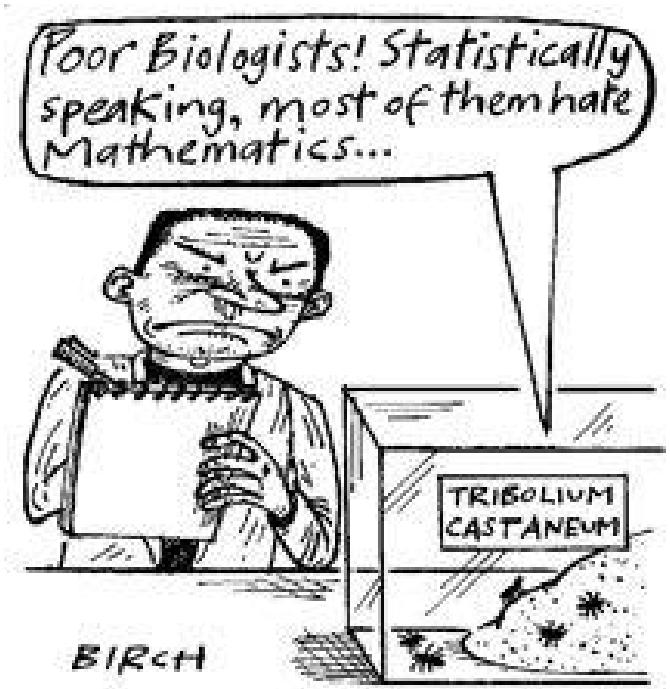

intro@bioinformatics:~$
Александр Предеус
Институт Биоинформатики

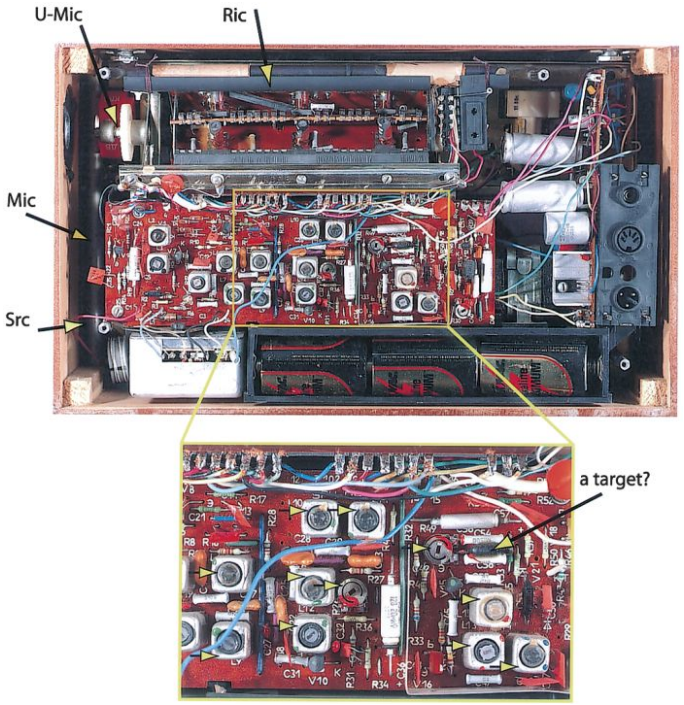
Биология и математика

- нормальное развитие естественной науки подразумевает увеличение количественных моделей
- описательная стадия → научные модели → инженерия
- биология избегала этого очень долго!



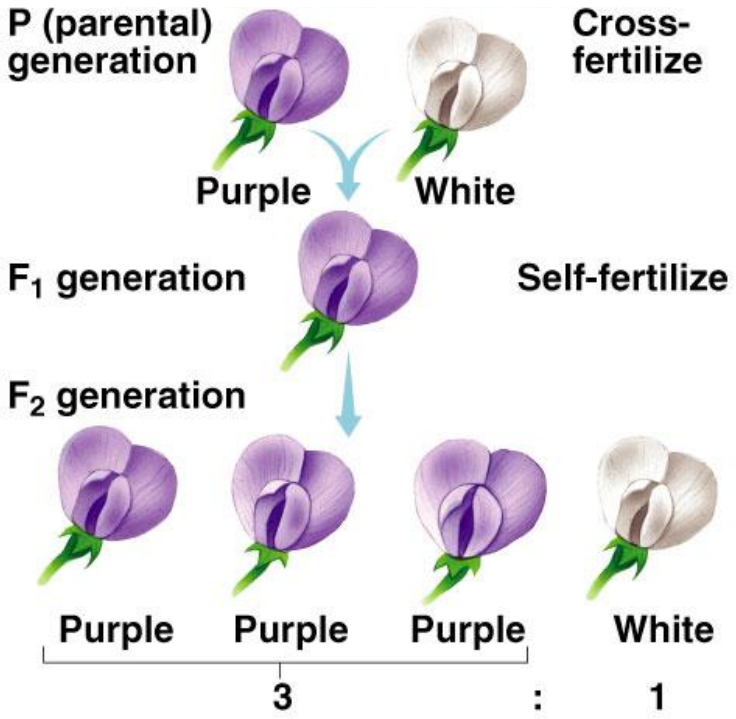
Способен ли биолог починить радио?

- “Can biologist fix a radio - Or, what I have learnt while studying apoptosis”, by Yury Lazebnik



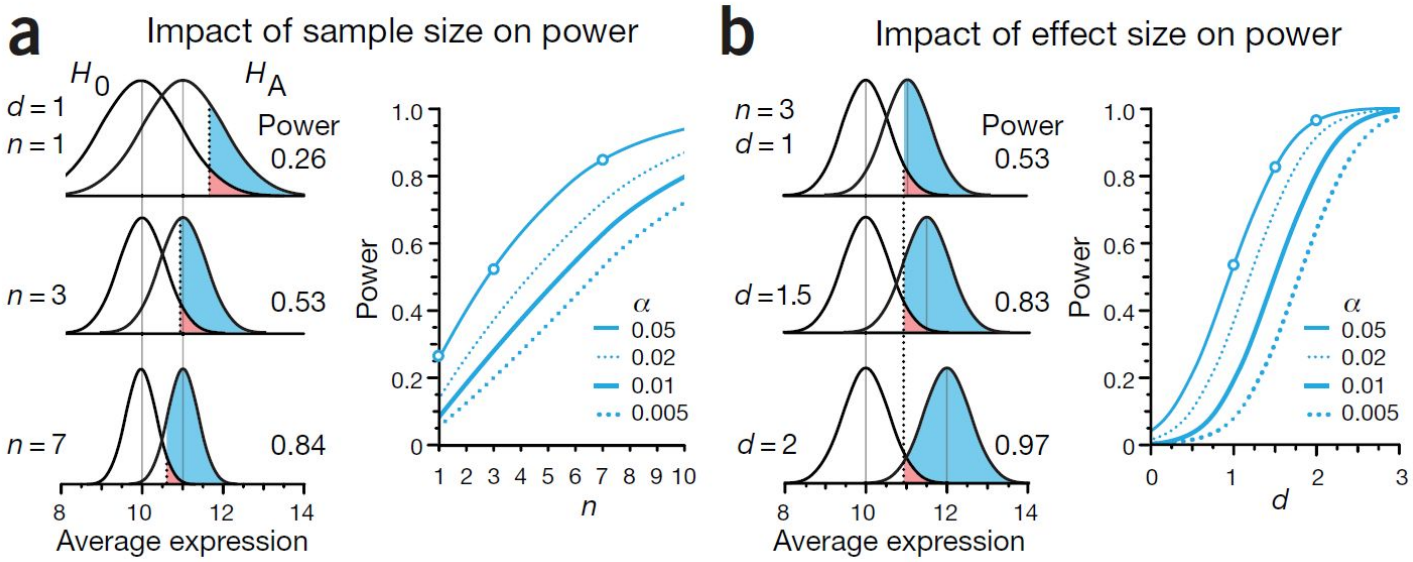
Эволюция математики в биологии

- любая описательная наука требует знания статистики
- статистический анализ - мощнейший инструмент во всех науках, где построение точных моделей затруднено

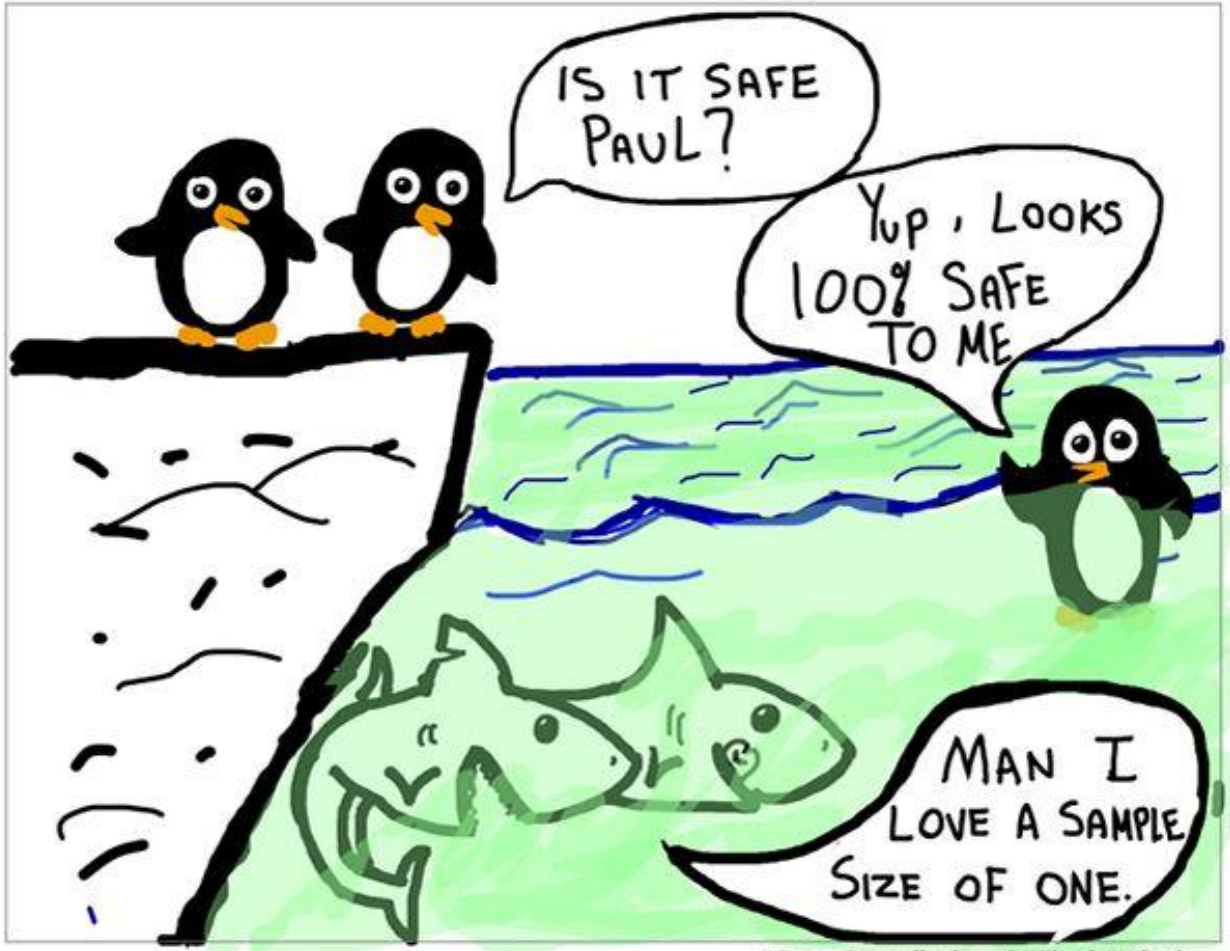


Значимость результатов

- размер выборки и эффекта имеет решающее значение в интерпретации любого количественного эксперимента



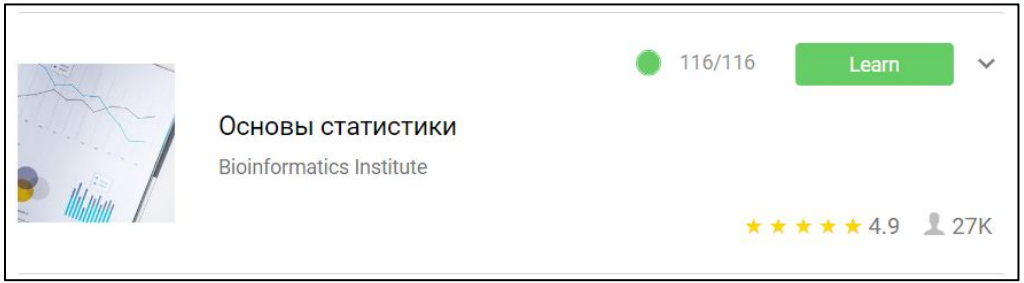
https://www.nature.com/collections/qghhqm/pointsofsignificance

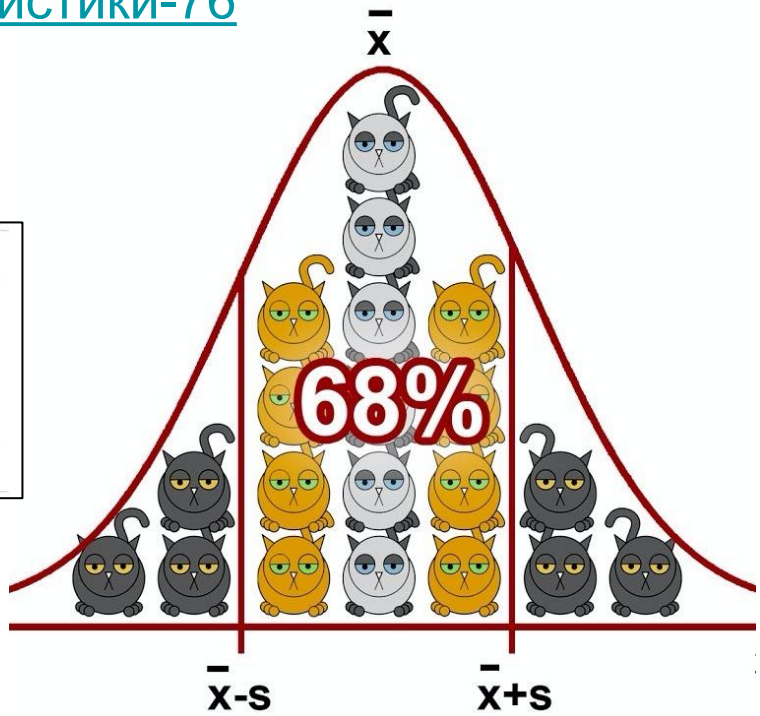


#DataDoodle by @WholeWhale

Статистика и котики

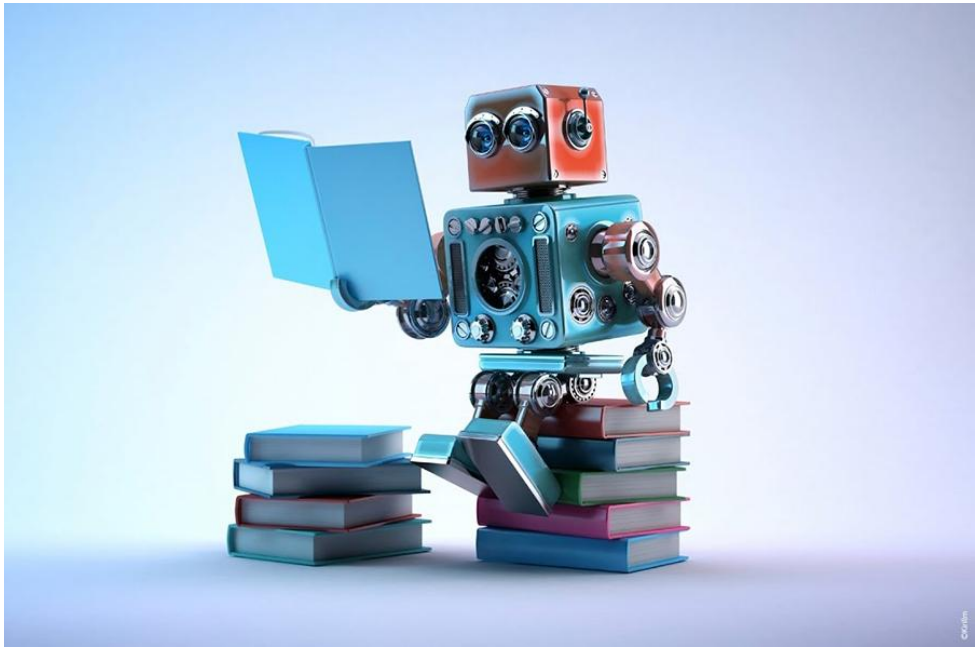
- мало кто любит статистику, зато все любят котиков (с)
- https://stepik.org/course/Основы-статистики-76





Машинное обучение

- классификация
- регрессия
- кластеризация
- уменьшение размерности
- нейросети
- поиск аномалий



Эволюция “биоинформатики”

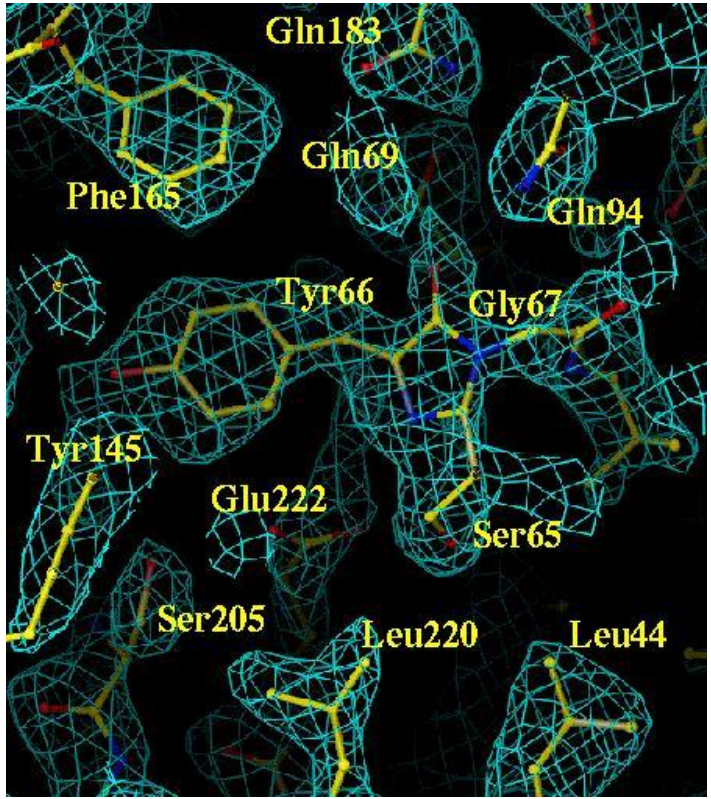
- математическая биология
  - дифференциальные уравнения, кинетические модели, и т.д.
- структурная биоинформатика
  - ака биофизика
  - рост связан с бумом кристаллографии протеинов в 90-е
- геномная биоинформатика
  - рост связан с бумом секвенирования
- системная биология
  - графы (сети), байесовские модели, анализ потоков, и т.д.
  - попытки интегрировать различные данные

Структурная биоинформатика

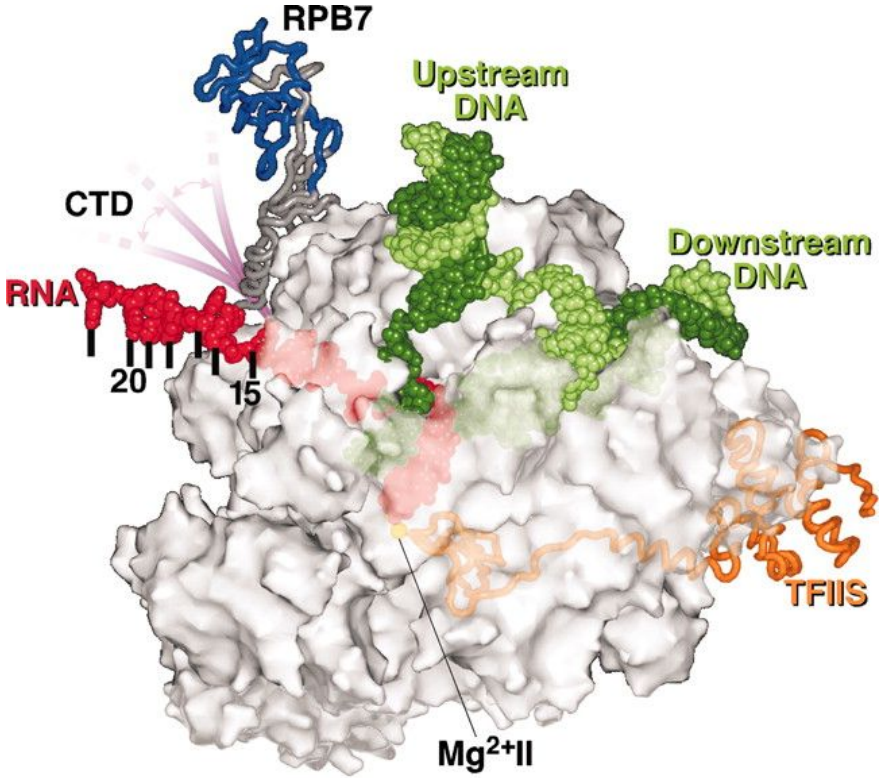
- предсказание и фолдинг неизвестных структур белков
- симуляция поведения белков и комплексов белок-ДНК
- “крупнозернистые” симуляции больших биологических объектов (органелл, вирусов, клеток, участков мембраны)
- докинг малых молекул (лекарств)

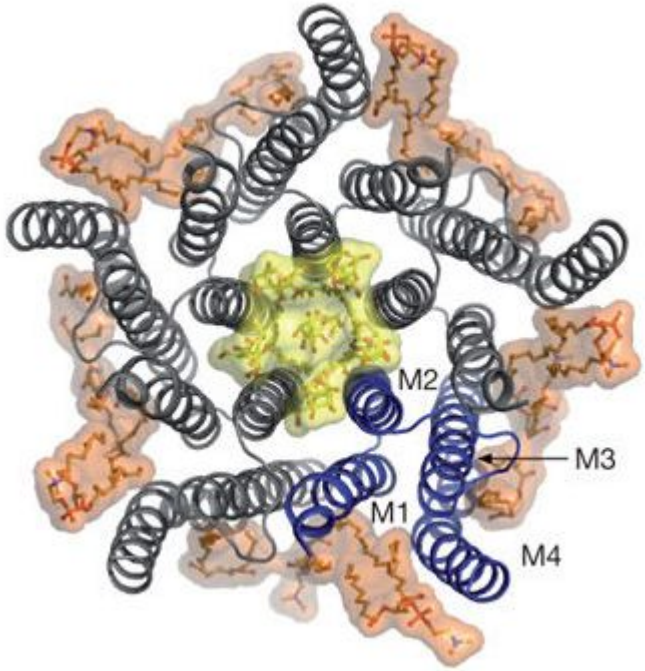
Кристаллография протеинов

- монокристалл протеина облучается рентгеновскими лучами
- дифракционная картина позволяет восстановить позиции индивидуальных атомов с высокой достоверностью



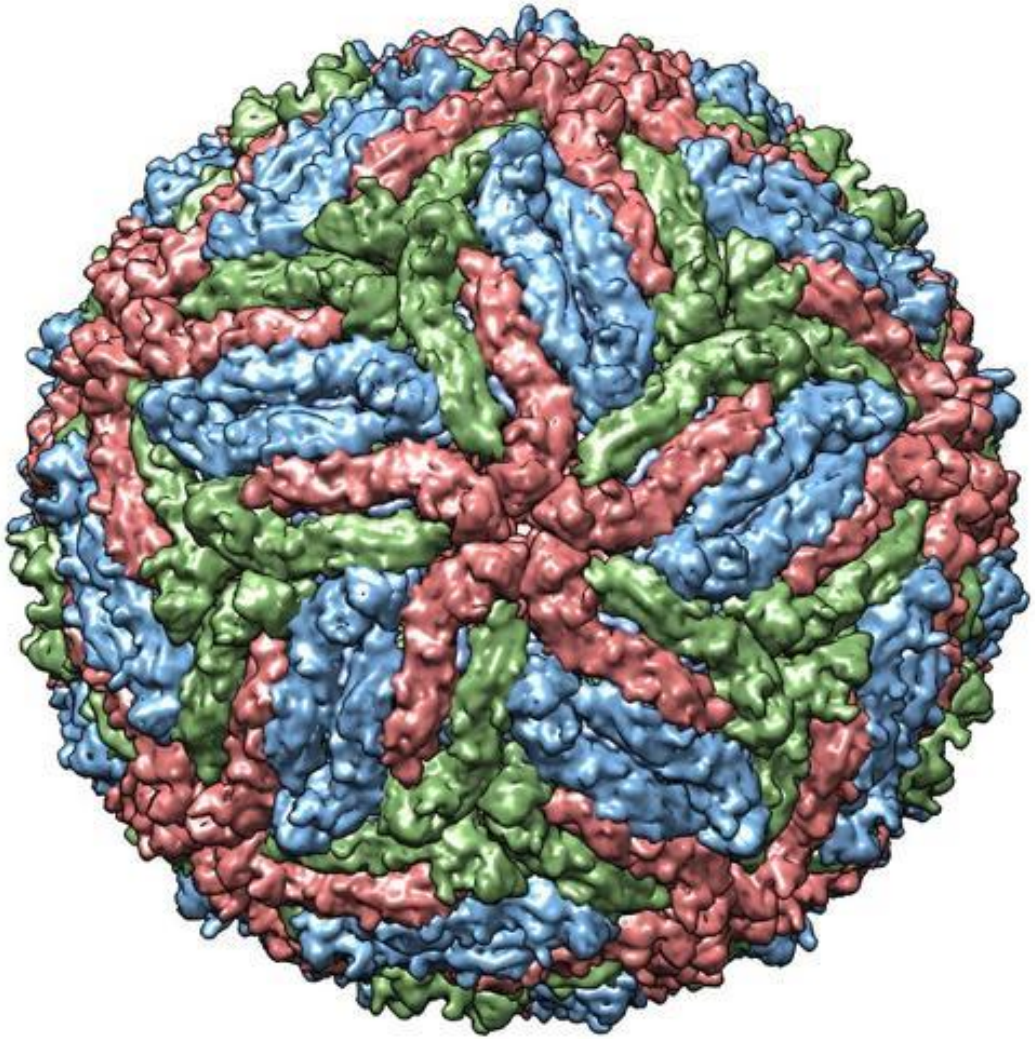
Структуры, потрясающие воображение





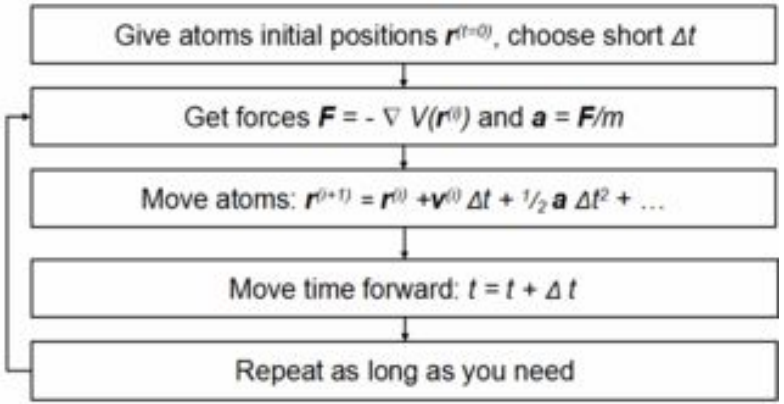
Cryo-EM

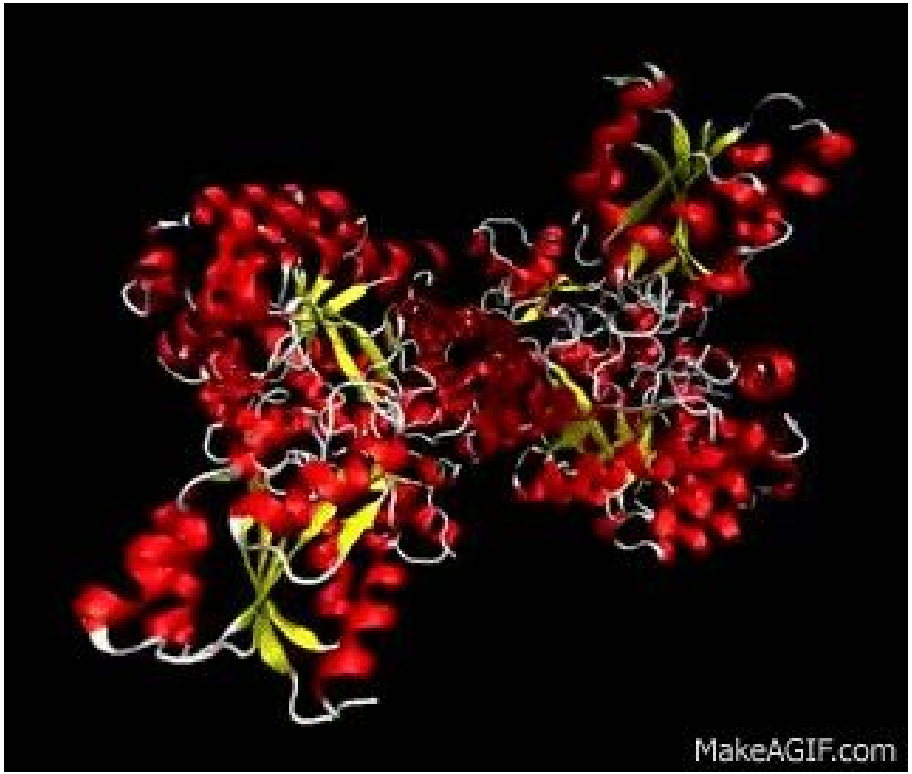
- не требует кристаллизации!
- разрешение становится все лучше
- незаменим для определения структур огромного размера
- например, вируса Зика



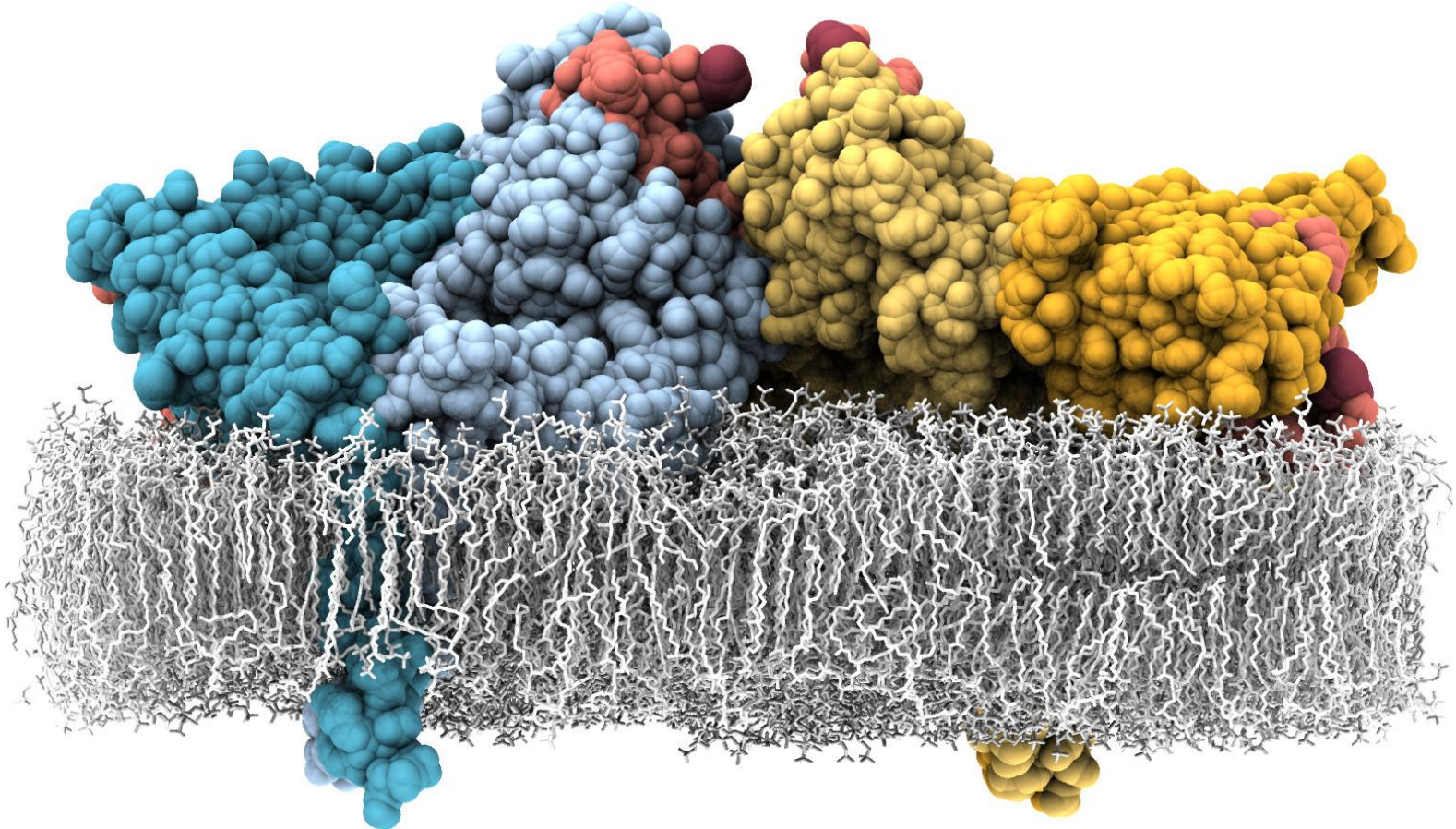
Молекулярная динамика

- решение ньютоновских дифференциальных уравнений движения





Симуляции миллионов атомов

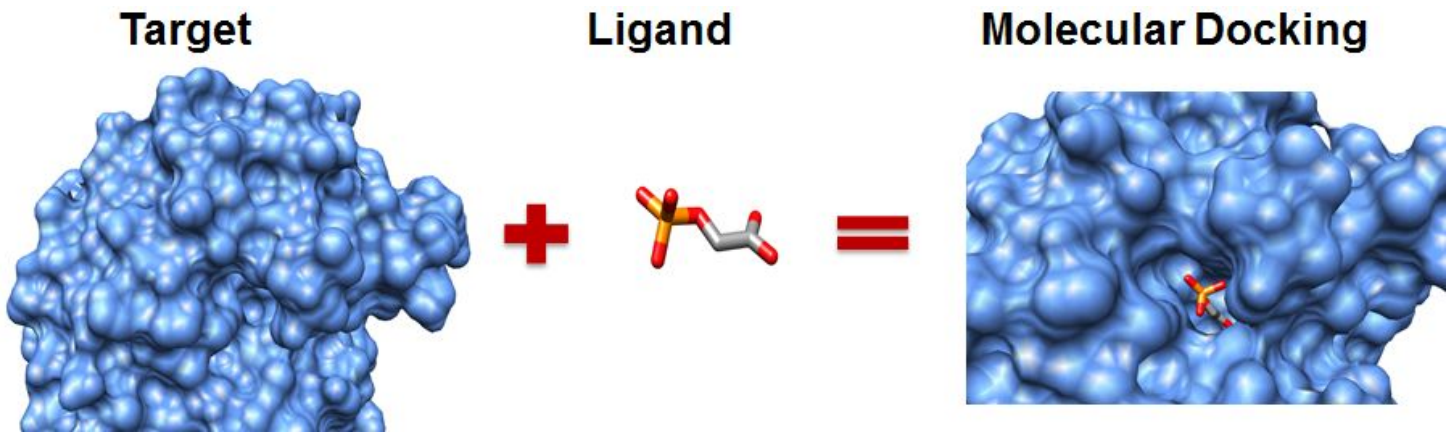


Фолдинг протеинов

- отличается от молекулярной динамики целью и подходами
- молекулярная динамика может использоваться для дальнейшего улучшения структуры

Докинг малых молекул

- большинство современных лекарств ингибируют ферменты, блокируя активный центр
- предсказание активных молекул может сильно снизить цену разработки новых лекарств



Геномная биоинформатика

- прогресс связан с прогрессом в секвенировании
- секвенирование - определение последовательности (ДНК, РНК, протеина)
- задачи:
  - поиск нуклеотидных и протеиновых последовательностей в базах данных (*blast*)
  - сборка геномов *de novo* (*De Bruijn graphs*)
  - выравнивание на собранные геномы и транскриптомы (*FM-index, Burrows-Wheeler transform*)

Проект “геном человека”

ws
Print”

The New York Times

National Edition

Arizona and New Mexico: M
cloudy in New Mexico, thunders
in the mountains. Partly sunny
where. Highs 80 mountains, ove
deserts. Weather map is on Page

. No. 51,432 Copyright © 2000 The New York Times TUESDAY, JUNE 27, 2000 Printed in Arizona ONE DOLL

tic Code of Human Life Is Cracked by Scientist

The Book of Life

The 3 billion base pairs ...

... of the intertwining double helix of DNA ...

... that make up the set of chromosomes in our cells, have been sequenced.

BASE PAIRS
Rungs between the strands of the double helix

BASES
A adenine
C cytosine
G guanine
T thymine

By ordering the base units, scientists hope to locate the genes and determine their functions.

The New York Times

A SHARED SUCCE

2 Rivals' Announcem
Marks New Medica
Era, Risks and All

By NICHOLAS WADE

WASHINGTON, June 26 —
achievement that represents a
nacle of human self-knowledge
rival groups of scientists said t
that they had deciphered the he
tary script, the set of instruc
that defines the human organis

become part
that Congress was entitled to the last word because Miranda's presumption that a confession was not volun

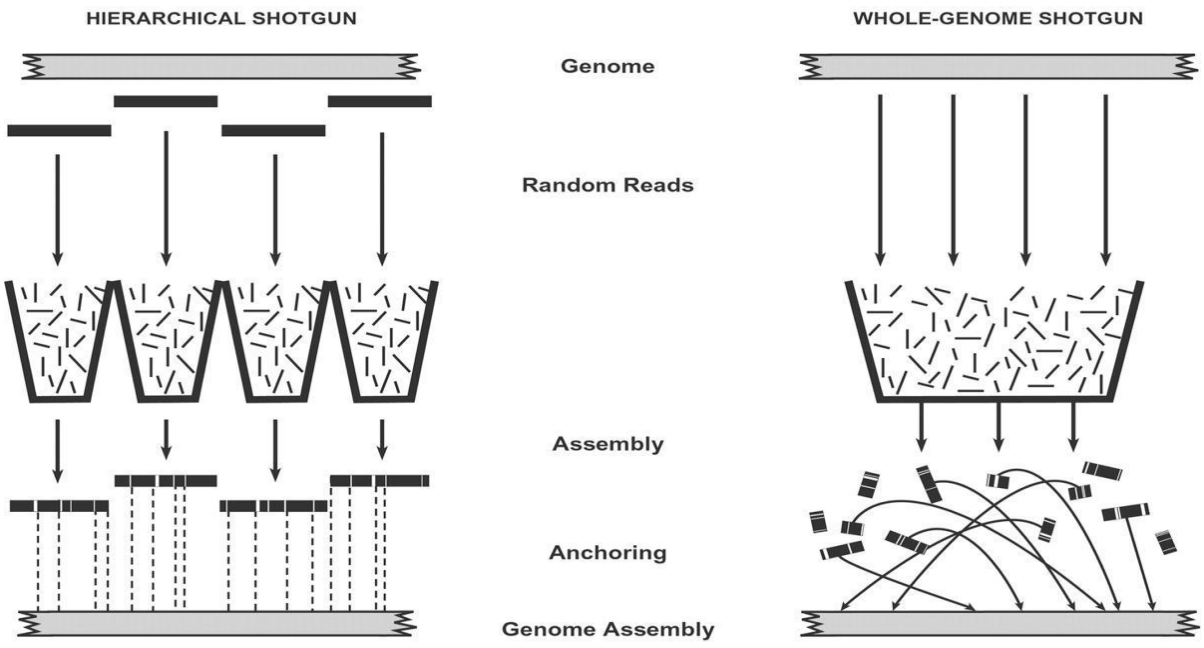
Университеты vs. Celera Genomics

Francis Collins

Eric Lander

Craig Venter

Соревнование стратегий

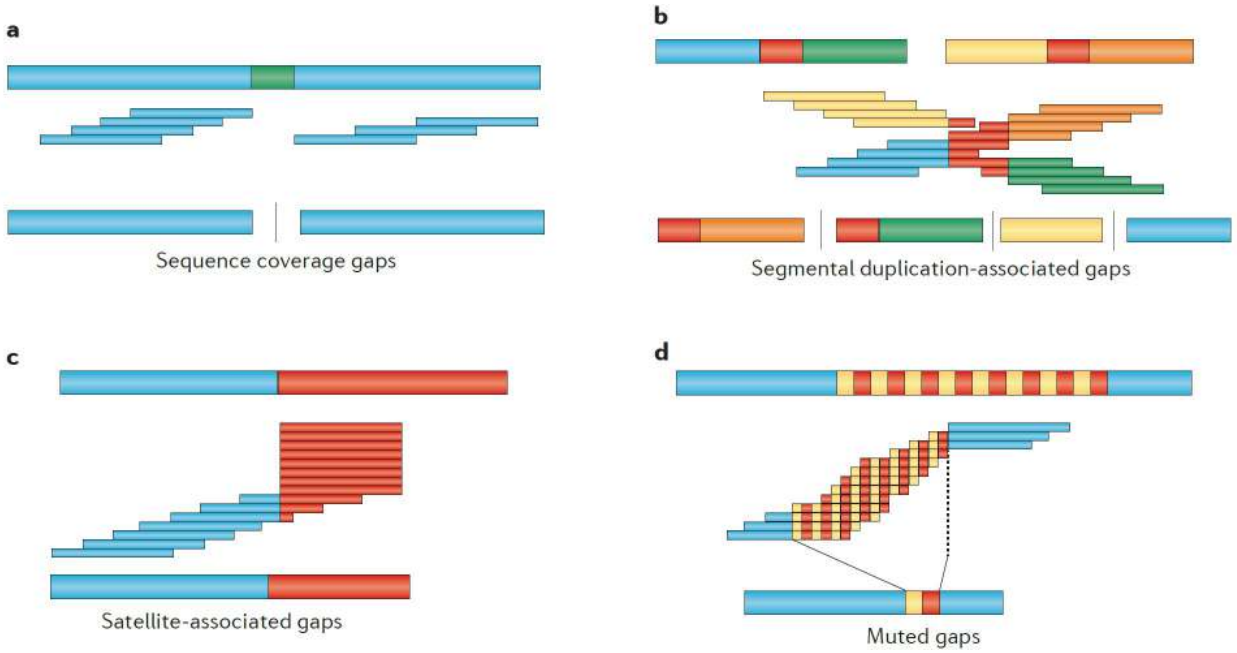


Public (Universities)
1990-2001 (2003)
3 billion dollars

Celera Corporation
1999-2001 (2003)
300 million dollars

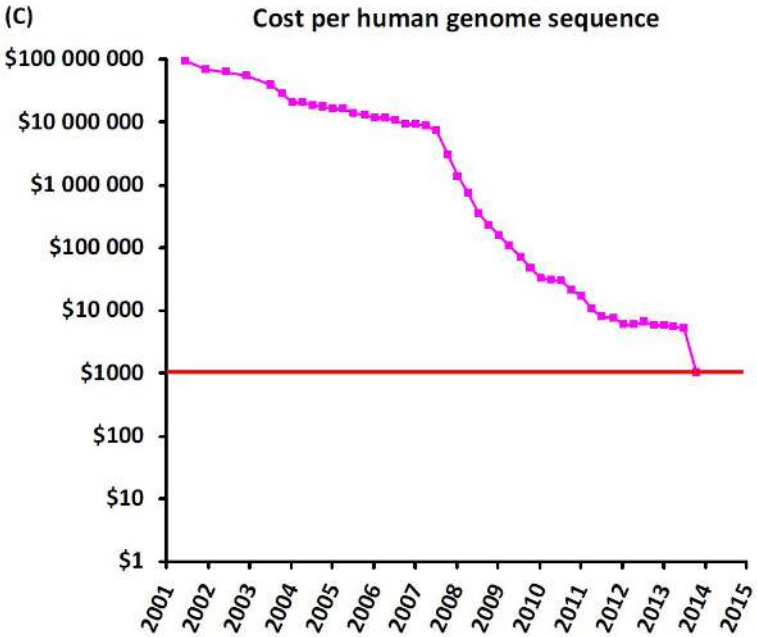
Возможно ли?

- Сомнение в возможности сборки коротких прочтений в геном
- Трудности – повторы, плохое покрытие



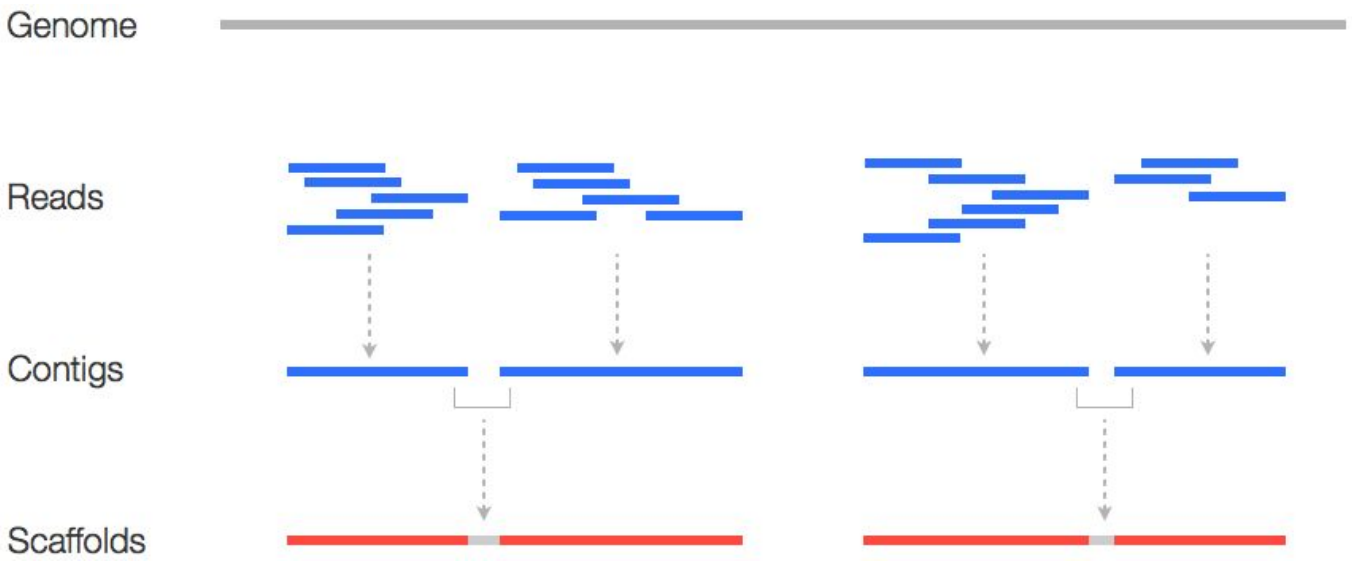
Секвенирование: революция 2000-х

- Секвенирование генома человека упало в цене от 100 миллионов до ~1000 $



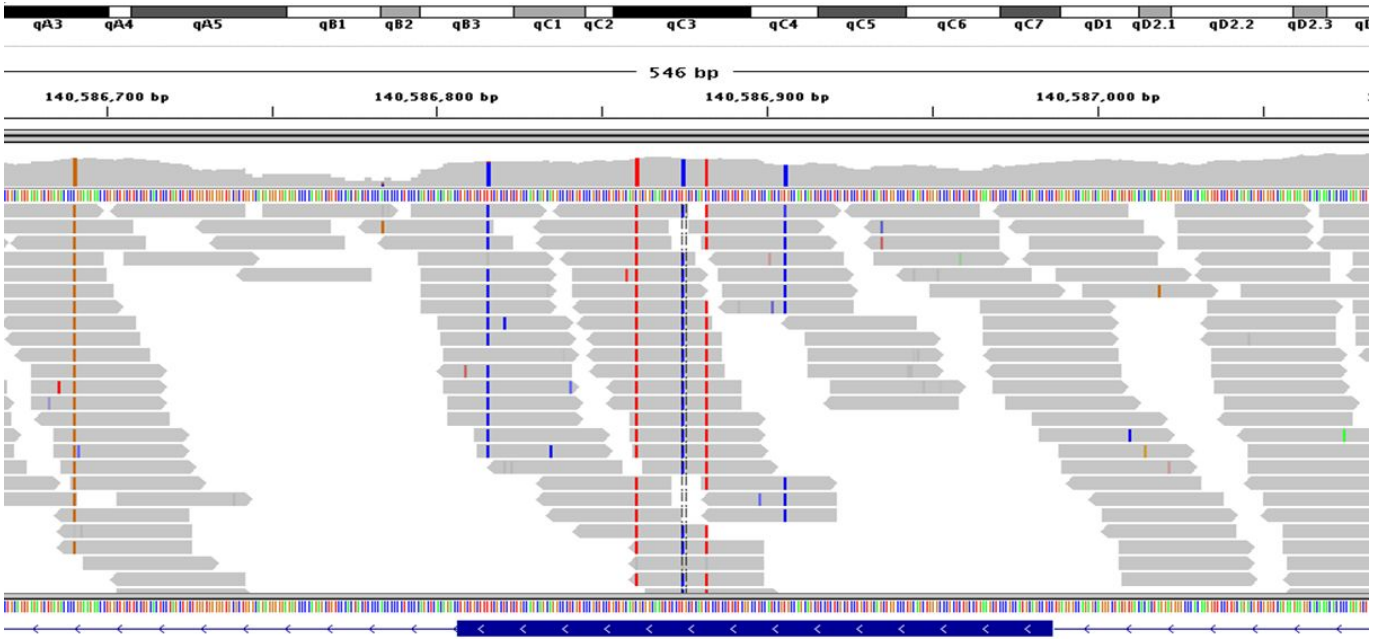
Тип 1: неизученные виды (сборка)

- Сборка геномов (de-novo genome assembly)
- Сборка транскриптомов (de-novo transcriptome assembly)



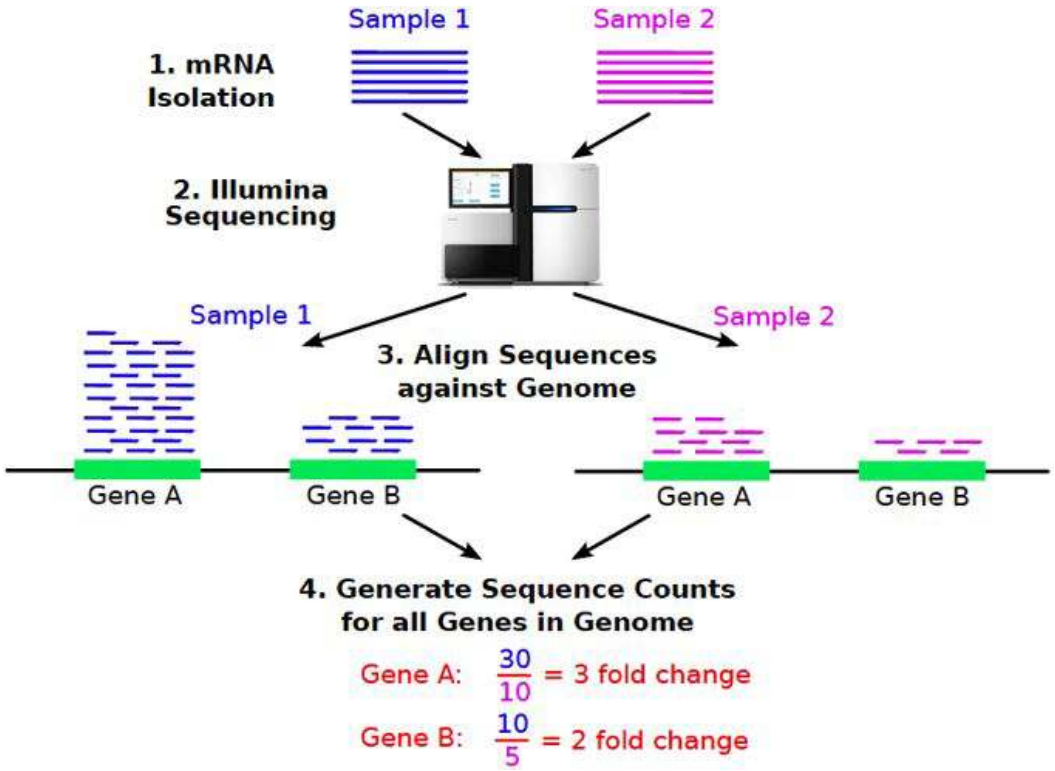
Тип 2: Уточнение последовательности (выравнивание)

- Ресеквенирование геномов
- Ресеквенирование частей генома



Тип 3: Количественный анализ (выравнивание)

- Транскриптом (RNA-seq)
- Позиционный (ChIP-seq, genome footprinting)



Что (и кого) мы секвенируем?

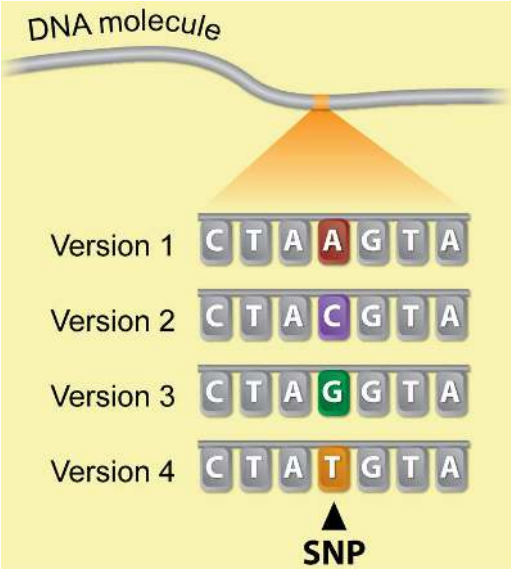
- Плазмиды и конструкты
- Вирусы
  - новые
  - количество (вирусная нагрузка)
  - варианты (штаммы)
- Прокариоты
  - новые
  - варианты (штаммы)
- Эукариоты
  - новые
  - модельные животные
- Люди
  - пациенты
  - исследование здоровых волонтеров

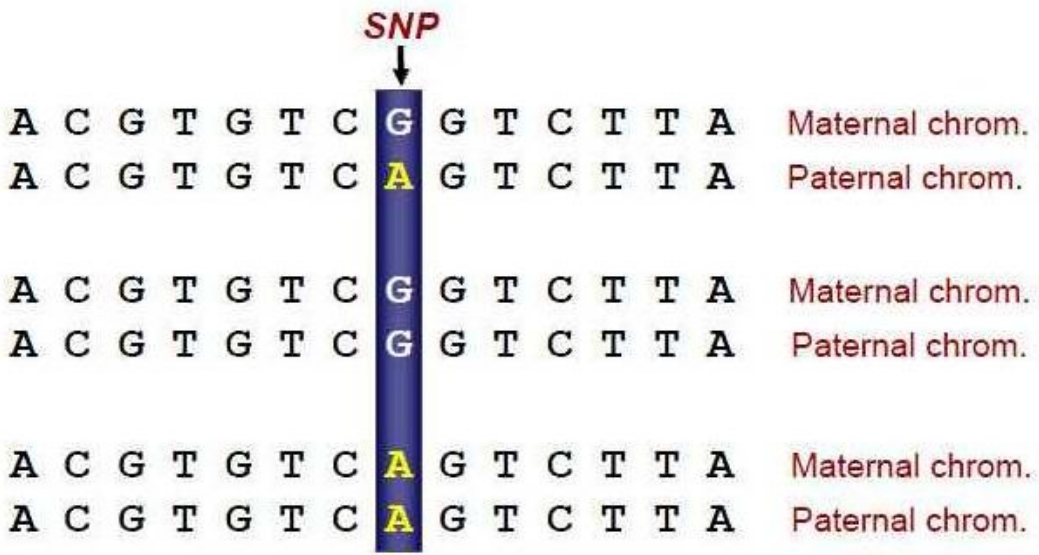
Примеры применения NGS

- исследование вариации в геноме человека
- определение присутствующих организмов (“баркодинг”)
- анализ дифференциальной экспрессии - сравнить те же ткани у больных и здоровых людей
- поиск участков ДНК, активных в определенных тканях и условиях

Вариативность в геномах

- SNP (SNV) - Single Nucleotide Polymorphism (Variant)
- Может быть гетеро/гомозиготный

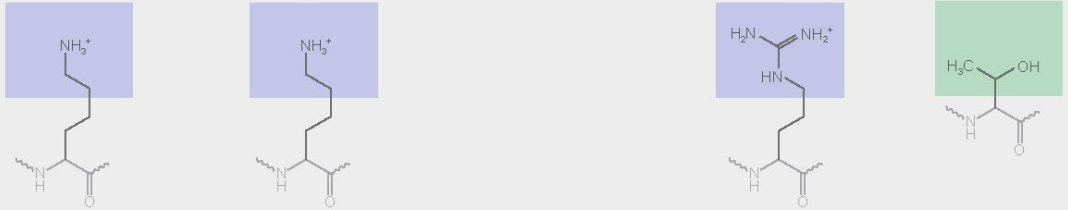




Типы однонуклеотидных замен

- Эффект замены радикально зависит от ее типа

	No mutation	Point mutations			
		Silent	Nonsense	Missense	
				conservative	non-conservative
DNA level	TTC	TTT	ATC	TCC	TGC
mRNA level	AAG	AAA	UAG	AGG	ACG
protein level	**Lys**	**Lys**	**STOP**	**Arg**	**Thr**



basic
polar

Вариативность в геномах

- “Инделы” - инсерции и делеции
- Крупные структурные вариации

Indel examples

wild-type sequence

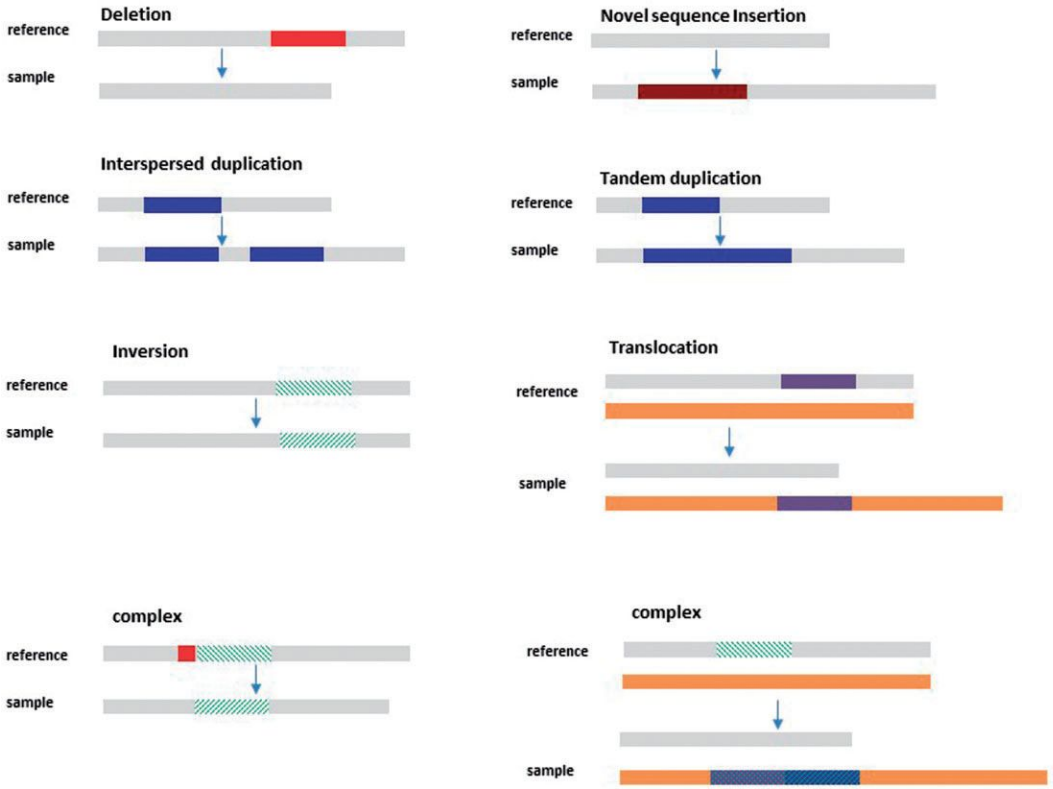
ATCTTCAGCCATAAAAGATGAAGTT

3 bp deletion

ATCTTCAGCCAAAGATGAAGTT

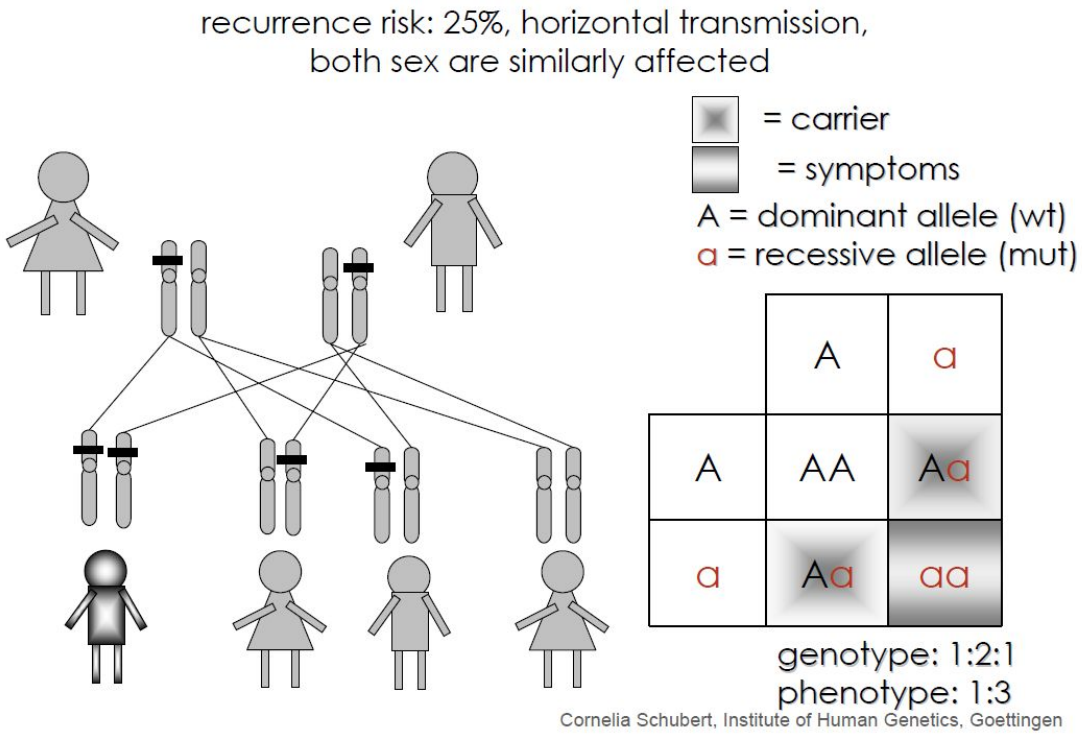
4 bp insertion (orange)

ATCTTCAGCCATATGTGAAAGATGAAGTT



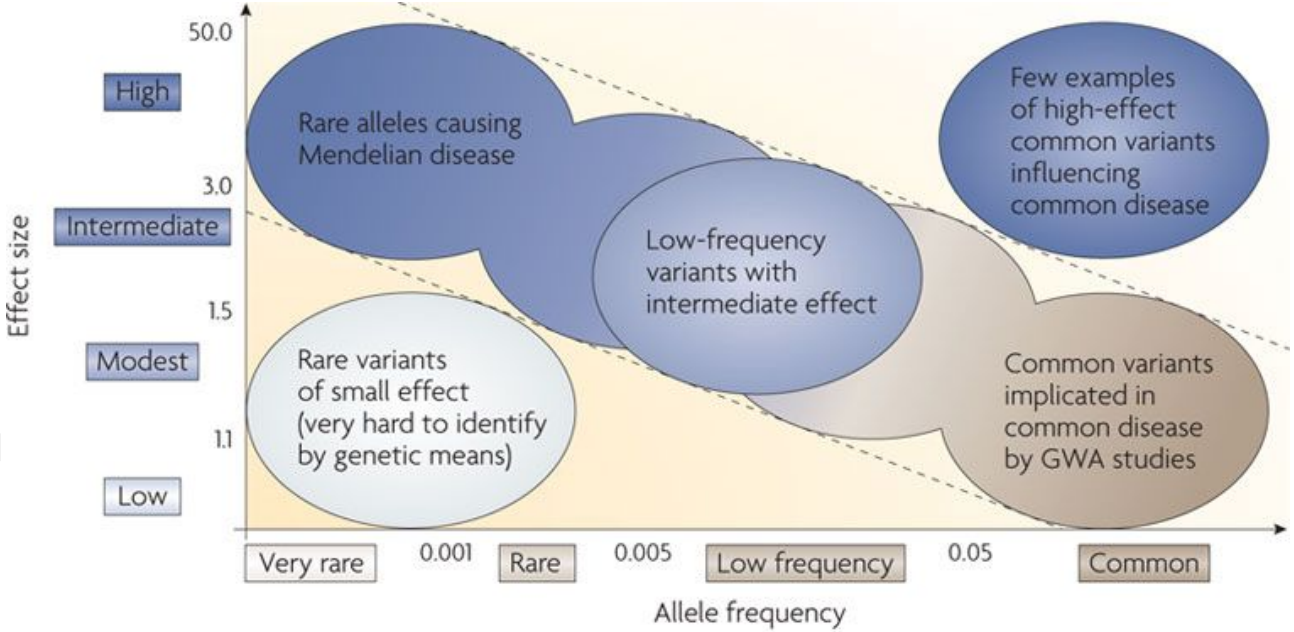
Медицинский NGS

- Около 7000 редких заболеваний, 80% генетических
- Общая частота - около 10%
- Менделевские болезни - от 2 до 5%



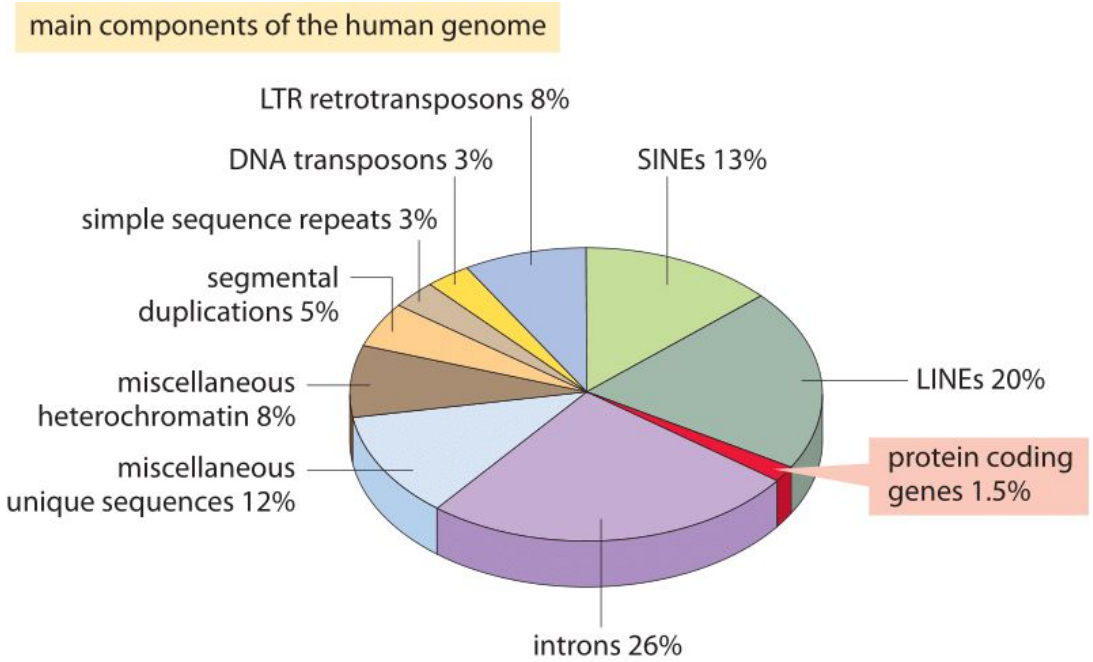
Частота и влияние вариантов

- Большинство сильно-патогенных вариантов - редкие
- Эффект частых вариантов, как правило, очень мал



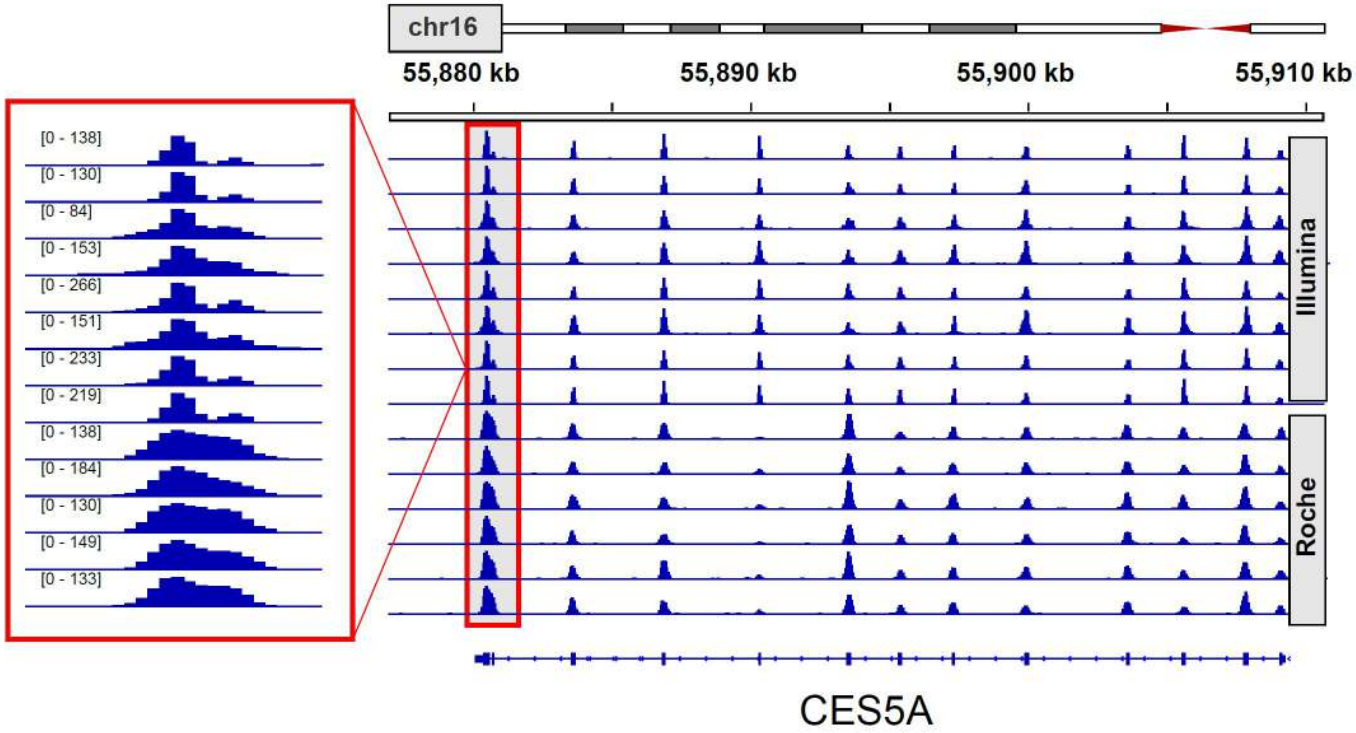
Гены в геноме человека

- кодирующие последовательности составляют всего 1.5% от всего генома (45 Мб из 3 Гб)



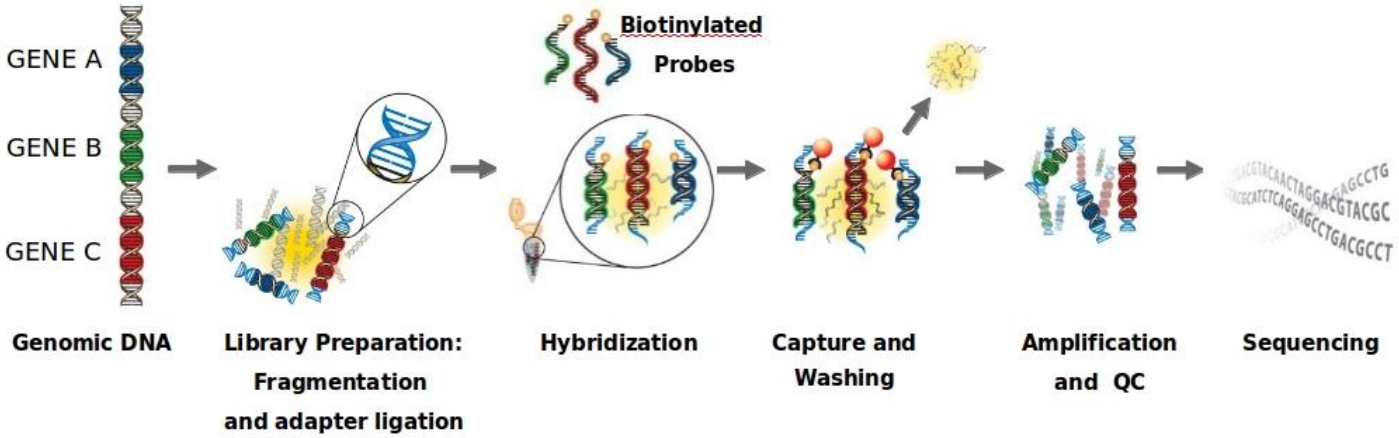
Что такое экзом?

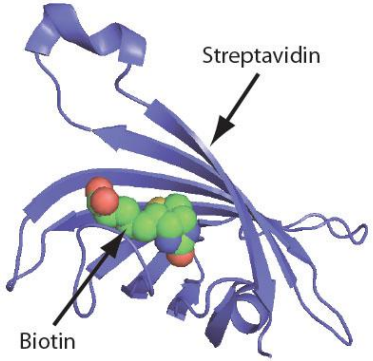
- Фокус только на кодирующих регионах (экзонах)



Обогащение ДНК

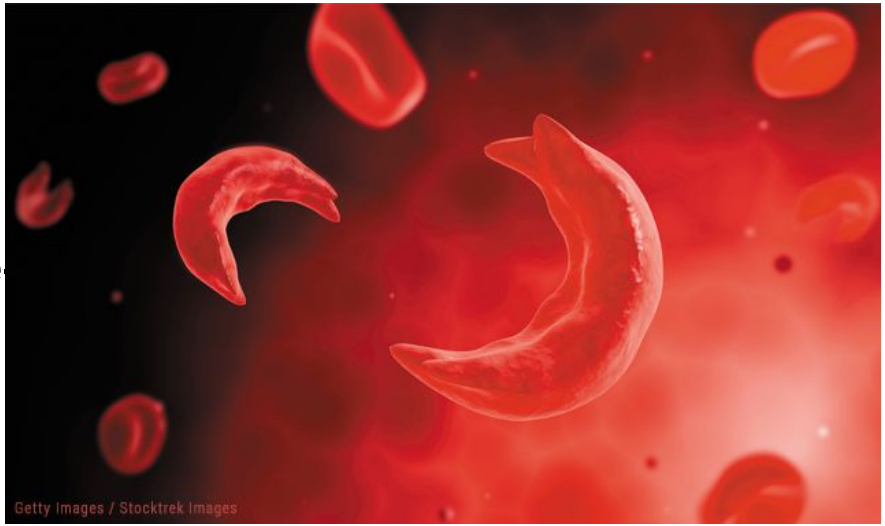
- Выделяются только нужные нам фрагменты
- Набор фрагментов может быть практически любым!



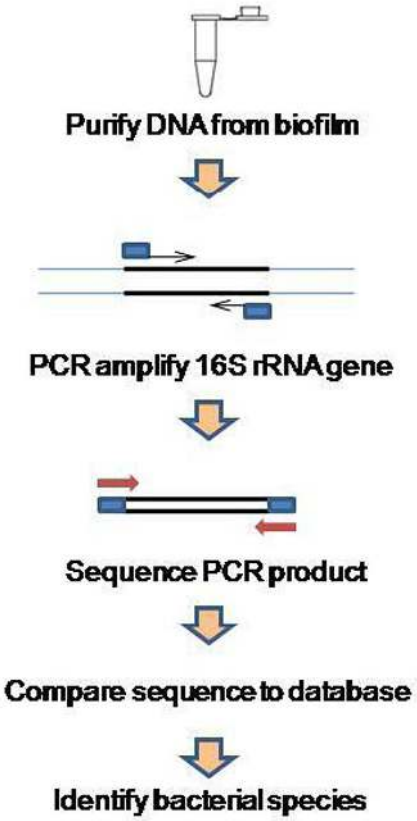


Ресеквенирование ДНК

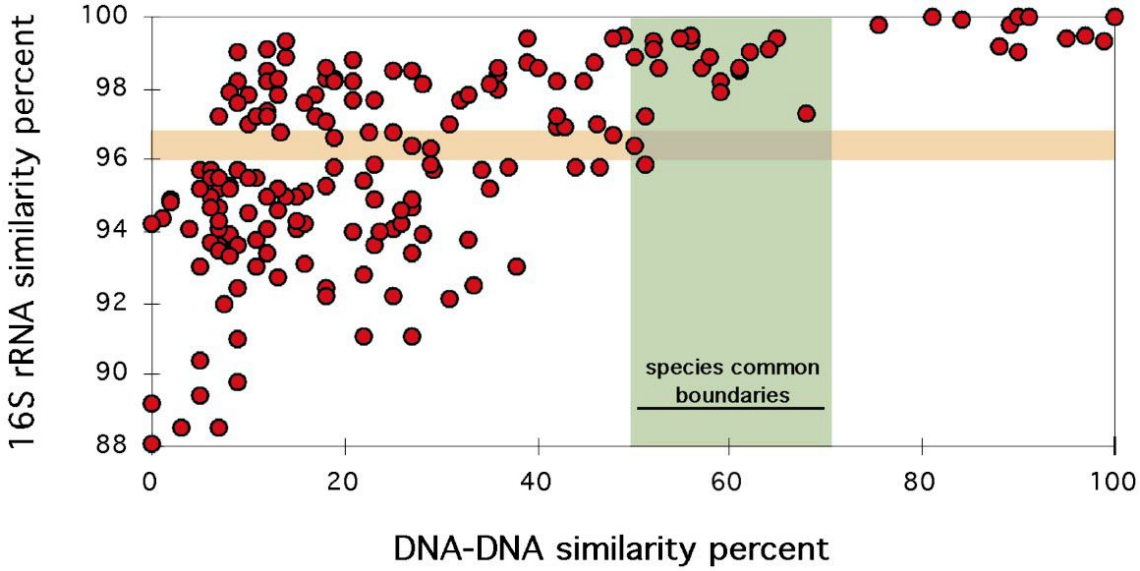
- Таргетная панель (1-500 генов)
- Клинический экзом (5000 важных генов) - CES
- Полный экзом (20000 генов) - WES
- Полный геном - WGS
- Являются необходимостью и де-факто стандартом при генетических (наследуемых) заболеваниях



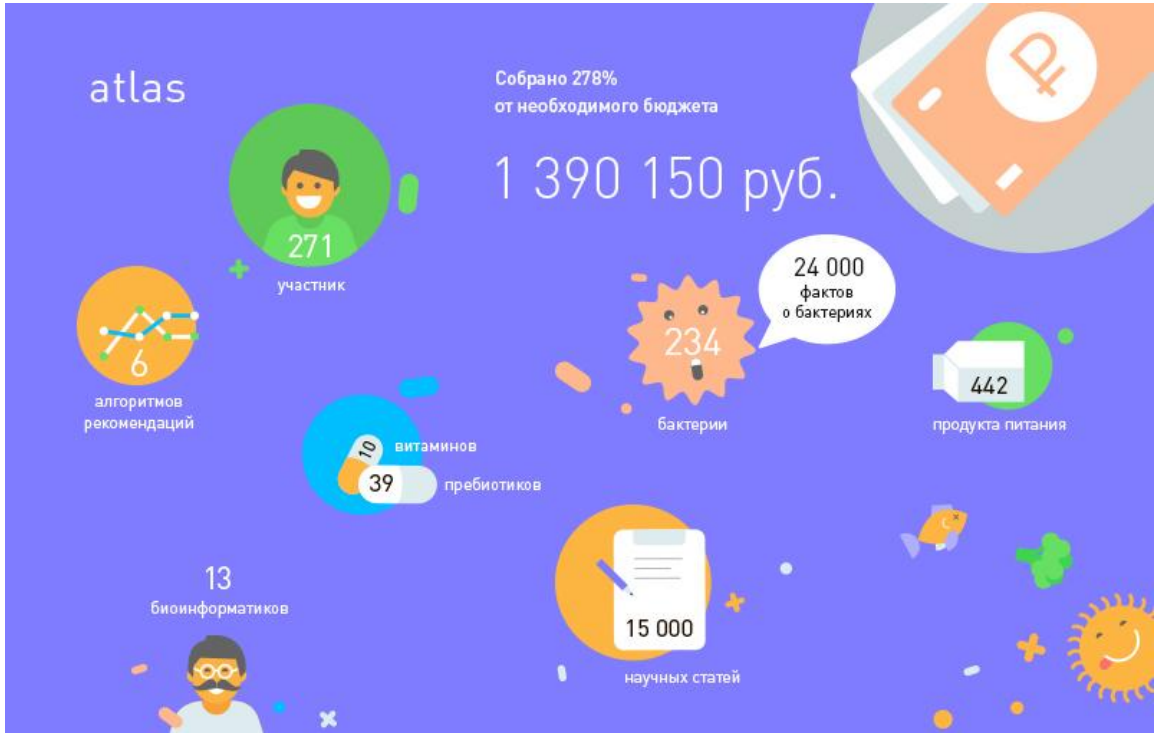
16S-секвенирование



- Секвенирование ампликона

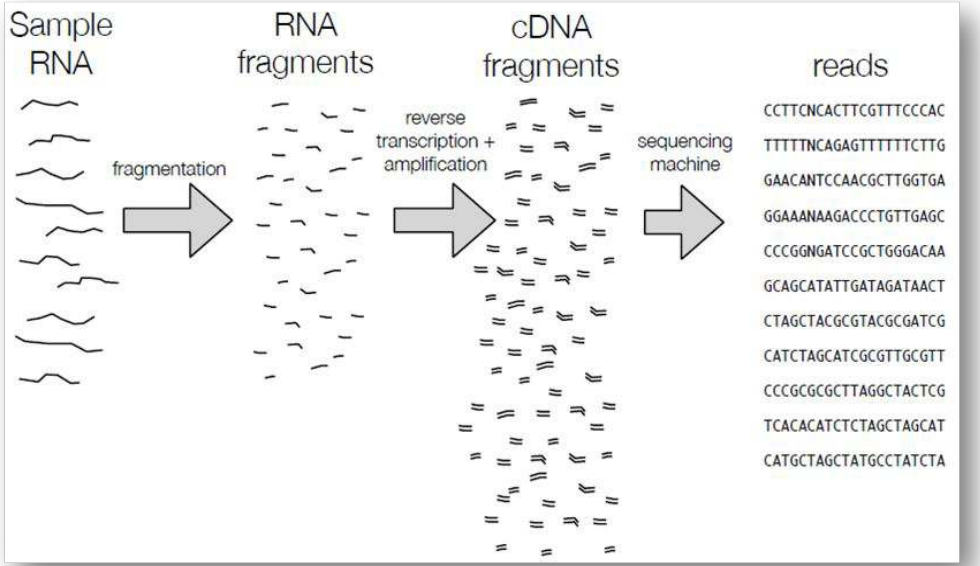


Oh My Gut!


atlas
Собрано 278%
от необходимого бюджета
1 390 150 руб.
271
участник
6
алгоритмов
рекомендаций
234
24 000
фактов
о бактериях
бактерии
442
продукта питания
10
витаминов
39
пребиотиков
13
биоинформатиков
15 000
научных статей

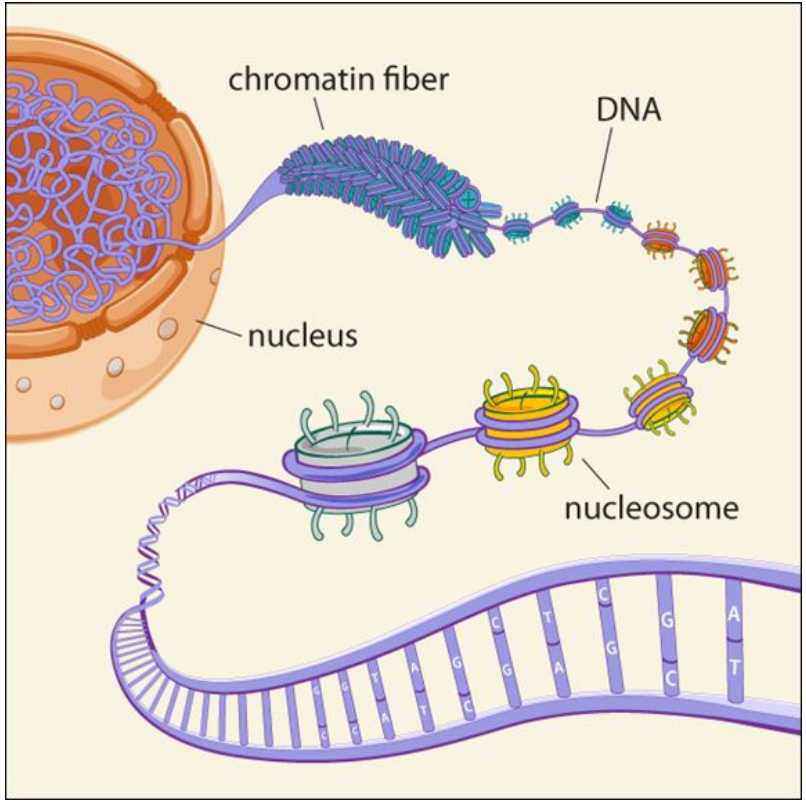
Секвенирование транскриптома

- De novo - если сборка генома слишком трудна, или нужна разница между тканями
- На хорошо аннотированных организмах - связь с фенотипом или условиями
- Цели:
  - Количественный анализ экспрессии
  - Поиск новых транскриптов



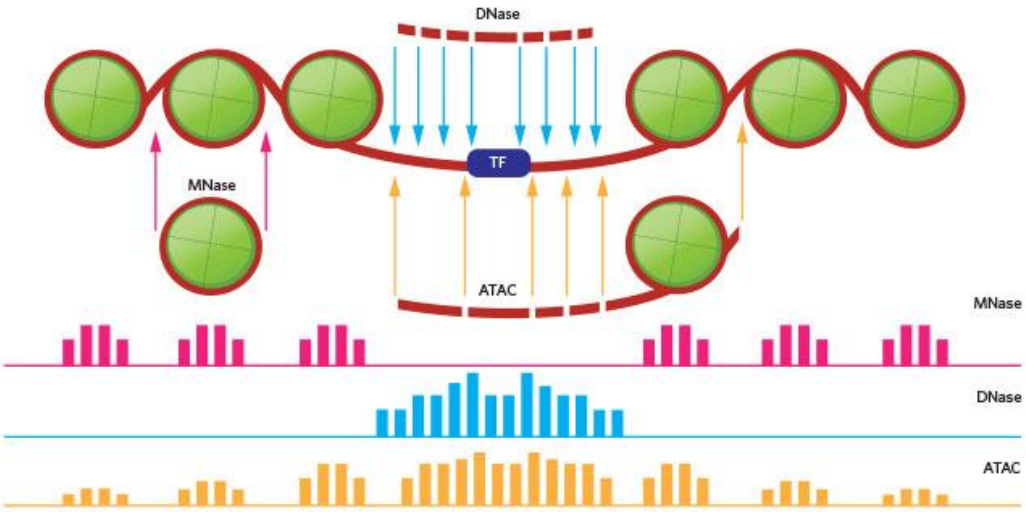
Хроматин в эукариотах

- Три уровня упаковки:
  - ”бусы на нитке” - нуклеосомы
  - 30 нм фибрила
  - Плотно упакованная структура - гетерохроматин
- Нуклеосомы содержат гистонные протеины
- Длина ДНК hs - около 2 м, размер клетки - порядка микрометров



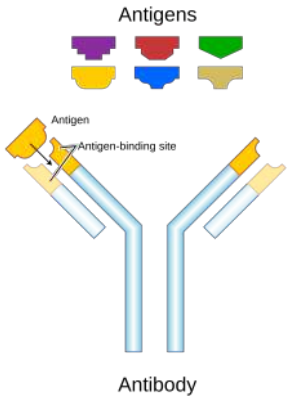
Genome footprinting

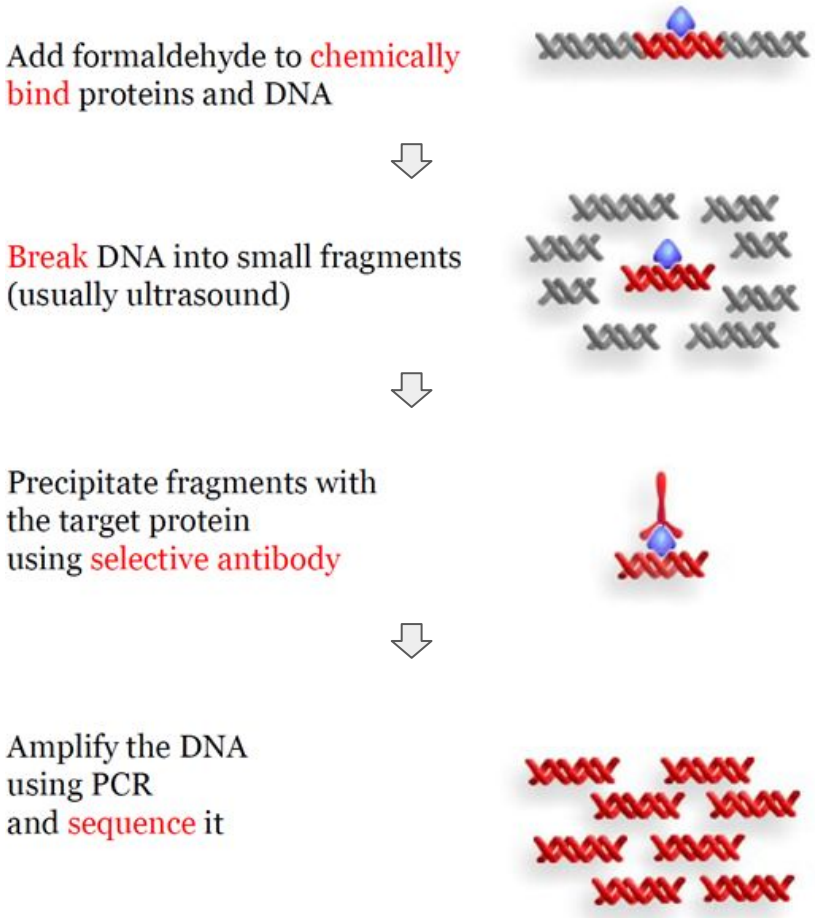
- Смысл: поймать наиболее “развернутые” участки хроматина
- DNase-seq, FAIRE-seq, ATAC-seq



ChIP-Seq

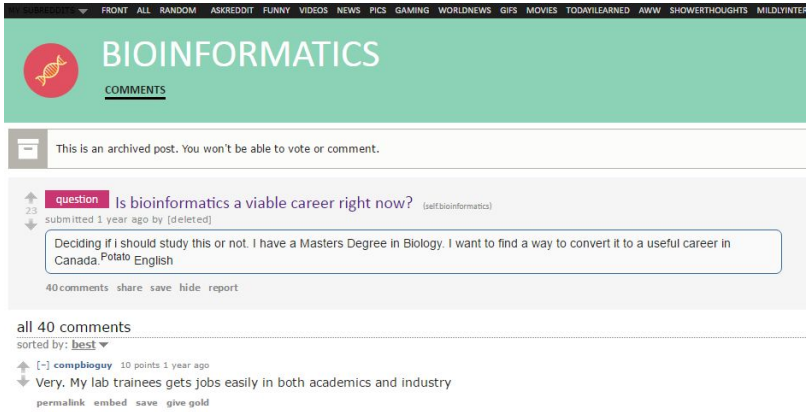
- Смысл: поймать участки ДНК, связанные с определенным протеином
- Делается с помощью селективных антител

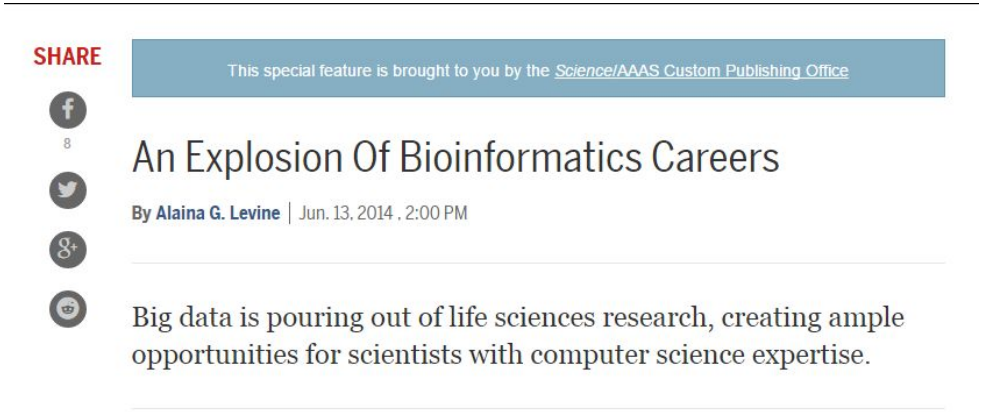




Куда податься биоинформатику?

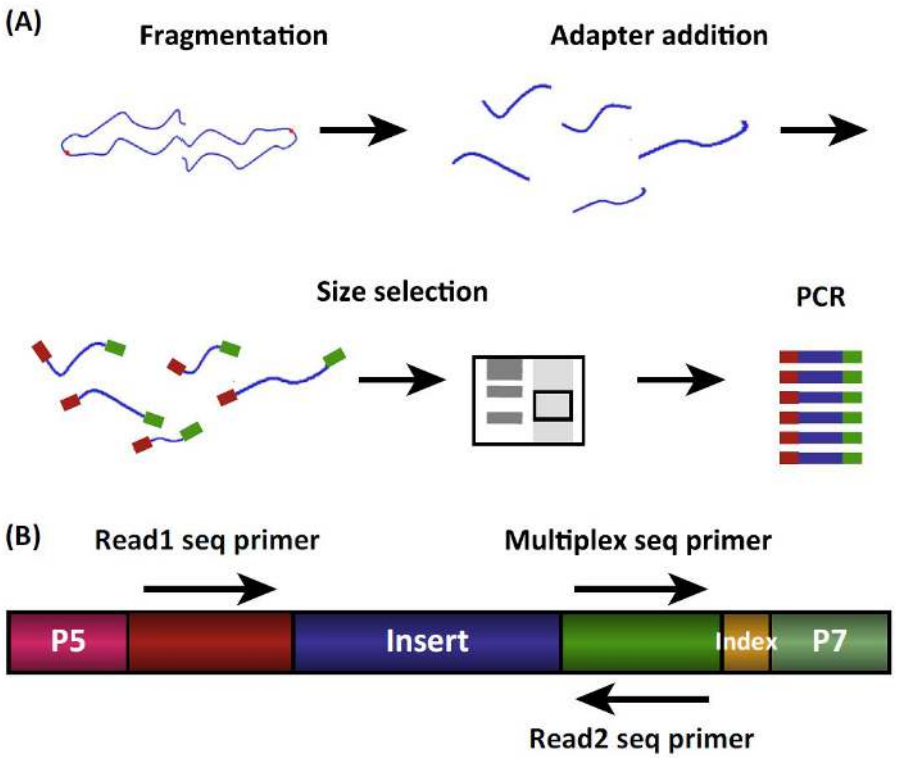
- биоинформатика - крайне быстро растущий рынок
- в том числе и в России
- большинство потребителей услуг - в медицине и науке





Типичный NGS-эксперимент

- фрагментация ДНК
- лигация адаптеров
- выбор фрагментов нужного размера
- амплификация
- секвенирование



Биоинформатика IRL

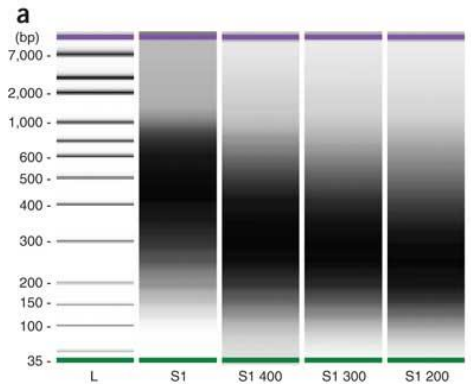
- Практически работа биоинформатика ~ NGS
- Работа с NGS ~ quality control (QC)
- Плюс, грамотное применение подходящих пайплайнов

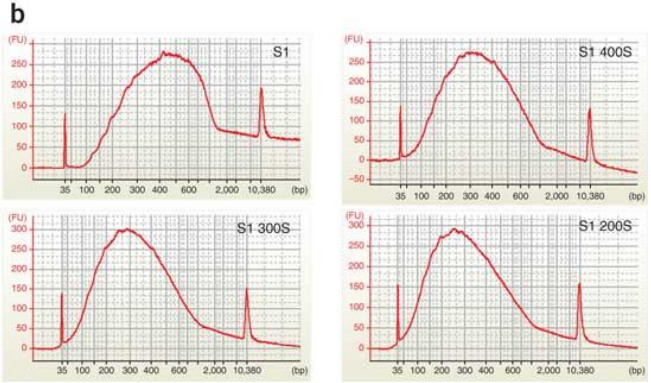
Постадийный QC

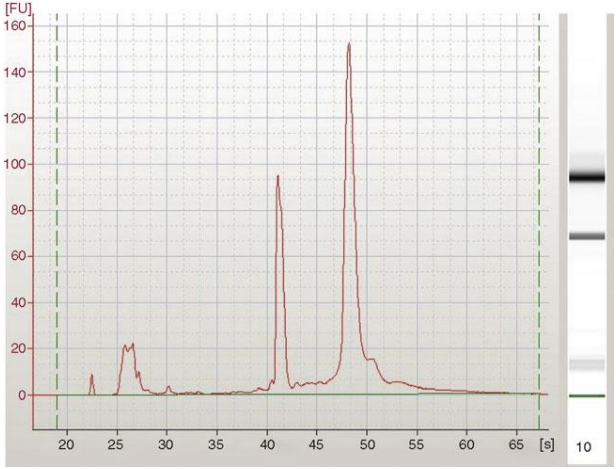
- QC эксперимента и приготовления библиотеки
  - Биологические наблюдения (живые клетки, гомогенность)
  - Качество экстракции ДНК/РНК, ее состояние
  - Распределение фрагментов по размеру - Bioanalyzer
  - PCR на нужные фрагменты (до секвенирования)
- QC секвенатора
  - На Illumina - плотность кластеров, basecalls, состояние прибора
- QC полученных прочтений
- QC после сборки и выравнивания

Типичные ранние проблемы

- РНК или ДНК деградировал
- Чрезмерная/недостаточная соникация или дробление энзимом
- Ошибки в количествах реактивов (плохие реактивы)
- Библиотека “низкой сложности” (мало уникальных фрагментов)

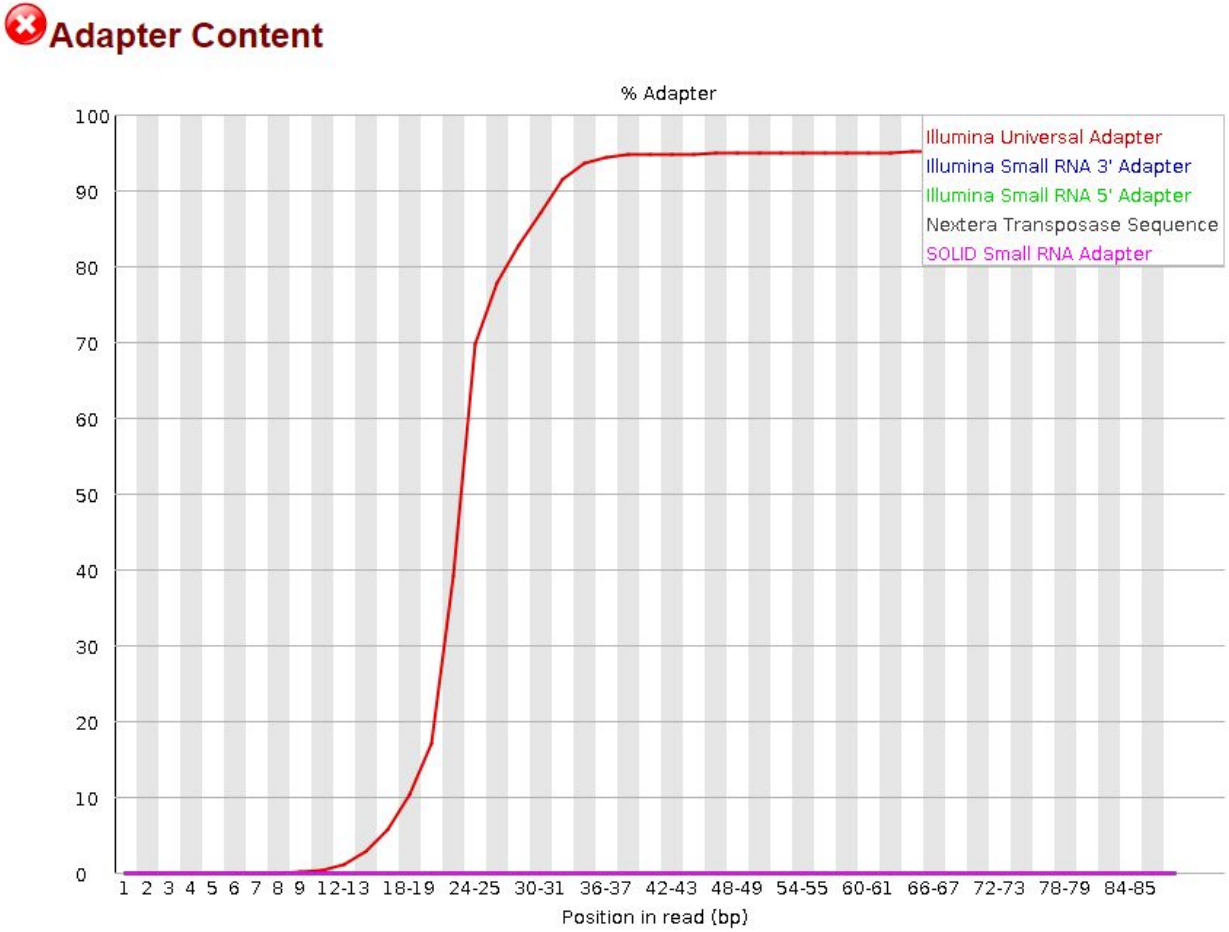






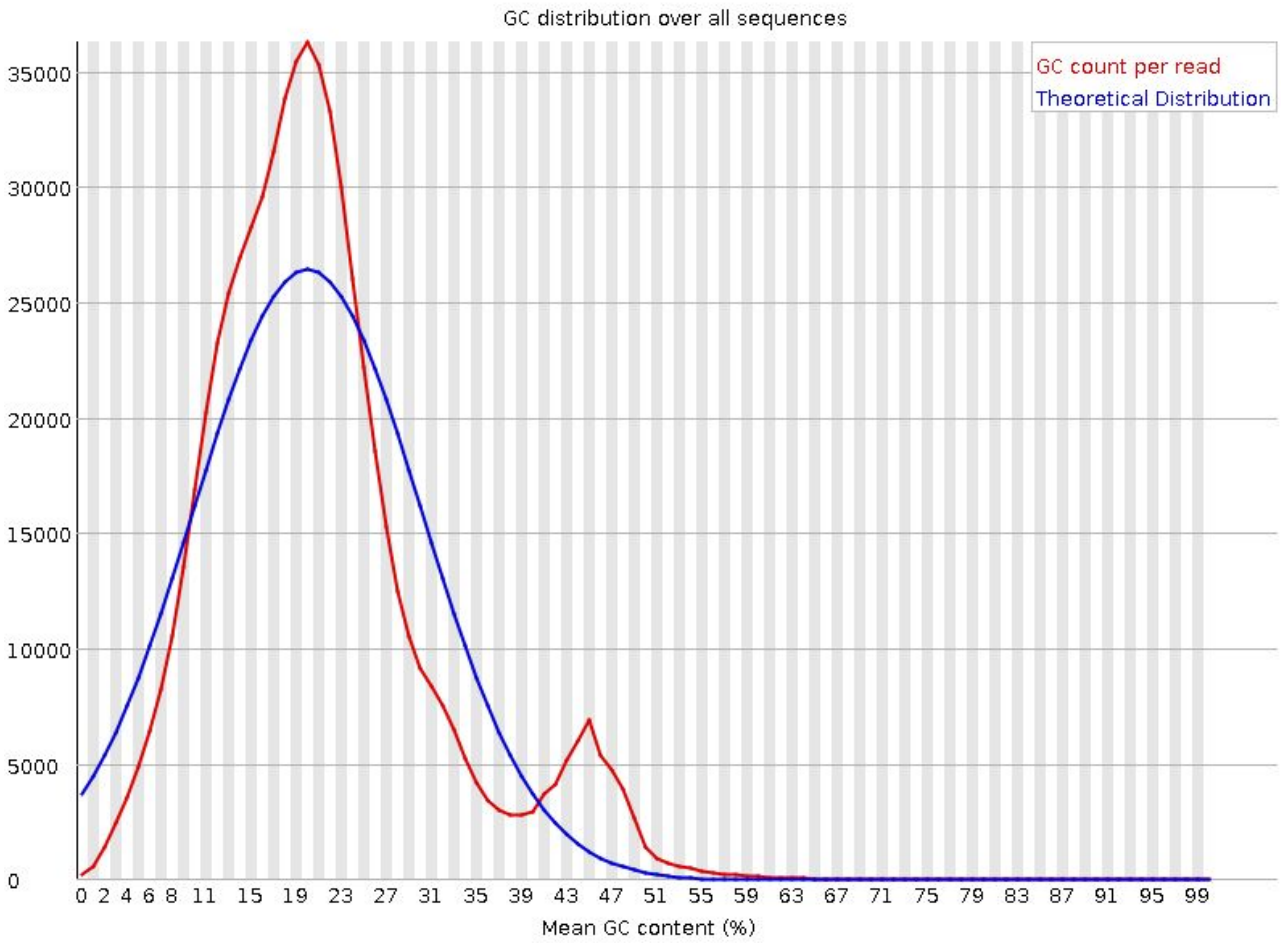
Пример 1

- Слишком короткие фрагменты
- Секвенирование доходит до конца и идет в адаптер



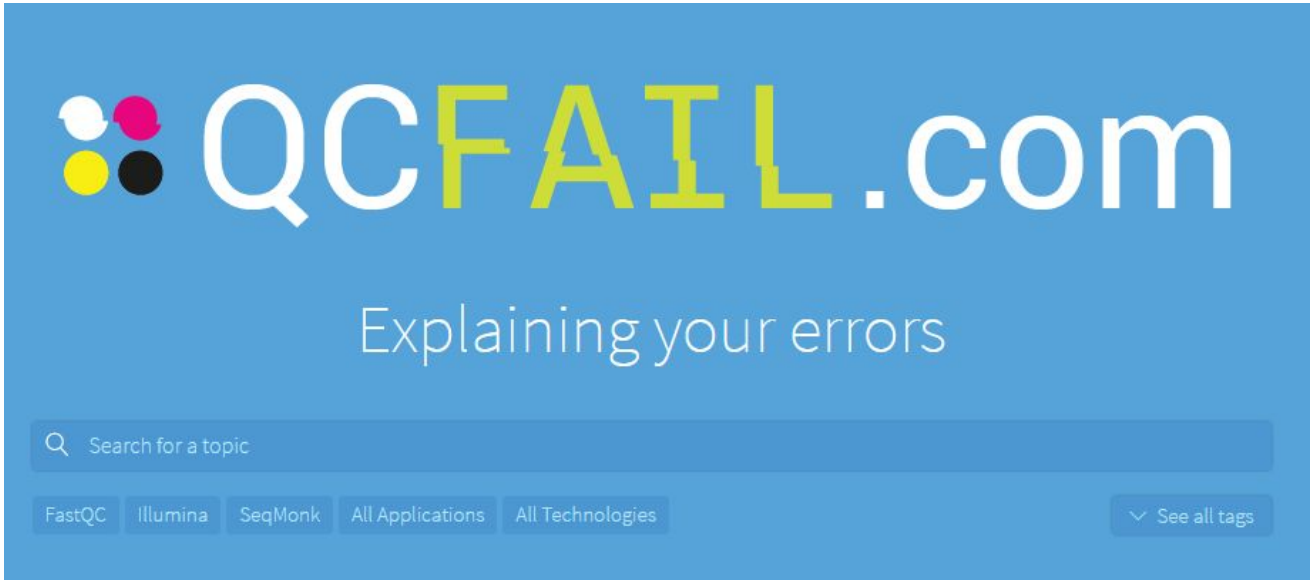
Пример 2

- загрязнение бактериальным геномом



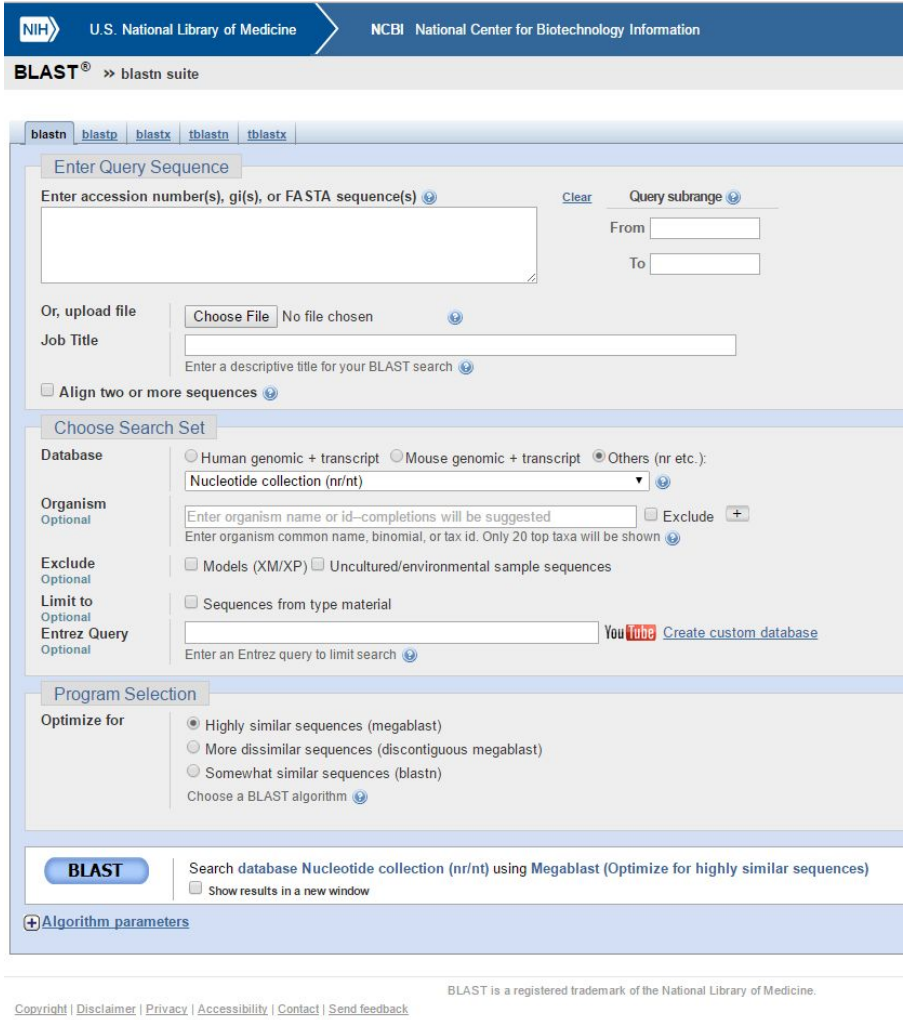
Примеры жизненных неудач

- QCFail: https://sequencing.qcfail.com/



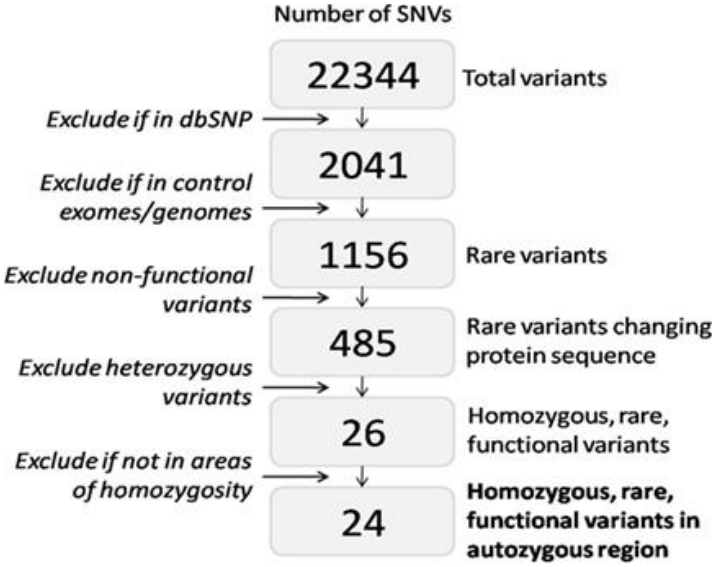
Непонятные прочтения

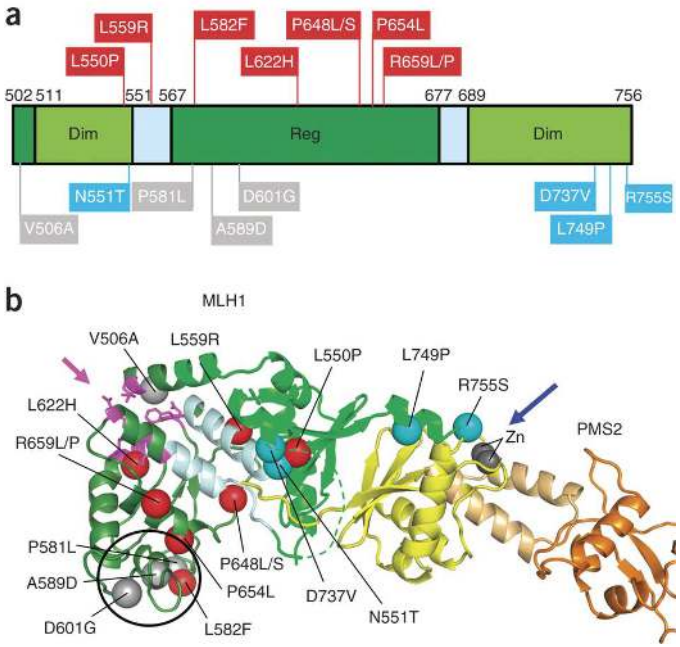
- BLAST - понять, какой биологический вид
- Методика - чтобы понять, откуда они взялись



Чем занимается мед-биоинформатик?

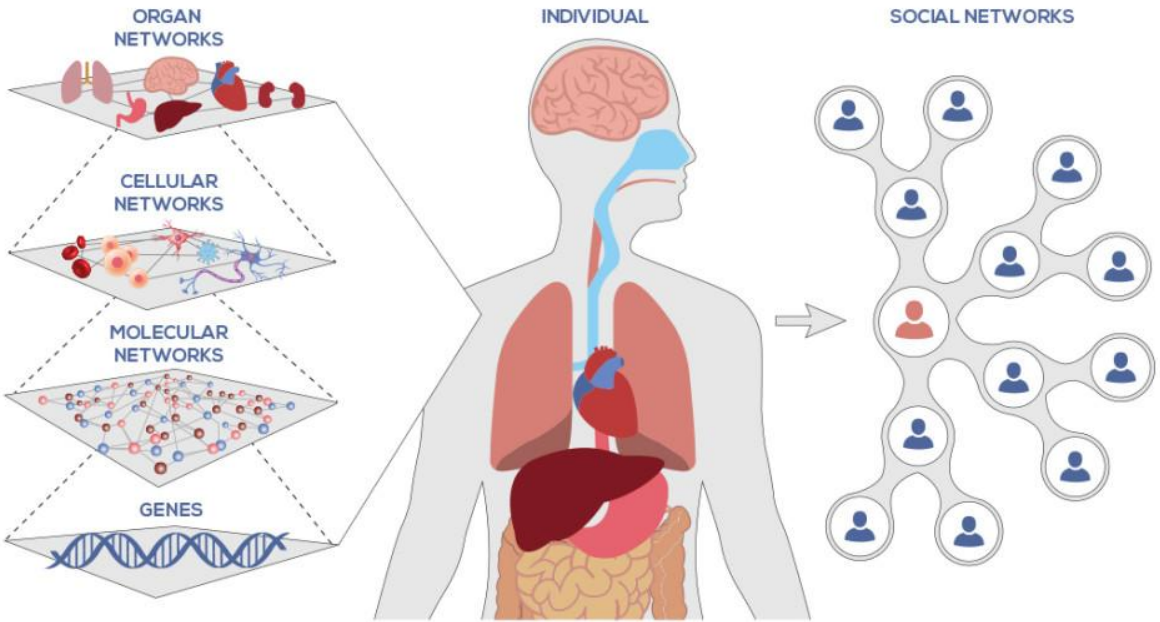
- общение с врачом-генетиком
- контроль качества образцов, анализ покрытия, кандидаты
- анализ и приоритезация мутаций





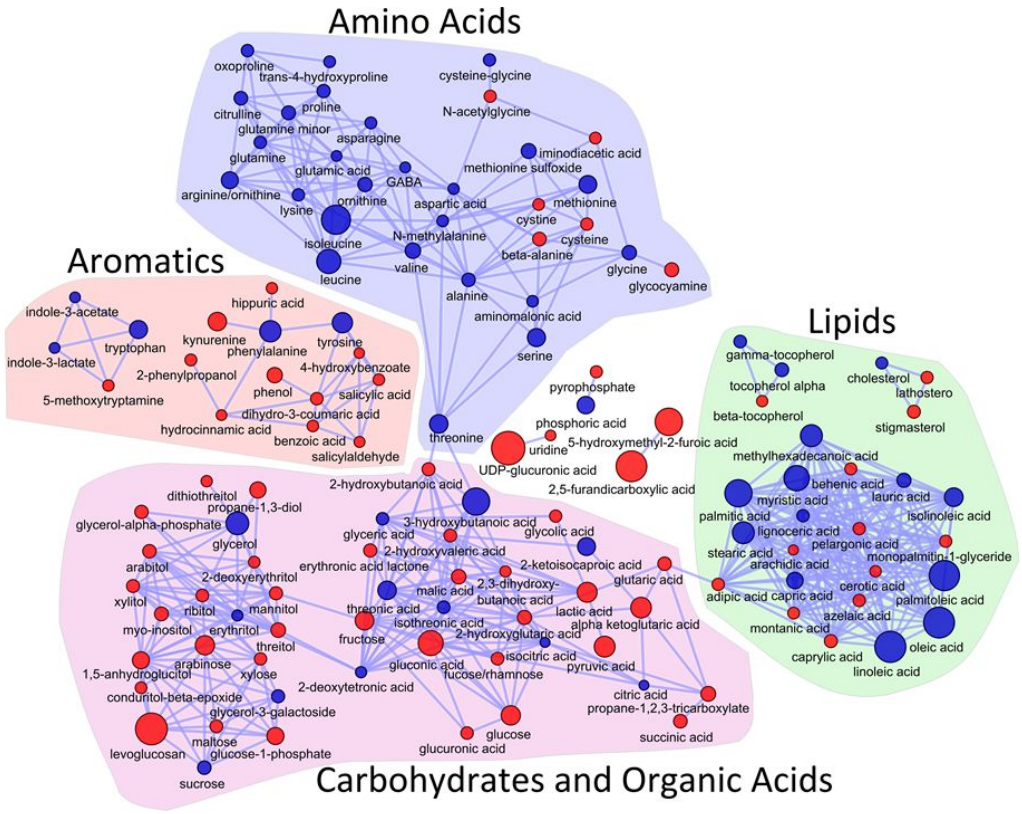
Системная биология

- попытки объединить разрозненные данные в целостную картину
- попытки построить более точные математические модели



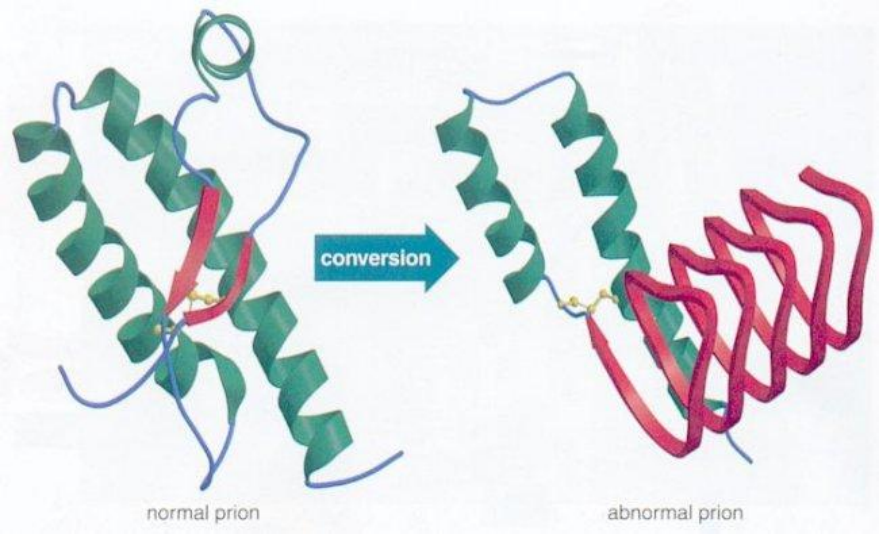
Интеграция омиксных технологий

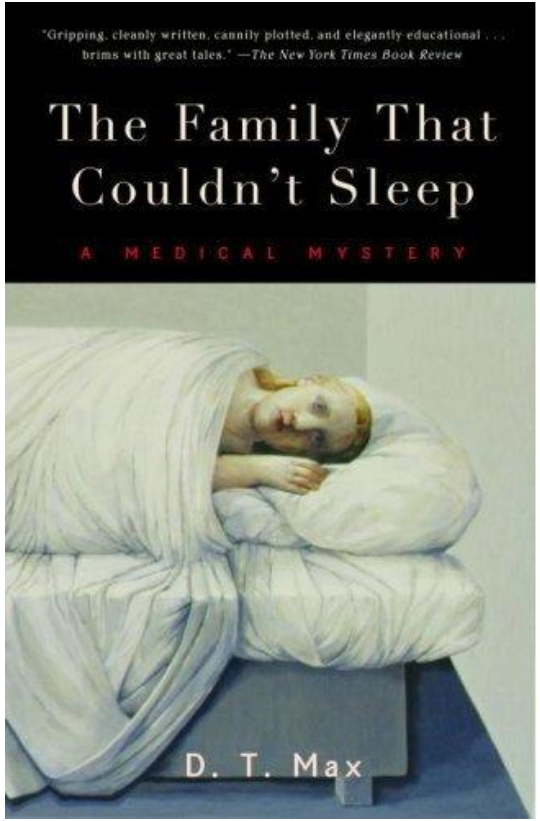
- геномика
- транскриптомика
- протеомика
- метаболомика
  - липидомика
  - гликомика



Fatal Familial Insomnia (FFI)

- аутосомно-доминантное прионное заболевание
- известно всего 25 семей
- знаменитая семья из Венето, страдающая от заболевания уже более 200 лет!





История другой семьи

- Мать умерла от деменции в 52 года
- Дочь оказалась носителем мутации
- Оба бросили свои карьеры (в 2013-м году) и были приняты в аспирантуру Broad Institute
- cureFFI.org

CureFFI.org

About Archives Contact

Does this mean I'll definitely get the disease?

Jan 20, 2016 • ericminikel • Cambridge, MA

I am excited to announce today the publication of our new study, "Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts" [full text, PDF, perspective piece by Robert Green]. I wanted to write a blog post to announce it and to offer up the comments section (bottom of this post) as a place for post-publication peer review. I also wanted to take this opportunity to tell the history of this study, a profoundly personal endeavor that has grown and taken shape over the entire four year course of my re-training as a scientist.

На данный момент

- Организовали небольшую лабораторию в Broad Institute
- Собрали деньги на клинические испытания
- Успели еще очень много всякого!

Спасибо за внимание!