Logboek-Genomics

Jarno Jacob Duiker

Introductie:

Dit logboek gaat over Genomics en Transcriptomics, De eerste 5 weken focussen wij op het Genomics gedeelte. In de Genomics kant van dit onderzoek gaan wij kijken naar het volgende: **Zijn er varianten aanwezig van PAX5 en Ebf1 in het genoom van de rag2 knockout muizen die gebruikt zijn?** Dit omdat: De reden dat gekozen is voor PAX5 en Ebf1 is dat deze betrokken zijn bij de ontwikkeling van voorloper B cellen. In het transcriptomics gedeelte wordt hier ook gebruik van gemaakt dus is het goed om te weten of er varianten aanwezig zijn in het genoom van de muizen die voor transcriptomics gebruikt worden (Rag2 knockout).

Hier onder is een overzicht te zien van de Tools die wij gaan gebruiken in ons onderzoek.

Tool	Referentie	Versie	Waarom
Featurecounts	https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/7/923/232889?searchresult=1		Featurecounts is een zeer efficiënt algemeen "read" samenvattingsprogramma dat mapped reads telt voor genomische kenmerken zoals genen, exonen, promotor, genlichamen, genomische bins en chromosomale locaties. het kan worden gebruikt om zowel RNA-seq als genomische DNA-seq leesbewerkingen te tellen
HISAT2	https://daehwankimlab.github.io/hisat2/		HISAT2 is een snelle en gevoelige alligner voor mapping NGS reads voor zowel DNA als RNA naar een enkele referentie genoom.
FastQC	https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/	0.11.9	FastQC wordt gebruikt om de kwaliteit te checken van de rauwe data, hier uit is te zien of de data gelijk te gebruiken is of dat deze moet worden getrimmed. De trimmer kan ook afgesteld worden op basis van de fastqc.
Fastqcr	https://rpkgs.datanovia.com/fastqcr/index.html	0.11.9	
freebayes	https://github.com/freebayes/freebayes		freebayes is een haplotype gebaseerde gen variant detector, ontworpen om kleine polymorfismes te detecteren, SNP's, inserties en deleties in het bijzonder. Dit programma gebruikt .BAM bestanden met een Phred+33 encoding.
seqtk	https://github.com/lh3/seqtk		seqtk wordt gebruikt voor het proceseren van sequences in het FASTA of FASTQ formaat. het "seamlessly parses" beide FASTA en FASTQ welke dan ook optimaal compressed wordt door gzip
Trimmomatic	https://github.com/usadellab/Trimmomatic	0.39	Trimmomatic wordt gebruikt om de data op te schonen nadat dez uit FastQC komt. Deze haalt de slechte kwaliteit paren af van de streng waardoor een hoge kwaliteit RNA- of DNA-streng overblijft die gebruikt kan worden.

Tool	Referentie	Versie	Waarom
bwa mem2	https://github.com/bwa-mem2/bwa-mem2?tab=readme-ov-file		Bwa mem2 wordt gebruikt om DNA en RNA reads te alignen tegen een gekozen referentie genoom.
samtools	https://www.htslib.org		samtools is een set van “utilities” dat alignments in de SAM, Bam en CRAM formatten kan manipuleren. het kan veranderen tussen de formats, sorteren, samenvoegen en indexen, ook kan het “reads” snel vinden in elke regio
R	https://www.r-project.org		R is de code taal die gebruikt wordt om alle statistieken testen te doen en tevens de visualisatie van de data die komt uit het onderzoek
R-studio	https://posit.co		R studio is het programma wat wordt gebruikt als IDE voor R
NCBI-GEO	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/		NCBI-GEO is gebruikt om het originele onderzoek te vinden waar dit onderzoek inspiratie vanaf neemt

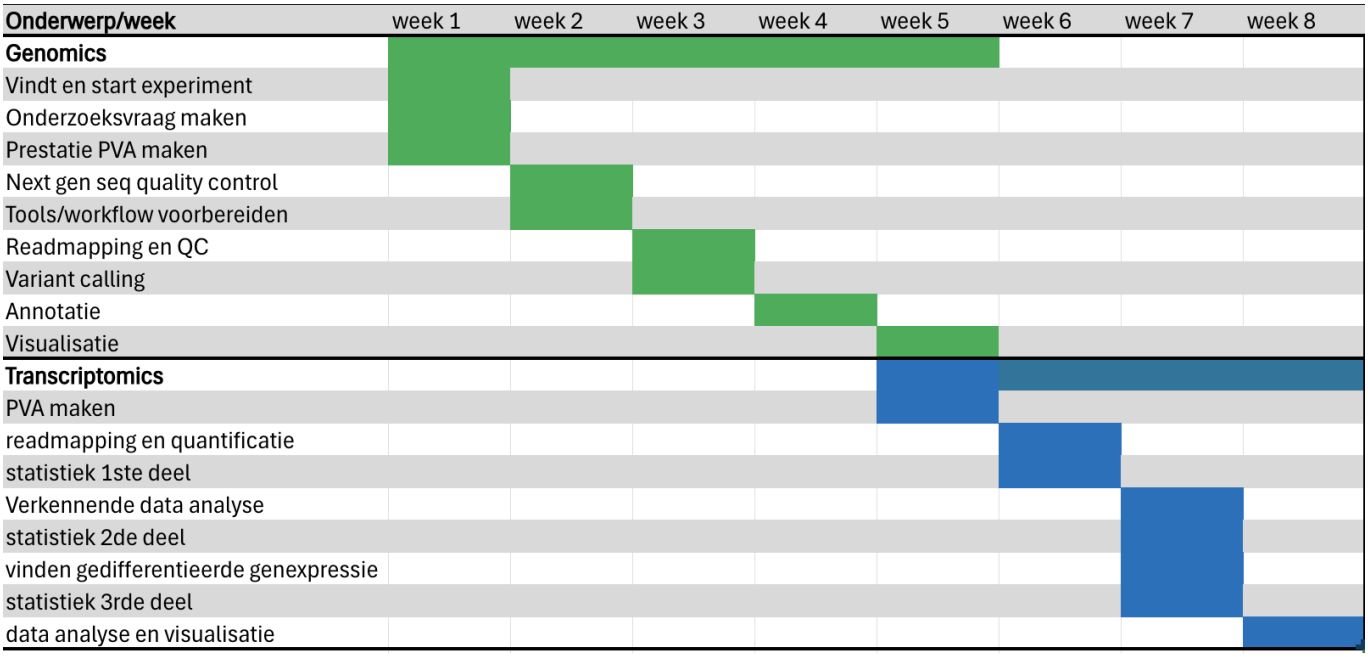


Figure 1: Planning - Tijd voor onderzoek Genomics & Transcriptomics

09-09-2024

Doel van de dag

Het maken van een team & Onderzoeken zoeken met potentie

Taken lijst

- Team maken
- Literatuur + data set zoeken
- Week planning maken

In de klas is er een groep gemaakt samen met Floris, Storm en Ivar. Wij vieren hebben als doelstelling een goed en een interessant onderzoek te presenteren. De motivatie in deze groep is dus een goede basis om op te bouwen.

De Data set zoeken word gedaan via NCBI in de GEO datasets catagorie met de volgende zoek opdracht die als standaard is gesteld door de opdracht gevers: "("expression profiling by high throughput sequencing"[DataSet Type]) AND "genome variation profiling by high throughput sequencing"[DataSet Type]"

Aan deze query kan aan het einde nog een woord of onderwerp toegevoegd worden. In onze groep is besproken naar wat onze interesses waren en het hoofd idee was "aging" ook wel veroudering. Dit komt omdat gen expressie veranderd naarmate een organisme ouder word. Dit is anders in elk organisme en daardoor word er veel onderzoek naar gedaan. Wij zijn gekomen op 3 onderzoeken die uit eindelijk interessant waren

Onderzoeken

- Zhang et al. (2021) : MiniCAFE, a CRISPR/Cas9-based compact and potent transcriptional activator, elicits gene expression in vivo. Dit onderzoek gaat over CRISPR-bemiddelde gen activatie. Dit is een belovende gen veranderingstrategie die DNA kan veranderen zonder dat de dubbele helix breekt. Deze is laten controleren door de opdrachtgever en die zei het volgende "Interessant onderzoek en leuk artikel, maar volgens mij zijn er voor het RNA-Seq gedeelte voor de meeste groepen maar 2 replicaten beschikbaar terwijl we daar minimaal 3 willen hebben. Mochten jullie niet iets anders kunnen vinden dan kunnen we dit experiment alsnog gebruiken, maar daar zitten wel wat risico's aan." Hierdoor zijn we gaan kijken naar andere opties.
- Takasugi et al. (2023) : Gene expressions associated with longer lifespan and aging exhibit similarity in mammals. Dit onderzoek hadden wij als tweede optie gevonden, het onderzoek gaat over gen expressie geassocieerd met langere levensspan en veroudering laten gelijkenis zien in zoogdieren. Dit onderzoek is niet gekozen door de onbeschikbaarheid van de DATA.

Gekozen onderzoek

- Ma et al. (2024) : Three-dimensional chromatin reorganization regulates B cell development during ageing. Dit is de keuze geworden door de aanwezigheid van veel data. Dit zijn in totaal 76 samples die genomen zijn van de jonge en oudere muizen. Deze samples zijn van meerdere catagorien maar voor ons belangrijk zijn de verschillende RNA samples. Het doel van dit onderzoek is ook erg interresant en wij hebben na het lezen gelijk al nieuwe dingen geleerd. Wat er uit sprong was de A/B compartenment in de nucleus. Dit is een recente ontdekking en zegt dat er een A compartement is waar de genen worden expressed maar in het B compartement worden de genen niet expressed. Deze twee compartementen zitten nouw bij elkaar en laat dus zien dat er wel structuur zit in waar een gen zit en waar het niet zit in de cel.

Week planning Doormiddel van het programma trello is er een week planning gemaakt. Hier worden ook de taken verdeeld dit is te zien aan de foto's bij de tickets. De foto laat een gebruiker zien, dit gecombineerd met de datum waar voor het af moet zijn geeft ons een duidelijke verdeling. De datum toevoeging geeft de gebruiker die de ticket heeft ook een herinering.

Hier een voorbeeld foto.

Hier zetten wij tickets in die aan bepaalde personen met verschillende urgenties

- MUST - Moet gedaan worden voor een bepaalde datum of het einde van het project.
- SHOULD - zou gedaan moeten worden want je wil het project liever niet opleveren zonder.

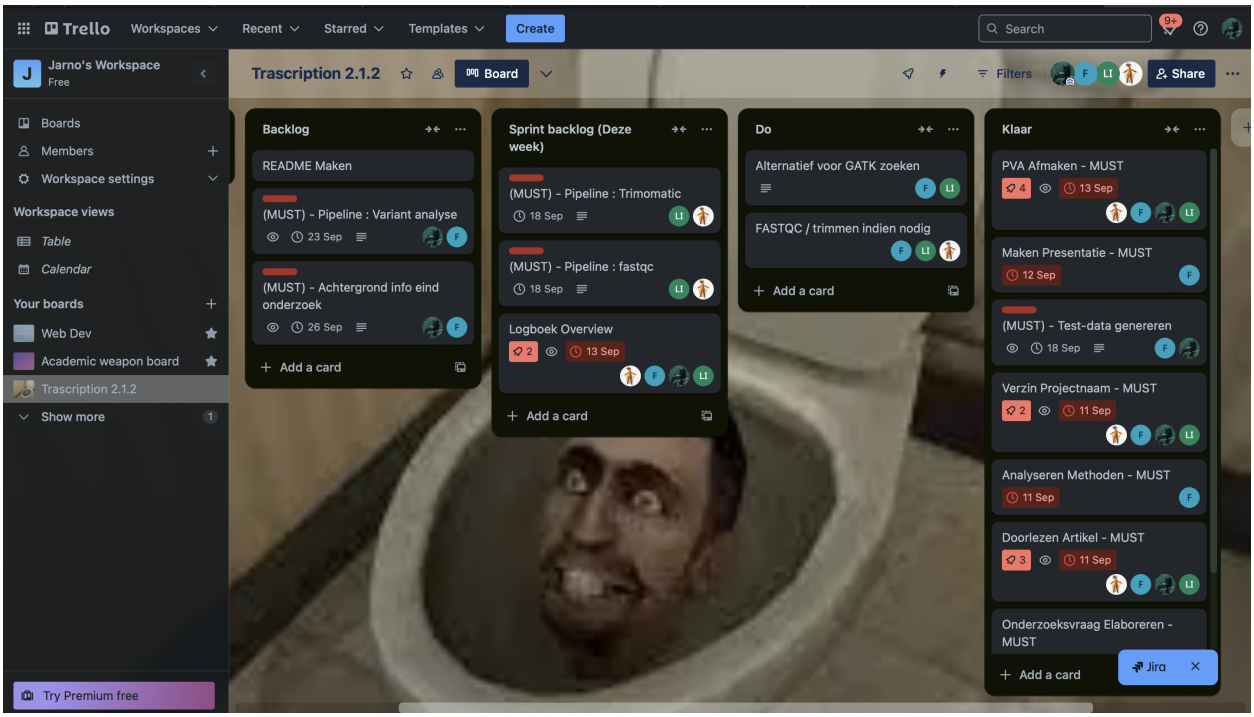


Figure 2: *Trello planning*

- COULD - kan gedaan worden maar is zeker niet essentieel voor het project.

De planning van de week voor mij was dat ik de Methoden moest bekijken en samenvatten voor zover mogelijk zodat de belangerijkste delen hiervan in het PVA en de Powerpoint werden gezet.

De methoden zijn belangrijk omdat hierin de benodigdheden staan voor replicatie van het onderzoek. In de gekozen paper waren verschillende methoden die voor ons niet belangrijk zijn. Dit zijn bijvoorbeeld waar de muizen zijn gekocht of de Hi-C methoden dit omdat onze onderzoeks vraag als volgt gaat “Heeft leeftijd invloed op de expressie van genen” de Hi-C kijkt naar de chromosoomconfiguratie dit is te extreem voor ons in de tijds periode die wij hebben gekregen.

https://trello.com

10-09-2024

Doel van de dag

Het afmaken van de samenvatting van de Methoden

Taken lijst

- Afmaken Methoden
- Herlezen document
- Checken Methoden

Het weten van de methoden is belangrijk omdat wij moeten weten wat wij kunnen repliceren en wat te ver gegerepen is voor ons onderzoek en dit zou onze onderzoeksvraag kunnen beinvloeden. Als we Hi-C als

voorbeeld nemen dit is een hoge doorvoer technique die chromatine conformatie vastlegt. Dit zouden wij niet in onze 5 weken kunnen doen op een goede manier. Dit is waarom wij kiezen voor de genoom analyze voor afwijkingen met het algemene referentie genoom.

In de les heb ik de methoden afgemaakt er waren uit eindelijk 24 methoden waar de materialen een beetje in gemixt stonden dit waren de volgende. Hier zijn er een paar die wel interessant zijn voor ons eigen onderzoek. Alle 24 methoden staan samen gevat in een extern document die te vinden is in de git.

- Mice - Waar de muizen vandaan kwamen, de leeftijd en welke type met welke aanpassingen dit waren in ons geval C57BL/6J muizen van 8-12 weken oud voor de jongen en 100-110 weken oud voor de oudere muizen
- Cell lines - De D345 cell line een "Wild-type D345" van yale zijn gecultureerd in RPMI1640 met 10% FBS en 1x penicillin streptomycin oplossing. Een variatie van de Rag2 cell, Ebf1 cell en de Pax5+ zijn gekweekt. verder ook 293T menselijke embronische nier cellen gekocht van ATCC gebruikt voor lentiviral expressie. Plat-E cell line gebruikt voor "retroviral" expressie. Alle cellen waren gekweekt in een 37 graden bevochtigde atmosfeer met 5% CO2
- Antibodies - antilichamen zijn in dit onderzoek gebruik voor "immunoprecipitation" ook wel immunoprecipitatie en het "stainen" van H3K27ac voor de "staining" worden IgG isotype control antilichamen gebruikt.
- Chip-seq en HiChIP- Chromatine immunoprecipitatie-sequencing of ChIP-seq genoemd, een nieuwe moleculaire laboratoriumtechniek die de DNA-bindingslocaties van een bepaald eiwit identificeerd. De DNA-fragmenten die aan het specifieke eiwit zijn verbonden, worden opgevangen met behulp van gesynthetiseerde immunoglobulinen, waarna de DNA-fragmenten worden gesequenced. De verzamelde DNA-sequenties worden daarna met behulp van softwaretools geanalyseerd om de kwaliteit van de ChIP-seq en mogelijke DNA-bindingslocaties te evalueren. HiChIP is een recent ontwikkelde methode voor het onderzoeken van de conformatie van chromatine, waarbij een in situ Hi-C-bibliotheek wordt voorbereid, gevolgd door een chromatine-immunoprecipitatiestap (ChIP). Dit proces is in het algemeen gericht op de histonmodificatie H3K27ac of cohesie.
- Pro-B cell purification - hier zuiveren ze de Pro-B cellen doormiddel van positieve selectie van CD19+ en B220 markers.
- In situ Hi-C - In situ HiC maakt gebruik van de relatieve frequentie van DNA-DNA-ligatiegebeurtenissen om de driedimensionale structuur van een genoom te heropbouwen. Op deze manier worden restrictie-enzymverteerde uiteinden van genomisch DNA in vaste kernen aangegeven met gebiotinyleerde dNTP's. DNA-DNA-ligatiegebeurtenissen die ontstaan door nabijheidsligatie worden daarna vast-gelegd, versterkt en in de volgende generatie gesequenced om hun lineaire genomische positie vast te stellen, en hun driedimensionale relatie.
- RNA-seq, De RNA-seq is niet heel belangrijk voor ons genomics deel echter is het wel belangrijk voor het transcriptomics deel. Dit wijst op hoe de RNA is gesequenced. Er zijn verschillende basis paren lengten gebruikt: 2x75, 1x100 , 2x100bp deze zijn allemaal gesequenced op een Illumina NovaSeq sequencer. De mapping is gedaan naar het mm10 genoom doormiddel van STAR. STAR is een aligner gemaakt om specifiek de vele uitdaging aan te pakken van RNA-seq data mapping. Het gebruikt een strategie om rekening te houden voor de "spliced" alignments.

Na alle methoden samengevat te hebben gingen wij als groepje kijken naar de materialen en methoden om te beslissen wat wij nodig hadden, wat outdated was en wat wij nog extra of anders wilden doen.

Onze onderzoeks vraag is : **Zijn er varianten aanwezig van PAX5 en Ebf1 in het genoom van de rag2 knockout muizen die gebruikt zijn?**

Dus wij gaan niet de RNA gebruiken voor deze vraag. De RNA-seq resultaten en alle bijbehorende stappen die met de RNA zijn gedaan vallen gelijk weg. Dit is omdat het transcriptomics is en niet genomics waar onze onderzoeks vraag op is afgestemd.

Wij gaan Hi-C niet gebruiken omdat dit ook niet past bij onze onderzoeks vraag en Hi-C is ook redelijk complex wat dus ook niet in ons tijd schema past.

Vragen of ronald dit er in moet ja of nee

13-09-2024

Doel van de dag

Het downloaden van de data doormiddel van SRA

Taken lijst

- Bash script schrijven voor de download
- De SRA unpacken en data controleren

Eerst werd ons gevraagd om naar de juiste map te gaan. Dit kan door de terminal te openen naar onze home te gaan en cd naar /students/2024-2025/Thema05/ en hier de map voor ons project aan te maken. Of het kan geworden met de GUI waar je ook begint met het openen van de home folder en dan in de zoekbalk het volgende typen "/students/2024-2025/Thema05/" Hier hebben wij de map aangemaakt genaamd "3dconformatieChomatine" een verkorte benaming van de paper. Hier in moest nog een map gemaakt worden die SRA moest worden genoemd. De data moesten wij van de ncbi geo website afhalen door een SraAccList te downloaden. Deze bevatte de naam-codes die wij dan in het systeem kunnen oproepen om ze vervolgens daar te downloaden en unpacken.

Hieronder is het script te zien die gebruikt is om de SraAccList aan te roepen deze te lezen en daarna wordt —output gebruikt om hem in de goede map te zetten "\" geeft een new line aan en de - -max-size 200g geeft aan dat de packed files niet meer mogen zijn dan 200 gigabytes

```
prefetch $(</students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/SRA/SraAccList.csv) --output-directory \
/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/SRA/ --max-size 200G
```

SRA Toolkit Release 3.1.1 is gebruikt. in deze toolkit zitten verschillende tools die gebruikt worden. De reden dat wij deze toolkit gebruiken is omdat deze van NCBI komt dit is ook het platform waarvandaan wij onze data halen dit zou dus het makkelijkste moeten werken.

16-09-2024

Doel van de dag

De SRA data uitpakken en de FastQ bekijken

Taken lijst

- Bash script schrijven voor het uitpakken
- Fastq quality checken

Om de SRA data naar fastq om te zetten gebruiken we fasterq-dump. fasterq-dump is een programma in de SRA toolkit, wij gebruiken Release 3.1.1, De reden voor het gebruik van fasterq-dump is op advies van onze leraar. Fasterq-dump zit ook in de SRA toolkit die dus al op het systeem staat ook is fasterq-dump goed gedocumenteerd en snel.

Fasterq-dump neemt de SRA files en extract de data hiervan naar fastq- of fasta files. in ons geval fasta files.

De code hieronder zoekt eerst in de SRA map naar files met een filenaam die eindigt op .sra

deze runt hij parallel wat betekent dat hij meerdere processen doet over verschillende cores. Hij zet de files in een nieuwe map de fastq map en door de {} behoud het de naam waarmee het werd gedownload.

```
find /students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/SRA/ -name "*.sra" | \
  parallel fasterq-dump -O /students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/fastq/ {}
```

FastaQC eerste check

FastQC wordt gebruikt om de kwaliteit te checken van de rauwe data, hier uit is te zien of de data gelijk te gebruiken is of dat deze moet worden getrimmed. De trimmer kan ook afgesteld worden op basis van de fastqc. https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Waarom wij FastQC gebruiken is omdat voor wij gaan werken met onze data willen wij zien of de data wel geschikt is om mee te werken. Als de kwaliteit heel slecht is dan kunnen er niet betrouwbare resultaten uit worden gehaald, en het is niet goed repliceerbaar.

Er zijn meerdere resultaten die uit een FastQC check komen hier is een uitleg wat er uit komt en hoe dit gelezen moet worden.

Catagorie	Uitslag	Hoe lees je dit
Basic statistics	Hier krijg je een tabel met verschillende dingen zoals de Filename, file type, sequence length, %GC, Total sequences, Encoding en de sequences flagged as poor quality	Het aflezen van deze tabel is lezen en checken of er geen fouten in zitten.
Per base sequence quality	Een grafiek zoals te zien is in figuur 1	De grafiek heeft 3 vlakken die van verschillende grote en kleuren. De kwaliteit ranged van 0-40, 28-40 is goed and gekleurd groen, 20-28 is gekleurd geel/oranje, 0-20 gekleurd rood. Verder representeert de gele box de 25th to 75th percentile. De zwarte lijnen geven de 10th en 90th percentile weer. De blauwe lijn geeft de gemiddelde scores voor kwaliteits controle score voor de nucleotide. gebaseerd op deze dingen is te zien dat de base van 1 tot 100 goede kwaliteit hierna gaat de kwaliteit sterk naar beneden. wat al aan geeft dat er getrimmed moet worden.
Per tile sequence quality	Hier is een plot te zien waar de reads worden weergegeven als een soort heatmap. waarbij elke tegel 1 een read weergeeft op een bepaalde positie deze kwaliteit van de reads worden vergeleken met elkaar.	Het aflezen van deze grafiek is door te kijken naar de kleur per tegel per positie. een donkerblauwe tegel betekent goede kwaliteit en hoe lichter de tegel word hoe slechter de kwaliteit dus lichtblauw betekent een slechte kwaliteit. Op de Y-as staat dan in welke tile het is en de X-as welke positie.
Per sequence quality score	Een grafiek die je de gemiddelde kwaliteit op de x-as en de nummer van sequences met gemiddelde op de y-as.	Het beste is wanneer de meeste reads een hoge gemiddelde kwaliteits score hebben en er geen grote dip in de grafiek is, dit betekent een lage kwaliteit.

Catagorie	Uitslag	Hoe lees je dit
Per base sequence content	Hier is een plot te zien met een y-as waar 0-100 aangegeven wordt en een x-as met de “positie in read (bp)” in de grafiek staan 4 lijnen met het percentage per base	In figuur 2 is het volgende uit de grafiek te halen er is significante variatie in de nucleotide distributie aan het bein van de reads positie 1-10. Dit zou kunnen zijn door de voorbereiding of de vooroordelen in het sequencen. A, T, C en G zijn niet gelijk gerepresenteerd. na de 10de positioe zijn de base wat gestabilizeerd wat aan geeft dat de sequence kwaliteit in de rest van de reads hoger zijn. Het afgekeurde kruis komt dus door de choas van 1-10.
Per sequence GC content	Per sequence GC content geeft weer een plot weer met 2 lijnen. Een blauwe lijn die de theoretische distrubutie aangeeft wat dus een richtlijn is, en de GC count per read wat dus de gelezen data is.	Het aflezen wordt door de twee lijnen vergelijken. het is ideaal als de twee lijnen overlappen of dichtbij elkaar liggen. Wanneer er meerdere pieken zijn die afwijken van de blauwe theoretische lijn kan dat betekenen dat er misschien sprake is van besmetting of sequencing errors. Er komt dus een rood kruis wanneer de GC abnormaal is vergeleken met de theoretische verwachting wat dus zegt da de algemene kwaliteit niet goed is.
Per base N content	De per base N content grafiek geeft de frequentie weer van “N” basecalls op elke positie in de reads. De “N” staat voor een onzekere of onbekende nucleotide, deze kon de sequencer niet identificeren als 1 van de base (A, T, C, G)	X-as geeft de positie weer in de reads, Y-as geeft het percentage van reads met een “N” base op elke positie. Een hoge waarde betekent dat de sequencer op die positie vaak onzeker was over welke nucleotide er aanwezig was. De verwachting is dat er een zeer laag percentage N’s in de sequence zit, de standaard hiervoor is <1%. afwijkende resultaten kan wijzen op problemen zoals slechte kwaliteit van de sequentie. Ze komen vaak voor aan het begin of eind van de reads.
Sequence length distribution	De sequence length distribution grafiek laat de verdeling van de lengtes van de reads zien. X-as geeft de lengte van de sequenties (in basenparen) en de Y-as toont aantal reads van die specifieke lengte.	Deze grafiek is belangrijk bij NGS omdat afwijkingen in de sequentie lengte kunnen wijzen op fragmentatie of technische fouten tijdens sequencering . Een ideaal resultaat is een scherpe piek op 1 specifieke lengte wanneer je 150 bp doelreadlengte hebt zou de meeste sequencing output op precies 150 bp moeten vallen wat een piek bij die lengte zou moeten opleveren. Als er meerdere pieken zijn of een vrede spreiding van lengtes kan dit beteken dat er sequencing fouten, slechte adaptertrimming of degradatie van het DNA-monster.

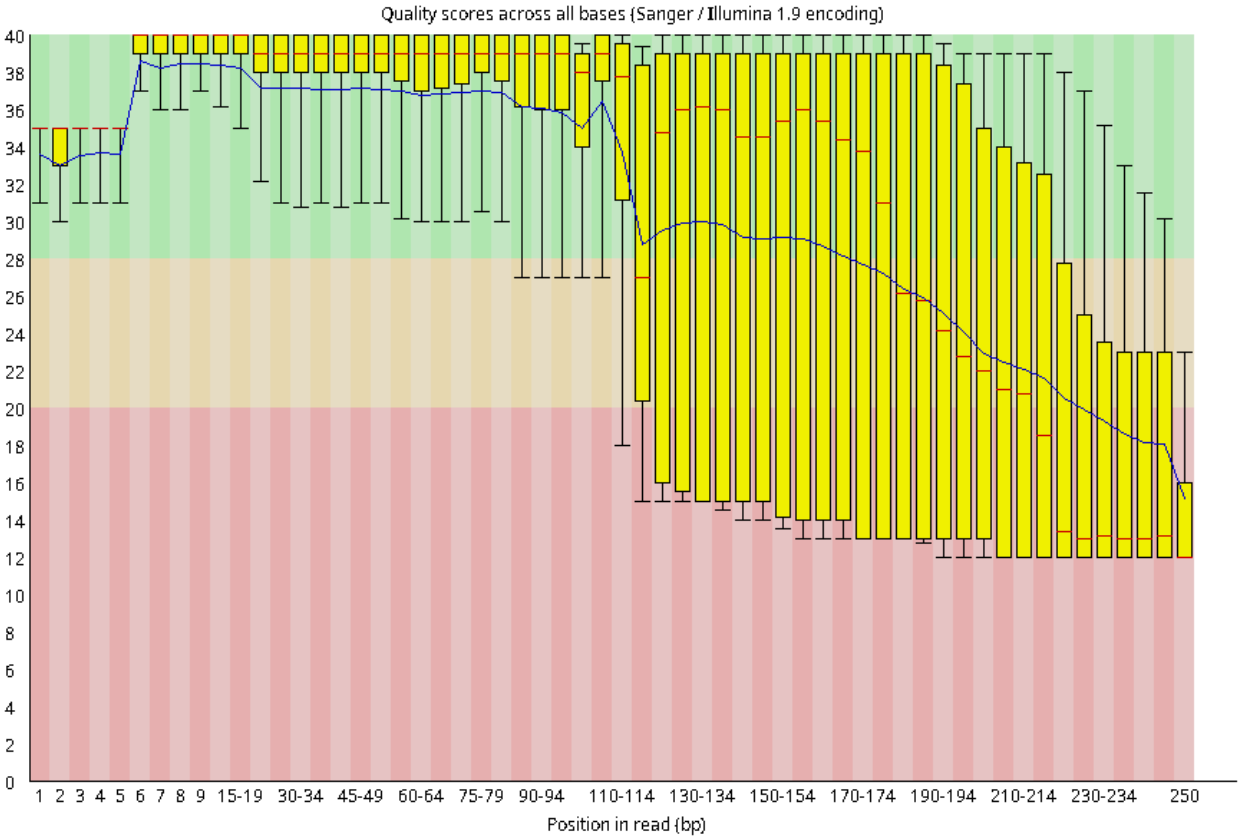
Catagorie	Uitslag	Hoe lees je dit
Sequence duplication levels	De Sequence duplication levels grafiek laat het percentage van sequences zien die meer dan 1x voorkomen. Duplicaties kunnen voorkomen door technische “artifacts” tijdens de sequencing en andere factoreren zoals PCR-amplificatie, en kunnen de diversititeit van de dataset verminderen. Dit heeft invloed op downstream analyses zoals genexpressie of variantdetectie. X-as laat het aantal keren zien dat de specifieke sequentie wordt gedupliceerd Y-as laat het percentage van reads dat voorkomt met duplicatie niveau zien	Het aflezen van de grafiek is door te kijken naar de twee lijnen in de grafiek de Duplicated sequences (meestal een rode lijn) geeft het percentage met unieke sequenties weer zonder correctie voor natuurlijke duplicaties. Het geeft een beeld van hoeveel van de reads in de dataset meerdere keren voorkomen zonder te differentiëren tussen technische en biologische duplicates. in de grafiek wil je graag een scherpe daling zien waarbij de meeste reads een duplicatie niveau van 1 hebben en het percentage gedupliceerede sequenties daarna snel afneemt. De total sequences lijn (meestal een blauwe lijn) corrigeert voor verwachte natuurlijke duplicates deze laat zien hoe de duplicatie eruit zou zien zonder technische artefacten en biedt een eerlijker beeld van hoeveel sequenties overgedupliceerd zijn de de sequencering zelf. Als er een groot verschil is tussen de lijnen betekent dit dat er duplicatie is onstaan door technische factoren zoals PCR duplicatie in plaats van biologische oorzaak. Te hoge aantal dupolactie kan probleem zijn voor downstream analyses en je wil dus dat de lijnen dichtbij elkaar liggen.
Overrepresented sequences	Dit is een tabel die sequenties van op zijn minst 20bp die vaker voorkomen dan 0.1% van de totale nummer van sequenties. In de tabel staat de sequenties uitgeschreven, de count, het percentage en de waarschijnlijke bron	Wanneer er een abnormaliteit te zien was in de Per sequence GC content grafiek kan er in deze tabel worden gekeken om de bron te vinden. als het niet staat als een bekende adapter of “vector”, kan het helpen om de data te blasten o te identiteit te vinden in de tabel.
Adapter content	Een grafiek waar verschillende adapters staan	Het geeft aan of de sequenties adapterfragmenten bevatten en van verschillende apparaten. als deze aanwezig zijn is het te zien door af te lezen in de grafiek welke positie er zijn om ze vervolgens weg te trimmen. deze “adaptercontent” is er voor identificatie van de DNA

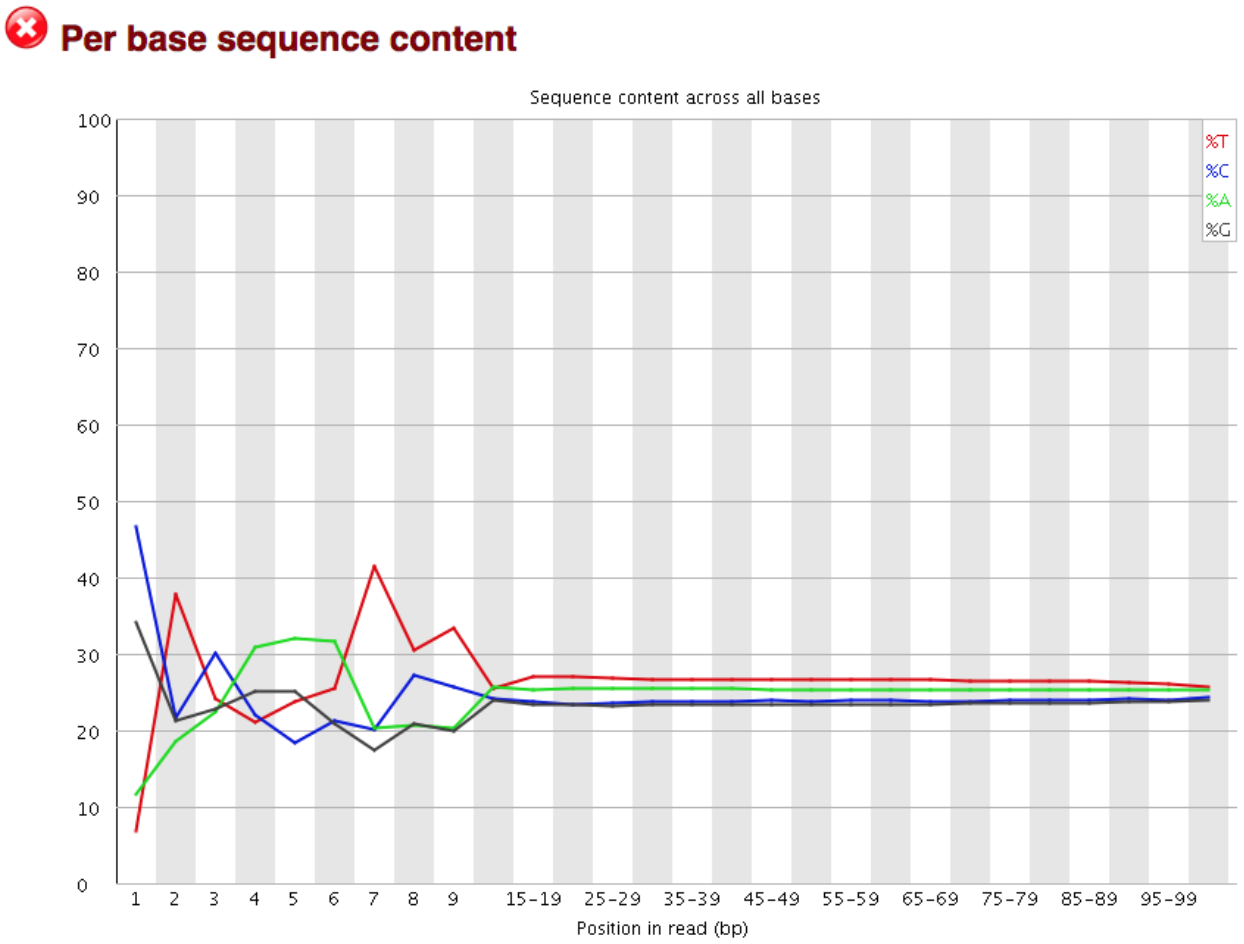
Referenties voor fastqc uitleg

FastQC. (z.d.). *FastQC*. https://mugenomicscore.missouri.edu/PDF/FastQC_Manual.pdf

Khetani, M. P. R. (2018, 5 september). Quality control: Assessing FASTQC results. *Introduction to RNA-Seq using high-performance computing - ARCHIVED*. https://hbctraining.github.io/Intro-to-rnaseq-hpc-salmon/lessons/qc_fastqc_assessment.html

Uit onze fastQC resultaten kwamen wat bijzondere resultaten. Er waren reads van verschillende lengten de grootste was 300 base paren wat boven de algemene norm is.


Quality scores across all bases (Sanger / Illumina 1.9 encoding)
40
38
36
34
32
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 15-19 30-34 45-49 60-64 75-79 90-94 110-114 130-134 150-154 170-174 190-194 210-214 230-234 250
Position in read (bp)



De conclusie uit de analyze van de FastQC resultaten is, Dat de generale statestieken 7 van de bestanden enorm veel duplicates wat een redelijk probleem vormt. Wat ook opvalt is dat alle bestanden met hoge duplicates een gem read lengte van 250 bp wat opmerkelijk lang is + de resultaten met enigzins goede kwaliteit hebben een gem lengte van 150 bp. Verder alle bestanden met veel duplicates bevatten veel minder reads dan de bestanden zonder of met weinig duplicates. Alle bestanden met 250 bp lengte eindigen aan het eind in het rode vlak in de sequentie kwaliteit en er is een dip bij de 110-120 waarna alles dus afzakt, voor de sequenties met 250bp is de kwaliteit goed van 0-110 bp. De sequence duplication levels zijn ook opmerkelijk door veel pieken en een hoog begin van de lijn. Overrepresented sequences vallen ook op want weer de 250bp bestanden hebben erg veel duplicates waar van sommige in de 50% zitten. Er zit ook heel veel adapter content bij 2 files is het zelfs >50%. Kortom deze files moeten getrimmed of verwijderd worden.

Om een gehele analyze te zien van de FastQC resultaten moet er gekeken worden naar de logboeken van Storm en Ivar

17-09-2024

Doel van de dag

Test data maken

Taken lijst

- Test data maken

Seqkit - Is een veelzijdige tool voor het verwerken en analyseren van sequentiebestanden de inputs welke hij accepteert zijn FASTA en FASTQ. Het kan grote datasets efficient doorlopen en biedt meerdere functies zoals filtering, slitsen van sequenties, statistieken genereren, test data sets maken etc. De gebruikte versie op de bio inf assemblix server (waar de Rstudio commands op gerund worden) is op dit moment seqkit V2.3.0

Testdata - Test data is een essentieel deel van een onderzoek dit is om verschillende redenen, test data kan helpen om tools te valideren. Als de test data dezelfde resultaten geeft als de twee of meer echte data sets dan kan dit aangeven dat de tool niet goed werkt.

Dit is dus ook de reden dat wij test data hebben gemaakt om te kijken of de resultaten verschillen met de test data of dat deze hetzelfde zijn met onze echte data.

De volgende code is gebruikt hiervoor

Deze code is geschreven door Floris, ik heb op de bin pc echter ook om het zelf te oefenen ook een test-data set gemaakt. alle code is hieronder te zien.

```
cd /run/media/floris/FLORIS_3/DATA_SETS/3D_Chromatine_Conformatie/DNA/SRA

seqkit head -n 10000 SRR26980527_1.fastq > subset_SRR26980527_1.fastq
seqkit head -n 10000 SRR26980527_2.fastq > subset_SRR26980527_2.fastq

#Code voor op de bin PC
cd /students/2024-2025/Thema05/3D_Chromatine_Conformatie/DNA/SRA

# Eerst hebben we geprobeerd om "sample" te gebruiken in plaats van head
seqkit sample -p SRR26980527_1.fastq > subset_SRR26980527_1.fastq

# Dit werkte echter niet heel goed dus hebben we uiteindelijk head gevonden en gebruikt

seqkit head -n 10000 SRR26980527_1.fastq > subset_SRR26980527_1.fastq
```

18-09-2024

Doel van de dag

Reads alignenen aan refentie genoom

Taken lijst

- Reads alignenen

Bwa mem 2 test voor 1 file BWA-MEM2 wordt gebruikt om zowel DNA- als RNA-reads te aligneren met een referentiegenoom. Het kan korte en middellange DNA- of RNA-reads alignen. Er zijn verschillende manieren waar dit voor gebruikt kan worden zoals, Whole genome sequencing, Exoomsequencing en RNA-seq. Voor ons is Whole genome sequencing interresant dit is omdat hierbij de genomen worden gescand en dan vergeleken met het gekozen referentie genoom (in ons geval GRCm39 uitgegeven op 22 - 07 -2020) dit om genetische variaties te identificeren.

Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv: Genomics*. - https://github.com/lh3/bwa

```
./bwa_mem2/bwa-mem2-2.2.1_x64-linux/bwa-mem2 mem -p 60 testnaam fastq/SRR26980549_1.fastq fastq/SRR2698
```

```
cd /students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine
cat /students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/SRA/SraAccList.csv | \
parallel /students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/bwa_mem2/bwa-mem2-2.2.1_x64-linux/bwa-mem2
/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/fastq/{}_1.fastq \
/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/fastq/{}_2.fastq > /students/2024-2025/Thema05/3dco
```

Ge automatiseert voor alle files in de map

Sam tools sort geindexeerd en gesorteerd + bam mee maken

```
samtools sort aligned_SRR26980549.sam > aligned_sorted_SRR26980549.bam & samtools index aligned_sorted_S
```

22-09-2024

A/B compartimenten

Harris, H.L., Gu, H., Olshansky, M. *et al.* Chromatin alternates between A and B compartments at kilobase scale for subgenic organization. *Nat Commun* **14**, 3303 (2023). https://doi.org/10.1038/s41467-023-38429-1

Asami Oji, Linda Choubani, Hisashi Miura, Ichiro Hiratani, Structure and dynamics of nuclear A/B compartments and subcompartments, Current Opinion in Cell Biology, Volume 90, 2024, 102406, ISSN 0955-0674, https://doi.org/10.1016/j.ceb.2024.102406. (https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067424000851)

De nucleus van het humane genoom is verdeeld in verschillende ruimtelijke compartimenten. Actief chromatine bevindt zich doorgaans in het A-compartiment, terwijl inactief chromatine eerder geassocieerd is met het B-compartiment. Deze compartimentalisatie is geïdentificeerd met behulp van de Hi-C-methode, een techniek die de chromosomale organisatie in kaart brengt door op nabijheid gebaseerde interacties te combineren met hogedoorvoer sequencing. Het belang van de A- en B-compartimenten in ons onderzoek ligt in het feit dat *Ebf1* (Early B-Cell Factor 1), een cruciale factor voor pro-B-cellen, van positie verandert tussen deze compartimenten naarmate het organisme (de muis) ouder wordt.

Het A compartiment is dus het compartiment waar de expressie actief is en hoge gen transcriptie plaats vindt. Voor zo ver wij weten ligt het A compartiment dicht bij het centrum echter is dit nog wel speculatie. Gen rijk, hoge GC-content, hebben histone markeringen voor actieve transcriptie.

Het B compartiment is de plek waar de expressie non actief is ook wel “silenced”, in het B compartimenten zitten niet veel genen, compact, hebben histone markeringen voor silencing en bestaan het meeste uit LADs en bevatten late replication origins.

TADs - Er wordt gesugereerd dat deze een grote invloed hebben op gen regulatie en dat ze belangrijk zijn voor embryonaal ontwikkeling. Ook werd gezien dat lange afstand regulatie van gen expressie niet allen leunt op TADs en hun grenzen.

Sub compartimenten - Er wordt gesuggereerd dat er binnen de twee compartimenten nog kleinere subcompartimenten zitten. Elk compartiment werd geobserveerd met verschillend histone modificatie patronen en RT. wat suggereert dat elke chromatine met gelijke karakteristieken in elkaar wordt gezet om verschillende interactie eenheden binnen de A en B compartimenten. Er is op het moment nog niet gevonden of er een link tussen de subcompartimenten ligt en het feitelijke nucleare oriëntatiepunten.

Pro B-cell

Pro-B cellen ontstaan in het beenmerg van progenitor cellen naar de B-cell lineage. elke pro-B cell ondergaat onafhankelijke herordening en op bouwing van diverse variabelen, diversiteit en "joining" gen segmenten van de immunoglobuline zware (H)- keten locus.

Kritisch voor de generatie van het verschillend repertoire van b cellen capabel in het herkennen van een wijde varia aan pathogene. De pro-B cell veranderd naar de pre-B cell dit gebeurd wanneer de zware immunoglobuline keten her georganiseerd is.

Nemazee, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* **17**, 281–294 (2017). https://doi.org/10.1038/nri.2017.19

23-09-2024

Het uitzoeken en script schrijven van freebayes

Trimmomatic

```
cat data/GSE149995_Sra_RunInfo.csv | \
  parallel 'TrimmomaticPE -threads 16 ' \
                  '/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/fastq/{}.fastq.gz ' \
                  '/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/fastq-trimmed/{}.trimmed.fastq.gz
                  'ILLUMINACLIP:/homes/marcelk/Development/2.1.2-Transcriptomics/TruSeq3-SE.fa:2:30:10
                  'MINLEN:40 ' \
                  'SLIDINGWINDOW:4:20'
```

Fastqc run 2

24-09-2024

Tweede Run trimmomatic

Voor verdere uitleg ga naar het logboek van Ivar & Storm

```
cat /students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/SRA/SraAccList.csv | \
  parallel 'TrimmomaticPE -threads 80 ' \
                  '/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/fastq/{}_1.fastq ' \
                  '/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/fastq/{}_2.fastq ' \
                  '/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/Trimmomatic_output/paired/{}_for
                  '/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/Trimmomatic_output/unpaired/{}_f
                  '/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/Trimmomatic_output/paired/{}_rev
                  '/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/Trimmomatic_output/unpaired/{}_r
                  'ILLUMINACLIP:/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/Trimmomatic/Trimmoma
                  'MINLEN:40 ' \
                  'SLIDINGWINDOW:4:20'
                  'HEADCROP: 10'
```

Freebayes

```
/students/2024-2025/Thema05/3dconformatieChromatine/freebayes/freebayes-1.3.6-linux-amd64-static -f GCA
```


Ma, Fan, Yifei Cao, Hui Du, et al. 2024. "Three-dimensional chromatin reorganization regulates B cell development during ageing." *Nature Cell Biology* 26: 991–1002. https://doi.org/10.1038/s41556-024-01424-9.

Takasugi, Mitsuo, Yuki Yoshida, Yoshinori Nonaka, and Nobuyuki Ohtani. 2023. "Gene expressions associated with longer lifespan and aging exhibit similarity in mammals." *Nucleic Acids Research* 51 (14): 7205–19. https://doi.org/10.1093/nar/gkad544.

Zhang, Xiaoming, Shiheng Lv, Zhen Luo, Yijie Hu, Xun Peng, Jianbo Lv, Shanshan Zhao, et al. 2021. "MiniCAFE, a CRISPR/Cas9-based compact and potent transcriptional activator, elicits gene expression in vivo." *Nucleic Acids Research* 49 (7): 4171–85. https://doi.org/10.1093/nar/gkab174.