# Использование КС-грамматики для распознавания 16s рРНК

Семён Григорьев, Дмитрий Ковалёв

12 сентября 2017 г.

## 1 Введение

Одна из задач, возникающих в биоинформатике — задача поиска и классификации маркерных цепочек, использующихся для обнаружения и классификации организмов. При этом, многие маркерные цепочки обладают достаточно богатой вторичной структурой, что позволяет сделать предположение, что её можно использовать для решения данной задачи. Более того, известно, что некоторые участки обладают достаточно консервативной вторичной структурой. Например, центральный домен 16s [**?**]. Использование вторичной структуры при решении задач поиска и классификации цепочек не является новой идеей. Она используется как в широко распространённых инструментах (Infernal [**?**]), так и во многих теоретических исследованиях [**?**, **?**, **?**].

Вторичная структура цепочек может быть описана с помощью грамматик. В зависимости от требуемой точности могут использоваться разные классы грамматик: регулярные, контекстно-свободные, конъюнктивные. В данной работе будут использоваться контекстно-свободные грамматики и соответствующий класс языков. В результате, по аналогии с поиском по регулярному выражению, задача поиска сведётся к поиску структурного шаблона, заданного контекстно-свободной грамматикой. Так как вторичная структура больших цепочек может быть достаточно сложной, соответствующая грамматика также оказывается сложной. При этом часто необходимо искать баланс между сложностью грамматики, которая непосредственно связана с детализацией описания вторичной структуры, и производительностью и точностью поиска.

Одна из маркерных цепочек, часто используемая в настоящее время — это 16s rRNA. Данный отчёт описывает эксперимент по распознаванию 16s с использованием информации только о её вторичной структуре, описанной контекстно-свободной грамматикой.

# 2 Описание вторичной структуры с помощью грамматики

Для спецификации грамматики был использован язык YARD [**?**], основанный на ECFG [**?**] с различными расширениями. В правых частях можно использовать конструкции регулярных выражений.

В таблице 1 представлены основные конструкции и примитивы, использовавшиеся при написании грамматики. Так как описание несовпадений в стеме в общем случае является сложной задачей (возможно, неразрешимой в терминах контекстно-свободных грамматик), были использованы такие правила, как $stem\_e1<s>$, описывающие приближение множества стемов с несовпадениями.

| Грамматическая конструкция | Описание |
|---|---|
| $any$ | Один из нуклеотидов $A, U, C, G$. |
| $any^*[n..m]$ | Цепочка нуклеотидов длины от $n$ до $m$. |
| $stemN<s>$ | Стем высоты $N$ со свободной частью $s$ (последовательность любых конструкций грамматики). |
| $mk\_stem<s>$ | Стем произвольной высоты (от 0 до $N$) со свободной частью $s$. |
| $stem\_e1<s>$ | Стем, позволяющий одно несовпадение, при этом требующий, чтобы подряд было не менее двух парных элементов. |

Таблица 1: Базовые конструкции грамматики

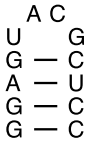
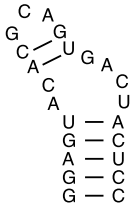
| | |
|---|---|
| $stem4<any^*[3..5]>$ | $mk\_stem<any^*[1..2]\ stem2<any^*[3..4]>\ any^*[2..5]>$ |
|  |  |

Таблица 2: Примеры описания структур

# 3 Эксперименты

Для проведения эксперимента прежде всего необходима контекстно-свободная грамматика, описывающая вторичную структуру искомой цепочки. Построение грамматики, задающей вторичную структуру, в настоящий момент выполняется вручную, однако возможен и вывод грамматики, но это тема для отдельного исследования.

Используемая в эксперименте грамматика, которая была построена нами, приведена в приложении А. В качестве образца была использована эталонная вторичная структура 16s E.Coli. Терминальный алфавит состоит из четырех символов-нуклеотидов: $A, U, C, G$. Для спецификации стемов активно используются параметризуемые правила, что позволяет сделать граммтику достаточно компактной. Ключевое слово `inline` является служебным и используется для того, чтобы подсказать генератору синтаксических анализаторов, как именно преобразовывать грамматику в ходе работы.

Всего было поставлено два эксперимента: обработка базы известных последовательностей 16s и поиск 16s в полноразмерных размеченных геномах. Целью первого эксперимента была оценка качества составленной нами граммитики на предмет полноты детектирования цепочек: вычислялся процент нераспознанных цепочек относительно всех обработанных. Цель второго — оценка количества ложных срабатываний. Вместе с этим оценивалась и полнота поиска.

Для первого эксперимента была использована база цепочек проекта Silva [**?**], которая содержит более 20 тысяч различных последовательностей. Результаты данного эксперимента приведены в таблице 3, где '+' — количество распознанных цепочек для соответствующего домена, '-' — количество нераспознанных. В итоге, при использовании грамматики для центрального домена распознанно 98.16% цепочек, являющихся 16s рРНК, а при использовании грамматики для 5'M домена — 63.13%. Кроме этого, можно заметить, что 5'M домен лучше разделяет домены.

| Домен | Стартовый нетерминал | Бактерии | | Эукариоты | | Археи | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | + | - | + | - | + | - |
| Центральный | h19 | 17878 | 335 | 2153 | 3165 | 306 | 13 |
| 5'M | h3 | 11498 | 6715 | 64 | 5254 | 81 | 238 |

Таблица 3: Результаты анализа базы организмов

Для второго эксперимента использовались 100 размеченных геномов из базы NCBI. Поиск по центральному домену показал очень большое количество ложных срабатываний, поэтому резуьтаты здесь приводиться не будут. Часть результатов поиска по 5'M домену приведены в таблице 4. В таблице указан код организма в NCBI, его название, количество размеченных и правильно обнаруженных последовательностей 16s (Expected и Covered соответственно), количество ложных срабатываний (FP-intervals), средняя длина и отклонение для цепочек, соответствующих ложным срабатваниям. Последние два столбца могут помочь оценить объём работы по дополнительной фильтрации ложных срабатываний. В итоге, для 100 геномов получены следующие результаты:

- среднее количество ложных срабатываний на геном равно 299, отклонение равно 221,54;
- средняя доля правильно обнаруженных цепочек равна 0,98 при отклонении 0,11.

Также, в таблице 5 приведены результаты поиска по совмещённой грамматике для 5'M и центрального домена. Обращает на себя резкое снижение количества ложных срабатваний. При этом, однако, уменьшается и количество положительных совпадений.

| NCBI ID | Name | Expected | Covered | FP-intervals | Length(avg.) | Length SD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NZ_CP012959.1 | Aggregatibacter actinomycetemcomitans strain 624 | 6 | 6 | 164 | 614.6 | 246.4 |
| NC_014640.1 | Achromobacter xylosoxidans A8 | 3 | 3 | 556 | 586.9 | 244.9 |
| NC_005966.1 | Acinetobacter sp. ADP1 complete genome | 7 | 7 | 211 | 552.8 | 134.4 |
| NZ_CP009448.1 | Achromobacter xylosoxidans C54 | 3 | 3 | 598 | 579.1 | 201.6 |
| NC_013171.1 | Anaerococcus prevotii DSM 20548 | 4 | 3 | 245 | 584.6 | 256.0 |
| NZ_CP012590.1 | Actinomyces sp. oral taxon 414 strain F0588 | 3 | 3 | 363 | 591.5 | 196.8 |
| NZ_CP014060.1 | Achromobacter xylosoxidans strain FDAARGOS_147 | 3 | 0 | 741 | 614.1 | 266.0 |
| NZ_CP007502.1 | Aggregatibacter actinomycetemcomitans HK1651 | 6 | 6 | 113 | 569.8 | 173.6 |
| NZ_LT635457.1 | Actinomyces sp. Marseille-P2985 | 3 | 3 | 71 | 570.0 | 153.4 |
| NZ_CP012046.1 | Achromobacter xylosoxidans strain MN001 | 3 | 3 | 560 | 599.9 | 222.9 |
| NZ_LN831029.1 | Achromobacter xylosoxidans genome assembly NCTC10807 | 3 | 3 | 653 | 582.5 | 206.0 |
| NZ_CP015594.1 | Acinetobacter sp. NCu2D-2 | 7 | 7 | 125 | 544.1 | 117.1 |
| NC_012913.1 | Aggregatibacter aphrophilus NJ8700 | 6 | 6 | 157 | 551.2 | 147.7 |
| NZ_CP020468.1 | Actinomyces sp. pika_114 | 3 | 3 | 103 | 664.1 | 596.9 |
| NZ_CP014232.1 | Actinomyces oris strain T14V | 3 | 3 | 200 | 606.1 | 227.7 |
| NZ_CP015110.1 | Acinetobacter sp. TGL-Y2 | 7 | 7 | 234 | 561.9 | 173.1 |
| NZ_CP012608.1 | Acinetobacter sp. TTH0-4 | 7 | 7 | 204 | 575.3 | 169.6 |
| NZ_CP017812.1 | Actinomyces sp. VUL4_3 | 3 | 3 | 125 | 662.4 | 326.1 |
| NZ_CP012067.1 | Aggregatibacter aphrophilus strain W10433 | 6 | 6 | 162 | 551.3 | 119.0 |
| NZ_CP012072.1 | Actinomyces meyeri strain W712 | 3 | 3 | 197 | 631.5 | 313.8 |
| NC_000964.3 | Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 chromosome | 10 | 10 | 278 | 558.2 | 154.3 |
| NZ_CP016852.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 168G | 10 | 10 | 278 | 558.9 | 154.3 |
| NZ_CP009902.1 | Bacillus anthracis strain 2002013094 | 11 | 10 | 1352 | 656.2 | 269.3 |
| NZ_CP017763.1 | Bacillus subtilis strain 29R7-12 | 10 | 10 | 297 | 538.0 | 110.4 |
| NZ_CP010314.1 | Bacillus subtilis subsp. subtilis strain 3NA | 10 | 10 | 273 | 556.3 | 150.7 |
| NC_012659.1 | Bacillus anthracis str. A0248 | 11 | 11 | 1302 | 660.8 | 285.9 |
| NC_011835.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis AD011 | 2 | 2 | 190 | 604.0 | 223.0 |
| NZ_CP009748.1 | Bacillus subtilis strain ATCC 13952 | 7 | 7 | 216 | 553.3 | 147.2 |
| NZ_CP009749.1 | Bacillus subtilis strain ATCC 19217 | 7 | 7 | 231 | 542.8 | 147.4 |
| NC_017834.1 | Bifidobacterium animalis subsp. animalis ATCC 25527 | 4 | 4 | 157 | 653.2 | 299.0 |
| NC_022523.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis ATCC 27673 | 4 | 4 | 176 | 613.7 | 252.4 |
| NC_017866.1 | Bifidobacterium animalis subsp. lactis B420 | 4 | 4 | 192 | 605.1 | 243.0 |
| NZ_CP014227.1 | Capnocytophaga haemolytica strain CCUG 32990 | 4 | 4 | 405 | 681.3 | 312.6 |
| NZ_CP014230.1 | Desulfomicrobium orale DSM 12838 | 2 | 2 | 198 | 566.4 | 162.8 |
| NC_013162.1 | Capnocytophaga ochracea DSM 7271 | 4 | 4 | 161 | 613.1 | 184.1 |
| NZ_CP012475.1 | Bacillus clausii strain ENTPro | 7 | 7 | 350 | 555.3 | 147.7 |
| NZ_CP017037.1 | Dialister pneumosintes strain F0677 | 5 | 5 | 407 | 647.0 | 257.2 |
| NZ_CP012366.1 | Enterococcus durans strain KLDS6.0933 | 6 | 6 | 202 | 532.3 | 101.7 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NZ_CP012384.1 | Enterococcus durans strain KLDS 6.0930 | 6 | 6 | 203 | 532.0 | 101.4 |
| NC_006582.1 | Bacillus clausii KSM-K16 DNA | 7 | 7 | 369 | 559.0 | 176.2 |
| NZ_CP016923.1 | Klebsiella pneumoniae isolate 11 | 8 | 8 | 381 | 543.7 | 150.8 |
| NZ_CP008740.1 | Haemophilus influenzae 2019 | 6 | 6 | 132 | 545.0 | 107.4 |
| NZ_CP016926.1 | Klebsiella pneumoniae isolate 23 | 8 | 8 | 389 | 553.2 | 162.1 |
| NZ_CP011313.1 | Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain 234-12 | 8 | 8 | 392 | 556.3 | 154.4 |
| NC_013721.1 | Gardnerella vaginalis 409-05 | 2 | 2 | 237 | 601.6 | 229.9 |
| NZ_CP007470.1 | Haemophilus influenzae strain 477 | 6 | 6 | 136 | 560.1 | 118.2 |
| NZ_CP007472.1 | Haemophilus influenzae strain 723 | 6 | 6 | 146 | 564.1 | 152.6 |
| NC_007146.2 | Haemophilus influenzae 86-028NP | 6 | 6 | 157 | 548.1 | 104.8 |
| NC_014644.1 | Gardnerella vaginalis ATCC 14019 chromosome | 2 | 2 | 267 | 597.4 | 190.2 |
| NC_003454.1 | Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum ATCC 25586 | 5 | 5 | 766 | 654.9 | 281.7 |
| NC_010376.1 | Finegoldia magna ATCC 29328 DNA | 4 | 4 | 339 | 645.8 | 335.1 |
| NC_018610.1 | Lactobacillus buchneri CD034 | 5 | 5 | 107 | 533.4 | 173.3 |
| NC_000908.2 | Mycoplasma genitalium G37 | 1 | 1 | 30 | 533.8 | 98.9 |
| NZ_CP019058.1 | Gardnerella vaginalis strain GV37 | 2 | 2 | 282 | 588.6 | 184.2 |
| NZ_CP012716.1 | Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum ChDC F3162 | 4 | 4 | 819 | 655.7 | 301.7 |
| NC_018498.1 | Mycoplasma genitalium M2288 | 1 | 1 | 32 | 519.3 | 92.5 |
| NC_018496.1 | Mycoplasma genitalium M6282 | 1 | 1 | 30 | 530.3 | 95.6 |
| NC_015428.1 | Lactobacillus buchneri NRRL B-30929 | 5 | 5 | 97 | 524.6 | 122.8 |
| NZ_CP019323.1 | Lactobacillus sp. WiKim39 | 4 | 4 | 443 | 605.1 | 206.9 |
| NZ_CP009531.1 | Lactobacillus sp. wkB8 | 4 | 4 | 108 | 555.3 | 162.9 |
| NC_014752.1 | Neisseria lactamica 020-06 complete genome | 4 | 4 | 176 | 643.8 | 294.6 |
| NZ_CP013696.1 | Pseudomonas aeruginosa strain 12-4-4(59) | 4 | 4 | 374 | 555.6 | 160.0 |
| NC_017534.1 | Propionibacterium acnes 266 | 3 | 3 | 197 | 605.1 | 270.4 |
| NZ_CP012889.1 | Porphyromonas gingivalis 381 | 4 | 4 | 105 | 520.1 | 78.0 |
| NC_017535.1 | Propionibacterium acnes 6609 | 3 | 3 | 195 | 609.4 | 279.5 |
| NZ_AP014839.1 | Pseudomonas aeruginosa DNA | 4 | 4 | 377 | 570.3 | 181.0 |
| NZ_CP011995.1 | Porphyromonas gingivalis strain A7436 | 4 | 4 | 98 | 540.6 | 151.9 |
| NZ_CP013680.1 | Pseudomonas aeruginosa AES-1R | 1 | 1 | 369 | 556.4 | 137.9 |
| NZ_CP015347.1 | Proteus mirabilis strain AOUC-001 | 7 | 7 | 261 | 550.1 | 176.0 |
| NZ_CP020052.1 | Proteus mirabilis strain AR_0059 | 7 | 7 | 259 | 557.6 | 152.2 |
| NZ_CP021694.1 | Proteus mirabilis strain AR_0155 | 7 | 7 | 281 | 565.3 | 171.6 |
| NC_017550.1 | Propionibacterium acnes ATCC 11828 | 2 | 2 | 183 | 583.6 | 210.5 |
| NZ_CP017149.1 | Pseudomonas aeruginosa strain ATCC 15692 | 4 | 4 | 377 | 556.7 | 159.6 |
| NZ_CP007726.1 | Neisseria elongata subsp. glycolytica ATCC 29315 | 4 | 4 | 179 | 655.0 | 324.3 |
| NC_010729.1 | Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 DNA | 4 | 4 | 103 | 525.3 | 104.1 |
| NC_018707.1 | Propionibacterium acnes C1 | 3 | 3 | 206 | 598.5 | 265.6 |
| NZ_CP012830.1 | Pseudomonas fluorescens strain FW300-N2E3 | 6 | 6 | 433 | 564.4 | 158.7 |
| NZ_CP011117.1 | Pseudomonas fluorescens strain LBUM223 | 6 | 6 | 437 | 591.4 | 217.4 |
| NZ_CP012073.1 | Ottowia sp. oral taxon 894 strain W10237 | 3 | 3 | 269 | 636.5 | 258.7 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NZ_CP019894.1 | Neisseria lactamica strain Y92-1009 | 4 | 4 | 177 | 603.6 | 195.8 |
| NZ_CP007241.1 | Streptococcus pyogenes strain 1E1 | 6 | 6 | 126 | 582.6 | 180.2 |
| NZ_CP016756.1 | Stenotrophomonas nitritireducens strain 2001 | 4 | 4 | 595 | 616.9 | 252.8 |
| NC_014498.1 | Streptococcus pneumoniae 670-6B | 4 | 4 | 257 | 591.7 | 199.0 |
| NC_012468.1 | Streptococcus pneumoniae 70585 | 4 | 4 | 246 | 598.4 | 201.2 |
| NC_002967.9 | Treponema denticola ATCC 35405 chromosome | 2 | 2 | 132 | 587.1 | 220.8 |
| NC_022246.1 | Streptococcus intermedius B196 | 4 | 4 | 304 | 586.0 | 198.7 |
| NC_022236.1 | Streptococcus constellatus subsp. pharyngis C232 | 4 | 4 | 267 | 588.4 | 213.5 |
| NZ_CP021181.1 | Sphingomonas sp. DC-6 | 2 | 2 | 478 | 558.8 | 153.8 |
| NC_013521.1 | Sanguibacter keddieii DSM 10542 | 4 | 4 | 302 | 583.3 | 208.9 |
| NC_013520.1 | Veillonella parvula DSM 2008 | 4 | 4 | 366 | 602.6 | 224.1 |
| NC_018089.1 | Streptococcus mutans GS-5 | 5 | 5 | 195 | 555.5 | 150.5 |
| NZ_AP012334.1 | Scardovia inopinata JCM 12537 DNA | 2 | 2 | 107 | 590.4 | 287.9 |
| NZ_CP018221.1 | Sphingomonas sp. JJ-A5 | 2 | 2 | 348 | 562.5 | 178.6 |
| NC_017768.1 | Streptococcus mutans LJ23 DNA | 5 | 5 | 203 | 572.1 | 172.1 |
| NZ_CP019511.1 | Sphingomonas sp. LM7 | 2 | 1 | 379 | 639.3 | 335.8 |
| NC_020561.1 | Sphingomonas sp. MM-1 | 2 | 2 | 475 | 594.1 | 254.4 |
| NZ_CP009227.1 | Treponema sp. OMZ 838 | 2 | 2 | 148 | 618.5 | 413.7 |
| NC_007492.2 | Pseudomonas fluorescens Pf0-1 | 6 | 6 | 484 | 573.8 | 178.3 |
| NC_014034.1 | Rhodobacter capsulatus SB 1003 | 4 | 4 | 722 | 650.8 | 328.0 |
| NZ_CP019721.1 | Veillonella parvula strain UTDB1-3 | 4 | 4 | 354 | 578.5 | 180.0 |



Таблица 4: Результаты анализа полноразмерных геномов (5'M домен)

| NCBI ID | Name | Expected | Covered | FP-intervals | Length(avg.) | Length SD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NZ_CP012959.1 | Aggregatibacter actinomycetemcomitans strain 624 | 6 | 6 | 35 | 954.4 | 175.2 |
| NC_014640.1 | Achromobacter xylosoxidans A8 | 3 | 0 | 41 | 976.6 | 232.5 |
| NC_005966.1 | Acinetobacter sp. ADP1 complete genome | 7 | 7 | 14 | 974.8 | 207.5 |
| NZ_CP009448.1 | Achromobacter xylosoxidans C54 | 3 | 0 | 43 | 932.7 | 146.0 |
| NC_013171.1 | Anaerococcus prevotii DSM 20548 | 4 | 3 | 29 | 1174.6 | 609.3 |
| NZ_CP012590.1 | Actinomyces sp. oral taxon 414 strain F0588 | 3 | 3 | 28 | 1033.9 | 356.2 |
| NZ_CP014060.1 | Achromobacter xylosoxidans strain FDAARGOS_147 | 3 | 0 | 79 | 1024.9 | 343.2 |
| NZ_CP007502.1 | Aggregatibacter actinomycetemcomitans HK1651 | 6 | 6 | 17 | 884.0 | 64.0 |
| NZ_LT635457.1 | Actinomyces sp. Marseille-P2985 | 3 | 3 | 5 | 1120.8 | 217.2 |
| NZ_CP012046.1 | Achromobacter xylosoxidans strain MN001 | 3 | 0 | 56 | 953.9 | 206.3 |

Таблица 5: Результаты анализа полноразмерных геномов (5'M + центральный домены)

## 4 Заключение

Данный эксперимент показал наличие возможности использовать вторичную структуру цепочки для предварительной фильтрации кандидатов, однако требуется существенная доработка используемых алгоритмов. В дальнейшем планируется выполнение работ по следующим направлениям.

- Поиск, разработка и применение алгоритмов автоматического вывода грамматик для построения грамматики, описывающей вторичную структуру цепочки.
- Анализ ложных срабатываний и пропущенных кандидатов с целью выявить их особенности и доработать соответствующим образом алгоритм поиска.
- Разработка методов уменьшения количества ложных срабатываний.

# Приложение

## A Грамматика 16S на языке YARD, использовавшаяся в эксперименте

```
inline any: A | U | G | C
inline any_1_2: any*[1..2]
inline any_1_3: any*[1..3]
inline any_2_3: any any_1_2
inline any_2_4: any*[2..4]
inline any_3_4: any*[3..4]
inline any_3_5: any any_2_4
inline any_5_7: any any any_3_5
inline any_4_6: any any_3_5
inline any_6_8: any any_5_7
inline any_9_11: any*[9..11]
inline any_4 : any any any any

stem1<s>:
      A s U
    | U s A
    | C s G
    | G s C
    | G s U
    | U s G
    | A s G
    | G s A
```

```
stem2<s>: stem1<stem1<s>>
stem4<s>: stem2<stem2<s>>
stem6<s>: stem4<stem2<s>>
stem8<s>: stem4<stem4<s>>

mk_stem<s>:
      A mk_stem<s> U
    | U mk_stem<s> A
    | C mk_stem<s> G
    | G mk_stem<s> C
    | G mk_stem<s> U
    | U mk_stem<s> G
    | G mk_stem<s> A
    | A mk_stem<s> G
    | s

stem<s>: mk_stem<stem4<s>>
stem_2<s>: mk_stem<stem2<s>>

stem_e1<s> : stem_2<(any stem_2<s> | stem_2<s> any)> | stem<s>
stem_e2<s> : stem_2<(any stem_e1<s> any | any stem_e1<s>
             | stem_e1<s> any)> | stem<s>
stem_4: stem_2<any_4>

[<Start>]
full: middle_part_root

head_part_root: h3
middle_part_root:  h19
tail_part_root: h28 any_3_5 h44 any_3_5 h45

head_middle_folded: stem2<(any_6_8 h3 any_9_11 h19 any_1_2 h27 any_2_4)>
full_size_root: h3 any_9_11 h19 any_1_2 h27 any*[7..9] tail_part_root

(* 5'M domain *)
h3: stem_e2<(any_1_2 h4 any_1_3 h16 any_3_5
    (h17 | any*[1..6]) any*[2..5] h18 any_1_2)>
h4: stem_e1<(h5 h15 any?)>
h5: any_5_7 stem_e2<(any_1_3 h6 any_5_7
    stem_2<(any_5_7 h7 any? h11 any_1_3 h12 any?)>
    any_1_2 h13 any_1_2 h14 any_2_4)> any_3_5

h6: stem_e2<stem_e2<stem_e2<stem_e2<any_3_4>>>>
h7: stem_e2<(any_2_4 stem<(any_1_2 h8 any_4_6 h9 any_3_5 h10 any_1_2)>
```

```
             any_1_3)>
h8: stem_2<(any_3_5 stem_4 any_3_5)>
h9: stem_2<any_3_5>
h10: stem_e2<any_3_5>
h11: stem_2<(any_2_4 stem_e2<any_6_8> any_3_5)>
h12: stem<(any? stem_2<any_3_5> any_2_4)>
h13: stem<any_9_11>
h14: stem_2<any_3_5>

h15: stem_e1<(any_2_4 stem2<any_4> any?)>
h16: stem_2<(any_5_7 stem_2<any_2_4> any_4_6)>
h17: stem<(any*[6..9] stem_2<any*[7..11]> any_6_8)>
h18: stem<(any_5_7 stem<(any_4_6 stem_2<any_3_5> any_6_8)>)>

(* Central domain *)
h19: stem_2<(any_5_7 h20 any_3_5 h25 any*[9..12] h26 any_1_2)>
h20: stem_2<( any_3_4 stem_2<( any_1_2 h21 any_2_4 h22 any_2_4 )> any_3_4 )>
h21: stem_e2<( any_3_5 stem_e2<(any_3_5 stem_e1<any*[5..6]> any_2_4)> any_3_5 )>
h22: stem_e2<( any_1_3 stem<(any_3_4 h23 any*[10..12] stem_2<( any any A any )>
               any_1_2)> any_1_3 )>
h23: stem<(any_2_4 stem_2<any*[5..6]> any_5_7)>
h25: stem<(any*[7..11] stem<any*[8..10]> any*[4..7])>
h26: stem_e1<(any_1_2 stem_e2<any_4_6> any_3_5 stem_4 any_3_5 )>
h27: stem_2<(any_5_7 stem_4 any_3_5)>

(* 3'M domain *)
h28: stem_e2<(any h28_a any_2_4)>
h28_a: stem<(any_1_3 h29 any_4_6 h43 any_4_6)>
h29: stem<(h30 any_2_4 h41 any_5_7 h42 any_4_6)>
h30: stem_e1<(any_3_5 h31 any*[7..9] h32 any_2_4)>
h31: stem<any*[7..9]>
h32: stem<(any_4_6 h33 any_1_2 h34 any_3_5)>
h33: stem<(any_1_3 stem<any_4> any_1_3 stem<any_4> any_1_3)>
h34: stem_e1<(any_1_2 stem<(stem_e2<(any_2_4 h35
     any_4_6 h38 any_3_5)> any_2_4)>)>
h35: stem<(h36 any_2_3 h37 any_2_3)>
h36: stem<any_4>
h37: stem<any_5_7>
h38: stem<(any_1_2 h39 any_1_3 h40 any_4_6)>
h39: stem<(any_2_4 stem<(any_1_3 stem<any_4_6>)> any_2_4)>
h40: stem<any_4>
h41: stem<(any_4_6 stem<(any_1_3 stem<(any_2_4 stem<any_4> any_2_4)>
           any_3_5)> any_4_6)>
h42: stem<(any_3_4 stem<any*[7..9]> any_3_4)>
h43: stem<any*[7..9]>
```

```
(* 3'm domain *)
h44: stem<(any_1_3 stem<(any_2_4 stem<(any_1_3 stem<(any_3_5
     stem_e1<(any_1_3 stem<any_4>)> any_2_4)> any_1_3)> any_3_5)> any_2_3)>
h45: stem<any_4>
```