Biologia: NGS Galaxy

Krótki opis usługi

Usługa jest przeznaczona dla biologów oraz bioinformatyków.

NGS Galaxy jest implementacją popularnego środowiska zarządzania zadaniami pozwalającego na uproszczone uruchamianie analiz bioinformatycznych na zasobach obliczeniowych PLGrid. W ramach usługi szczególny nacisk położony został na udostępnienie możliwie dużej liczby narzędzi związanych z analizą danych pochodzących z eksperymentów opartych o metody wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Wykonywanie analiz z użyciem **Galaxy** oparte jest o wygodny interfejs dostępny w formie serwisu internetowego, pozwalającego na intuicyjne zarządzanie danymi, narzędziami oraz wynikami. Wbudowane moduły wizualizacji pozwalają na przejrzystą i efektywną analizę wyników.

Aktywowanie usługi

Aby skorzystać z usługi **NGS Galaxy**, należy mieć aktywne konto w Infrastrukturze PLGrid oraz aktywną afiliację.

Do usługi **NGS Galaxy** może uzyskać dostęp każdy użytkownik PLGrid, który jest użytkownikiem usługi **Molecular Biology Data Analysis Toolkit** . W celu uzyskania dostępu do tej usługi należy po zalogowaniu się w Portalu PLGrid w lewym menu wybrać zakładkę ***Usługi***. Po przejściu do tej zakładki należy kliknąć zielony przycisk ***Zarządzaj usługami***, znajdujący się w prawym górnym rogu. Spowoduje to przejście do Katalogu Aplikacji i Usług (KAiU), gdzie należy wyszukać usługę **Molecular Biology Data Analysis Toolkit**, a następnie o nią aplikować.

Przyznanie usługi następuje automatycznie. Gdy usługa zostanie przyznana, pojawi się na liście usług w portalu PLGrid ze statusem *„active”* Status usługi będzie również widoczny w KAiU jako *"Status użytkownika: Usługa aktywna — usługa dostępna dla użytkownika*".

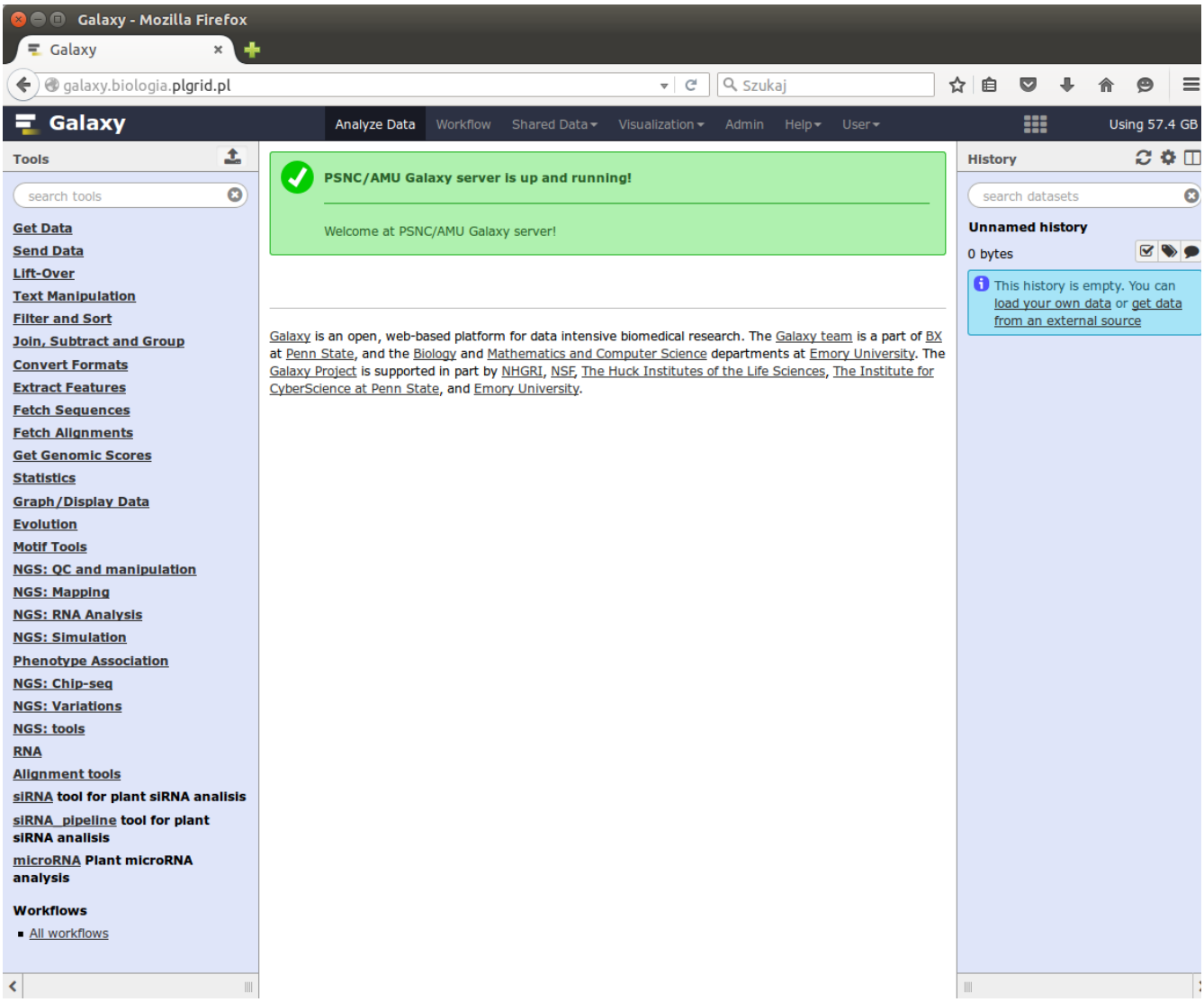
Pierwsze kroki

Uruchomienie usługi

Uruchomienie usługi **NGS Galaxy** możliwe jest na każdym komputerze wyposażonym w przeglądarkę internetową. Usługa dostępna jest poprzez portal MBDAT bądź pod adresem: https://galaxy.biologia.plgrid.pl. Podczas wczytywania strony wyświetlony zostanie monit o zalogowanie z użyciem konta PLGrid.

Organizacja interfejsu

Po zalogowaniu wyświetlona zostanie strona startowa usługi:



Interfejs składa się z trzech paneli: po lewej stronie zlokalizowana jest lista dostępnych narzędzi pogrupowanych według kategorii funkcjonalnych, środkowy panel służy do wyświetlania formularzy poszczególnych narzędzi oraz wizualizacji wyników, natomiast w prawym panelu znajduje się historia pracy w której wyświetlane są pliki wysłane do **Galaxy** oraz pliki wynikowe uzyskane w ramach prowadzonych analiz.

Przykładowy scenariusz użycia: analiza danych RNA-seq

1. Załaduj z dysku pliki z folderu ***Sesja2***:
   adrenal_1.fastq
   adrenal_2.fastq
   brain_1.fastq
   brain_2.fastq
   Aby to zrobić, wybierz narzędzie ***Get Data -> Upload File***, następnie użyj przycisku ***Choose local file***. Można zaznaczyć wszystkie pliki jednocześnie z wciśniętym klawiszem *Shift*. Następnie należy określić format plików. Dla plików *.**fastq*** w kolumnie ***Type*** wybierz ***fastqsanger*** (pliki fastq z kodowaniem jakości w skali Sanger). Naciśnij przycisk ***Start***. Podczas transferu można zamknąć okno przyciskiem ***Close*** bez przerywania transferu. Aby do niego wrócić należy ponownie wybrać ***Get Data -> Upload File.***

2. Pobieranie z UCSC Genome Browser plików z adnotacją genomową w formacie GTF. Narzędzie: ***Get Data -> UCSC Main table browser***. Aby pobrać adnotacje znanych genów o wysokiej wiarygodności dla genomu człowieka w wersji złożenia hg19 dla chromosomu 19 wybierz następujące opcje:

   - clade: Mammal
   - genome: Human
   - assembly: Feb. 2009 (GRCh37/hg19)
   - group: Genes and Gene Predictions
   - track: UCSC Genes
   - table: knownGene
   - region: zaznacz opcję position i wpisz chr19

- output format: GTF – gene transfer format, zaznacz opcję Send output to Galaxy

  Wciśnij przycisk ***get output*** i następnie potwierdź przyciskiem ***Send query to Galaxy***. Plik z adnotacją pojawi się w panelu historii Galaxy.

3. Pobieranie plików z adnotacją genomową w formacie BED. Powtórz poprzedni punkt, tym razem w opcjach na stronie UCSC Genome Browser wybierając output format: ***BED – browser extensible data***. Tym razem po wciśnięciu przycisku ***get output***, pojawi się strona z dodatkowymi opcjami. Pozostaw ustawienia domyślne, i wciśnij przycisk ***Send query to Galaxy***

4. Mapowanie odczytów do genomu referencyjnego. Narzędzie: ***NGS: Mapping -> Bowtie2 – map reads against reference genome***. Wybierz następujące parametry:

   - Is this single or paired library: Paired end
   - Pierwszy plik FASTQ: adrenal_1.fastq (plik zawierający odczyty „forward" (zazwyczaj zawiera '_1' albo 'f' w nazwie)
   - Drugi plik FASTQ: adrenal_2.fastq (plik zawierający odczyty „reverse" (zazwyczaj zawiera '_2' albo 'r' w nazwie)
   - Will you select a reference genome from your history or use a built-in index?: Use a buillt-in genome index
   - Select reference genome: Human (Homo sapiens) (b37): hg19 Canonical

   Wciśnij przycisk ***Execute***. Spróbuj powtórzyć procedurę dla plików ***brain_1.fastq*** i ***brain_2.fastq***. Pamiętaj, że możesz wybrać tylko pliki o zgodnym formacie. Podczas importu plików, dla ***brain*** ustawiliśmy opcję ***Auto-detect***. Klikając na nazwę pliku w historii rozwiną się informacje na temat pliku. Sprawdź, czy pliki ***brain*** mają format ***fastqsanger***. Jeśli nie, wciśnij ikonę ołówka, a następnie w zakładce ***Datatype*** zmień typ pliku na ***fastqsanger***.

5. Zwizualizuj uzyskany plik BAM w przeglądarce genomowej. W panelu historii kliknij na nazwę pliku i poszukaj ikonki z wykresem, która po najechaniu na nią myszką powinna być adnotowana jako ***Visualize in Trackster***. Po jej wciśnięciu zostaniesz przekierowany do okna wizualizacji. Aby utworzyć nowa wizualizację, należy wpisać jej nazwę (dowolną) oraz wybrać genom ***Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) (hg19)*** oraz wcisnąć przycisk ***Create***. Dane są dostępne dla rejonu: Chr19:3000000:3500000, dlatego z rozwijanego menu na górze strony należy wybrać chr19 i powiększyć fragment chromosomu na którym widoczne są zmapowane odczyty. Aby porównać rozłożenie odczytów z pozycjami genów, należy załadować plik GTF. W tym celu naciśnij ikonę ***+*** znajdującą się w prawym górnym rogu (***Add tracks***). Wybierz plik GTF pobrany wcześniej z UCSC Genome Browser. Zwróć uwagę, że po odpowiednim zawężeniu obserwowanego regionu zmienia się reprezentacja odczytów oraz sposób wyświetlania genów. Po zakończeniu, wciśnij ikonę ***save*** a następnie ***close***. W ten sposób wizualizacja ta będzie dostępna później poprzez menu górnej belki ***Visualization -> Saved visualizations***.

6. Analiza jakości mapowania. Narzędzie: pakiet RseQC. Wszystkie narzędzia z pakietu uruchomić należy na plikach BAM uzyskanych za pomocą mapowania programem Bowtie2 (Input file) oraz pliku BED zawierającym adnotację chromosomu 19 pobranym w punkcie 3 tej sesji (reference gene model). W ramach pakietu należy wybrać następujące narzędzia i opcje:

   - ***NGS: QC and manipulation -> Gene Body Converage (BAM)***
   - ***NGS: QC and manipulation -> RPKM Saturation.*** Opcje: Strand-specific?: Pair-End RNA-seq z pierwszym układem odczytów.
   - ***NGS: QC and manipulation -> Read Distribution***
   - ***NGS: QC and manipulation -> BAM/SAM Mapping Stats***

   Uruchom narzędzie dla plików BAM uzyskanych z mapowania próbek adrenal oraz brain. Porównaj wyniki.

7. Testowanie statystyczne genów pod względem różnicowej ekspresji. Narzędzie: ***NGS: RNA Analysis -> DESeq2***. Jako plik GFF podaj plik GTF z adnotacją chromosomu 19 pobrany w punkcie 2 tej sesji. Należy dodać po jednym replikacie dla każdej z grup. Jako pierwszy wskaż plik BAM będący wynikiem mapowania odczytów pochodzących z mózgu, a w ramach grupy drugiej wskaż plik BAM będący wynikiem mapowania odczytów z nadnerczy.

8. Przeanalizuj uzyskane wyniki zawierające listę genów ulegających różnicowej ekspresji.

Gdzie szukać dalszych informacji?

Szczegółowe informacje o użytkowaniu infrastruktury PLGrid znajdują się w Podręczniku Użytkownika.

Szczegółowa dokumentacja platformy Galaxy znajduje się na stronie: https://galaxyproject.org/

Materiały szkoleniowe opracowane przez deweloperów platformy Galaxy dostępne są na stronie: https://wiki.galaxyproject.org/Learn/Screencasts

Informacje o usługach dziedzinowych *Biologia* dostępne są na stronie: http://biologia.plgrid.pl/

Uzyskanie informacji/helpdesk PLGrid: dokumentacji o pomocy