

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

Simon Pfaff



Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Fakultät für Biologie

Master_thesis_GER

Simon Pfaff

August 4, 2018



Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Betreuer: Dr. Markus Ankenbrandt

Betreuer: Prof. Dr. Jörg Schulz

Betreuer: Dr. Frank Förster

Lehrstuhl für Bioinformatik

Center for Computational and Theoretical Biology

Contents

1	Zusammenfassung / Abstract	4
1.1	Deutsch	4
1.2	English	4
2	Einleitung	4
2.1	Chloroplasten	4
2.2	Big Data	5
2.3	Open Science	8
2.4	Daten in Daten	8
2.5	Verwendete Programme und ihre Ansätze	9
2.5.1	chloroExtractor	10
2.5.2	fast-plast	12
2.5.3	NOVOPlasty	12
2.5.4	Org.ASM	12
2.5.5	GetOrganelle	12
2.5.6	IOGA	13
2.6	Interesse an Chloroplasten, was tun damit mit diesen Daten?	13
2.7	Aufgaben in der Master Thesis	14
3	Material / Methoden	15
3.1	Evaluation der Programme	15
3.1.1	Testdaten	15
3.1.2	Welche Programme werden weiter verwendet.	16
3.2	Erzeugen von Chloroplasten aus genomischen Daten	18
3.3	Varianz Analyse	18
3.4	GWAS	19
3.5	Struktur Varianz Analyse	19
3.6	Neue Chloroplasten	19
4	Ergebnisse	20
4.1	Automatisierung	20
4.2	Daten: Simulierte Daten	20
4.3	Daten: 1001 Genom Projekt, 11 Testdatensätze	22
4.4	Daten: GO-Preprint	22
4.5	Die besten Programme: fast-plast und chloroExtractor	23
4.6	1001 Genom Projekt	27
4.7	Varianz Analyse	27
4.8	GWAS	28
4.9	Struktur Varianz Analyse	30
4.10	Neue Chloroplasten	30

5	Diskussion	30
5.1	Definition von Success, Einteilung der Erfolge über Genom Länge.	30
5.2	Die Entscheidung für fast-plast und chloroExtractor	32
5.3	Fazit aus der Erfolgchance	33
5.4	Erhöhen der Erfolgsrate	33
5.5	Etablieren einer einfachen Scanning Routine	33
5.6	GWAS	34
6	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	34
7	Anhang	35
7.1	Tabellen	35

1 Zusammenfassung / Abstract

1.1 Deutsch

In der heutigen Big Data Ära, werden immer 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 Genom Daten, Chloroplasten Genome 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 denen Chloroplasten Genome einfach aus Pflanzen Genomen extrahiert werden können.

1.2 English

In today's Big Data Era, every day new data is created. But this is not necessary to get new informations. In older data oftentimes hides other data, which may not be used till today. Since open science is growing in the last years, many of this data is freely accessible. In this case, plant whole genom batch data is used. This data oftentimes includes chloroplast genom data, when in the sequencing process nobody removed it by cellnucleus extraction. There were different tools which provided a suit to extract this chloroplast genome data from plant genom data. They were tested, compared and the best were used to calculate alot of chloroplast genomes. This chloroplast genomes got analyzed with different methodes. 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, alle Pflanzen besitzen diese und nutzen sie um Energie in Form von ATP durch Photosynthese zu erzeugen¹. Ihr Genom gilt als hoch konserviert, sowohl in der Gen Orientierung als auch dem Gen Inhalt ², dieser besteht zwischen 100 und 200 Genen³. Das Genom ist in etwa 30 bis 60 Mikrometer lang und besitzt eine Masse von ungefähr 80 - 130 Millionen daltons⁴. Chloroplasten zeigen eine auffällige Genom Struktur, das Genom ist ein Plasmid welches sich in drei Teile aufteilt. Dem

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

²Raubeson and Jansen 2005

³Howe, C. J. (2016). Chloroplast Genome. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). 10.1002/9780470015902.a0002016.pub3

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

Large Single Copy, dem Small Single Copy, welche beide durch zwei Inverted repeats unterbrochen sind (Fig. 1)⁵. Chloroplasten zeigen eine viel geringere Substitutionsraten als in Genomischer DNA, diese ist noch einmal signifikant geringer in den Inverted repeat Regionen⁶. 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 besitzen⁸. Vor allem in gezüchteten Nutzpflanzen finden sich auch Invertierungen des IR⁹. Durch ihre hohe Konservierung sind Chloroplasten und ihre Gene sehr gut für Barcoding geeignet¹⁰. Mit diesem Barcoding können Pflanzen und ihre Varianten identifiziert werden. Neue Studien zeigen, dass der komplette Chloroplast selbst als ein Art "Ultra-barcode" verwendet werden könnte, da die Variation in Chloroplasten in einer Spezies doch mehr variiert als angenommen¹¹.

Die Gene auf einem Chloroplasten lassen sich in verschiedene Klassen einteilen (Fig. 2). Zunächst gibt es die Gene welche für die Photosynthese wichtig sind, hier unterteilt man nochmal in Photosystem I (psaA, 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 konservierten Open Reading Frames (ORFs) genannt ycfs (Hypothetical chloroplast open reading frames) und potentiell Codierende Gene wie matK und cemA¹². Vor allem stark konservierte Gene wie rbcL und matK und cemA werden häufig für Barcoding oder zum berechnen von phylogenetischen Bäume verwendet.

2.2 Big Data

Die Big Data Ära zeichnet sich vor allem durch die Flut an Daten aus welche kaum zu Bewältigen ist. Im biologischen Sinne zeichnet sich diese Flut an Daten vor allem

⁵Shaw, J.; Lickey, E. B.; Schilling, E. E.; Small, R. L. (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.

⁶Wolfe et al. 1987

⁷Alonso-Blanco C, Andrade J, Becker C, Bemm F, Bergelson J, Borgwardt KM, et al. 1135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. 2016;166(2):481–491. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.063

⁸Jansen RK, Wojciechowski MF, Sanniyasi E, Lee S-B, Daniell H. 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*. 2008;48(3):1204-1217. 10.1016/j.ympev.2008.06.013.

⁹Palmer et al. 1988

¹⁰Song, Y.; Wang, S.; Ding, Y.; Xu, J.; Li, M.F.; Zhu, S.; Chen, N. Chloroplast genomic resource of *Paris* for species discrimination. *Sci. Rep.* 2017, 7, 3427–3434

¹¹Kane et al. (2012)

¹²Vydianathan, Ravi & P. Khurana, J & K. Tyagi, A & Khurana, Paramjit. (2007). An update on chloroplast genome. *Plant Systematics and Evolution*. 271. 101-122. 10.1007/s00606-007-0608-0.

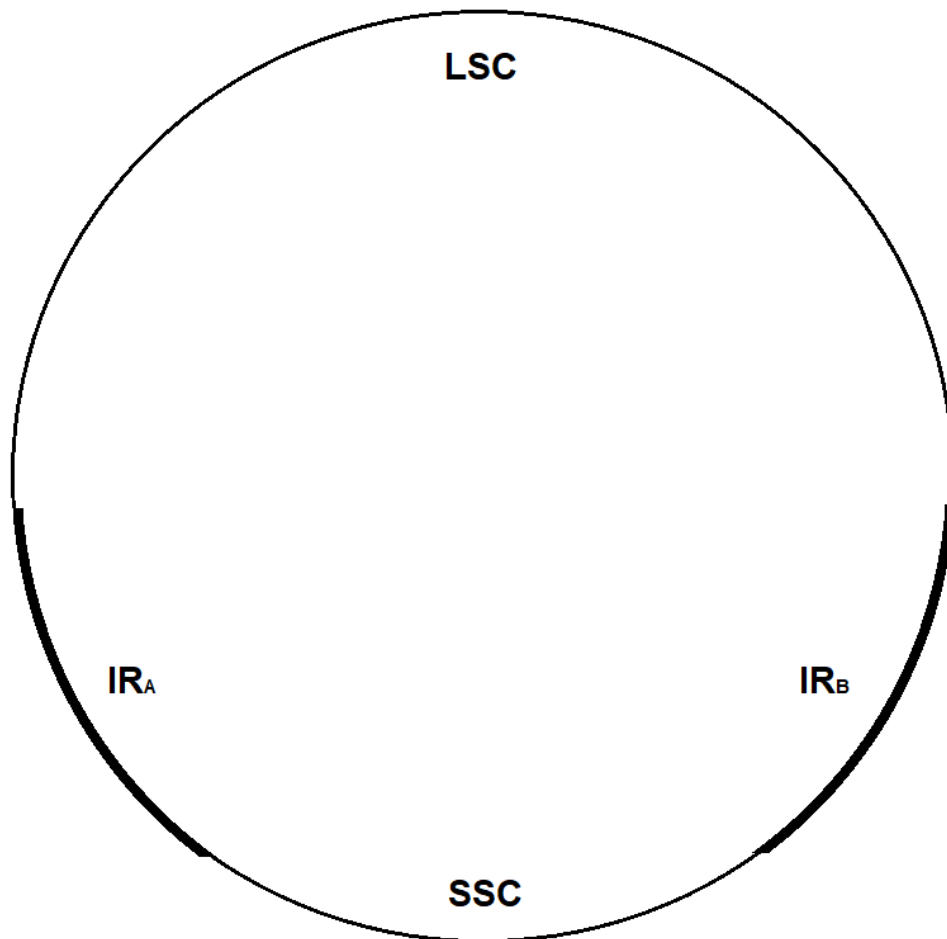


Figure 1: **Chloroplast Genom Einteilung** Der Chloroplast ist unterteilt in LSC, SSC sowie IR. LSC und SSC werden jeweils von den IRa und IRb unterbrochen.

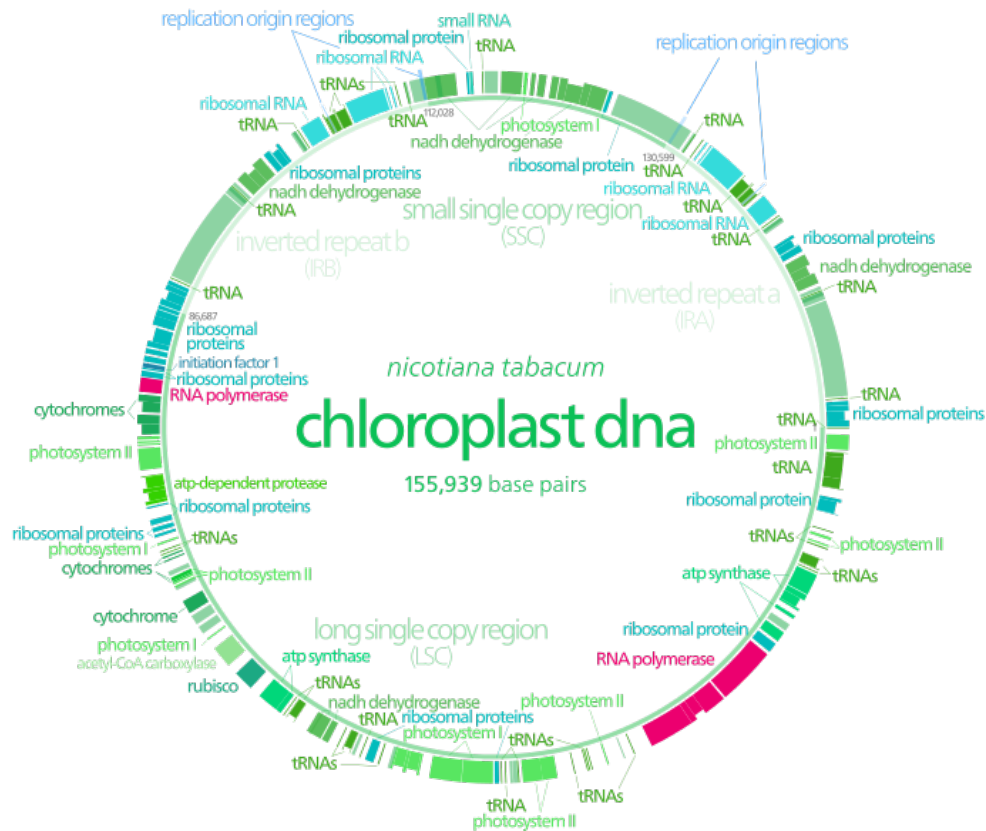


Figure 2: **Chloroplast Genom: Einteilung Gen Klassen** Das Chloroplast Genom der Tabakpflanze, die innere Beschriftung zeigt den B-Strang, die Äußere den A-Strang der DNA. Die Kerben visualisieren Introns. Wikipedia unter Wikimedia Commonsen Lizenz <https://en.wikipedia.org/wiki/File:CtDNA.svg>

durch genomische Daten aus. Durch sogenannte Hochdurchsatz Methoden in modernen Sequenzierungs Technologien wie PacBio¹³ oder Illumina¹⁴ 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 Anforderung 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. Informatik ist wichtig um eine sinnvolle Programm Struktur zu entwickeln sowie natürlich das Programmieren an sich, und alles was dazugehört von Bugs fixen bis zur Optimierung der Software. Biologie ist wichtig um die oftmals komplizierten Biologischen Fragestellungen und Sachverhalte zu verstehen.

2.3 Open Science

Mit der Flut der ansteigenden Daten wächst in den letzten Jahren auch immer mehr die Akzeptanz zur "Open Science". "Open Science" bezeichnet eine Bewegung welche fordert dass Wissenschaft und alles was dazugehört, Daten, Programme, Ergebnisse öffentlich und für jedermann zugänglich sein soll. Befürworter dieser Bewegung argumentieren 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 jung Wissenschaftler aber auch bei älteren immer mehr Anklang. Mittlerweile gibt es mehrere Lizenz Modelle die unter Open Science laufen. Diese Regeln wie die Daten verwendet werden dürfen oder müssen. Dies reicht von 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 Science Lizenz zu publizieren ist. Alle hier verwendeten Programme und Daten sind unter Open Science Lizenzen veröffentlicht, sonst wäre diese Arbeit garnicht möglich. Deswegen werden alle Ergebnisse wiederum öffentlich verwendbar sein. Denn so sollte Wissenschaft sein!

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, hier findet 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 Kern Extraktion durchgeführt wird, da diese mehr Zeit und Geld kosten würde. Diese Organellen DNA können mit bestimmten Programmen

¹³<https://www.pacb.com/>

¹⁴<https://www.illumina.com/>

gefiltert werden, hierfür wurde unter anderem der chloroExtractor programmiert. Dieser kann in genomischen Pflanzen Daten Chloroplasten DNA finden und diese verwenden um einen vollständigen Chloroplasten bauen. Hiermit müssen somit keine neuen Sequenzierungen für Chloroplasten mehr durchgeführt werden, wenn man an Chloroplasten forschen möchte.

2.5 Verwendete Programme und ihre Ansätze

Es gibt verschiedene Ansätze um Chloroplasten Genome bzw. ihre DNA aus genomischen Pflanzen Daten zu extrahieren. Die wohl einfachste Möglichkeit ist ein Referenzbasiertes Mapping der Daten auf einen Referenz Chloroplasten. 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 Ansatz besteht darin den Chloroplasten de novo zu assemblieren, also ohne Referenz. Um diesen Ansatz zu benutzen müssen aber zunächst die Reads mit Chloroplasten Genom aus den Daten gezogen werden. Hier gibt es wiederum verschiedene Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist es die Reads gegen eine Datenbank von Chloroplasten Genen 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 Seed erstellt. Auch hier muss aber sichergestellt werden, dass der Seed in den Chloroplasten Daten vorhanden ist. Von diesen Methoden gibt es auch Abwandlungen, wie z.b. das scannen der Daten durch Kmers, hier werden die Daten in verschiedene Kmers zerteilt, durch plotten dieser Kmers können an spezifischen Stellen überrepräsentierte Kmers gefunden werden, diese überrepräsentierten Kmer spiegeln häufig Plasteome 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. Abgesehen von den Ansätzen der Programme gibt es zwei verschiedene Arten von Programmen, die einen benutzen bereits vorhandene Programme wie Assambler, Mapper oder Kmer-counter. Diese Bauen eine Pipeline um diese 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 drittanbieter Programmen 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 das 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 Bug-fixes kam auf die neuere Version gewechselt, um das bestmögliche Ergebnis für die Daten zu erhalten.

2.5.1 chloroExtractor

Der chloroExtractor (Versionen: 1.0.2, 1.0.3, 1.0.4) ^{15, 16} ist ein Programm welches durch eine Kombination aus Kmer Analyse und Mapping auf bekannte Chloroplasten, Reads von Chloroplasten aus Pflanzen Sequenzierungs Daten zu extrahieren. Es wurde 2018 vom chloroExtractorTeam veröffentlicht ¹⁵ und besteht hauptsächlich aus Perl und R Code. Es verwendet ein Pipeline Programm (PipeWrap.pm) um den richtigen Ablauf zu steuern. Dieses Pipeline Tool wird durch eine Konfigurations Datei gesteuert, sodass ein Benutzer einfach neue Schritte einfügen könnte. Auch können hiermit einfach über ein File Parameter gesteuert werden welche dann in allen verwendeten Programmen gleich sind, oder einzelnen Programmen speziellen Input mitgegeben werden kann. Auch verfügt der chloroExtractor dank PipeWrap über ein Checkpoint System. Bricht der Ablauf des Programmes ab, kann er am genau diesem Punkt wieder gestartet werden ohne das Programm von neu starten zu müssen. Zunächst verwendet der chloroExtractor Jellyfish ¹⁷ um aus den Rohdaten Kmere zu bauen, diese werden über ein R Skript skaliert und gleichzeitig auf Chloroplasten mit Bowtie2 ¹⁸ gemappt. Die reads welche gemapt haben und die richtigen Kmere werden mit SPAdes¹⁹ anschließend assembliert, SPAdes arbeitet de novo und benötigt keine Referenz. SPAdes verwendet eine De Bruijn-Graphen Methode um die reads richtig zusammen zu fügen, diese werden dann durch ein Perl Skript (fcg.pl) zu einem zirkulären Chloroplasten zusammengebaut. Dieses Skript überprüft gleichzeitig mit BLAST+²⁰ ob es sich bei den ausgegebenen Reads wirklich um Chloroplasten handelt. Es wurden drei Verschiedene Versionen des chloroExtractors verwendet, dies brachten unter anderem Bug fixes welche das Programm zum Absturz brachten. Aber auch Verbesserungen am fcg.pl Skript.

¹⁵Ankenbrand et al., (2018). chloroExtractor: extraction and assembly of the chloroplast genome from whole genome shotgun data. Journal of Open Source Software, 3(21), 464, <https://doi.org/10.21105/joss.00464>

¹⁶<https://github.com/chloroExtractorTeam/chloroExtractor>

¹⁷Guillaume Marcais and Carl Kingsford, A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. Bioinformatics (2011) 27(6): 764-770 (first published online January 7, 2011) [10.1093/bioinformatics/btr011](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr011)

¹⁸Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods. 2012, 9:357-359.

¹⁹Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A., Dvorkin M., Kulikov A. S., Lesin V., Nikolenko S., Pham S., Prjibelski A., Pyshkin A., Sirotkin A., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M. A., Pevzner P. A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology, 2012

²⁰Christiam Camacho, George Coulouris, Vahram Avagyan, Ning Ma, Jason Papadopoulos, Kevin Bealer and Thomas L MaddenEmail author, BMC Bioinformatics200910:421 <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-42>

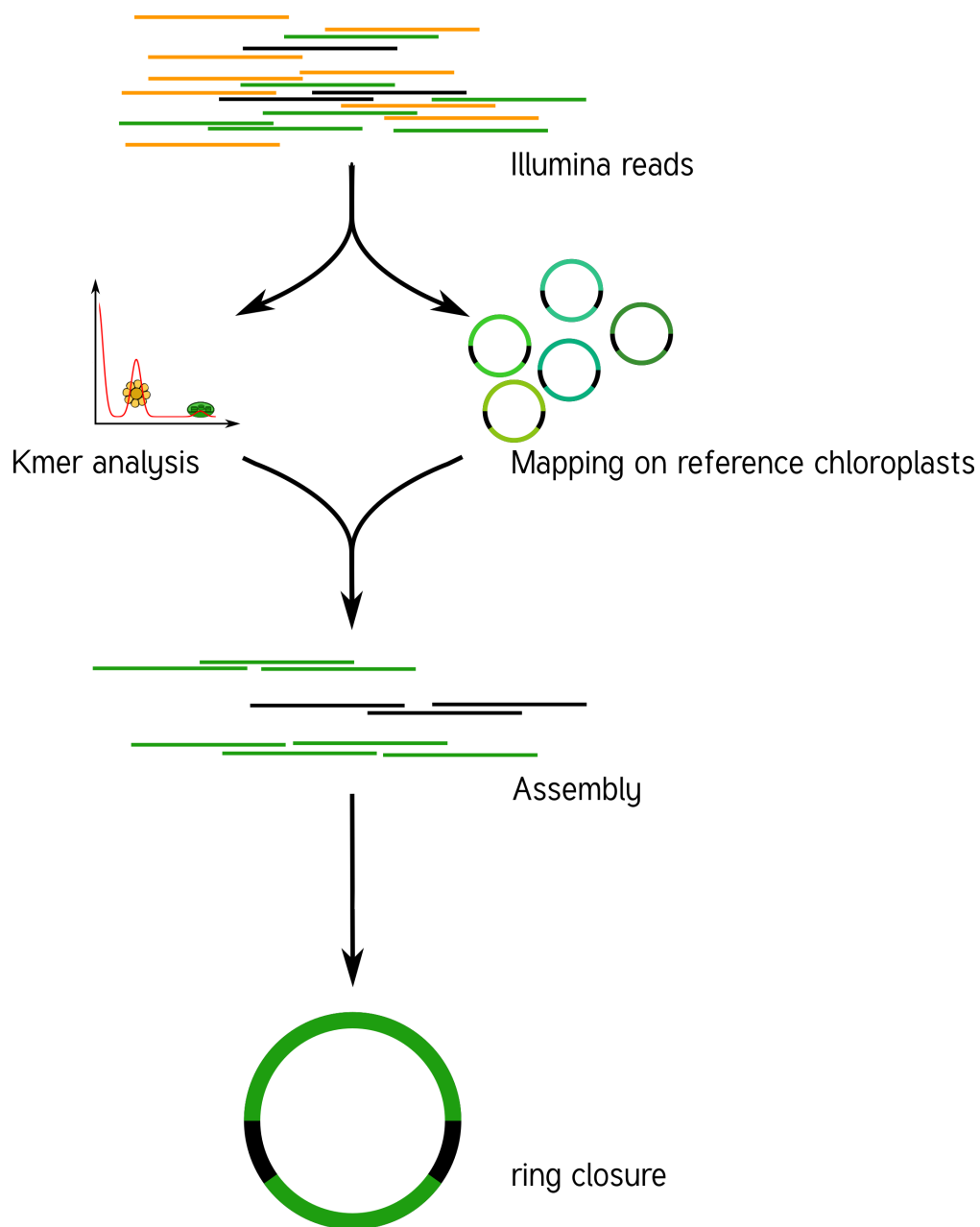


Figure 3: **Ablauf des chloroExtractors** Eine kombination aus kmer Analyse und mapping auf bekannte Chloroplasten rekrutieren Chloroplasten reads um diese anschließend zu Assemblieren um anschließend einen Ringschluss herbeizuführen. (Ankenbrand et al., (2018).)

2.5.2 fast-plast

Fast-plast (Version: 1.2.8) ²¹ ist ein weiteres Programm, welches verwendet wird um Chloroplasten DNA zu finden. Es ist in Perl und in C++ programmiert und verwendet auch SPAdes, aber zusätzlich Bowtie1 sowie Bowtie2. Auch hier wird Blast+ verwendet um die richtigen reads zu finden.

2.5.3 NOVOPlasty

Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Programmen, benutzt NOVOPlasty (Versionen: 2.6.8, 2.6.9, 2.7.0) ^{22, 23} keine dritt Anbieter Programme. Es benötigt somit keine Abhängigkeiten von deren Programmen und ist komplett in Perl programmiert. NOVOPlasty benutzt sogenannte seeds um Chloroplasten DNA zu finden, dies können einzelne Chloroplasten Gene sein, aber auch ein kompletter Chloroplast. Die Verschiedenen verwendeten Versionen versprochen Bug fixes sowie neue Features.

2.5.4 Org.ASM

Org.ASM (Version: 1.0.00-alpha11) ²⁴ ist ein Programm hauptsächlich geschrieben in Python. Es versucht überrepräsentierte Sequenzen zu finden und diese zu assemblieren ²⁵. Mit Hilfe eines Seeds versucht er diese Sequenzen zu finden. Da Chloroplasten und andere Organellen wie Mitochondrien in Zellen überrepräsentiert sind, vor allem wenn man eine geringe Coverage über das Pflanzen Genom hat, sind diese somit detektierbar ²⁶.

2.5.5 GetOrganelle

GetOrganelle (Versionen: 1.9.82, 1.0.1, 1.0.3) ^{27, 28} verwendet zum lokieren der Chloroplasten reads ähnlich wie andere Programme Bowtie2 ¹⁸ 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 in fälle des GetOrganelle per Hand, mit Hilfe des Programms Bandage vollzogen werden. Wie bereits erwähnt nutzt der chloroExtractor ein Perl Skript welchen diesen händischen Schritt automatisiert. Vom GetOrganelle wurden drei Versionen verwendet. Zunächst 1.9.82, diese wurde geändert zu 1.0.1 (github commit: b390260 vom 31. März 2018) und 1.0.3, hier gab es in den verschiedenen Versionen Bugfixes.

²¹<https://github.com/mrmckain/Fast-Plast>

²²<https://github.com/ndierckx/NOVOPlasty>

²³Dierckxsens N., Mardulyn P. and Smits G. (2016) NOVOPlasty: De novo assembly of organelle genomes from whole genome data. Nucleic Acids Research, doi: 10.1093/nar/gkw955

²⁴<https://pythonhosted.org/ORG.asm/>

²⁵<https://git.metabarcoding.org/org-asm/org-asm/wikis/home>

²⁶<https://pythonhosted.org/ORG.asm/algorithms.html>

²⁷<https://github.com/Kinggerm/GetOrganelle>

²⁸Jian-Jun Jin*, Wen-Bin Yu*, Jun-Bo Yang, Yu Song, Ting-Shuang Yi, De-Zhu Li. 2018. GetOrganelle: a simple and fast pipeline for de novo assembly of a complete circular chloroplast genome using genome skimming data. bioRxiv, 256479. <http://doi.org/10.1101/256479>

2.5.6 IOGA

Der Iterative Organellar Genome Assembly, kurz IOGA (Keine Versionsnummer vergeben, github commit: c460ea9 vom 10. Sep. 2016)^{29, 30} verwendet BBmap³¹ für das filtern und trimmen der reads, um anschließend mit SOAPdenovo2³² und SPAdes¹⁹ 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 Chloroplasten Genomen, welche gegen ende 2016 erstmals die 1000 Genome überschritten hat³³, 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 gekoppelt³⁴? Auch ist immer noch nicht exakt verstanden wie Chloroplasten vererbt werden, es wird zwar angenommen das diese ähnlich wie Mitochondrien maternal vererbt werden doch gibt es bei Pflanzen auch viele Arten die biparental oder uniparental Chloroplasten vererben³⁵. Die in den letzten Jahren stark steigende Anzahl an Chloroplasten Genomen gibt diesen Fragestellungen neue Rohdaten die diese Probleme evtl. lösen können. Auch Probleme die nur mit kleinen Änderungen im Chloroplasten Genom zu tun haben (wie SNPs) können so auf den Grund gegangen werden, oder auch die Adaption von verschiedenen Chloroplasten Genen in das Pflanzengenom und der daraus folgenden Änderung im Photosynthese Systems³⁶. 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 natürlich auch mit dem Chloroplasten zusammenhängen. Wie bereits erwähnt eignen sich Chloroplasten gut als Barcode Marker auch hier können Fortschritte mit mehr Daten erlangt werden. Zudem können mit vielen

²⁹<https://github.com/holmrenser/IOGA>

³⁰Bakker 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.

³¹<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>

³²Luo R, Liu B, Xie Y, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. GigaScience. 2012;1:18. 10.1186/2047-217X-1-18.

³³Tonti-Filippini, J. , Nevill, P. G., Dixon, K. and Small, I. (2017), What can we do with 1000 plastid genomes?. Plant J, 90: 808-818. 10.1111/tpj.13491

³⁴Massouh A, Schubert J, Yaneva-Roder L, et al. Spontaneous Chloroplast Mutants Mostly Occur by Replication Slippage and Show a Biased Pattern in the Plastome of Oenothera. The Plant Cell. 2016;28(4):911-929. 10.1105/tpc.15.00879.

³⁵Greiner S, Sobanski J, Bock R. Why are most organelle genomes transmitted maternally? Bioessays. 2015;37(1):80-94. 10.1002/bies.201400110.

³⁶Wicke S, Schneeweiss GM, dePamphilis CW, Müller KF, Quandt D. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. Plant Molecular Biology. 2011;76(3-5):273-297. 10.1007/s11103-011-9762-4.

Chloroplasten Daten sehr gut Phylogenetische Bäume berechnet werden³⁷. Dies sind alles Beispiele wie zwischen 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^{38, 7}. Doch können nicht nur die Anzahl der neuen 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 annotieren. Denn es kann durchaus vorkommen dass bei neuen Genomen, welche de novo assembliert werden müssen Verunreinigungen durch Chloroplasten auftreten können. Denn ~5 - 20% der kompletten DNA wird von Plastiden DNA ausgemacht, je nach Spezies und Gewebe³³.

2.7 Aufgaben in der Master Thesis

Die Aufgaben dieser Thesis ist grob in drei Teile eingeteilt. Zunächst sollen die verschiedenen Programme, der chloroExtractor^{15, 16}, fast-plast²¹, IOGA^{29, 30}, GetOrganelle^{27, 28}, Org.ASM²⁴ und NOVOPlasty^{22, 23} verglichen werden und herausgefunden werden welche das oder die besten Programme sind um damit so viele Chloroplasten Genome 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 Ressourcen schonend arbeiten. Der zweite Teil ist das Produzieren von Chloroplasten Genomen, hierzu werden die Pflanzen Genome des 1001 Genom Projektes verwendet. Auf den so Produzierten Chloroplasten sollen verschiedene wissenschaftliche Arbeiten durchgeführt werden, so zum Beispiel eine Varianz Analyse sowie eine Genomweite Assoziationsstudie, kurz GWAS³⁹. Eine GWAS versucht bestimmte Traits, also Eigenschaften mit Genomischen Varianten zu assoziieren, um anschließend eine Aussage darüber treffen zu können ob diese Variante einen Einfluss auf diese Eigenschaft hat oder nicht. Hierzu werden die einzelnen 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 Chloroplasten Genomen, hierzu sollen Daten verwendet werden welche noch keinen Eintrag in der Chloroplasten Datenbank haben.

³⁷Chase MW, Fay MF. Ancient flowering plants: DNA sequences and angiosperm classification. *Genome Biology*. 2001;2(4):reviews1012.1-reviews1012.4.

³⁸<http://1001genomes.org/>

³⁹Korte A, Farlow A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*. 2013;9:29. 10.1186/1746-4811-9-29.

3 Material / Methoden

3.1 Evaluation der Programme

Um die oben genannten Programme zu vergleichen habe ich mir verschiedene Ansätze überlegt. Um zunächst zu testen wie genau die Programme funktionieren und ob diese überhaupt funktionieren, habe ich sie auf dem Testset SRR5216995 (Arabidopsis thaliana: Col-0) mit einer Million Reads getestet, dieser ist frei zugänglich bei NCBI und dient als Testset beim chloroExtractor¹⁵. Um eine Automatisierung zu erhalten muss für jedes Programm ein Dockercontainer⁴⁰ gebaut werden, falls nicht schon einer vorhanden ist, letzteres trifft nur für den chloroExtractor zu. Diese Dockercontainer sind auf Dockerhub⁴¹ frei zur Verfügung⁴². Um das Ziel zu erreichen so viele Chloroplasten wie möglich zu extrahieren, musste eine Automatisierungslösung für alle Programme erstellt werden, damit keine evtl. Manuelle Schritte oder Auswertungen der zeitbestimmende Schritt sind. Um dies zu erreichen musste ich zusätzlich einige Bash Skripte (s. Anhang) schreiben welche eine volle Automatisierung ermöglichen.

3.1.1 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 Genom Daten 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 Anteil zurecht kommen oder einen dieser Fälle bevorzugen. Diese Testdatensätze wurden mit ART^{43, 44} erzeugt. ART wird dazu verwendet Short-reads zu erzeugen. Hierzu wurden Arabidopsis Thaliana (TARIR10⁴⁵) Daten verwendet. Mitochondrien DNA wurde nicht simuliert, da diese zu Problemen führen könnte wenn diese aufgrund ihrer ähnlichen Häufigkeit für Chloroplasten DNA identifiziert werden. Um die verschiedenen Verhältnisse von Genom und Chloroplasten zu bekommen wurden die Chloroplasten Daten einfach vervielfältigt und anschließend zusammen kopiert. Hiernach wurden sie mit folgenden ART Kommandos zu short-reads simuliert. Für die Tests wurden eine Million Reads pro Datei benutzt, da diese genug Chloroplasten DNA enthalten sollten.

⁴⁰<https://www.docker.com/>

⁴¹<https://hub.docker.com/>

⁴²<https://hub.docker.com/u/chloroextractorteam/>

⁴³Weichun Huang, Leping Li, Jason R. Myers, Gabor T. Marth; ART: a next-generation sequencing read simulator, Bioinformatics, Volume 28, Issue 4, 15 February 2012, Pages 593–594, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr708>

⁴⁴<https://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/biostatistics/art/index.cfm>

⁴⁵https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001735.3/

```
'art_illumina [options] -i <INPUT_SEQ_FILE> -l <READ_LEN> -f <FOLD_COVERAGE>
-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 Projekt³⁸ verwendet, dies sind alles Arabidopsis thaliana. Es wurden 11 Datensätze (SRR1945435 - SRR1945445) verwendet. Diese sind alle frei verfügbar und wurden von NCBI heruntergeladen. Es wurden jeweils zwei Millionen Reads pro Datei gezogen, mit 150 basen Parren pro Read.

GetOrganelle-Paper preprint Um zu weitere Testdaten zu ermitteln und ein Urteil darüber zu fällen welche Programme weiter verwendet werden, wurden 57 Datensätze welche im GetOrganelle Paper²⁸ verwendet wurden auf allen Programmen getestet. In dieser Arbeit 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 basen Parren bis zu 300 basen Parre pro Read. Es wurden hier drei Millionen Reads pro Datei verwendet, da diese im GetOrganelle Paper auch verwendet wurden.

3.1.2 Welche Programme werden weiter verwendet.

Um alle Daten aus dem 1001 Genom Projekt (1135 Datensätze) zu berechnen, mussten aufgrund von Hardwaretechnischen Limitierungen die besten Programme ausgewählt werden. Diese Programme müssen in in Geschwindigkeit sowie in Erfolgs- und Fehler-rate überzeugen. Desweiteren müssen diese Programme gut automatisierbar sein, d.h. am besten mit nur 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 das sie einen hohen Durchsatz erreichen können. 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 heraus gesucht 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 unter Ordner verwenden da er sonst versucht auf Falsche Dateien zuzugreifen und abstürzt. Dies scheint ein Bug in einem Splitt 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 Fehler Korrektur verwendet werden, welche GetOrganelle gar nicht nutzt. Org.ASM konnte nur erfolgreich in einem Dockercontainer installiert werden, da dieses Programm sonst 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 setzen dieser Variable leicht entfernt werden. Für jedes Programm wurde ein Skript geschrieben welches die Laufzeit überprüft und wenn dieses fertig ist danach eine Auswertung startet.

Erfolgsrate Um zunächst zu überprüfen ob ein wirklich ein kompletter Chloroplast zusammengebaut wurden bei den ersten Testdatensätzen ein Referenz Mapping auf TAIR10 benutzt. Hierzu wurde mit Bowtie2, später mit minimap2 der Chloroplast auf das TAIR10 chloroplasten Genom gemapt. Auch wurde mit AliTV ⁴⁶ eine Visualisierung des Mappings erstellt. Nachdem klar war das 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 SeqFilter⁴⁷ Skript verwendet, und anschließend über bash Skript eine Entscheidung getroffen ob es sich um einen kompletten Chloroplasten handelt oder nicht (s. Anhang: 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.

Table 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

⁴⁶Ankenbrand MJ, Hohlfeld S, Hackl T, Förster F. (2017) AliTV—interactive visualization of whole genome comparisons. PeerJ Computer Science 3:e116 <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.116>

⁴⁷<https://github.com/BioInf-Wuerzburg/SeqFilter>

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 Durchschnitts zeit genommen die der Prozess zum rechnen benötigt, anschließend wurde mit dem `time linux` Kommando die CPU als auch die Realzeit gemessen. Die Geschwindigkeit von Programmen mit vielen Abhängigkeiten brauchen im Schnitt länger, da zum benutzen der Dockercontainer Singularity⁴⁸ 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 Erfahrung zu bringen wie sich dies auf Ressourcen und Laufzeit auswirkt. Zudem wurde zum Ausführen der Dockercontainer Singularity⁴⁸ verwendet, welches die benötigte Laufzeit und die benötigten Ressourcen beeinflusst.

3.2 Erzeugen von Chloroplasten aus genomischen Daten

Um so viele Chloroplasten wie möglich aus den genomischen Daten des 1001 Genom Projekts raus zu holen, wurden der `fast-plast` und der `chloroExtractor` benutzt. Diese wurden mit Hilfe eines Dockercontainers und einigen Skripts (s. Anhang) voll automatisiert. So dass nur ein Befehl nötig war um die komplette Pipeline zu starten und auszuwerten.

3.3 Varianz Analyse

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 Assambler auf die Varianz der entstehenden Chloroplasten hat. Hierzu wurden die assemblierten Chloroplasten, welche beide verwendeten Programme gemeinsam hatten verwendet. Diese Läufe wurden zunächst zehn fach wiederholt, auch um einen Eindruck über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bekommen. Diese Chloroplasten wurden anschließend mit `minimap2`⁴⁹ auf das Referenzgenom (TAIR10 chloroplast⁵⁰) gemapt. Hiernach wurde eine Varianzanalyse mit `Samtools`⁵¹ durchgeführt, hierzu wurde der Befehl `'mpileup/bcftools call'`⁵² 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

⁴⁸<https://singularity.lbl.gov/>

⁴⁹Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 10.1093/bioinformatics/bty191

⁵⁰https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000932.1

⁵¹Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools, *Bioinformatics* (2009) 25(16) 2078-9 19505943

⁵²Li H, A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data, *Bioinformatics* (2011) 27(21) 2987-93. 21903627

erstellt. Auch diese wurden auf den Referenzchloroplasten mit minimap2 kartiert und anschließend mit samtools' 'mpileup' Funktion 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 Arapheno⁵³, einer Trait Datenbank für *A.Thaliana*, heruntergeladen und zusammen mit den Varianzanalyse Daten in ein R⁵⁴ Skript gegeben. Dieses R Skript nutzt zunächst vcfr⁵⁵, ein R Paket, um die verschiedenen VCF (Variance Calling File) Daten einzulesen. Anschließend ruft es ein weiteres R Skript auf welches freundlicher weiß von Korte et. al³⁹ zur Verfügung gestellt wurde und eine GWAS Analyse durchführt.

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 Struktur Varianten zu überspannen.⁵⁶ Hierzu könnten nun die komplett de novo Assemblierten Chloroplasten verwendet werden.

3.6 Neue Chloroplasten

Um neue Chloroplasten von Spezien zu finden, welche noch nicht in der CP-Base^{57, 58} Datenbank sind, wurde eine Liste von Möglichen Daten von NCBI mit CP-Base verglichen. Nur 49 Datensätze waren ohne Eintrag in CP-base und hatten somit noch keinen Dokumentierten Chloroplasten für diese Spezies. Auf diese 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, cpbase.sh) wurden alle Spezies Einträge von CP-base geladen welche einen Chloroplasten besitzen. Anschließend wurde mit einem folgendem Perl-Einzeiler die Datensätze herausgegeben welche noch keinen Eintrag in CP-base haben. Zudem musste der Datensatz mindestens zwei Millionen

⁵³<https://arapheno.1001genomes.org/>

⁵⁴<https://www.r-project.org/>

⁵⁵<https://cran.r-project.org/web/packages/vcfr/index.html>

⁵⁶1001 Genomes Consortium 1,135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. Cell. 2016;166:481–491.

⁵⁷http://rocaplab.ocean.washington.edu/old_website/tools/cpbase

⁵⁸http://rocaplab.ocean.washington.edu/tools/cpbase_test/

Reads haben und mindestens 200 Basenpaare pro Read aufweisen. 'perl -F"," -ane 'print if \$F⁴³>399 and \$F⁸>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 Skripten übernommen. Um dies zu Bewerkstelligen wurden mehrere Skripte geschrieben welche sich gegenseitig aufrufen um den kompletten Ablauf sicherzustellen. Das einzige Skript welches aktiv ausgeführt werden muss ist das run_SRRchl.sh. Dieses Skript setzt Links zu anderen Skripten, zum einen zwei Auswertungs Skripten (ev_stat.sh und percent_stat.sh) und zu einem Skript namens cp_skript.sh. Dieses cp_skript übernimmt den kompletten Aufbau der Ordner Struktur, und linkt all die Skripte die jedes Programm braucht, so brauchen IOGA und GetOrganelle eine Referenz, diese wird von diesem Skript in die passenden Ordner kopiert. Auch kopiert und führt dieses cp_skript.sh 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 Evaluierungs Skript und Run Skript. 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 run Skript. Zudem startet es auch die Dazugehörigen Evaluierungs Skripte, welche auch gleichzeitig als Überwachungs Skript dienen. Sobald der Slurm Job fertig ist, startet das Evaluierungs Skript des jeweiligen Programmes damit, die Finale Output Datei zu überprüfen und diese in eine der vier Erfolgs Kategorien 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 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. 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^{43, 44} 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 bauen einen vollständigen zirkulären zu bauen. NOVOPlasty baut zwar auch einen kompletten Chloroplasten doch gibt dieser nur die drei verschiedenen contigs aus (IR, SSC, LSC), und schafft es nicht diese in einen zirkulären Chloroplasten zu vereinen. GetOr-

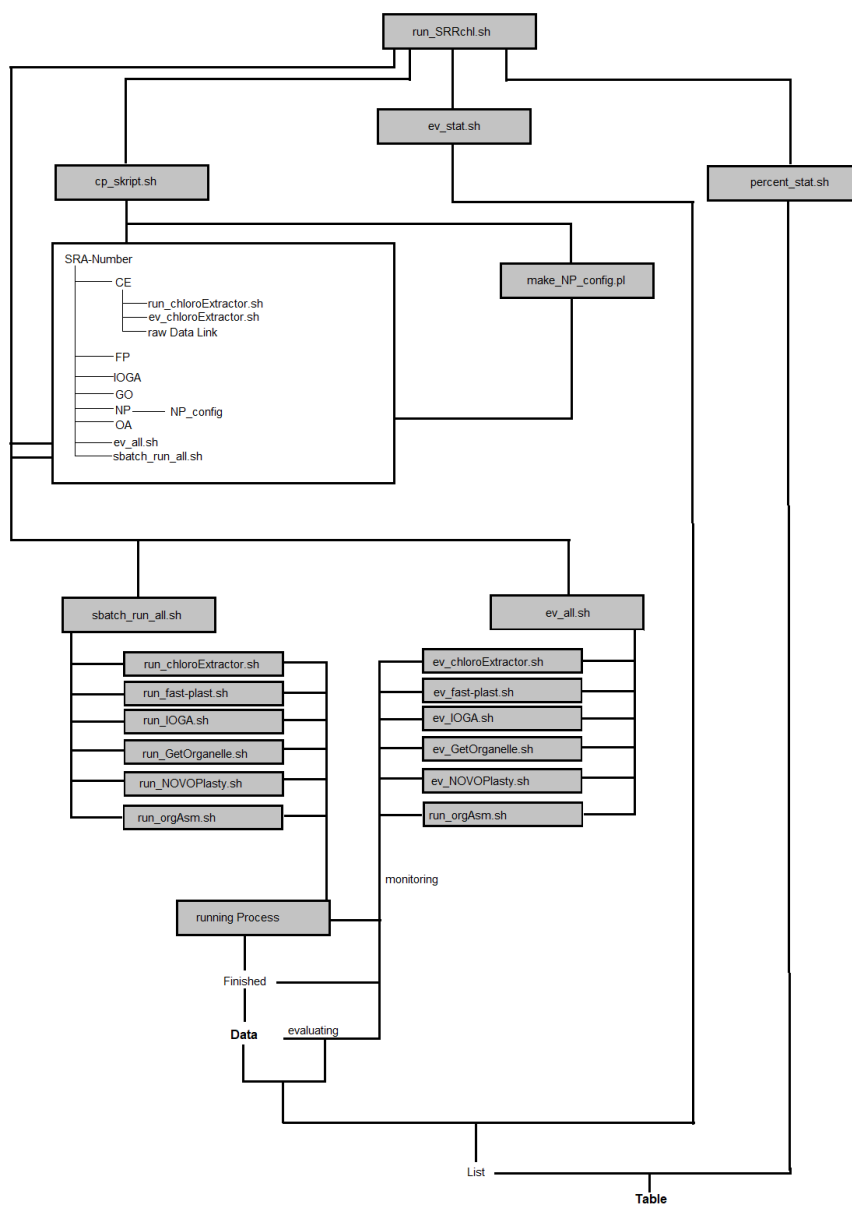


Figure 4: **Automatisierungs Skripts** Ablauf der verwendeten Skripte um eine Automatisierung zu erwirken, hier wird nur das `run_SRRchl.sh` Skript ausgeführt und alle anderen skripte werden automatisch bis zur Auswertung ausgeführt

ganelle wie auch der IOGA schaffen es nicht die simulierten Datensatz zusammen zu bauen da sie mit einem Fehler abbrechen oder wie im Falle des IOGA nach zwei Wochen Laufzeit abgebrochen werden. (s. Tabelle 1)

Table 2: **Test Datensatz: Simulierte Daten** S steht für Success, E für Error, 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 "-" wurden nach zwei Woche Laufzeit abgebrochen.

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

4.3 Daten: 1001 Genom Projekt, 11 Testdatensätze

Aus den Daten des 1001 Genom Projekts ^{38, 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 wurden per Hand ausgewertet, keiner dieser elf Datensätze konnte einwandfrei mit Bandage zu einem zirkulären Chloroplasten gebaut werden, da immer kein Ringschluss vorhanden war.

4.4 Daten: GO-Preprint

Um mehr Daten zu testen, wurden alle 57 Datensätze des GetOrganelle Papers ²⁸ 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 40 mit allen Programmen fertig gestellt werden (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 Chloroplasten Genome komplett zu bauen, davon

Table 3: **Test Datensatz: 1001 Genom Project** S steht für Success, E für Error, I für Incomplete, die angegebene Zahl steht für die Anzahl der Contigs. Sechs verschiedene Chloroplasten konnten zu einem zirkulären Chloroplasten zusammengebaut werden, dabei werden bereits fünf vom fast-plast abgedeckt und einer wird von chloroExtractor beigesteuert. Felder mit einem "-" wurden Abgebrochen da sie nach einer Woche noch nicht fertig waren.

SRA	CE	FP	NP	GO	OA	IOGA
SRR1945435	I-5	I	I-4	I	E	I-6
SRR1945436	I-6	S	I-3	I	I	I-8
SRR1945437	I-5	I	I-4	I	I	I-10
SRR1945438	S-3	S	I-6	I	E	I-10
SRR1945439	I-4	S	I-1	I	I	I-10
SRR1945440	I-4	S	E	I	E	I-9
SRR1945441	I-5	S	E	I	I	I-6
SRR1945442	I-4	I	I-1	I	-	-
SRR1945443	S	I	I-2	I	I	I-8
SRR1945444	I-4	I	E	I	I	I-8
SRR1945445	I-4	I	E	I	E	I_7

sind 17 nur von ihm geschafft worden. Der chloroExtractor schafft 14 Chloroplasten, wo von drei nur von ihm geschafft werden. Die zwei Erfolge des GetOrganelles, mit Hilfe des fcg.pl scripts 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 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. 6 SRR5602602 - Laurus nobilis), wobei letzteres Programm nicht einen Erfolg hat(Abb. 5). So können bereits 35 von 40 Chloroplasten alleine durch fast-plast und chloroExtractor geschafft werden.

4.5 Die besten Programme: fast-plast und chloroExtractor

Da aus Zeitlichen und Hardware Technischen gründen nicht alle Programme weiterverwendet werden konnten, wurde nach Erfolgsrate, Geschwindigkeit und benötigten Ressourcen gefiltert, am wichtigsten war aber die Automatisierbarkeit der Programme. Bis auf der GetOrganelle konnte für jedes Programm eine Automatisierbarkeit erwirkt

Table 4: **Test Datensatz: GetOrganelle Preprint** 40 von 57 Datensätze konnten komplett gelöst werden. 31 Datensets konnten mit dem fast-plast zu einem Chloroplasten gebaut werden, die 14 die der chloroExtractor schafft enthalten die restlichen 9 um auf alle 40 Chloroplasten zu kommen. Somit konnten mit zwei Programmen 74% gelöst werden.

Tool	SUCCESS	%	ERROR	PARTIAL	INCOMPI	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

werden. Der GetOrganelle benötigt das öffnen der fastg Datei in einem Visualisierungs Programm für fastg-Graphen, hier wird Bandage empfohlen. Bandage hat allerdings eine schlechte Kommandozeilen Anbindung wodurch auch keine Automatisierbarkeit durch Skripts erfolgen konnte. Es wurde auch versucht mit dem 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 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 reichen 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 Basen paare bis zu 300 Basen paare, Anzahl der Reads und somit Größe der Dateien reichten von eine Millionen Reads bis zu drei Millionen Reads. Die Laufzeiten sind, vor allem bei Programmen mit vielen Abhängigkeiten, erhöht. Da zum nutzen der Dockercontainer Singularity⁴⁸ verwendet wurde. Die Programme welche in oben genannten Punkte 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,

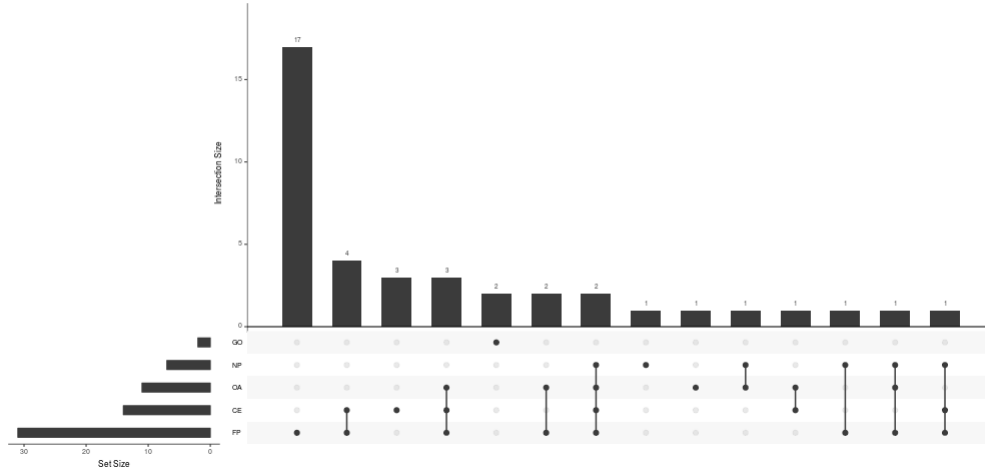


Figure 5: **Upset Diagram GO-Preprint** Hier wird gezeigt wie sich die einzelnen Erfolge auf die 40 stück aufteilen. So schafft der fast-plast 17 Chloroplasten welches kein anderes Tool schafft. Fast-plast und chloroExtractor haben vier Erfolge gemeinsam, der chloroExtractor schafft drei Chloroplasten welche kein anderes Programm schafft. usw. So werden 35 der geschafften 40 durch fast-plast und chloroExtractor abgedeckt.

Table 5: **Laufzeit und Ressourcenverbrauch** Alle Laufzeiten sind Durchschnittswerte, RAM werte zu Peakzeiten. Die Laufzeiten reichen von 30 Minuten (chloroExtractor) bis zu 100 Minuten (IOGA), die RAM nutzung unterscheidete 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

Ressourcen arm und hat nach dem fast-plast die zweithöchste 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

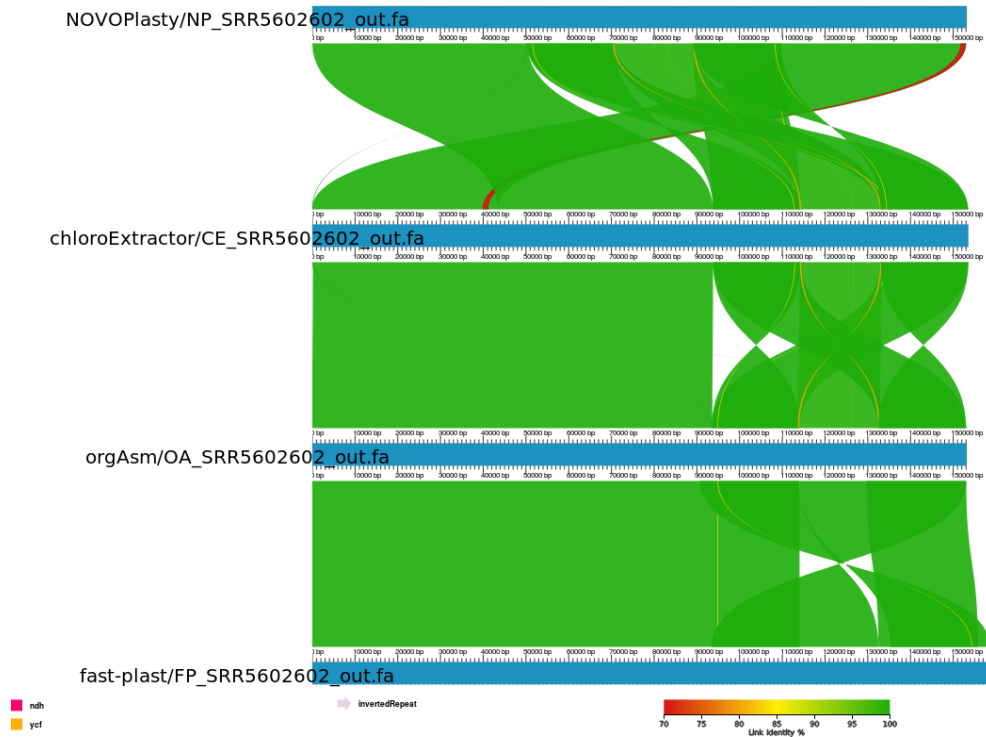


Figure 6: **AliTV SRR5602602 - Laurus nobilis** SRR5602602 - Laurus nobilis, Daten des GO-Preprints, geschafft von ChloroExtractor, NOVOPlasty, fast-plast und Org.ASM. Orientierung von LSC sowie von SSC und IRs können nicht perfekt aufgelöst werden und können durchaus Verdreht sein.

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 gibt sogar drei dieser Dateien aus, da er unterscheidet zwischen Warn- und Fehlermeldungen und Standard Meldungen, und eine Datei für den Output der eingebundenen Programme. Der chloroExtractor gibt seine kompletten Meldungen über ein übergeordnetes Programm aus, welche den Ablauf steuert. Dieses Programm gibt alles auf STDERROR aus und kann damit einfach mit geloggt werden, oder wie in diesem Fall über die slurm Datei, welche von dem verwendeten queueing System ausgegeben wird. 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. 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. 4).

Table 6: **Datensatz: 1001 Genom Projekt** 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	NO_PAIR	Total
CE	136	~15%	54	3	706		
FP	266	~30%	29	11	593		
Summary	303	~34%	-	-	-	47	946

4.7 Varianz Analyse

Um die Varianz Analyse durchzuführen und vor allem zu überprüfen ob die Assambler bzw. die Programme an sich einen Einfluss darauf haben, indem sie z.B. zufällige Seeds verwenden oder zufällige Daten bevorzugen, wurden 89 Datensätze der 1001 Genom Projektes 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.

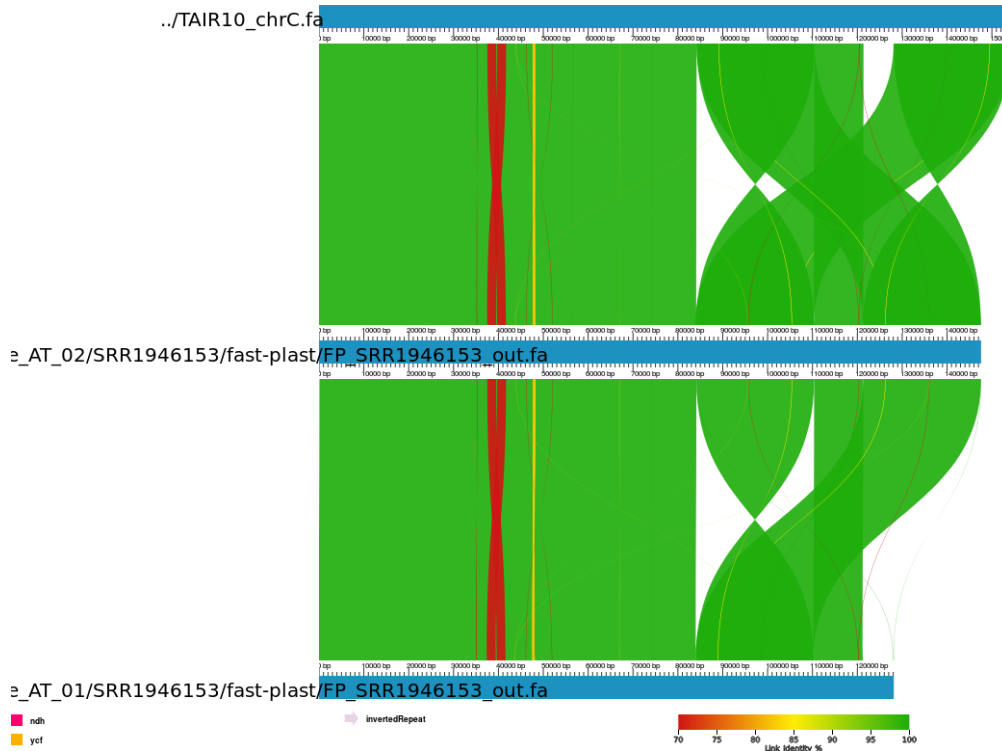


Figure 7: **fast-plast SRR1946153** Zwei verschiedene Läufe auf den selben Daten, der fast-plast schafft einen davon, den anderen nicht. Hier fehlt ein Teil des IR, wodurch auch nicht als Erfolg gewertet wird.

Der chloroExtractor und somit der Assamblar SPAdes brachte bei allen elf Durchläufen die exakt gleichen Sequenzen heraus. Dieses Programm arbeitet also 100% Reproduzierbar (s. Abb. 8). Im Gegensatz dazu der fast-plast, dieser schaffte es nicht einmal bei allen elf Durchläufen alle Chloroplasten wieder korrekt zusammen zubauen, bei bis zu neun verschiedenen Datensätzen konnte kein Erfolgreiches Ergebnis erzielt werden (s. Abb. 7). Interessanter weiße waren nicht immer die selben Datensätze betroffen, so konnten bei einigen Durchläufen ein Erfolg erreicht werden, bei dem nächsten aber nicht. Ob dies ein Zufalls Effekt des Programms oder der verwendeten Rechner-Infrastruktur ist, konnte nicht überprüft werden. Die zweite Varianz Analyse bzw. SNP calling wurde auf allen Erfolgreich zusammengebauten Chloroplasten durchgeführt. Das SNP calling ergab das 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 verschiedenen Traits berechnet werden. Dies waren die Eigenschaften Flowering

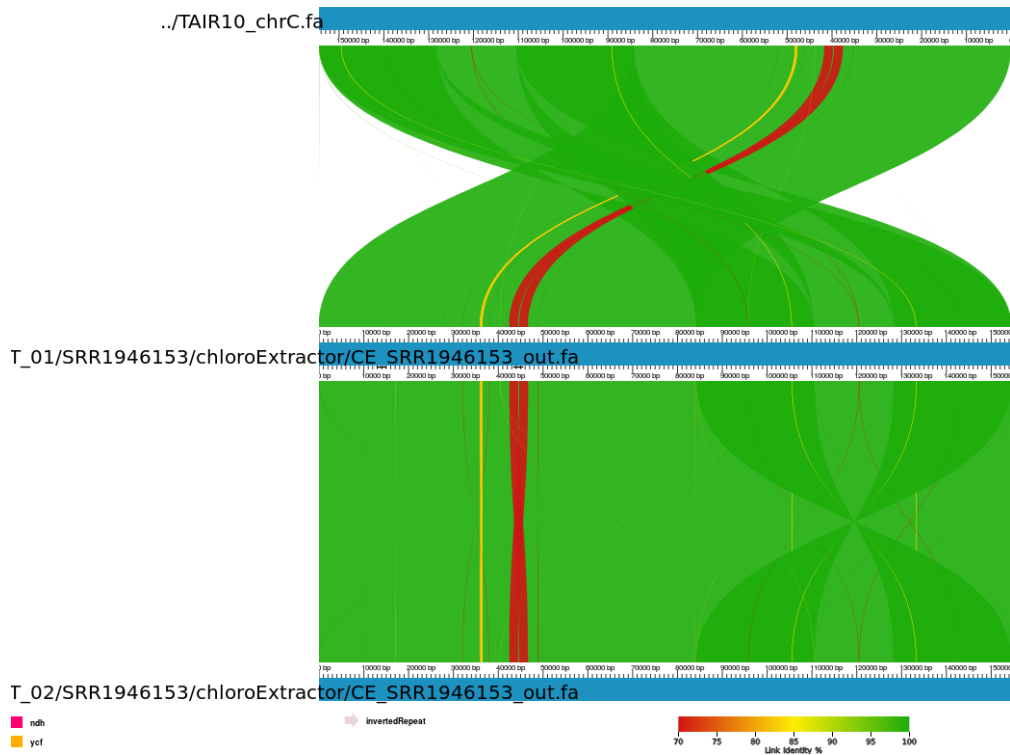


Figure 8: **chloroExtractor SRR1946153** Zwei verschiedene Läufe auf den selben Daten, der chloroExtractor bringt das gleiche Ergebniss für beide Durchläufe.

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. Zudem konnte für beide berechneten Traits keine Signifikanz für einen SNP gefunden werden.

4.9 Struktur Varianz Analyse

Für die Struktur Varianz Analyse konnten keine Ergebnisse erzielt werden, Grund hierfür war unter anderem fehlende Zeit. Aber auch konnten keine guten Programme gefunden werden welche mit kompletten Chloroplasten umgehen konnten, die meisten nutzten direkt Illumina short reads.

4.10 Neue Chloroplasten

Aus NCBI wurden 79657 Datensätze heruntergeladen, dies sind alles Pflanzengenome. Diese liste wurde mit den Einträgen von CPbase 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. Somit wurden 17 neue Chloroplasten von Spezien welche zuvor noch keinen genomisch bekannten Chloroplasten hatten erfolgreich erstellt.

Table 7: **Neue Chloroplasten** Von den 49 Spezien 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	INCOMPI	NO_PAIR	Total
CE	4	20	16	9	0	
FP	15	7	22	5	0	
Summary	17	-	-	-	0	49

5 Diskussion

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

Jegliche Einteilung in die Erfolgs Kategorien: Success, Partial, Incomplete_high und Incomplete_low 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 Evaluations Skript 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. Diese könnte eine

Table 8: **Liste neue Chloroplasten** Liste von 17 Spezien welche mit Hilfe des fast-plast 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

Sequenz aus 150 kbp Adenin sein, und das Skript würde es als einen Success 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 Struktur Variante besitzt mit 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

(BUSCO⁵⁹), hierzu werden extrem konservierte Orthologe Gene verwendet um zu überprüfen ob diese alle vorhanden sind. Da ein Chloroplast Genom an sich sehr konserviert ist könnte eine Anzahl von Genen genommen werden und diese in einem solchen Model verwendet werden.

5.2 Die Entscheidung für fast-plast und chloroExtractor

Es wurde im Ergebnis Teil 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 extrem langsam ist sondern auch weil er keinerlei Log File während des Prozesses schreibt, erst wenn dieser Komplette beendet ist, so war vor allem zu Beginn extrem 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. 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 die dazugehörige Regular Expression (RegEx) nicht komplett passt, dies kam häufiger vor da nicht alle header gleich aufgebaut sind und wohl ein paar nicht 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 das 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. Der Org.ASM lief zwar nachdem er installiert wurde gar nicht so schlecht, 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 einigermaßen 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 oder gar das fastg welches SPAdes im chloroExtractor ausgibt.

⁵⁹BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Felipe A. Simão, Robert M. Waterhouse, Panagiotis Ioannidis, Evgenia V. Kriventseva, and Evgeny M. Zdobnov, Bioinformatics, June 9, 2015 doi: 10.1093/bioinformatics/btv351

5.3 Fazit aus der Erfolgschance

Es wurden in dieser Arbeit 303 Chloroplasten Genome von *Arabidopsis Thaliana* und 17 Neue (s. Tab. 8) erstellt. Nimmt man von den versuchten die gesamte Zahl, so konnten in etwa 30% der Datensätze zu Chloroplasten Genomen führen. Dies entspricht tatsächlich mehr als am Anfang der Arbeit angenommen, hier wurden in etwa 10 - 20% geschätzt. Allerdings auch ohne die anderen Programme, abgesehen von chloroExtractor, großartig getestet zu haben. Nimmt man nur die Erfolgschance von chloroExtractor war diese erste Abschätzung gar nicht so schlecht. Dies zeigt mir als einer der Entwickler des chloroExtractors, dass dieser noch mehr verbessert werden kann.

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 einen Test benötigen. Auch könnten die Parameter jedes Mal geändert werden, dann aber unter dem Verlust einer Automatisierbarkeit. In diesen Versuchen wurden verschiedene 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 Daten. Theoretisch kann dies einen Zuwachs an Erfolg bringen, wenn das verwendete Programm dann 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 welche 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 Downloadzeit und evtl. die Zeit die gebraucht wird um die Dateien zu mischen.

5.5 Etablieren einer einfachen Scanning Routine

In dieser Arbeit wurde gezeigt dass eine voll automatische Lösung für das Scannen von Chloroplasten in Pflanzen Genom 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 Container⁶⁰, 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. Dieser Container ist sehr

⁶⁰https://github.com/chloroExtractorTeam/screening_container

einfach zu benutzen, und alles was dafür gebraucht wird ist Docker⁴⁰ oder ein Programm welches Dockercontainer ausführen kann wie z.B. Singularity⁴⁸.

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 Wachstumszeit, Größen, Blütenbreite oder Form sind nicht gut genug Katalogisiert um eine geringe Datenmenge wie sie benutzt wurde abzudecken. Dies heißt nicht das keinerlei Assoziation zwischen Chloroplasten Varianz und diesen Eigenschaften besteht. Dies zeigt lediglich dass noch mehr Daten benötigen werden um diese GWAS Studie zu beenden.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

List of Figures

1	Chloroplast Genom Einteilung	6
2	Chloroplast Genom: Gen Klassen	7
3	Ablauf des chloroExtractors	11
4	Automatisierungs Skripts	21
5	Upset Diagramm GO-Preprint	25
6	AliTV SRR5602602 - Laurus nobilis	26
7	fast-plast SRR1946153	28
8	chloroExtractor SRR1946153	29

List of Tables

1	Erfolgsraten Einteilung	17
2	Test Datensatz: Simmulierte Daten	22
3	Test Datensatz: 1001 Genom Project, 11 Datensätze	23
4	Test Datensatz: GetOrganelle Preprint, 11 Datensätze	24
5	Laufzeit und Ressourcenverbrauch	25
6	Datensatz: 1001 Genom Project	27
7	Neue Chloroplasten	30
8	Liste neue Chloroplasten	31

7 Anhang

7.1 Tabellen

Alle Ergebniss Tabellen können eingesehen werden unter: https://github.com/chloroExtractorTeam/chloroplast_landscape/tree/Documentation_SPfaff

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, August 4, 2018

Simon Pfaff