

# Contents

<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Samenvatting</b>	<b>3</b>
2.1	1.Training van het AUGUSTUS-programma voor het ontdekken van nieuwe genmodellen en hun patronen. . .	3
2.2	2. De training van het AUGUSTUS-programma met proteïne van langere evolutionaire afstand . . . . .	4
2.3	De training van het AUGUSTUS-programma met proteïne van kortere evolutionaire afstand . . . . .	4
<b>3</b>	<b>Materialen en methoden</b>	<b>5</b>
3.1	Alignment. Protocol1.Ruwe gegevens inspecteren . . . . .	5
<b>4</b>	<b>GenemarkET. Model opbouwen (protocol 1). mRNA pijplijnne</b>	<b>11</b>
4.1	Deel 1. Model opbouwen . . . . .	11
4.2	Etrain (protocol7) . . . . .	14
<b>5</b>	<b>ProtHints en de eiwitpijplijn</b>	<b>16</b>
5.1	Pipeline met eiwitten van grotere evolutionaire afstand . . . . .	16
5.2	Protocol 2. Het creëren van genstructuren voor training op basis van eiwitten. . . . .	20
5.3	GenomeThreader . . . . .	20
5.4	Protocol 6.Verwijderen van Redundant Genstructuren (protocol 6) . . . . .	21
5.5	Trainingsset van Proteins.Etrain . . . . .	30
<b>6</b>	<b>Pipeline met eiwitten van kortere evolutionaire afstand</b>	<b>40</b>
6.1	Gen-identificatie (proteine niveau) . . . . .	54
6.2	Gen-identificatie (nucleotide niveau) . . . . .	64
6.3	Visualisatie . . . . .	73
6.4	GenViz . . . . .	73
6.5	JBrowse . . . . .	73
6.6	Artemis . . . . .	74
<b>7</b>	<b>Conclusie en Discussie</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Bijlage</b>	<b>77</b>
	<b>References</b>	<b>86</b>

## 1 Inleiding

Dit onderwerp van onderzoek is heel belangrijk, omdat er in de experimentele wetenschap momenteel gezocht wordt naar alternatieven voor het gebruik van dieren in verschillende laboratoriumexperimenten. Aangezien verschillende wormsoorten een belangrijke rol spelen als modellen in medisch en biologisch onderzoek, is het cruciaal om hun genetisch materiaal te

onderzoeken. Dit project richt zich specifiek op de analyse van het genoom van de soort *Lumbricida*. De soort *Lumbricus Terrestris* hoort tot de fylogenetische familie Annelida, Clitellata, Oligochaeta, Crassicitellata, Lumbricina, Lumbricidae (Erxleben and Grüning 12:19:56 +0000). De soort ringwormen (Annelida) zijn de oudste evolutionaire groep. De musculatuur lijkt hier sterk op de dwarsgestrepte musculatuur van dieren. (Pilato n.d.). Daarom is deze soort een van de mensrelevante modellen voor laboratoriumonderzoek.

Genoomannotatie is het proces dat gericht is op het identificeren van functionele componenten binnen een DNA-sequentie. Dit proces van annotatie biedt inzicht in het genoom door de plaats en functie van genen te specificeren, waaronder genen die eiwitten coderen of andere functies vervullen, evenals de bijbehorende regulerende elementen. De assemblage is altijd gebaseerd op de reads die zijn gegenereerd tijdens het sequentieproces. Het proces van genoomassemblage houdt in dat het originele genoom wordt gereconstrueerd uit kleine stukjes DNA, verkregen door middel van sequencing (“De Novo Assembly Tutorial” n.d.). Deze reads zorgen ervoor dat het oorspronkelijke genoom meestal meerdere keren wordt gedekt. Bij het analyseren van genomische en metagenomische gegevens, is de gebruikelijke oplossing een verzameling contigs. Een contig is een aaneengeschakelde nucleotidesequentie. Deze contigs kunnen worden samengevoegd tot scaffolds, waarbij scaffolds bestaan uit een reeks contigs met een schatting van de afstanden tussen deze sequenties (“The NCBI Eukaryotic Genome Annotation Pipeline” n.d.) processen van genoomassemblage en annotatie zijn geïntegreerd in een groter geheel dat zich richt op de identificatie van het genoom. Het annoteren van genoom is nog steeds een proces dat veel tijd kost en verschillende soorten sequentieanalyses samenbrengt. Gezien de grootte en complexiteit van genomen, is de eerste stap naar volledige genoomassemblage meestal het verkrijgen van sequencinggegevens om ruwe assemblage en voorspelling van genmodellen te verkrijgen.

Het hele annotatieproces bestaat over het algemeen uit de volgende stappen : 1) Het maskeren van sterk repetitieve elementen in de genoomsequentie 2) het gebruik van transcripten en eiwitten van dezelfde of verwante soorten om ab initio te voorspellen . De bekende transcripten en eiwitten zijn opgeslagen in genetische databases zoals NCBI en BLAST. 3) gebruik van genzoekalgoritmen om mogelijke genstructuren te identificeren; 4) het combineren van deze gegevens om een eerste reeks genmodellen te creëren; 5) filteren van de resultaten op kwaliteit om de meest waarschijnlijke genmodellen te identificeren die volledige eiwitcoderende regio's. (ncbi.nlm.nih.gov n.d.) . In eerste instantie wordt de kwaliteitsselectie uitgevoerd met behulp van een set positieve controles voor het programma. Na het voltooiën van deze controles wordt het percentage fout-positieven resultaten duidelijk zichtbaar.

Een overzicht van publiek beschikbare genomen en annotaties in de soort *Lumbricus terrestris*.

Hoewel er in de bestaande literatuur slechts een beperkt aantal studies is dat de assemblage en annotatie van het genoom van

Lumbricus terrestris behandelt, zijn er wel talrijke beschrijvingen van de genoomannotatie van andere organismen. Voor de soorten C.Elegans en Lubricus Rubellis is er bijvoorbeeld een volledige annotatie. Voor het eerst wordt een gedetailleerde genoomassemblage van de genen van een soort Lumbricus terrestris gepubliceerd op 30 oktober (Blaxter, Spurgeon, and Kille 2023a). Door de innovatieve long-read sequencing methoden van Pacific Biosciences hebben de wetenschappers het genoom gesequenced en gepubliceerd. Hoewel het gepubliceerde genoom compleet is op sequentieniveau, is de analyse van de annotaties erg fragmentarisch. Deze genoomassemblage is de eerste die voor het publiek beschikbaar is. Het project legt de focus op het verder onderzoeken van de metadata van genoomassemblages. Tot nu toe zijn er in de literatuur geen uitgebreide en systematische studies gedaan over de annotatie van het Lumbricus terrestris genoom.

## 2 Samenvatting

### 2.1 1.Training van het AUGUSTUS-programma voor het ontdekken van nieuwe genmodellen en hun patronen.

De training van AUGUSTUS vond plaats in verschillende stappen. In het begin werd de predictor uitgevoerd met de standaardinstellingen voor caenorhabditis, wat leidde tot 11.000 voorlopige genmodellen voor één chromosoom, maar met een vrij lage nauwkeurigheid in de voorspellingen. Voor het opstellen van een eerste trainingsset van genen werden RNA-sequencingdata gebruikt. De transcriptomereads werden met TopHat op het genoom gemapt (zie documentatie protocol1, data\_processing). Dit resulteerde in 9.953 voorspelde genmodellen per chromosoom op basis van het transcriptoom. Gemiddeld waren de genen ongeveer 5.146 baseparen lang, en elk gen had meestal rond de 3,2 exons (zie protocol1, data\_processing, genemarkES, genemark.average\_gene\_length.out). De exons waren gemiddeld 1.719 baseparen, terwijl de introns gemiddeld 4.760 baseparen lang waren.

Daarna werden de genensets gefilterd met het Augustus-programma filterGenemark.pl. Na de filtratie bleven er 1.975 genen over op één chromosoom. Etrain werd uitgevoerd met genen die uit het transcriptoom kwamen. De uiteindelijke parameters werden gebruikt om de gff-annotatie te genereren. Een de novo-model met hoge specificiteit en sensitiviteitsscores van 8-9 voor de Lumbricus Terresstris werd verkregen via de mRNA-pijplijn.

## 2.2 2. De training van het AUGUSTUS-programma met proteïne van langere evolutionaire afstand

Het AUGUSTUS-programma is getraind met proteïne die een langere evolutionaire afstand hebben. Hiervoor is een database uit Ortho DB, Arthropoda (“Bioinformatics Web Server - University of Greifswald” n.d.) gebruikt. Deze database is voorbereid met “ProtHints”, wat een onderdeel is van de Braker-pipeline (“Gaius-Augustus/BRAKER” [2018] 2024). Voor de BLAST-analyse werd de versie ncbi-blast-2.16.0+ toegepast (zie protocol 2 documentatie). De OrthoDB-database diende als referentie. Om redundantie te verminderen, zijn alle trainingsgen aminozuursequenties met elkaar vergeleken en zijn alleen die eiwitsequenties behouden die minder dan 80% redundant zijn met andere sequenties in de set (zie protocol 2, scripts en documenten). Hieruit is een model (species) afgeleid dat de annotatie heeft opgeleverd.

Na het verwijderen van redundante genstructuren in de proteïne-pijplijn, zijn de specificiteit en gevoeligheid gestegen van 0,01 naar 0,4-0,5 punten voor het de novo-model van de eiwitpijplijn.

## 2.3 De training van het AUGUSTUS-programma met proteïne van kortere evolutionaire afstand

Proteïnegegevens werden ingezet voor extern bewijs en als Hints van Extrinsic Evidence. Lumbricus proteoom (“(Taxonomy\_id:6397) in UniProtKB Search (698) | UniProt” n.d.), Eisenia fetida proteoom (“(Taxonomy\_id:6393) in UniProtKB Search (633) | UniProt” n.d.) en Genomethreader (“Genometools/Genomethreader” [2019a] 2024) zijn toegepast. Door de alignment met GenomeThreader zijn er 20 genen geïdentificeerd voor chromosoom 1. Op chromosoom 1 zijn deze eiwitten en hun coördinaten aangetroffen: Q8MWU7 DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific, A0A088BZ25\_EISFE 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4, G3LY18\_EISFE Superoxide dismutase Eisenia fetida, B9TY06\_LUMTE Superoxide dismutase Lumbricus terrestris, B9TY04\_LUMRU Superoxide dismutase Lumbricus rubellus, Q9GRJ1 CALM\_LUMRU Calmodulin Lumbricus rubellus, Q2I6A7\_EISFE Calmodulin Eisenia fetida, V9VGQ0\_LUMRU glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase Lumbricus rubellus, P92182 ACT1\_LUMTE Actin-1 Lumbricus terrestris, P91754 ACT\_LUMRU Actin Lumbricus rubellus, E9KJS6\_9ANNE Beta-actin Lumbricus friendi, Q2I743\_LUMTE Extracellular hemoglobin linker L2 subunit Lumbricus terrestris, Q0G8J7\_LUMTE High-affinity serotonin transporter protein Lumbricus terrestris, V9GWR0\_LUMTE Peroxidasin Lumbricus terrestris, Q8MWS8\_9ANNE Hox20 Eisenia andrei, Q2I6A6\_EISFE HSp60 Eisenia fetida, Q2I741\_LUMTE Extracellular hemoglobin linker L4 subunit Lumbricus terrestris, P08924|GLB1\_LUMTE Extracellular globin-1 Lumbricus terrestris, P92182ACT1\_LUMTE Actin-1 Lumbricus terrestris, Q2I6A1\_EISFE Ubiquitin Eisenia fetida, P84589 UBIQ\_LUMTE Ubiquitin Lumbricus terrestris, A0A143Y4B3\_9ANNE

## 3 Materialen en methoden

### 3.1 Alignment. Protocol1. Ruwe gegevens inspecteren

Voor de Alignment zijn Bowtie en Tophat gebruikt. Het transcriptome ID49 is afkomstig van Project: PRJEB59399 (“ENA Browser” n.d.), dat een verzameling genomische en transcriptomische data bevat voor *Lumbricus terrestris*, ook wel de gewone regenworm genoemd. Dit project is opgezet om de assemblage en annotatie van het genoom te ondersteunen. Je kunt de ruwe gegevens hier bekijken: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB59399>. Reference genoom: [https://ftp.ensembl.org/pub/rapid-release/species/Lumbricus\\_\\_terrestris/GCA\\_949752735.1/ensembl/genome/](https://ftp.ensembl.org/pub/rapid-release/species/Lumbricus__terrestris/GCA_949752735.1/ensembl/genome/)

Eerst wordt de index opgebouwd met bowtie2. Daarna vindt de Alignmenet plaats met Tophat. Cufflinks voegt alle reads samen tot transcripties met: cufflinks accepted\_hits.bam. Script om de genomindex te genereren:

```
bowtie2-build -f Lumbricus_terrestris-GCA_949752735.1-softmasked.fa lumter --large-index
```

Nu we een referentie-index hebben gecreëerd, kunnen we verder met het uitlijnen van de reads. We doen dit om te ontdekken waar in het genoom de reads oorspronkelijk vandaan komen. TopHat is een RNA-Seq lezer die helpt bij het uitlijnen van gesplitste transcripties naar een referentie. Het ondersteunt splice-junctions, wat betekent dat je niet alleen alle exons krijgt, maar ook de verbindingpunten tussen twee exons, die we splice junctions noemen.

```
tophat lumter sample_1.fastq sample_2.fastq \
--output-dir TopHAT \
```

```
cufflinks accepted_hits.bam
```

Cufflink zal transcripts.gtf genereren, terwijl TopHat accepted\_hits.bam aanmaakt met de resultaten van de alignment en een lijst van verbindingpunten tussen de exons in junctions.bed. Elke junction bestaat uit twee verbonden BED-blokken, waarbij elk blok zo lang is als de maximale overhang van een lees die de junction overspant. De score is het aantal uitlijningen dat de

junction overspant.

Het bestand introns.gff geeft details over de coördinaten van introns en de strengen (+-) die gebruikt kunnen worden voor ET-training.

OX457036.1 TopHat2 intron 253060 254504 12 + . .

Ten eerste moeten we de ruwe gegevens bekijken die we hebben van de genoom-Alignment . Elke junction bestaat uit twee verbonden BED-blokken, welke bevat informatie over de knooppunten die exons met elkaar verbinden. Junctions.bed (TopHat, protocol1, script2):

```
head(junctions)
```

##		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11
## 1	OX457036.1	135689	136300	JUNC000000001	16	-	135689	136300	255,0,0	2	143,22	
## 2	OX457036.1	136278	139661	JUNC000000002	13	-	136278	139661	255,0,0	2	22,37	
## 3	OX457036.1	139624	150988	JUNC000000003	9	-	139624	150988	255,0,0	2	37,70	
## 4	OX457036.1	150918	153142	JUNC000000004	1	-	150918	153142	255,0,0	2	70,16	
## 5	OX457036.1	150929	156647	JUNC000000005	1	-	150929	156647	255,0,0	2	59,92	
## 6	OX457036.1	155453	155919	JUNC000000006	2	-	155453	155919	255,0,0	2	92,59	
##		V12										
## 1		0,589										
## 2		0,3346										
## 3		0,11294										
## 4		0,2208										
## 5		0,5626										
## 6		0,407										

Cufflink verwerkt de uitgelijnde RNA-Seq-reads die van Tophat komen en bouwt ze op in de transcripten en exonen.

```
transcripts <- read.table("lumbricus/protocol1/data_processing/TOPHAT/transcripts.gtf", sep="\t")

colnames(transcripts) <- c("chr", "versie", "feature", "start", "end", "score", "strain", "v8")

transcripts %>% select(1:5) %>% head()
```

```
##           chr    versie    feature    start    end
## 1 OX457036.1 Cufflinks transcript 109191 109546
## 2 OX457036.1 Cufflinks      exon 109191 109546
## 3 OX457036.1 Cufflinks transcript 124949 125423
## 4 OX457036.1 Cufflinks      exon 124949 125423
## 5 OX457036.1 Cufflinks transcript 135006 155436
## 6 OX457036.1 Cufflinks      exon 135006 135832
```

1. We gaan de outputbestanden van Tophat+Cufflink, namelijk accepted\_hits.bam en junctions.bed, in IGV zetten, samen met het transcriptbestand van Cufflinks. Eerst hebben we een bed-bestand nodig.

```
awk '{if($3=="exon" ) {print $1,$4,$5, $7, $3 } }' transcripts.gtf > exon_ids.bed

awk '{if($3=="transcript" ) {print $1,$4,$5, $7, $3 } }' transcripts.gtf > transcripts_ids.b
```

1. Bekijk de bed-bestanden voor de genoombrowser:

```
exons_ids <- read.table("lumbricus/protocol1/data_processing/TOPHAT/igv/exon_ids.bed", sep="\t")

transcript_ids <- read.table("lumbricus/protocol1/data_processing/TOPHAT/igv/transcripts_ids.bed", sep="\t")

head(exons_ids)
```

```
##                               V1
## 1 OX457036.1 109191 109546 . exon
```

```
## 2 OX457036.1 124949 125423 . exon
## 3 OX457036.1 135006 135832 - exon
## 4 OX457036.1 136279 136300 - exon
## 5 OX457036.1 139625 139661 - exon
## 6 OX457036.1 150919 150988 - exon
```

```
head(transcript_ids)
```

```
##                                     V1
## 1 OX457036.1 109191 109546 . transcript
## 2 OX457036.1 124949 125423 . transcript
## 3 OX457036.1 135006 155436 - transcript
## 4 OX457036.1 135006 156649 - transcript
## 5 OX457036.1 135006 156649 - transcript
## 6 OX457036.1 135006 156649 - transcript
```

Bekijk de exonen (diepblauw) en transcripties (lichtblauw) in IGV:

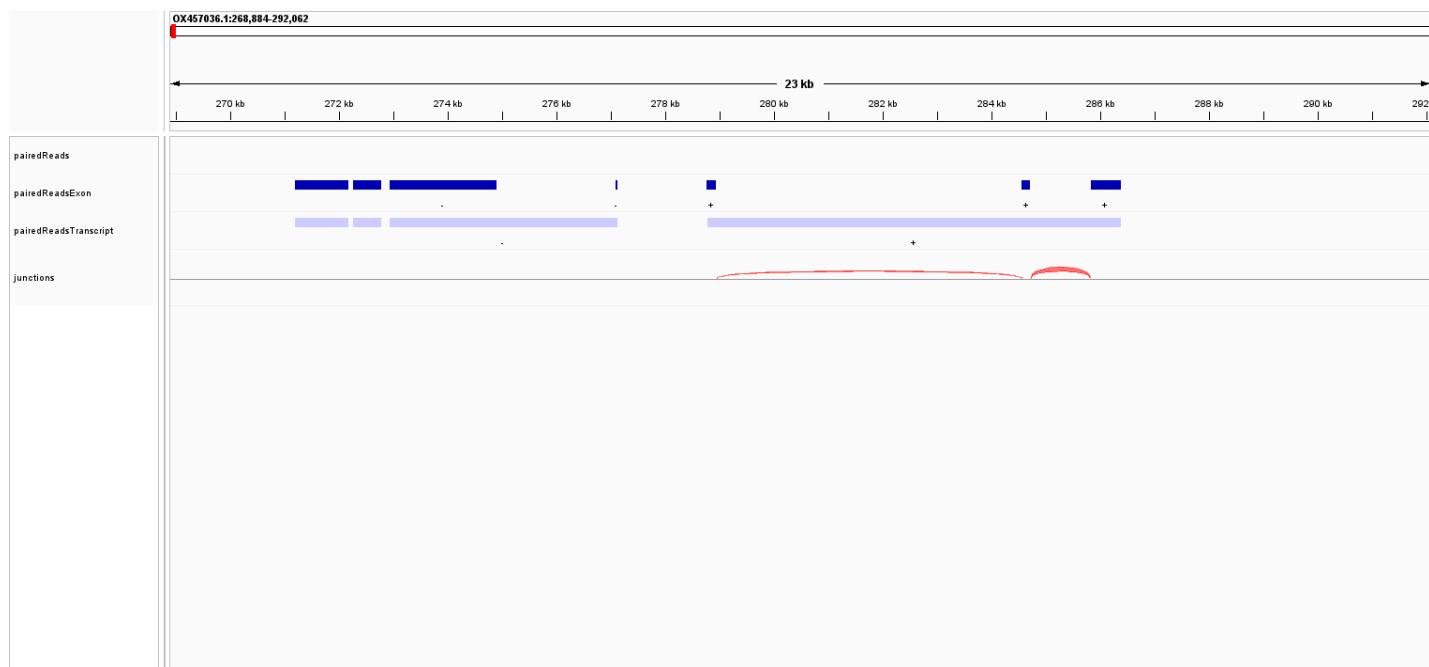


Figure 1: exon-transcripts structure chr1:23kb

Vervolgens plaatsen we junctions.bed (rood) en geaccepteerde hits of reads (grijs) op dezelfde track om de exon-intronstructuur te visualiseren (snapshots 1,2,4,5).



IGV Snapshots:

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot1.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot1.png)

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot2.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot2.png)

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot4.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot4.png)

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot5.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot5.png)

Laten we nu eens kijken naar de introns (protocol1-TopHat->introns.gff). We merken op dat er gaten in de structuur zitten en dat er ook lange introns uit de structuur komen. Het is daarom handig om verschillende RNA-Seq read mappers te gebruiken en te vergelijken. In dit onderzoek zijn Star, TopHat en Minimap toegepast, maar TopHat werd gekozen voor verder onderzoek omdat het goed samenwerkt met genemark. IGV Snapshots met introns (introns worden in geel weergegeven):

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot10.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot10.png)

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot10.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot10.png)

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot9.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot9.png)

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot11.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot11.png)

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot13.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot13.png)

[https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv\\_snapshot12.png](https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/igv_snapshot12.png)

In de laatste (snapshot12) is er een enorm transcript te zien waarin niet alle introns en exons worden herkend, en er zijn veel gaten.

Voordat we GeneMarkET uitvoeren, verzamelen we enkele statistieken uit de primaire analyse. Eerst bekijken we de gemiddelde introns, exonen en lengtes.

```
introns <- read.table("lumbricus/protocol1/data_processing/TOPHAT/introns.gff", sep="\t")

colnames(introns) <- c("chr","source","structure", "start", "end", "score", "strand", "v8", "v9")

head(introns)
```

```
##          chr  source structure  start      end score strand v8 v9
```

```
## 1 OX457036.1 TopHat2    intron 135833 136278    16    -    .    .
## 2 OX457036.1 TopHat2    intron 136301 139624    13    -    .    .
## 3 OX457036.1 TopHat2    intron 139662 150918     9    -    .    .
## 4 OX457036.1 TopHat2    intron 150989 153126     1    -    .    .
## 5 OX457036.1 TopHat2    intron 150989 156555     1    -    .    .
## 6 OX457036.1 TopHat2    intron 155546 155860     2    -    .    .
```

```
introns_length <- introns %>% mutate(ilength=end-start)
```

```
max_intron <- max(introns_length$ilength) %>% round(digits = 1)
```

```
avr_intron <- mean(introns_length$ilength) %>% round(digits = 1)
```

```
exons <- read.table("lumbricus/protocol1/data_processing/TOPHAT/transcripts.gtf", sep="\t")
```

```
exons <- exons %>% select(1:5)
```

```
colnames(exons) <- c("chr", "source", "structure", "start", "end")
```

```
exons_length <- exons %>% mutate(elength=end-start)
```

```
max_exon <- max(exons_length$elength) %>% round(digits = 1)
```

```
max_exon
```

```
## [1] 255549
```

```
avr_exon <- mean(exons_length$elength) %>% round(digits = 1)
```

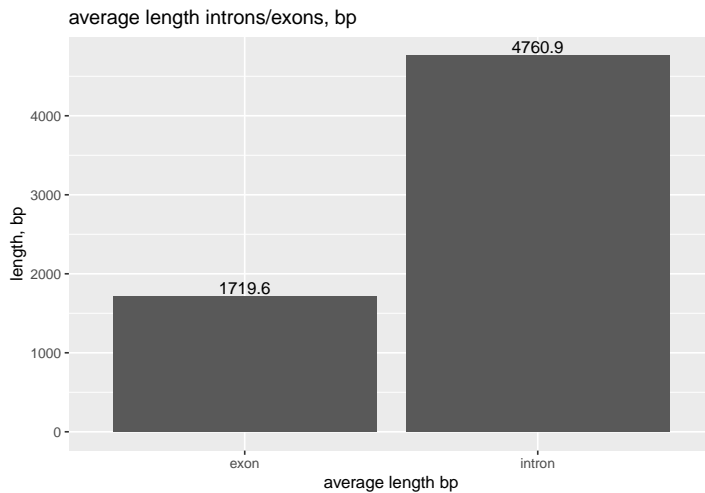
maximale lengte van intron :  $2.91919 \times 10^5$

gemiddelde intronlengte 4760.9

maximale lengte van exon :  $2.55549 \times 10^5$

gemiddelde lengte exon 1719.6

plot



## 4 GenemarkET. Model opbouwen (protocol 1). mRNA pijplijnne

### 4.1 Deel 1. Model opbouwen

Het script `bed_to_gff.pl` van GeneMarkES maakt `introns.gff` aan vanuit de `TopHat junctions.bed`. Dit bestand bevat informatie over de strengen en kan direct gebruikt worden met GeneMarkET (protocol 1, script 2).

```
bed_to_gff.pl --bed junctions.bed --gff introns-gmes.gff --label TopHat2
```

```
introns <- read.table("lumbricus/protocol1/data_processing/TOPHAT/introns.gff", sep="\t")

colnames(introns) <- c("chr", "aligner", "structure", "start", "end", "score", "strand", "v8", "v9")

head(introns)
```

```
##          chr aligner structure  start    end score strand v8 v9
## 1 0X457036.1 TopHat2   intron 135833 136278    16     -   .   .
## 2 0X457036.1 TopHat2   intron 136301 139624    13     -   .   .
## 3 0X457036.1 TopHat2   intron 139662 150918     9     -   .   .
## 4 0X457036.1 TopHat2   intron 150989 153126     1     -   .   .
```

```
## 5 0X457036.1 TopHat2    intron 150989 156555    1    -    .    .
## 6 0X457036.1 TopHat2    intron 155546 155860    2    -    .    .
```

Om genemark met introns.gff uit te voeren:

```
../../gmes_petap.pl    --verbose --sequence    genome.fa    --ET    introns.gff
```

1. GeneMarkET gaat een ghmm-model en genemark.gtf produceren. Dit bestand(gtf) bevat informatie over de start- en eindcoördinaten van genen, die in de daaropvolgende stap gebruikt zal worden.
2. Genemark maakt gebruik van filterGenemark.pl voor kwaliteitscontrole. Dit zorgt ervoor dat alleen de genmodellen die niet geregistreerd zijn in de intronstructuur behouden blijven. (protocol1, script3) Na het filteren van de primaire resultaten wordt er een set van 1.975 genmodellen voor één chromosoom opgeslagen in genemark.f.good.gtf.

```
filterGenemark.pl    --genemark    genemark.gtf    --introns    introns.gff
```

```
Average gene length: 5146
Average number of introns: 3.26484477042098
Good gene rate: 0.198432633376871
Number of genes: 9972
Number of complete genes: 9953
Number of good genes: 1975
Number of one-exon-genes: 1982
Number of bad genes: 7997
Good intron rate: 0
One exon gene rate (of good genes): 1.00354430379747
```

```
cut -f 2,3,4,5    lumbricus/protocol1/data_processing/GeneMarkES/genemark.f.good.gtf    | head
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
## bash: no job control in this shell
## GeneMark.hmm3    stop_codon    51009    51011
## GeneMark.hmm3    CDS 51009    54860
```

```
## GeneMark.hmm3      exon      51009    54860

## GeneMark.hmm3      start_codon 54858    54860

## GeneMark.hmm3      stop_codon  82883    82885

## GeneMark.hmm3      CDS 82883    86734

## GeneMark.hmm3      exon      82883    86734

## GeneMark.hmm3      start_codon 86732    86734

## GeneMark.hmm3      stop_codon  116110   116112

## GeneMark.hmm3      CDS 116110   117048

## bash: [2599900: 2 (255)] tcsetattr: Inappropriate ioctl for device
```

1. Genemark.f.good.gtf is nu klaar om een trainingsset te maken van (protocol1, stap 4 en 5). Eerst wordt gtf omgezet naar gb. Zie protocol1, data\_processing, Bonafide.

```
computeFlankingRegion.pl bonafide.gtf
```

```
Total length gene length (including introns): 1780572. Number of genes: 1975. Average Length: 901.555443037975
```

```
The flanking_DNA value is: 450 (the Minimum of 10 000 and 450)
```

```
gff2gbSmallDNA.pl bonafide.gtf genome.fa 450 tmp.gb
```

```
filterGenesIn_mRNAname.pl bonafide.gtf tmp.gb > bonafide.gb
```

```
cat lumbricus/protocol1/data_processing/bonafide/bonafide.gb | head
```

```
LOCUS      OX457036.1 Lumbricus terrestris genome assembly, chromosome: 1_50559-55310 4752 bp DNA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..4752
     mRNA             complement(451..4302)
                     /gene="1_t"
     CDS              complement(451..4302)
                     /gene="1_t"
```

```
BASE COUNT      1219 a    994 c    853 g    1655 t    31 n
```

```
ORIGIN
```

```
1 catccgtctt tttggaatcg atttttatcg tattctgaaa tgttcttata aatcttacac
61 cggctgcaaa ttttcttata cttagtttcc ttattttcct ggctcgcgta cttatgcgct
121 agctccttta ctttagcatt ttacagagt ttacagctcg gataacttcc gttcttttgt
181 cttttatctt tatgaaattc atctaagctt ttttcaatct tacagcagca gcaaactttt
```

Bonafide.gb is klaar om etrain te starten

## 4.2 Etrain (protocol7)

Op basis van de genen die we hebben verkregen via mRNA-alignment, gaan we een trainingsset opstellen om een nieuw model te trainen. In de vorige sectie hebben we bonafide.gb aangemaakt, waarin 1.975 geverifieerde genen voor een specifiek chromosoom zijn opgenomen. We zijn nu klaar om de ontwikkeling van een nieuwe species te starten.

```
conda activate c
new_species.pl --species=lumter
```

```
etraining --species=lumter bonafide.gb &> bonafide.out
```

Check for Stop Codons:

```
grep -c "Variable stopCodonExcludedFromCDS set right" bonafide.out
```

0

We hoeven geen bad lijst op te stellen, omdat er geen stopcodons in de CDS aanwezig zijn.

```
grep -c LOCUS bonafide.gb
```

1975

Het randomSplit.pl-script splitst de data op in twee segmenten: een kleinere sectie genaamd test.gb voor trainingsdoeleinden, en een grotere sectie die train.gb wordt genoemd voor de evaluatie van het trainingsproces.

```
randomSplit.pl bonafide.gb 200
mv bonafide.gb.test test.gb
mv bonafide.gb.train train.gb
```

```
etraining --species=lumter train.gb &> etrain.out
```

Deze configuratie kan worden aangepast in het configuratiebestand (map config, species, lumter\_parameters.cfg).

tag: 511 (0.259) taa: 700 (0.354) tga: 764 (0.387)

Evaluatie van de voorspelling:

```
augustus --species=lumter test.gb > test.out
```

\*\*\*\*\* Evaluation of gene prediction \*\*\*\*\*

```
*****      Evaluation of gene prediction      *****

-----\
      | sensitivity | specificity |
-----|
nucleotide level |      0.95 |      0.977 |
-----/

-----\

      | #pred | #anno |      | FP = false pos. | FN = false neg. |      | | | | |
      | total/ | total/ | TP |-----|-----| sensitivity | specificity |
      | unique | unique |   | part | ovlp | wrng | part | ovlp | wrng |      |
```

						32		40			
exon level	192	200	160	-----				-----			
	192	200		24	0	8	24	0	16		
transcript	#pred	#anno	TP	FP	FN	sensitivity	specificity				
gene level	192	200	160	32	40	0.8	0.833				

See also: lumbricus/protocol1/test/test.out

Hier eindigt onze mRNA-pijplijn, waarbij we een hoge specificiteitscore hebben bereikt voor het model dat we hebben gemaakt voor Lumbricus Terrestris. Dit model zal dienen voor visualisatie.

## 5 ProtHints en de eiwitpijplijn

### 5.1 Pipeline met eiwitten van grotere evolutionaire afstand

Er zijn veel genen in verschillende genoom die door hun evolutionaire oorsprong met elkaar verbonden zijn. De gelijkenis tussen eiwitsequenties is goed zichtbaar. OrthoDB is een belangrijke bron voor eiwitten en dient als een database die eiwitten met een uitgebreider evolutionair verleden omvat. Zie protocol 2.

```
../bin/prothint.py ../OX457036.1.fasta ../Arthropoda.fa
```

```
grep ">" seed_proteins.faa | wc -l
```

14733

Prothint heeft een database met eiwitten voorbereid voor startAlign.pl. Het resultaat was 14.733 eiwitten in het bestand seed\_proteins.faa. Dit seed-bestand kan worden gebruikt met startAlign.pl om een gth.concat.alg-object te verkrijgen, dat vervolgens wordt gebruikt om bonafide.gb te genereren.



```
head lumbricus/protocol2/data_processing/ProtHints/seed_proteins.faa
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
```

```
## bash: no job control in this shell
```

```
## >6249_g
```

```
## MPSVSGLIEMMMMTATITVMMTVTTVRIVERLGWGSYDTGDGDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDSSNNNSSNPPQVTAECLRRELRRCRHRFRSTSSEMTAPPAASA
```

```
##
```

```
## >10626_g
```

```
## MLGRGDCERKKQNGILETAIHEHAWLQYLEGTDERNKGKSKAGNLKAKREKLQKMRKGDIEEIGLLRGFAERKEKQGETEGLTGQVEEMEIDGPTTEKARHCLVAK
```

```
##
```

```
## >2633_g
```

```
## MSSAAHVNASRRQQRQTINVRQRKDGEGRRLKRGVLVGNSDLTVNWWKATRCRPVPLRYQGVSNETLRMNCNSTSGEGRFGTAIAIGVRRQKKGAKRQQDEKLP
```

```
##
```

```
## >1749_g
```

Naast het seed\_proteins.faa genereert protHints een prothint\_augustus.gff hintsbestand dat je direct kunt gebruiken met augustus.

```
head lumbricus/protocol2/data_processing/\
```

```
ProtHints/prothint_augustus.gff
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
```

```
## bash: no job control in this shell
```

```
## OX457036.1 ProtHint stop 51009 51011 2 - 0 src=P;mult=9;pri=4;al_score=0.163636;
## OX457036.1 ProtHint start 52806 52808 2 - 0 src=P;mult=2;pri=4;al_score=0.2;
## OX457036.1 ProtHint intron 53104 53221 2 - . src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.361685;
## OX457036.1 ProtHint intron 53515 53655 0 - . src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.108387;
## OX457036.1 ProtHint start 55225 55227 0 - 0 src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.104132;
## OX457036.1 ProtHint stop 82883 82885 2 - 0 src=P;mult=11;pri=4;al_score=0.163636;
## OX457036.1 ProtHint intron 84978 85095 2 - . src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.361685;
## OX457036.1 ProtHint intron 85389 85529 0 - . src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.108387;
## OX457036.1 ProtHint start 87099 87101 0 - 0 src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.104132;
```

```
## OX457036.1 ProtHint intron 144544 144597 0 + . src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.13595;
```

2. We kunnen augustus meteen draaien met de prothint\_augustus.gff die door de eiwitten zijn gemaakt, voordat we de trainingsset aanpakken.

```
augustus --species=lumter\  
--predictionStart=2000000 --predictionEnd=3000000\  
OX457036.1.fasta\  
--extrinsicCfgFile=extrinsic.cfg\  
--hintsfile=prothint_augustus.gff \  
> augustus.hints.prots.orthodb.arthropoda.2-3mb.gff
```

Hierdoor ontstaat een annotatie voor 2mb-3mb van het chromosoom, gebaseerd op de eiwitindicaties van eiwitten die een lange evolutionaire afstand hebben.

```
cat lumbricus/protocol2/data_processing\  
/ProtHints/augustus.hints.prots.orthodb.arthropoda.2-3mb.gff | \  
tail -n 50
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device  
## bash: no job control in this shell  
## # 3'UTR exons and introns: 0/0  
## # hint groups fully obeyed: 0  
## # incompatible hint groups: 2  
## # P: 2 (407821_0:000ad4_584_g)  
## # end gene g81  
## ###  
## # start gene g82  
## OX457036.1 AUGUSTUS gene 2981898 2982863 1 - . g82  
## OX457036.1 AUGUSTUS transcript 2981898 2982863 1 - . g82.t1  
## OX457036.1 AUGUSTUS stop_codon 2981898 2981900 . - 0 transcript_id "g82.t1"; gene_id "g82";  
## OX457036.1 AUGUSTUS CDS 2981898 2982863 1 - 0 transcript_id "g82.t1"; gene_id "g82";
```

```

## OX457036.1  AUGUSTUS      start_codon 2982861 2982863 .   -   0   transcript_id "g82.t1"; gene_id "g82";
## # protein sequence = [MDDEETVPYSLPRTTSTPATKGAAEASAFGQSRAEAYRTFEDPEYQFLDLPKKDRKKVLISSETTVSDSKRWEDASHLM
## # GPRKIQMKPGKFDGTSSLESFLTQFEVCARHNRWDDSDKVDFLRCALDKAATQLLWDFGARADVTDQLVGRLRQRYGVEGQAETYRAQLYRRQRAD
## # ESLSDLHDIRRLVVLAYPVPSNETTEIVARDSFLEAIRDRELSLKVREREPKSIDAYRVALRLSAYQQMTDVEDRRRPPNVRVQTQEADAGNQLQT
## # QLDGFLAAQRKWQRDFEDRISLQLNELRNQSQTHPDVAPATRNPAASP]
## # Evidence for and against this transcript:
## # % of transcript supported by hints (any source): 100
## # CDS exons: 1/1
## #      P:      1
## # CDS introns: 0/0
## # 5'UTR exons and introns: 0/0
## # 3'UTR exons and introns: 0/0
## # hint groups fully obeyed: 0
## # incompatible hint groups: 1
## #      P:      1 (407821_0:000ad4_584_g)
## # end gene g82
## ###
## # start gene g83
## OX457036.1  AUGUSTUS      gene      2983320 2984174 0.91      -   .   g83
## OX457036.1  AUGUSTUS      transcript 2983320 2984174 0.91      -   .   g83.t1
## OX457036.1  AUGUSTUS      stop_codon 2983320 2983322 .   -   0   transcript_id "g83.t1"; gene_id "g83";
## OX457036.1  AUGUSTUS      CDS 2983320 2984174 0.91      -   0   transcript_id "g83.t1"; gene_id "g83";
## OX457036.1  AUGUSTUS      start_codon 2984172 2984174 .   -   0   transcript_id "g83.t1"; gene_id "g83";
## # protein sequence = [MEKAGLYFNLKKTCLMTTENWTSFEVDGEEMKVVTCTCFGAMIENDGGCERYCGSLAGGINFFAVCVFFACERTCL
## # SEPLVASSSCPLEPAPSSRLFARSNLPLRAARCLFELPDRTCPSEPPVRCSSRTCPSEPLAASSSCPLEPAPPSRLSACSGRLRPLRAASSLFELLAR
## # TSLFRFTAESNLFVRAACLLLRGTGLETYKRRKKKKPSFAVGIEVGESQSLRVNPSGVSQRNEKGSSSSSVVRSPSPRKVISSIRQSEVSSSFKLRLKL
## # RLNSGQFVVE]
## # Evidence for and against this transcript:
## # % of transcript supported by hints (any source): 0
## # CDS exons: 0/1

```

```
## # CDS introns: 0/0

## # 5'UTR exons and introns: 0/0

## # 3'UTR exons and introns: 0/0

## # hint groups fully obeyed: 0

## # incompatible hint groups: 0

## # end gene g83

## ###

## # command line:

## # augustus --species=lumter --predictionStart=2000000 --predictionEnd=3000000 OX457036.1.fasta --extrinsicC
```

## 5.2 Protocol 2. Het creëren van genstructuren voor training op basis van eiwitten.

### 5.3 GenomeThreader

We hebben 14.733 eiwitten verzameld uit de eerdere secties. Nu gaan we een trainingsset opzetten met deze eiwitten. Uit de oorspronkelijke 14.733 eiwitten hebben we een klein deel gekozen om de trainingsset te vormen.

```
startAlign.pl --genome OX457036.1.fasta \
--prot seed_proteins.faa \
--pos OX457036.1:1-10000000 \
--prg gth
```

2. Hierdoor ontstaat het object `gth.concat.aln`, dat vervolgens kan worden geconverteerd naar het gtf-formaat (`protocol2`, `data_processing`, `protHints`).

```
gth2gtf.pl gth.concat.aln bonafide.gtf
```

Converting GenomeThreader file `align_gth/gth.concat.aln` to gtf format

Controleer het gtf-bestand :

```
head lumbricus/protocol2/data_processing/Bonafid/bonafide.gtf
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
```

```
## bash: no job control in this shell
```

```
## OX457036.1   gth CDS 51009   54860   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene1_mRNA1"; transcript_id "OX457036.1_g_gene1_mRNA1";
## OX457036.1   gth exon   51009   54860   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene1_mRNA1"; transcript_id "OX457036.1_g_gene1_mRNA1";
## OX457036.1   gth CDS 82883   86734   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene2_mRNA2"; transcript_id "OX457036.1_g_gene2_mRNA2";
## OX457036.1   gth exon   82883   86734   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene2_mRNA2"; transcript_id "OX457036.1_g_gene2_mRNA2";
## OX457036.1   gth CDS 104626  104645  .   -   2   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3";
## OX457036.1   gth exon   104626  104645  .   -   2   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3";
## OX457036.1   gth CDS 104696  104750  .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3";
## OX457036.1   gth exon   104696  104750  .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3";
## OX457036.1   gth CDS 104904  105745  .   -   2   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3";
## OX457036.1   gth exon   104904  105745  .   -   2   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3";
```

```
computeFlankingRegion.pl bonafide.gtf
```

Output van computeFlankingRegion.pl:

Total length gene length (including introns): 5412279. Number of genes: 1090. Average Length: 4965.39357798165 The flanking\_DNA value is: 2482 (the Minimum of 10 000 and 2482)

```
gff2gbSmallDNA.pl bonafide.gtf genome.fa 2482 bonafide.gb
```

Bonafide.gb wordt in de volgende pipeline gebruikt om redundantie te verwijderen.

## 5.4 Protocol 6.Verwijderen van Redundant Genstructuren (protocol 6)

Voor NCBI Blast, controleer de link en stel het Path in naar de Blast uitvoerbare bestanden.

```
wget ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/
```

```
export PATH=$PATH:HOME/ncbi-blast-2.16.0+
```

Maak gebruik van de opgegeven commandoregel om het GTF-bestand van de trainingsgenstructuur te transformeren naar een FASTA-bestand dat de eiwitsequentie omvat.

```
gtf2aa.pl genome.fa bonafide.f.gtf prot.aa
```

Inspecteer prot.aa :

```
head lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/prot.aa
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
```

```
## bash: no job control in this shell
```

```
## >OX457036.1_t_gene395_mRNA512
```

```
## ESSLPRCCPAGRGGGSQDSIAHARCFDRRITFSMMTLVGLGKEGLKRRKGGMDGERDLNWLEGGMGGEVQNRVIGIERRY*
```

```
## >OX457036.1_t_gene508_mRNA640
```

```
## MEESRPVTPAQPSRPPSSMEVLLEAIQTNAKSTHDAMTSIQSSLQLNARDTQEAIATVELNLAVQSNVREEISSVKSIVRDTQDAISSVQSNVSDAISSVQLNVRE
```

```
## >OX457036.1_t_gene532_mRNA668
```

```
## MTCLRRIEGVTRRERIRNTEIHNRLKIQRDIVDRIQIRRMRYFGHVVRMQSGRYPKVALQGYVHGKRRRGRPRKRWMDVAEEDCLRMGLTVGEATTRAQDRDDWRLS
```

```
## >OX457036.1_t_gene891_mRNA1213
```

```
## GKGRVNGCCFWRIRSGKLVREISTFCDIEFCEFKFGRDSFEVSCRGGKMASLEEELIPEFGDVRDIPSDTLRLVSETYGEEVEDVSRSQVRRMAMKPLSPKLGSAA
```

```
## >OX457036.1_t_gene296_mRNA397
```

```
## WSEEPEEGDGVWLVMIVEELQKIGIHEADHSMVDHIRNEEVKLKLAGSRYLEYIIMGRRGRLAGHILRLPKERIARTAIKWVPEGKRRRGRPRNTWRRTFKGDLERM
```

Voer een Blast uit van alle eiwitsequenties uit de vorige stap met elkaar en toon alleen de eiwitsequenties die minder dan 80% identiek zijn aan een andere sequentie in de groep.

```
aa2nonred.pl prot.aa prot.nr.aa
```

```
head lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/prot.nr.aa
```

```
grep ">" lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/prot.nr.aa | wc -l
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
```

```
## bash: no job control in this shell
```

```
## >OX457036.1_t_gene753_mRNA930
```

```
## SIVGAATEVYNRMSSDFLPTPTKSHYIFNLRDLSKCIQESKQVFRFLFCHEALRVFHDRLTTSEDKMSFYAILAEIAPKFFNENADAQSFLKHPIIFGDFIKVAAPRE
```

```
## >OX457036.1_t_gene803_mRNA1030
## SQKSRASATIVVCDLDHMMIRLPHFTAKRSVEPFQSTEEQVLGRIRSFPQGSSGGPDGLRPQHLSDLVNCVEIGSELIFAITGLVNLLLKGECPEDIRPVLFGGTL
## >OX457036.1_t_gene103_mRNA135
## MSINFAQRIQMPGIERVHGVTKVRNEFNILGYSVSFRYVISVFEDRIPYRLRKEIRLTGIRNAVDIGSSENANCLYVSDYEKCVRKITRERDGGHKIIKWLTAYR
## >OX457036.1_t_gene500_mRNA632
## IMRAEIQGRLNRGRQKKSWMDMIQQDMEFLGLRKEEVRDRTTWRQRIRINGLKYYVYVYGHVSVNMKDIIIEHRLTVAELHFLKRAEILDRREKPLDVERKRQTETET
## >OX457036.1_t_gene503_mRNA635
## MCEVAEYFENGELVIFDDSDPAPSYADEMESDEMDDSKSDFPEAECAMALLELAQSFGLVSSLNSFGHINDETGLRNAATEPSNVPLNNTAENLASTADARQHFSAF
## 602
```

Daarna hebben we 602 niet-redundante eiwitten om mee verder te gaan:

```
grep ">" lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/prot.nr.aa | wc -l
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
## bash: no job control in this shell
## 602
```

```
cat bonafide.gb | perl -ne 'if(m/\s+gene="(\\S+)\\s+"){ \
print "\\n".$1."\\n";}' | sort -u > traingenelst
```

regel 1: syntaxisfout bij onverwacht token '('

Dit leverde een syntaxisfout op, waarna alle perl -ne regex werden vervangen door Python regex, die werden uitgevoerd in de IDE.

```
import re
import subprocess

# Read from the file 'bonafide.gb'
with open('bonafide.gb', 'r') as file:
    content = file.read()
```

```

# Find all unique gene names

gene_names = set(re.findall(r'/gene="(\\S+)"', content))

# Writing unique gene names to a file

with open('traingen.es.lst', 'w') as f:

    for gene in sorted(gene_names):

        f.write(f"{gene}" + "\n")

```

De uitvoer bevat de strings die als transcriptnamen worden gebruikt in het bonafide.gtf-bestand, waaruit bonafide.gb oorspronkelijk is gemaakt, met aanhalingstekens.

```

head lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/traingen.es.lst

```

```

## "OX457036.1_t_gene1000_mRNA1441"
## "OX457036.1_t_gene1001_mRNA1448"
## "OX457036.1_t_gene1002_mRNA1452"
## "OX457036.1_t_gene1003_mRNA1454"
## "OX457036.1_t_gene1004_mRNA1455"
## "OX457036.1_t_gene1006_mRNA1462"
## "OX457036.1_t_gene1007_mRNA1463"
## "OX457036.1_t_gene1008_mRNA1464"
## "OX457036.1_t_gene1009_mRNA1468"
## "OX457036.1_t_gene100_mRNA132"

```

Hierna volgt een reeks scripts/opdrachten die alleen bedoeld zijn om een lijst te verkrijgen van niet-redundante genen en hun bijbehorende loci in GeneBank. Dit is voornamelijk een bewerking voor tekstbestanden

```

grep -oE '(OX457036[A-Za-z1-9._]{1,})\\w+' prot.nr.aa > nonred.lst

```



```
head lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/nonred.lst
```

```
## OX457036.1_t_gene753_mRNA930
## OX457036.1_t_gene803_mRNA1030
## OX457036.1_t_gene103_mRNA135
## OX457036.1_t_gene500_mRNA632
## OX457036.1_t_gene503_mRNA635
## OX457036.1_t_gene504_mRNA636
## OX457036.1_t_gene573_mRNA720
## OX457036.1_t_gene618_mRNA766
## OX457036.1_t_gene384_mRNA500
## OX457036.1_t_gene496_mRNA628
```

Isoleer de genen in traingenen.lst van bonafide.gtf:

```
grep -f traingenen.lst -F bonafide.gtf > bonafide.f.gtf
```

```
head lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/bonafide.f.gtf
```

```
## OX457036.1   gth CDS 51009   54860   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene1_mRNA1"; transcript_id "OX45703
## OX457036.1   gth exon   51009   54860   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene1_mRNA1"; transcript_id "OX4
## OX457036.1   gth CDS 82883   86734   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene2_mRNA2"; transcript_id "OX45703
## OX457036.1   gth exon   82883   86734   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene2_mRNA2"; transcript_id "OX4
## OX457036.1   gth CDS 104626  104645   .   -   2   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX45703
## OX457036.1   gth exon   104626  104645   .   -   2   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX4
## OX457036.1   gth CDS 104696  104750   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX45703
## OX457036.1   gth exon   104696  104750   .   -   0   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX4
## OX457036.1   gth CDS 104904  105745   .   -   2   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX45703
## OX457036.1   gth exon   104904  105745   .   -   2   gene_id "OX457036.1_g_gene3_mRNA3"; transcript_id "OX4
```

```
grep -oE '(OX457036[A-Za-z1-9._]{1,})\w+' prot.nr.aa > nonred.lst
```

```
head lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/nonred.lst
```

```
## OX457036.1_t_gene753_mRNA930
## OX457036.1_t_gene803_mRNA1030
## OX457036.1_t_gene103_mRNA135
## OX457036.1_t_gene500_mRNA632
## OX457036.1_t_gene503_mRNA635
## OX457036.1_t_gene504_mRNA636
## OX457036.1_t_gene573_mRNA720
## OX457036.1_t_gene618_mRNA766
## OX457036.1_t_gene384_mRNA500
## OX457036.1_t_gene496_mRNA628
```

In nonred.lst gaan we nu een niet-redundante subset van genen vinden.

Voor het filteren van het bestand bonafide.gb hebben we een lijst met loci-namen nodig in plaats van genenamen.

```
cat bonafide.gb | perl -ne '
if ( $_ =~ m/LOCUS\s+(\S+)\s/ ) {
    $txLocus = $1;
} elsif ( $_ =~ m/\s/gene="\s+(\S+)\s"/ ) {
    $txInGb3{$1} = $txLocus
}

if( eof() ) {
    foreach ( keys %txInGb3 ) {
        print "$_\t$txInGb3{$_}\n";
    }
}' > loci.lst
```

```

Unrecognized character \xE2; marked by <-- HERE after <-- HERE near column 1 at -e line 1.

cat: write error: Broken pipe

./test.sh: line 2: syntax error near unexpected token `('
./test.sh: line 2: `if ( $_ =~ m/LOCUS\s+(\S+)\s/ ) {'

```

Deze commando van het protocol veroorzaakte een fout en is vervangen. Het is nu locilist.py (scripts, protocol2).

```

import re

txInGb3 = {}

txLocus = ""

with open("bonafideOrtho.gb.db") as file:

    for line in file:

        if re.search(r'LOCUS\s+(\S+)\s', line):

            txLocus = re.search(r'LOCUS\s+(\S+)\s', line).group(1)

        elif re.search(r'/gene="(\S+)"', line):

            gene = re.search(r'/gene="(\S+)"', line).group(1)

            txInGb3[gene] = txLocus

with open("loci.lst", "w") as output_file:

    for key in txInGb3.keys():

        output_file.write(f"{key}\t{txInGb3[key]}\n")

```

en nonred.loci.py (scripts, protocol2):

```

import subprocess

with open('nonred.lst', 'r') as f:

    patterns = f.read().splitlines()

```

```

with open('loci.lst', 'r') as f:

    loci = f.read().splitlines()

matched_loci = [locus.split('\t')[1] for locus in loci if any(pattern in locus for pattern in patterns)]

with open('nonred.loci.lst', 'w') as f:

    f.write('\n'.join(matched_loci))

```

wat nonred.loci.lst en loci.lst (met 2 kolommen) produceert:

```
head lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/nonred.loci.lst
```

```

## OX457036.1_102144-115856
## OX457036.1_161655-167728
## OX457036.1_180282-185623
## OX457036.1_225887-235418
## OX457036.1_345964-351295
## OX457036.1_411769-417637
## OX457036.1_418604-428585
## OX457036.1_428586-437296
## OX457036.1_468333-473965
## OX457036.1_488481-495418

```

```
head lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/loci.lst
```

```

## OX457036.1_t_gene1_mRNA1 OX457036.1_48527-57342
## OX457036.1_t_gene2_mRNA2 OX457036.1_80401-89216
## OX457036.1_t_gene3_mRNA3 OX457036.1_102144-115856
## OX457036.1_t_gene4_mRNA4 OX457036.1_138781-147529
## OX457036.1_t_gene5_mRNA5 OX457036.1_161655-167728

```

```
## OX457036.1_t_gene6_mRNA6 OX457036.1_180282-185623
## OX457036.1_t_gene7_mRNA7 OX457036.1_225887-235418
## OX457036.1_t_gene8_mRNA8 OX457036.1_321850-327440
## OX457036.1_t_gene9_mRNA9 OX457036.1_345964-351295
## OX457036.1_t_gene10_mRNA10 OX457036.1_389861-394620
```

```
filterGenesIn.pl nonred.loci.lst bonafide.gb > bonafide.f.gb
```

Deze commando haalt enkel de laatste locus uit de bonafide.gb. Het doel is om alle unieke loci uit de bonafide.gb te verzamelen, niet alleen de laatste.

Om alle unieke loci te krijgen, moeten we dit in een loop zetten (protocol2, scripts, bonafide.nonred.f.py).

```
import re

origfilename = "bonafideRED.gb"
goodfilename = "nonred.loci.lst"

goodlist = {}

with open(goodfilename, 'r') as goodfile:

    for line in goodfile:

        goodlist[line.strip()] = 1

with open(origfilename, 'r') as origfile:

    content = origfile.read().split('\n/\n')

    for gendaten in content:

        match = re.match(r'^LOCUS +(\S+) .*', gendaten)

        if match:

            genname = match.group(1)

            if genname in goodlist:

                with open('bonafide.filtered.nonred.gb', 'a') as f2:

                    f2.write( gendaten+ '\n'+ '/' + '\n')
```

```
f2.close()
```

```
grep -c LOCUS lumbricus/protocol2/data_processing/Redundancy/bonafide.f.nonred.gb
```

```
## 602
```

Na deze fase zijn er 602 niet-redundante loci in Bonafide.

## 5.5 Trainingsset van Proteins.Etrain

We hebben in de vorige sectie 602 niet-redundante genstructuren ontdekt die kunnen dienen om een nieuwe soort te ontwikkelen.

Creëer een nieuwe species

```
new_species.pl --species=wormNonredEP
```

```
etrainig --species=wormNonredEP bonafide.gb &> bonafide.out
```

Check for stop-codons:

```
grep -c "Variable stopCodonExcludedFromCDS set right" bonafide.out
```

49

We moeten 49 stopcodons uitsluiten. Bad List:

```
etrainig --species=wormNonredEP bonafide.gb 2>&1\  
| grep "in sequence" \  
| sed -E 's/.*n sequence (\\S+):.*\\/\\1/' \  
| sort -u > bad.pre.list
```

```
grep -oE "in sequence.*(OX457036.[1-9A-Za-z_0-]{1,})\w+" \
bad.pre.list\
| grep -oE "(OX457036.[1-9A-Za-z_0-]{1,})\w+"> bad.list
```

```
head ~/lumbricus/protocol2/data_processing/bad-list/bad.list
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
## bash: no job control in this shell
## OX457036.1_80264327-80269533
## OX457036.1_3169142-3174603
## OX457036.1_3169142-3174603
## OX457036.1_82306032-82311964
## OX457036.1_83519819-83526493
## OX457036.1_85356189-85367403
## OX457036.1_3254876-3258078
## OX457036.1_87513969-87519492
## OX457036.1_3258079-3261568
## OX457036.1_92067632-92073579
```

Vervolgens filter bad.list uit bonafide.gb:

```
perl filterGenes.pl bad.list bonafide.filtered.nonred.gb \
> bonafide.filtered.gb
```

```
grep -c LOCUS bonafide.gb bonafide.filtered.gb
```

```
bonafide.gb:602 bonafide.filtered.gb:373
```

```
ln -s bonafide.filtered.gb bonafide.gb
```

test.gb is een klein bestand dat dient voor training. Train.gb is een groot bestand dat gebruikt wordt om de training te evalueren.

```
randomSplit.pl bonafide.gb 200
```

```
mv bonafide.gb.test test.gb
```

```
mv bonafide.gb.train train.gb
```

```
etrainig --species=wormNonredEP train.gb &> etrain.out
```

```
cat lumbricus/protocol2/data_processing/Bonafid/etrain.out
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
```

```
## bash: no job control in this shell
```

```
## # Read in 402 genbank sequences.
```

```
## Quantiles of the GC contents in the training set:
```

```
## 0% 0.351
```

```
## 5% 0.385 10% 0.391
```

```
## 15% 0.395 20% 0.399
```

```
## 25% 0.401 30% 0.404
```

```
## 35% 0.407 40% 0.41
```

```
## 45% 0.414 50% 0.417
```

```
## 55% 0.419 60% 0.425
```

```
## 65% 0.429 70% 0.431
```

```
## 75% 0.438 80% 0.446
```

```
## 85% 0.453 90% 0.463
```

```
## 95% 0.478 100% 0.596
```

```
## HMM-training the parameters...
```

```
## i= 0 bc= (0.237, 0.263, 0.263, 0.237)
```

```
## ** building model for exons *EXON*
```

```
## gene OX457036.1_t_gene3_mRNA3 transcr. 1 in sequence OX457036.1_102144-115856: Initial exon does not begin
```

```
## gene OX457036.1_t_gene6_mRNA6 transcr. 1 in sequence OX457036.1_180282-185623: Single exon gene does not be
```



## gene OX457036.1\_t\_gene7\_mRNA7 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_225887-235418: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene12\_mRNA12 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_411769-417637: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene13\_mRNA13 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_418604-428585: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene15\_mRNA22 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_468333-473965: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene16\_mRNA23 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_488481-495418: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene25\_mRNA32 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_793349-799539: Single exon doesn't end in

## gene OX457036.1\_t\_gene28\_mRNA35 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_828087-833443: Single exon gene does not

## gene OX457036.1\_t\_gene37\_mRNA46 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_1227964-1235673: Terminal exon doesn't end

## gene OX457036.1\_t\_gene50\_mRNA59 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_1382767-1388011: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene75\_mRNA84 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_1864193-1870189: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene75\_mRNA84 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_1864193-1870189: Terminal exon doesn't end

## gene OX457036.1\_t\_gene79\_mRNA98 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_1958047-1966250: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene85\_mRNA106 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_2379310-2387763: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene87\_mRNA112 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_2561265-2567109: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene87\_mRNA112 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_2561265-2567109: Terminal exon doesn't end

## gene OX457036.1\_t\_gene93\_mRNA124 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_2975037-2982552: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene100\_mRNA132 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3169142-3174603: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene100\_mRNA132 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3169142-3174603: Terminal exon doesn't end

## gene OX457036.1\_t\_gene102\_mRNA134 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3254876-3258078: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene103\_mRNA135 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3258079-3261568: Single exon doesn't end

## gene OX457036.1\_t\_gene105\_mRNA137 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3297799-3304519: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene106\_mRNA138 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3359681-3374933: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene107\_mRNA139 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3570104-3579686: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene110\_mRNA148 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3680134-3686759: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene110\_mRNA148 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3680134-3686759: Terminal exon doesn't end

## gene OX457036.1\_t\_gene117\_mRNA171 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_3896603-3901932: Single exon gene does

## gene OX457036.1\_t\_gene128\_mRNA184 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_4536556-4541279: Initial exon does not begin

## gene OX457036.1\_t\_gene132\_mRNA192 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_4640716-4646111: Terminal exon doesn't end

## gene OX457036.1\_t\_gene147\_mRNA214 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_5505955-5511224: Single exon gene does

## gene OX457036.1\_t\_gene153\_mRNA228 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_6794286-6799750: Single exon gene does

## gene OX457036.1\_t\_gene179\_mRNA274 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_9993286-10000490: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene181\_mRNA276 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10082478-10095441: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene189\_mRNA284 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10205252-10211280: Single exon gene does

## gene OX457036.1\_t\_gene190\_mRNA285 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10216378-10228154: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene190\_mRNA285 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10216378-10228154: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene202\_mRNA297 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10374730-10382407: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene204\_mRNA299 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10391569-10396787: Single exon gene does

## gene OX457036.1\_t\_gene206\_mRNA301 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10413134-10424326: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene209\_mRNA304 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10495298-10507106: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene211\_mRNA306 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10533789-10538161: Single exon gene does

## gene OX457036.1\_t\_gene216\_mRNA311 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10613588-10629777: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene221\_mRNA316 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10696814-10706294: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene225\_mRNA322 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10772550-10783247: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene229\_mRNA326 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10841503-10847628: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene234\_mRNA331 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10928283-10936080: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene237\_mRNA334 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_10981454-11006179: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene243\_mRNA340 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_11088540-11104071: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene247\_mRNA344 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_11128186-11137943: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene253\_mRNA351 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_11195586-11198238: Single exon gene does

## gene OX457036.1\_t\_gene261\_mRNA359 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_11337441-11356370: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene286\_mRNA385 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_11669977-11680124: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene302\_mRNA403 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_11831195-11840855: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene329\_mRNA439 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_12028102-12034370: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene333\_mRNA444 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_12068482-12078355: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene339\_mRNA452 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_12133940-12144845: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene372\_mRNA487 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_12550006-12558476: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene376\_mRNA491 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_12635558-12646780: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene377\_mRNA492 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_12646781-12657708: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene391\_mRNA507 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_12960383-12967876: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene395\_mRNA512 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13027769-13033390: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene397\_mRNA514 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13051998-13056982: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene402\_mRNA519 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13140825-13161161: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene413\_mRNA530 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13397191-13405858: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene425\_mRNA543 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13602291-13606653: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene434\_mRNA554 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13757095-13762171: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene435\_mRNA555 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13762172-13772308: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene441\_mRNA561 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13839972-13854769: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene445\_mRNA566 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13901788-13906868: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene445\_mRNA566 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13901788-13906868: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene447\_mRNA568 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_13911762-13923073: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene471\_mRNA598 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_14313501-14330986: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene474\_mRNA601 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_14364215-14373980: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene479\_mRNA606 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_14473081-14492232: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene481\_mRNA609 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_14513472-14521008: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene482\_mRNA610 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_14545906-14556390: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene484\_mRNA615 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_14609593-14636959: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene487\_mRNA618 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_14656204-14668619: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene489\_mRNA620 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_14702303-14705945: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene502\_mRNA634 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_14981346-14987357: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene505\_mRNA637 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_15032110-15044241: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene513\_mRNA647 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_15197718-15206715: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene516\_mRNA650 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_15241512-15258529: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene522\_mRNA658 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_15382172-15393407: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene525\_mRNA661 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_15466614-15490650: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene533\_mRNA669 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_15648400-15656275: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene548\_mRNA686 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_15849091-15856449: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene550\_mRNA688 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_15897477-15904571: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene554\_mRNA692 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_15945308-15950870: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene557\_mRNA701 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16029826-16043888: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene560\_mRNA705 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16110064-16156047: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene567\_mRNA714 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16218716-16244266: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene568\_mRNA715 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16277390-16292370: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene571\_mRNA718 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16319223-16330199: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene572\_mRNA719 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16345315-16362379: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene584\_mRNA732 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16491313-16495315: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene584\_mRNA732 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16491313-16495315: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene585\_mRNA733 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16495316-16503463: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene593\_mRNA741 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16643179-16655152: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene599\_mRNA747 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16731342-16734506: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene603\_mRNA751 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16813342-16817285: Single exon gene doe

## gene OX457036.1\_t\_gene604\_mRNA752 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16817286-16823059: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene611\_mRNA759 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_16958336-16962778: Single exon gene doe

## gene OX457036.1\_t\_gene617\_mRNA765 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17042978-17057198: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene619\_mRNA767 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17073623-17079359: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene621\_mRNA769 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17094834-17130276: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene623\_mRNA771 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17190425-17193814: Single exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene626\_mRNA775 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17257381-17271171: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene631\_mRNA780 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17348930-17377096: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene640\_mRNA798 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17497068-17525209: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene642\_mRNA800 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17529650-17541578: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene645\_mRNA803 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17596130-17619797: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene649\_mRNA807 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17634550-17639074: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene655\_mRNA815 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17744508-17750240: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene660\_mRNA820 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17835220-17838511: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene662\_mRNA823 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17849842-17853785: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene663\_mRNA824 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17853786-17857449: Terminal exon doesn't

## gene OX457036.1\_t\_gene664\_mRNA825 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17857450-17863139: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene672\_mRNA834 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_17990480-18009219: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene673\_mRNA835 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_18035626-18051537: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene677\_mRNA839 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_18119255-18129507: Initial exon does no

## gene OX457036.1\_t\_gene681\_mRNA843 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_18193378-18208400: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene682\_mRNA844 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_18208401-18213272: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene693\_mRNA856 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_18374726-18387789: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene700\_mRNA863 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_18483239-18487988: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene704\_mRNA867 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_18578939-18598050: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene724\_mRNA899 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_19002118-19008622: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene726\_mRNA901 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_19028984-19045696: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene740\_mRNA915 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_19352598-19358042: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene749\_mRNA924 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_19606015-19611206: Single exon gene does not

## gene OX457036.1\_t\_gene751\_mRNA926 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_19682132-19695097: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene753\_mRNA930 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_19741846-19780645: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene764\_mRNA945 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_23014763-23023715: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene768\_mRNA963 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_23456961-23465364: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene771\_mRNA969 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_23995161-24004302: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene801\_mRNA1028 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_30140557-30146091: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene803\_mRNA1030 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_30446959-30515442: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene810\_mRNA1043 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_31074367-31080836: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene810\_mRNA1043 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_31074367-31080836: Terminal exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene815\_mRNA1048 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_31982116-31992214: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene841\_mRNA1115 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_38587149-38593016: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene843\_mRNA1118 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_39204601-39212053: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene867\_mRNA1169 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_46355246-46360813: Initial exon has length

## gene OX457036.1\_t\_gene867\_mRNA1169 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_46355246-46360813: Terminal exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene877\_mRNA1186 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_48353548-48363475: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene912\_mRNA1262 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_56743606-56749445: Single exon gene does not

## gene OX457036.1\_t\_gene965\_mRNA1376 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_70984509-70990321: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene994\_mRNA1431 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_77046037-77051600: Single exon gene does not

## gene OX457036.1\_t\_gene1012\_mRNA1473 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_82306032-82311964: Initial exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene1018\_mRNA1485 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_83519819-83526493: Terminal exon does not

## gene OX457036.1\_t\_gene1029\_mRNA1511 transcr. 1 in sequence OX457036.1\_85356189-85367403: Initial exon does not

```

## gene OX457036.1_t_gene1039_mRNA1542 transcr. 1 in sequence OX457036.1_87513969-87519492: Initial exon does :
## gene OX457036.1_t_gene1058_mRNA1577 transcr. 1 in sequence OX457036.1_92067632-92073579: Initial exon does :
## gene OX457036.1_t_gene1093_mRNA1640 transcr. 1 in sequence OX457036.1_98424851-98432363: Initial exon does :
## start codon frequencies: ATG(277)

## # admissible start codons and their probabilities: ATG(1), CTG(0), TTG(0)

## number of bases in the reading frames: 167480 167786 167820

## --- frame = 0 ---      minPatSum = 233
## --- frame = 1 ---      minPatSum = 233
## --- frame = 2 ---      minPatSum = 233

## --- initial frame = 0 ---      minPatSum = 233
## --- initial frame = 1 ---      minPatSum = 233
## --- initial frame = 2 ---      minPatSum = 233

## --- internal exon terminal frame = 0 ---      minPatSum = 233
## --- internal exon terminal frame = 1 ---      minPatSum = 233
## --- internal exon terminal frame = 2 ---      minPatSum = 233

## single, initial, internal, terminal mean exon lengths :

## 914  269 200 261

## single exon : 44

## initial exon 0 : 98

## initial exon 1 : 60

## initial exon 2 : 72

## internal exon 0 : 576

## internal exon 1 : 243

## internal exon 2 : 251

## terminal exon : 314

## Frequency of stop codons:

## tag:   91 (0.254)

## taa:   94 (0.263)

## tga:  173 (0.483)

## end *EXON*

```

```
## Writing exon model parameters [1] to file /home/alena/anaconda3/envs/c/config/species/wormNonredEP/wormNonr
```

tag: 97 (0.26) taa: 102 (0.273) tga: 174 (0.466)

```
augustus --species=wormNonredEP test.gb > test.out
```

Deze test gaf een gevoeligheid en specificiteit van 0.01.

Na het toepassen van het protocol voor het verwijderen van redundante genstructuren, nam de specificiteit toe met 0,3 tot 0,5 punten.

```
*****      Evaluation of gene prediction      *****
```

```
-----\
```

	sensitivity	specificity
nucleotide level	0.942	0.762

```
-----/
```

```
-----\
```

#pred	#anno	FP = false pos.	FN = false neg.	
total/	total/	TP		sensitivity specificity
unique	unique	part ovlp wrng	part ovlp wrng	

```
-----|
```

		1071		767	
--	--	------	--	-----	--

exon level		1884		1580		813		-----		-----		0.515		0.432	
		1884		1580				436		104		531		456	
								145		166					
-----/															
-----\															
transcript		#pred		#anno		TP		FP		FN		sensitivity		specificity	
-----															
gene level		454		373		88		366		285		0.236		0.194	
-----/															

Zie lumbricus/protocol2/test/test.out voor meer informatie.

## 6 Pipeline met eiwitten van kortere evolutionaire afstand

Voor de eiwitten van kortere evolutionaire afstand is proteoom van wormen geselecteerd. Het proteoom komt van UniProt, dat zowel het proteoom van Lumbricus Terrestris als dat van Eisenia Fetida omvat. Twee van de Fasta-bestanden die we van UniProt hebben gekregen, zijn in één bestand samengevoegd.

Proteome Lumbricus Terrestris: [https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=%28taxonomy\\_id%3A6397%29](https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=%28taxonomy_id%3A6397%29)

Proteome Eisenia Fetida: [https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=%28taxonomy\\_id%3A6393%29](https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=%28taxonomy_id%3A6393%29)

Samengevat Lumbricus en Eisenia:

lumbricus -> protocol2.2 -> data\_processing -> merged\_6393\_and\_6397.fa

Fasta files, afkomstig van Uniprot: Eisenia: lumbricus -> protocol2.2 -> data\_raw -> uniprotkb\_taxonomy\_id\_6393\_2024\_12\_29.fasta

Lumbricus : lumbricus -> protocol2.2 -> data\_raw -> uniprotkb\_taxonomy\_id\_6397\_2024\_12\_29.fasta.

Eerste step is de ProtHints:

```
../bin/prothint.py ../OX457036.1.fasta ../merged_6393_and_6397.fa
```

Het programma ProtHints wordt gebruikt om hints voor te bereiden (ProtHints installatie vond plaats in protocol 2). In deze fase wordt het bestand prothint\_augustus.gff aangemaakt. Voorbeeld prothint\_augustus.gff :



OX457036.1	ProtHint	start	33409650	33409652	2	-	0	src=P;mult=2;pri=4;al_score=0.433058;
OX457036.1	ProtHint	intron	34198705	34199175	2	+	.	src=P;mult=2;pri=4;al_score=0.38446;
OX457036.1	ProtHint	intron	34199278	34199565	2	+	.	src=P;mult=2;pri=4;al_score=0.26901;
OX457036.1	ProtHint	intron	37878497	37880236	2	+	.	src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.488541;
OX457036.1	ProtHint	intron	37880480	37881139	2	+	.	src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.474112;
OX457036.1	ProtHint	stop	37881166	37881168	2	+	0	src=P;mult=1;pri=4;al_score=0.429752;

Je kunt hints gelijk toepassen in augustus.

```
augustus --species=caenorhabditis
--predictionStart=2000000 --predictionEnd=3000000\
OX457036.1.fasta
--extrinsicCfgFile=extrinsic.cfg
--hintsfile=prothint_augustus.gff
> augustus.extrinsics.hints.gff
```

For de extrinsic.cfg zie:

<https://github.com/nextgenusfs/augustus/blob/master/config/extrinsic/cgp.extrinsic.cfg>

Voorbeeld extrinsic.cfg:

```
# source of extrinsic information:
# M manual anchor (required)
# P protein database hit
# E EST/cDNA database hit
# C combined est/protein database hit
# D Dialign
# R retroposed genes
# T transMapped refSeqs
# W wiggle track coverage info from RNA-Seq
```

[SOURCES]

M RM E W P

```
#
# individual_liability: Only unsatisfiable hints are disregarded. By default this flag is not set
# and the whole hint group is disregarded when one hint in it is unsatisfiable.
# 1group1gene: Try to predict a single gene that covers all hints of a given group. This is relevant for
# hint groups with gaps, e.g. when two ESTs, say 5' and 3', from the same clone align nearby.
#
```

[SOURCE-PARAMETERS]

```
# feature          bonus          malus  gradelevelcolumns
#      r+/r-
#
# the gradelevel cols have the following format for each source
# sourcecharacter numscoreclasses boundary ... boundary  gradequot ... gradequot
#
```

[GENERAL]

start	1	0.8	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1	1e3
stop	1	0.8	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1	1e3
tss	1	1	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1	1
tts	1	1	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1	1
ass	1	0.95	0.1	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	100
dss	1	0.95	0.1	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	100
exonpart	1	.992	.985	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1.02	P	1
exon	1	0.9		M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1e4
intronpart	1	1		M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1
intron	1	.34		M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1e6	W	1	1	P	100
CDSpart	1	1	.985	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1e5

CDS	1		1	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1	1
UTRpart	1	1	1	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1	1
UTR	1		1	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1	1
irpart	1		1	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1	1
nonexonpart	1		1	M	1	1e+100	RM	1	1.15	E	1	1	W	1	1	P	1	1
genicpart	1		1	M	1	1e+100	RM	1	1	E	1	1	W	1	1	P	1	1

Tijdens deze stap wordt er een gff-annotatiebestand geproduceerd. Voorbeeld Augustus gff van protein Hints:

```
# start gene g10
OX457036.1 AUGUSTUS gene 2072765 2073299 0.59 + . g10
OX457036.1 AUGUSTUS transcript 2072765 2073299 0.59 + . g10.t1
OX457036.1 AUGUSTUS tss 2072765 2072765 . + . transcript_id "g10.t1"; gene_id "g10";
OX457036.1 AUGUSTUS 5'-UTR 2072765 2072799 0.99 + . transcript_id "g10.t1"; gene_id "g10";
OX457036.1 AUGUSTUS start_codon 2072800 2072802 . + 0 transcript_id "g10.t1"; gene_id "g10";
OX457036.1 AUGUSTUS single 2072800 2073033 0.93 + 0 transcript_id "g10.t1"; gene_id "g10";
OX457036.1 AUGUSTUS CDS 2072800 2073033 0.93 + 0 transcript_id "g10.t1"; gene_id "g10";
OX457036.1 AUGUSTUS stop_codon 2073031 2073033 . + 0 transcript_id "g10.t1"; gene_id "g10";
OX457036.1 AUGUSTUS 3'-UTR 2073034 2073299 0.6 + . transcript_id "g10.t1"; gene_id "g10";
OX457036.1 AUGUSTUS tts 2073299 2073299 . + . transcript_id "g10.t1"; gene_id "g10";
# protein sequence = [MYKLVDETSKLAWLLCLMRMLSQKYVSSMLMLANSRASLLPLLIAYNELISRDELSCYRFLHSCDMFILTFRRS]
# Evidence for and against this transcript:
# % of transcript supported by hints (any source): 0
# CDS exons: 0/1
# CDS introns: 0/0
# 5'UTR exons and introns: 0/1
# 3'UTR exons and introns: 0/1
# hint groups fully obeyed: 0
# incompatible hint groups: 0
# end gene g10
```

De proteïnesequentie in de gff is gereed om te gebruiken met de Blast-web of API-versie. Voor het evidence at protein level is het nuttig om GenomeThreader (<https://genomethreader.org/download.html>) in te zetten om specifieke eiwitten van *Lumbricus Terrestris* te vinden. Commando voor GenomeThreader 1.7.1:

```
gth -genomic soft.masked.chromosome1.OX457036.1.fasta -protein merged_6393_and_6397.fa
```

GenomeThreader geeft de positie van het gevonden eiwit in de gegeven dna-sequentie, evenals de identificatie van het eiwit “Q8MWU7” (protocol2.2-> data\_processing-> output.gth).

```
$ Arguments: -genomic soft.masked.chromosome1.OX457036.1.fasta -protein merged_6393_and_6397.fa
```

```
*****
```

```
Protein Sequence: file=merged_6393_and_6397.fa, description=tr|Q8MWU7|Q8MWU7_9ANNE Hox01 (Fragment) OS=Eisenia
```

```
1 HFNRYLTRRR RIEIAHALCL TERQI
```

```
Genomic Template: file=soft.masked.chromosome1.OX457036.1.fasta, strand=-, from=4635697, to=4635026, descripti
```

```
Predicted gene structure:
```

```
Exon 1 4635397 4635323 ( 75 n); Protein 1 25 ( 25 aa); score: 0.878
```

```
MATCH OX457036.1- tr+ 0.878 75 1.000 P
```

```
PGS_OX457036.1-_tr+ (4635397 4635323)
```

```
Alignment (genomic DNA sequence = upper lines):
```

```
CACTTCAACA AATATCTGAC GAGGAGACGA AGGATCGAGA TCTCGCACCA GCTGTGCTTG 4635338
```

```
H F N K Y L T R R R R I E I S H Q L C L
```

```
| | | + | | | | | | | | + | | |
```

```
H F N R Y L T R R R R I E I A H A L C L 20
```

```

ACGGAACGAC AGGTG                                4635323

T   E   R   Q   V

|   |   |   |   +

T   E   R   Q   I                                25

```

```

*****

```

Gegevens met betrekking tot chromosoom 1 voorspellingen komen voort uit bewijs van eiwitten (file GenomeThreader.output.gth, data\_processing, protocol2.2).

Predicted:

strand=- from=4635697 to=4635026

Protein ID : Q8MWU7|

DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific

Predicted:

strand=- from=19847071 to=19841778

A0A088BZ25\_EISFE 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 (Fragment) OS=Eisenia fetida

Predicted:

strand=- from=23688885 to=23683840

G3LY18\_EISFE Superoxide dismutase OS=Eisenia fetida

Predicted:

strand=- from=23686573 to=23683870

B9TY06\_LUMTE Superoxide dismutase OS=Lumbricus terrestris

Predicted:

strand=- from=23686573 to=23684768

B9TY04|B9TY04\_LUMRU Superoxide dismutase (Fragment) OS=Lumbricus rubellus

Predicted:

strand=+ from=37878052 to=37880778

Q9GRJ1 CALM\_LUMRU Calmodulin OS=Lumbricus rubellus

Predicted:

strand=+ from=37879936 to=37880745

Q2I6A7\_EISFE Calmodulin (Fragment) OS=Eisenia fetida

Predicted:

strand=+ from=39296646 to=39299946

V9VGQ0\_LUMRU glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase OS=Lumbricus rubellus OX=35632

Predicted:

strand=+ from=44647234 to=44650203

P92182 ACT1\_LUMTE Actin-1 OS=Lumbricus terrestris

Predicted:

strand=+ from=44647234 to=44650203

P91754|ACT\_LUMRU Actin OS=Lumbricus rubellus

Predicted:

strand=+ from=44648761 to=44649954

E9KJS6\_9ANNE Beta-actin OS=Lumbricus friendi

Predicted:

strand=+ from=51521291 to=51525245

Q2I743\_LUMTE Extracellular hemoglobin linker L2 subunit OS=Lumbricus terrestris

Predicted:

strand=- from=55530224 to=55501373

Q0G8J7\_LUMTE High-affinity serotonin transporter protein OS=Lumbricus terrestris

Predicted:

V9GWR0\_LUMTE Peroxidase OS=Lumbricus terrestris

strand=+ from=57431103 to=57470825

Predicted:

strand=+ from=61318513 to=61319184

Q8MWS8\_9ANNE Hox20 OS=Eisenia andrei

Predicted:

strand=- from=66406471 to=66405222

Q2I6A6\_EISFE HSp60 (Fragment) OS=Eisenia fetida

Predicted:

strand=- from=7768149 to=77676755

Q2I741\_LUMTE Extracellular hemoglobin linker L4 subunit OS=Lumbricus terrestris

Predicted:

strand=- from=77703849 to=77700628

P08924|GLB1\_LUMTE Extracellular globin-1 OS=Lumbricus terrestris

Predicted:

strand=- from=87203704 to=87077023

P92182|ACT1\_LUMTE Actin-1 OS=Lumbricus terrestris

Predicted:

strand=+ from=90736653 to=90737447

Q2I6A1\_EISFE Ubiquitin (Fragment) OS=Eisenia fetida

Predicted:

strand=+ from=90736725, to=90737447

P84589|UBIQ\_LUMTE Ubiquitin (Fragment) OS=Lumbricus terrestris

Predicted:

strand=+ from=91986226 to=91991793

A0A143Y4B3\_9ANNE Myeloid Differentiation primary response protein MyD88

Predicted:

strand=+ from=98669240 to=98672183

Q2I699\_EISFE Protein kinase C2 (Fragment) OS=Eisenia fetida

Visualisatie van protein evidence voor Chromosome I OX457036.1 Lumbricus Terrestris:

<https://alenagr3r.github.io/OX457036.1.html/OX457036.1.proteins.Lumbricus>

Op dit moment hebben we 20 eiwitten gevonden op het eerste chromosoom, die afkomstig zijn uit het proteoom van Lumbricus



Terrestris en Eisenia Fetida. Daarnaast zijn we geïnteresseerd in de andere genen, dus we keren terug naar onze gff annotatie. Dit keer passen we ons eigen model toe, dat is gebaseerd op eiwitten en ontwikkeld, protocol, 2,6 en 7. Verkrijgen van gff annotatie:

```
augustus --species=protsLumter sequence.fasta --predictionStart=2000000 --predictionEnd=3000000 --hintsfile=p
```

Gff3 file augustus.prothints.gff3 is te vinden: protocol2.2-> gff->augustus.prothints.gff3 Je kunt de webversie van Blast of Api Blast gebruiken om eiwitten te vinden. We zullen de Api-versie gebruiken. Om dit te doen, verwijderen we eerst alle overbodige tekens:

```
with open('augustus.prothints.gff3', 'r') as infile, open('parsed.gff3', 'w') as outfile:

    temp = infile.read().replace("#", "")

    outfile.write(temp)
```

Predicted genes for sequence number 1 on both strands

start gene g1

OX457036.1	AUGUSTUS	gene	2000789	2003917	1	+	.	ID=g1
OX457036.1	AUGUSTUS	transcript	2000789	2003917	1	+	.	ID=g1.t1;Parent=g1
OX457036.1	AUGUSTUS	start_codon	2000789	2000791	.	+	0	Parent=g1.t1
OX457036.1	AUGUSTUS	CDS	2000789	2003917	1	+	0	ID=g1.t1.cds;Parent=g1.t1
OX457036.1	AUGUSTUS	stop_codon	2003915	2003917	.	+	0	Parent=g1.t1

protein sequence = [MEESRPVTPAQSRPPSSMEILLEAIQTNARSTHEAIQTNAKSSQEAMQAHAKSTHDAMTSIQSSLQLNARETQEIAIA  
TVEFNVLAQSNVSEAISSVQSNVREEIREEEISAVRDNVREALTEMVSRLEERLEASVPKPAVDSPNGYLTAITPADAPYHSTIGLGETLGARPKDFT  
QPGILRRSDRLAGRPPISYREYGSRKDWPPFLGWDSNPEVTSSCPPSISRARPQQHAVPSGEDPEVATPGMPIGAGVTIGPSQWGQISSRDFGDDRLE  
EETDYARTGEMAISSFERRKEREADNVEIMSDGNDVIEISKIMESRPKTVKIIDNRMHAAQQPEFRNFEVNKPIANKLSREGGDRVNPVPLASSSLP  
LVEYPRDPQWRMQASLAHVDQQRVEMAPSRVDFTQPASVMPTYQSMPDCVLDGRATSTMVGRDYARPDLPPGPAAMATVDWMQPYARPDHNSMPWRY  
APTYTPSAFYGSSDNRVWDPLRCLDPLRPSDAVFPRWPTTVESARMSSCLGAQSFGRDAELPRCQAVMKSTPLERNETTADNKATSAVGETNALA  
PTYVSVGPIKIVPTTTTATQTTGDWELPSISSKGTVKELEPTASATAKEGEVKQSSTSPPKPTQFLKLGSGKTDVETFLRKFSVCARNNRWTDEER  
LNQLVVSLVEPATHLLSESADSLDTWTALVQRLRERYGNAEQALFQTQLSTRKQKADEDMGALVDDVRRRLTSRAYPGSSVHSEAIIVRAFLDALR  
DRTLALKIREREPKSLDEAYKVAMRLDGYQKAEDGGHEQHERRYGRVNAVKEEDDSEMRVLKRQVEQIMRQMERQPVSAQYRDNNRGSWTGNGSNG

```
NGWSNANRNNWRNNQRCSICNRTGHWSSVCYRQAAEQEDGPSARRCFECSAMDHIARFCPLRQQQAPPDNLGQPVGDNDNPSVGRVFAVRSAPA  
PSRDQRNGQNQERRSRRSPSSSRRRDSGRNSPREERRCFYCDDSSHLLRSSPLRNGPPEDRIWRMLGEPTGLRPPENLTSAG]
```

Voor de volgende stap zullen we de CDS-coördinaten en eiwitsequentie uit ons gff3-bestand knippen.

```
cds_coords = []  
  
content = open("parsed.gff3", 'r').read()  
pattern_a = r'CDS.*\s+\d+\w+ '  
matches_a = re.findall(pattern_a, content)  
cds_coords.extend(matches_a)  
print(cds_coords)
```

```
CDS\t2000789\t2003917
```

```
protein_seq=[]  
  
content = open("parsed.gff3", 'r').read()  
pattern_b="protein sequence =.*[A-Za-z\s\]]{1,}\]"  
matches_b=re.findall(pattern_b, content)  
protein_seq.extend(matches_b)  
  
print(protein_seq)
```

```
protein sequence = [MEESRPVTPAQPSRPPSSMEILLEAIQTNARSTHEAIQTNAKSSQEAMQAHAKSTHDAMTSIQSSLQLNARETQEIA  
TVEFNVLAQSNVSEAISSVQSNVREEIREEEISAVRDNVREALTEMVSRLEASPVKPAVDSPNGYLTAITPADAPYHSTIGLGETLGARPKDFT  
QPGILRRSDRLAGRPPISYREYGSRKDWPPFLGWDSNPEVTSSCPPSISRARPQQHAVPSGEDPEVATPGMPIGAGVTIGPSQWGQISSRDFGDDRLE  
EETDYARTGEMAISSFERRKEREADNVEIMSDDGNVDIEISKIMESRPKTVKIIDNRMHAAQQPEFRNFEVKNKPIANKLSREGGDRVNPVPLASSLP  
LVEYPRPDPQWRMQASLAHVDQQRVEMAPSRVDFTQPASVMPTYQSMPDCVLDGRATSTMVGRDYARPDLPPGPAAMATVDWMQPYARPDHNSMPWRY  
APTYTPSAFYGSSDNRVWDPLRCLDPLRPSDAVFPRWPTVVESARMSSCLGAQSFGRDAELPRCQAVMKSTPLERNETTADNKATSAVGETNALA
```

```

PTYVSVGPIKIVPTTTTATQTTGDWELPSISSKGTVKELEPTASATAKEGEVKQSSTSPPKPTQFLKLGSFSGKTDVETFLRKFSVCARNNRWTDEER
LNQLVVSLVEPATHLLSESNADSLDTWTALVQRLRERYGNAEQQALFQTQLSTRKQKADEDMGALVDDVRRLTSRAYPGSSTVHSEAIIVRAFLDALR
DRTLALKIREREPKSLDEAYKVAMRLDGYQKAEDGGHEQHERRYGRVNAVKEEDDSEMRVLKRQVEQIMRQMERQPVSA PQYRDNNRGSWTGQNGSNG
NGWSNANRNNWRNNQRCSICNRTGHWSSVCYRQAAEQEDGPSARRCFECSAMDHIARFCPLRQQQAPPDNLGQPVGDNDNPSVGRVFAVRSAPA
PSRDQRNGQNQERRSRRSPSSRRRDSGRNSPREERRCFYCDDSSHLLRSSPLRNGPPEDRIWRMLGEPTGLRPPENLTSAG]

```

In de volgende fase moeten we een database opzetten waarin elke(of meerdere)CDS coördinaat(en) gekoppeld is aan een specifieke eiwitsequentie. Je kunt ook de eiwitsequentie kopiëren en een blast uitvoeren op de website als alternatief:

[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

Maak een databasebestand aan met eiwitten en hun CDS-coördinaten. Splits het hele GFF-bestand per “eind gen”, zodat elke gendata één geninformatie bevat.

```

import re

readtxtfile = r'parsed.gff3'

with open(readtxtfile) as fp:

    txtrawdata = fp.read()

    genes = re.split(r'end\sgene.*',txtrawdata)

print(genes[-1])

```

Doorloop de lijst met genen.

```

str_coords=[]

str_proteins=[]


for gendata in genes:

    cds_coords = []

    protein_seq=[]

```

```

pattern_a = r'CDS.*\s+\d+\w+'

matches_a = re.findall(pattern_a, gendata)

cds_coords.extend(matches_a)


pattern_b="protein sequence =.*[A-Za-z\s\]]{1,}\]"

matches_b=re.findall(pattern_b, gendata)

protein_seq.extend(matches_b)


delimiter = " " # Define a delimiter

joined_coords=delimiter.join(cds_coords)

str_coords.append(joined_coords)

str_proteins.append(protein_seq)


dict={"cd_coords":str_coords, "protein_seq":str_proteins}

df = pd.DataFrame(dict)

```

Exporteer het dataframe naar een bestand.

```

outfile = open("proteinsdb.fa", 'w')


for index, row in df.iterrows():

    print( ">", row["cd_coords"], "\n", row['protein_seq'])

    outfile.write( ">" + str(row["cd_coords"]) + "\n" + str(row['protein_seq'])+ "\n" )

outfile.close()

```

Momenteel beschikken we over een bestand waarvan we enkel de overbodige tekens moeten verwijderen.

```
>CDS      2374823 2375022 CDS 2378236 2378761

protein sequence = [MHSSMQTNARDTQEQAMQSHAREAQEQAMQSHARETQEASVVQSNVTEEISAIQSNITEEISAIQSNITEEISTVRS
REEISAVYSNVREVLTEVVTRIERLEESPVPRSVVGLNPGLRSPASIMADVPHQSTIRLAESSGARPKDFTHLGLRRSERLAHKDPISYRELGSRDE
DSGNKVYVVLVRELEIMTSGSKVVNRTGHLGKLVAKDMATVPYDGAELVRFNLHISSRGRGIR]

>CDS      2381370 2384417

protein sequence = [MHSSMQTNARDTQEQAMQSHAREAQEQAMQSHARETQEASVVQSNVTEEISAIQSNITEEISAIQSNITEEISTVRS
REEISAVYSNVREVLTEVVTRIERLEESPVPRSVVGLNPGLRSPASIMADVPHQSTIRLAESSGARPKDFTHLGLRRSERLAHKDPISYRELGSRDG
WQSFHRLDLNPRVPSSYPRISQDHDHDPQHAASLPYDDPELATPGMTVGAGVTIGTRSGVLVQIGSRDFGDDSLSEEADDVGRGELAMSFERRMER
KETERRLREFADNVEIMSDEGSVDIEISRMMEARPKTVKIIDNRMQTALQPEFRDLEISKPIANQLPREGGDKANPVPLAFSSLPHVEYPRPNPQWRM
QASLADVGRQRAETATNLGDILQSTSGRPTYRSMADSAFDGRTTSTLVGRGYARPDLRPAPVVMATVDRMQPYVLPDHSYLSRMSAPTHAPSAFYENI
DNQVWLSDFRPSDDIFPRWPPIVESARMSSCLGAQSFQFGRDVELPRSSLLKPTLPVRIETTGVDKTPASSNVSVGLIRTVPMTTVATQTTGDLELPS
TSLGGTAKEPEPTASATPKVGEVKPSSTPAPKPKQWLKLGYSYSGKTDVEIFLRRFSVCAKNNGWSEEEKLNQLVVALVEPATNLLSETNADSLDTWTA
LVQRLRERYGNAEQQALFQTLSTRKQKPDMDGMSVDDIRRLTSRAYPGSSTVHSEIAIVRAFLDALRDRTLALKIREREAKSLDEAYKVAMRLDGY
QKAEAGGHEQHERRQGRINAIKEEDAKVKDSELKDLRWELEQMKRQVERQPLAAPQVRYHNSGPWRGQNGSTGNGWYNANGNNGNWRNNQRGYDYR
EHWSAGGYRQAVRPEAGRSGRRCYECGQVTDHIARFCPLRQQQAARNDNQGPQSDTPCNPIVGRVNAVQSSAPAPSGNQGNQMLPSSSTRRRDDGRN
SPGEERRCFYCDSRFHLLRGCPLRNGSSDDHNWRTLEEPTGSHPSGTWHHMGIIYP]

>CDS      2414960 2415253 CDS 2417218 2417280

protein sequence = [MNALCTVERRVTSQCTQDRTAGRDPKEEKKNNNSNNNNINNNNNNDNDNESDDDDDDNDNDNDNDNDYNNNDNDNDYDNS
SLIPLAVETMDPINKDDLAFVSEIRRLTKLSGYLRGKDF]

>CDS      2478928 2483715
```

Onnodige tekens verwijderen

```
with open('proteinsdb.fa', 'r') as infile, open('temp.fa', 'w') as outfile:

    temp = infile.read().replace("protein sequence = [", "")

    outfile.write(temp)
```

Het bestand is gereed om blasten uit te voeren, nu de extra tekens zijn weggehaald. Elke eiwit heeft één of meer cds en de coördinaten daarvan worden gebruikt als unieke identificatiecode.

[illegible]

Het bestand dat alle eerder genoemde stappen bevat, is te vinden in protocol2.2, in de map scripts, met de naam parse-proteins.py. De database van de aangemaakte proteïnen vind je in identification-p onder prediction, en heet proteinsdb.fa.

## 6.1 Gen-identificatie (proteine niveau)

Blast wordt uitgevoerd met deze query, waarbij er maximaal één eiwit per fractie wordt gebruikt. Deze query werkt op dezelfde manier als de Standard Protein BLAST web-versie die je gebruikt om vergelijkbare eiwitten in de database te blasten. Er is ook een gedetailleerde uitleg over de functie van qblast, in het hoofdstuk hieronder, nucleotide identificatie.

```
from Bio.Blast import NCBIWWW
from Bio.Blast import NCBIXML

genomic="blast/fraction1-proteins.fa"
```

```
sequence_data = open(genomic).read()

result_handle = NCBIWWW.qblast("blastp", "nr", sequence_data, hitlist_size=5, alignments=50)

result_handle
```

De volledige query staat beschreven in het bestand blast-p.py, bij de protocol2.2-> scripts. Blast doet verschillende alignments, identificeert eiwitten en beoordeelt ze, met aandacht voor een Hsp\_evalue, vergelijkbare p-waarde. We hebben vooral belangstelling voor deze drie waarden: Hit\_id, Hit\_def en Hsp\_evalue.

```
<Hit>

  <Hit_num>1</Hit_num>

  <Hit_id>ref|XP_042643872.1|</Hit_id>

  <Hit_def>kinesin-like protein KIF11 isoform X1 [Tyto alba]</Hit_def>

  <Hit_accession>XP_042643872</Hit_accession>

  <Hit_len>1175</Hit_len>

  <Hit_hsps>

    <Hsp>

      <Hsp_num>1</Hsp_num>

      <Hsp_bit-score>48.521</Hsp_bit-score>

      <Hsp_score>114</Hsp_score>

      <Hsp_evalue>0.049464</Hsp_evalue>

      <Hsp_query-from>23</Hsp_query-from>

      <Hsp_query-to>116</Hsp_query-to>

      <Hsp_hit-from>691</Hsp_hit-from>

      <Hsp_hit-to>784</Hsp_hit-to>

      <Hsp_query-frame>0</Hsp_query-frame>

      <Hsp_hit-frame>0</Hsp_hit-frame>

      <Hsp_identity>31</Hsp_identity>

      <Hsp_positive>54</Hsp_positive>

      <Hsp_gaps>8</Hsp_gaps>
```

```

<Hsp_align-len>98</Hsp_align-len>

<Hsp_qseq>LEAIQTNARSTHEAIQTNAKSSQEAMQ----AHAKSTHDAMTSIQSSLQLNARETQEAIATVEFNVLAVQSNVSEAISSVQSNVREEIREEISA
<Hsp_hseq>LKKLQEETTSVFAQLQNDCENLKEEVEMTRLAHTKSTAELMSSLQSLDLFARETQKNLT----NVLTKNGSLKTAITAVQENIHLKTTDLVSS
<Hsp_midline>L+ +Q      S      +Q + ++ +E ++      AH KST + M+S+QS L L ARETQ+ +      NVL      ++  AI++VQ N+  +  +
</Hsp>

</Hit_hsps>

</Hit>

```

Alle xml-bestanden per CDS bevinden zich in de map xml, identificatie-p, met een naam die unieke CDS-coördinaten bevat zoals CDS2007959-2008723.xml. De details over het parsen van het xml-resultaat zijn te vinden in het hoofdstuk dat gaat over nucleotidenidentificatie.

We zijn vooral geïnteresseerd in het vergelijken van twee anotaties van verschillende bronnen, eiwit en mRNA. En om te zien of er overlap is als er overlappingsen zijn.

In de genomische browser Jbrowser zijn overlappende genstructuren weergegeven, zoals te zien is in de screenshots die zijn gekozen voor vergelijking. De bovenste track laat annotaties zien die afkomstig zijn uit de mRNA-pijplijn, en de onderste track toont annotaties uit de proteïnepijplijn.

G5 Toont 2 CDS overeenkomsten, groen en blauw.

inzoomen:

<https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/intersectiong5.svg>

Informatie over dit gen:

g5,coördinaten OX457036.1:2108840-2109808, in de nucleotidenlijn werd er een voorspelling voor verkregen : Candidozyma auris strain BA03 chromosome; 1 eval; CP157508.1 in de eiwitlijn, werd er een voorspelling voor verkregen: endonuclease-reverse transcriptase, GFN75565.1

g6 coördinaten OX457036.1:2,205,956-2,206,438(-) ,voor dit gen geen Hits gevonden. CDS , in groen, werd geïdentificeerd in zowel nucleotide pipeline als proteïne pipeline G7 CDS is geïdentificeerd als bifunctional 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, WP\_117560622.1

inzoomen:

<https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/lumterAM182481.1g6-7.svg>





Figure 2: G5.



Figure 3: G6-G7.

G8, G9: Twee CDS g8, en g9, in blauwe kleur, op beide annotaties

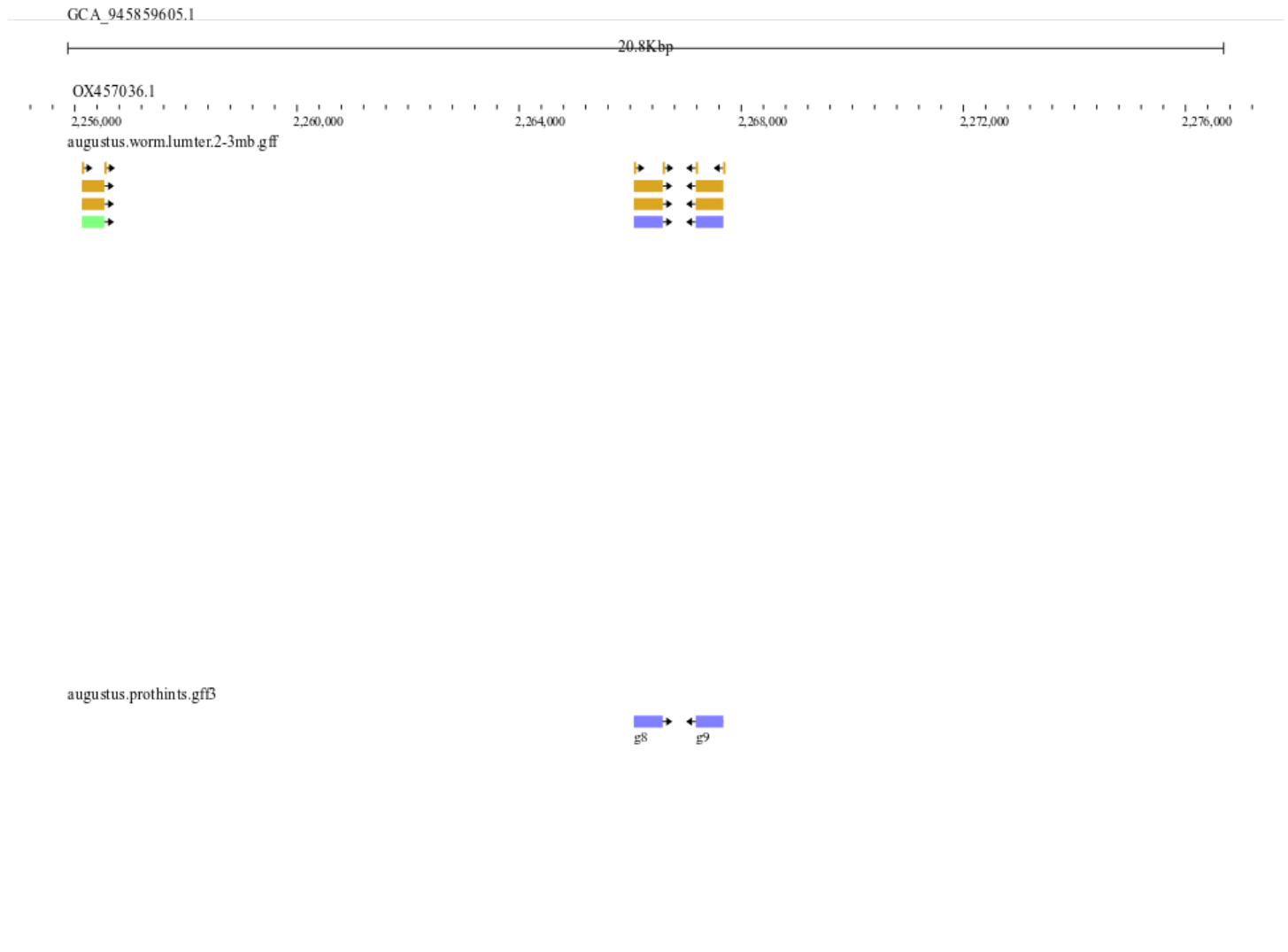


Figure 4: G8-G9.

Voor g8 zijn er geen its op nucleotide niveau gevonden. Op de proteïne niveau BLAST toonde dit resultaat voor g8 emb CAI2738958.1 naamloos eiwitproduct, CDS coördinaten 2266065-2266586

Voor g9 is deze prediction gevonden op nucleotide niveau:Earthworm (*L.terrestris*) extracellular globin chain c gene, complete cds, Query ID lcl|Query\_2713981. Bij de proteïne-identificatie werd het volgende resultaat verkregen: MAG,hypothetical protein DMG74\_22350

inzoomen:

<https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g8g9.svg>

Hier zijn de 2 CDS van dit gen roze en blauw, die overeenkomen met de bovenste en onderste annotatie. Voor g10 is er

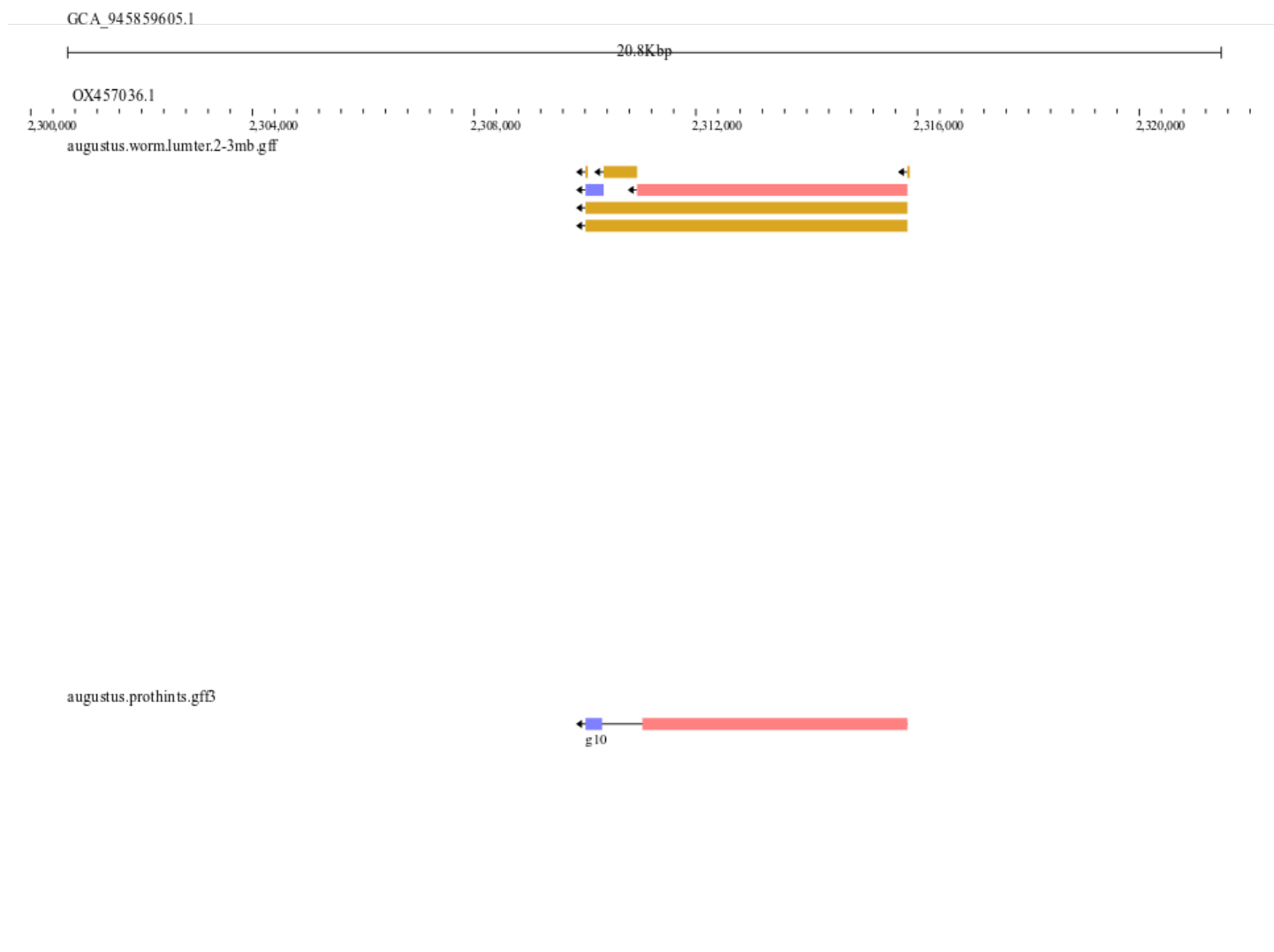


Figure 5: G10.

geen significante overeenkomst gevonden op nucleotide niveau. Bij de proteïne niveau, voor gen10: uncharacterized protein XP\_038057353.1

inzoomen:

<https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g10.svg>



G11

Hier afgebeeld zijn cds, in roze op de bovenste en onderste annotatie, de identiteit van dit gen is onbekend

G12,G13,G14

Genen 12, 13 en 14 hebben een volledige structurele overlap

Ondanks de volledige overlap in genomische structuur, is de identificatie van deze genen onbekend

G13: gb KAG8287034.1 hypothetical protein J6590\_047011

G13 : Pipistrellus nathusii genome assembly, Query\_3407871

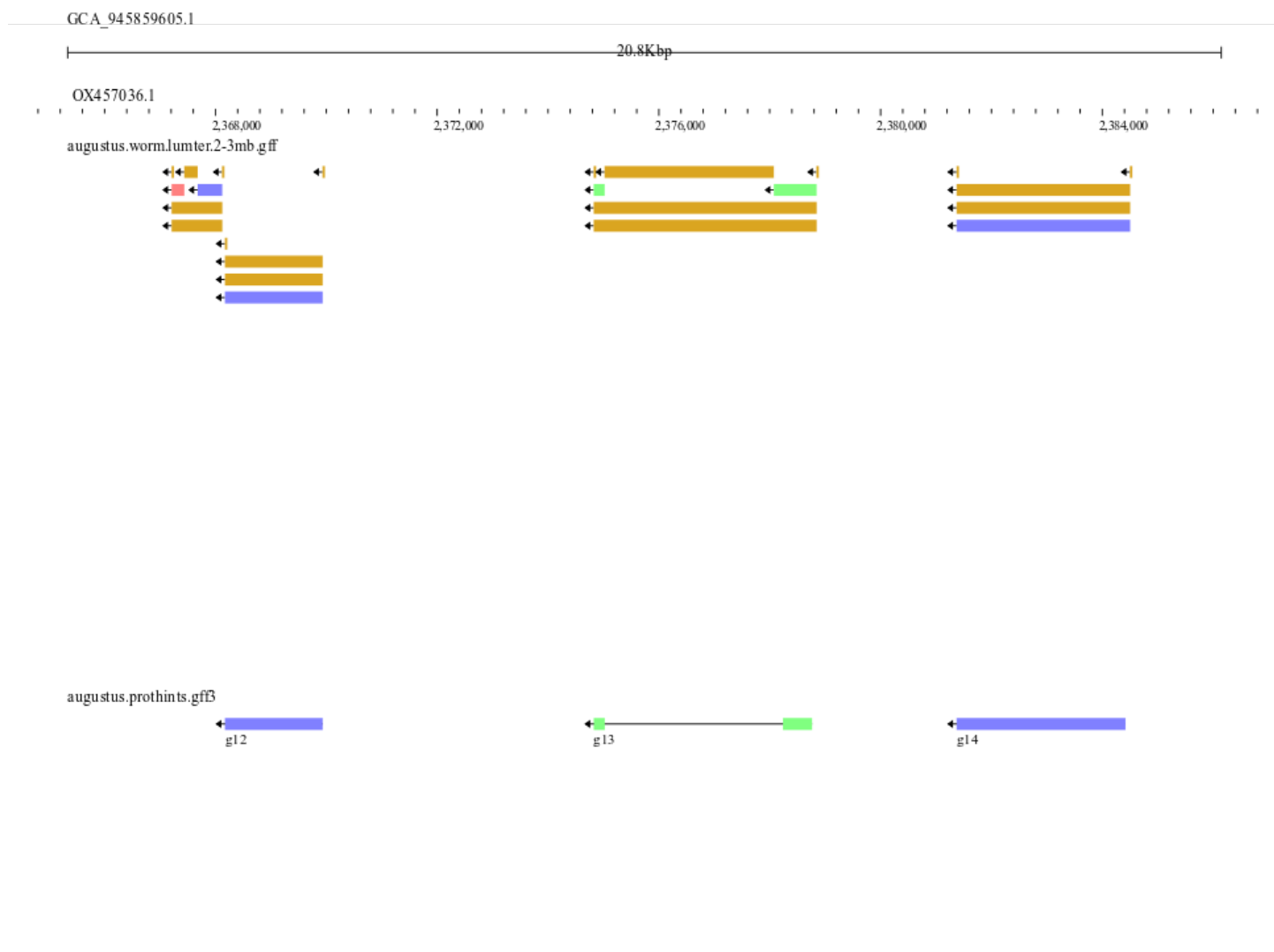


Figure 6: G12G13G14.

G14: hypothetical protein protein emb|VDI23710.1

G14: Argiope bruennichi uncharacterized LOC129975135 XM\_056088086.1

inzoomen

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g12g13g14.svg>

G16: predicted: Gadus chalcogrammus uncharacterized LOC130405754 (LOC130405754), transcript variant X1, mRNA;XM\_056610933.1; OX457036.1:2478928-2483715 G16: hypothetical protein FSP39\_018360

inzoomen:

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g16.svg>

Voor extra zoekopdrachten naar overeenkomsten in de genomische structuur van deze twee pipilinen zijn de extracten van de genomische browser beschikbaar:

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g17g18g19.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g20-g23.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g24g25.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g26.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g27.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g28g29.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g30.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g31.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g32g33.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g34.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g35g36.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g37.svg>

<https://raw.githubusercontent.com/alénagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/g38.svg>

Voor zowel de eiwitlijn als de nucleotidenlijn geldt dat er in 1 megabase ongeveer 30 genen te vinden zijn, wat gelijkstaat aan

1% van het chromosoom. Dit betekent dat er ongeveer 2000-3000 genen op elk chromosoom aanwezig zijn.

## 6.2 Gen-identificatie (nucleotide niveau)

Dit hoofdstuk bespreekt voorspelling op nucleotidenniveau. Alle voorspellingen zijn gebaseerd op een DNA-fragment van 1 mb. De exacte locatie is aangeduid als 2000000-3000000. (2-3 mb) van chromosoom 1. De predictor is toegepast op het eigen lumtermodel (zie, protocol 1, model) dat in deel 1 is ontwikkeld. Alle stappen voor identificatie zijn vastgelegd in prediction.xlsx (map identification-n).

```
augustus --species=lumter lumter.fasta --predictionStart=2000000 --predictionEnd=3000000 --gff3=on
```

Voor het identificeren van genen hebben we de qblast() functie gebruikt uit de Bio.Blast.NCBIWWW module van Biopython. De qblast functie heeft verschillende opties die vergelijkbaar zijn met de parameters die je kunt instellen op de BLAST webpagina. Wij hebben nucleotide blast ("blastn", "nt") gebruikt. Deze functie is bedoeld om nucleotidesequenties te vinden die vergelijkbaar zijn met die van andere organismen, en deze gegevens zijn beschikbaar in de NCBI-database. Hulp voor de qblast functie:

```
from Bio.Blast import NCBIWWW
help(NCBIWWW.qblast)
```

Some useful parameters:

- program            blastn, blastp, blastx, tblastn, or tblastx (lower case)
- database           Which database to search against (e.g. "nr").
- sequence           The sequence to search.
- ncbi\_gi            TRUE/FALSE whether to give 'gi' identifier.
- descriptions       Number of descriptions to show. Def 500.
- alignments        Number of alignments to show. Def 500.
- expect            An expect value cutoff. Def 10.0.
- matrix\_name        Specify an alt. matrix (PAM30, PAM70, BLOSUM80, BLOSUM45).
- filter            "none" turns off filtering. Default no filtering
- format\_type        "HTML", "Text", "ASN.1", or "XML". Def. "XML".
- entrez\_query       Entrez query to limit Blast search



- `hitlist_size`    Number of hits to return. Default 50
- `megablast`        TRUE/FALSE whether to use MEGa BLAST algorithm (blastn only)
- `short_query`      TRUE/FALSE whether to adjust the search parameters for a short query sequence. Note that this will override manually set parameters like word size and e value. Turns off when sequence length is > 30 residues. Default: None.
- `service`          plain, psi, phi, rpsblast, megablast (lower case)

This function does no checking of the validity of the parameters and passes the values to the server as is. More help is available at:

<https://ncbi.github.io/blast-cloud/dev/api.html>

</p>

Eerst hebben we het ruwe GFF-bestand voorbereid voor de Blast API door alle spaties en het '#' symbool te verwijderen.

Om de gencoördinaten te krijgen, maakten we gebruik van een regex-patroon.

```
pattern_a = r'gene.*\s+(OX457036.*AUGUSTUS\sgene.*g\d+)'
```

Voor het ophalen van de coderingssequentie uit het GFF-bestand maakten we gebruik van een andere regex.

```
pattern_b = r"coding sequence =.*[actg\s\]]{1,}."
```

Nadat je het GFF-bestand hebt geparsed, is het klaar voor gebruik met de Blast API. Elke coderingssequentie heeft een unieke identificatie die de start- en eindcoördinaten bevat: genomisch OX457036.1:2000789-2003917

Voor meer details kun je de scripts bekijken, vooral `scripts->parse-nucleotide.py`, deel `identification-n`.

```
head lumbricus/identification-n/predicton/genome.fa.gff
```

```
## bash: cannot set terminal process group (2599859): Inappropriate ioctl for device
```

```
## bash: no job control in this shell
```

```
## >genomic OX457036.1:2000789-2003917
```

```
## atggaggagtctaggccagtcactcccgtcagccttctaggcccccttcttctatggagatattgctcgaggcaatac
```

```
## aaactaatgctaggtccactcatgaagcaatacagactaacgctaagtcttcacaagaggctatgcaagcgcatgctaagtcaactcatgatgctatg
## acttctatacagtcgtctttgcaactgaatgccagagagacgcaagaggcgattgccacggtggagtttaatgtcctggcagtgcaatcaaattgtag
## cgaagctatttcctcagtgcaatcaaattgtaagaggagataagagaagagatctcggctgtaagagataatgtcaggggaagcgctgacggaaatgg
## tatcacgattggaaaggctagaggcgctgccgggtacccaagcctgctgtggattcgaaccctggttacctcacgctattacccctgcgacgcgcca
## taccactcgaccatcggcctgggggaaactttgggtgctaggcctaaagatttcacgcaacctgggtatattcgggagaagtgatagattggctggttag
## gccgccaatttcatatagggagtacggtagtcgaaaagactggccgcctttcctgggttgggattcgaaccagaagtacctcctcctgtcctccct
## ctatctctagagctcgtccacagcagcacgcgggtcccatcaggcgaggatccggaagtggcgactccggggatgccgataggggcgggcgttacaatt
## ggtcccagccagtggggtcaaattagttctagagattttggtgatgataggttagaagaggaaactgactatgctagaacaggcgaaatggcaatttc
```

De blast-query's via Bio.Blast.NCBIWWW.qblast zijn uitgevoerd en de resultaten zijn teruggegeven in XML-formaat (voor meer informatie, zie: `blast.py`).

```
from Bio.Blast import NCBIWWW
from Bio.Blast import NCBIXML

genomic="genome.fa"

sequence_data = open(genomic).read()

sequence_data

result_handle = NCBIWWW.qblast("blastn", "nt", sequence_data, hitlist_size=5, alignments=50)

with open('results.xml', 'w') as save_file:
    blast_results = result_handle.read()
    save_file.write(blast_results)
```

Voor de blast-analyse is het bestand `genome.fa` opgedeeld in drie verschillende fracties, wat resulteerde in 3 xml-bestanden (identificatie->xml). Elke DNA-sequentie die je invoert in nucleotide BLAST krijgt een bepaald aantal hits, en het geeft ook

wat statistieken over die hits.

Een voorbeeld van een hit: .

```
<Iteration_hits>

<Hit>

  <Hit_num>1</Hit_num>

  <Hit_id>gi|11071239|emb|AJ299434.1|</Hit_id>

  <Hit_def>Lumbricus rubellus mt2A gene for metallothionein 2A, exons 1-4</Hit_def>

  <Hit_accession>AJ299434</Hit_accession>

  <Hit_len>7302</Hit_len>

  <Hit_hsps>

    <Hsp>

      <Hsp_num>1</Hsp_num>

      <Hsp_bit-score>85.143</Hsp_bit-score>

      <Hsp_score>93</Hsp_score>

      <Hsp_evalue>7.19655e-12</Hsp_evalue>

      <Hsp_query-from>70</Hsp_query-from>

      <Hsp_query-to>246</Hsp_query-to>

      <Hsp_hit-from>306</Hsp_hit-from>

      <Hsp_hit-to>490</Hsp_hit-to>

      <Hsp_query-frame>1</Hsp_query-frame>

      <Hsp_hit-frame>1</Hsp_hit-frame>

      <Hsp_identity>131</Hsp_identity>

      <Hsp_positive>131</Hsp_positive>

      <Hsp_gaps>8</Hsp_gaps>

      <Hsp_align-len>185</Hsp_align-len>

      <Hsp_qseq>AGATTGAACATCAAACAGGATATAGTTGACAAAGTGCGGAATAGAAGAATGCGATACTTTGGACATGTGA-----CAAGAATGGGGAACGAA
      <Hsp_hseq>AGACTGAATATTCAACATGATATAATACACAAGATCCAAAGTAAACGACTACGCTACTTTGGCCACGTATATATATCCAGAATGAGGGATGAGA
      <Hsp_midline>||| ||| || |||| ||||| | |||| | | | || | || ||||| || || | ||||| || | |

    </Hsp>

  </Hit_hsps>
```

</Hit>

De XML-resultaten van de blast-uitvoer laten zien hoe goed de Alignment overeenkomt, samen met de eval-waarde. De gevonden Hits worden bewaard met het NCBI-referentienummer, zoals “ref XM\_003731435.1”, of het Ensemble-referentienummer, zoals “emb OE003277.1”. Zodra je de XML-resultaten hebt, is de eerste stap om ze te parsen. De XML-resultaten zijn geparsed en gesorteerd op coördinaten en e-waarde (sort-blast-by-coords.py, sort-blast-by-pval.py).

```
import os

cwd = os.getcwd()

print(cwd)

import sys

from Bio.Blast import NCBIXML

OUT = open("sorted_by_coordinates.fraction3.txt", 'w')

OUT.write("Query Name\tQuery Length\tAlignment ID NCBI\teValue\n")

result_handle = open("blast.results.fraction3.xml")

blast_records = NCBIXML.parse(result_handle)

for rec in blast_records:

    for alignment in rec.alignments:

        for hsp in alignment.hsps:

            fields = [rec.query_id, rec.query[:100], str(rec.query_length), alignment.hit_id,

                      alignment.accession, str(hsp.expect)]

            OUT.write("\t".join(fields) + "\n")

OUT.close()

print('Done')
```

```
sorted_by_coordinate <- read_excel("lumbricus/identification-n/prediction.xlsx", sheet = 6 )

sorted_by_p <- read_excel("lumbricus/identification-n/prediction.xlsx", sheet = 5 )

# sorted by coordinates
```

```
head(sorted_by_coordinate )
```

```
## # A tibble: 6 x 6
##   `Query Name` `Query Length` `Alignment ID NCBI` eValue Column1 ` _1`
##   <chr>        <chr>                <dbl> <chr>  <chr>    <dbl>
## 1 Query_1234140 genomic OX457036.1:2~      459 gi|26~ XM_063~ 6.18e-5
## 2 Query_1234140 genomic OX457036.1:2~      459 gi|26~ XM_063~ 3.20e-2
## 3 Query_1234140 genomic OX457036.1:2~      459 gi|26~ XM_062~ 4.75e-1
## 4 Query_1234140 genomic OX457036.1:2~      459 gi|26~ XM_062~ 4.75e-1
## 5 Query_1234140 genomic OX457036.1:2~      459 gi|26~ XM_062~ 4.75e-1
## 6 Query_1234141 genomic OX457036.1:2~      408 gi|28~ OZ0783~ 4.46e-6
```

```
# sorted by p-val
```

```
head(sorted_by_p)
```

```
## # A tibble: 6 x 2
##   Column1 Column2
##   <chr>    <chr>
## 1 <NA>     <NA>
## 2 query:  genomic OX457036.1:2108840-2109808
## 3 match:  gi|2739567124|gb|CP157508.1| Candidozyma auris strain BA03 chromosome~
## 4 query:  genomic OX457036.1:2108840-2109808
## 5 match:  gi|2739567124|gb|CP157508.1| Candidozyma auris strain BA03 chromosome~
## 6 query:  genomic OX457036.1:2108840-2109808
```

Eerst moeten we naar alle voorspellingen kijken, ook naar de voorspellingen met ongunstige eval-waarden (vergelijkbaar met p-waarden). Alle voorspellingen: .

```
all_predictions <- read_excel("lumbricus/identification-n/prediction.xlsx", sheet = 1 )
```

```
all_predictions
```

```
## # A tibble: 89 x 5
```

```
## `OX457036.1:2000789-2003917` AUGUSTUS gene predicted:not satisfac~1 `185403`
## <chr> <chr> <chr> <chr> <chr>
## 1 OX457036.1:2007959-2008723 AUGUSTUS gene predicted:not satisfact~ 1852
## 2 OX457036.1:2039309-2039692 AUGUSTUS gene predicted:not satisfact~ 881419
## 3 OX457036.1:2062296-2062562 AUGUSTUS gene predicted:not satisfact~ 0
## 4 OX457036.1:2087020-2087265 AUGUSTUS gene predicted: Lumbricus ru~ 7.38114~
## 5 OX457036.1:2089471-2089899 AUGUSTUS gene predicted:Lampetra plan~ 8.69409~
## 6 OX457036.1:2090721-2091137 AUGUSTUS gene predicted:not satisfact~ 965729
## 7 OX457036.1:2106048-210639 AUGUSTUS gene predicted:Mus musculus ~ 6.12276~
## 8 OX457036.1:2106538-2106948 AUGUSTUS gene predicted:not satisfact~ 640374
## 9 OX457036.1:2107471-2108487 AUGUSTUS gene predicted:not satisfact~ 3.24628~
## 10 OX457036.1:2108840-2109808 AUGUSTUS gene predicted: Candidozyma ~ 1.27857~
## # i 79 more rows
## # i abbreviated name: 1: `predicted:not satisfactory p-value`
```

In deze fase hadden we voorspellingen( Hits) voor 92 genen op een 1mb chromosoom (tussen 2mb en 3mb), zelfs met enkele genen die niet zo'n goede eval-waarden hadden.

```
colnames(all_predictions ) <- c("id","source","feature", "predicted", "eval")
```

```
all_predictions $eval <- parse_number(all_predictions $eval)
```

```
df.f.pavlue <- all_predictions %>% filter(eval<= 1e-4) %>% filter(eval!=0)
```

```
head(df.f.pavlue)
```

```
## # A tibble: 6 x 5
```

```
## id source feature predicted eval
## <chr> <chr> <chr> <chr> <dbl>
## 1 OX457036.1:2087020-2087265 AUGUSTUS gene predicted: Lumbricus rub~ 7.38e- 7
## 2 OX457036.1:2089471-2089899 AUGUSTUS gene predicted:Lampetra plane~ 8.69e-99
## 3 OX457036.1:2106048-210639 AUGUSTUS gene predicted:Mus musculus c~ 6.12e-10
## 4 OX457036.1:2108840-2109808 AUGUSTUS gene predicted: Candidozyma a~ 1.28e-22
```

```
## 5 OX457036.1:2108840-2109808 AUGUSTUS gene    predictied: Phaeodactylu~ 2.82e-13
```

```
## 6 OX457036.1:2112894-2113442 AUGUSTUS gene    predicted:  Ixodes scapu~ 1.27e-14
```

```
write.table( df.f.pavalue, +  
             "lumbricus/identification-n/prediction/df.filtered.txt",sep="\t")
```

```
predictions <-read.table("lumbricus/identification-n/prediciton/df.filtered.txt")
```

In de daaropvolgende fase hebben we een eval, evaluatiedrempel van 1e-4 ingesteld, wat redelijk mild is. Na het filteren van de voorspellingen met ongunstige eval-waarden, hebben we 32 voorspellingen gevonden die betrekking hebben op 32 genen voor een 1 Mb segment van het eerste chromosoom, wat 1% van het totale chromosoom is. De uiteindelijke voorspelling voor het fragment dat we onderzoeken, is als volgt.

prediction:

```
table7 <- predictions %>% select(V7)  
table7 %>%  
  kable("html") %>%  
  kable_styling(font_size = 7)
```

V7

predicted: Lumbricus rubellus mt2A gene for metallothionein 2A, exons 1-4;AJ299434.1;

predicted:Lampetra planeri genome assembly, chromosome: 62; emb OZ078387.2

predicted:Mus musculus chromosome 8, clone RP23-339I14, complete sequence;AC121136.11

predicted: Candidozyma auris strain BA03 chromosome; 1 eval; CP157508.1

predictied: Phaeodactylum tricornutum CCAP 1055/1 predicted protein partial mRN;XM\_002176960.1

predicted: Ixodes scapularis G-protein coupled receptor dmsr; XM\_029969893.4

predicted :Melanogrammus aeglefinus genome assembly, chromosome: 10; emb OZ180142.1

predicted : Earthworm (L.terrestris) extracellular globin chain c gene, complete cds; gb J05161.1 LUMHBC

predicted:Zymobacter palmae IAM14233 DNA, complete genome;dbj|AP018933.1

predicted: Hylaeus volcanicus uncharacterized LOC128877144 (LOC128877144), transcript variant X5, mRNA;XM\_054124195.1

predicted:Mus musculus BAC clone RP23-95F15 from chromosome 1, complete sequence;AC165443.5

predicted:4\_Tte\_b3v08;emb|OE003277.1

predicted:Earthworm (L.terrestris) extracellular globin chain c gene, complete cds;J05161.1 LUMHBC

predicted: XM\_009033761.1| Helobdella robusta hypothetical protein mRNA

predicted:XM\_069820523.1| PREDICTED: Periplaneta americana carbonic anhydrase beta (CAHbeta), transcript variant X3, mRNA

predidcted:Loxodonta africana zinc finger protein 252-like (LOC100666328), transcript variant X4, mRNA

predicted:gb|KX592814.1| Bos taurus isolate Dominette\_000065F genomic sequence

predicted: gb|J05161.1|LUMHBC Earthworm (L.terrestris) extracellular globin chain c gene, complete cds

predicted:ref|XM\_637462.1| Dictyostelium discoideum AX4 hypothetical protein (DDB\_G0277655) mRNA, complete cds

predicted:Rattus norvegicus uncharacterized LOC134482949 (LOC134482949), ncRNA

Melanogrammus aeglefinus genome assembly, chromosome: 13

predicted:PREDICTED: Portunus trituberculatus putative uncharacterized protein DDB\_G0271982 (LOC123514901), partial mRNA

predicted:emb|LN021320.1| Spirometra erinaceieuropaei genome assembly S\_erinaceieuropaei ,scaffold SPER\_scaffold0020968

predicted: gb|L12688.1|LUMBT Earthworm DNA sequence

prediction:emb|OZ078459.1| Lampetra fluviatilis genome assembly, chromosome: 56

emb|OZ180149.1| Melanogrammus aeglefinus genome assembly, chromosome: 17

predicted: ef|NC\_043824.1|;Passiflora obovata chloroplast, complete genome;gb|MK694931.1|

predicted:ref|XM\_005559078.4;Macaca fascicularis piggyBac transposable element derived 4 (PGBD4), mRNA

predicted:emb|OE179951.1| 2\_Tcm\_b3v08

predicted:emb;BX544872.8;Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-58L12 in linkage group 3, complete sequence

predicted:XM\_023356947.1;Centruroides sculpturatus uncharacterized LOC111615539 (LOC111615539), mRNA

predicted:XM\_066083420.1| PREDICTED: Magallana gigas retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 412 (LOC105343682), mRNA

For more details,see Voor meer informatie, kijk in de map identification-n, prediction.xlsx, sheet “df\_fitlered”.



## 6.3 Visualisatie

## 6.4 GenViz

Voor het voorbereiden van de data kun je de volgende bestanden bekijken: `genviz-features.py`, map visualisatie en GenomeViz.

De genen die zijn gevonden, worden weergegeven in grafieken, met speciale aandacht voor de eerste 2-3 megabases van chromosoom 1 (coördinaten 2000000-3000000).

Om te scrollen door de features, kun je de webversie gebruiken:

<https://alenagrrr3.github.io/2-3mb-terrsetris/>

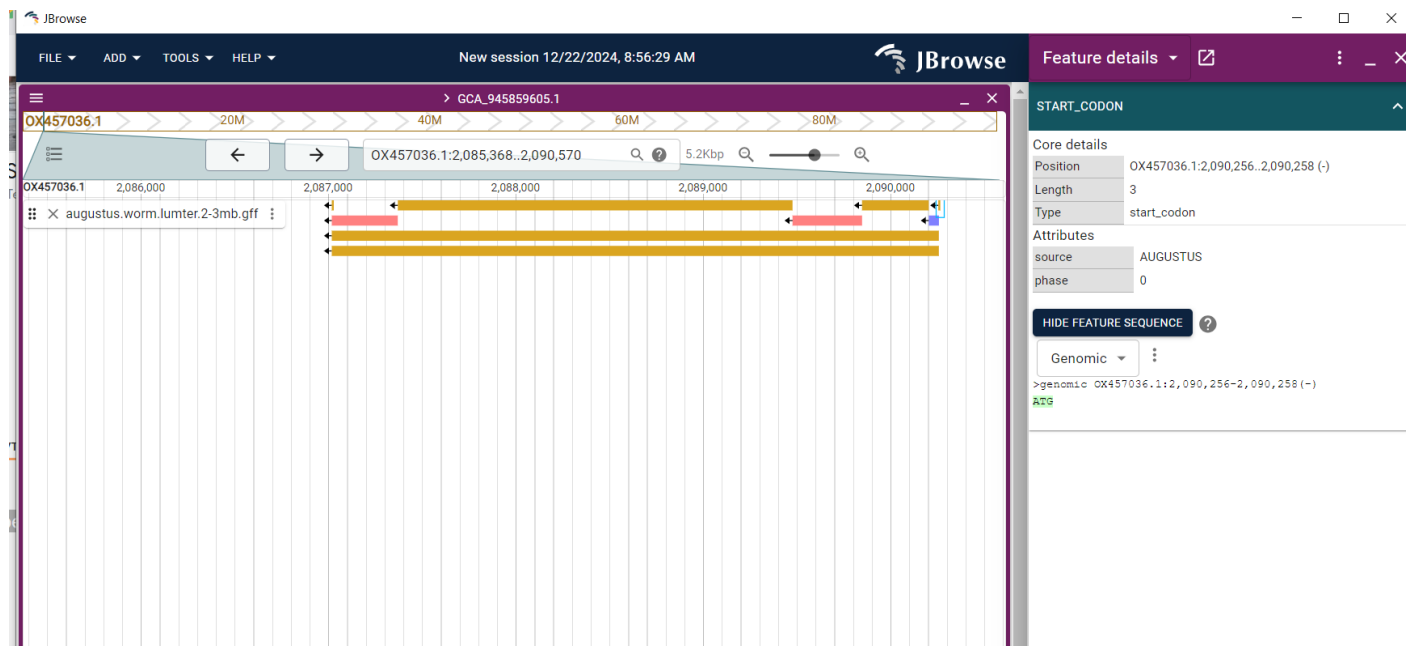
De totale representatie van het chromosoom /OX457036.1.

<https://alenagrrr3.github.io/OX457036.1.html/>

## 6.5 JBrowse

Het gen met de coördinaten OX457036.1:2,087,020 - 2,090,258 is geïdentificeerd als het mt2A-gen voor metallothioneïne 2A van *Lumbricus rubellus*, inclusief exons 1-4; AJ299434.1. is onderzocht in de in Jbrowser (“JBrowse | JBrowse” n.d.)

Gene 5, with intron, Cds, and transcript:



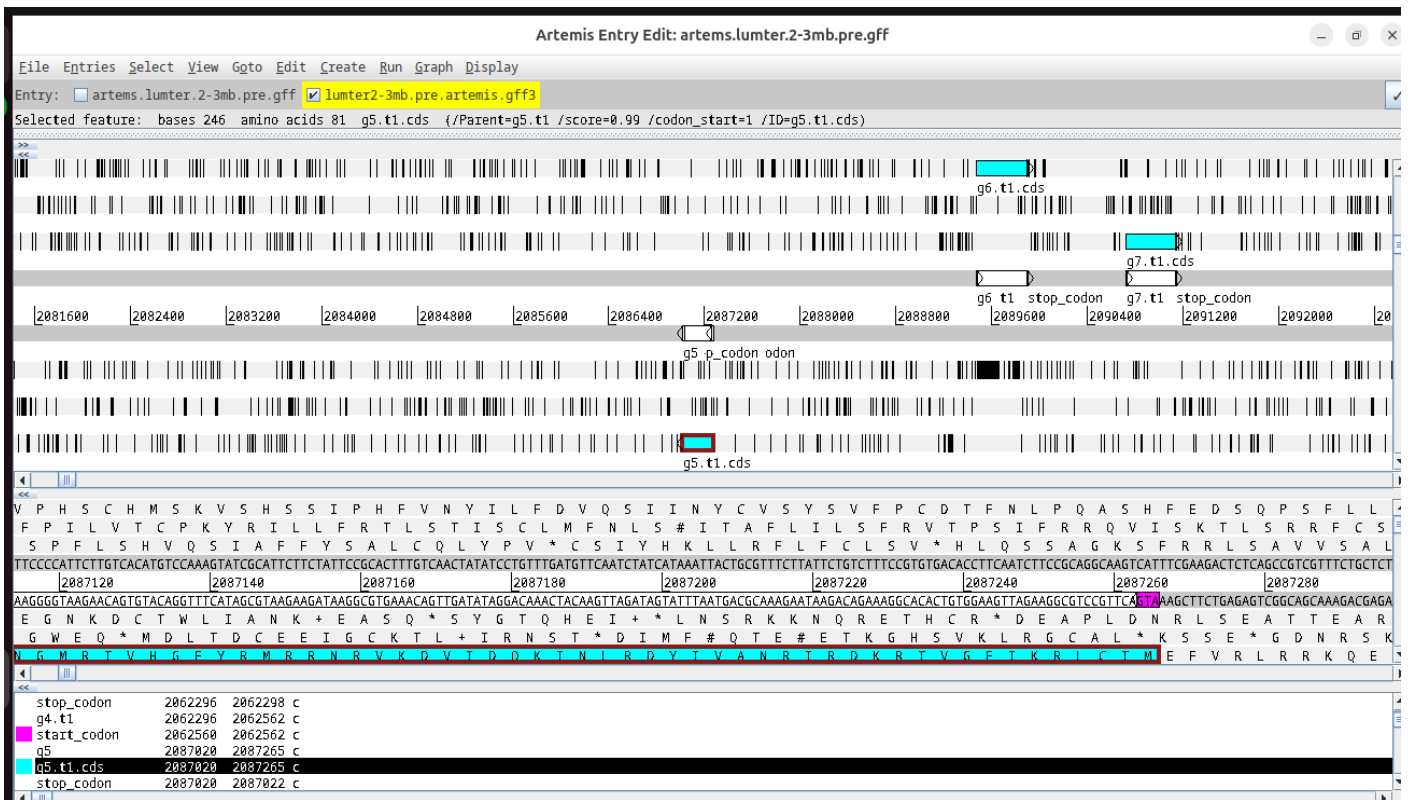
To

zoom in, you can use the link:

<https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/lumterAM182481.1-gene5.svg>

## 6.6 Artemis

gen "g5" (OX457036.1:2,087,020 - 2,090,258 ) in Artemis Browser met startcodon en CDS (minus streng):



To

zoom in, you can use the link:

<https://raw.githubusercontent.com/alenaagrrr3/OX457036.1.html/refs/heads/main/artemis-g5-startcodon.webp>

## 7 Conclusie en Discussie

RNA-Seq supported annotatie.

Het werken met zulke grote genomen is vaak moeilijk vanwege beperkte computermiddelen, zoals rekentijd en de hoeveelheid geheugen die nodig is om genoomgegevens te verwerken. De structurele annotatie van het eerste chromosoom is uitgevoerd met Augustus-pijplijnen op een Linux-systeem met 4 cores, elk met een snelheid van 799.986 MHz. De totale tijd die nodig was 22 dagen, exclusief de tuning van Augustus en ontwikkeling van het model. Dit is ook rekening houdend met het feit dat de RNA-seq alignment drie keer is gedaan met drie verschillende RNA-seq splice-aware aligners, STAR, TopHat and Minimap. Splice-aware aligners houden in dat je niet alleen exons ontvangt, maar ook splice junctions tussen exonen in genregio's als resultaat. Vervolgens worden er intronshints van gemaakt. filterGenemark.pl filtert de genen uit die zijn opgenomen in introns-files. En alleen de genen die niet in introns zitten blijven over. De transcripten van de transcriptoomassemblages van *Lumbricus terrestris* werden als basis gebruikt. 1975 genmodellen voor de chromosoom-1 die ondersteund worden door RNA-Seq alignmenten worden opgeslagen in het bestand `bonafide.gtf` (`protocol1/data_processing/bonafide.gtf`).

Proteïne supported annotatie

Door Uniprot-eiwitten te gebruiken als uitgangspunt, zijn er genen verkregen voor de chromosoom-1 die voor deze eiwitten coderen: Superoxide dismutase, Calmodulin, Protein kinase C2, Myeloid Differentiation primary response protein, Actin, serotonin transporter, Peroxidasin, Extracellular Hemoglobin Linker, Ubiquitin. In het bijzonder zijn de volgende eiwitten van groot belang voor de eukaryote cel.

Superoxide dismutase B9TY04 (“Superoxide Dismutase - Lumbricus Rubellus (Humus Earthworm) | UniProtKB | UniProt” n.d.), is een enzym van de klasse oxidoreductases dat de dismutatie van superoxide in zuurstof en waterstofperoxide katalyseert. Het speelt een cruciale rol in de antioxidantverdediging van vrijwel alle cellen die op de een of andere manier in contact komen met zuurstof.

Calmodulin Q9GRJ1 (“Calmodulin - Lumbricus Rubellus (Humus Earthworm) | UniProtKB | UniProt” n.d.) is een multifunctioneel intermediair calciumbindend proteïne dat tot expressie komt in alle eukaryote cellen. Het is een intracellulair doelwit van de secundaire Ca<sup>2+</sup> boodschapper en Ca<sup>2+</sup>-binding is nodig voor calmoduline-activatie.

Protein kinase C2 Q2I699 (“Protein Kinase C2 - Eisenia Fetida (Red Wiggler Worm) | UniProtKB | UniProt” n.d.) enzym dat eiwitfosforylering uitvoert en zo deelneemt aan celsignaleringscascades.

Myeloid Differentiation primary response protein A0A143Y4B3, (“EaMyD88 - Myeloid Differentiation Primary Response Protein MyD88 - Eisenia Andrei | UniProtKB | UniProt” n.d.), Een adaptoreiwit dat signalen voor Toll-like receptor (TLR)-betrokkenheid door het plasmamembraan stuurt.

Actin P92182 · ACT1\_LUMTE (“ACT1 - Actin-1 - Lumbricus Terrestris (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt” n.d.), een globulair eiwit dat de basis vormt van het cytoskelet van eukaryote cellen en het hoofdbestanddeel is van spiervezels, waar het samenwerkt met myosine om spiersamentrekkingen te produceren.

serotonin transporter (“SERT - High-affinity Serotonin Transporter Protein - Lumbricus Terrestris (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt” n.d.) is een intracellulair eiwit. De serotonine transporter behoort tot de familie van monoamine transporter eiwitten.

Peroxidasin V9GWR0 · V9GWR0\_LUMTE (“Peroxidasin - Lumbricus Terrestris (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt” n.d.) Peroxidasine is een eiwit dat peroxidase en extracellulaire matrixmotieven combineert. Peroxidase katalyseert radioactieve jodering, oxidatie en dityrosinevorming in aanwezigheid van waterstofperoxide. Peroxidazine heeft functies in extracellulaire matrixconsolidatie, fagocytose en afweer. Verhoogde expressie van dit gen wordt waargenomen in de visuele organen, vet en endometrium.

Extracellular hemoglobin linker L4 subunit, (“Extracellular Hemoglobin Linker L4 Subunit - Lumbricus Terrestris (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt” n.d.), hemoglobine is een eiwit in rode bloedcellen dat moleculaire zuurstof transporteert.

In de regenworm *Lumbricus terrestris* vormen de linker subeenheden een kerncomplex met D(6)-symmetrie waaraan 12 hemoglobinedodecameren zich binden om het hele complex te vormen. (Royer et al. 2006)

Ubiquitin P84589 · UBIQ\_LUMTE (“Ubiquitin - Lumbricus Terrestris (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt” n.d.), een klein (8,5 kDa) geconserveerd eukaryotisch eiwit dat betrokken is bij de regulatie van intracellulaire afbraak van andere eiwitten en bij de wijziging van hun functies. Het is aanwezig in bijna alle weefsels van meercellige eukaryoten, evenals in eencellige eukaryotische organismen. Het op ubiquitine gebaseerde signaleringssysteem is betrokken bij de regulering van belangrijke cellulaire processen, waaronder celcyclus, apoptose, reparatie, transcriptie, intracellulaire signaaltransductie, immuunrespons en andere. Een speciale rol van dit systeem is het handhaven van eiwithomeostase in de cel, wat wordt uitgevoerd door gerichte afbraak van defecte of kortlevende intracellulaire eiwitten gelabeld met ubiquitine in een speciale moleculaire machine - proteasoom.

Tijdens het vergelijken van de genomische structuren in de genomic browser, verkregen uit twee verschillende bronnen, de eiwitlijn en de RNA-seq lijn, merkten we dat de meeste structuren overeenkwamen. Toch waren er veel genen die nog niet goed geïdentificeerd waren, of slechts als “ongekarakteriseerd eiwit” of “hypothetisch eiwit” werden gekarakteriseerd. Aangezien er niet veel ondersteunende gegevens zijn voor deze soort, die gebruikt kunnen worden voor genvoorspelling en kwaliteitscontrole, blijven veel genomische structuren onontdekt.

## 8 Bijlage

Map struture:

```
fs::dir_tree("lumbricus")
```

```
## lumbricus
```

```
## +-- DESCRIPTION
```

```
## +-- NAMESPACE
```

```
## +-- bib
```

```
## +-- docs
```

```
## | +-- PVA_Regenwormproject.html
```

```
## | +-- PVA_regenwormproject.Rmd
```

```
## | +-- docs.pdf
```

```

## | \-- pva_feedback.v.1.0_lajsa_alena_merged.docx

## +-- identification-n

## | +-- gff

## | | +-- OX457036.1.gff3

## | | \-- lumter2-3mb.gff3

## | +-- predicton

## | | +-- df.filtered.txt

## | | \-- genome.fa.gff

## | +-- prediction.xlsx

## | +-- scripts

## | | +-- blast.py

## | | +-- parse-nucleotide.py

## | | +-- parse-proteins.py

## | | +-- soort-blast-by-coords.py

## | | \-- sort-blast-by-pval.py

## | \-- xml

## | +-- blast.results.fraction2.xml

## | +-- blast.results.fraction3.xml

## | \-- results.fraction1.xml

## +-- identifictation-p

## | +-- prediction

## | | +-- prediction.xlsx

## | | \-- proteinsdb.fa

## | +-- viz

## | | +-- g10.png

## | | +-- g11.png

## | | +-- g12g13g14.png

## | | +-- g6-7.png

## | | +-- g8g9.png

## | | +-- intersectiong5.png

```

```

## | | \-- intersectiong5.svg
## | \-- xml
## | +-- CDS2000789-2003917.xml
## | +-- CDS2007959-2008723.xml
## | +-- CDS2087020-2087265.xml
## | +-- CDS2108840-2109797CDS2112970-2113319.xml
## | +-- CDS2205956-2206438.xml
## | +-- CDS2212655-2212858.xml
## | +-- CDS2266065-2266586.xml
## | +-- CDS2267178-2267675.xml
## | +-- CDS2310009-2310308CDS-2311036-2315817.xml
## | +-- CDS2347211-2347231CDS2347648-2347833.xml
## | +-- CDS2368170-2369933.xml
## | +-- CDS2374823-2375022CDS2378236-2378761.xml
## | +-- CDS2381370-2384417.xml
## | +-- CDS2414960-2415253CDS2417218-2417280.xml
## | +-- CDS2478928-2483715.xml
## | +-- CDS2564359-2565530CDS2565843-2569281
## | +-- CDS2577242-2577559.xml
## | +-- CDS2579897-2580625.xml
## | +-- CDS2591913-2592509.xml
## | +-- CDS2596779-2597135.xml
## | +-- CDS2597827-2599023CDS2600521-2600871
## | +-- CDS2605011-2605567CDS2606116-2606311.xml
## | +-- CDS2654466-2654759.xml
## | +-- CDS2668036-2669283.xml
## | +-- CDS2753195-2753644.xml
## | +-- CDS2784545-2784997.xml
## | +-- CDS2794556-2795188.xml
## | +-- CDS2825999-2831233.xml

```

```

## |      +-- CDS2845298-2847028.xml

## |      +-- CDS2890565-2891302.xml

## |      +-- CDS2938553-2938625CDS2944301-2944450CDS2944934-2945007CDS2945591-2945668.xml

## |      +-- CDS2961015-2962238.xml

## |      \-- CDS2976735-2976952CDS2979221-2981863CDS2981906-2982863.xml

## +-- lumbricus.Rproj

## +-- protocol1

## |  +-- data_processing

## |  |  +-- GeneMarkES

## |  |  |  +-- genemark.average_gene_length.out

## |  |  |  +-- genemark.f.good.gtf

## |  |  |  +-- genemark.gtf

## |  |  |  \-- hmm.model

## |  |  |      \-- gmhmm.mod

## |  |  +-- TOPHAT

## |  |  |  +-- accepted_hits.bam

## |  |  |  +-- align_summary.txt

## |  |  |  +-- igv

## |  |  |  |  +-- exon-intron.png

## |  |  |  |  +-- exon-introns.svg

## |  |  |  |  +-- exon_ids.bed

## |  |  |  |  +-- exontranscripts.png

## |  |  |  |  +-- igv_snapshot.svg

## |  |  |  |  +-- igv_snapshot_bed_vs_junctions.png

## |  |  |  |  +-- junction_vs_bam_10kb.png

## |  |  |  |  +-- junction_vs_bam_11kb.png

## |  |  |  |  +-- junction_vs_bam_11kb2.png

## |  |  |  |  +-- junction_vs_bam_2.8.bp.png

## |  |  |  |  \-- transcripts_ids.bed

## |  |  |  +-- introns.gff

```



```

## | | | +-- introns_by_gmh_with_gtf.gff
## | | | +-- junctions.bed
## | | | \-- transcripts.gtf
## | | \-- bonafide
## | | +-- bonafide.gb
## | | +-- bonafide.gtf
## | | +-- bonafide.unique.gb
## | | +-- etrain.out
## | | \-- test.out
## | +-- data_raw
## | | +-- masked
## | | | \-- chromosome1.fasta.masked
## | | \-- soft-masked
## | | \-- soft.masked.chromosome1.OX457036.1.fasta
## | +-- model
## | | +-- lumter
## | | | +-- lumter_exon_probs.pbl
## | | | +-- lumter_igenic_probs.pbl
## | | | +-- lumter_intron_probs.pbl
## | | | +-- lumter_metapars.cfg
## | | | +-- lumter_metapars.cgp.cfg
## | | | +-- lumter_metapars.utr.cfg
## | | | +-- lumter_parameters.cfg
## | | | \-- lumter_weightmatrix.txt
## | | \-- wormET0
## | | +-- wormET0_exon_probs.pbl
## | | +-- wormET0_igenic_probs.pbl
## | | +-- wormET0_intron_probs.pbl
## | | +-- wormET0_metapars.cfg
## | | +-- wormET0_metapars.cgp.cfg

```

```

## | |      +-- wormET0_metapars.utr.cfg
## | |      +-- wormET0_parameters.cfg
## | |      \-- wormET0_weightmatrix.txt
## | +-- refs
## | | +-- README.GeneMark-ET
## | | \-- refs
## | +-- scrips
## | | +-- bed_to_gff.pl
## | | +-- filterGenemark.pl
## | | +-- step1.sh
## | | +-- step2.sh
## | | +-- step3.sh
## | | +-- step4.sh
## | | \-- step5.sh
## | \-- test
## |      +-- test.gb
## |      +-- test.out
## |      \-- train.gb
## +-- protocol2
## | +-- data_processing
## | | +-- Bonafid
## | | | +-- bonafide.gb
## | | | +-- bonafide.gtf
## | | | \-- etrain.out
## | | +-- ProtHints
## | | | +-- augustus.hints.prots.orthodb.arthropoda.2-3mb.gff
## | | | +-- extrinsic.cfg
## | | | +-- gth.concat.aln
## | | | +-- prothint.gff
## | | | +-- prothint_augustus.gff

```

```

## | | | +-- run.cfg
## | | | \-- seed_proteins.faa
## | | +-- Redundancy
## | | | +-- bonafide.f.gb
## | | | +-- bonafide.f.gtf
## | | | +-- bonafide.f.nonred.gb
## | | | +-- loci.lst
## | | | +-- nonred.loci.lst
## | | | +-- nonred.lst
## | | | +-- prot.aa
## | | | +-- prot.nr.aa
## | | | \-- traingenex.lst
## | | \-- bad-list
## | | +-- bad.list
## | | +-- bad.pre.list
## | | +-- bonafide.f.nonred.gb
## | | \-- inseq
## | +-- data_raw
## | | \-- transcriptome.refs
## | +-- filter
## | | +-- before.png
## | | +-- bonafide.filtered.nonred.gb
## | | +-- export.hist.on.wormEP
## | | +-- filterGenes.pl
## | | +-- filtered.gb
## | | +-- prot.out.png
## | | \-- test.out
## | +-- model
## | | +-- protsLumter
## | | | +-- protsLumter_exon_probs.pbl

```

```

## | | | +-- protsLumter_igenic_probs.pbl
## | | | +-- protsLumter_intron_probs.pbl
## | | | +-- protsLumter_metapars.cfg
## | | | +-- protsLumter_metapars.cgp.cfg
## | | | +-- protsLumter_metapars.utr.cfg
## | | | +-- protsLumter_parameters.cfg
## | | | \-- protsLumter_weightmatrix.txt
## | | \-- wormNonredEP
## | | +-- wormNonredEP_exon_probs.pbl
## | | +-- wormNonredEP_igenic_probs.pbl
## | | +-- wormNonredEP_intron_probs.pbl
## | | +-- wormNonredEP_metapars.cfg
## | | +-- wormNonredEP_metapars.cgp.cfg
## | | +-- wormNonredEP_metapars.utr.cfg
## | | +-- wormNonredEP_parameters.cfg
## | | \-- wormNonredEP_weightmatrix.txt
## | +-- refs
## | | \-- refs
## | +-- resources
## | | \-- ncbi-blast-2.16.0+
## | | +-- ChangeLog
## | | \-- bin
## | | +-- blast_vdb_cmd
## | | +-- blastn_vdb
## | | +-- blastp
## | | +-- makeprofiledb
## | | \-- rpsblast
## | +-- scripts
## | | +-- bonafide.nonred.f.py
## | | +-- create_train_list.py

```

```

## | | +-- createbonafide.py
## | | +-- locilst.py
## | | +-- nonred.loci.py
## | | +-- step1.sh
## | | +-- step2.sh
## | | \-- step3.sh
## | \-- test
## |     +-- test.gb
## |     +-- test.out
## |     \-- train.gb
## +-- protocol2.2
## | +-- data_processing
## | | +-- GenomeThreader.output.gth
## | | +-- extrinsic.cfg
## | | +-- merged_6393_and_6397.fa
## | | \-- prothint_augustus.gff
## | +-- data_raw
## | | +-- soft.masked.chromosome1.OX457036.1.fasta
## | | +-- uniprotkb_taxonomy_id_6393_2024_12_29.fasta.gz
## | | \-- uniprotkb_taxonomy_id_6397_2024_12_29.fasta.gz
## | +-- gff
## | | \-- augustus.prothints.gff3
## | \-- scripts
## |     +-- blast-p.py
## |     +-- parse-proteins.py
## |     \-- stap1.sh
## \-- visualization
##     +-- GenomeViz
##     | +-- custom_bopython-feature.png
##     | +-- genviz-features.py

```

```

##      |   +-- index.html
##      |   \-- terr.png
##      +-- IGV
##      |   +-- OX457036.1.fasta
##      |   +-- bam
##      |   |   +-- accepted_hits.bam
##      |   |   \-- accepted_hits.bam.bai
##      |   \-- bed
##      |       +-- exon_ids.bed
##      |       \-- tranasctips_ids.bed
##      +-- artemis
##      |   +-- artemis-g5.png
##      |   \-- lumter.artemis.track.gff3
##      \-- jbrowser
##          +-- 2087020.png
##          +-- cds.png
##          +-- intron.png
##          +-- start_codon.png
##          \-- transcript1.png

```

## References

- “ACT1 - Actin-1 - Lumbricus Terrestris (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P92182/entry>.
- “Augustus.” n.d. Bioinformatics Notebook. Accessed November 25, 2024. <https://rnnh.github.io/bioinfo-notebook/docs/augustus.html>.
- “Augustus/Docs/RUNNING-AUGUSTUS.md at Master · Gaius-Augustus/Augustus.” n.d. GitHub. Accessed November 25, 2024. <https://github.com/Gaius-Augustus/Augustus/blob/master/docs/RUNNING-AUGUSTUS.md>.
- Baum, Dr Julia. n.d. “Ever Thought about Earthworms?” African Wildlife Economy Institute. Accessed November 25, 2024. <https://www0.sun.ac.za/awei/articles/ever-thought-about-earthworms>.

- “Bioinformatics and Other Bits - Creating a Local RefSeq Protein Blast Database.” n.d. Accessed November 28, 2024. <https://dmnfarrell.github.io/bioinformatics/local-refseq-db>.
- “Bioinformatics Web Server - University of Greifswald.” n.d. Accessed December 18, 2024. [https://bioinf.uni-greifswald.de/bioinf/partitioned\\_odb11/](https://bioinf.uni-greifswald.de/bioinf/partitioned_odb11/).
- Blaxter, Mark L., David Spurgeon, and Peter Kille. 2023a. “The Genome Sequence of the Common Earthworm, *Lumbricus Terrestris* (Linnaeus, 1758).” *Wellcome Open Research* 8 (October): 500. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.20178.1>.
- . 2023b. “The Genome Sequence of the Common Earthworm, *Lumbricus Terrestris* (Linnaeus, 1758).” *Wellcome Open Research* 8 (October): 500. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.20178.1>.
- Brůna, Tomáš, Katharina J Hoff, Alexandre Lomsadze, Mario Stanke, and Mark Borodovsky. 2021. “BRAKER2: Automatic Eukaryotic Genome Annotation with GeneMark-EP+ and AUGUSTUS Supported by a Protein Database.” *NAR Genomics and Bioinformatics* 3 (1): lqaa108. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa108>.
- Buchfink, Benjamin, Chao Xie, and Daniel H Huson. 2015. “Fast and Sensitive Protein Alignment Using DIAMOND.” *Nature Methods* 12 (1): 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>.
- “Calmodulin - *Lumbricus Rubellus* (Humus Earthworm) | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9GRJ1/entry>.
- [colauttilab.github.io/](https://colauttilab.github.io/). n.d. “De Novo Assembly Tutorial.” Accessed November 30, 2024. <https://colauttilab.github.io/NGS/deNovoTutorial.html>.
- “De Novo Assembly Tutorial.” n.d. Accessed December 29, 2024. <https://colauttilab.github.io/NGS/deNovoTutorial.html>.
- “Download GenomeThreader.” n.d. Accessed January 1, 2025. <https://genomethreader.org/download.html>.
- “EaMyD88 - Myeloid Differentiation Primary Response Protein MyD88 - *Eisenia Andrei* | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A143Y4B3/entry>.
- [ebi.ac.uk](https://www.ebi.ac.uk). n.d. “ENA Browser.” Accessed November 25, 2024. <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB59400>.
- “ENA Browser.” n.d. Accessed December 18, 2024. <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/ERR10851549>.
- Erxleben, Anika, and Björn Grüning. 12:19:56 +0000. “Genome Annotation.” Text. Galaxy Training Network; Galaxy Training Network. 12:19:56 +0000. [https://translated.turbopages.org/proxy\\_u/en-ru.ru.dd5ab9ec-67446c58-5ab2c0cb-74722d776562/https/training.galaxyproject.org/training-material/topics/genome-annotation/tutorials/genome-annotation/tutorial.html](https://translated.turbopages.org/proxy_u/en-ru.ru.dd5ab9ec-67446c58-5ab2c0cb-74722d776562/https/training.galaxyproject.org/training-material/topics/genome-annotation/tutorials/genome-annotation/tutorial.html).
- “Extracellular Hemoglobin Linker L4 Subunit - *Lumbricus Terrestris* (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q2I741/entry>.

“Gaius-Augustus/BRAKER.” (2018) 2024. Gaius-Augustus. <https://github.com/Gaius-Augustus/BRAKER>.

“Gene Cluster Visualizations in R.” n.d. Accessed November 27, 2024. <https://nvelden.github.io/geneviewer/>.

“Genome Annotation / Tutorial List.” 13:32:22 +0000. Text. Galaxy Training Network; Galaxy Training Network. 13:32:22 +0000. <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/genome-annotation/>.

“Genometools/Genomethreader.” (2019a) 2024. GenomeTools. <https://github.com/genometools/genomethreader>.

———. (2019b) 2024. GenomeTools. <https://github.com/genometools/genomethreader>.

“Home · TransDecoder/TransDecoder Wiki.” n.d. Accessed November 28, 2024. <https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki>.

“Hox20 - Eisenia Andrei | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8MWS8/entry>.

“Index of /Genomes.” n.d. Accessed November 28, 2024. <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>.

“Index of /Genomes/MapView.” n.d. Accessed November 28, 2024. <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MapView/>.

“Index of /Releases/Dfam\_3.8/Families/FamDB/.” n.d. Accessed December 18, 2024. [https://www.dfam.org/releases/Dfam\\_3.8/families/FamDB/](https://www.dfam.org/releases/Dfam_3.8/families/FamDB/).

“JBrowse | JBrowse.” n.d. Accessed November 26, 2024. <https://jbrowse.org/jb2/>.

Leung, Maxwell C. K., Phillip L. Williams, Alexandre Benedetto, Catherine Au, Kirsten J. Helmcke, Michael Aschner, and Joel N. Meyer. 2008. “Caenorhabditis Elegans: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology.” *Toxicological Sciences* 106 (1): 5–28. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn121>.

“LumbriBASE.” n.d. Accessed November 30, 2024. [http://xyala2.bio.ed.ac.uk/Lumbribase/lumbribase\\_php/lumbribase.shtml](http://xyala2.bio.ed.ac.uk/Lumbribase/lumbribase_php/lumbribase.shtml).

ncbi.nlm.nih.gov. n.d. “The NCBI Eukaryotic Genome Annotation Pipeline.” Accessed November 25, 2024. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/annotation\\_euk/process/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/annotation_euk/process/).

“Pcs-1a - Glutathione Gamma-Glutamylcysteinyltransferase - Lumbricus Rubellus (Humus Earthworm) | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/V9VGQ0/entry>.

“Peroxidasin - Lumbricus Terrestris (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/V9GWR0/entry>.

Pilato, Giovanni. n.d. “The significance of musculature in the origin of the Annelida.” Accessed November 30, 2024. <http://ouci.dntb.gov.ua/en/works/ldperODl/>.

“Protein Kinase C2 - Eisenia Fetida (Red Wiggler Worm) | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q2I699/entry>.

Royer, William E., Hitesh Sharma, Kristen Strand, James E. Knapp, and Balaji Bhyravbhatla. 2006. “Lumbricus Ery-



throcruorin at 3.5 Å Resolution: Architecture of a Megadalton Respiratory Complex.” *Structure* 14 (7): 1167–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2006.05.011>.

“Sanger-Pathogens/Artemis.” (2009) 2024. Pathogen Informatics, Wellcome Sanger Institute. <https://github.com/sanger-pathogens/Artemis>.

“SERT - High-affinity Serotonin Transporter Protein - Lumbricus Terrestris (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q0G8J7/entry>.

Short, Stephen, Amaia Green Etxabe, Alex Robinson, David Spurgeon, and Peter Kille. 2023. “The Genome Sequence of the Red Compost Earthworm, Lumbricus Rubellus (Hoffmeister, 1843).” *Wellcome Open Research* 8 (August): 354.  
<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.19834.1>.

Stanke, Mario. 2005. “Augustus Online.” Service. Institute for Mathematics and Computer Science, University of Greifswald. February 4, 2005. <https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/submission.php>.

“Superoxide Dismutase - Lumbricus Rubellus (Humus Earthworm) | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/B9TY04/entry>.

“(Taxonomy\_id:6393) in UniProtKB Search (633) | UniProt.” n.d. Accessed January 1, 2025. [https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=%28taxonomy\\_id%3A6393%29](https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=%28taxonomy_id%3A6393%29).

“(Taxonomy\_id:6397) in UniProtKB Search (698) | UniProt.” n.d. Accessed January 1, 2025. [https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=%28taxonomy\\_id%3A6397%29](https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=%28taxonomy_id%3A6397%29).

“The Genome Sequence of the Common ... | Wellcome Open Research.” n.d. Accessed December 19, 2024. <https://wellcomeopenresearch.org/articles/8-500>.

“The NCBI Eukaryotic Genome Annotation Pipeline.” n.d. Accessed December 29, 2024. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/annotation\\_euk/process/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/annotation_euk/process/).

“Ubiquitin - Lumbricus Terrestris (Common Earthworm) | UniProtKB | UniProt.” n.d. Accessed January 2, 2025. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P84589/entry>.

University of Greifswald. n.d. “Bioinformatics Web Server - University of Greifswald.” Accessed December 28, 2024. [https://bioinf.uni-greifswald.de/bioinf/partitioned\\_odb11/](https://bioinf.uni-greifswald.de/bioinf/partitioned_odb11/).

Wang, Ying, Robyn Branicky, Alycia Noë, and Siegfried Hekimi. 2018. “Superoxide Dismutases: Dual Roles in Controlling ROS Damage and Regulating ROS Signaling.” *Journal of Cell Biology* 217 (6): 1915–28. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>.