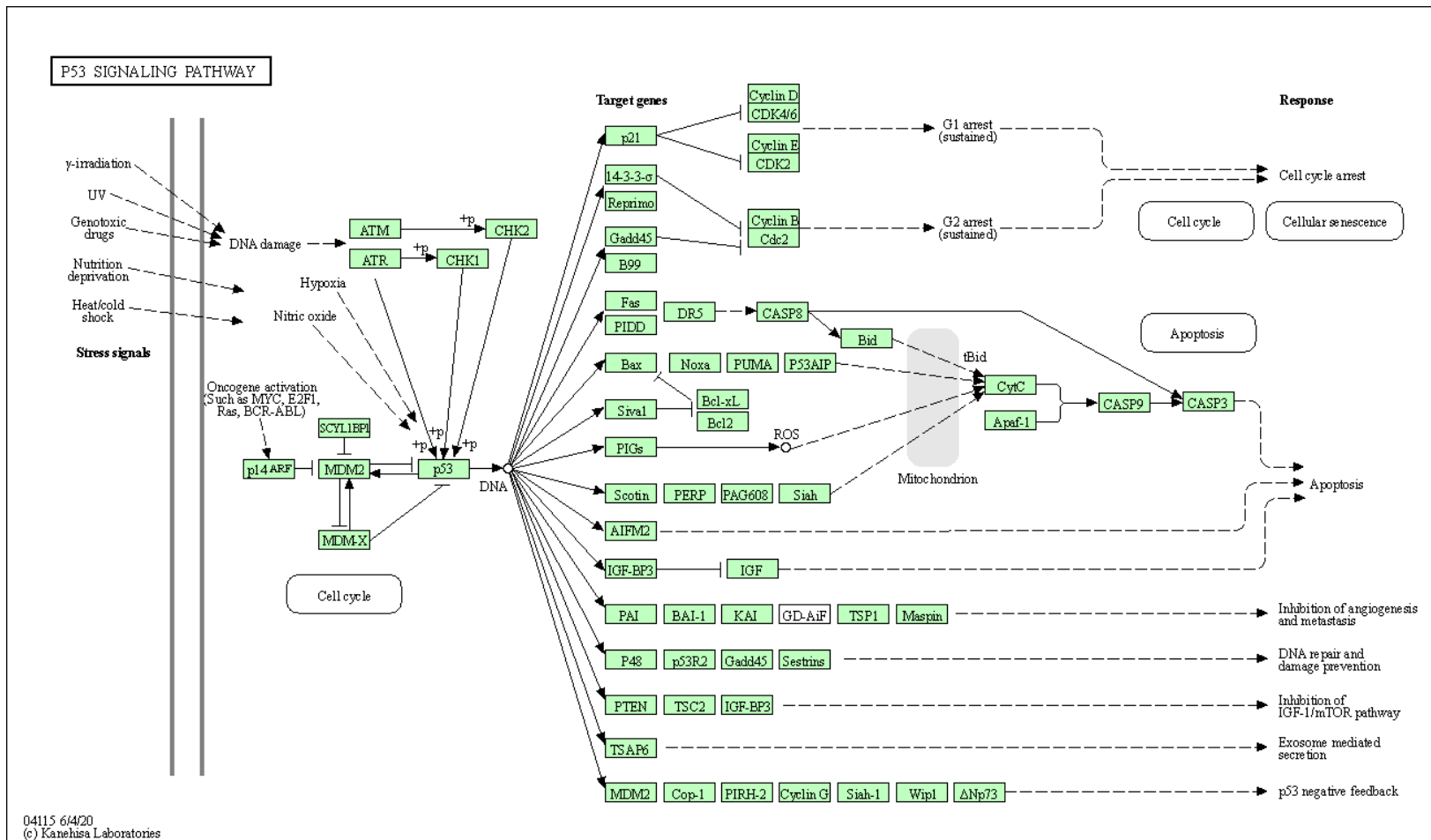
total	69,123	pathway	6,518	ko	27,728	glycan	919	network	2,393
		brite	444	genome	5,994	reaction	2,020	variant	1,366
		module	1,089	agenes	3,023	enzyme	15,880	disease	10,211

KEGG

METABOLIC PATHWAYS

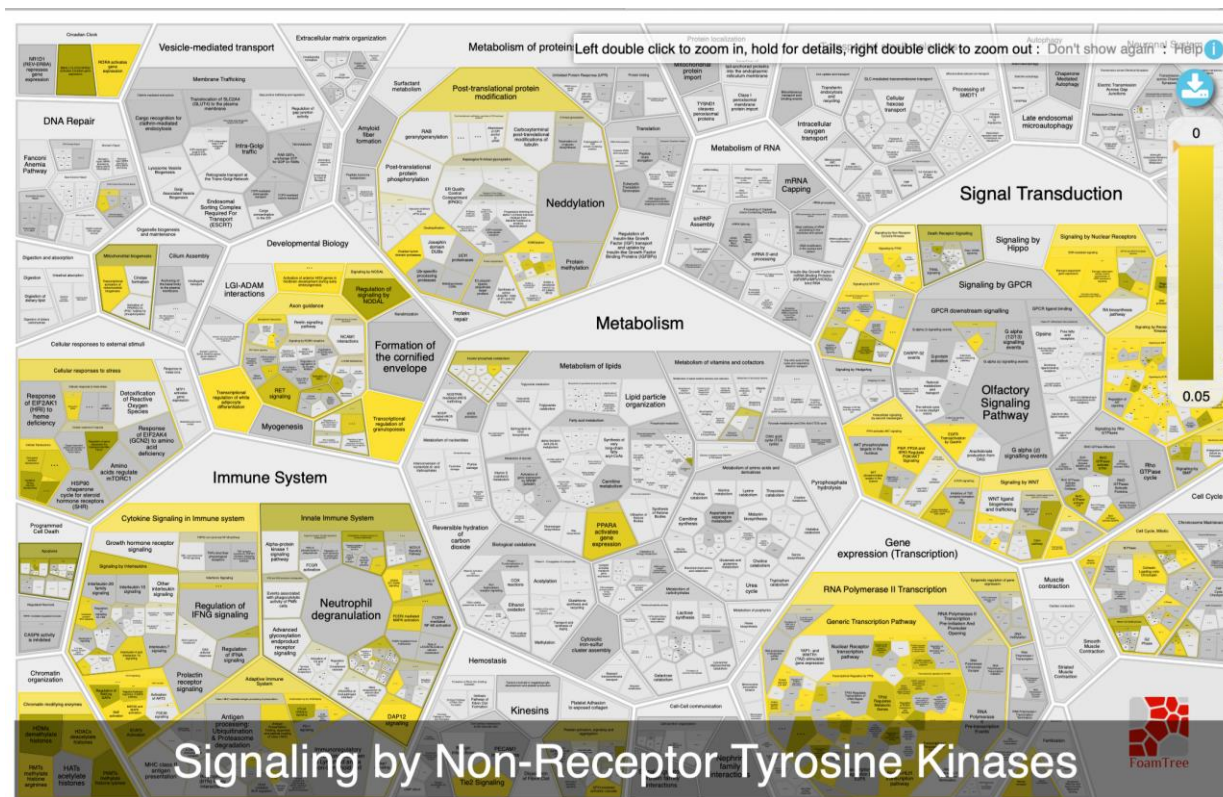


KEGG



REACTOME

- Метаболические пути
- <https://reactome.org/>





GENE ONTOLOGY

- <http://geneontology.org/>

THE GENE ONTOLOGY RESOURCE

The mission of the GO Consortium is to develop a comprehensive, **computational model of biological systems**, ranging from the molecular to the organism level, across the multiplicity of species in the tree of life.

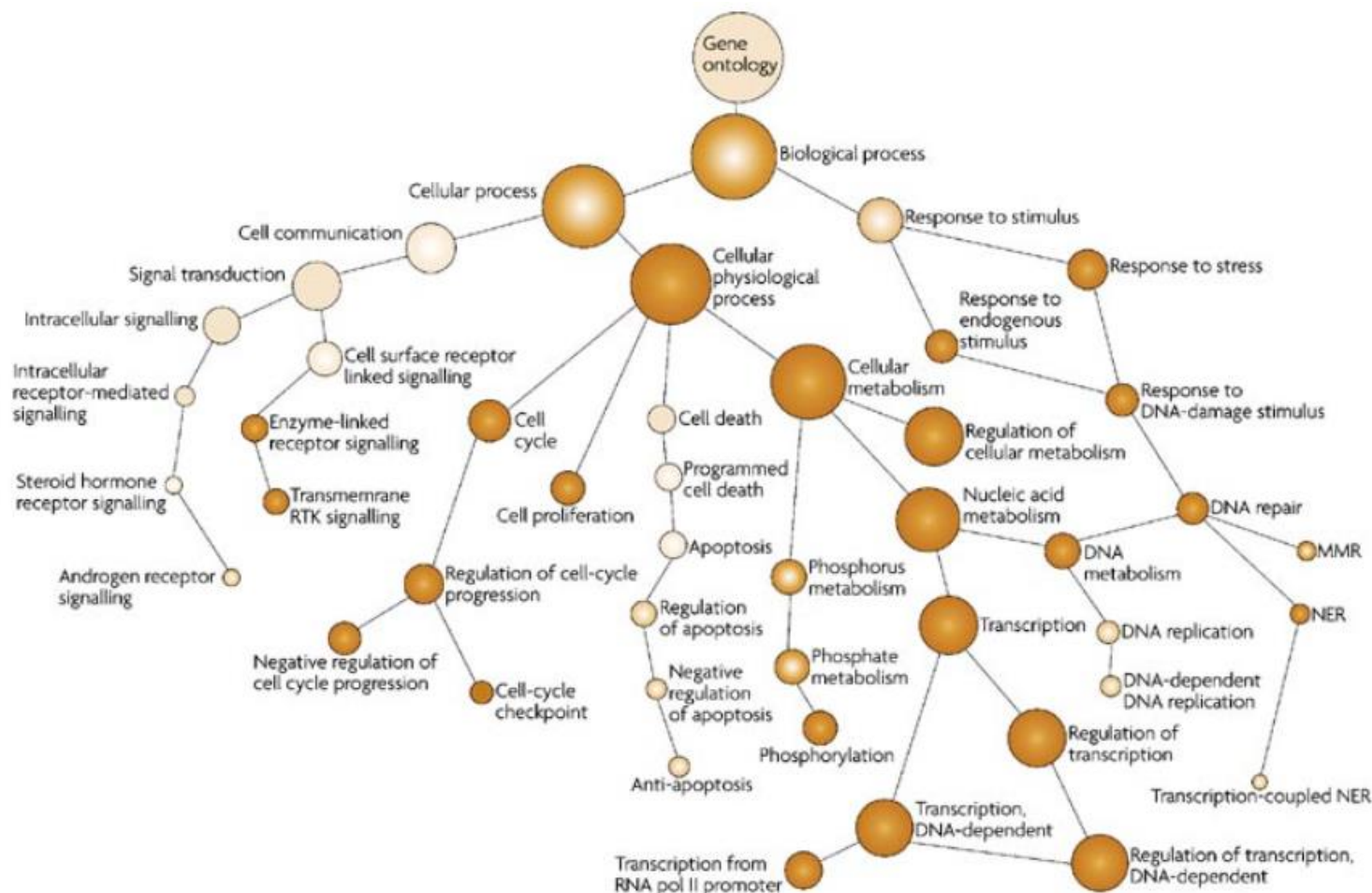
The Gene Ontology (GO) knowledgebase is the world's largest source of information on the functions of genes. This knowledge is both human-readable and machine-readable, and is a foundation for computational analysis of large-scale molecular biology and genetics experiments in biomedical research.

Search GO term or Gene Product in AmiGO ...



Any Ontology Gene Product

GENE ONTOLOGY





PUBMED

MEDLINE PubMed Production Statistics

	<u>FY2022</u>	<u>FY2021</u>	<u>FY2020</u>	<u>FY2019</u>	<u>FY2018</u>
MEDLINE Citations Indexed (Annual)	1,369,611	1,291,807	952,919	956,390	904,636
MEDLINE Citations Cumulative Total	29,807,639	28,444,654	27,149,277	26,196,358	25,239,968
MEDLINE Journal Titles	5,282	5,282	5,274	5,243	5,251
PubMed Citations (Annual)	1,714,780	1,733,089	1,514,199	1,366,447	1,329,148
PubMed Citations Cumulative Total	34,693,538	33,136,289	31,563,992	30,178,674	28,934,389
PubMed Searches	2.58 Billion	2.57 Billion	3.3 Billion	3.1 Billion	3.3 Billion
Web/Interactive	1.283 Billion	1.186 Billion	1.076 Billion	896 Million	831 Million
Script/E-Utilities	1.303 Billion	1.391 Billion	2.2 Billion	2.2 Billion	2.5 Billion



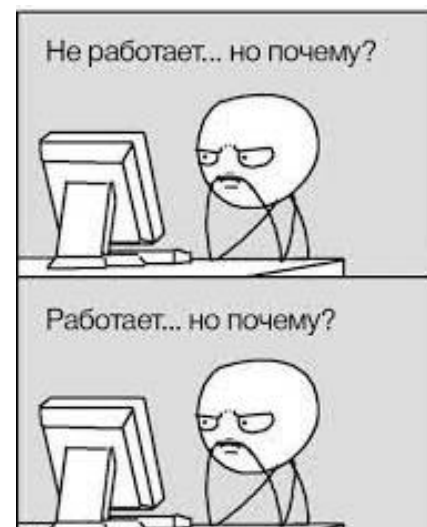
ЧЕМ ЗАНИМАЕТСЯ БИОИНФОРМАТИКА СЕГОДНЯ?

- Анализ медицинских и биологических данных разнообразной специфики:
 - Аминокислотные и нуклеотидные последовательности
 - Эволюция
 - Структуры биологических молекул
 - Разработка лекарств
 - Популяционные исследования
 - Обработка сигналов (МРТ, ЭЭГ, ...)
 - Обработка изображений (микроскопия)

А ЕЩЕ

- Проектирование баз данных для хранения информации
- Систематизация данных
- Разработка и совершенствование алгоритмов и программ для анализа биологических данных

- Написание статей, грантов, патентов
 - Рецензирование публикаций
 - Участие в конференциях и научная коммуникация
 - Преподавание
 - Ведение дипломных и курсовых проектов
 - Чтение чужих статей
 - Самообразование
 - Поиск себя...



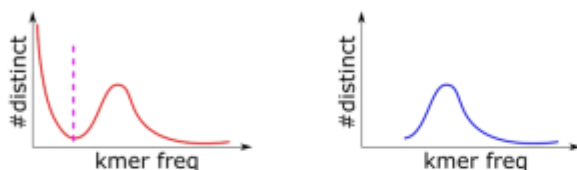
Давайте по порядку

БУДНИ БИОИНФОРМАТИКА

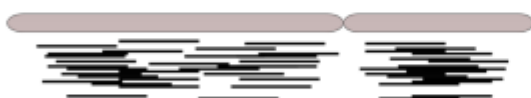
Read clipping



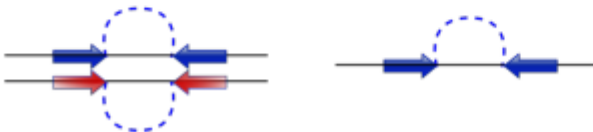
Read error correction



Read mapping



Duplicate removal

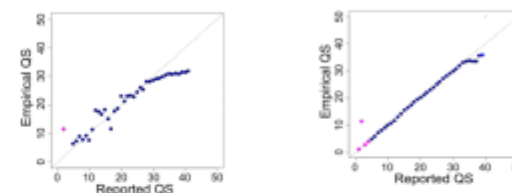


Re-alignment

TTAAAAAACGT
TTA-AAA--CGT
TT--AAAA-CGT

TTAAAAAACGT
TT---AAACGT
TT---AAACGT

Base Quality Adjustment



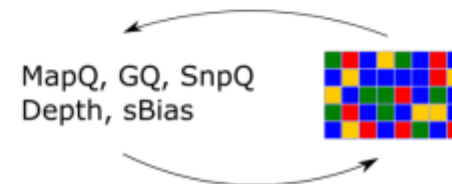
SNP calling

— A —
— A —
— A —

Chr1:2340
T → A

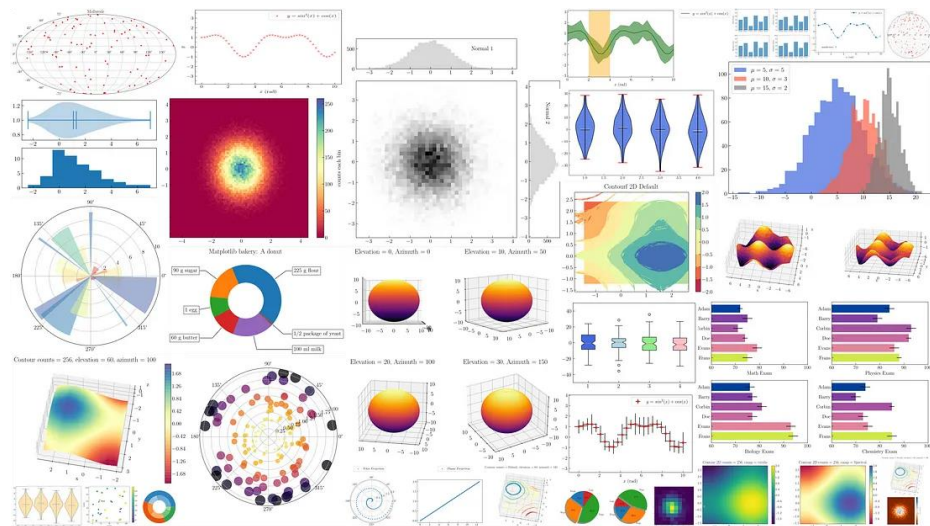
SNP filtering

Evaluation



ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

- Важный этап анализа – представление своих результатов
- Табличка -> картинка





ВСЕ ТЕЧЕТ, ВСЕ МЕНЯЕТСЯ

- Версии референсов
- Базы данных
- Протоколы обработки данных
- Актуальные программы
- Интерфейсы сервисов
- Пакеты и программы

- ВСЕ МЕНЯЕТСЯ И ОБНОВЛЯЕТСЯ!
- Нужно фиксировать версии и не путать их в рамках одного проекта
- Помните о воспроизводимости



ДОМАШНЕЕ ЗАДАНИЕ

- **Вариант 1**
- Взять любой протокол секвенирования (смотрите [Enseqlopedia](#), статьи, ...), но не из лекции
- Описать:
 - Общую задачу (изучение сайтов связывания транскрипционных факторов, пространственной структуры хроматина, ...)
 - В общих чертах (без подробностей!!!) пробоподготовка и обработка
 - Как использовали метод, что показали в рамках 1-2 статей (ищите в PubMed)



ДОМАШНЕЕ ЗАДАНИЕ

- **Вариант 2**
- Возьмите любой ген (искать: **HPA**, **GeneCards**, Википедия, ...)
- Кратко опишите функцию гена
- Найдите ген в геномном [браузере](#), приведите картинку
- Подайте на вход сервису [STRING](#)
- Приведите полученный граф (можно увеличить)
- Опишите его (любой из 8 вариантов вкладки **Viewers**)
- Найдите информацию о анализе вашего списка с помощью **KEGG** (вкладка **Analysis**)
- Попробуйте интерпретировать
- Есть ли выбранный ген или генный продукт в [HPA](#)? Какая у него клеточная локализация?



ДОМАШНЕЕ ЗАДАНИЕ

- При выполнении домашнего задания не стесняйтесь добавлять иллюстрации и рассуждения
- Вся информация, которую Вы взяли из внешних источников, должна содержать соответствующие ссылки
- Оформите домашнее задание в виде документа (.pdf)
- Домашнее задание будет проверено, если понятно, что сделано
 - Описана задача: в чем заключалось задание
 - Понятен ход рассуждения: что вы сделали для выполнения задания
 - Присутствует логика изложения: каждое последующее действие вытекает из предыдущего
 - Указаны все ссылки на внешние источники
 - Есть минимальный анализ (ваш собственный!) результатов

НО! Это не курсовая! Без фанатизма! Рассчитывайте на 2-4 страницы



ДОМАШНЕЕ ЗАДАНИЕ

- Назовите документ **FBB_MFK_2024_ZharikovaA(заменить).pdf**
- На первой странице документа укажите полностью свои фамилию, имя, курс и факультет
- Отправьте на почту: azharikova89@gmail.com
- Если есть вопросы – напишите мне!

