

Поиск молекулярных конвергентных замен у высокогорных грызунов

- автор: Халенёва Дарья
- под руководством: Бондарева Ольга, Петрова Татьяна, Бодров Семён

Институт биоинформатики & Зоологический институт РАН

О проекте

Когда организмы попадают в новые для себя условия окружающей среды, то, со временем, начинают адаптироваться к ним, и эти адаптации спустя многие поколения можно проследить на молекулярном уровне как изменения на генетическом уровне отдельных генов или целых систем. Чтобы определить, какие именно изменения на уровне генома относятся к адаптивным, а какие - к случайным, удобно использовать модель, состоящую из нескольких близкородственных таксонов, которые приобретают адаптации к контрастным условиям окружающей среды независимо.

Такую хорошую модельную систему предоставляют грызуны подсемейства полевоочных, благодаря тому, что эти животные за короткий срок и неоднократно заселяли самые разнообразные экологические ниши от тундры до высокогорьев. Представители двух триб подсемейства заселяют как гористые ландшафты, так и лесные зоны, адаптации происходили независимо. Проект позволит взглянуть на то, как можно отследить, какие изменения происходили на генетическом уровне у грызунов при переходе к жизни в условиях высокогорьев и в перспективе оценить, какие замены возникают у обитателей гор в ходе конвергентной эволюции, а какие независимо.

Цель и задачи проекта

Цель проекта:

Выявить молекулярные адаптации грызунов к жизни в высокогорных условиях, используя транскриптомные данные

Пайплайн работы

1. Сборка транскриптомов, контроль качества

1.1 FastQC

```
fastqc -o /home/asha/magistrat/fastQC2 /home/asha/magistrat/trimmed2/*PE*.fastq
```

1.2 Trimmomatic

тут лежат адаптеры:

```
/home/asha/miniconda3/envs/general_env/share/trimmomatic/adapters
```

Чистка адаптеров производится из этой папки!

запуск для консоли:

```
trimmomatic PE -phred33 -threads 3 /home/taxon/RNA/raw/A2_S117_R1_001.fastq.gz  
/home/taxon/RNA/raw/A2_S117_R2_001.fastq.gz /home/taxon/testasha/trimmed/A2_S117_R1_PE.fastq.gz  
/home/taxon/testasha/trimmed/A2_S117_R1_SE.fastq.gz /home/taxon/testasha/trimmed/A2_S117_R2_PE.fastq.gz  
/home/taxon/testasha/trimmed/A2_S117_R2_SE.fastq.gz ILLUMINACLIP:TruSeq2-PE.fa:2:30:10 SLIDINGWINDOW:4:15  
MINLEN:60 HEADCROP:12  
fastqc -o /home/taxon/testasha/trimmed/FQC /home/taxon/testasha/trimmed/A2_S117_R1_PE.fastq.gz  
scp -P 8122 -i newkey asha@84.204.46.23:/home/taxon/testasha/trimmed/FQC/*.html  
/home/asha/ZIN/magistrat/RNA/trimmedFQ_adapters
```

TruSeq2-PE убрал адаптеры наполовину

TruSeq3-PE:

```
trimmomatic PE -phred33 /home/asha/magistrat/trimmed/A10_S120_R1.trimmed_PE.fastq  
/home/asha/magistrat/trimmed/A10_S120_R2.trimmed_PE.fastq /home/asha/magistrat/trimmed2/A10_R1_PE.fastq  
/home/asha/magistrat/trimmed2/A2_R1_SE.fastq /home/asha/magistrat/trimmed2/A10_R2_PE.fastq  
/home/asha/magistrat/trimmed2/A10_R2_SE.fastq  
ILLUMINACLIP:/home/asha/miniconda3/envs/general_env/share/trimmomatic/adapters/TruSeq2-PE.fa:2:30:10 MINLEN:36
```

Запуск многих файлов:

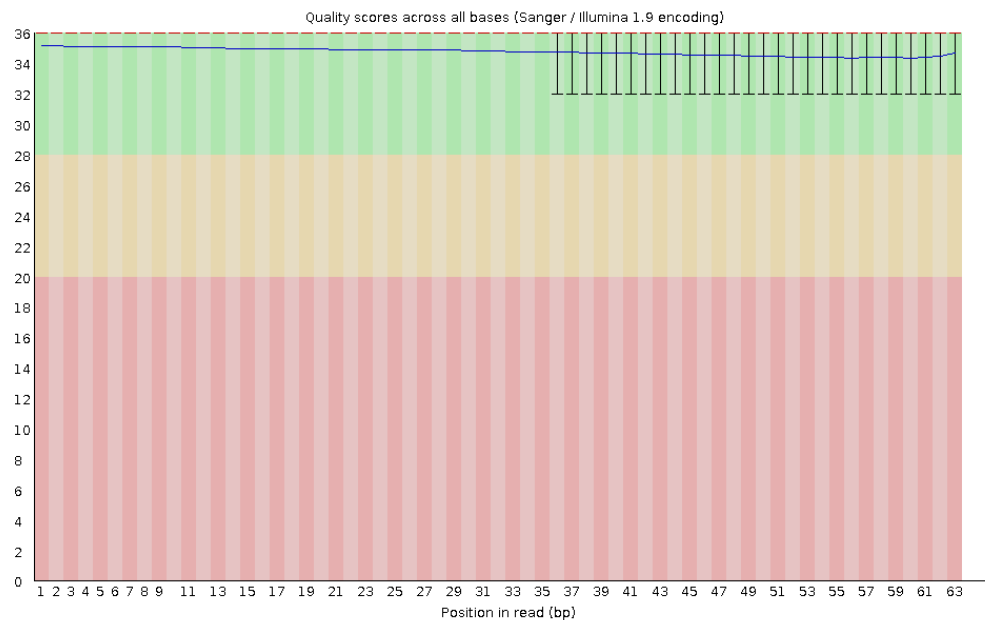
```
for file in /home/taxon/RNA/raw/*.gz
do
withpath="${file}"
filename=${withpath##*/}
base="${filename%*_*}.gz"
echo "${base}"
trimmomatic PE /home/taxon/RNA/raw/"${base}"_001.fastq.gz /home/taxon/RNA/raw/"${base}"_001.fastq.gz
/home/asha/magistrat/trimmed/"${base}".trimmed_PE.fastq
/home/asha/magistrat/trimmed/"${base}".trimmed_SE.fastq
/home/asha/magistrat/trimmed/"${base}".trimmed_PE.fastq
/home/asha/magistrat/trimmed/"${base}".trimmed_SE.fastq HEADCROP:12
ILLUMINACLIP:/home/asha/miniconda3/envs/general_env/share/trimmomatic/adapters/TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10
LEADING:2 TRAILING:2 MINLEN:36
done
```

Удаление адаптеров:

```
for adapters in `ls *.fa`; do base=$(basename $adapters ".fa");
trimmomatic PE -phred33 -threads 3 /home/asha/magistrat/trimmed/A10_S120_R1.trimmed_PE.fastq
/home/asha/magistrat/trimmed/A10_S120_R2.trimmed_PE.fastq /home/asha/magistrat/trimmed2/"${base}"_1_PE.fastq
/home/asha/magistrat/trimmed2/"${base}"_1_SE.fastq /home/asha/magistrat/trimmed2/"${base}"_2_PE.fastq
/home/asha/magistrat/trimmed2/"${base}"_2_SE.fastq ILLUMINACLIP:"${base}":2:30:10 SLIDINGWINDOW:4:10; done
```

Итоговое качество - хорошее для всех прочтений!

✓ Per base sequence quality



1.3 Trinity

Установка

1. Качаем сам тринити в папку откуда будем запускать

```
wget https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/releases/download/v2.11.0/trinityrnaseq-
v2.11.0.FULL.tar.gz
tar -xf trinityrnaseq-v2.11.0.FULL.tar.gz # разархивируем
#ВАЖНО!!! python version = 3.9.0 не работает, сработало на 3.7
#Поэтому: (скорее всего можно 3.8 тоже)
conda install python=3.7.0
```

2. для тринити нужны (у меня было пустое окружение):

```
conda install -c bioconda bowtie2
conda install -c bioconda jellyfish
conda install -c bioconda samtools=1.9
conda install -c bioconda salmon=1.4.0
conda install -c anaconda numpy
```

3. Перед запуском заходим в корневую папку где установлена тринити и там запускаем команду:

```
make -i clean && make
```

Запуск

После установочных шагов, приведенных выше, Trinity запустилась командой:

```
# ЗАПУСК ДЛЯ (НЕСКОЛЬКИХ) L.LAGURUS
/home/asha/programs/trinityrnaseq-v2.11.0/Trinity --seqType fq --left
/home/asha/magistrat/trimmed/5465_S3_R1.trimmed_PE.fastq,/home/asha/magistrat/trimmed/5466_S4_R1.trimmed_PE.fa
stq --right
/home/asha/magistrat/trimmed/5465_S3_R2.trimmed_PE.fastq,/home/asha/magistrat/trimmed/5466_S4_R2.trimmed_PE.fa
stq --max_memory 60G --output /home/asha/magistrat/assembled/Trinity_lagurus
```

После этого проводим оценку качества сборки:

```
/home/asha/programs/trinityrnaseq-v2.11.0/util/TrinityStats.pl Trinity.fasta >
Clethrionomys.sp.trinity.stats.txt
```

Копируем фасты в /home/taxon/RNA/assembled/:

```
cp /home/asha/magistrat/assembled/Trinity*/*.fasta /home/taxon/RNA/assembled/
cp /home/asha/magistrat/assembled/Trinity*/*.pep.fasta /home/taxon/RNA/assembled/peptide_trinity/
```

Транскриптомы, собранные мной

- Clethrionomys.sp.trinity.fasta
- glareolus.trinity.fasta
- lemminus1.trinity.fasta
- oeconomus.trinity.fasta
- rutilus1.trinity.fasta
- tuvinicus.trinity.fasta
- agrestis.trinity.fasta
- lagurus.trinity.fasta
- macrotis.trinity.fasta
- rufocanus.trinity.fasta
- rutilus2.trinity.fasta

Оценка качества:

2. Аннотация собранных транскриптомов

2.1 diamond

```
conda install -c bioconda diamond
>diamond version 2.0.8
```

База:

```
/home/DBS/nr.gz
```

Запуск

Для нуклеотидов:

```
diamond blastx --db /home/DBS/nr.gz --query
/home/taxon/RNA/assembled/nucleotide_trinity/lemminus2.trinity.fasta --out
/home/taxon/RNA/annotated/by_nucl/lemminus2.diamond.tsv --max-target-seqs 1 --threads 10 -b8 -c 1 -e 0.00001
```

Для белков:

```
diamond blastp --db /home/DBS/nr.gz --query
/home/taxon/RNA/assembled/peptide_trinity/torquatus.trinity.pep.fasta --out
/home/taxon/RNA/annotated/by_protein/torquatus.diamond.tsv --max-target-seqs 1 --threads 10 -b8 -c 1 -e
0.00001
```

Запуск через скрипт (сам скрипт см. ниже):

```
python3 /home/asha/scripts/diamond.query.py
```

Скрипт для запуска файлов в цикле:

```
import os
from glob import glob

paths = glob('/home/taxon/RNA/assembled/peptide_trinity/*.fasta')
names = [p.split('/')[1].split('.')[0] for p in paths]

for p, n in zip(paths, names):
```

```

print('*50)
print(f'Now working on {n} guy...')
print('*50)
os.system(f'diamond blastp --db /home/DBS/nr.gz --query {p} --out
/home/taxon/RNA/annotated/by_protein/{n}.diamond.tsv --threads 10 -b8 -c1 --max-target-seqs 1')
print('*50)
print(f'Finished with {n}!')
print('*50)

```

(отсюда скачиваем таксонмап если нужна):

```

wget ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/taxonomy/accession2taxid/prot.accession2taxid.gz
/home/asha/taxonmap/prot.accession2taxid.gz

```

Параметры:

- `--db` позволяет выбрать базу данных для референса
- `-b` выделяет объем памяти на каждую обчитываемую в одно время ячейку (`-b2` соответствует примерно 12 Гб памяти)
- `--max-target-seqs` если указано, алгоритм выведет только указанное количество матчей (25 по умолчанию)
- `--out` адрес и имя создаваемого файла
- `--query` последовательности для сравнения с базой

Diamond выдаст последовательности, для которых нашелся match в базе. Далее те id, для которых нашелся match, необходимо сравнить с имеющимися и "пересечь", то есть отобрать из исходного файла только те последовательности, которые соответствуют генам.

Отфильтровать по значению e-value готовые файлы можно так:

```

awk '$11<=0.00000000001 {print}' amphibiuss.diamond.tsv

```

На выходе с diamond имеем следующее число хитов по белкам: (wc -l)

- ☒ 36998 agrestis.diamond.tsv
- ☒ 51351 amphibiuss_200.diamond.tsv
- ☒ 57935 brandtii_200.diamond.tsv
- ☒ 38950 Clethrionomys.diamond.tsv
- ☒ 36276 fortis.diamond.tsv
- ☒ 64749 glareolus2.diamond.tsv
- ☒ 41336 glareolus.diamond.tsv
- ☒ 33020 gregalis.diamond.tsv
- ☒ 38337 griseus.diamond.tsv
- ☒ 35685 lagurus.diamond.tsv
- ☒ 48603 lemminus2.diamond.tsv (Танин)
- ☒ 28320 lemminus.diamond.tsv
- ☒ 68547 lutescens_200.diamond.tsv
- ☒ 49772 macrotis.diamond.tsv
- ☒ 58167 mandarinus.diamond.tsv
- ☒ 37770 nivalis.diamond.tsv
- ☒ 37766 ochrogaster.diamond.tsv
- ☒ 74671 oeconomus.diamond.tsv
- ☒ 46559 pennsylvanicus.diamond.tsv
- ☒ 46181 raddei.diamond.tsv
- ☒ 45762 rufocanus.diamond.tsv
- ☒ 58466 rutilus1_300.diamond.tsv
- ☒ 62660 rutilus2.diamond.tsv
- ☒ 46527 schaposchnikowi.diamond.tsv
- ☒ 41376 schisticolor.diamond.tsv
- ☒ 42172 sibiricus.diamond.tsv
- ☒ 64878 subterraneus.diamond.tsv
- ☒ 25659 torquatus.diamond.tsv
- ☒ 20606 tuvinicus.diamond.tsv
- ☒ 33565 zibethicus.diamond.tsv

2.2 Трансдекодер

```

conda install -c bioconda transdecoder
TransDecoder.LongOrfs
TransDecoder.Predict

```

Ищет открытые рамки считывания. Его нужно прогнать на собранных тринити транскриптомах чтобы получить последовательности пептидов. Они нужны, так как с ними в дальнейшем будет работать proteinortho.

Запуск

Переходим в папку с файлом assembly.trinity.fasta, куда тринити положила его после сборки

запускаем поиск самых длинных рамок считывания:

```
TransDecoder.LongOrfs -t assembly.trinity.fasta
```

он создаст много папочек где будут лежать координаты рамок и сиквенсы как нуклеотидные так и пептидные. Теперь над нашим же исходным фаста файлом можно запускать предикт, он найдет предполагаемые гены:

```
TransDecoder.Predict -t assembly.trinity.fasta
```

Файл с пептидными последовательностями будет transdecoder.pep

Сопоставление сборки и отблащенных id

Далее нужно "пересечь" полученные заголовки (id) последовательностей (которые нашел diamond) с самими последовательностями из исходной сборки, чтобы получить итоговый фаста файл, где содержатся только гены.

ИНТЕРСЕКТ:

```
grep -F -A 1 -f 'ids' 'lin.fastas.fa' > intersected.fa  
sed '/^-/d' intersected.fa > final.fa
```

ВНИМАНИЕ! ФАЙЛЫ ОЧЕНЬ БОЛЬШИЕ, ПОЭТОМУ ВЫТЯГИВАЕМ ЧЕРЕЗ samtools:

```
# (аминокислотные)  
awk '{print $1}' /home/taxon/RNA/annotated/by_protein/mandarinus.diamond.tsv | xargs samtools faidx  
/home/taxon/RNA/assembled/peptide_trinity/mandarinus.trinity.fasta >  
/home/taxon/RNA/clean_genes/peptides/mandarinus.genes.fasta  
  
# (нуклеотидные)  
awk -F '.' '{print $1}' /home/taxon/RNA/annotated/by_protein/lemminus2.diamond.tsv | xargs samtools faidx  
/home/taxon/RNA/assembled/nucleotide_trinity/lemminus2.trinity.fasta >  
/home/taxon/RNA/clean_genes/nucleotide/mountains/lemminus2.genes.nucl.fasta
```

3. Поиск ортологических генов

3.1 Proteinortho

Proteinortho is a tool to detect orthologous genes within different species.

```
conda install -c bioconda proteinortho  
>version 6.0.28
```

```
# МОИ ГОРНЫЕ И НЕ ОЧЕНЬ, ДЛЯ КОТОРЫХ БУДЕМ ИСКАТЬ ОРТОЛОГИ С ПРОТЕИНОРТО (14 штук без повторностей):  
cp /home/taxon/RNA/clean_genes/peptides/{ lemminus2.genes.fasta rufocanus.genes.fasta macrotis.genes.fasta  
tuvinicus.genes.fasta glareolus.genes.fasta rutilus2.genes.fasta nivalis.genes.fasta ochrogaster.genes.fasta  
brandtii.genes.fasta mandarinus.genes.fasta gregalis.genes.fasta raddei.genes.fasta fortis.genes.fasta  
pennsylvanicus.genes.fasta } /home/taxon/RNA/clean_genes/peptides/mountains
```

Запуск

из папки /home/taxon/RNA/protOrtho

```
proteinortho /home/taxon/RNA/clean_genes/peptides/mountains/*.fasta -project=mountain_ortho -cpus=15 -  
verbose=2 -clean
```

Получили сводную табличку с ортологами для 14-ти файлов:

- ☒ lemminus2.genes.fasta
- ☒ rufocanus.genes.fasta
- ☒ macrotis.genes.fasta
- ☒ tuvinicus.genes.fasta
- ☒ glareolus.genes.fasta
- ☒ rutilus2.genes.fasta
- ☒ nivalis.genes.fasta
- ☒ ochrogaster.genes.fasta
- ☒ brandtii.genes.fasta
- ☒ mandarinus.genes.fasta
- ☒ gregalis.genes.fasta
- ☒ raddei.genes.fasta
- ☒ fortis.genes.fasta
- ☒ pennsylvanicus.genes.fasta

табличка выглядит примерно так (уже отфильтрована по условию количество генов = количество видов для поиска только универсальных однокопийных ортологов):

| # Species | Genes | Alg. Conn. | brandtii.genes.fasta | fortis.genes.fasta | glareolus.genes.fasta | gregalis.genes.fasta | lemminus2.genes.fasta | macrodis.genes.fasta | mandarinus.genes.fasta | nivalis.genes.fasta | ochrogaster.genes.fasta | pennsylv. |
|-----------|-------|------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------|
| 2921 | 14 | 14 | 0.523 TRINITY_DN5388_c0_g1_i2.p1 | TRINITY_DN1328_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN8415_c0_g1_i2.p1 | TRINITY_DN3568_c0_g3_i1.p1 | TRINITY_DN13995_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN12476_c1_g1_i1.p1 | TRINITY_DN5464_c0_g1_i2.p1 | TRINITY_DN16439_c1_g1_i1.p1 | XP_005365546.1 | TRINITY_C |
| 2922 | 14 | 14 | 0.516 TRINITY_DN1242_c0_g1_i2.p1 | TRINITY_DN3746_c0_g1_i10.p1 | TRINITY_DN2495_c0_g1_i3.p1 | TRINITY_DN2119_c0_g1_i2.p1 | TRINITY_DN2105_c0_g1_i3.p1 | TRINITY_DN928_c0_g1_i2.p1 | TRINITY_DN1597_c2_g1_i8.p1 | TRINITY_DN1008_c0_g1_i1.p1 | XP_005362054.1 | TRINITY_C |
| 2923 | 14 | 14 | 0.515 TRINITY_DN1066_c6_g1_i1.p1 | TRINITY_DN5_c0_g6_i1.p1 | TRINITY_DN276_c2_g1_i2.p1 | TRINITY_DN1170_c2_g1_i2.p1 | TRINITY_DN854_c2_g1_i1.p1 | TRINITY_DN1373_c0_g2_i2.p1 | TRINITY_DN191_c5_g1_i2.p1 | TRINITY_DN517_c2_g1_i1.p1 | XP_005371696.1 | TRINITY_C |
| 2924 | 14 | 14 | 0.513 TRINITY_DN7256_c0_g1_i7.p1 | TRINITY_DN3662_c0_g3_i2.p1 | TRINITY_DN10739_c0_g1_i3.p1 | TRINITY_DN19184_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN20199_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN10903_c1_g3_i1.p1 | TRINITY_DN1211_c21_g1_i3.p1 | TRINITY_DN3541_c0_g1_i1.p1 | XP_005358460.1 | TRINITY_C |
| 2925 | 14 | 14 | 0.512 TRINITY_DN2545_c2_g1_i1.p1 | TRINITY_DN26542_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN3504_c1_g1_i3.p1 | TRINITY_DN1733_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN2066_c1_g1_i1.p1 | TRINITY_DN45526_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN1510_c5_g1_i1.p1 | TRINITY_DN562_c0_g4_i1.p1 | XP_005366515.1 | TRINITY_C |
| 2926 | 14 | 14 | 0.507 TRINITY_DN11297_c0_g1_i3.p1 | TRINITY_DN54557_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN76663_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN4143_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN13271_c0_g2_i1.p1 | TRINITY_DN76577_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN6742_c0_g1_i3.p1 | TRINITY_DN7883_c0_g1_i1.p1 | XP_026643801.1 | TRINITY_C |
| 2927 | 14 | 14 | 0.504 TRINITY_DN10297_c0_g1_i4.p1 | TRINITY_DN18193_c0_g2_i1.p1 | TRINITY_DN5628_c0_g1_i8.p1 | TRINITY_DN18811_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN1920_c0_g1_i2.p1 | TRINITY_DN2965_c0_g2_i1.p1 | TRINITY_DN7871_c0_g1_i5.p1 | TRINITY_DN227_c1_g3_i1.p1 | XP_005353120.1 | TRINITY_C |
| 2928 | 14 | 14 | 0.504 TRINITY_DN43533_c0_g1_i2.p1 | TRINITY_DN724_c5_g2_i1.p1 | TRINITY_DN33074_c1_g1_i1.p1 | TRINITY_DN1433_c1_g2_i3.p2 | TRINITY_DN1193_c3_g1_i1.p1 | TRINITY_DN989_c1_g4_i1.p1 | TRINITY_DN5355_c2_g1_i5.p1 | TRINITY_DN1724_c1_g1_i1.p1 | XP_005358816.1 | TRINITY_C |
| 2929 | 14 | 14 | 0.502 TRINITY_DN103548_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN35795_c0_g2_i1.p1 | TRINITY_DN141849_c0_g1_i2.p1 | TRINITY_DN7826_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN5629_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN489_c0_g2_i2.p1 | TRINITY_DN4895_c0_g1_i1.p1 | TRINITY_DN22835_c0_g1_i1.p1 | XP_005351458.1 | TRINITY_C |

Нам нужно теперь вытащить сами гены. Для этого:

1. фильтруем результат протеинорто таким образом чтобы оставить только те гены, которых для каждого вида нашлось по 1 штуке (любым простым скриптом на bash/R/Python, я в пандасе отсортировала и сохранила новую табличку) - УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ОДНОКОПИЙНЫЕ ОРТОЛОГИ
2. Из исходной сборки trinity вытягиваем нуклеотидные фасты для генов, на них будем считать отбор
3. для каждой ортогруппы (там где присутствуют все 14 видов) вытягиваем ортологичные гены с помощью скрипта (make_orthogroup_genes.py)
4. В полученных файликах могут оказаться дубликаты, поэтому убираем их с помощью seqkit rmdup (можно в цикле для всех сразу):

```
for f in *.fasta; do seqkit rmdup "$f" > deduplicated/"${f%.*}.fa"; done
```

РЕЗУЛЬТАТ:

получили 251 файл - это ортогруппы, в каждой из них один единственный ген для всех 14ти видов

3.2 Выравнивание

- Стартовый пайплайн (вышел плохо):

Выравнивала mafft, вышло плохо, гены очень сильно разорвало. Поэтому выравнивала prank-ом (wget). Выравнивала исходные транскрипты целиком

```
prank -d=/home/asha/ZIN/magistrat/RNA/proteinortho/genes_by_group/deduplicated/2.fa -o=/home/asha/ZIN/magistrat/RNA/proteinortho/aligned_ortho_genes/2_ali.fa
for f in *.fa; do prank -d="$f" -o=/home/asha/ZIN/magistrat/RNA/proteinortho/aligned_genes_new/"${f%.*}_ali.fa" -codon; done

#ПРОГОН ЧЕРЕЗ GBLOCKS для чистки выравнивания
for f in *.fas; do /home/asha/programms/Gblocks_0.91b/Gblocks "$f" -s /home/asha/ZIN/magistrat/RNA/proteinortho/aligned_gb_ortho_genes/"${f%.*}.fa" -g; done
```

- НОВЫЙ ПАЙПЛАЙН

Выравнивать будем не просто вытащенные нуклеотидные последовательности, а непосредственно CDS. Пайплайн усовершенствован в связи с 1) плохой работой Gblocks (рамка считывания для большинства генов уничтожена из-за некачественного выравнивания исходных транскриптов) 2) плохой работой Ete на выравниваниях без Gblocks и на выравниваниях после Gblocks. НАБЛЮДЕНИЕ: часто ген находится на (-) цепи, и выравнивается очень плохо!!!

Поэтому:

```
# скачаем поисковик рамок считывания от NCBI (можно и трансдекодером, а можно так)
wget https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/TOOLS/ORFfinder/linux-i64/ORFfinder.gz
gzip -d ORFfinder.gz
# принимает на вход мультифасту и выдает список всех ORF во всех последовательностях (во всех направлениях ищет)
/home/usr/programms/ORFfinder -in 2.fa -ml 190 -outfmt 1 -out 2_CDS.fa
```

```
-ml - минимальная длина рамки
-outfmt <Integer>
Output options:
0 = list of ORFs in FASTA format
1 = CDS in FASTA format
2 = Text ASN.1
3 = Feature table
```

подробнее на <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/TOOLS/ORFfinder/USAGE.txt>

Прогоняем все файлы через него:

```
for f in *; do /home/asha/programms/ORFfinder -in "$f" -ml 200 -outfmt 1 -out /home/asha/ZIN/magistrat/RNA/proteinortho/genes_by_group/CDS/"${f%.*}_CDS.fa"; done
```

В полученных файлах нас будет интересовать только самая длинная ORF для каждого вида в ортогруппе. Поэтому необходимо дополнительно причесать аутпут (скрипт /CDS_id_cleaner.py, запускается изнутри 1 раз)

На выходе имеем чистые кодирующие регионы для каждого гена каждого вида в каждой из 251 ортогрупп.

Пример выходного файла после скрипта: (таких 251 по количеству ортогрупп)

```
>rutilus
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>branditi
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>tuvonicus
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>rufocanus
CTGGCGGGGCTCTGCTGAGGCTCTGCGGCACAGCAGGATGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>mandarinus
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>nivalis
CTGGCGGGGCTCTGCTGAGGCTCTGCGGCACAGCAGGATGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>fortis
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>gregalis
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>lemminus2
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>macrotis
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>pennsylvanicus
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
>addel
ATGGCGGAGGCACTCCGGTCTCAGGCACTTTAAATTCACTACAGATGCTGCTGAGTTTCCTCCTCAGGAGAAAAAATCTGGTCTAAATTGTGGACCCAAGAAGACTAGACTCTAGGATTGGCAGAGAAATACAGTTCTCACCTCCCTGTCACTTCCCAGGCAGAACTCTACGATGACATCTCTGCTATTATCAGCACAATTACGCTCTGGAAGCAAACTTAGA
```

4. Оценка действия отбора

Для оценки действия отбора очень важно правильно подобрать группу видов, которые будут сравниваться. Нас интересуют представители одной трибы - трибы *Clethrionomyini*, а именно три лесных (*Clethrionomys glareolus*, *C. rutilus*, *Craseomys rufocanus*) и три горных обитателя (*Alticola lemminus*, *A. macrotis*, *A. tuvinicus*)

4.1 MrBayes

Для тестирования моделей эволюции необходимо построить филогенетическое дерево, на котором будут присутствовать исследуемые виды. Филогенетическое дерево было построено на митогеномных данных (все необходимые виды есть в базе ЗИНа, а также в NCBI).

Пайплайн:

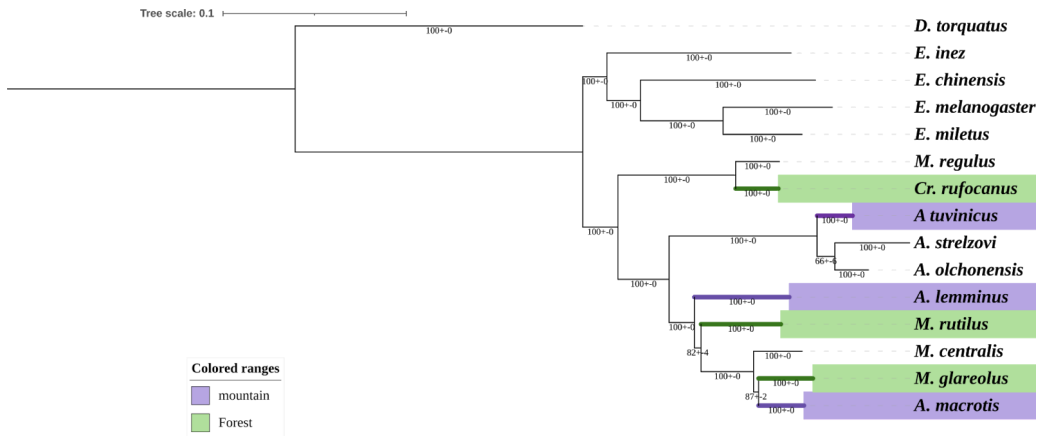
- ☒ Собираем фаста-файл с митогеномами видов для выравнивания
- ☒ Выравниваем (я использовала MUSCLE в программе MEGA X)
- ☒ Конвертируем формат в NEXUS (удобно с помощью mesquite - экспортировать файл в формате NEXUS for MrBayes)

```
sudo apt update
sudo apt install mrbayes
```

☒ http://mrbayes.sourceforge.net/mb3.2_manual.pdf

```
mb execute mito_alignment.nex
```

На выходе получим дерево в файле *.con.tre, его сконвертируем в .phy формат (любым удобным способом) и будем использовать при тестировании моделей с ete-evol.



4.2 ETE-toolkit

Установка (необходимы дополнительные пакеты, без них работать не будет, пришлось поискать)

```
sudo apt-get install python-numpy python-qt4 python-lxml python-six
pip install PyQt5
pip install QtPy
pip install --upgrade ete3
```

```
# Достанем 6 видов которые нас интересуют для анализа:
for f in *; do xargs samtools faidx /home/asha/ZIN/magistrat/RNA/proteinortho/aligned_genes_new/"$f" <
/home/asha/ZIN/magistrat/RNA/ete/clethrionomyini_for_ete.txt >
/home/asha/ZIN/magistrat/RNA/ete/data_new/"${f%.*}.fasta"; done
```

параметры:

```
-t # файл с деревом в .phy формате, полученный ранее
--alg # само выравнивание
--mark # промаркирует горные виды, отделив их от background то есть от лесных видов
--models # модели, которые будем использовать для оценки отбора
--tests # модели, которые хотим сравнивать между собой
--clear_all # нужен если тестируем несколько раз и хотим очищать уже созданные файлы с тем же названием
```

Запуск

```
ete3 evol -t ../clethrionomyini_tree.phy --alg /home/asha/ZIN/magistrat/RNA/ete/data/1_ali.fasta --models
b_neut,b_free,M0 --tests b_neut,b_free,M0 --mark lemminus2,macrotois,tuvinicus --cpu 6 --clear_all > 2_cds.out

for f in *; do ete3 evol -t ../clethrionomyini_tree.phy --alg
/home/asha/ZIN/magistrat/RNA/ete/data_group_1/"$f" --models b_neut b_free M0 --tests b_neut,b_free,M0 --mark
lemminus2,macrotois,tuvinicus --cpu 6 --clear_all > ../ete_results/"$f".out; done
```

Результаты

Среди 251 универсального однокопийного ортолога в трибе *Clethrionomyini* найдено 20 генов, для которых показано действие отбора, при уровне значимости $p < 0.01$.

Найденные гены (цифры для каждого вида - рассчитанное значение омеги):

| orthogroup | tuvinicus | macrotois | lemminus2 | background | p-value | models | average.omega | BLAST гена |
|------------|-----------|-----------|-----------|------------|----------|-----------|---------------|---|
| 33 | 0.48 | 0.08 | 0.239 | 0.024 | 0.002423 | M0/b_free | 0.07 | tetratricopeptide repeat domain |
| 55 | 999 | 0.197 | 0.922 | 0.227 | 0.045188 | M0/b_free | 0.297 | lipase maturation factor 2 |
| 59 | 0.647 | 0.694 | 0.224 | 0.018 | 0.034507 | M0/b_free | 0.136 | squalene epoxidase (Sqle) |
| 60 | 0.677 | 0.247 | 0.082 | 0.038 | 0.015774 | M0/b_free | 0.08 | glycine-tRNA ligase (Gars1) |
| 77 | 0.035 | 0 | 0 | 0.226 | 0.00478 | M0/b_free | 0.102 | beta-glucuronidase transcript (Gusb) |
| 83 | 0.13 | 0 | 0 | 0.179 | 0.01996 | M0/b_free | 0.097 | elongator complex protein 3 transcript variant X1 (Elp3) |
| 99 | 8.963 | 0.864 | 0.633 | 0.231 | 0.00081 | M0/b_free | 0.854 | transcription elongation factor, mitochondrial (Tefm) |
| 100 | 0.35 | 0 | 0.094 | 0.608 | 0.014028 | M0/b_free | 0.357 | F-box protein 7 (Fbxo7) |
| 112 | 2.042 | 0 | 0 | 0.129 | 0.029111 | M0/b_free | 0.195 | thioredoxin related transmembrane protein 1 (Tmx1) |
| 146 | 1.478 | 2.266 | 0 | 0.184 | 0.041966 | M0/b_free | 0.247 | reticulophagy regulator family member 3 (Retreg3) |
| 173 | 0 | 999 | 999 | 0.354 | 0.004692 | M0/b_free | 0.413 | small nuclear RNA activating complex polypeptide 2 (Snapc2) |
| 177 | 0.75 | 0 | 999 | 0.022 | 0.00236 | M0/b_free | 0.096 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like (Hnnp1l) |
| 178 | 0 | 0.818 | 0 | 0 | 0.009515 | M0/b_free | 0.076 | thymidylate kinase transcript variant X1 (Dtymk) |
| 185 | 916.762 | 999 | 999 | 0.017 | 0.009461 | M0/b_free | 0.067 | biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 4 (Bloc1s4) |
| 205 | 0.734 | 999 | 0.738 | 0 | 0.004302 | M0/b_free | 0.073 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 (Psm8) |
| 208 | 0 | 0 | 0.056 | 0.324 | 0.002271 | M0/b_free | 0.158 | 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial (Acaa2) |
| 243 | 0.874 | 0 | 0.182 | 0.022 | 0.001341 | M0/b_free | 0.121 | rhomboid domain-containing protein 2 transcript variant X1 (Rhbdd2) |
| 245 | 1.253 | 999 | 0 | 0 | 0.012813 | M0/b_free | 0.207 | NEDD4 family-interacting protein 1 (Ndfip1) |
| 249 | 1.731 | 0.518 | 1.401 | 0.074 | 0.02903 | M0/b_free | 0.275 | immediate early response 2 (Ier2) |
| 251 | 0.375 | 999 | 999 | 0.11 | 0.037962 | M0/b_free | 0.331 | zinc finger protein 282 (Znf282) |

В настоящее время проводится анализ найденных генов для установления их потенциальной роли в адаптации к высокогорьям.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПОЛЕЗНЫЕ КОМАНДЫ

```
#получить список айдишек фаста файла
perl -ne 'if(/^>(\S+)/){print "$1\n"}' ochrogaster.trinity.fasta > ochrogaster_ID.txt
# линейаризуем фаста файлы
cat fastas.fa | awk '/^>/ {printf("%s\n", (N>0?"\n":""), $0);N++;next;} {printf("%s", $0);} END
{printf("\n");}' > lin_fastas.fa
# ORF-поиск
for f in *; do /home/asha/programms/ORFfinder -in "$f" -ml 500 -outfmt 1 -out
/home/asha/ZIN/magistrat/RNA/proteinortho/genes_by_group/CDS/"${f%.*}_CDS.fa"; done
# sort fastas by length
for f in *; do /home/asha/programms/seqkit sort -l "$f" > sorted/"${f%.*}.fa"; done
#ищем значимые по p-val гены и копируем такие файлы в significant_group_1
grep -lE '[0-9]+\+' * | xargs cp -t ../significant_group_1
#замена расширения у файлов
for file in *.fas; do mv "$file" "${file%.fa}.best.fasta.out".fa"; done
# копируем файлы с сервера
scp -i newkey -P 8122 asha@XXX:/home/asha/magistrat/assembled/Trinity_agrestis/*.fasta
/home/asha/ZIN/magistrat/RNA/assembled/agrestis
```

Overrepresented sequenses BLAST (были в ридях, был вопрос чистить или нет, в итоге не чистила тк не мусор)

TGCAGCTTGTACAGTGCAGCTCACTCAGGGAAGAAAAGGTGCCCTTGA - Myodes glareolus haplotype 1901_HBB_T2_B beta-globin (HBB-T2) gene
AGAGGAAAGATGCCCAAGGCATTATCATTTTGCCACAGGTGGCAGTT - PREDICTED: Microtus ochrogaster hemoglobin subunit beta-like (LOC101992662), mRNA
CAGGTGTTTCAGGCCATACCAAGGCAGTGATCACCTTCTTGCCATGGG - Myodes glareolus haplotype 1901_HBB_T2_B beta-globin (HBB-T2) gene

Литература

Andrews, S. (2010). **FastQC**: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170

Buchfink B, Reuter K, Drost HG, "Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using **DIAMOND**", *Nature Methods* 18, 366–368 (2021).

ETE 3: Reconstruction, analysis and visualization of phylogenomic data. Jaime Huerta-Cepas, Francois Serra and Peer Bork. *Mol Biol Evol* 2016; doi: [10.1093/molbev/msw046](https://doi.org/10.1093/molbev/msw046)

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*. 2011 May 15;29(7):644-52. doi: 10.1038/nbt.1883. [PubMed PMID: 21572440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21572440/).

Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.

Lechner, M., Findeisz, S., Steiner, L., Marz, M., Stadler, P. F., & Prohaska, S. J. (2011). Proteinortho: detection of (co-) orthologs in large-scale analysis. *BMC bioinformatics*, 12(1), 124.

Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*.

<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki>