Л е к ц и я № 5

Компьютерная геномика
Секвенирование

Разработал профессор П. М. Васильев
Кафедра фармакологии и биоинформатики

Для студентов, обучающихся по направлению 06.03.01 «Биология»
профили Биохимия, Генетика
при изучении дисциплины «Биоинформатика»

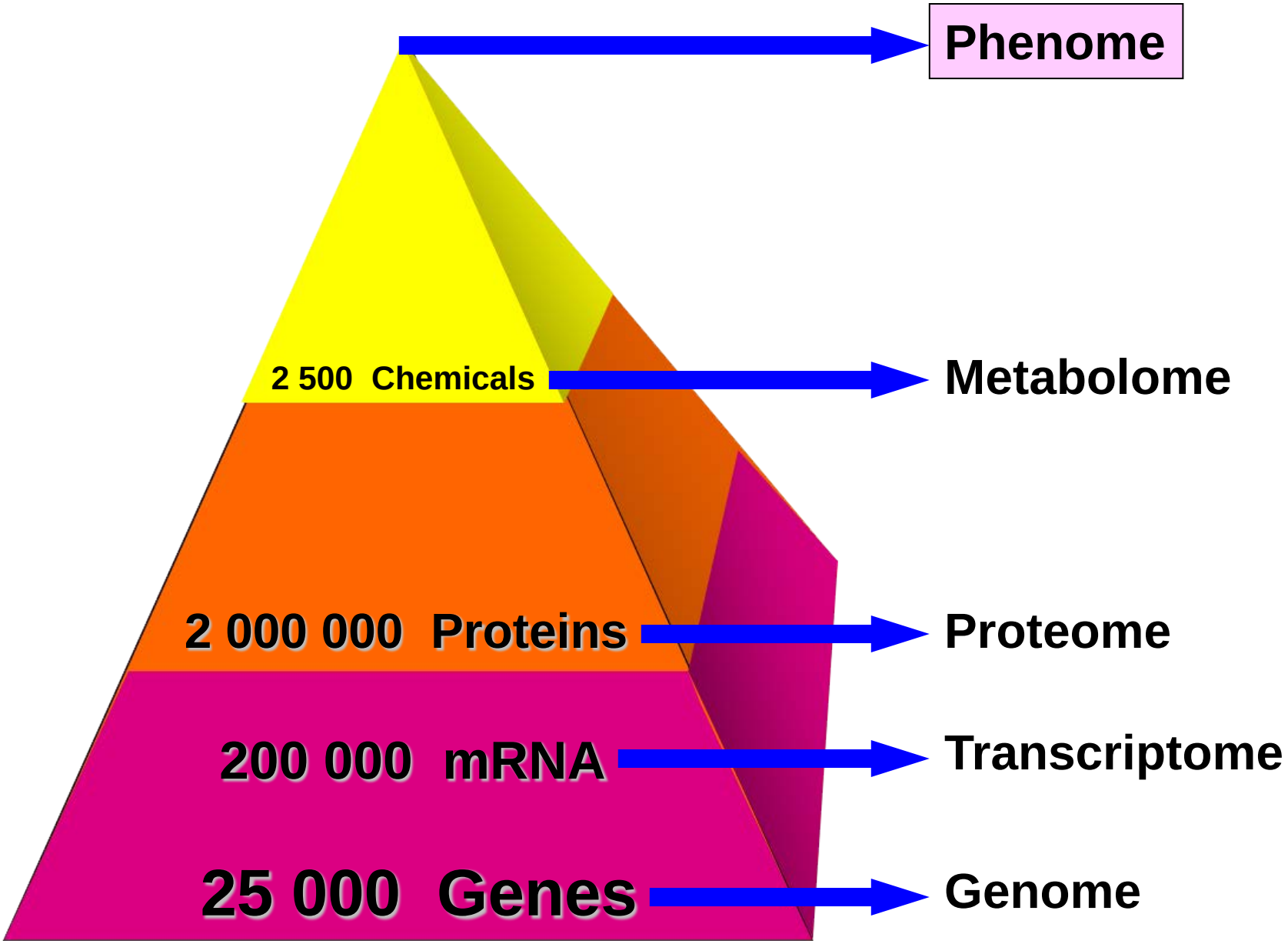
План лекции

- **Геном, транскриптом, протеом, метаболом: механизмы формирования.**
- **Геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика.**
- **Методы секвенирования.**
- **Полимеразная цепная реакция (ПЦР).**
- **Генотипирование.**
- **Структура генома.**
- **Типы мутаций.**

Компьютерная геномика

- Предсказание генов в последовательностях
- Предварительная аннотация по сходству белковых последовательностей
- Сравнительный анализ геномов
- Исследование регуляции работы генов
- Поиск «пропущенных» генов
- Исследование транспортеров
- Полногеномный анализ

“Om’s” иерархия живых систем



Определения

- Геном — совокупность всей наследственной информации: не только гены, но и пространство между ними (вся молекула ДНК)
- Экзом — совокупность всех генов, функционально-значимая часть генома; ~1.3% от его общего объема
- Транскриптом — полный набор транскриптов (молекул РНК) в данный период времени при данных условиях

Определения

- Протеом — совокупность экспрессированных белков в данный период времени при данных условиях
- Метаболом — комплекс всех низкомолекулярных метаболитов с массой < 1500 Da
- Феном — сумма фенотипических черт организма

Определения

- Кодон — тройка нуклеотидов в ДНК или РНК, обычно кодирующая одну аминокислоту
- Старт-кодон — кодон мРНК, сигнализирующий о начале синтеза белка
- Стоп-кодон — кодон мРНК, сигнализирующий об окончании синтеза белка

Определения

- Ген — участок хромосомной ДНК, кодирующий белок или функциональную РНК
- Экзон — белок-кодирующая часть гена
- Интрон — не кодирующая часть гена
- Транскрипт — молекула РНК, образуется в результате транскрипции
- Секвенирование — метод определения нуклеотидной последовательности молекулы ДНК или РНК

Размеры

- Геном — ~3.2 млрд. пар нуклеотидов, из которых ~8% не расшифровано
- Экзом — ~25 тыс. генов, ~1.3% генома
- Транскриптом — ~200 тыс. мРНК
- Протеом — >2 млн. белков
- Метаболом — ~2500 метаболитов и ~3500 пищевых компонентов

Human Genome Project (HGP)

NIH National Human Genome Research Institute

Begin your search here

1990 — 2003

About Genomics | Research Funding | Research at NHGRI | Health | Careers & Training | News & Events | About NHGRI

Home / About Genomics / **The Human Genome Project**

The Human Genome Project

The Human Genome Project (HGP) was one of the great feats of exploration in history. Rather than an outward exploration of the planet or the cosmos, the HGP was an inward voyage of discovery led by an international team of researchers looking to sequence and map all of the genes -- together known as the genome -- of members of our species, *Homo sapiens.* Beginning on October 1, 1990 and completed in April 2003, the HGP gave us the ability, for the first time, to read nature's complete genetic blueprint for building a human being.

https://www.genome.gov/human-genome-project

1000 Genomes Project

IGSR: The International Genome Sample Resource

Providing ongoing support for the 1000 Genomes Project data

2008 — 2012

Home About Data Portal Analysis Contact Browser FAQ

Search 1000genomes

IGSR and the 1000 Genomes Project

Populations: - African; - American; - East Asian; - European; - South Asian;

Links

- Announcements
- IGSR Sample Collection Principles
- 1000 Genomes Project Publications
- File formats
- Software tools
- Download data
- Twitter

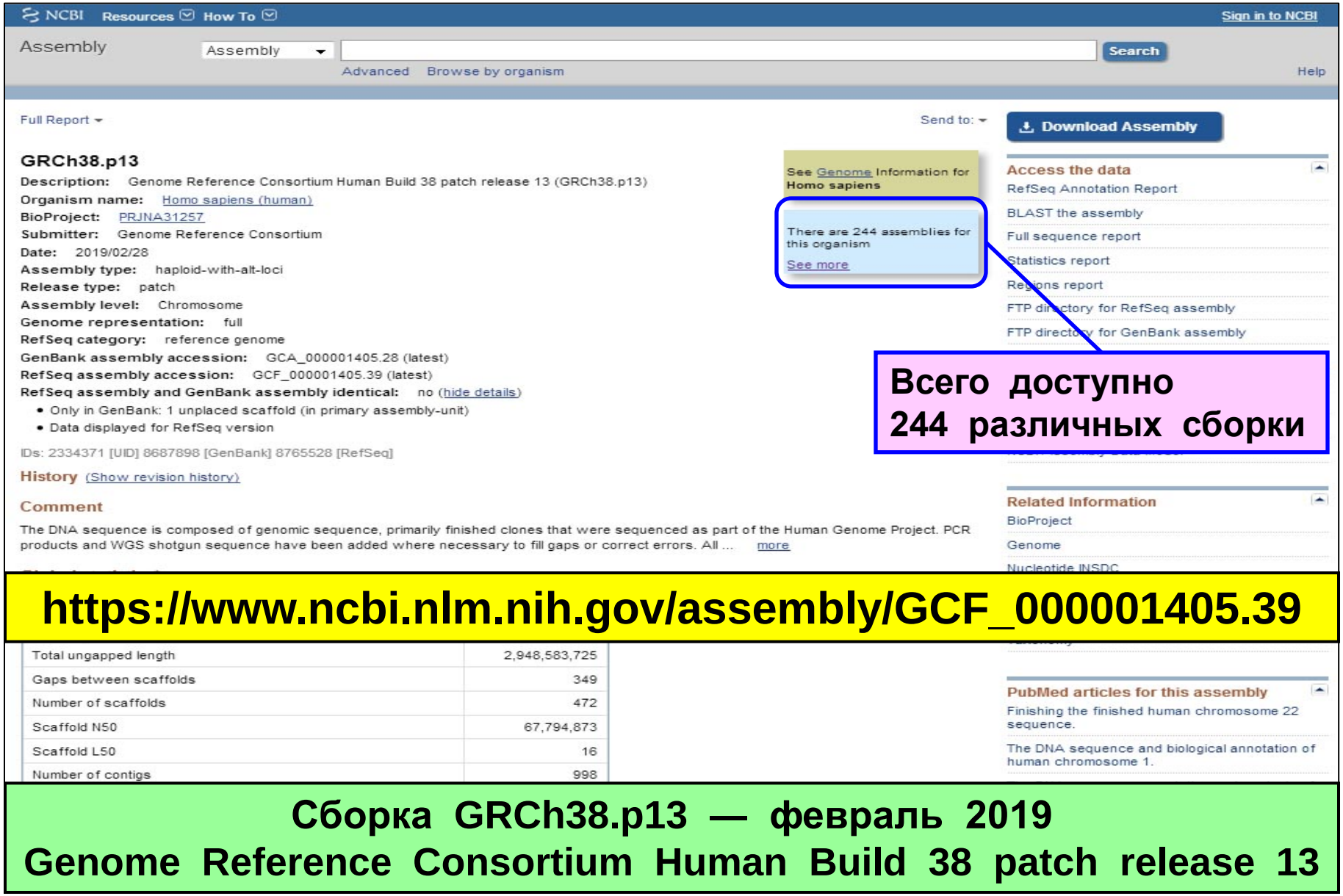
~250 тыс. геномов
26 популяций,
5 суперпопуляций

http://www.internationalgenome.org/

Референсный геном

- Абстрактный геном, собранный по результатам секвенирования геномов большого числа людей и максимально проаннотированный.
- Представляет из себя искусственную конструкцию, реально не существующую.
- Выполняет роль «стандарта» при анализе геномов всех людей: сборке генома по результатам секвенирования, анализе мутаций и т.д.

Референсный геном человека



Всего доступно
244 различных сборки

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.39

Сборка GRCh38.p13 — февраль 2019
Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 13

CHESS

CHESS
Comprehensive Human Expressed SequenceS

2017 — .....

CHESS 2.2 is a comprehensive set of human genes based on nearly 10,000 RNA sequencing experiments produced by the GTEx project. It includes a total of 20,352 protein-coding genes and 18,887 lncRNA genes. Adding antisense and other RNA genes, ts. Of these transcripts, 266,331 re

CHESS contains virtual otein-coding genes and 2,671 lncRNAs bas 018 Genome Biology paper (see reference b

Список доминантных генов
Включает данные из
RefSeq (NCBI) и GENCODE (EMBL)

CHESS 2.2 data

42,611 генов и 323,258 транскриптов:
20,352 генов, кодирующих белки
18,887 генов, кодирующих lncRNA
266,331 транскрипт изоформ генов, кодирующих белки

Browser.

CHESS gene list	This file is a table showing all 42,611 genes in CHESS release 2.2, in a tab-delimited text file with one gene per line. For each gene it provides features such as gene ID, type, gene name, source of the annotation, location(s), GFF	chess2.2.genes

http://ccb.jhu.edu/chess/

Human Proteome Project (HPP)

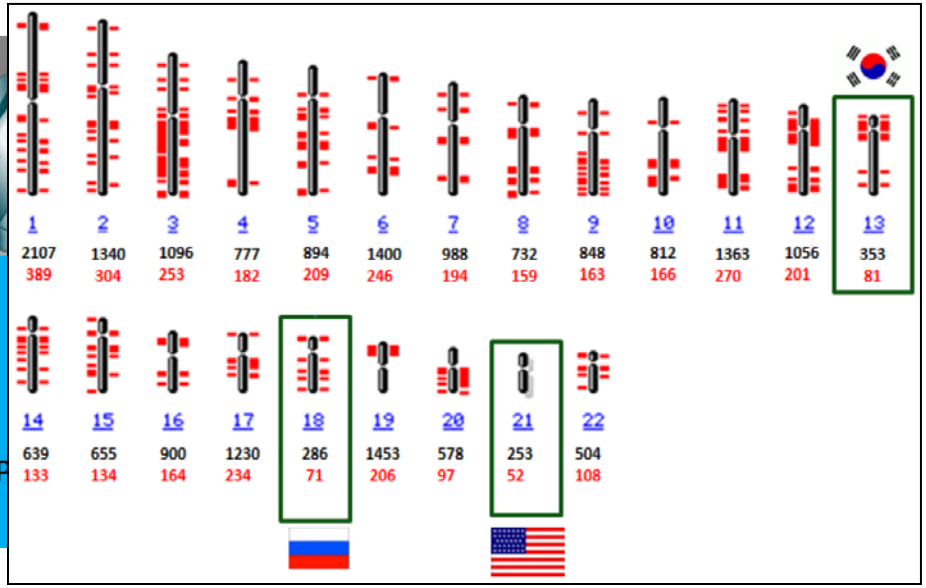
HUPO
HUMAN PROTEOME ORGANIZATION

translating
the code of life

2010 — .....

Home > The Human Proteome Project (HPP)

Human Proteome Project



HPP GUIDELINES

HPP

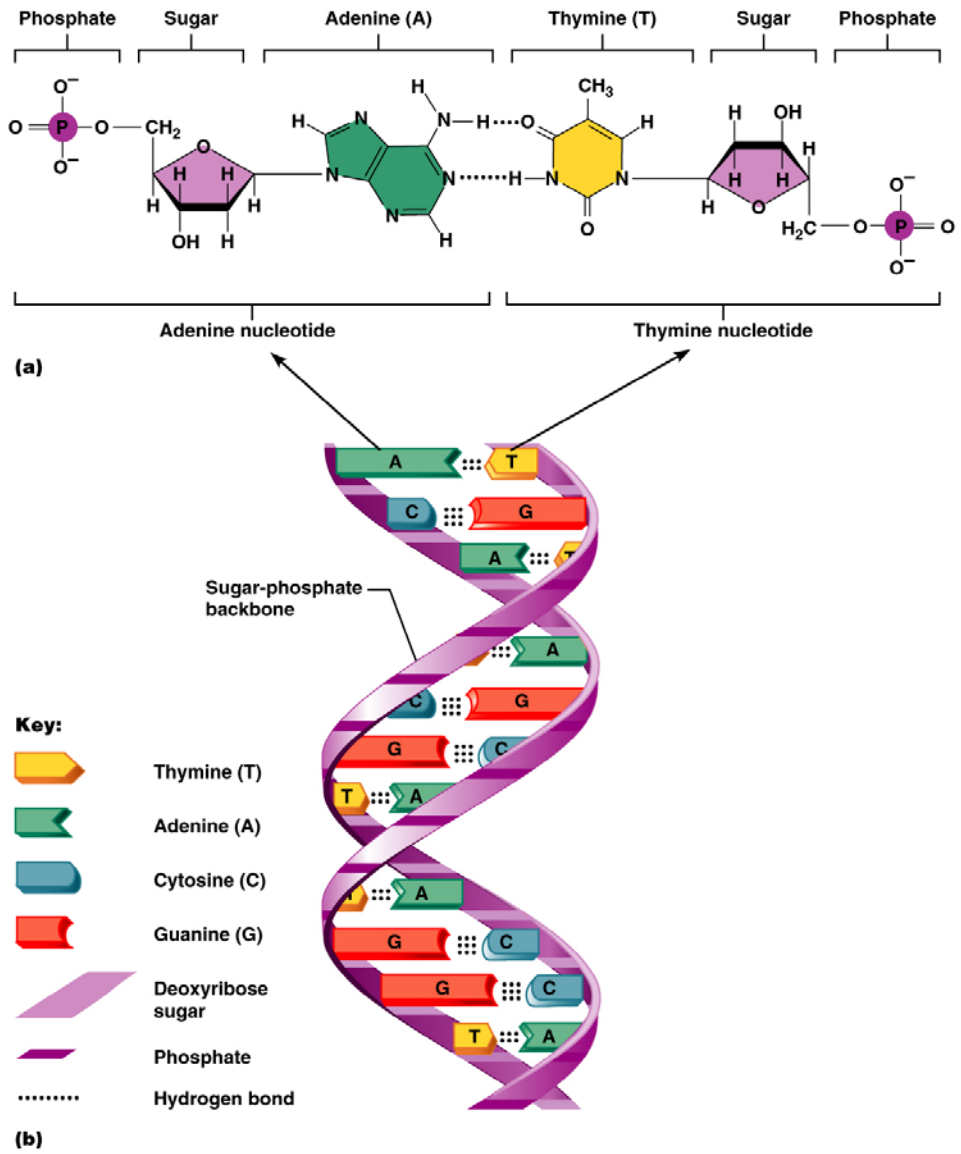
- About the HPP
- Leadership
- C-HPP
- B/D-HPP
- HPP Resource Pillars ▸
- News
- Resources
- HPP Q & A

https://hupo.org/human-proteome-project

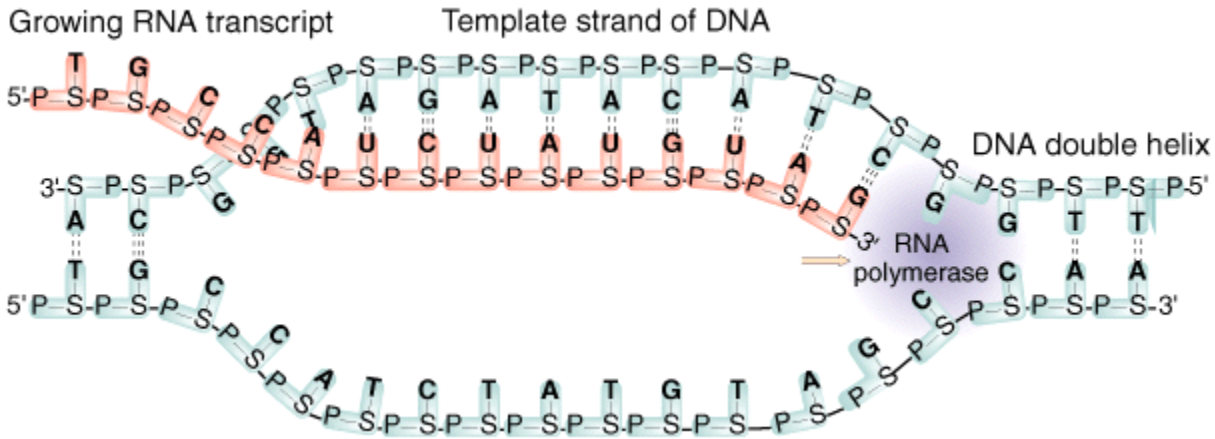
Human Metabolome Database (HMDB)

https://hmdb.ca/

Строение ДНК

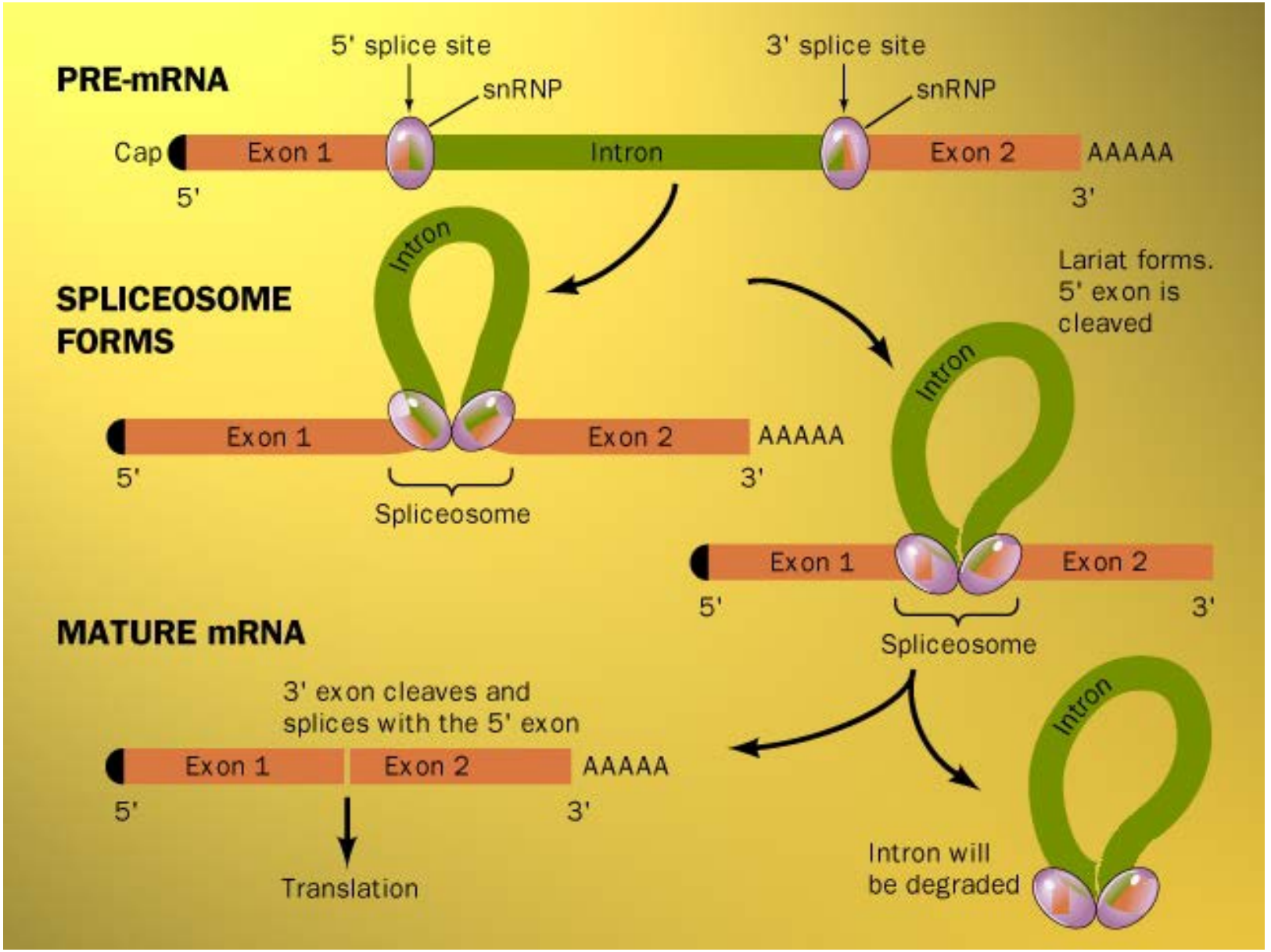


Транскрипция

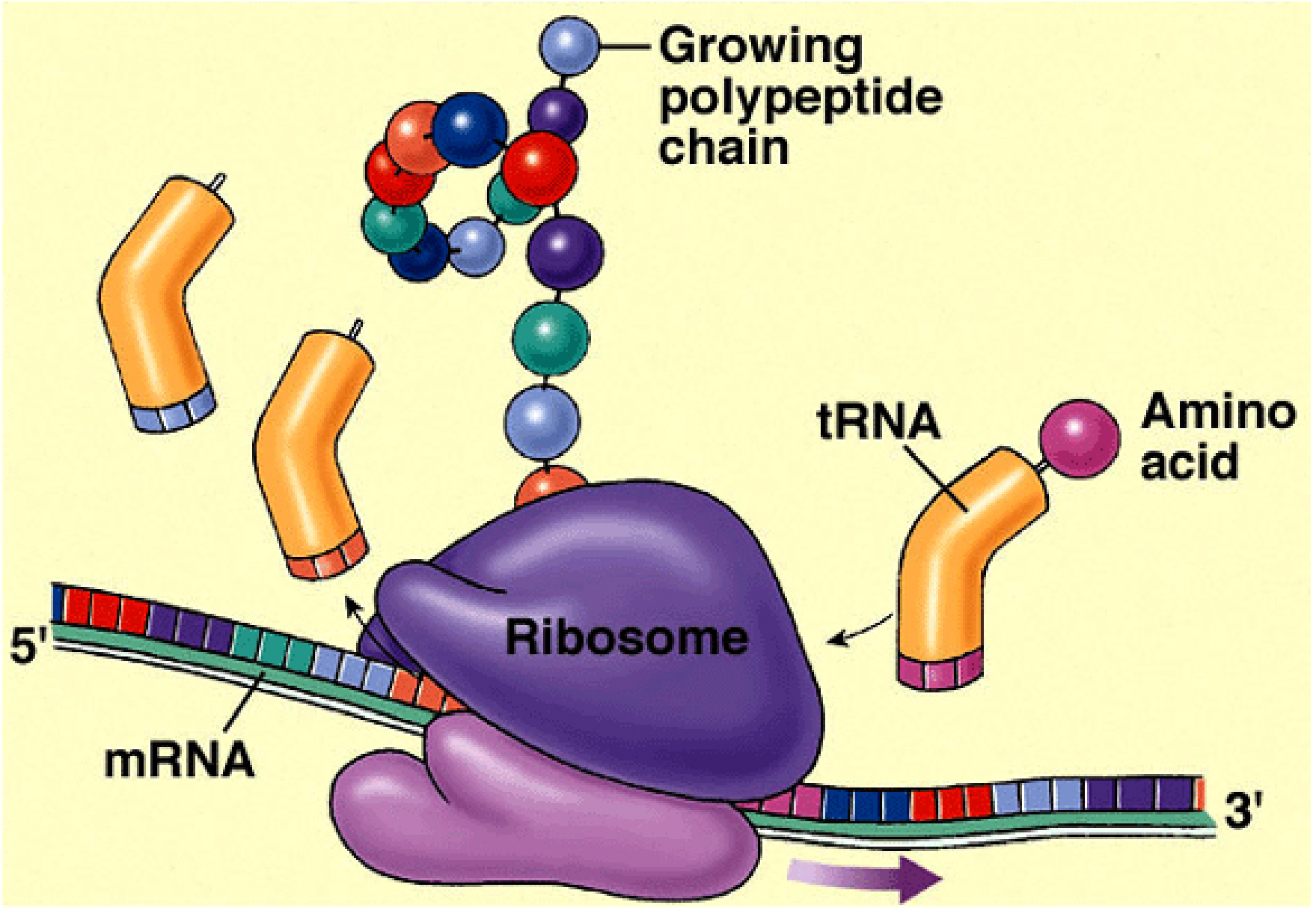


- РНК-продукт не остается комплементарно связанным с ДНК-матрицей
- По окончании синтеза двойная спираль ДНК восстанавливается
- Одноцепочечная РНК высвобождается
- синтезированные РНК – копии ограниченных участков ДНК

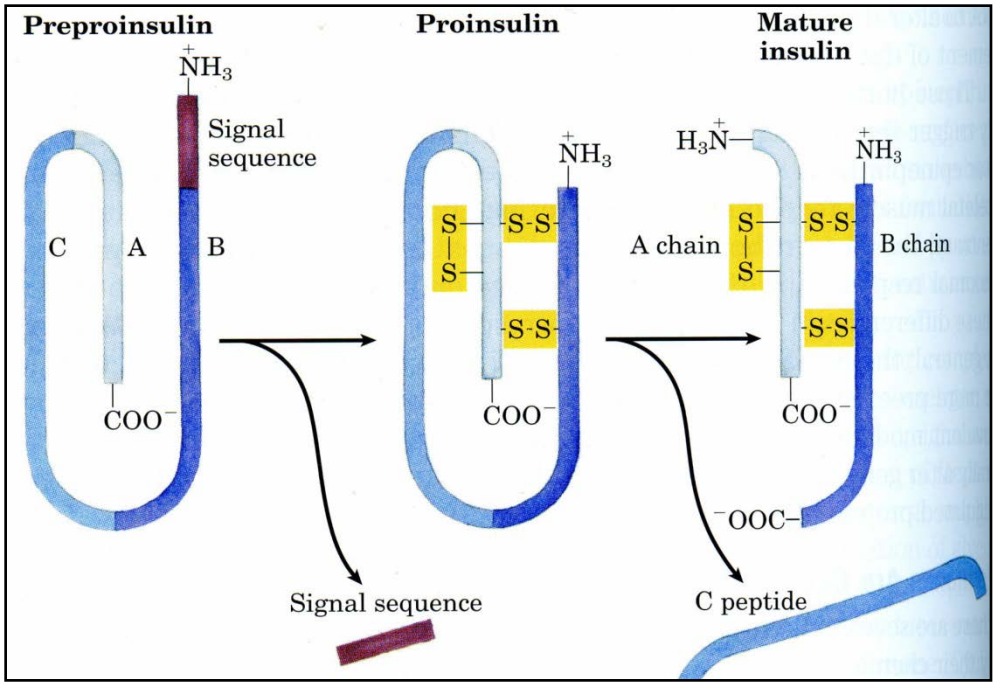
Сплайсинг

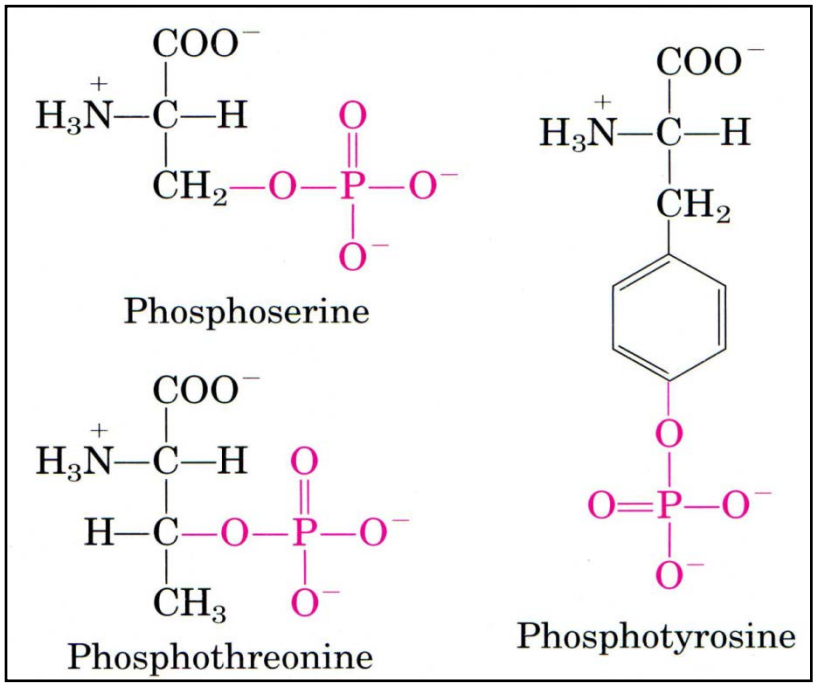

PRE-mRNA
5' splice site
snRNP
3' splice site
snRNP
Cap
Exon 1
Intron
Exon 2
AAAAA
5'
3'
SPLICEOSOME FORMS
Intron
Lariat forms. 5' exon is cleaved
Exon 1
Exon 2
AAAAA
5'
3'
Spliceosome
Intron
Exon 1
Exon 2
5'
3'
Spliceosome
MATURE mRNA
3' exon cleaves and splices with the 5' exon
Exon 1
Exon 2
AAAAA
5'
3'
Translation
Intron
Intron will be degraded

Трансляция


Growing
polypeptide
chain
tRNA
Amino
acid
Ribosome
5'
mRNA
3'

Процессинг





Фолдинг

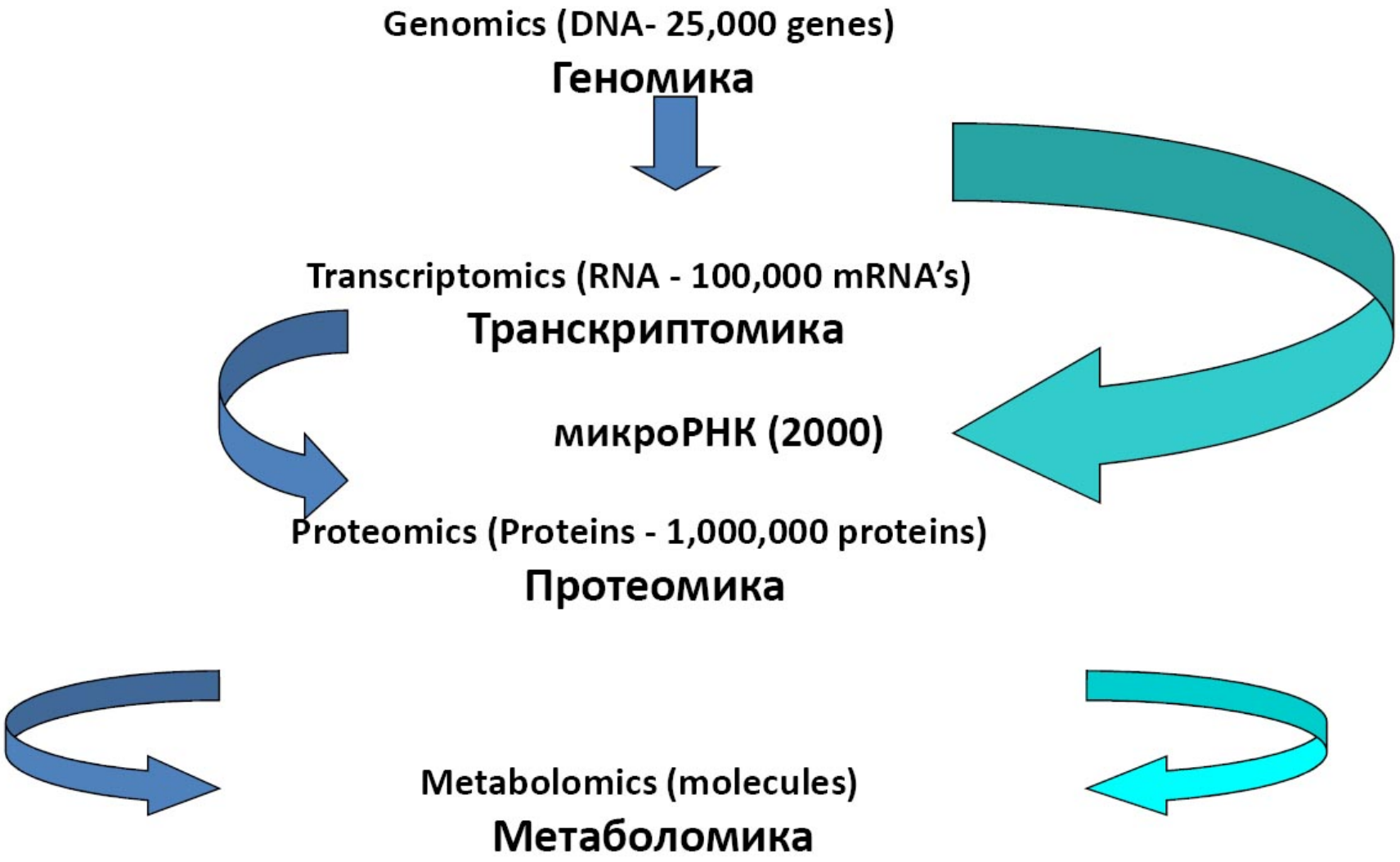
Ограниченный протеолиз

Добавление сульфидных связей

Ковалентные модификации:

- фосфорилирование
- ацетилирование
- метилирование
- гликозилирование

Иерархия Omic's технологий



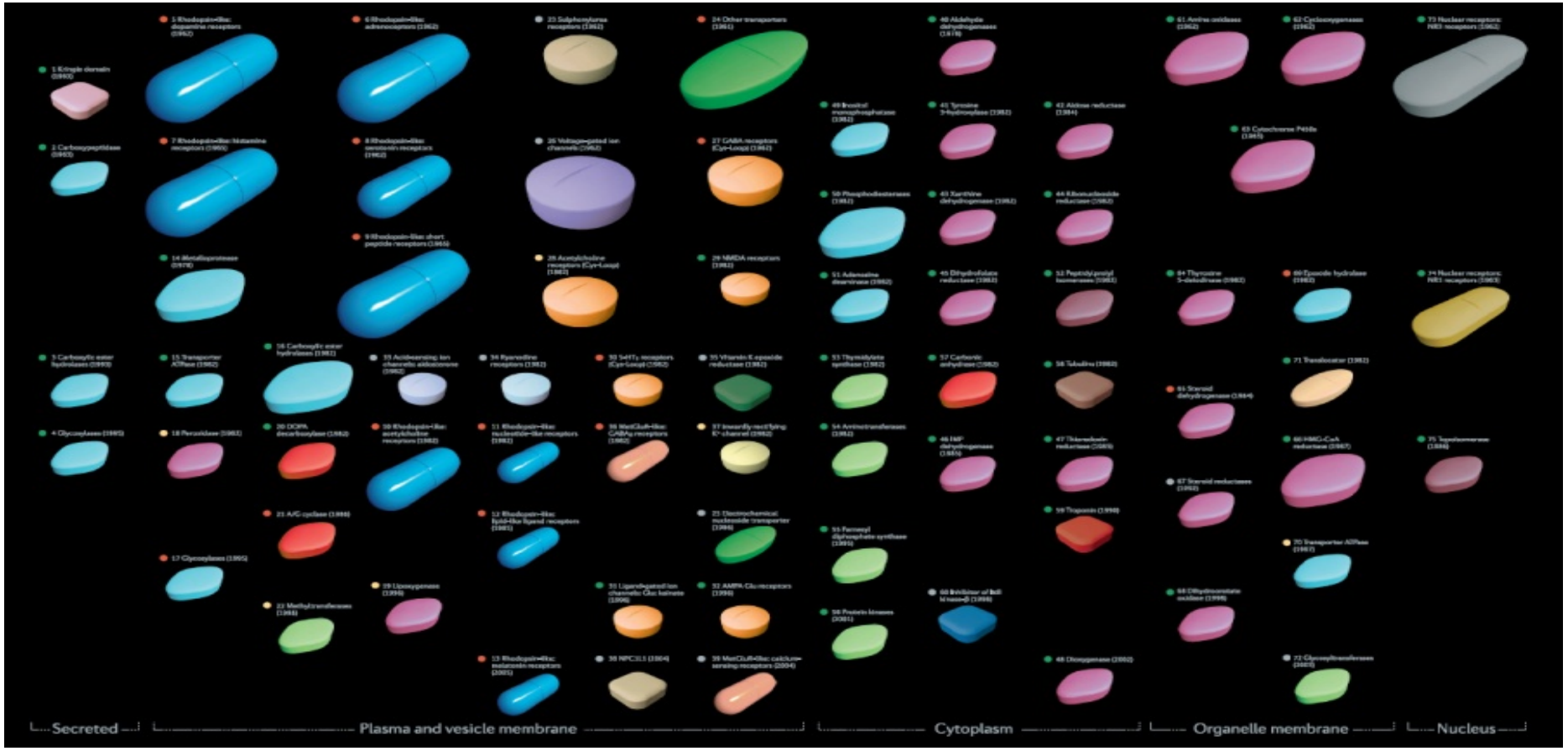
Omic's экспериментальные методы

- Геномика
  - Высокоскоростное секвенирование ДНК (HT-DNA sequencing)
- Обнаружение мутаций
  - Метод однонуклеотидного полиморфизма (SNP)
- Транскриптомика
  - Измерение генной транскрипции (Gene/Transcript measurement)
  - Серийный анализ экспрессии генов (SAGE)
  - Генные чипы
  - Микрочипы (Microarrays)
- Протеомика
  - Масс-спектрометрия (MS)
  - 2D-гель электрофорез (2D-PAGE)
  - Белковые чипы
  - Двугибридный анализ (Yeast-2-hybrid)
  - Рентгеноструктурный анализ (X-ray)
  - Ядерный магнитный резонанс (NMR)
- Метаболомика
  - Ядерный магнитный резонанс
  - Рентгеноструктурный анализ
  - Капилярный электрофорез

Протеомные проекты

- Проект «Протеом человека».
  Россия исследует белки 18 хромосомы.
- Проект «Протеом плазмы крови».
  Идентифицировано более 13 тыс. белков.
- Протеом плазмы крови включает 10 % всех белков человека.
- Найдено более 1000 новых белков-мишеней для создания лекарств.

Биомишени для создания лекарств



- GPCR
- Ферменты
- Транспортеры
- Ионные каналы
- Ядерные рецепторы
- Прочие

Размер значка

Маленький – 1 ÷ 10 лекарств

Средний – 11 ÷ 50 лекарств

Большой – > 50 лекарств

Достоверность 3D-модели

- Высокая
- Умеренная
- Низкая
- Нулевая

Overington J.P. et al. Natural Reviews: Drug Discovery, 2006, Vol. 5, No. 12, P. 993-996

Секвенирование

- Метод определения нуклеотидной последовательности молекулы ДНК
- ДНК многократно копируются и нарезаются на короткие отрезки
- Позволяет обнаружить мутации и полиморфизмы любого масштаба: от крупных хромосомных перестроек до однонуклеотидных замен

Задачи секвенирования

- Расшифровка неизвестных ДНК (секвенирование "de novo")
- Выявление индивидуальных отличий конкретного образца от референсной последовательности (ресеквенирование)
- Анализ генетических полиморфизмов, включая однонуклеотидные (SNP-типирование)
- Анализ эпигенетических модификаций ДНК (например, профиля метилирования)
- Анализ профиля экспрессии секвенированием кДНК, полученной из тотальной мРНК (диагностика вирусных и раковых заболеваний)

Стоимость секвенирования

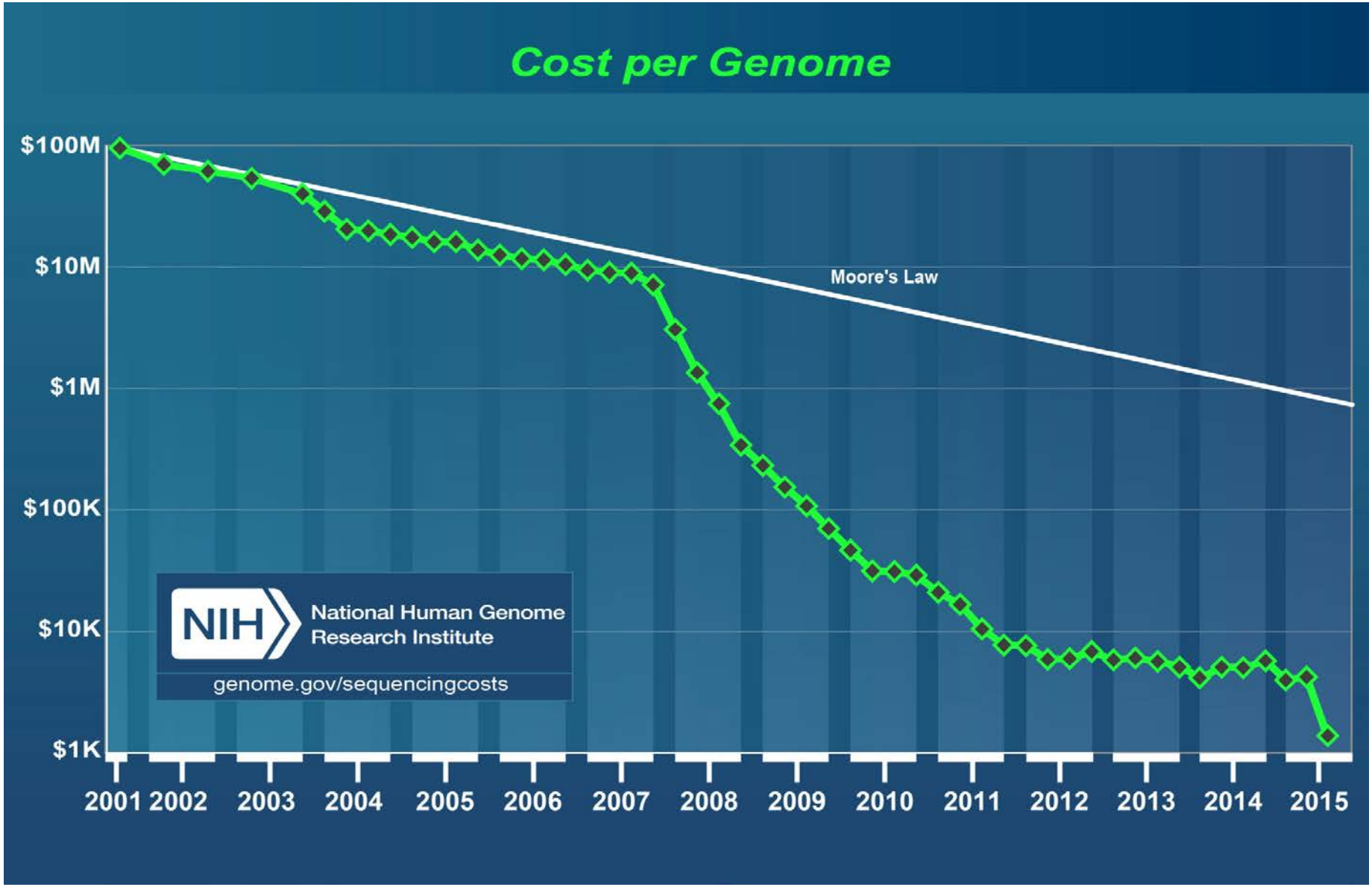
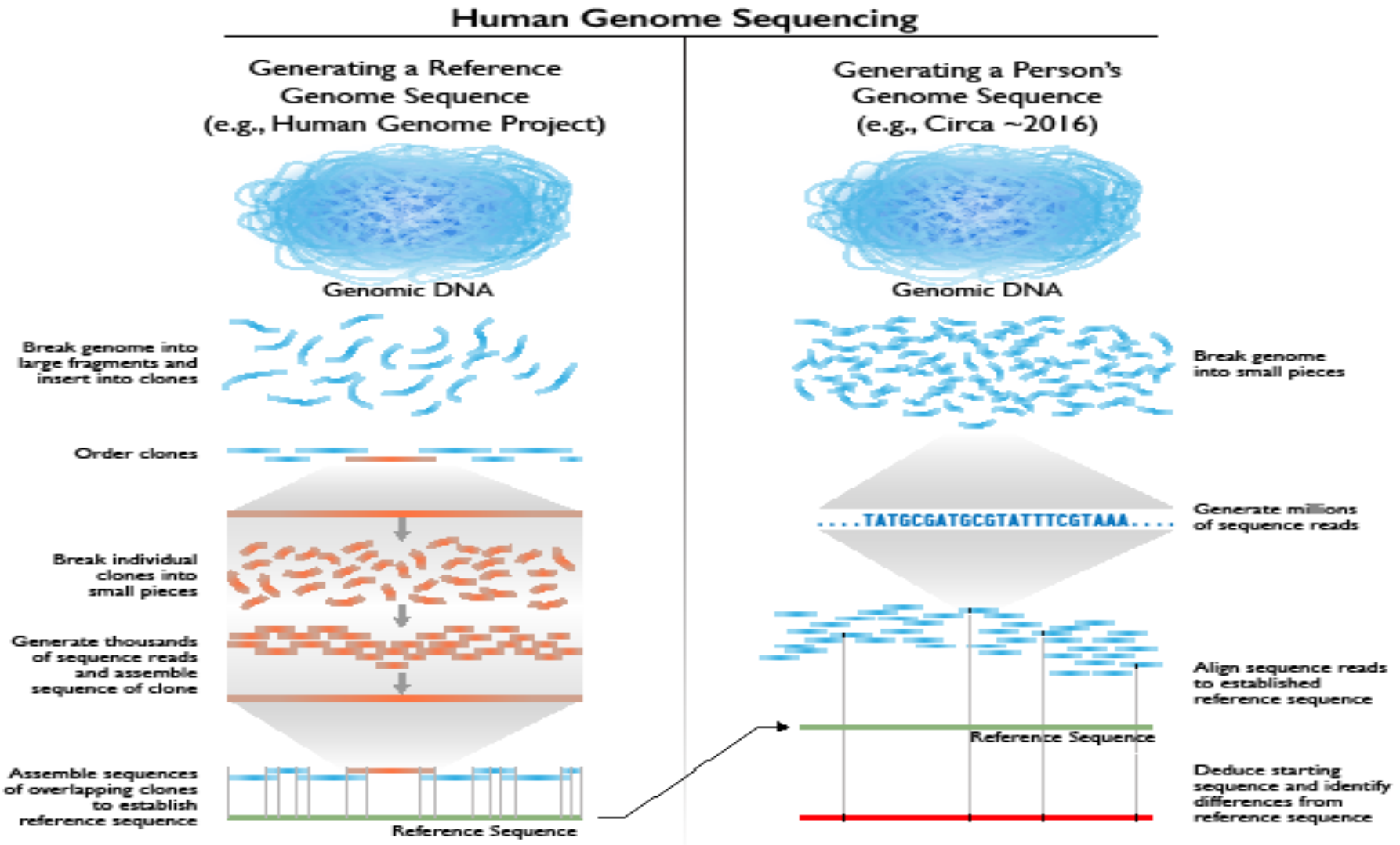


Схема секвенирования



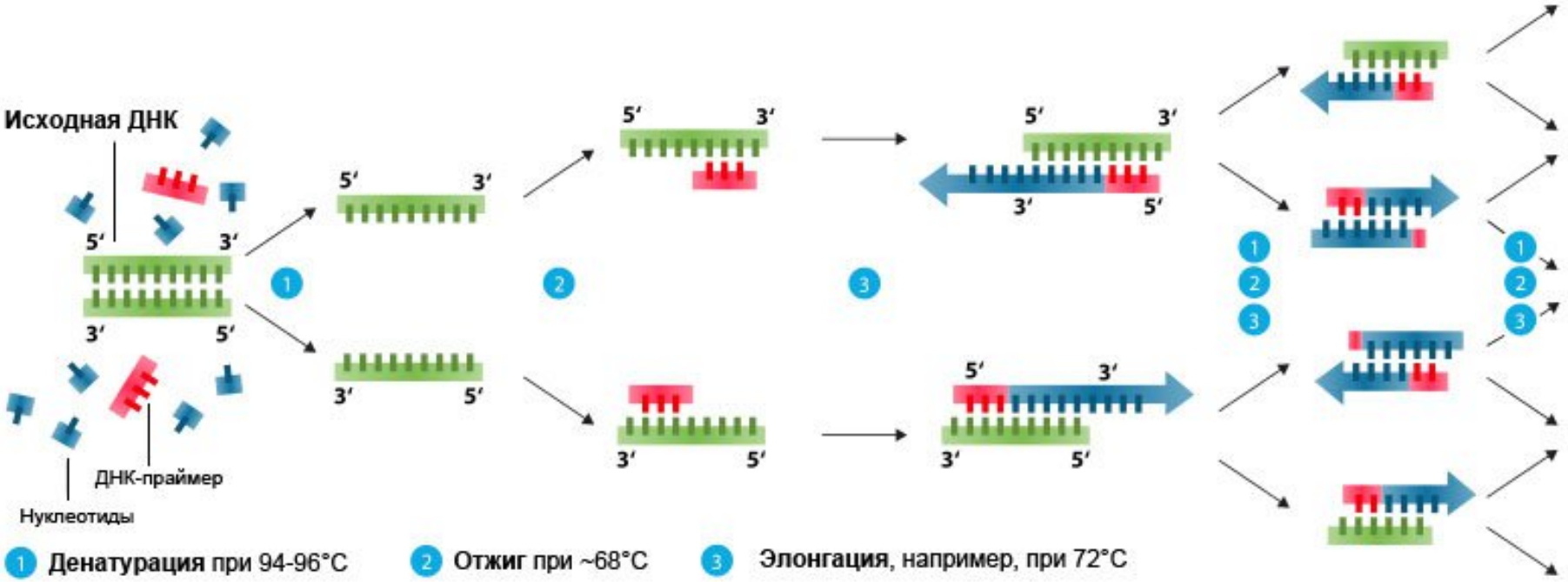
Амплификационные технологии

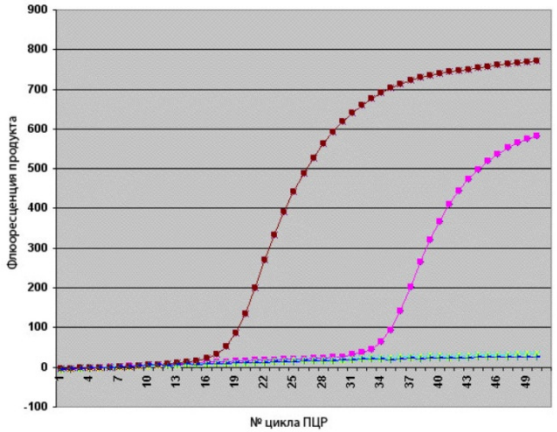
Полимеразная цепная реакция
Кэри Муллис 1983 г.
Нобелевская премия 1993 г.

Компоненты ПЦР

- ДНК-матрица
- Праймеры – олигонуклеотиды длиной 18-30 nu, комплементарные противоположным концам разных цепей ДНК-матрицы
- дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- ДНК-полимераза (Taq, Tth)

Схема ПЦР


Исходная ДНК
5′
3′
3′
5′
ДНК-праймер
Нуклеотиды
1
2
3
1 Денатурация при 94-96°C
2 Отжиг при ~68°C
3 Элонгация, например, при 72°C


Флюоресценция продукта
№ цикла ПЦР

Виды ПЦР

- Количественная ПЦР (ПЦР в реальном времени, real-time PCR)
- ПЦР in situ – ПЦР непосредственно в клетках, результаты видны под микроскопом
- ПЦР с обратной транскрипцией – используется при секвенировании РНК
- Мультипраймерная ПЦР – одновременная амплификация двух и более ДНК

Технологии секвенирования

- 1-е поколение

Sanger sequencing

- 2-е поколение

Roche

illumina

ion torrent

applied biosystems

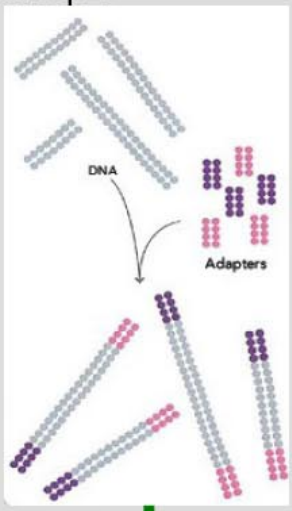
- 3-е поколение

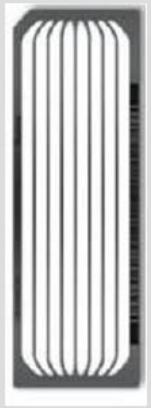
Helicos

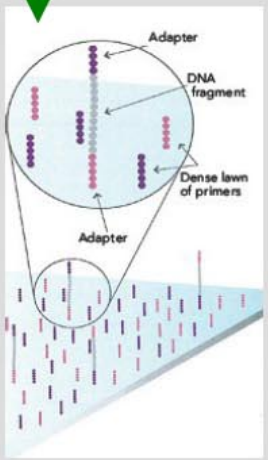
PACIFIC BIOSCIENCES

Секвенирование Illumina - принцип метода

1. ДНК фрагментируют и лигируют к фрагментам адаптеры

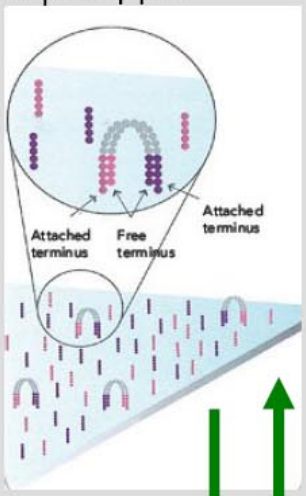




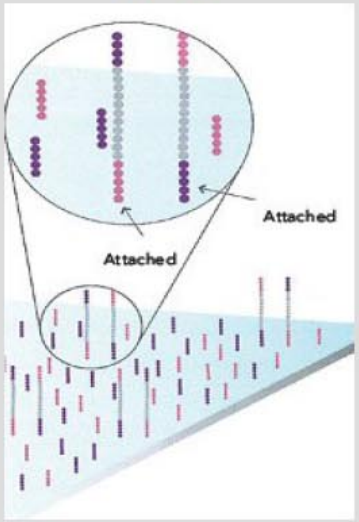


2. ДНК пропускают через каналы ячейки, покрытые праймерами, комплементарными концам адаптеров

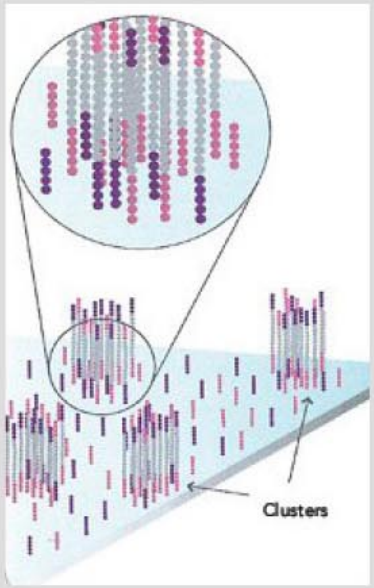
3. Через ячейку пропускают реагенты для достраивания второй цепи ДНК



4. Двуцепочечные фрагменты денатурируют

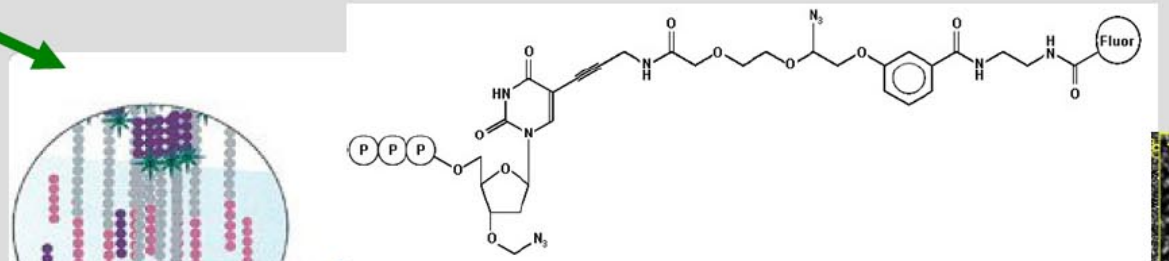


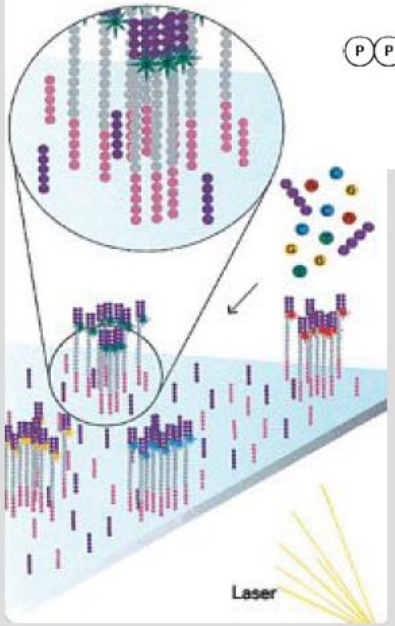
Стадии 3-4 повторяются 30-35 раз

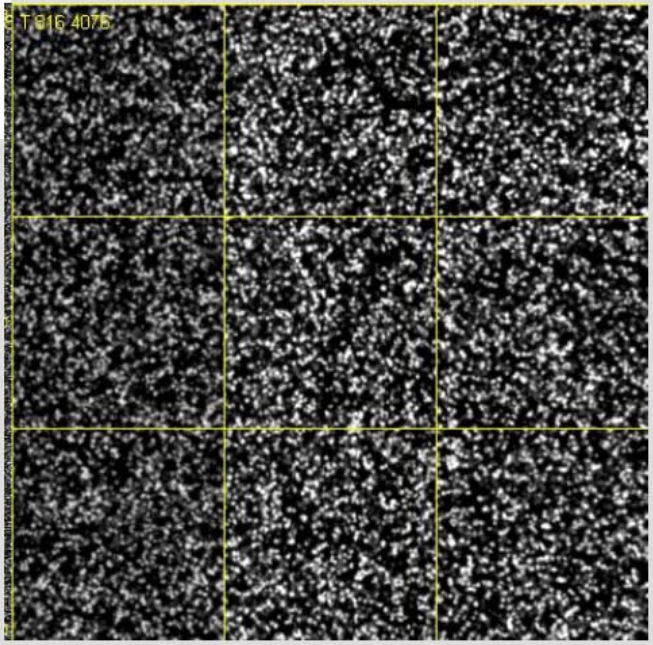


6. Каждый фрагмент оказывается окружен группой идентичных молекул («кластеры»).

Секвенирование Illumina - принцип метода







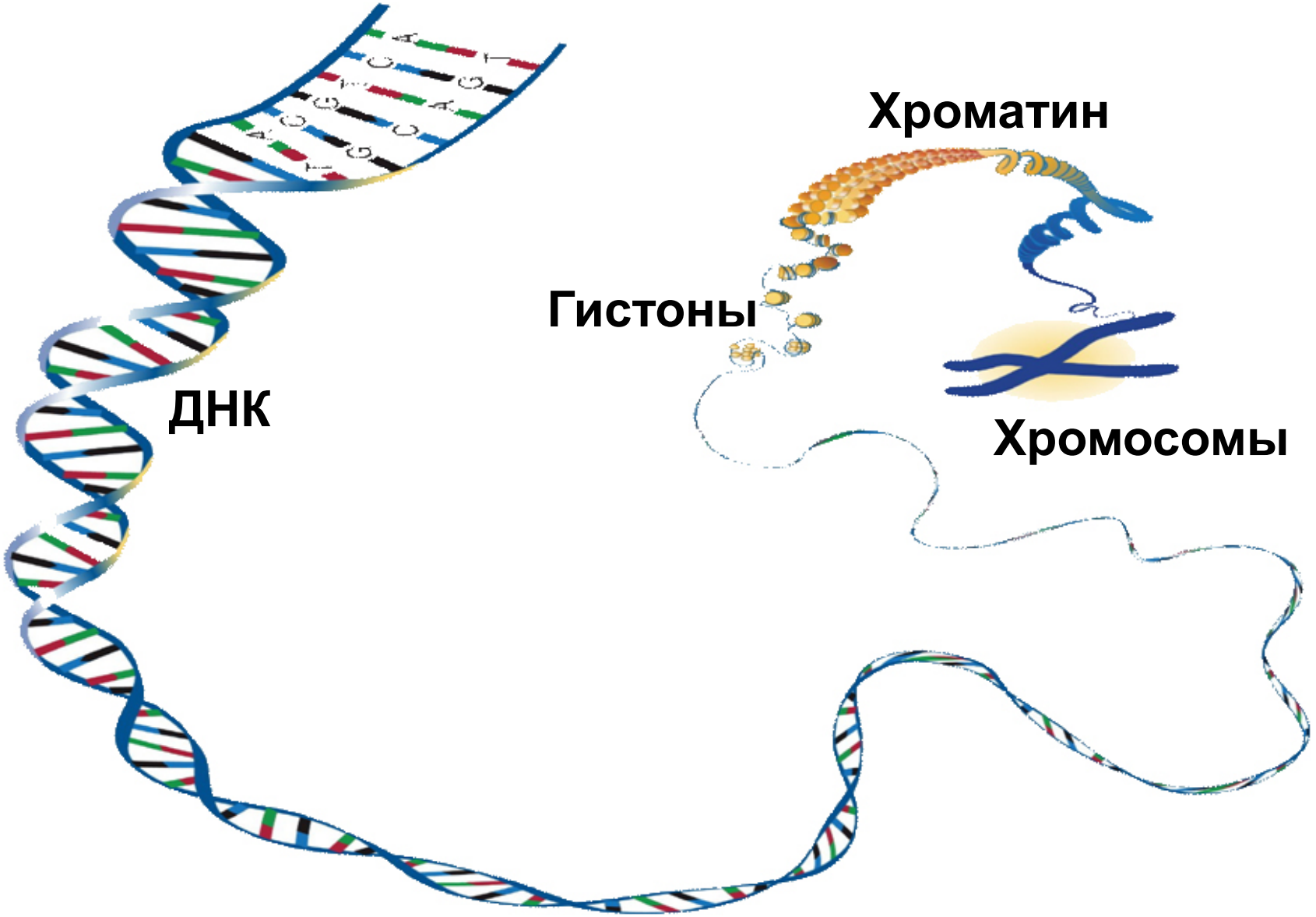
7. Через ячейку пропускают реагенты (флуоресцентно меченые терминированные dNTP и полимеразу)

8. На ячейку светят лазером и проводят съемку.

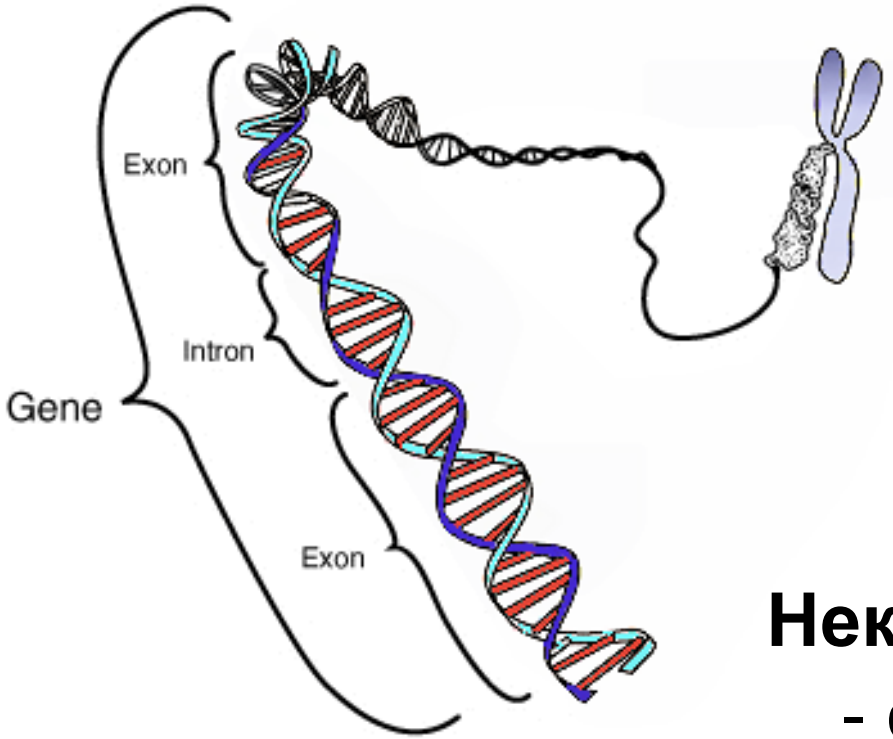
10. Повторение 7-9 нужное число раз (50-300). Число циклов соответствует длине чтения.

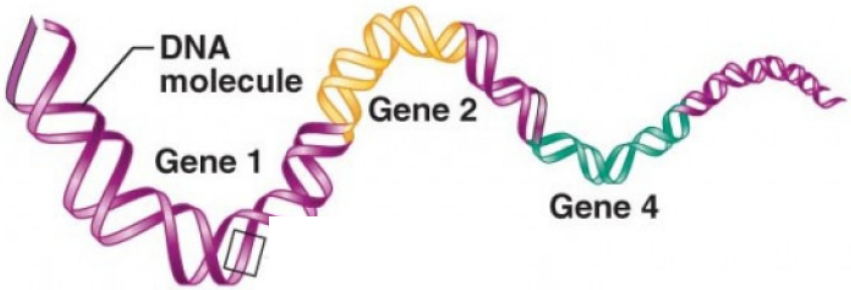
9. Через ячейку пропускают реагенты, отщепляющие флуорофор и терминатор

Структура генома



Структура генома

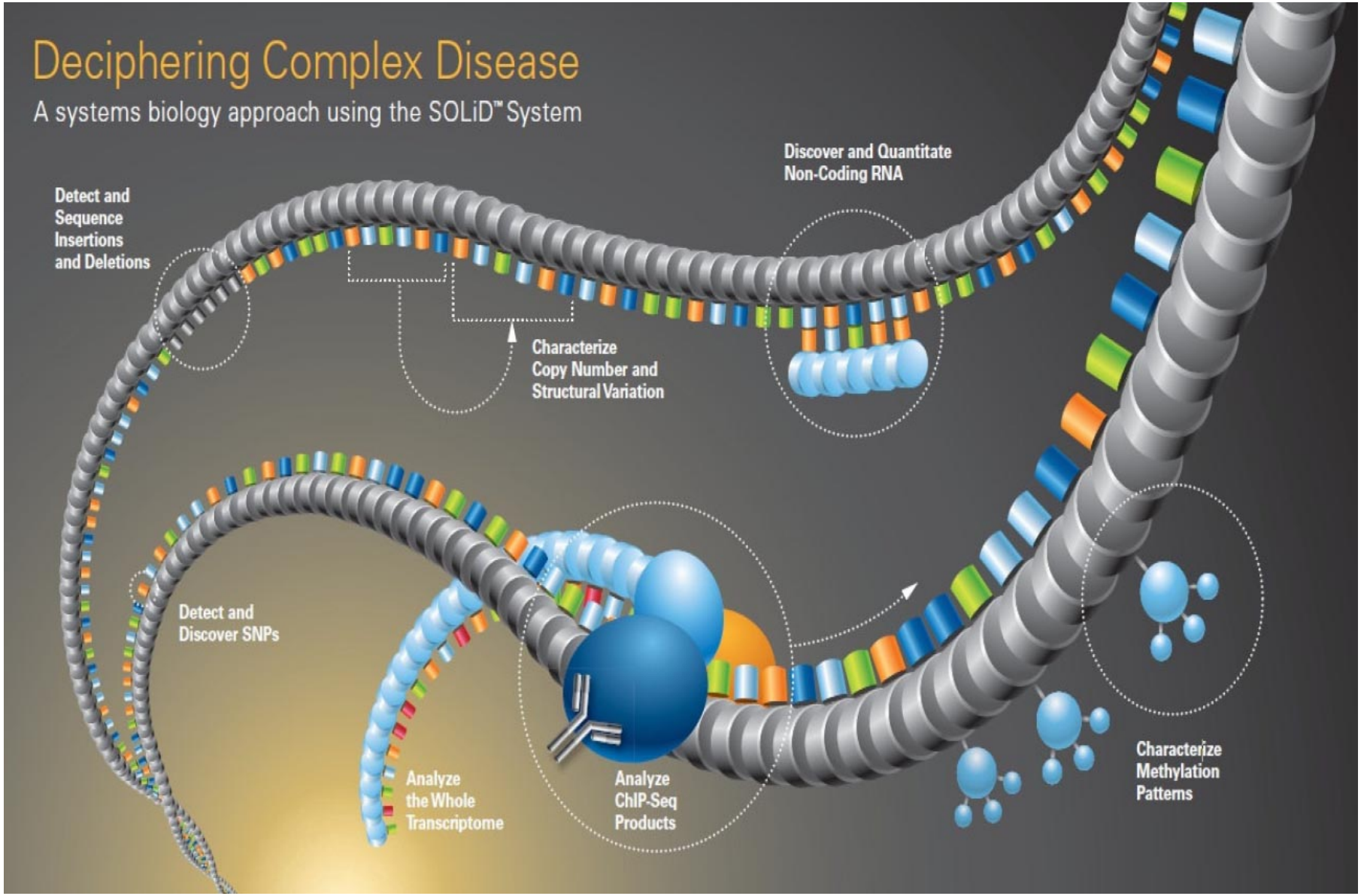




Некодирующая часть:

- области РНК
- регуляторные регионы
- ретро-транспозоны
- всевдо-гены
- и др.

Факторы заболеваний



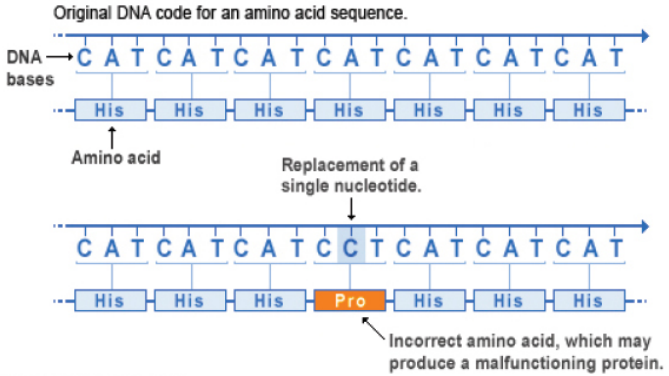
Мутации

Наследуемые изменения ДНК, различаются:

- по размеру (точечные, хромосомные, геномные)
- по влиянию (нейтральные, негативные, позитивные)
- по способу возникновения (случайные, индуцированные)
- по возможности наследования (соматические, половые)
- по отклонению от нормы (прямые, обратные, супрессорные)

Мутации

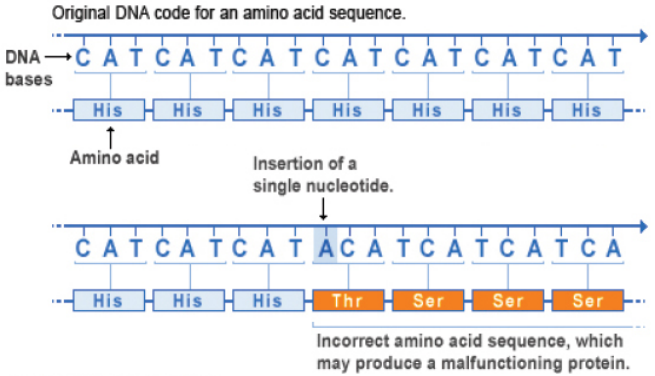
MISSENSE MUTATION — Замены



U.S. National Library of Medicine

This type of mutation is a change in one DNA base pair that results in the substitution of one amino acid for another in the protein made by a gene.

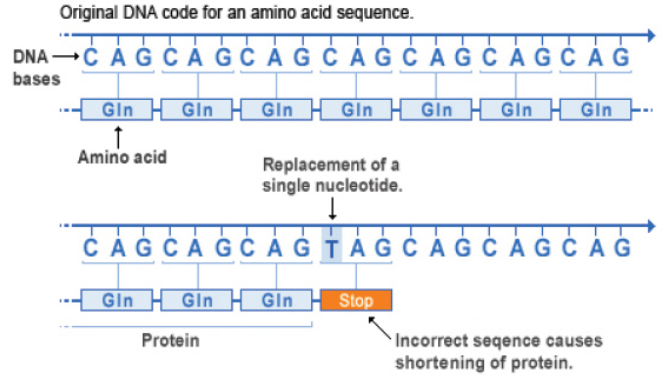
INSERTION — Вставки



U.S. National Library of Medicine

An insertion changes the number of DNA bases in a gene by adding a piece of DNA. As a result, the protein made by the gene may not function properly.

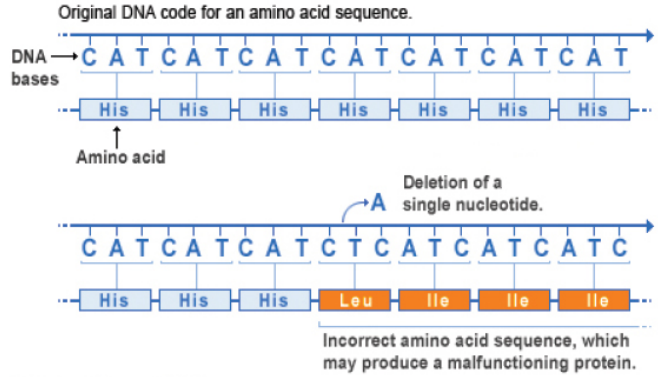
NONSENSE MUTATION — Нонсенсы



U.S. National Library of Medicine

A nonsense mutation is also a change in one DNA base pair. Instead of sub stituting one amino acid for another, however, the altered DNA sequence prematurely signals the cell to stop building a protein. This type of mutation results in a shortened protein that may function improperly or not at all.

DELETION — Делеции

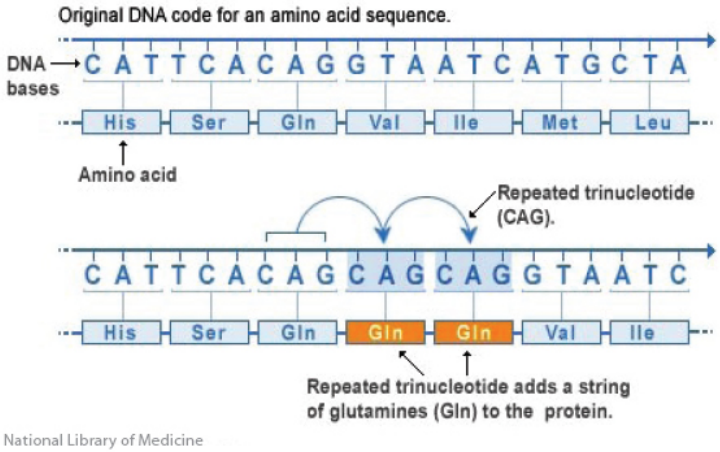


U.S. National Library of Medicine

A deletion changes the number of DNA bases by removing a piece of DNA. Small deletions may remove one or a few base pairs within a gene, while larger deletions can remove an entire gene or several neighboring genes. The deleted DNA may alter the function of the resulting protein(s).

Мутации

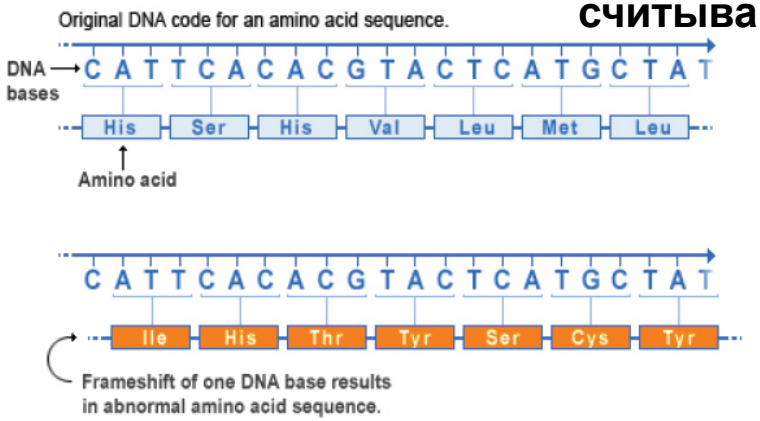
REPEAT EXPANSION — Повторы



U.S. National Library of Medicine

Nucleotide repeats are short DNA sequences that are repeated a number of times in a row. For example, a trinucleotide repeat is made up of 3-base-pair sequences, and a tetranucleotide repeat is made up of 4-base-pair sequences. A repeat expansion is a mutation that increases the number of times that the short DNA sequence is repeated. This type of mutation can cause the resulting protein to function improperly.

FRAMESHIFT MUTATION — Изменение рамки считывания

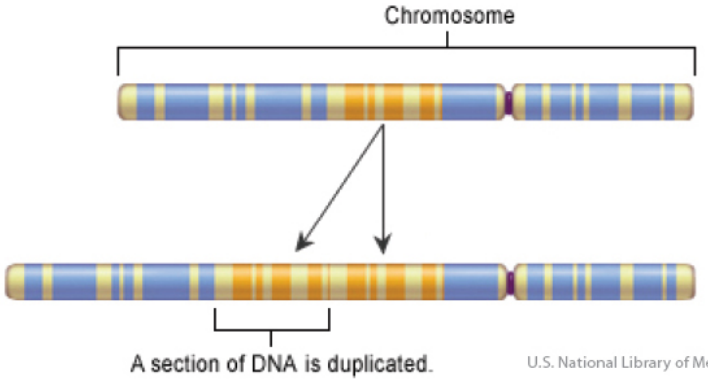


U.S. National Library of Medicine

This type of mutation occurs when the addition or loss of DNA bases changes a gene's reading frame. A reading frame consists of groups of 3 bases that each code for one amino acid. A frameshift mutation shifts the grouping of these bases and changes the code for amino acids. The resulting protein is usually nonfunctional. Insertions, deletions, and duplications can all be frameshift mutations.

DUPLICATION — Дублирование

A duplication consists of a piece of DNA that is abnormally copied one or more times. This type of mutation may alter the function of the resulting protein.



U.S. National Library of Medicine

Source: http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/mutationsanddisorders/possiblemutations


To be continued ...