Москва, 2017

Кафедра медицинской генетики

Биоинформатическая обработка NGS-данных

Выполнили:
Вдовина Юлия
Кириллова Арина
Фефелова Екатерина
Биоинженерия и биоинформатика, 3 курс, ИФиТМ

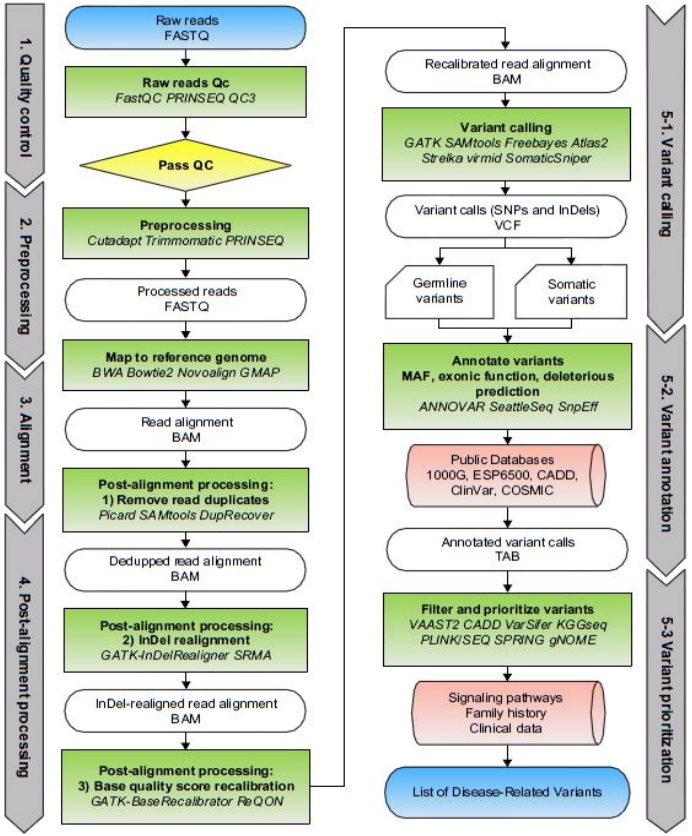
Руководитель: Литвинова Мария Михайловна, к.м.н., доцент, врач-генетик

Контроль качества

Предварительная обработка

Выравнивание

Постобработка полученных данных



Определение вариантов

Аннотация

Фильтрация, Приоритизация

Center for Research Informatics, The University of Chicago, Chicago, IL, USA

FastQ

- Текстовый формат, позволяющий хранить не только нуклеотидную последовательность, но и данные о качестве прочтения каждого нуклеотида
- Содержит 4 строки:
  1. Идентификатор последовательности
  2. Прочтение
  3. Комментарий
  4. Phred quality score

1. @HWI-ST751:100:C0GFTACXX:2:1101:1417:1981 1:N:0:AGTCAA
2. CNCTGGACTTAGGTTTAGTGAGGGCTGACTCTGAAGCTGAGGGTCTGCAGAAGGGAGTNNNNNN
3. +
4. D#4ADDDEHHHHHFHGGHJJJJJJJIJJJJJJIIIIIJJGHIIIIJJJGIHHIIJHGC######

A read from a FASTQ file produced by Casava 1.8 software. In the FASTQ file each read sequence is described using four lines.

Clinical Applications for Next-Generation Sequencing, Academic press, 2015

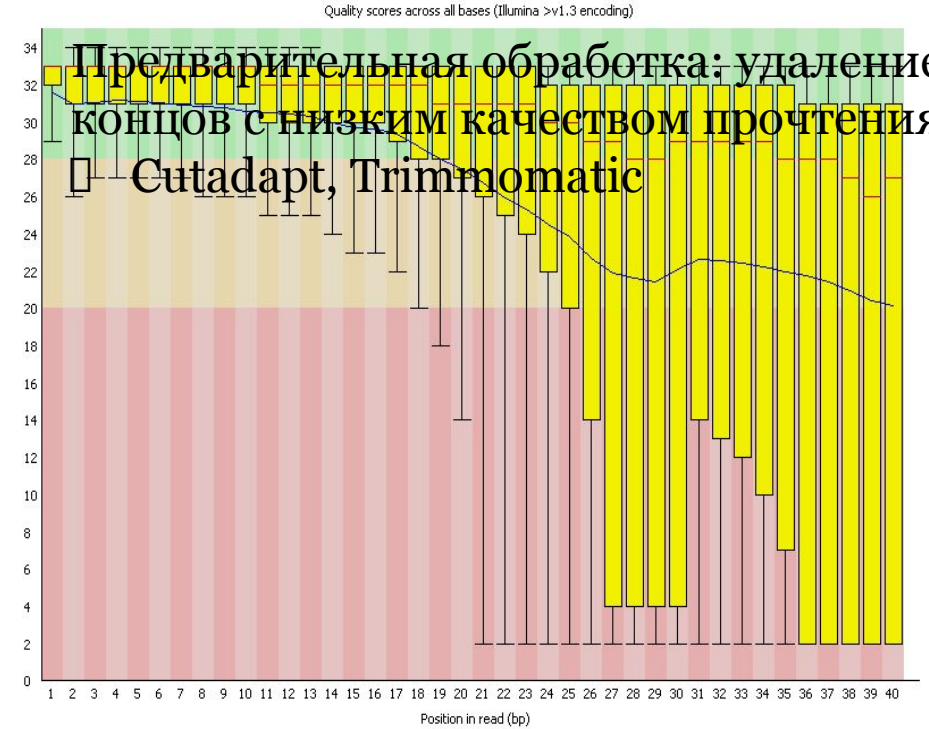
Quality control (QC)

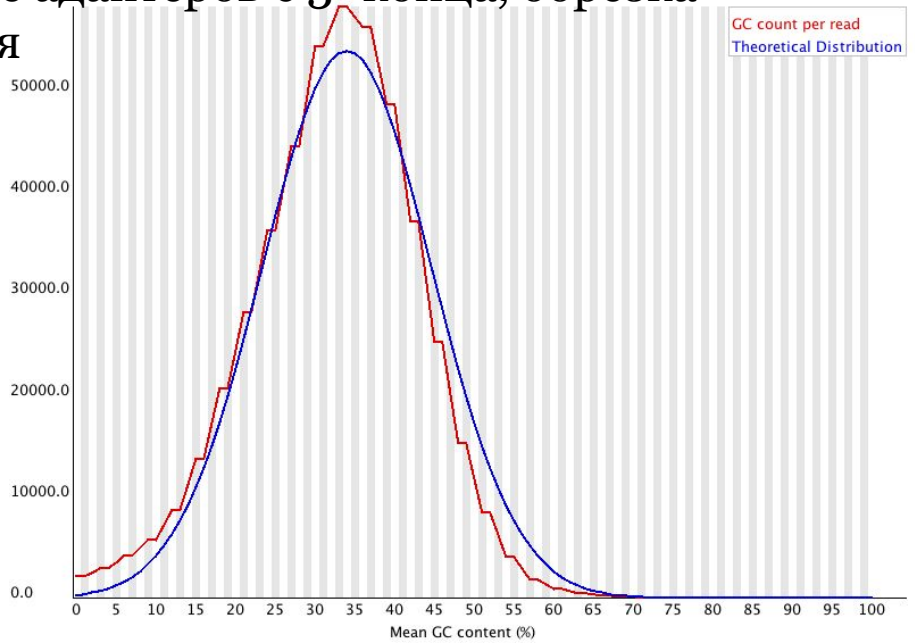
Контроль качества прочтений по ряду параметров

- FastQC

Предварительная обработка: удаление адаптеров с 3’-конца, обрезка концов с низким качеством прочтения

- Cutadapt, Trimmomatic





Выравнивание (alignment)

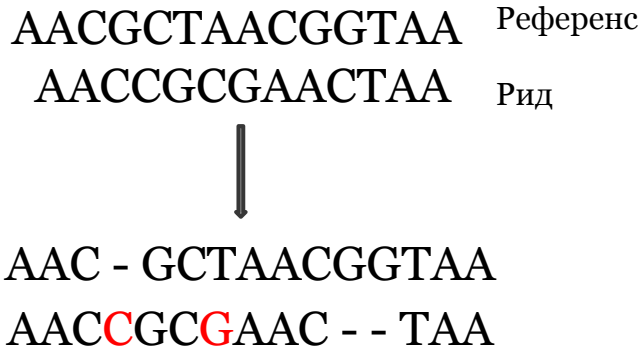
Этап картирования на референсный геном

- BWA, Bowtie2, Novoalign
- На выходе файл в формате SAM/BAM

SAM = Sequence Alignment Map

BAM = Binary Alignment Map

После выравнивания производится постобработка полученных данных с целью минимизировать количество ошибок, генерируемых на следующем этапе



Определение вариантов (variant calling)

На этом этапе программа определяет варианты, отличающиеся от референсной последовательности (SNPs, SNVs, InDels)

- SAMtools и GATK
- На выходе = VCF (Variant Call Format)

Вариативность в геномах:

- SNP = Single Nucleotide Polymorphysm (однонуклеотидный полиморфизм)
- InDel = инсерция или делеция одного и более нуклеотидов

VCF

Стандартный формат для хранения данных о ДНК полиморфизмах, таких как: замены (SNPs), вставки, делеции и структурные варианты (SVs)

VCF example

Header

```
##fileformat=VCFv4.1
##fileDate=20110413
##source=VCFtools
##reference=file:///refs/human_NCBI36.fasta
##contig=<ID=1,length=249250621,md5=1b22b98cdeb4a9304cb5d48026a85128,species="Homo Sapiens">
##contig=<ID=X,length=155270560,md5=7e0e2e580297b7764e31dbc80c2540dd,species="Homo Sapiens">
##INFO=<ID=AA,Number=1,Type=String,Description="Ancestral Allele">
##INFO=<ID=H2,Number=0,Type=Flag,Description="HapMap2 membership">
##FORMAT=<ID=GT,Number=1,Type=String,Description="Genotype">
##FORMAT=<ID=GQ,Number=1,Type=Integer,Description="Genotype Quality">
##FORMAT=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Read Depth">
##ALT=<ID=DEL,Description="Deletion">
##INFO=<ID=SVTYPE,Number=1,Type=String,Description="Type of structural variant">
##INFO=<ID=END,Number=1,Type=Integer,Description="End position of the variant">
```

Body

#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	SAMPLE1	SAMPLE2
1	1	.	ACG	A,AT	40	PASS	.	GT:DP	1/1:13	2/2:29
1	2	.	C	T,CT	.	PASS	H2;AA=T	GT	0|1	2/2
1	5	rs12	A	G	67	PASS	.	GT:DP	1|0:16	2/2:20
X	100	.	T	<DEL>	.	PASS	SVTYPE=DEL;END=299	GT:GQ:DP	1:12:.	0/0:20:36

P.Danecek et al

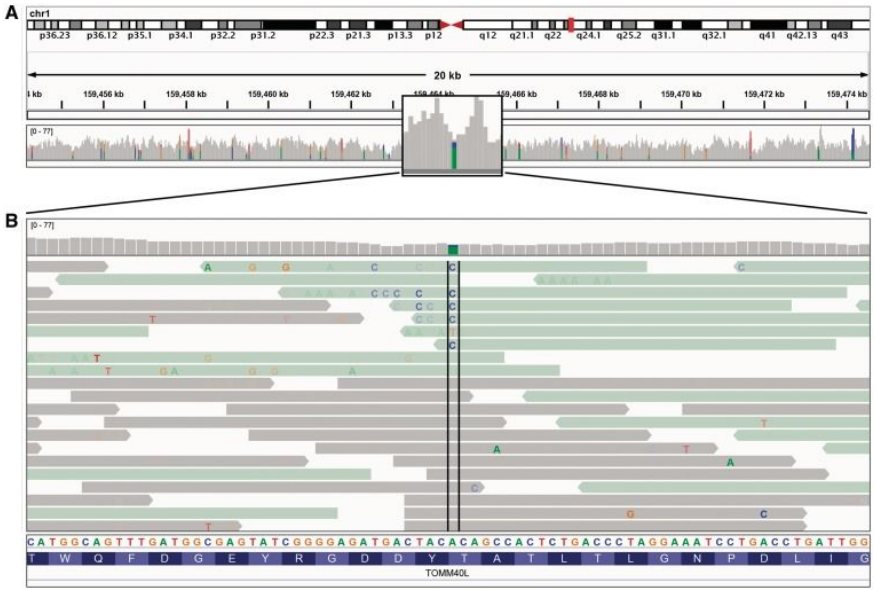
Аннотация, фильтрация, приоритизация

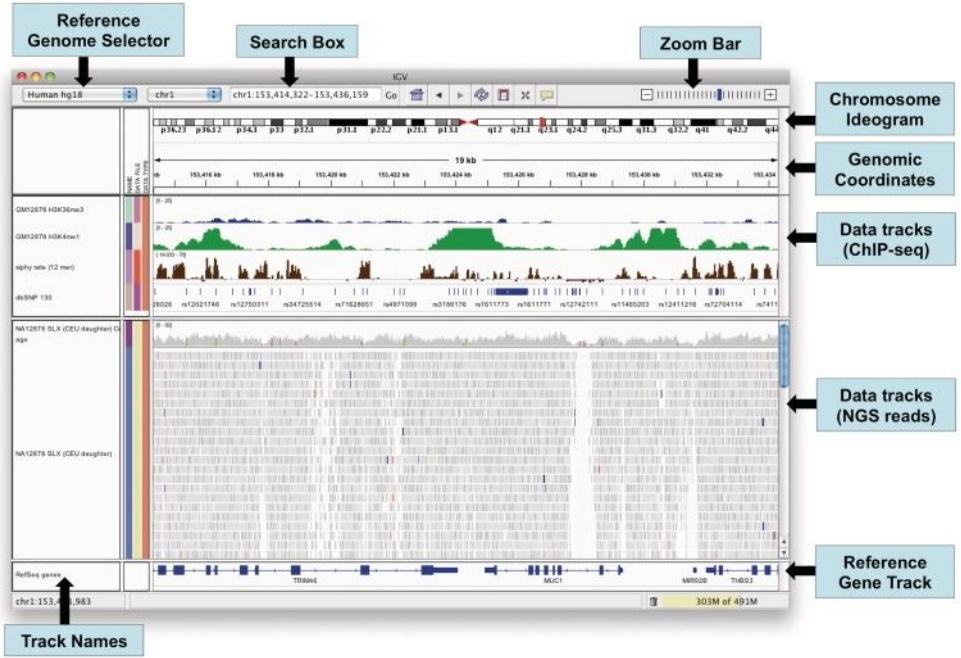
- Проводится аннотирование вариантов и предсказание их влияния на кодируемый белок на основе анализа геномных координат фрагмента
  (поиск по базам данных известных мутаций)
- ANNOVAR, SnpEff
- Убираются варианты с низким покрытием и низким качеством
- Варианты ранжируются по частоте, приоритет отдается более редким мутациям
  (предполагается, что у них большая степень вероятности вызвать заболевание)
- Приоритизация вариантов по функциональному эффекту
  (чей эффект наиболее склонен вызвать заболевание)
  Например: нонсенс мутация обычно наносит больший вред, чем миссенс мутация
- Для неизвестных вариантов предсказывается возможная патогенность на основе разработанных утилит

Визуализация

- Integrative Genomic Viewer (IGV)

  http://www.broadinstitute.org/igv





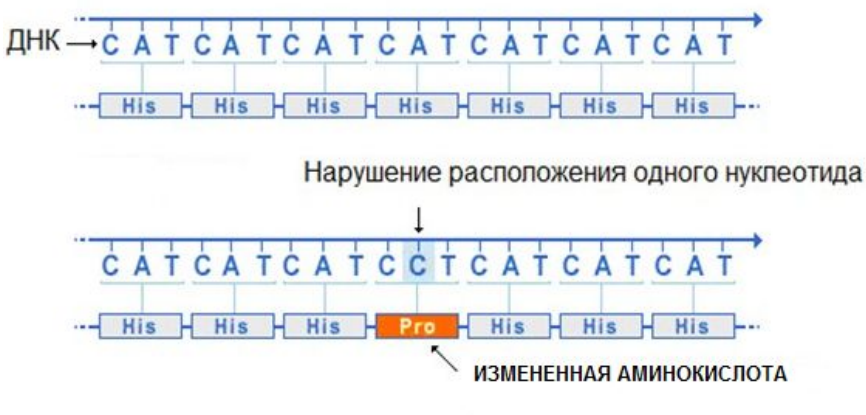
Thorvaldsdóttir et al.

Типы мутаций

- Мутации с заменой нуклеотида

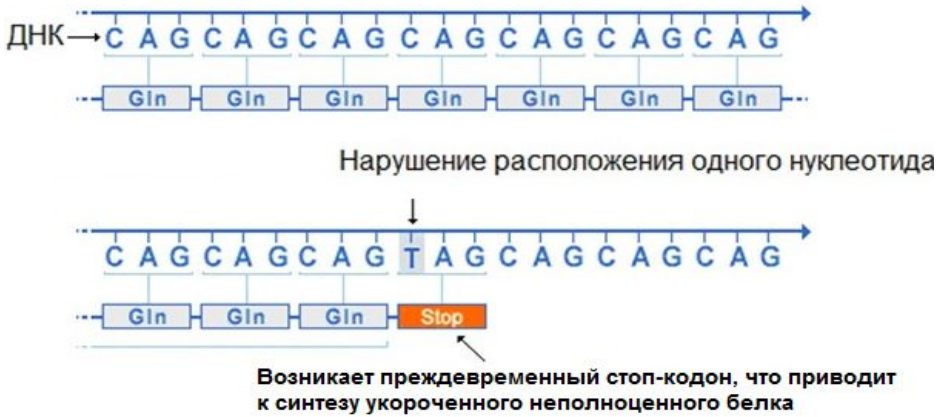
Missense

Однонуклеотидные мутации, приводящие к замене аминокислоты в белке



Nonsense

Однонуклеотидные замены, приводящие к возникновению преждевременного терминирующего кодона



- Мутации вызванные инсерцией или делецией одного или нескольких нуклеотидов

Frameshift

(со сдвигом рамки считывания)

Нормальная ДНК	**GAA-TGA-CTG-TCT-GGA**
Нормальный белок	**Лей-Тре-Асп-Арг-Про**

Делеция Т

Мутантная ДНК	**GAA-GAC-TGT-CTG-GA**
Мутантный белок	**Лей-Лей-Тре-Асп-**

Базы данных геномных вариантов человека

База данных, Web сайт	Описание
Популяционные базы данных	
Exome Aggregation Consortium http://exac.broadinstitute.org/	База данных вариантов, найденных при проведении экзомного секвенирования образцов ДНК 61,486 неродственных индивидуумов, являющихся участниками различных болезнь-специфичных и популяционных генетических исследований. Лица, с наследственными заболеваниями, проявляющимися в детстве, были исключены из выборки.
Genome Aggregation Database http://gnomad.broadinstitute.org/	Расширенная база данных геномных вариантов, основанная на базе Exome Aggregation Consortium, включающая данные по 123 136 экзомов и 15 496 геномов.
Exome Variant Server http://evs.gs.washington.edu/EVS/	База данных вариантов, найденных при экзомном секвенировании нескольких крупных когорт лиц европейского и афроамериканского происхождения. Включает в себя данные о покрытии, что важно для учета информации об отсутствии варианта.
1000 Genomes Project http://browser.1000genomes.org/index.html	База данных вариантов, найденных во время геномного и таргетного секвенирования с низким и высоким покрытием в 26 популяциях. Содержит информацию о большем числе вариантов по сравнению Exome Variant Server, но включает данные низкого качества. Некоторые обследованные когорты включали родственных индивидуумов.
dbSNP http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	База данных коротких генетических вариантов (как правило, <50 п.н.), собранных из различных источников. Наряду с доброкачественными и вероятно доброкачественными вариантами содержит и множество патогенных вариантов.
dbVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar	База данных структурных вариантов (как правило, ≥50 п.н.), составленная из многих источников
Базы данных, включающие описания фенотипов	
OMIM http://www.omim.org/	База данных генов человека и генетических состояний, которая содержит репрезентативную выборку вариантов нуклеотидной последовательности, ассоциированных с заболеваниями.
Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php	База данных аннотированных вариантов нуклеотидной последовательности, опубликованных в литературе. Доступ к основной части контента требует оплаты. В базе встречаются доброкачественные и вероятно доброкачественные варианты, необходимо уточнять клиническую значимость вариантов по литературным данным.
ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	База данных утверждений о клинической значимости и фенотипической взаимосвязи вариантов. Содержит данные низкого качества, в связи с чем не рекомендуется ее использование при формировании заключений о патогенности выявленного варианта. Использование может быть ограничено только поиском ссылок на литературные источники.

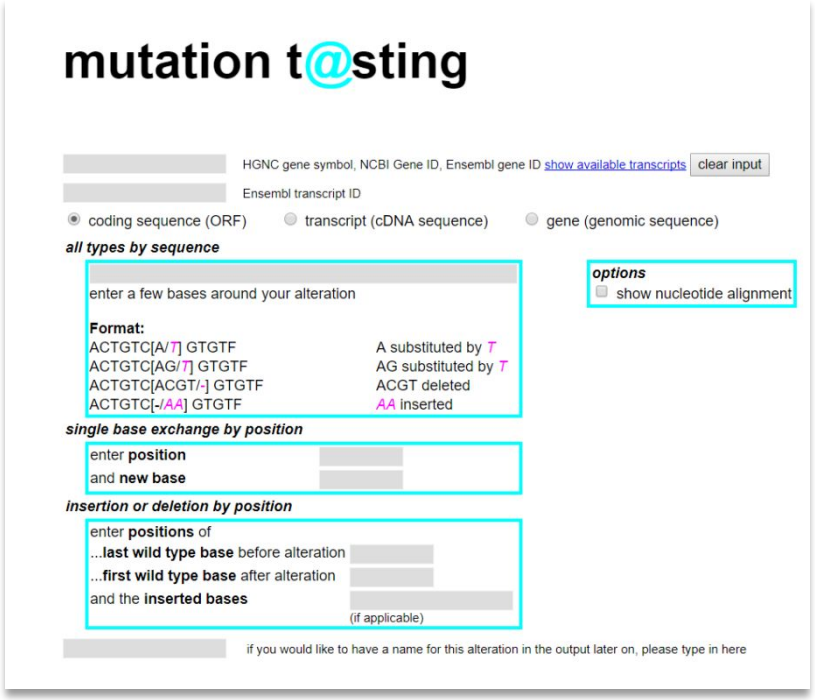
Медицинская генетика 2017, №7. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MGS).

Программы предсказания патогенности вариантов нуклеотидной последовательности (In silico)

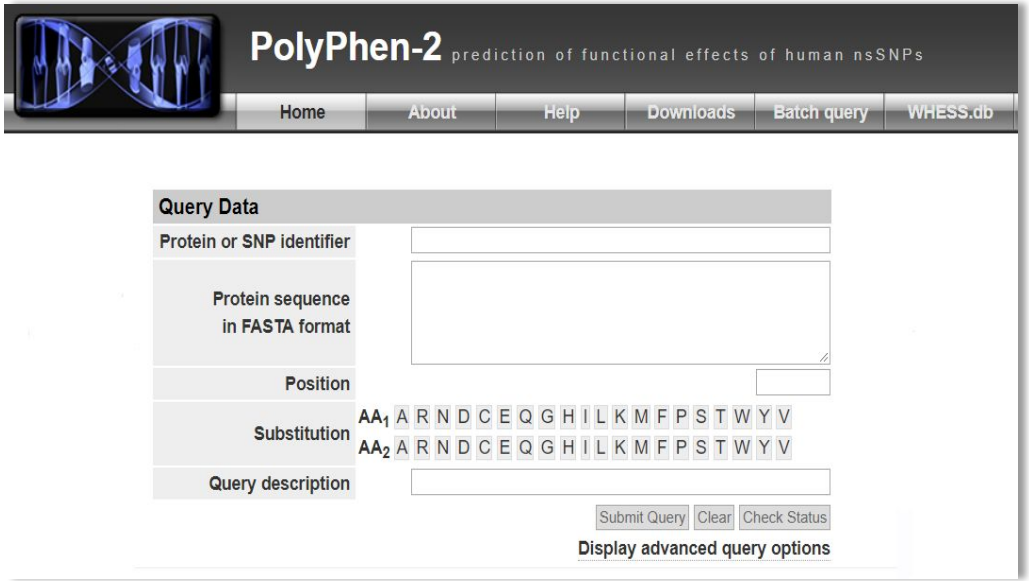
Название — Вебсайт	Основа
ConSurf — http://consurftest.tau.ac.il/	Эволюционная консервативность
FATHMM — http://fathmm.biocompute.org.uk/	Эволюционная консервативность
MutationAssessor — http://mutationassessor.org/	Эволюционная консервативность
PANTHER — http://www.pantherdb.org/tools/snpScoreForm.jsp	Эволюционная консервативность
PhD-SNP — http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html	Эволюционная консервативность
SIFT — http://sift.jcvi.org/	Эволюционная консервативность
SNPs&GO — http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/	Структура/функция белка
Миссенс-замены	
Align GVGD -http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd_input.php	Структура/функция белка и эволюционная консервативность
MAPP — http://mendel.stanford.edu/SidowLab/ downloads/ MAPP/index.html	
MutationTaster -http://www.mutationtaster.org/	
MutPred — http://mutpred.mutdb.org/	
PolyPhen-2 — http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/	
PROVEAN -http://provean.jcvi.org/index.php	Выравнивание и измерение сходства между последовательностью варианта и последовательностью гомологичного белка
SIFT — http://provean.jcvi.org/index.php	
nsSNPAnalyzer — http://snpanalyzer.uthsc.edu/	Выравнивание множества последовательностей и анализ структуры белка
Condel — http://bg.upf.edu/fannsdb/	Объединяет SIFT, PolyPhen-2 и MutationAssessor
Изменения в сайтах сплайсинга	
GeneSplicer — http://ccb.jhu.edu/software/genesplicer/	Модели Маркова
Human Splicing Finder — http://www.umd.be/HSF/	Основанное на положении варианта
MaxEntScan — http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/ Xmaxentscanscoreseq.html	Принцип максимальной энтропии
NetGene2 — http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/	Нейронные сети
NNSplice — http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html	Нейронные сети
ASSP — http://wangcomputing.com/assp/	Нейронные сети
FSPLICE — http://www.softberry.com/berry.phtml? topic=fsplice& group=programs&subgroup=gfind	Видоспецифичный предиктор сайтов-сплайсинга, основанный на модели весовой матрицы

Медицинская генетика 2017, №7. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MGS).

MutationTaster
www.mutationtaster.org



Polyphen2
http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/



Критерии для интерпретации вариантов

Для каждого варианта нуклеотидной последовательности специалист подбирает подходящие признаки, которые затем объединяет в соответствии с приведенными критериями:

1. Патогенный (p): Очень сильный (pvs1), Сильный (ps1-4), Средний (pm1-5), Вспомогательный (pp1-5)
2. Вероятно патогенный
3. Неопределенного значения
4. Доброкачественный(b): Очень сильный (ba1), Сильный (bs1-4), Вспомогательный (bp1-6)
5. Вероятно доброкачественный

Если вариант не отвечает критериям любого набора, или доказательства патогенности и доброкачественности противоречивы, то такой вариант следует считать вариантом ***неопределенного значения***

Правила комбинирования критериев для интерпретации вариантов

Патогенный вариант	1. 1 очень сильный критерий (PVS1) и a. 1 сильный (PS1-PS4) или b. 2 и более средних (PM1-PM5) или c. 1 средний (PM1-PM5) и 1 вспомогательный (PP1-PP5) d. 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) 2. 2 и более сильных (PS1-PS4) критериев 3. 1 сильный критерий (PS1-PS4) и a. 3 и более средних (PM1-PM5) или b. 2 средних (PM1-PM5) и 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) или c. 1 средний (PM1-PM5) и 4 и более вспомогательных (PP1-PP5)
Вероятно патогенный вариант	1. 1 очень сильный (PVS1) и 1 средний (PM1-PM5) 2. 1 сильный (PS1-PS4) и 1-2 средних (PM1-PM5) 3. 1 сильный (PS1-PS4) и 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) 4. 3 и более средних (PM1-PM5) 5. 2 средних (PM1-PM5) и 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) 6. 1 средний (PM1-PM5) и 4 и более вспомогательных (PP1-PP5)
Вариант неопределенного значения	1. Вариант не описывается ни одним критерием 2. Критерии доброкачественности и патогенности противоречат друг другу
Вероятно доброкачественный вариант	1. 1 сильный (BS1-BS4) и 1 вспомогательный (BP1-BP6) 2. 2 и более вспомогательных (BP1-BP6)
Доброкачественный вариант	1. 1 очень сильный (BA1) или 2. 2 сильных (BS1-BS4)

Медицинская генетика 2017, №7. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MGS).

Пример медицинского заключения

Пример 1: Выявлен патогенный вариант нуклеотидной последовательности при заболевании с АР типом наследования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ
по результатам секвенирования ДНК (панель «Эпилепсии»)

Пациент:
Фамилия
Имя
Отчество
Пол: М/Ж
Дата рождения: дд.мм.гг
Вид материала: Кровь (венозная)
Дата забора: дд.мм.гг
Диагноз: Симптоматическая эпилепсия.

Патогенные варианты нуклеотидной последовательности, являющиеся вероятной причиной заболевания

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
TPP1	chr11:6638271G>A	A/A	6	c.622C>T	p.Arg208*	0,0173159%	NM_000391.3	176x

** Частоты аллелей приведены по базе Exome Aggregation Consortium (выборка до 60702 человек). н/д = нет данных (не описан)*

Медицинская генетика 2017, №7. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MGS).

Спасибо за внимание!