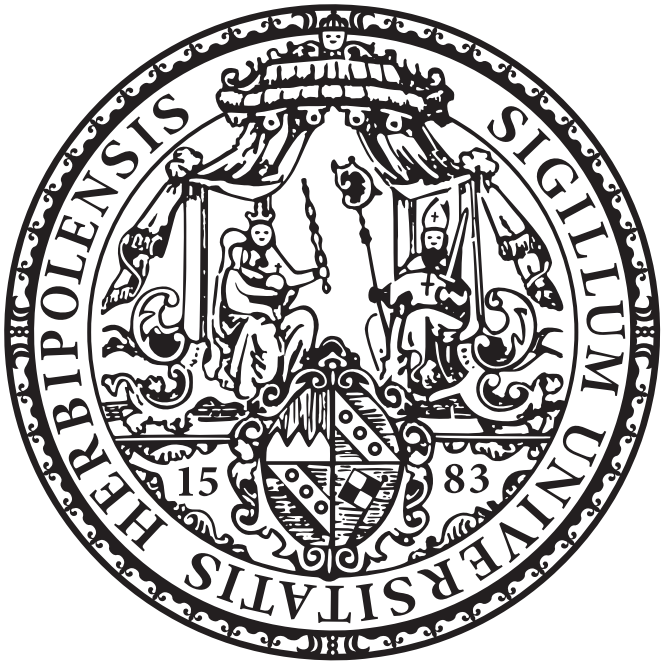
Master Thesis
Seperating the good from the bad... Exploring the genomic landscape of chloroplasts from genomic sequencing data

Simon Pfaff



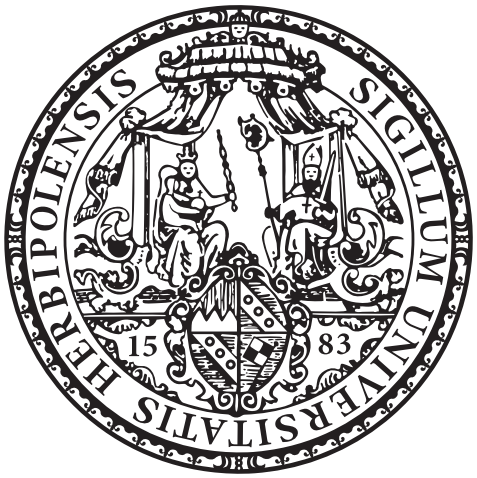
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Fakultät für Biologie

Master Thesis

Simon Pfaff

8. August 2018

Seperating the good from the bad... Exploring the genomic landscape of chloroplasts from genomic sequencing data



Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Betreuer: Dr. Markus Ankenbrand
Betreuer: Prof. Dr. Jörg Schulz
Betreuer: Dr. Frank Förster
Lehrstuhl für Bioinformatik
Center for Computational and Theoretical Biology

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung / Abstract

1.1 Deutsch

In der heutigen Big Data Ära werden immer mehr neue Daten erzeugt. Doch können auch bereits vorhandene Daten durchaus noch Informationen enthalten, welche bisher ungenutzt sind. Dank der Open Science sind viele dieser Daten frei verfügbar. In diesem konkreten Falle werden verschiedene Programme verwendet um in pflanzlichen Genomdaten, Chloroplastengenome zu suchen. Chloroplasten haben ihre eigene zirkuläre DNA, und wenn beim Sequenzieren diese nicht gefiltert wurde, dann ist sie noch in den Daten vorhanden. So kann man, ohne eine neue Sequenzierung machen zu müssen, Chloroplasten DNA für Analysen erhalten. Es wurden verschiedene Programme getestet und verglichen, um so viele Chloroplasten wie nur möglich zu bauen und damit Analysen durchzuführen. Es wurde eine vollautomatische Pipeline erstellt, mit der Chloroplastengenome einfach aus Pflanzengenomen extrahiert werden können.

1.2 Englisch

In todays' Big Data era, new data is created every day. However, this is not necessary to get new information. Older data often times hides other data, which may not have been used yet. Since Open Science has been growing in the past years, much of this data is freely accessible. In this case, whole genome plant data is used. This data often times includes chloroplast genome data, if in the sequencing process nobody removed it, by cell nucleus extraction. There were different tools which provided a suit to extract this chloroplast genome data from plant genome data. They were tested, compared and the best were used to calculate a lot of chloroplast genomes. These chloroplast genomes were analysed with different methods. Also there is now a fully automatic pipeline for chloroplast genome extraction from genomic sequencing data.

2 Einleitung

2.1 Chloroplasten

Chloroplasten sind extrem wichtig. Ein Großteil der Pflanzen, vor allem grün Pflanzen besitzen diese und nutzen um Energie durch Photosynthese zu erzeugen[1]. Ihr Genom gilt als hoch konserviert, sowohl in der Orientierung ihrer Gene als auch dem Inhalt dieser[2]. Das Chloroplastengenom enthält zwischen 100 und 200 Gene[3]. Die DNA des Chloroplasten hat in etwa eine Konturlänge von 30 bis 60 Mikrometer und besitzt eine Masse von ungefähr 80 - 130 Millionen Daltons[4]. Chloroplasten zeigen eine auffällige Genomstruktur. Das Genom ist ein Plasmid, welches sich in drei Teile aufteilt: Den Large Single Copy, den Small Single Copy, welche beide durch zwei Inverted Repeats unterbrochen sind (Abb. 1)[5]. Chloroplasten zeigen eine viel geringere Substitutionsrate als in genomischer DNA, diese ist noch einmal signifikant geringer in den Inverted Repeat Regionen [6]. Dennoch zeigen sich Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNPs)[7]. Zudem gibt es in seltenen Fällen eine Genwanderung von Genen auf dem IR zum SSC, wodurch ein IR weg-fallen kann, sodass solche Chloroplasten nur noch ein IR besitzen [8] . Vor allem in gezüchteten Nutzpflanzen finden sich auch Invertierungen des IR [9]. Durch ihre hohe Konservierung sind Chloroplasten und ihre Gene sehr gut für Barcoding geeignet[10]. Mit diesem Barcoding können Pflanzen und ihre Varianten identifiziert werden. Neue Studien zeigen, dass der komplette Chloroplast selbst als eine Art Ültra-barcode"verwendet werden könnte, da die Variation in Chloroplasten in einer Spezies doch mehr variiert als angenommen [11]. Die Gene auf einem Chloroplasten lassen sich in verschiedene Klassen einteilen (Abb.

[1] Purves Biologie, Sadava D, Hillis D.M, Heller H.C, Berenbaum M.R, (9. Auflage S. 14)

[2] Raubeson L, Jansen R. (2005). Chloroplast genomes of plants, Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants. Diversity and Evolution of Plants-Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants. 3. 10.1079/9780851999043.0045.

[3] Howe CJ. (2016). Chloroplast Genome. In eLS, John Wiley & Sons, 10.1002/9780470015902.a0002016.pub3

[4] Burgess, Jeremy (1989). An introduction to plant cell development. Cambridge: Cambridge university press. S. 62. ISBN 0-521-31611-1.

[5] Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, et al. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. American Journal of Botany. 10.3732/ajb.94.3.275.

[6] Wolfe KH, Li WH, Sharp PM. (1988). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNA. Proc Natl Acad Sci USA 10.1073/pnas.84.24.9054.

[7] 1001 Genomes Consortium, (2016) 1,135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. Cell. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.063

[8] Jansen RK, Wojciechowski MF, Sanniyasi E, et al. Complete plastid genome sequence of the chickpea (*Cicer arietinum*) and the phylogenetic distribution of rps12 and clpP intron losses among legumes (Leguminosae). Molecular phylogenetics and evolution. 10.1016/j.ympev.2008.06.013.

[9] Palmer JD, Jansen RK, Michaels HJ, et al. (1988). Chloroplast DNA Variation and Plant Phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden, 10.2307/2399279

[10] Song Y, Wang S, Ding Y, et al. (2017) Chloroplast genomic resource of Paris for species discrimination. Sci. Rep. 10.1038/s41598-017-02083-7

[11] Kane N, Sveinsson S, Dempewolf H, et al.(2012), Ultra-barcoding in cacao (Theobroma spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA. American Journal of Botany, 10.3732/ajb.1100570

2). Zunächst gibt es die Gene welche für die Photosynthese wichtig sind. Hier unterteilt man noch einmal in Photosystem I (*aA*, *psaB*, etc.), Photosystem II (*psbA*, *psbB*, etc.), Cytochrome b6f (*petA*, *petB*, etc.), ATP Synthese (*atpA*, *atpB*, etc.), RuBisCo(*rbcL*) und NAD(P)H dehydrogenase Gene(*ndhA*, *ndhB*, etc.)[12]. Die zweite Klasse beinhaltet Gene, welche für den genetischen Apparat, also Transkription, Translation und Replikation nötig sind, sowie RNA Gene. Hierzu zählen Transfer RNA (*trnH*, *trnK*, etc.), ribosomale RNA (*rrn16*, *rrn5*, etc.), RNA Polymerasen (*rpoA*, *rpoB*, etc.) und ribosomale Gene (*rps2*, *rps3*, *rpl2*, *rpl16*, etc.). Die dritte und letzte Kategorie beschreibt Gene welche konservierte Open Reading Frames (ORFs) haben und ycfs (*Hypothetical chloroplast open reading frames*) genannt werden, sowie potentiell kodierende Gene wie *matK* und *cemA* [12]. Vor allem stark konservierte Gene wie rbcL und matK und cemA werden häufig für Barcoding oder zum Berechnen von phylogenetischen Bäumen verwendet.

2.2 Big Data

Die Big Data Ära zeichnet sich vor allem durch die Flut an Daten aus, welche kaum noch zu bewältigen ist. Im biologischen Sinne zeichnet sich diese Flut an Daten vor allem durch genomische Daten aus. Durch sogenannte Hochdurchsatz-Methoden in modernen Sequenzierungstechnologien, wie PacBio[13] oder Illumina[14] sie verwenden, können sehr viele genomische Daten in kurzer Zeit für vergleichsweise wenig Geld erzeugt werden. Um dieser Daten Herr zu werden sind vor allem Programme, die diese Daten auswerten, wichtig. Die Anforderungen an diese Programme sind unter anderem eine hohe Geschwindigkeit und vor allem eine hohe Automatisierbarkeit. Um solche Programme zu entwickeln, sind vor allem Kenntnisse in Informatik und in Biologie notwendig. Kenntnisse in Informatik werden benötigt um Programme sinnvoll zu strukturieren und diese anschließend in einer geeigneten Programmiersprache zu erstellen. Zudem müssen diese Programme immer wieder gewartet werden. Auch könnten neue Features eingebaut werden oder das Programm nochmals optimiert werden. Kenntnisse in der Biologie werden benötigt um biologische Fragestellungen sowie Sachverhalte zu verstehen. Diese müssen korrekt in das Programm implementiert werden, zudem müssen natürlich alle Ergebnisse korrekt interpretiert werden. Nur mit Kenntnissen in beiden Fächern, können Programme welche in der Biologie und Bioinformatik verwendet werden, effektiv erstellt und gewartet werden.

2.3 Open Science

Mit der Flut der ansteigenden Daten wächst in den letzten Jahren auch immer mehr die Akzeptanz gegnüber Öpen Science". Öpen Science"bezeichnet eine Bewegung welche fordert, dass Wissenschaft und alles was dazugehört, wie Daten, Programme, Ergebnisse öffentlich und für jedermann zugänglich sein soll. Befürworter dieser Bewegung argu-

[12] Ravi V, Khurana JP, Tyagi AK, et al. (2007). An update on chloroplast genome. Plant Systematics and Evolution. 10.1007/s00606-007-0608-0.
[13] https://www.pacb.com/
[14] https://www.illumina.com/

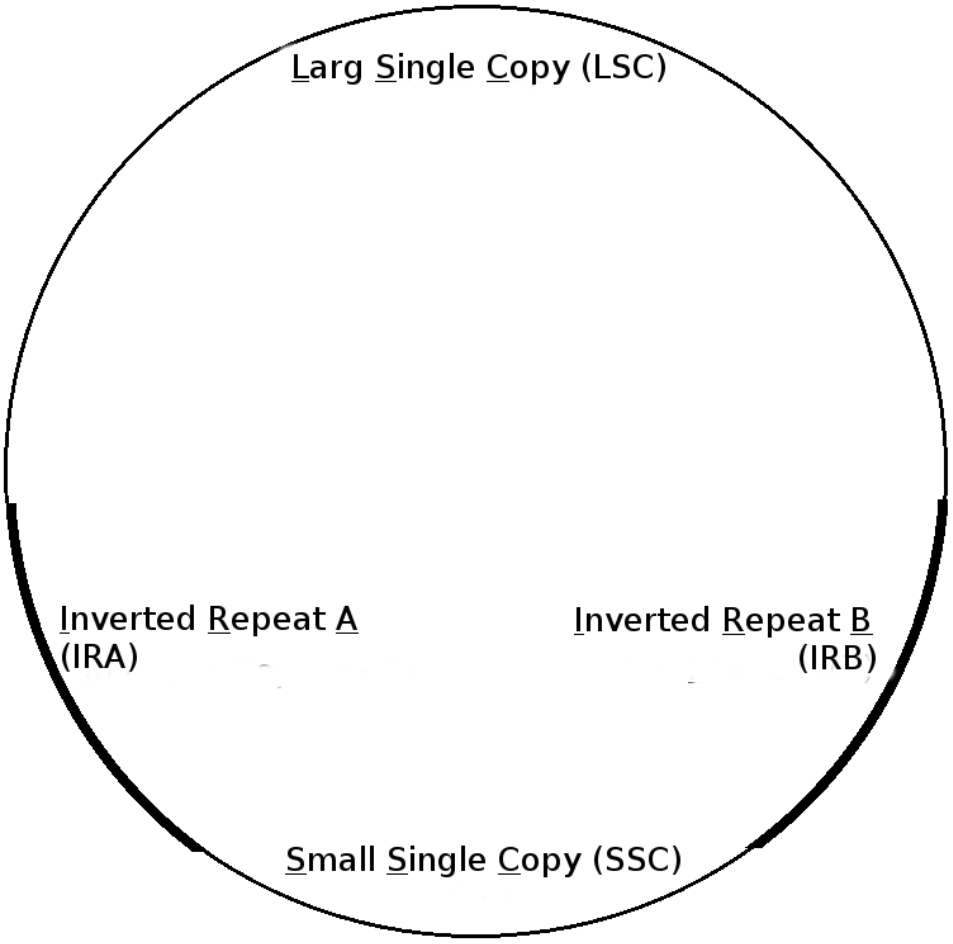


Abbildung 1: **Chloroplastgenom Einteilung** Der Chloroplast ist unterteilt in Large Single Copy, Small Single Copy und Inverted Repeat, diese unterteilen sich noch einmal in IRA und IRB. LSC und SSC werden jeweils von den IRs unterbrochen.

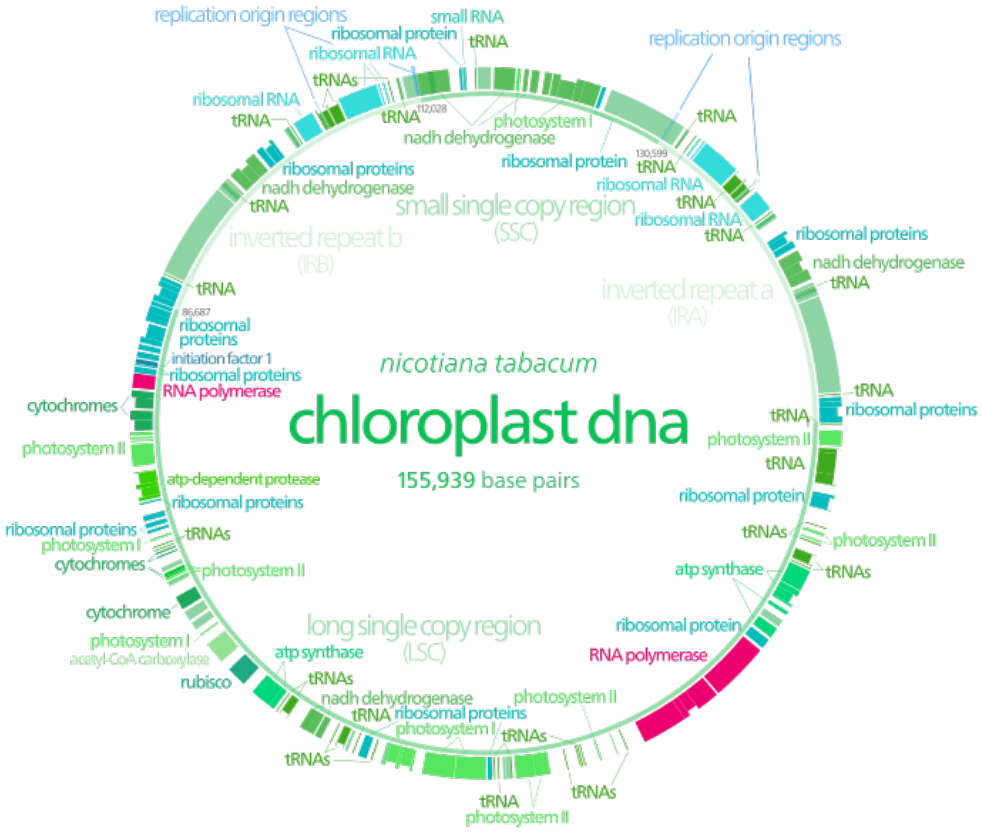


Abbildung 2: **Chloroplastgenom: Einteilung Genklassen** Das Chloroplastgenom der Tabakpflanze, die innere Beschriftung zeigt den - Strand, die äußere den + Strand der DNA. Die Kerben visualisieren Introns. Wikipedia unter Wikimedia Commons Lizenz`https://en.wikipedia.org/wiki/File:CtDNA.svg`

mentieren damit, dass Wissen für jedermann zugänglich sein sollte, und nicht nur für Ausgewählte oder gar gegen Bezahlung. So steigere sich unter anderem die Akzeptanz der Wissenschaft als auch deren Glaubwürdigkeit, da die Ergebnisse von jedem nachvollziehbar veröffentlicht werden müssen, mit allen Rohdaten und Vorgehensweisen. Dies sei der eigentliche Gedanke hinter der Wissenschaft, sie solle jedem zugänglich sein. Diese Bewegung findet vor allem bei jungen Wissenschaftlern aber auch bei älteren immer mehr Anklang. Mittlerweile gibt es mehrere Lizenzmodelle die unter Open Science laufen. Diese regeln, wie die Daten verwendet werden dürfen oder müssen. Dies reicht vom Freigeben der Daten und jeglichem Verwendungszweck bis hin zum Zwang, dass alles was mit diesen Daten oder auch Programmen veröffentlicht wird wieder unter der gleichen Open Source Lizenz zu publizieren ist. Alle hier verwendeten Programme und Daten sind unter Open Source Lizenzen veröffentlicht, sonst wäre diese Arbeit gar nicht möglich. Deswegen werden alle Ergebnisse wiederum öffentlich verwendbar sein. Open Science sollte keine Bewegung sein, sondern einfach nur "goodSScience.[15]

2.4 Daten in Daten

Bei den heutzutage geringen Kosten, Daten, vor allem genomische Daten zu erzeugen, ist es nicht verwunderlich dass immer neue Daten generiert werden. Dennoch steckt in bereits erhobenen Daten meist mehr Information als zunächst verwendet. In genomischen Daten, zum Beispiel, finden sich meistens Daten von Organellen, wie Mitochondrien oder Chloroplasten, welche ihre eigene DNA besitzen. Diese sind dort zu finden, da vor einer Sequenzierung häufig keine Kernextraktion durchgeführt wird, da diese mehr Zeit und Geld kosten würde. Diese Organellen DNA können mit bestimmten Programmen gefiltert werden, hierfür wurde unter anderem der chloroExtractor[16, 17] programmiert. Dieser kann in genomischen Pflanzendaten, Chloroplasten-DNA finden und diese verwenden um einen vollständigen Chloroplasten zu bauen. Hiermit müssen somit keine neuen Sequenzierungen für Chloroplasten mehr durchgeführt werden, wenn man an Chloroplasten forschen möchte.

2.5 Bestehende Programme und ihre Ansätze

Es gibt verschiedene Ansätze, um Chloroplastengenome bzw. ihre DNA aus genomischen Pflanzendaten zu extrahieren. Die wohl einfachste Möglichkeit ist ein referenzbasiertes Mappen der Daten auf einen Referenzchloroplasten. Hierzu muss lediglich ein nah verwandter Chloroplast als Referenz benutzt werden. So können die Reads, welche auf diese Referenz passen, genommen werden und assembliert werden, mit der gleichen Referenz. Dies funktioniert allerdings nur wenn man eine passende Referenz benutzt, diese sollte von der gleichen Spezies oder zumindest einer nah verwandten Spezies stammen. Ein anderer

[15] Watson M. (2015) When will 'open science' become simply 'science'?, Genome Biology `https://doi.org/10.1186/s13059-015-0669-2`

[16] Ankenbrand MJ, Pfaff S, Förster F, et al., (2018). chloroExtractor: extraction and assembly of the chloroplast genome from whole genome shotgun data. Journal of Open Source Software, `https://doi.org/10.21105/joss.00464`

[17] `https://github.com/chloroExtractorTeam/chloroExtractor`

Ansatz besteht darin, den Chloroplasten de novo zu assemblieren, also ohne Referenz. Um diesen Ansatz zu benutzen, müssen aber zunächst die Reads mit Chloroplastengenom aus den Daten gezogen werden. Hier gibt es wiederum verschiedene Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist es, die Reads gegen eine Datenbank von Chloroplastengenen zu blasten. Hierzu muss entweder eine Datenbank von Chloroplasten Genen gestellt werden oder der Benutzer muss eine Pseudo-Referenz einen sogenannten Seed angeben. Ein Seed, was von einigen Basenpaaren bis zu einem kompletten Chloroplasten reichen kann, kann auch eingesetzt werden, um durch ein reines Mapping Reads zu finden. Bei kleinen Seeds wird dieser häufig durch gefundene Reads erweitert und eine Liste von Seeds erstellt. Auch hier muss aber sichergestellt werden, dass der Seed in den Chloroplastendaten vorhanden ist. Von diesen Methoden gibt es auch Abwandlungen, wie z.B. das Scannen der Daten durch Kmere. Hier werden die Daten in verschiedene Kmere zerteilt, durch plotten dieser Kmere können an spezifischen Stellen überrepräsentierte Kmere gefunden werden. Diese überrepräsentierten Kmer spiegeln häufig Plastome wieder. Diese sind unter anderem Chloroplasten, aber auch Mitochondrien. Sie besitzen ihre eigene DNA und kommen im Schnitt häufiger vor als DNA welche im Zellkern zu finden ist. Allerdings gibt es weitaus mehr DNA welche durch häufiges vorkommen überrepräsentiert ist in einem Kmer Plot. Hierzu gehören rRNA Gene, Transposons und andere genomische Repeats, welche je nach Art und Spezies variieren kann. Da der chloroExtractor einen Kmer basierten Ansatz benutzt ist ein solches idealisiertes Kmer Diagramm in dessen Logo zu finden(Abb 3). Abgesehen von den Ansätzen der Programme gibt es zwei verschiedene Arten von Programmen per se. Die einen benutzen bereits vorhandene Programme wie Assembler, Mapper oder Kmer-counter. Diese bauen eine Pipeline um die Programme, sodass diese in der richtigen Reihenfolge mit den richtigen Parametern mit nur einem Befehl gesteuert werden können. Der Vorteil ist: solche Programme sind einfacher zu warten, da sie meist kleiner sind als Programme die dies nicht tun und einfacher zu programmieren. Allerdings sind sie von diesen Drittanbieterprogrammen abhängig und es können Probleme auftreten wenn diese Änderungen bzw. Updates ausgeben, weswegen meist die kompatiblen Versionen angegeben werden. Ein weiterer Nachteil: Der Benutzer muss häufig weitere Programme, sogenannte Abhängigkeiten, installieren bevor er das eigentliche Programm nutzen kann. Die andere Möglichkeit ist es, die komplette Maschinerie selbst zu programmieren, dies ist sehr aufwendig und bedeutet viel Wartungsarbeit. Vorteil hier ist, dass keine anderen Abhängigkeiten benötigt werden außer ein System, welches das Programm verwenden kann. In dieser Arbeit wurden verschiedene Typen von Programmen verwendet. Es wurden von allen Programmen die jeweils neusten Versionen benutzt, und wenn es zu großen Änderungen wie Bugfixes kam auf die neuere Version gewechselt, um das bestmögliche Ergebnis für die Daten zu erhalten. Alle Programme wurden in Dockercontainer mit Singularity [18] verwendet. Zudem wird auf allen Servern ein Workload Manager namens SLURM [19] verwendet.

[18] `https://singularity.lbl.gov/`
[19] `https://www.schedmd.com/`

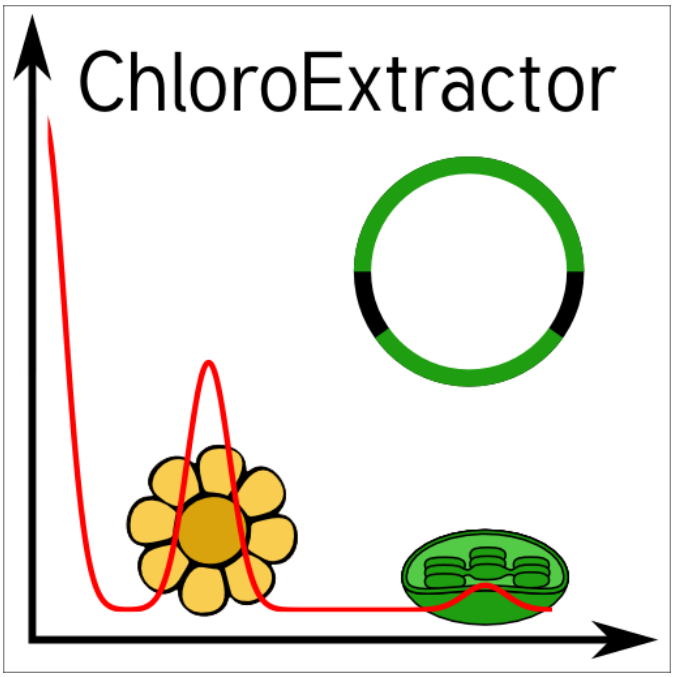


Abbildung 3: **chloroExtractor Logo** Das Logo des chloroExtractors zeigt die Verteilung der Genomischen Daten in einem idealisierten Kmer Plot. Der erste Peak zeigt die Kmere des Pflanzengenoms, der zweite kleinere Peak zeigt die Kmere mit Chloroplastengenom.

2.5.1 chloroExtractor

Der chloroExtractor [16, 17] ist ein Programm welches durch eine Kombination aus Kmer Analyse und Mapping auf bekannte Chloroplastengene, Reads von Chloroplasten aus pflanzlichen Sequenzierungsdaten extrahiert. Es wurde 2018 vom chloroExtractor-Team veröffentlicht [16] und besteht hauptsächlich aus Perl und R Code. Es verwendet ein Pipeline-Programm (PipeWrap.pm[20]) um den richtigen Ablauf zu steuern. Dieses Pipeline-Tool wird durch eine Konfigurationsdatei gesteuert, sodass ein Benutzer einfach neue Schritte einfügen könnte. Auch können hiermit einfach über eine Datei Parameter gesteuert werden, welche dann in allen verwendeten Programmen gleich sind. Es könnte so auch einzelnen Programmen spezieller Input mitgegeben werden. Auch verfügt der chloroExtractor dank PipeWrap über ein Checkpoint System. Bricht der Ablauf des Programms ab, kann er an genau diesem Punkt wieder gestartet werden ohne das Programm von Neuem starten zu müssen. Zunächst verwendet der chloroExtractor Bowtie2 [21] um die Reads auf eine Referenz aus codierenden Chloroplastengene zu mappen. Hierdurch wird der relative Anteil an Chloroplasten Reads in den Daten geschätzt. Durch ein R Skript wird der Datensatz auf 200-fache Chloroplasten-Reads Coverage skaliert. Anschließend wird iterativ durch Jellyfish [22] Kmere erzeugt und jene mit zu niedriger Coverage aussortiert. Die Reads der Kmere, die im richtigen Coverage-Bereich liegen werden anschließend mit SPAdes[23] assembliert. SPAdes arbeitet de novo und benötigt keine Referenz. SPAdes verwendet eine De Brujin-Graphen Methode, um die Reads richtig zusammenzufügen. Diese werden dann durch ein Perl Skript (fcg.pl) zu einem zirkulären Chloroplasten zusammengebaut. Dieses Skript überprüft gleichzeitig mit BLAST+[24], ob es sich bei den ausgegebenen Reads wirklich um Chloroplasten handelt (Abb. 4). Falls es dazu kommt, dass SPAdes den Chloroplasten nicht komplett zusammenbauen kann, gibt das fcg.pl Skript die Contigs, welche für den Chloroplasten verwendet werden würden, aus. Hier gibt es verschiedene Fälle. Kann nur die Zirkularität des Chloroplasten nicht aufgelöst werden gibt der chloroExtractor LSC, SSC und IR aus. Sind gar keine Verbindungen der Contigs möglich gibt das fcg.pl Skript jene Contigs aus, die einen BLAST+ Treffer besitzen und somit ein Teil des Chloroplasten sind.

2.5.2 fast-plast

Fast-plast [25] ist ein weiteres Programm, welches verwendet wird um Chloroplasten-DNA zu finden. Es ist in Perl und in C++ programmiert und verwendet auch SPAdes, und Bowtie2[21]. Auch hier wird BLAST+[24] verwendet, um die richtigen Reads zu finden.

[20] `https://github.com/BioInf-Wuerzburg/perl5lib-PipeWrap`

[21] Langmead B, Salzberg S. (2012), Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods, `9: 357-359.`

[22] Marcais G, Kingsford C.(2011), A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. Bioinformatics `10.1093/bioinformatics/btr011`

[23] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. (2012), SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing, Journal of Computational Biology, `10.1089/cmb.2012.0021`

[24] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. (2009), Selecting control genes for RT-QPCR using public microarray data, BMC Bioinformatics `https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-42`

[25] `https://github.com/mrmckain/Fast-Plast`

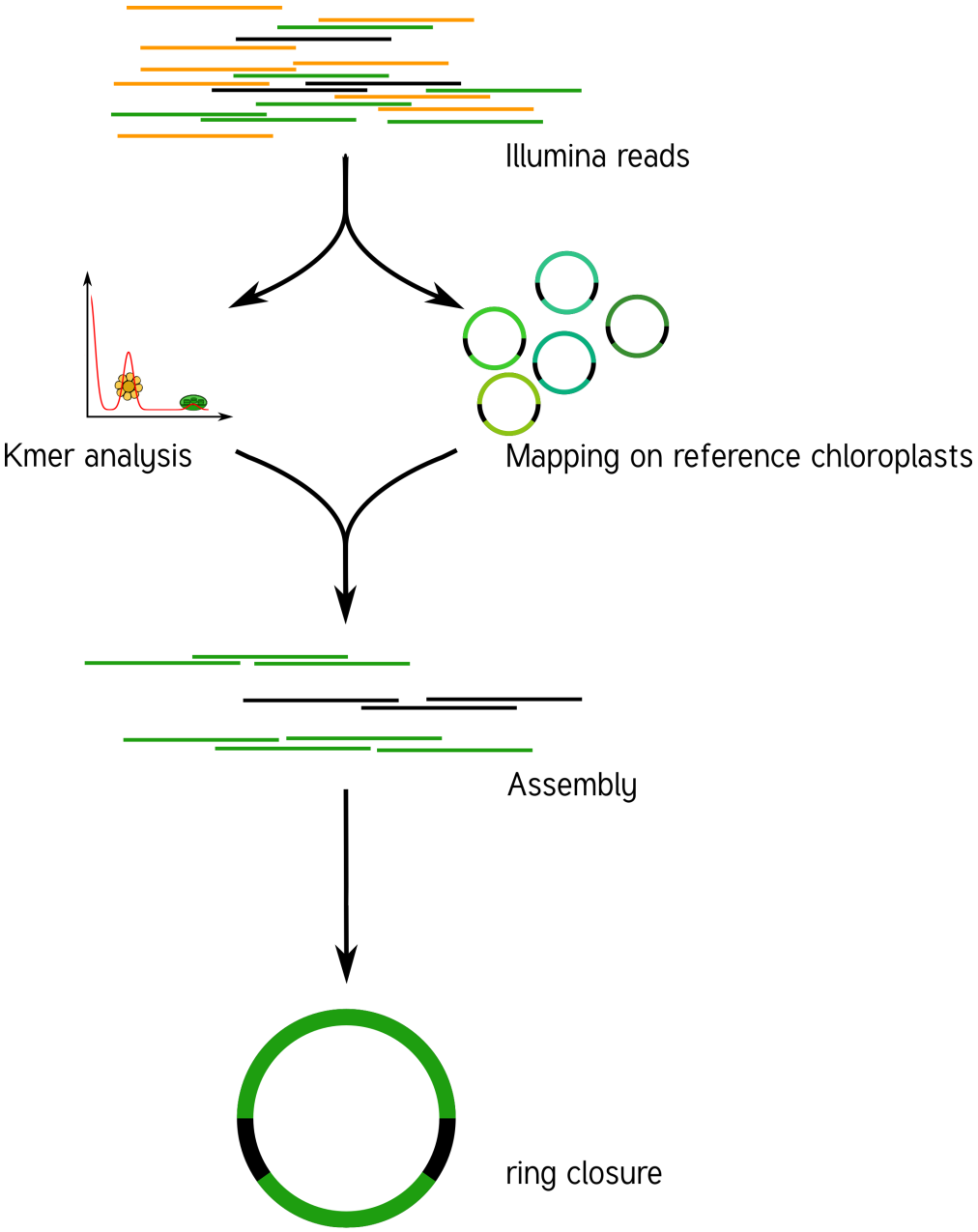


Abbildung 4: **Ablauf des chloroExtractors** Eine Kombination aus Kmer-Analyse und Mapping auf bekannte Chloroplasten, rekrutieren Chloroplastenreads um diese anschließend zu assemblieren um dann einen Ringschluss herbeizuführen. (Ankenbrand et al., (2018).)

2.5.3 NOVOPlasty

Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Programmen benutzt NOVOPlasty [26, 27] keine Drittanbieterprogramme. Es benötigt somit keine Abhängigkeiten von anderen Programmen und ist komplett in Perl programmiert. NOVOPlasty benutzt sogenannte Seeds um Chloroplasten-DNA zu finden, dies können einzelne Chloroplastengene sein, aber auch ein kompletter Chloroplast.

2.5.4 Org.ASM

Org.ASM [28] ist ein Programm, hauptsächlich geschrieben in Python. Es versucht überrepräsentierte Sequenzen zu finden und diese zu assemblieren[29]. Mit Hilfe eines Seeds versucht es diese Sequenzen zu finden.Chloroplasten und andere Organellen wie Mitochondrien sind in Zellen überrepräsentiert, vor allem wenn man eine geringe Coverage über das Pflanzengenom hat, somit sind diese detektierbar[30].

2.5.5 GetOrganelle

GetOrganelle[31, 32] verwendet zum Lokalisieren der Chloroplasten-Reads, ähnlich wie andere Programme, Bowtie2 [21] und BLAST+, nur muss hier eine Referenz mitgegeben werden. Diese wird nur hierfür verwendet, das Assemblieren hingegen geschieht de novo mit SPAdes. Wie auch beim chloroExtractor wird hier der fastg-Graph verwendet um den Chloroplasten zu finden, aber dies muss im Falle des GetOrganelle per Hand, mit Hilfe des Programms Bandage[33] vollzogen werden. Wie bereits erwähnt, nutzt der chloroExtractor ein Perl Skript welchen diesen händischen Schritt automatisiert.(Abb. 5)

[26] `https://github.com/ndierckx/NOVOPlasty`

[27] Dierckxsens N, Mardulyn P , Smits G. (2016), NOVOPlasty: De novo assembly of organelle genomes from whole genome data. Nucleic Acids Research, `10.1093/nar/gkw955`

[28] `https://pythonhosted.org/ORG.asm/`

[29] `https://git.metabarcoding.org/org-asm/org-asm/wikis/home`

[30] `https://pythonhosted.org/ORG.asm/algorithms.html`

[31] `https://github.com/Kinggerm/GetOrganelle`

[32] Jin J, Yu W, Yang J, Song Y, et al. (2018), GetOrganelle: a simple and fast pipeline for de novo assembly of a complete circular chloroplast genome using genome skimming data. bioRxiv, `http://doi.org/10.1101/256479`

[33] Wick RR, Schultz .B, Zobel J, et al (2015). Bandage: interactive visualisation of de novo genome assemblies. Bioinformatics, `https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv383`

2.5.6 IOGA

Der Iterative Organellar Genome Assembly, kurz IOGA [34, 35] verwendet BBmap [36] für das Filtern und Trimmen der Reads, um anschließend mit SOAPdenovo2 [37] und SPAdes [23] die Reads zu assemblieren. Auch dieses Programm benötigt eine Referenz. Der IOGA ist in Python geschrieben.

2.6 Interesse an Chloroplasten, was tun damit mit diesen Daten?

Mit der steigenden Anzahl an frei erhältlichen Chloroplastengenomen, welche aus NCBI[38] oder CpBase [39, 40] geladen werden können und gegen Ende 2016 erstmals die 1000 Genome überschritten haben[41], können immer mehr Versuche mit vielen Chloroplasten durchgeführt werden. So ist immer noch nicht geklärt, wie genau die Replikation von Plastid Genomen wie von Chloroplasten wirklich funktioniert. Wie werden Mutationen im Inverted Repeat repariert oder bei der Replikation auf beide IRs übernommen? Da SNPs im IR immer auf beiden gefunden werden. Welche Mutationen treten am häufigsten auf und wie sind diese evtl. an die Struktur des Genoms gekoppelt [42]? Auch ist immer noch nicht exakt verstanden, wie Chloroplasten vererbt werden. Es wird zwar angenommen, dass diese, ähnlich wie Mitochondrien, maternal vererbt werden, doch gibt es bei Pflanzen auch viele Arten, die biparental oder uniparental Chloroplasten vererben[43]. Die in den letzten Jahren stark steigende Anzahl an Chloroplastengenomen gibt diesen Fragestellungen immer mehr und neue Rohdaten, die diese Fragen lösen könnten. Auch Problemen bzw. Fragen die nur mit kleinen Änderungen im Chloroplastengenom zu tun haben (SNPs) können so auf den Grund gegangen werden. Auch die Adaption von verschiedenen Chloroplastengenen in das Pflanzengenom und der daraus folgenden Änderung im Photosynthese Systems[44] können besser verstanden werden. Auch kann ohne große Änderung an der kodierenden Sequenz, alleine durch Änderung an Transkriptionsfaktoren oder deren Level viel Einfluss auf solche Systeme genommen werden, welche

[34] https://github.com/holmrenser/IOGA

[35] Bakker FT, Lei D, et al. (2015), Herbarium genomics: plastome sequence assembly from a range of herbarium specimens using an Iterative Organelle Genome Assembly pipeline, Biol. J. Linnean Soc. https://doi.org/10.1111/bij.12642

[36] https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/

[37] Luo R, Liu B, Xie Y, et al. (2012), SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. GigaScience. 10.1186/2047-217X-1-18.

[38] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

[39] http://rocaplab.ocean.washington.edu/old_website/tools/cpbase

[40] http://rocaplab.ocean.washington.edu/tools/cpbase_test/

[41] Tonti-Filippini J, Nevill PG, Dixon K, et al. (2017), What can we do with 1000 plastid genomes?. Plant J, 10.1111/tpj.13491

[42] Massouh A, Schubert J, Yaneva-Roder L, et al. (2016), Spontaneous Chloroplast Mutants Mostly Occur by Replication Slippage and Show a Biased Pattern in the Plastome of Oenothera. The Plant Cell. 10.1105/tpc.15.00879.

[43] Greiner S, Sobanski J, Bock R. (2015), Why are most organelle genomes transmitted maternally? Bioessays. 10.1002/bies.201400110.

[44] Wicke S, Schneeweiss GM, dePamphilis CW, et al. (2011) The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. Plant Molecular Biology. 10.1007/s11103-011-9762-4.

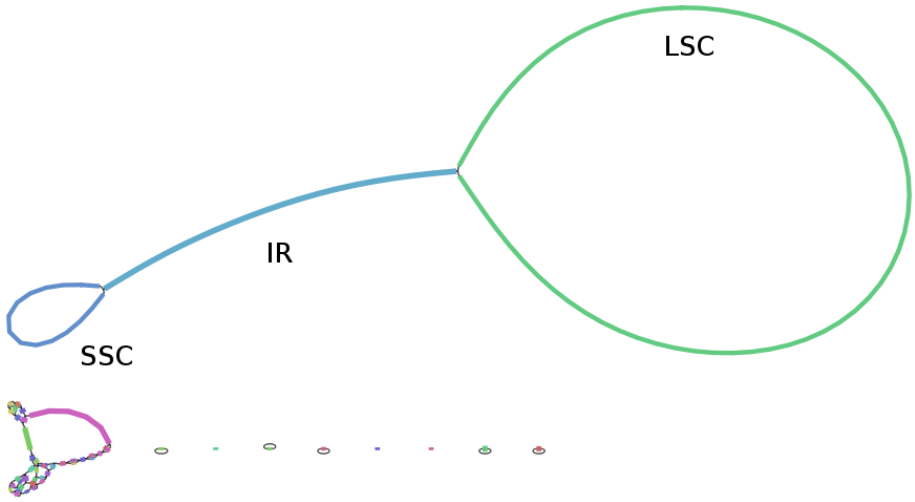


Abbildung 5: **Bandage - Visualisierung fastg-Datei** Die Visualisierung einer fastg Datei, der eigentlich zirkuläre Chloroplast zeigt sich in einer Form in der SSC (Blau) und LSC (Grün) durch eine Kette welche den IR (Türkis) darstellt verbunden sind. Diese Form wird im fcg.pl Skript des chloroExtractors aufgelöst, wobei beim GetOrganelle diese Struktur per Hand gefunden werden muss.

natürlich auch mit dem Chloroplasten zusammenhängen[41]. Wie bereits erwähnt, eignen sich Chloroplasten gut als Barcode Marker. Auch hier können Fortschritte mit mehr Daten erlangt werden. Zudem können mit vielen Chloroplasten-Daten sehr gut phylogenetische Bäume berechnet werden[45]. Dies sind alles Beispiele wie zwischen vielen Spezies mit Hilfe von Chloroplasten-Forschung betrieben werden kann. Aber auch innerhalb einer Spezies tauchen Variabilitäten auf und dies konnte nur mit vielen verschiedenen Chloroplasten der gleichen Spezies herausgefunden werden. So wurden beim 1001 Genom Projekt mehrere Tausend SNPs auf *A.thaliana* Chloroplasten gecalled[46, 7]. Doch können nicht nur viele Chloroplasten Probleme lösen, schon einzelne neue Chloroplasten können sehr aufschlussreich und informativ sein. So wurde die Idee des chloroExtractors z.B. nur aus dem Grund entworfen, einen Chloroplasten aus dem *Dionaea muscipula* (Venusfliegenfalle) Genom zu extrahieren, um diesen separat zu haben, um das Genom leichter zu assemblieren und zu annotieren. Denn es kann durchaus vorkommen, dass bei neuen Genomen, welche de novo assembliert werden müssen, Verunreinigungen durch Chloroplasten auftreten können. Denn ca. 5 - 20% der kompletten DNA wird von Plastiden-DNA ausgemacht, je nach Spezies und Gewebe[41].

2.7 Aufgaben in der Master Thesis

Die Aufgabe dieser Thesis kann grob in drei Teile eingeteilt werden. Zunächst sollen die verschiedenen Programme, der chloroExtractor [16, 17], fast-plast[25], IOGA[34, 35], GetOrganelle[31, 32], Org.ASM[28] und NOVOPlasty[26, 27] verglichen werden, und herausgefunden werden, welche das oder die besten Programme sind um damit so viele Chloroplastengenome zu erzeugen wie möglich. Hier soll vor allem darauf geachtet werden, dass die Programme automatisierbar sind um einen hohen Durchsatz zu haben. Zudem sollen die Programme ressourcenschonend arbeiten. Der zweite Teil ist das Produzieren von Chloroplastengenomen. Hierzu werden die Pflanzengenome des 1001 Genom Projektes verwendet. Nach internen Besprechungen und ersten Tests des chloroExtractors, wird angenommen, dass ca. 10 - 20%[47] der Datensätze einen kompletten zirkulären Chloroplasten erbringen könnten. Dies hängt von mehreren Variablen ab. Zunächst davon, wie viel Chloroplasten-DNA in den Daten vorhanden ist. Dies unterscheidet sich je nachdem welches Gewebe zum Sequenzieren verwendet wurde. Hier haben Wurzeln weniger Chloroplasten als Blüten oder Blätter. Auch hängt es davon ab wie "gut"die Daten sind. Generell gilt: je größer die Reads, desto besser zu assemblieren. Auch zu beachten sind insert Size und Anzahl der Reads. Auf den so produzierten Chloroplasten sollen verschiedene wissenschaftliche Analysen durchgeführt werden, so zum Beispiel eine Varianzanalyse sowie eine Genomweite Assoziationsstudie, kurz GWAS [48]. Eine GWAS versucht bestimmte Traits, also Eigenschaften mit genomischen Varianten zu assoziie-

[45] Chase MW, Fay MF. (2001) Ancient flowering plants: DNA sequences and angiosperm classification. Genome Biology. `https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-4-reviews1012`

[46] `http://1001genomes.org/`

[47] persönliches Gespräch mit Förster F. und Ankenbrand M. über geschätzte Ergebnisse

[48] Korte A, Farlow A. (2013), The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. Plant Methods. `10.1186/1746-4811-9-29`.

ren, um anschließend eine Aussage darüber treffen zu können ob diese Variante einen Einfluss auf diese Eigenschaft hat oder nicht. Hierzu werden die Chromosomen einzeln oder als komplettes Genom angesehen, je nach Ansatz oder Fragestellung. Auch sollte eine Struktur-Varianz-Analyse durchgeführt werden. Zudem könnten diese Daten benutzt werden um Chloroplasten besser als genetische Marker zu benutzen. Der dritte Teil ist das Suchen nach bisher noch nicht dokumentierten Chloroplastengenomen. Hierzu sollen Daten verwendet werden welche noch keinen Eintrag in der Chloroplasten-Datenbank (CpBase[39, 40]) haben.

3 Material / Methoden

3.1 Verwendete Versionen

Es wurde für jedes Programm immer die neuste Version verwendet. Hierzu wurdem die Dockercontainer neu gebaut wenn eines der Programme ein Update, wie z.B. ein Bugfix gemacht hat. So kam es, dass einige Programme in mehreren Versionen verwendet wurden.

3.1.1 chloroExtractor

Hier wurden die Versionen 1.0.2, 1.0.3 und 1.0.4 verwendet. Diese drei verschiedene Versionen des chloroExtractors brachten unter anderem Bug fixes für Bugs, welche das Programm zum Absturz brachten, aber auch Verbesserungen am fcg.pl Skript.

3.1.2 fast-plast

Vom fast-plast wurde nur Version 1.2.7 verwendet, diese war seit 2017 die neuste version. 1.2.8 wurde im ende Juni (commit 954b2cbd, 28.06) veröffentlicht, wurde aber für keine Ergebnisse mehr benutzt.

3.1.3 NOVOPlasty

Der NOVOPlasty wurde in den Versionen 2.6.8. 2.6.9 und 2.7.0 verwendet. Diese brachten Bugfixes, Änderungen an der Konfigurations-Datei sowie Verbesserungen beim einlesen der Read Header und Input Seeds.

3.1.4 org.ASM

Org.ASM wurde nur in der Version 1.0.00-alpha11 verwendet.

3.1.5 GetOrganelle

Get Organelle wurde in den Versionen 1.9.82, 1.0.1 und 1.0.3 verwendet. Es gab einen Versionssprung, so wurde die Version 1.9.82 geändert zu 1.0.1 (github commit: b390260 vom 31. März 2018). In den Verschiedenen Versionen gab es diverse Bug Fixes, sowie

kleine Features. Zudem wurde das Programm GetOrganelle mit 1.0.1 in einer wissenschaftlichen Arbeit veröffentlicht [32].

3.1.6 IOGA

Der IOGA hat keine verwendete Versionsnummer, dieser wurde genutzt mit github commit: c460ea9 vom 10. Sep. 2016. Dieser wurd seitdem her nicht mehr geupdated.

3.2 Evaluation der Programme

Um die oben genannten Programme zu vergleichen, wurden sich verschiedene Ansätze überlegt. Um zunächst zu testen, wie genau die Programme funktionieren und ob diese überhaupt funktionieren, wurden sie auf dem Testset SRR5216995 (*Arabidopsis thaliana*: Col-0) mit einer Million Reads getestet. Dieser ist frei zugänglich bei NCBI[38] und dient als Testset beim chloroExtractor[16]. Um eine Automatisierung zu erhalten, musste für jedes Programm ein Dockercontainer[49](s. Anhang Tab.9) gebaut werden, falls dieser nicht schon vorhanden war, letzteres traf nur für den chloroExtractor zu. Diese Dockercontainer sind auf Dockerhub[50] frei zur Verfügung[51]. Um das Ziel zu erreichen, so viele Chloroplasten wie möglich zu extrahieren, musste eine Automatisierungslösung für alle Programme erstellt werden, damit keine evtl. manuellen Schritte oder Auswertungen der zeitbestimmende Schritt sind. Um dies zu erreichen, mussten zusätzlich einige Bash und Perl Skripte (s. Anhang: Skripte) geschrieben werden, welche eine volle Automatisierung ermöglichen.Um für alle Programme, welche einen Seed oder eine Referenz benötigen Chancengleichheit herzustellen wurde hier überall die gleiche Datei verwendet. Diese Datei benutzt der chloroExtractor, hier handelt es sich um 4154 Chloroplastengene. Diese sind aus verschiedenen Arten. Bei den Genen handelt es sich um *ndhB*, *rps12*, *psbD*, *rpl2* und *psbA*. Liefert ein Programm seine eigenen Referenzen mit, wie es der chloroExtractor tut, wurden diese nicht geändert. Da diese als Standardparameter gelten, welche nicht verändert werden sollten.

3.2.1 Testdaten

Es wurden verschiedene Größen von Dateien verwendet. So sind dies alles Illumina short Read Daten, doch unterscheiden sich diese in Readlänge, Insertsize und Anzahl der Reads.

Simulierte Daten Um zu testen, wie gut die verschiedenen Programme mit unterschiedlichen Anteilen von Chloroplasten-DNA in Genomdaten zurechtkommen, wurden drei verschiedene Testdatensätze simuliert (Genom : Chloroplast - 1:10, 1:100, 1:1000). Mit diesen sollte auch getestet werden, ob die Programme mit viel oder wenig Chloroplasten-DNA-Anteilen zurechtkommen, oder einen dieser Fälle bevorzugen. Um diese Daten

[49] `https://www.docker.com/`
[50] `https://hub.docker.com/`
[51] `https://hub.docker.com/u/chloroextractorteam/`

vorzubereiten, wurden von *Arabidopsis thaliana* (TAIR10 [52]) die jeweiligen Chromosomen, wie auch die Daten des Chloroplasten von NCBI[38] heruntergeladen. Diese wurden in den jeweiligen Verhältnissen zusammen kopiert. Diese Testdatensätze wurden mit ART[53, 54](Version: 2.5.8) erzeugt. ART wird dazu verwendet, Short-reads zu erzeugen. ART kann keine zirkulären Daten wie Chloroplasten erzeugen, deswegen wurden diese als lineare Sequenzen verwendet mit der Abfolge LSC-IRB-SSC-IRA. Mit einem Overlap zwischen IRA und LSC und dieses immer wieder, sodass folgendes Gebilde ensteht: (IRA)-LSC-IRB-SSC-IRA-LSC-IRB-SSC-IRA-(LSC) usw.. Mitochondrien DNA wurde nicht mit simuliert, da sich zunächst auf die Chloroplasten fokussiert werden sollte und diese Mitochondrien die Komplexität der Daten erhöhe. Um die verschiedenen Verhältnisse von Genom und Chloroplasten zu bekommen wurden die Chloroplastendaten einfach vervielfältigt und anschließend zusammen kopiert. Hiernach wurden sie mit folgenden ART Kommandos als short Reads simuliert. Hiernach wurden die Daten gemischt, da es zu Problemen kommt, wenn diese Daten sortiert sind. Für diese Daten wurden 150 Basen paare Reads simuliert, und eine Coverage der Daten welche 100x beträgt. Für die Tests wurden eine Million Reads pro Datei benutzt, da diese genug Chloroplasten DNA enthalten sollten.

```
art_illumina [options] -i <INPUT_SEQ_FILE> -l <READ_LEN> -f <FOLD_COV> -o <OUTPUT_FILE_PREFIX>
-m <MEAN_FRAG_LEN> -s <STD_DE>

1:10 : ./art_illumina -p -i sequence-arabidopsis-thaliana-kern-chl-1zu10.fa
-l 150 -f 100 -o a_thaliana_1_10_sim -m 500 -s 150

1:100 : ./art_illumina -p -i sequence-arabidopsis-thaliana-kern-chl-1zu100.fa
-l 150 -f 100 -o a_thaliana_1_100_sim -m 500 -s 150

1:1000 : ./art_illumina -p -i sequence-arabidopsis-thaliana-kern-chl-1zu1000.fa
-l 150 -f 100 -o a_thaliana_1_1000_sim -m 500 -s 150
```

1001 Genom Projekt Um einen ersten Eindruck über die Programme und deren Erfolgsrate zu bekommen, wurden parallel zu den Tests mit simulierten Daten die ersten Tests mit realen Datensätzen vorgenommen. Hierzu wurden Daten aus dem 1001 Genom Projekt[46] verwendet, dies sind alles Daten von *Arabidopsis thaliana*. Es wurden 11 Datensätze (SRR1945435 - SRR1945445) verwendet. Diese sind alle frei verfügbar und wurden von NCBI[38] heruntergeladen. Es wurden jeweils zwei Millionen Reads pro Datei gezogen, mit 150 Basenpaaren pro Read.

GetOrganelle-Paper preprint Um weitere Testdaten zu ermitteln und ein Urteil darüber zu fällen, welche Programme weiter verwendet werden, wurden 57 Datensätze, welche im GetOrganelle Paper [32] verwendet wurden, auf allen Programmen getestet. In

[52] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001735.3/

[53] Weichun H, Leping L, Jason RM, Gabor TM. (2015), ART: a next-generation sequencing read simulator, Bioinformatics, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr708

[54] https://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/biostatistics/art/index.cfm

diesem Preprint wurden bei 47 Datensätzen von 57, mit dem GetOrganelle erfolgreich zirkuläre Chloroplasten extrahiert. Diese Daten sind auch frei zugänglich und wurden von NCBI heruntergeladen. Gerade hier gab es einige Abweichungen in Dateigrößen. Reads reichten von 75 Basenpaaren bis zu 300 Basenpaare pro Read. Es wurden hier fünf Millionen Reads pro Datei verwendet, da diese im GetOrganelle Paper auch verwendet wurden.

3.2.2 Welche Programme werden weiter verwendet.

Um alle Daten aus dem 1001 Genom Projekt (1135 Datensätze) zu berechnen, mussten aufgrund von Hardware technischen Limitierungen die besten Programme ausgewählt werden. Diese Programme müssen in in Geschwindigkeit sowie in Erfolgs- und Fehlerrate überzeugen. Desweiteren müssen diese Programme gut automatisierbar sein, d.h. am besten nur mit Befehl gestartet werden können, sodass kein weiterer Aufwand anfällt. Dies gilt vor allem auch bei der Wahl der Parameter mit denen das Programm gestartet wird. Diese können nicht für jeden Datensatz angepasst werden, was bedeutet, dass die Standardparameter verwendet werden. Dies ist notwendig, um einen hohen Durchsatz an Berechnungen zu ermöglichen.

Installation & Automatisierung Alle Programme konnten mit Hilfe von einigen Skripts und dem erstellen eines Dockercontainers so automatisiert werden, dass sie einen hohen Durchsatz erreichen konnten. Das einzige Programm welches einen händischen Schritt benötigt ist der GetOrganelle. Hier muss die fastg Datei in Bandage geöffnet werden und der zirkuläre Chloroplast selbst herausgesucht werden. Bei den verschiedenen Skripts handelt es sich vor allem um Start-Skripts. Aber es mussten auch ein paar kleine Skripts verwendet werden um kleine Bugs zu fixen. So kann der IOGA keine Unterordner verwenden da er sonst versucht auf falsche Dateien zuzugreifen und abstürzt. Dies scheint ein Bug in einem split-Befehl zu sein. Beim GetOrganelle mussten zusätzliche Befehle eingebaut werden, damit SPAdes keine Fehlermeldungen bringt und abbricht, da er bestimmte Funktionen (hammer.py) nicht ausführen konnte, welche für eine Fehlerkorrektur verwendet werden, welche GetOrganelle gar nicht nutzt. Org.ASM konnte nur erfolgreich in einem Dockercontainer installiert werden, da dieses Programm sonnst verschiedenste Fehlermeldungen brachte. Alle Programme, welche Perl verwenden, also chloroExtractor, fast-plast und NOVOPlasty, brachten Fehlermeldungen, da innerhalb des Dockercontainers globale Variablen nicht vollständig gesetzt waren. Diese Fehler waren aber nicht fatal, und konnten mit dem setzten dieser Variable leicht entfernt werden. Für jedes Programm wurde ein Skript geschrieben welches die Laufzeit überprüft und wenn dieses fertig ist, eine Auswertung startet.

Erfolgsrate Um zunächst zu überprüfen, ob ein wirklich ein kompletter Chloroplast zusammengebaut wurde, wurde bei den ersten Testdatensätzen ein Referenz-Mapping auf TAIR10 benutzt. Hierzu wurde mit Bowtie2, später mit minimap2[55](Version: 2.10-r761)

[55]Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics. `10.1093/bioinformatics/bty191`

der Chloroplast auf das TAIR10 Chloroplastengenom gemappt. Auch wurde mit AliTV [56] eine Visualisierung des Mappings erstellt. Nachdem klar war, dass es sich bei allen ausgegeben Daten um Chloroplasten handelt, und weil diese Art der Auswertung schlecht Automatisierbar war, wurde ein Bash Skript geschrieben, welche die Auswertung übernimmt. Dieses Skript überprüft die Größe des Chloroplasten und in wie vielen Contigs der Chloroplast ausgegeben wurde. Hierzu wurde das SeqFilter[57](Version: 2.1.8) Skript verwendet, und anschließend über ein Bash Skript eine Entscheidung getroffen, ob es sich um einen kompletten Chloroplasten handelt oder nicht (s. Anhang: Skripte:ev_stat.sh). Hierzu wurden verschiedene Kategorien eingeführt(s. Tab. 1). Diese Auswertung wurde für dann für alle Testdaten sowie die GetOrganelle Preprint Daten verwendet. Zudem gab es zu den vier Kategorien, in denen Erfolge eingeteilt wurden noch Error, wenn kein Ergebnis vorhanden war, wenn das Programm z.B. durch einen Fehler abgebrochen hat. Sowie Cancelled, wenn das Programm länger als 14 Tage brauchte wurde es abgebrochen.

Tabelle 1: **Erfolgsraten Einteilung** Das Skript ev_stat.sh scannt die Output Dateien und teilt diese je nach Größe und Anzahl der Contigs in verschiedene Kategorien ein.

Kategorie	Contigs	Basenpaare
Success	1	110 kbp - 180 kbp
Partial	> 1	110 kbp - 180 kbp
Incomp:high	> 1	$>$ 180 kbp
Incom:low	> 1	$>$ 110 kbp

Geschwindigkeit Einer der weniger entscheidenden aber dennoch wichtigen Punkte, nach dem gefiltert wurde, ist die Geschwindigkeit, oder besser die Laufzeit der Programme. Zunächst wurde hier die Durchschnittszeit genommen, die der Prozess zum Rechnen benötigt, anschließend wurde mit dem time Linux Kommando die CPU als auch die Real-Zeit gemessen. Die Geschwindigkeit von Programmen mit vielen Abhängigkeiten brauchen im Schnitt länger, da zum Benutzen der Dockercontainer Singularity[18](Version: 2.4.5-dist) verwendet wurde. Dieses benötigt Zeit, um den Container zu verwenden. Zudem wird Zeit in Anspruch genommen wenn viele Daten in den Container gemountet werden müssen.

Benötigte Ressourcen Ein weiterer Punkt, nachdem aussortiert wurde, ist der benötigte RAM-Verbrauch. Es wurden verschiedene Größen von Dateien verwendet um in

[56] Ankenbrand MJ, Hohlfeld S, Förster F, et al. (2017) AliTV—interactive visualization of whole genome comparisons. PeerJ Computer Science, `https://doi.org/10.7717/peerj-cs.116`

[57] `https://github.com/BioInf-Wuerzburg/SeqFilter`

Erfahrung zu bringen wie sich dies auf Ressourcen und Laufzeit auswirkt. Zudem wurde zum Ausführen der Dockercontainer Singularity [18] verwendet, welches die benötigte Laufzeit und die benötigten Ressourcen, wie RAM beeinflusst.

3.3 Varianzanalyse

Um mehr über die Chloroplasten und deren Verbreitung, sowie Mutationsrate und somit Varianz zu erfahren, wurden zwei verschiedene Varianzanalysen durchgeführt. Zunächst sollte überprüft werden, welche Einflüsse die Programme und ihre Strategien den Chloroplasten zu assemblieren, speziell deren Assembler, auf die Varianz der entstehenden Chloroplasten hat. Hierzu wurden die assemblierten Chloroplasten, welche beide verwendeten Programme gemeinsam hatten verwendet. Diese Läufe wurden zunächst zehnfach wiederholt. Auch um einen Eindruck über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bekommen. Diese Chloroplasten wurden anschließend mit minimap2 [55] auf das Referenzgenom (TAIR10 Chloroplast [58]) gemapt. Hiernach wurde eine Varianzanalyse mit Samtools[59](Version: 0.1.19-96b5f2294a) durchgeführt, hierzu wurde der Befehl mmpileup/bcftools call"[60] (bcftools Versionen:0.1.19-96b5f2294a & 1.8) verwendet. Dieser führt eine Varianzanalyse bzw. ein SNP calling durch. Die zweite Varianzanalyse wurde auf allen Chloroplasten, welche aus dem 1001 Genom Projekt gebaut wurden erstellt. Auch diese wurden auf den Referenzchloroplasten mit minimap2 gemapt und anschließend mit Samtools' mpileupFunktion einem SNP calling unterzogen.

3.4 GWAS

Häufig wird eine GWAS über das komplette Genom berechnet. Doch können auch einzelne Chromosomen oder Organellen bereits signifikante Varianten besitzen. So soll mit dieser GWAS der Einfluss von Chloroplasten Varianten auf Eigenschaften der *A.thaliana* getestet werden. Hierzu wurden die SNP callings aus der Varianzanalyse verwendet. Verschiedene Trait-Tabellen wurden von Arapheno[61, 62], einer Trait Datenbank für *A.thaliana*, heruntergeladen und zusammen mit den Varianzanalyse Daten in ein R[63] Skript gegeben. Dieses R Skript nutzt zunächst vcfR[64], ein R-Paket, um die verschiedenen VCF (Variance Calling File) Daten einzulesen. Anschließend ruft es ein weiteres R-Skript auf welches freundlicherweise von Korte et. al[48] zur Verfügung gestellt wurde, und eine GWAS Analyse durchführt.

[58] `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000932.1`

[59] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. (2009) The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools, Bioinformatics `10.1093/bioinformatics/btp352`

[60] Li H, (2011) A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data, Bioinformatics `10.1093/bioinformatics/btr509`

[61] `https://arapheno.1001genomes.org/`

[62] Seren Ü, Grimm D, Fitz J, et al. (2017) AraPheno: a public database for Arabidopsis thaliana phenotypes, Nucleic Acids Research, `https://doi.org/10.1093/nar/gkw986`

[63] `https://www.r-project.org/`

[64] `https://cran.r-project.org/web/packages/vcfR/index.html`

3.5 Struktur Varianz Analyse

Wie bereits erwähnt, können Chloroplasten auch verschiedene strukturelle Änderungen evolvieren. Diese sind durch die Rohdaten, welche meist short Reads sind, nicht aufzudecken. Da diese zu kurz sind um komplette Strukturvarianten zu überspannen.[7] Hierzu könnten nun die komplett de novo assemblierten Chloroplasten verwendet werden. Es wurde versucht mit Delly[65] (Version: v0.7.8) und Breakdancer[66](Version: 1.3.6) Strukturvarianten in Chloroplasten zu finden.

3.6 Neue Chloroplasten

Um neue Chloroplasten von Spezies zu finden, welche noch nicht in der CpBase [39, 40] Datenbank sind, wurde eine Liste von möglichen Daten von NCBI mit CpBase verglichen. Nur 49 Datensätze waren ohne Eintrag in CpBase, und hatten somit noch keinen dokumentierten Chloroplasten für diese Spezies. Auf diesen 49 Datensätze wurden sowohl der chloroExtractor als auch der fast-plast angewendet. Um die NCBI Liste von interessanten Daten zu erhalten wurde mit folgendem Befehl gesucht:

```
((((((("green plants"[orgn]) AND "wgs"[Strategy]) AND illumina"[Platform])
AND "biomol dna"[Properties]) AND paired"[Layout]) AND random"[Selection]))
AND public"[Access]
```

Mit einem Skript (s. Anhang: Skript: cpbase.sh) wurden alle Spezies Einträge von CpBase geladen welche einen Chloroplasten besitzen. Anschließend wurde mit einem folgendem Perl-Einzeiler die Datensätze herausgegeben, welche noch keinen Eintrag in CpBase haben. Zudem musste der Datensatz mindestens zwei Millionen Reads haben und mindestens 200 Basenpaare pro Read aufweisen.

```
perl -F",ane 'print if F[6] > 399 and F[3]>999999' SraRunInfo_plants.csv | grep
-vf species_cpbase.list | sort -u -t, -k29,29 | shuf
```

4 Ergebnisse

4.1 Automatisierung

Um eine Automatisierung aller Programme zu erreichen wurde für jedes Programm ein Dockercontainer gebaut, welcher mit Singularity verwendet wird. Zudem wird die komplette Auswertung von einigen Skripts übernommen. Um dies zu bewerkstelligen wurden mehrere Skripts geschrieben, welche sich gegenseitig aufrufen, um den kompletten Ablauf sicherzustellen (Abb. 6). Das einzige Skript, welches aktiv ausgeführt werden muss ist das run_SRRchl.sh. Dieses Skript setzt Links zu anderen Skripts, zum einen zu zwei Auswertungs Skripts (ev_stat.sh und percent_stat.sh) und zum andern, einem Skript namens cp_skript.sh. Dieses cp_skript.sh Skript übernimmt den kompletten Aufbau der Ordner Struktur und linkt all die Skripts, die jedes Programm braucht, so brauchen IOGA und GetOrganelle eine Referenz, diese wird von diesem Skript in die passenden

[65] https://github.com/dellytools/delly
[66] https://github.com/genome/breakdancer

Ordner kopiert. Auch kopiert und führt dieses cp_skript.sh Skript das Skript aus, welches die NOVOPlasty Konfigurationsdatei automatisiert für jeden Datensatz schreibt (make_NP_config.pl). Für jeden Datensatz wird so ein Ordner erzeugt mit jeweils dem Programm als Unterordner. In jedem Unterordner werden die roh Daten verlinkt, sowie für jedes Programm das passende Evaluierungsskript und Runskript. Als letztes linkt es sbatch_run_all.sh und ev_all.sh in den jeweiligen Datenordner. Diese werden nun vom run_SRRchl.sh Skript ausgeführt. Das sbatch_run_all.sh Skript geht nun in jeden Unterordner und startet die jeweiligen Programme, über sbatch und deren Runskript. Zudem startet es auch die dazugehörigen Evaluierungsskripts, welche auch gleichzeitig als Überwachungsskript dienen. Sobald der Slurm Job fertig ist, startet das Evaluierungsskript des jeweiligen Programms damit die finale Output-Datei zu überprüfen und diese in eine der vier Erfolgskategorien einzuteilen. Zudem schiebt es alle Dateien, welche keine Log-Dateien oder finale Output-Dateien sind in einen raw_Programm Ordner, damit dieser mit dem clear_skript.sh Skript gelöscht werden kann, falls diese Daten nicht mehr benötigt werden. Sobald alle Datensätze fertig sind, wird mit dem ev_stat.sh Skript eine Datei mit einer Erfolgstabelle mit jedem Programm erstellt. Percent_stat.sh kann dann genutzt werden um eine Zusammenfassung über alle Datensätze zu erhalten.

4.2 Daten: Simulierte Daten

Die Simulierten Daten, welche mit ART[53, 54] erzeugt wurden, um das Verhalten der Programme bei verschiedenen Verhältnissen zu testen, konnten von drei Programmen, dem chloroExtractor, fast-plast und Org.ASM bei allen drei Datensätzen geschafft werden. Diese schaffen es einen vollständigen zirkulären Chloroplasten zu bauen. NOVOPlasty baut zwar auch einen kompletten Chloroplasten doch gibt dieser nur die drei verschieden Contigs aus (IR, SSC, LSC), und schafft es nicht diese in einen zirkulären Chloroplasten zu vereinen. GetOrganelle wie auch der IOGA schaffen es nicht die simulierten Datensätze zusammenzubauen, da sie mit einem Fehler abbrechen oder wie im Falle des IOGA nach zwei Wochen Laufzeit abgebrochen werden. (s. Tabelle 2)

Tabelle 2: **Test Datensatz: Simulierte Daten** S steht für Success, P für Partial, E für Error, C für Cancelled, die angegebene Zahl steht für die Anzahl der Contigs. Bis auf IOGA und GetOrganelle konnten alle anderen Programme die Simulierten Daten zu einem Chloroplasten zusammenbauen, auch wenn im Falle des NOVOPlasty nicht zirkulär. Die IOGA Läufe mit C"wurden nach zwei Woche Laufzeit abgebrochen.

Sim(Genome:Chloroplast)	CE	FP	NP	GO	OA	IOGA
1:10	S	S	P-3	E	S	E
1:100	S	S	P-3	E	S	C
1:1000	S	S	P-3	E	S	C

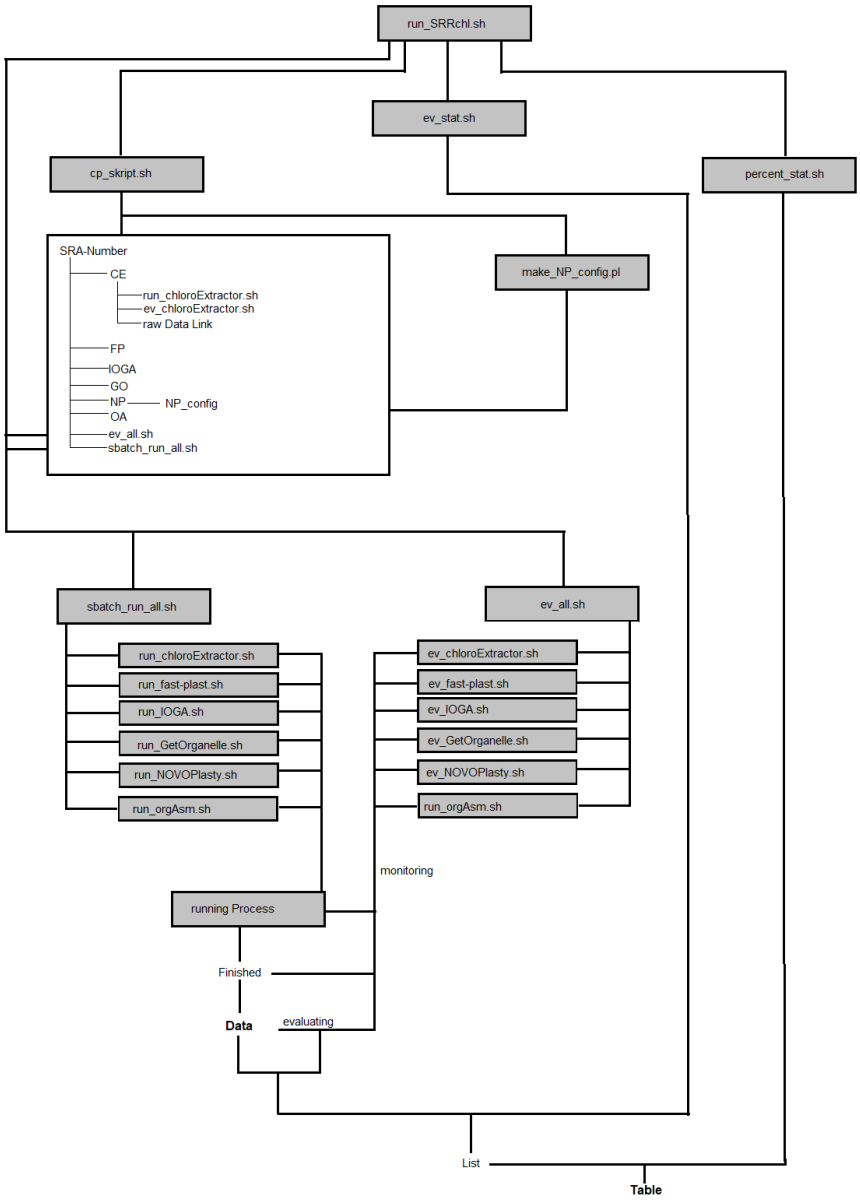


Abbildung 6: **Automatisierungsskripts** Ablauf der verwendeten Skripte um eine Automatisierung zu erwirken, hier wird nur das run_SRRchl.sh Skript ausgeführt und alle anderen Skripte werden automatisch bis zur Auswertung ausgeführt. So erstellt das cp_script.sh für jedes Programm einen Unterordner mit den dazugehörigen run und ev Skripts. sbatch_run_all.sh startet alle run Skripts und ev_all.sh startet jedes ev Skript.

Abbildung 7: **Bandage: GetOrganelle SRR1945443** Kein Chloroplast erkennbar im fastg Graphen. Keine Vernetzung der Contigs per se erkennbar. Dazu im Vergleich der Graph des chloroExtractors (Abb. 8)

4.3 Daten: 1001 Genom Projekt, 11 Testdatensätze

Aus den Daten des 1001 Genom Projekts [46, 7] wurden zunächst elf Testdatensätze verwendet um auch reale Daten auf allen Programmen zu testen. Von den elf Testdatensätzen des 1001 Genom Projekts konnten sechs verschiedene vollständige zirkuläre Chloroplasten zusammengebaut werden. Von diesen sechs bringt der fast-plast fünf ein und der chloroExtractor einen. Keines der anderen Programme konnte einen weiteren zirkulären Chloroplasten erzeugen (s. Tab.3). Diese elf Datensätze des GetOrganelles wurden per Hand ausgewertet, keiner dieser elf Datensätze konnte einwandfrei mit Bandage zu einem zirkulären Chloroplasten gebaut werden, da immer kein Ringschluss vorhanden war. (vergleiche Abb.7, Abb. 8)

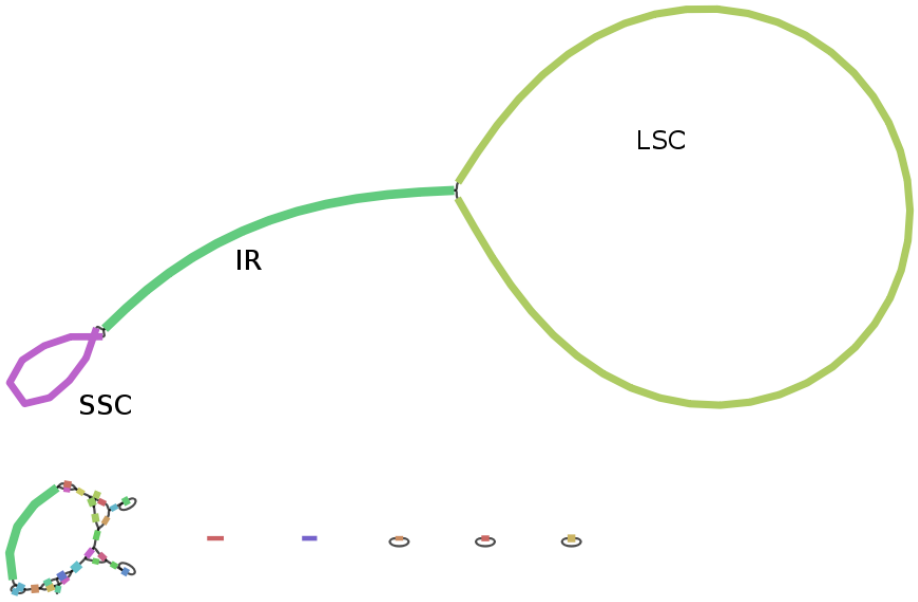


Abbildung 8: **Bandage: chloroExtractor SRR1945443** Chloroplast klar erkennbar, dieser zeichnet sich aus durch einen großen Kreis (LSC - Gelb), verbunden über eine Linie (IR - Grün) auf einen kleinen Kreis (SSC - Violett).

Tabelle 3: **Test Datensatz: 1001 Genom Project** S steht für Success, P für Partial, E für Error, I für Incomplete, C für Cancelled. Sechs verschiedene Chloroplasten konnten zu einem zirkulären Chloroplasten zusammengebaut werden, dabei werden bereits fünf vom fast-plast abgedeckt und einer wird von chloroExtractor beigesteuert.

SRA	CE	FP	NP	GO	OA	IOGA
SRR1945435	I	I	I	I	E	I
SRR1945436	I	S	I	I	I	I
SRR1945437	I	I	I	I	I	I
SRR1945438	P	S	I	I	E	I
SRR1945439	I	S	I	I	I	I
SRR1945440	I	S	E	I	E	I
SRR1945441	I	S	E	I	I	I
SRR1945442	I	I	I	I	C	C
SRR1945443	S	I	I	I	I	I
SRR1945444	I	I	E	I	I	I
SRR1945445	I	I	E	I	E	I

4.4 Daten: GO-Preprint

Um mehr Daten zu testen, wurden alle 57 Datensätze des GetOrganelle Papers [32] benutzt. Da der GetOrganelle diese Daten eigentlich erfolgreich schaffen sollte, wurde hier versucht mit dem fcg.pl Skript des chloroExtractors eine Automatisierung der Daten zu erwirken. Doch versucht der GetOrganelle zunächst die die fastg-Graphen zu verbessern, dies führt dazu dass das fcg.pl Skript nicht mehr funktioniert. So wurden die fastg-Graphen aus SPAdes direkt verwendet, doch ergaben sich hier leider nur zwei Datensätze als zirkuläre Chloroplasten. Auf Nachfrage beim GetOrganelle Team hieß es, dass wenn es notwendig war alle Parameter angepasst wurden und dass alle Chloroplasten per Hand aus Bandage geholt wurden. Von 57 Datensätzen, welche im GetOrganelle Paper verwendet wurden, konnten insgesamt 40 fertig gestellt werden, diese verteilen sich auf die verschiedenen Programme (s. Tab. 4). So konnten 35 von 40 erfolgreichen Datensätzen durch den fast-plast und den chloroExtractor erreicht werden. Der fast-plast schafft es 31 Chloroplastengenome komplett zu bauen, davon sind 17 nur von ihm geschafft worden(Abb. 9). Der chloroExtractor schafft 14 Chloroplasten, wo von drei nur von ihm geschafft werden. Die zwei Erfolge des GetOrganelles, mit Hilfe des fcg.pl Skripts des chloroExtractors, werden auch nur vom GetOrganelle geschafft. Von den sieben des NOVOPlasty ist einer dabei welcher nur von diesem geschafft wird. Von den elf des Org.ASM ist auch einer nur allein von diesem Geschafft worden. Doch wurden einige auch mehrfach geschafft. So sind vier Stück nur von fast-plast und chloroExtractor geschafft worden. Zwei Stück von fast-plast und Org.ASM, sowie jeweils einer von Org.ASM und NOVOPlasty; chloroExtractor und

Org.ASM; fast-plast und NOVOPlasty. Drei Erfolge teilen sich fast-plast, chloroExtractor und Org.ASM. Sowie jeweils ein Erfolg teilen sich fast-plast, Org.ASM, NOVOPlasty, als auch einer von fast-plast, chloroExtractor und NOVOPlasty. Zwei Chloroplasten konnten von allen Programmen bis auf GetOrganelle und IOGA gelöst werden (u.a. Abb. 10: SRR5602602 - *Laurus nobilis*), wobei letzteres Programm nicht einen Erfolg hat(Abb. 9 & Tab. 4). So können bereits 35 von 40 Chloroplasten alleine durch fast-plast und chloroExtractor geschafft werden.

Tabelle 4: **Test Datensatz: GetOrganelle Preprint** 40 von 57 Datensätze konnten komplett gelöst werden. 31 Datensätze konnten mit dem fast-plast zu einem Chloroplasten gebaut werden, die 14 die der chloroExtractor schafft enthalten weitere welche nicht vom fast-plast geschafft wurden. Somit konnten mit allen Programmen 74% gelöst werden, wenn die drei ohne paired Daten herausgerechnet werden und alleine 64% von diesen 54 von fast-plast und chloroExtractor

Tool	SUCCESS	%	ERROR	PARTIAL	INCOMPl	NO_PAIR	Total
CE	14	~26%	11	17	12	3	
FP	31	~57%	0	18	5	3	
GO	2	~4%	21	26	5	3	
IOGA	0	~0%	22	28	4	3	
NP	7	~13%	19	8	20	3	
OA	11	~20%	36	4	3	3	
Summary	40	~74%	-	-	-	3	57

4.5 Die besten Programme: fast-plast und chloroExtractor

Da aus zeitlichen und hardwaretechnischen Gründen nicht alle Programme weiterverwendet werden konnten, wurde nach Erfolgsrate, Geschwindigkeit und benötigten Ressourcen (s. Tab 5) gefiltert. Am wichtigsten war aber die Automatisierbarkeit der Programme. Bis auf der GetOrganelle konnte für jedes Programm eine Automatisierbarkeit erwirkt werden, ohne Daten außen vor zu lassen. Der GetOrganelle benötigt das Öffnen der fastg-Datei in einem Visualisierungsprogramm für fastg-Graphen, hier wird Bandage empfohlen. Bandage hat allerdings eine schlechte Kommandozeilen-Anbindung wodurch auch keine Automatisierbarkeit durch Skripts erfolgen konnte. Es wurde versucht, dass fcg.pl Skript aus dem chloroExtractor, welches genau diesen Schritt im chloroExtractor automatisiert, zu verwenden um auch beim GetOrganelle eine Automatisierbarkeit zu erreichen. Doch führte dies nur bei sehr wenigen Daten zum Erfolg, da der GetOrganelle die von SPAdes erstellte fastg-Datei versucht zu verbessern, und die getrimmte Datei nicht mehr vom fcg.pl Skript verwendet werden kann. Dies passiert wohl, weil der GetOrganelle beim verbesserten fastg-Graphen versucht Namen und Sequenzen anzupassen, womit das fcg.pl Skript nicht zurecht kommt. Es wurde auch versucht die roh fastg-

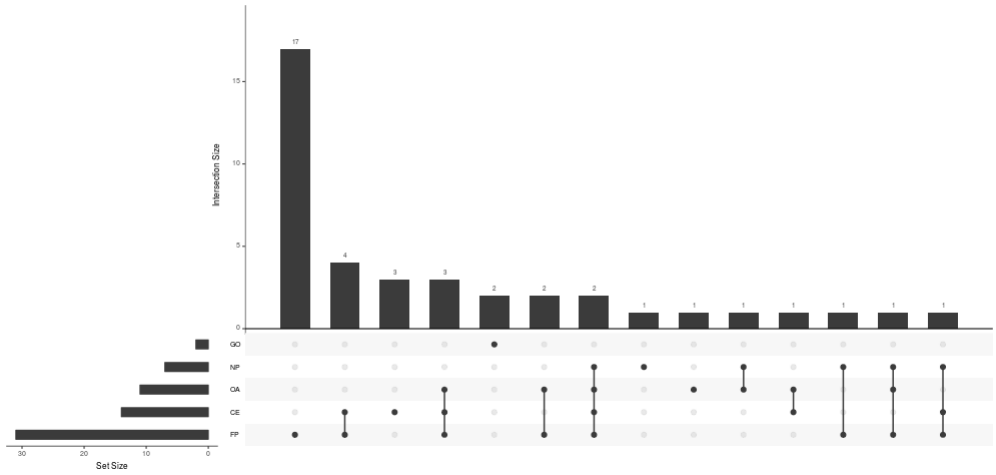


Abbildung 9: **Upset Diagramm GO-Preprint** Hier wird gezeigt wie sich die einzelnen Erfolge auf die 40 Stück aufteilen. So schafft der fast-plast 17 Chloroplasten welches kein anderes Tool schafft. Fast-plast und chloroExtractor haben vier Erfolge gemeinsam, der chloroExtractor schafft drei Chloroplasten welche kein anderes Programm schafft. usw. So werden 35 der geschafften 40 durch fast-plast und chloroExtractor abgedeckt.

Dateien des GetOrganelle zu benutzen dies ergab zwar eine Automatisierbarkeit, doch würden so Teile des GetOrganelles, nämlich das verbessern der fastg-Datei unterschlagen. Die Laufzeiten der Programme unterscheiden sich sehr, von 30 Minuten bis über eine Stunde, auch die RAM werte sind sehr unterschiedlich, diese reichten von wenigen 20 Gigabyte bis zu 60 Gigabyte. All diese Werte sind Durchschnittswerte, da verschiedene Größen von Dateien als Eingabe verwendet wurden. Da nicht alle Dateien die gleiche Anzahl an Reads hatten, sowie die Größen der einzelnen Reads sich unterschieden. Diese reichten von 75 Basenpaare bis zu 300 Basenpaare, Anzahl der Reads und somit Größe der Dateien reichten von eine Million Reads bis zu fünf Millionen Reads. Die Laufzeiten sind, vor allem bei Programmen mit vielen Abhängigkeiten, erhört. Da zum nutzen der Dockercontainer Singularity [18] verwendet wurde. Die Programme welche in den oben genannten Punkten überzeugt haben, sind der fast-plast und der chloroExtractor. Der fast-plast benötigt zwar die meisten Ressourcen und ist nicht der schnellste, aber hat mit Abstand die größte Erfolgschance. Zudem ist er voll automatisierbar und erreicht dies mit den vorgegebenen Standard Parametern. Als zweites Programm wird der chloroExtractor verwendet, dieser ist schnell, ressourcenarm und hat, nach dem fast-plast, die zweit höchste Erfolgsrate. Mit beiden Programmen konnten 35 von den 40 Erfolgen von 57 Chloroplasten der GetOrganelle-Preprint Daten berechnet werden. Zudem haben diese beiden Programme die wenigsten Probleme bei der Handhabung wie auch bei der Installation zu Beginn gemacht. Sie sind durch die gegebenen Parameter einfach zu verwenden und zu Automatisieren. Die von den Programmen geschriebenen Log Dateien sind einfach gehalten, um dem Ablauf zu folgen, und klar verständlich. Der fast-plast

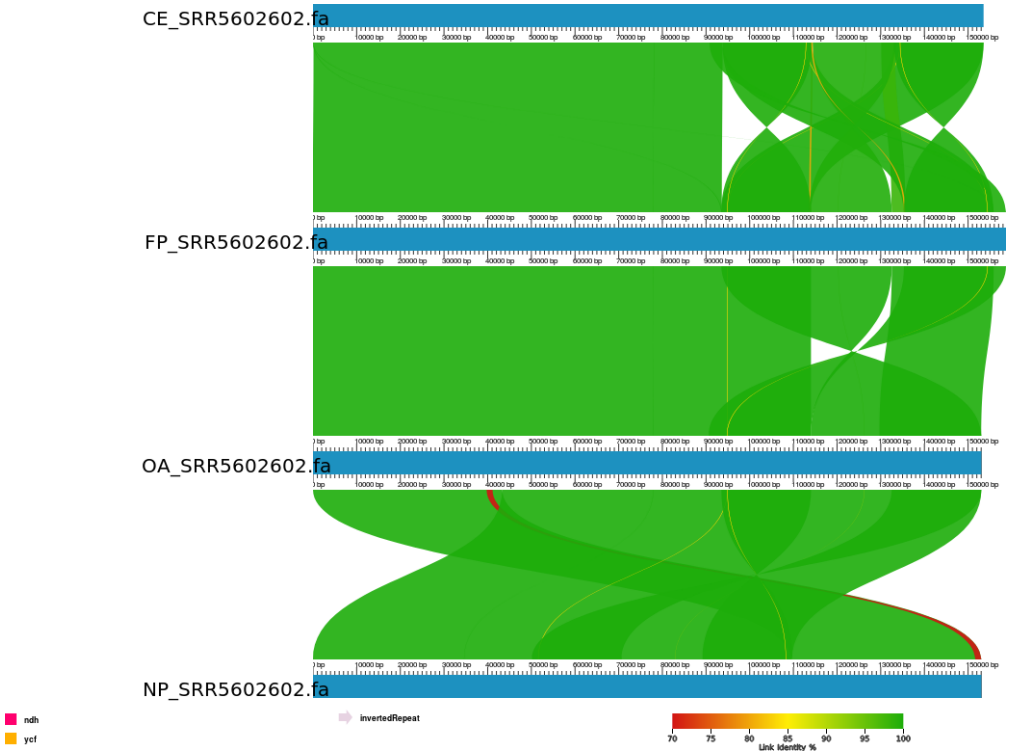


Abbildung 10: **AliTV SRR5602602 - *Laurus nobilis*** Daten des GO-Preprints, geschafft von ChloroExtractor, NOVOPlasty, fast-plast und Org.ASM. Orientierung von LSC sowie von SSC und IRs können nicht perfekt aufgelöst werden und können durchaus Verdreht sein.

Tabelle 5: **Laufzeit und Ressourcenverbrauch** Alle Laufzeiten sind Durchschnittswerte (getrimmtes Mittel), RAM werte zu Peakzeiten. Die Laufzeiten reichen von 30 Minuten (chloroExtractor) bis zu 100 Minuten (IOGA), die RAM Nutzung unterschied sich auch erheblich, diese reichen von 20 GB (chloroExtractor) bis hin zu 60 GB (fast-plast). Aufgrund der Nutzung von verschieden großen Datensätzen können nur Durchschnittswerte Angegeben werden.

Tool	Laufzeit	RAM
CE	~ 30 min	~ 20 GB
FP	~ 60 min	~ 60 GB
GO	~ 40 min	~ 50 GB
IOGA	~ 100 min	~ 40 GB
NP	~ 30 min	~ 30 GB
OA	~ 60 min	~ 30 GB

gibt sogar drei dieser Dateien aus, da er unterscheidet zwischen Warn- und Fehlermeldungen sowie Standard Meldungen, sowie eine Datei für den Output der eingebundenen Programme. Der chloroExtractor gibt seine kompletten Meldungen über ein übergeordnetes Programm aus, welche den Ablauf steuert (PipeWrap). Dieses Programm gibt alles auf STDERROR aus und kann damit einfach mit geloggt werden. In diesem Fall wurde über die Slurm-Datei, welche von dem verwendeten queueing System ausgegeben wird(SLURM [19]) mit geloggt. Diese beiden Programme wurden auf allen Daten, des 1001 Genom Projekts, laufen gelassen, um möglichst viele Chloroplasten zu generieren.

4.6 1001 Genom Projekt

Ziel so viele Chloroplasten wie möglich vollautomatisch aus kompletten Genom Datensätze zu erzeugen, wofür zwei Programme ausgewählt worden sind, wurde zunächst auf Datensätzen des 1001 Genom Projekt versucht. Von den 1135 Datensätzen welche im 1001 Genom Projekt gesammelt wurden, konnten 946 Datensätze erfolgreich von NCBI heruntergeladen werden. Die restlichen 189 konnten nicht richtig heruntergeladen werden aufgrund von Downloadfehlern. Hier handelte es sich um andauerndes Problem, da mehrere male versucht wurde diese Datensätze herunter zu laden. Zudem waren 47 Datensätze keine paired-end Datensätze, und konnten deshalb nicht verwendet werden. Von diesen 899 restlichen Datensätzen konnten mit dem fast-plast und dem chloroExtractor 303 komplette zirkuläre Chloroplasten vollautomatisch gebaut werden, dies entspricht etwa 34%. (Tab. 6).

Tabelle 6: **Datensatz: 1001 Genom Project** SUCCESS, echte zirkuläre Chloroplasten. Error, Fehler oder Abbrüche im Programm. Partial, keine zirkulären Chloroplasten aber Contigs richtig identifiziert. Incomplete, Nicht richtig identifizierte Chloroplasten.

Tool	SUCCESS	%	ERROR	PARTIAL	INCOMPLETE
CE	136	~15%	54	3	706
FP	266	~30%	29	11	593
Summary	303	~34%	-	-	-

4.7 Varianzanalyse

Um die Varianzanalyse durchzuführen, und vor allem zu überprüfen ob die Assembler bzw. die Programme an sich einen Einfluss darauf haben, indem sie z.B. zufällige Seeds verwenden oder zufällige Daten bevorzugen, wurden 89 Datensätze des 1001 Genom Projekts verwendet. Diese 89 Datensätze zeichnen sich dadurch aus, dass sowohl der chloroExtractor als auch der fast-plast diese zu vollständigen Chloroplasten zusammengebaut haben. Diese Datensätze wurden noch zehn weitere Male berechnet. So wurden auf elf mal 89 Datensätzen überprüft welche Einflüsse die Programme auf die Varianz haben. Der chloroExtractor und somit der Assembler SPAdes brachte bei allen elf Durchläufen die exakt gleichen Sequenzen heraus. Dieses Programm arbeitet also 100% Reproduzierbar (Abb. 12). Im Gegensatz dazu der fast-plast, dieser schaffte es nicht wieder bei allen elf Durchläufen alle Chloroplasten wieder korrekt zusammenzubauen, bei bis zu neun verschiedenen Datensätzen konnte kein Erfolgreiches Ergebnis erzielt werden(Abb. 11). Interessanterweise waren nicht immer die selben Datensätze betroffen, so konnten bei einigen Durchläufen ein Erfolg erreicht werden, bei dem nächsten Durchlauf aber nicht. Ob dies ein Zufallseffekt des Programms, oder der verwendeten Rechner-Infrastruktur ist, konnte nicht überprüft werden. Die zweite Varianzanalyse bzw. SNP calling wurde auf allen erfolgreich zusammengebauten Chloroplasten durchgeführt. Das SNP calling ergab, dass auf allen 303 Chloroplasten insgesamt 2128 SNPs gefunden wurden. Diese Ergebnisse werden für die GWAS-Analyse verwendet.

4.8 GWAS

Die GWAS Analyse, welche mit den 303 kompletten Chloroplasten aus den Daten des 1001 Genom Projekts und den 2128 gefunden SNPs durchgeführt wurde, konnte nur auf zwei verschieden Traits berechnet werden. Dies waren die Eigenschaften Flowering Time bei 16°C sowie bei 10°C. Dies sind die beiden Traits am besten untersucht sind und deswegen auch die meisten Daten beinhalten. Für alle anderen Traits konnten keine Berechnungen erstellt werden da die Datenmenge nicht für eine GWAS ausreichend ist.

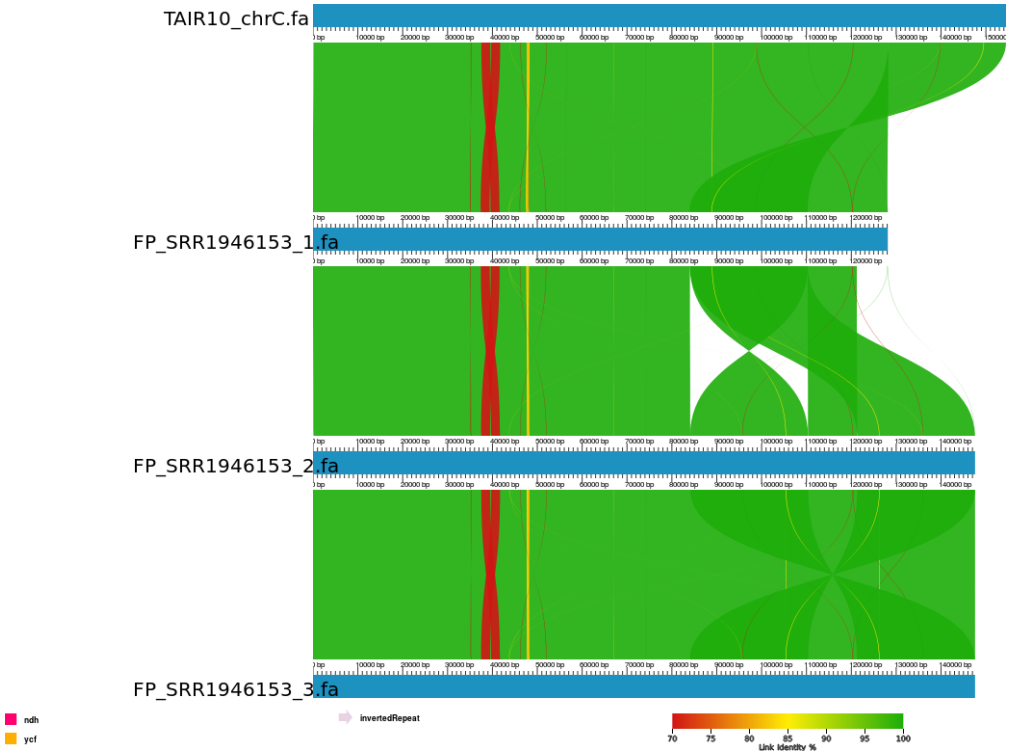


Abbildung 11: **fast-plast SRR1946153** Drei verschiedene Läufe auf den selben Daten, der fast-plast schafft einen davon nicht (Lauf 1), den anderen aber schon (2 u. 3). Hier fehlt ein Teil des IR, wodurch auch nicht als Erfolg gewertet wird.

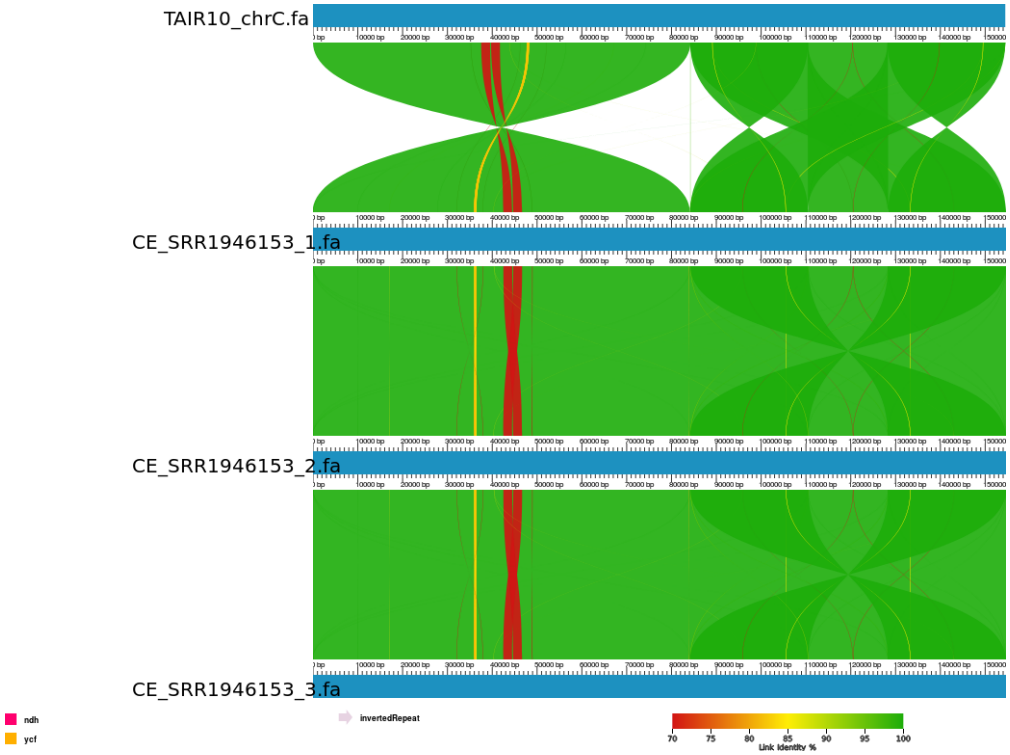


Abbildung 12: **chloroExtractor SRR1946153** Drei verschiedene Läufe auf den selben Daten, der chloroExtractor bringt das gleiche Ergebnis für alle Durchläufe. Da die Orientierung von LSC, SSC und IR nicht aus short Reads heraus gelesen werden kann, kommt es vor das diese Verdreht sind zur Referenz.

4.9 Strukturvarianzanalyse

Für die Strukturvarianzanalyse konnten keine Ergebnisse erzielt werden. Grund hierfür war unter anderem fehlende Zeit. Aber auch konnten keine Programme gefunden werden welche mit kompletten Chloroplasten umgehen konnten. Die meisten nutzten direkt Illumina short reads, wie Delly[65, 67] oder Breakdancer[66, 68].

4.10 Neue Chloroplasten

Aus NCBI wurden 79657 Datensätze heruntergeladen, dies sind alles Pflanzengenome. Diese Liste wurde mit den Einträgen von CpBase (stand 20.06.2018, 2069 Genome von 942 verschiedenen Spezies)verglichen. Es blieben die übrig welche keinen Eintrag in CpBase haben. Von diesen 79657 blieben nur 49 Datensätze. Diese wurden auf fast-plast und chloroExtractor benutzt und es wurden 17 zirkuläre Chloroplasten erfolgreich zusammengebaut (s. Tab. 7). Somit wurden 17 neue Chloroplasten von Spezies welche zuvor noch keinen genomisch bekannten Chloroplasten hatten erfolgreich erstellt (s. Tab. 8).

Tabelle 7: **Neue Chloroplasten** Von den 49 Spezies welche bisher noch keinen Eintrag in CpBase hatte konnten mit Hilfe des fast-plasts und des chloroExtractors 17 neue bisher nicht bekannte Chloroplasten Genome gebaut werden

Tool	SUCCESS	ERROR	PARTIAL	INCOMPl	Total
CE	4	20	16	9	
FP	15	7	22	5	
Summary	17	-	-	-	49

5 Diskussion

5.1 Definition von Success, Einteilung der Erfolge über Genom Länge.

Jegliche Einteilung in die Erfolgskategorien: Success, Partial, Incomplete_high und Incomplete_low und Error werden von einem Skript übernommen, welches zunächst den SeqFilter benutzt um Informationen über diese Datei zu erhalten. Der SeqFilter zählt die Sequenzen sowie deren Größe. Das Evaluationsskript des jeweiligen Programms teilt aufgrund dieser Daten in die Kategorien ein (s. Tab. 1). Diese Variante ist zwar voll automatisiert doch nicht fehlerlos, so können falsch positive Sequenzen vorkommen. Dies könnte eine Sequenz aus 150 kbp Adenin sein, und das Skript würde es als einen Success

[67] Rausch T, Zichner T, Schlattl A, et al. (2012) Delly: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. Bioinformatics, `https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts378`

[68] Chen K, Wallis JW, McLellan MD, et al. (2009), BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation, Nature Methods `10.1038/nmeth.1363`

Tabelle 8: **Liste neue Chloroplasten** Liste von 17 Spezies welche mit Hilfe des fastplast und des chloroExtractors nun ein bekanntes Chloroplasten Genom besitzen.

SRA	Spezies
DRR057122	*Momordica charantia*
DRR089517	*Betula chichibuensis*
ERR1462646	*Hippophae rhamnoides*
ERR2001942	*Betula pendula*
ERR2003066	*Potentilla micrantha*
ERR2174632	*Solanum pennellii*
ERR2187925	*Geum urbanum*
SRR1503730	*Agave tequilana*
SRR2847417	*Manihot glaziovii*
SRR3194007	*Artocarpus altilis*
SRR3724930	*Taraxacum S3*
SRR4457832	*Pityopsis pinifolia*
SRR5046394	*Ephedra gerardiana*
SRR5464169	*Trema orientalis*
SRR5590327	*Lagenaria siceraria*
SRR5799057	*Fragaria vesca*
SRR5838021	*Populus deltoides*

ansehen. Die Daten wurden Stichprobenartig überprüft und dies kam in diesen Stichproben nicht vor, doch ist es nicht auszuschließen. Um sicher zu gehen müsste jeder erstellter Chloroplast auf eine Referenz gemapt werden oder sogar durch Sequenzierung bestätigt werden. Erste Möglichkeit wäre nur Rechenaufwand, könnte aber bei Chloroplasten, die noch nicht veröffentlicht wurden oder keine Referenz besitzen schwer werden, zweite Möglichkeit ist sehr Kosten intensiv würde aber letzte Zweifel beseitigen. Eine Verbesserung des Skripts könnte auch eine strengere Beurteilung sein, zumindest wenn man mehr Grundinformationen hat. So könnten bei den Versuchen mit den *A.thaliana* des 1001 Genom Projekts die Grenzen strenger gewählt werden, da es sich hier immer um die gleiche Spezies handelt. Doch könnten somit die Anzahl der falsch negativen erhöht werden, z.B. wenn eine *A.thaliana* Art eine Strukturvariante besitzt, mit dem Verlust eines IR. Die Grenzen wurden bewusst großzügiger gewählt, da dies den größten Teil der Chloroplasten abdecken dürfte. Gerade bei Chloroplasten, welche bisher nicht veröffentlicht oder bekannt sind ist eine Abschätzung schwer, da die Größen von Chloroplasten doch sehr variieren können. Eine weitere Möglichkeit zu testen ob es sich wirklich um einen Chloroplasten handelt wäre die Verwendung von Benchmarking Universal Single-Copy

Orthologs (BUSCO[69]), hierzu werden extrem konservierte orthologe Gene verwendet und überprüft ob diese alle vorhanden sind. Da ein Chloroplastgenom an sich sehr konserviert ist könnte eine Anzahl von Genen genommen werden und diese in einem solchen Modell verwendet werden.

5.2 Die Entscheidung für fast-plast und chloroExtractor

Es wurde im Ergebnisteil erklärt warum gerade der fast-plast und der chloroExtractor weiter verwendet wurden. Doch gibt es auch Gründe, warum sich speziell gegen andere Programme entschieden wurden. So wurde sich gegen den IOGA entschieden, nicht nur weil er langsam ist sondern auch weil er keinerlei Log-Datei während des Prozesses schreibt, erst wenn dieser komplett beendet ist. So war vor allem zu Beginn schwer nachzuvollziehen, ob der IOGA nun wirklich noch Arbeitet oder evtl. in irgendeinem Loop fest hängt oder sogar aufgehört hat zu arbeiten aber den Prozess nicht beendet hat. Auch wurde der IOGA zum letzten mal vor zwei Jahren geupdated, es scheint also keine regelmäßige Wartung oder Verbesserung statt zu finden. Es wurde sich auch gegen den NOVOPlasty entschieden, dieser benötigt zwar keine Abhängigkeiten, da er komplett in Perl geschrieben ist, doch hat dies einige Probleme mit sich gebracht. So werden z.B. nicht alle Read-Header richtig eingelesen, wenn der dazugehörige Reguläre Ausdruck (Regular Expresion - RegEx) nicht komplett passt. Dies kam häufiger vor, da nicht alle Header gleich aufgebaut sind und wohl ein paar nicht in der RegEx abgedeckt wurden. Das zweite Problem mit NOVOPlasty ist die Konfigurationsdatei, diese muss exakt dem Beispiel entsprechen und darf nicht ein Zeichen mehr oder weniger enthalten, oder gar Zeilen. Da diese Datei nicht über RegEx eingelesen wird, sondern Zeile für Zeile durchgegangen wird. So kam es gerade am Anfang vor, dass der NOVOPlasty gar nicht funktionierte, da ein Leerzeichen in einer nicht verwendeten Option fehlte. Der NOVOPlasty scheint noch regelmäßig geupdated zu werden, doch änderte sich bei diesen Updates der Aufbau der Konfigurationsdatei, weswegen jedes mal das Skript zum erstellen dieser Datei umgeschrieben werden musste. Auch warf der NOVOPlasty Fehler, in denen gesagt wird, dass der Seed nicht lesbar oder inkompatibel sei. Doch wurde bei jedem Versuch als Seed die gleiche Datei verwendet, und dieser Fehler trat nur ab und zu auf. Der Org.ASM brachte zwar erfolgreiche Ergebnisse, im Vergleich würde er auf dem dritten Platz landen, doch gab es einige Probleme bei der Installation. Nur in einem Dockercontainer mit einigen Tricks konnte es geschafft werden, dieses Programm erfolgreich zu installieren. Der GetOrganelle konnte zwar mit dem fcg.pl Skript des chloroExtractors automatisiert werden, doch unterschlägt dies dann das eigentliche Endprodukt des GetOrganelles, da das verbesserte bzw. getrimmte Fastg nicht vom fcg.pl Skript erkannt wurde und deshalb nur das Fastg aus SPAdes selbst verwendet werden kann, dies aber häufig schlechter Ausfällt als das getrimmte.

[69] Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P,et al. (2015), BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics, 10.1093/bioinformatics/btv351

5.3 Fazit aus der Erfolgschance

Es wurden in dieser Arbeit 303 Chloroplasten Genome von *Arabidopsis thaliana* und 40 von verschiedenen Spezies (GO-Preprint) sowie 17 neue (s. Tab. 8) erstellt. Nimmt man von den Versuchen die gesamt Zahl, so konnten in etwa 35% der Datensätze zu Chloroplastengenomen führen. Dies entspricht mehr als am Anfang der Arbeit angenommen, hier wurden in etwa 10 - 20% geschätzt[47]. Allerdings auch ohne die anderen Programme, abgesehen von chloroExtractor und org.ASM, getestet zu haben. Nimmt man den nur die Erfolgschance von chloroExtractor war diese erste Abschätzung gar nicht so schlecht.

5.4 Erhöhen der Erfolgsrate

Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie eine Erfolgsrate erhöht werden könnte. So könnte versucht werden, auf die Daten speziell die Start Parameter festzulegen. Dies würde allerdings einiges an Tests benötigen. Auch könnten die Parameter jedes mal geändert werden, dann aber unter dem Verlust einer Automatisierbarkeit. In diesen Versuchen wurden verschieden Große Datensätze verwendet, und es lässt sich nicht sagen ob eine Erhöhung dieser einen echten Vorteil bringen würde, hierzu müssten alle Daten noch einmal gestartet werden, dann mit erhöhten oder niedrigeren Readmengen. Theoretisch kann dies einen Zuwachs an Erfolg bringen, wenn das verwendete Programm denn auch alle Daten verwendet, die es bekommt und nicht irgendeinen Cutoff ab einer bestimmten Daten bzw. Read Menge hat. Wenn die kompletten Daten verwendet werden würden hätte dies auch den Vorteil, dass man sicher gehen kann, dass die Daten nicht sortiert wurden, indem man diese einfach nochmal durchmischt. Dies ist wichtig, vor allem bei Programmen welchen einen Cutoff benutzen, denn hier könnte es vorkommen, dass wenn eine Datei sortiert ist Chloroplasten-Reads am Ende der Datei liegen und diese somit gar nicht erst benutzt werden. Dennoch ist zu beachten, je mehr Daten natürlich verwendet werden, desto länger brauchen die Programme. Zudem kommt eine erhöhte Download Zeit und evtl. die Zeit die gebraucht wird um die Dateien zu mischen bevor diese für die Programme verwendet werden können.

5.5 Etablieren einer einfachen scanning Routine

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine voll automatische Lösung für das Scannen von Chloroplasten in Pflanzengenom-Daten möglich und auch erfolgreich ist. Die hier verwendeten Skripte können frei verwendet und angepasst werden. Doch kann dies alles auch in einem kompletten Dockercontainer benutzt werden. Der chloroExtractorTeam Screening Container[70], kann verwendet werden um komplett automatisch die Daten von NCBI herunter zu laden, diese zu mischen (mit einem festen Seed) und dann den chloroExtractor und den fast-plast zu verwenden um diese Daten zu verarbeiten. Hierzu muss lediglich der Container gestartet werden und der run.sh Befehl mit der passenden SRA Nummer gegeben werden. Dieser Container wird gerade verwendet um weitere 12393 Datensätze zu durchsuchen und Chloroplasten zu bauen. Diese Container ist sehr einfach zu

[70] `https://github.com/chloroExtractorTeam/screening_container`

benutzen, und alles was dafür gebraucht wird ist Docker[49] oder ein Programm welches Dockercontainer ausführen kann wie z.B. Singularity[18].

5.6 GWAS

Es wurde eine GWAS Studie auf den 303 *A.thaliana* Chloroplasten durchgeführt, doch konnte dies nur auf zwei verschiedenen Eigenschaften berechnet werden. Hierzu gehört die Flowering Time bei 16°C sowie bei 10°C. Die restlichen Arapheno Traits konnten nicht berechnet werden. Dies ist vor allem der Fall, da zu wenige Daten zur Verfügung stehen, sowohl von unserer Seite aus als auch von der Eigenschaften Seite aus. Eigenschaften wie Größen, Blütenbreite oder Form sind nicht gut genug Katalogisiert um eine geringe Datenmenge, wie sie hier benutzt wurde abzudecken. Dies heißt nicht dass keinerlei Assoziation zwischen Chloroplasten Varianz und diesen Eigenschaften besteht. Dies zeigt lediglich, dass noch mehr Daten benötigen werden um diese GWAS Studie zu beenden.

5.7 Strukturvarianz

Es wurde angenommen, dass ein kompletter Chloroplast für eine Strukturvarianzanalyse einen großen Vorteil bringt, im Vergleich zu Illumina short Reads. Diese sind häufig zu kurz um große Invertierungen oder neu Anordnungen zu überspannen. Leider konnte diese Annahme nicht überprüft werden, da zu wenig Zeit vorhanden war. Als auch Programme, welche eine solche Analyse durchführen nicht erfolgreich benutzt werden konnten.

5.8 Fazit und Zukunftsaussichten

Chloroplastengenome können vielseitig verwendet werden und mit der immer steigenden Anzahl dieser Genome können mehr und mehr Analysen durchgeführt werden. Hier wurde eine Möglichkeit gezeigt wie man solche Chloroplastengenome aus bereits existierenden Daten bauen kann. Dies ist aber nur möglich da alle Daten, dank Open Science, öffentlich verfügbar waren. Es wurden 360 Chloroplasten aus bereits vorhandenen Daten erzeugt, die meisten aus *Arabidopsis thaliana* Daten, die vom 1001 Genom Projekt verwendet wurden. Es wurden aber auch 17 neue Chloroplastengenome erzeugt. Zudem wurde ein erster Ausblick auf die verschiedenen Analysen gegeben welche mit Chloroplastengenomen möglich sind. Schaut man sich die Updates der verschiedenen Programme an, so wird ein Teil davon immer noch geupdated bzw. verbessert. Dies führt evtl. dazu, dass mehr Chloroplastengenome gebaut werden können. Je mehr Chloroplastengenome mit der Zeit verfügbar werden, desto mehr Analysen können mit diesen Chloroplasten durchgeführt werden. So zeigte sich hier, bei dem Versuch einer GWAS, dass es bei zu wenigen Daten zu Problemen kommen kann. Diese Arbeit zeigt vor allem eines, es ist durch Automatisierung möglich Chloroplastengenome aus pflanzlichen Sequenzdaten zu bauen. Dank der Automatisierung ist hier lediglich Rechenpower vonnöten. So können in Zukunft noch viel mehr Chloroplastengenome erzeugt werden.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

7 Anhang

7.1 Dockercontainer

Tabelle 9: **Dockercontainer** Alle erstellten Dockercontainer stehen zur freien Verfügung.

Programm	Dockerhub link
chloroExtractor	`https://hub.docker.com/r/chloroextractorteam/chloroextractor/` Build: b5uvjvdnbcyndhjngua85nv
fast-plast	`https://hub.docker.com/r/chloroextractorteam/fast-plast_docker/` Build: bgrmngfwpil4sk2kezi9f
NOVOPlasty	`https://hub.docker.com/r/chloroextractorteam/novoplasty_docker/` Build: bf9adepndze96bcnteyeabk
IOGA	`https://hub.docker.com/r/chloroextractorteam/ioga_docker/` Build: bwnf4xtzhohfcstqjqsvqvw
GetOrganelle	`https://hub.docker.com/r/chloroextractorteam/getorganelle_docker/` Build: bwt3bus2r7utsjpgrmjmjuc
Org.ASM	`https://hub.docker.com/r/chloroextractorteam/org.asm_docker/` Build: bmcx88c2d79orvuykgivy4q
Screening Container	`https://hub.docker.com/r/chloroextractorteam/screening_container/` Build: bdsankaqpukcgfmkmdq9yud

Tabelle 10: **Git Links** Alle verwendeten Programme stehen zur freien Verfügung.

Programm	git link
chloroExtractor	`https://github.com/chloroExtractorTeam/chloroExtractor`
fast-plast	`https://github.com/mrmckain/Fast-Plast`
NOVOPlasty	`https://github.com/ndierckx/NOVOPlasty`
IOGA	`https://github.com/holmrenser/IOGA`
GetOrganelle	`https://github.com/Kinggerm/GetOrganelle`
Org.ASM	`https://git.metabarcoding.org/org-asm/org-asm`
Screening Container	`https://github.com/chloroExtractorTeam/screening_container`

7.2 Danksagung

Ich möchte allen danken, welche mich in meiner Zeit als Student vor allem in den letzten Semestern unterstützt haben. Zunächst danke ich dem kompletten CCTB, in dem ich in den letzten Semestern mit mehr als nur Kollegen zusammenarbeiten durfte. Hier möchte ich im besonderen meinen Betreuern Markus Ankenbrand und Jörg Schulz danken, welche sich die Zeit nehmen müssen diese Arbeit zu korrigieren und immer mit Rat zur Seite standen. Speziell möchte ich auch meinen ganz besonderen Dank an Frank Förster aussprechen, der uns mehr als nur beratend zur Seite stand und mehrere Nächte geopfert hat um unseren chloroExtractor zu verbessern und zu fixen. Auch möchte ich aber meiner kompletten Familie danken, meinen Eltern Roland und Maria, sowie meinen beiden Brüdern Florian und Christopher, sowie meinem Bruder im Geiste Martin LöwePiekar, sowie natürlich den Damen, welche es mit diesen drei Chaoten aushalten, die da wären Vanessa, Julia und Charlotte. Natürlich danke ich auch all meinen anderen Freunden, welche es mit mir all die Jahre ausgehalten haben, und dies planen noch weiter zu tun, so wie der World of Warcraft Community, der Gilde Maestri delle Arte und dem Raid Invictus, welche mich immer gut unterhalten haben, und das ein oder andere mal evtl. auch zu viel von der Arbeit abgehalten haben. Auch geht mein Dank an Kaffee, vielen dank für die Substitution von Schlaf mit Koffein.

7.3 Skripte

Alle verwendeten Skripte können gefunden werden unter:
`https://github.com/chloroExtractorTeam/chloroplast_landscape/tree/Documentation_SPfaff` Zudem sind diese auf der beiliegenden CD zu finden.

7.4 Tabellen

Alle Ergebnis Tabellen können eingesehen werden unter:
`https://github.com/chloroExtractorTeam/chloroplast_landscape/tree/Documentation_SPfaff` Zudem sind diese auf der beiliegenden CD zu finden.

Eigenständigkeitserklärung

ERKLÄRUNG gemäß ASPO vom 5.8.2009 § 23 Abs. 10

Hiermit versichere ich, dass ich vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit bisher oder gleichzeitig keiner anderen Prüfungsbehörde unter Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Würzburg, 8. August 2018 Simon Pfaff