

# Genomorientierte Bioinformatik

---

-

## BamFeatures

Malte Weyrich

DECEMBER 2024

---

Das Sequenzieren in der Bioinformatik generiert Milliarden von *Reads* pro *Sample*, welche mit einem *Mapper* an das *Referenzgenom* aligniert werden. Diese Daten werden in einer *Sequence Alignment Map (SAM)* Datei gespeichert und können zusätzlich in ein komprimiertes Format, einer *Binary Alignment Map (BAM)* Datei, umgewandelt werden. Anschließend können verschiedene Analysen auf den *BAM* Dateien durchgeführt werden. Die in diesem Report diskutierte *JAR* liest eine gegebene *paired-end RNA-seq BAM* Datei ein und errechnet verschiedene Features, die in einer *<tsv>* Datei gespeichert werden. Die JAR wurde auf drei verschiedenen *BAM* Dateien ausgeführt, um damit anschließend die *RPKM* Werte zu berechnen. Zudem wird die *JAR* anhand ihrer Laufzeit und Korrektheit analysiert.

---

# Inhalt

<b>1 RNA-seq</b>	<b>3</b>
<b>2 Java Programm</b>	<b>3</b>
<b>3 Argumente</b>	<b>4</b>
3.1 Logik . . . . .	4
3.1.1 Erstellen der ReadPair Objekte . . . . .	4
3.1.2 Berechnung der ReadPair Attribute . . . . .	5
3.1.3 Reduktion der Heap Benutzung . . . . .	8
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>9</b>
4.1 Laufzeit . . . . .	11
4.2 Benchmarking . . . . .	11
4.3 Korrektheit . . . . .	12

## 1 – RNA-seq

Die Bezeichnung *RNA-seq* bezieht sich auf ein bestimmtes Sequenzierprotokoll der Bioinformatik bei dem möglichst alle exprimierten Transkripte mehrerer Samples mittels Hochdurchsatzsequenziergeräten wie *Illumina* verarbeitet und die resultierenden *Reads* in Ausgabe Dateien abgespeichert werden. Bei *Illumina* werden die extrahierten Transkripte mittels Ultraschall oder enzymatischer Fermentation in Fragmente mit ähnlicher Länge zerstückelt und mit Adaptersequenzen und Barcodes versehen. Darauf folgt eine *PCR* Amplifikation der Fragmente, um das Signal zu verstärken. Die amplifizierten Fragmente können nun im Sequenzzyklus von *Illumina*, Base für Base, gelesen werden. Dabei wird jedoch nicht das ganze Fragment gelesen, sondern jeweils nur ca. 100BP (abhängig von Voreinstellung und Protokoll) beider Enden des Fragments (*paired-end sequencing*). Somit entstehen pro Fragment zwei *Reads*, ein forward *Read* und ein reverse *Read*, welche zu einem *ReadPair* zusammengefasst werden können. In dem Protokoll von *Illumina* werden zuerst alle *Reads* eines Endes aller Fragmente gemacht, dann wird das Fragment, **vereinfacht gesagt**, auf der *Flow Zelle* umgedreht (durch Replikation), wodurch die umgedrehten Fragmente jeweils das Komplement ihres ursprünglichen Fragments sind. Somit sollten die *Reads* eines *ReadPairs* immer auf entgegengesetzte Strände ("+/-") "mappen". Ist bei einem Sequenzierexperiment die Ausgangskonfiguration der Fragmente bekannt, so handelt es sich um ein *strangspezifisches* Experiment und man kann allen *Reads* einem festen Strang zuordnen, je nach dem, ob das Fragment in der Anfangskonfiguration vom "-" oder vom "+" Strang kam. Ein *Mapper* würde nun solche *ReadPairs* an einem *Referenzgenom mappen* und eine (oder mehrere) *SAM/BAM* Datei(en) erstellen, welche unter anderem die Koordinaten der alignierten *Reads* basierend auf dem *Referenzgenom* beinhalten. Die Alignment Daten dieser Datei können nun von der *BamFeatures JAR* weiter annotiert werden.

## 2 – Java Programm

Usage:

```
java -jar bam.jar -bam <bamPath> -o <outputPath> -gtf <gtfPath> \\
      [-frstrand <true/false>] [-lengths]
```

## 3 – Argumente

Zusätzlich zu den vorausgesetzten Argumenten (*-bam*, *-o*, *-gtf*) können noch *-frstrand* und *-lengths* angegeben werden. Bei einem Strangpositiven Experiment (*-frstrand true*) ist der forward *Read* auf dem "+" und der reverse *Read* auf dem "-". So kann die *JAR* die *Reads* korrekt zuordnen. Falls die Strangrichtung nicht angegeben ist, werden für beide *Reads* jeweils beide Stränge betrachtet. Die *-lengths* Option wird für die Berechnung der *RPKM* Werte benötigt. Ist diese Option gesetzt, so werden die für die Längennormalisierung benötigte Genlängen der kombinierten Exons jedes Gens berechnet und in einer *<tsv>* Datei gespeichert.

**Tabelle 1 – Übersicht der verwendeten BAM Dateien**

Spezies	BAM	GTF	frstrand
Homo Sapiens	ebna_hisat	GRCh37.75	"+" / "true"
Homo Sapiens	hes_star	GRCh37.75	"-" / "false"
Hefe	nookaew_cm	R64-1-1.75	×

### 3.1. Logik

#### 3.1.1 Erstellen der ReadPair Objekte

Die Einträge der *BAM* Datei werden der Reihe nach von einem *SAMFilereader* eingelesen. Da es sich um *paired-end* Daten handelt, muss für jeden *Read* sein zugehöriger *Mate* gefunden werden. *Reads* die nicht gepaart sind, oder nicht den Qualitätsanforderungen der Aufgabenstellung entsprechen, werden ignoriert. *Read Objekte* die zum ersten Mal vorkommen, werden in einer *HashMap<Id, Read>* *seenEntries* gespeichert und für jede Iteration wird überprüft, ob wir die *Read Id* bereits gesehen haben. Sobald wir zwei zusammengehörende *Reads* identifiziert haben, wird ein neues *ReadPair Objekt* erstellt. Dabei wird die Strangrichtung beim erstellen des Objekts berücksichtigt und die *Reads* jeweils nach *forward* und *reverse* kategorisiert. Zusätzlich werden die *AlignmentBlocks* beider *Reads* zu einem gemeinsamen *Regionvector meltedBlocks* und zwei einzelnen *Regionvectors* (*regionVecFw*, *regionVecRw*) verschmolzen. Dies ist notwendig für die anschließenden Berechnungen und fängt einige *Edge Cases* ab. Hat ein *ReadPair R* z.B.  $b_1 \in regionVecFw, b_2 \in regionVecRw$  und  $b_1.end == b_2.start - X, X > 0$ , so werden diese Blöcke verschmolzen zu:  $b_1, b_2 \rightarrow_{melt()} b_{neu}$ , mit  $b_{neu}.start == b_1.start \wedge b_{neu}.end == b_2.end$ .

### 3.1.2 Berechnung der ReadPair Attribute

Als erstes werden die *igenes* und *cgenes* berechnet:

1.  $cgenes := \{g \in cgenes \mid g_{start} < fwRead_{start} \wedge g_{end} > rwRead_{end}\}$
2.  $igenes := \{g \in cgenes \mid g_{start} \geq fwRead_{start} \wedge g_{end} \leq rwRead_{end}\}$

Für die Berechnung dieser Attribute verwenden wir ein verschachteltes Objekt *intervalTreeMap* *HashMap<String, HashMap<Boolean, IntervalTree<Gene>>>* verwendet, welches für jedes Chromosom die Gene nach ihrem Strang in Intervalbäumen abgespeichert hat (Strang ist entweder: [true|false|null]). Falls  $|cgenes| == 0$  aber  $|igenes| > 0$  wird das *ReadPair* verworfen und mit dem nächsten weiter gemacht, sind beide Mengen leer, so wird die kürzeste Distanz zu benachbarten Genen ausgerechnet und in *gdist* abgespeichert. Danach wird das *ReadPair* auf *split-inconsistency* überprüft (Algorithmus 1), d.h. falls es eine überlappende Region beider *Reads* gibt, müssen die potentiell implizierten Introns beider *Reads* übereinstimmen. Nach dem Aufruf von *getNsplit()* wird

---

#### Algorithm 1 getNsplit()

---

```

1: Input: fw, rw                                ▷ forward and reverse reads
2: if |fw.Blocks| = 1 and |rw.Blocks| = 1 then      ▷ Checks if the reads imply introns
3:   return 0
4: end if
5: overlap = determineOverlap(fw, rw)            ▷ Determine overlap region
6: iFwRegions ← {}                               ▷ Set for containing fw Introns
7: iRwRegions ← {}                             ▷ Set for containing rw Introns
8: iRegions ← {}                            ▷ Set for containing all Introns
9: extractIntronsInOverlap(overlap.x1, overlap.x2, iFwRegions, iRegions, fw)
10: extractIntronsInOverlap(overlap.x1, overlap.x2, iRwRegions, iRegions, rw)
11: if |iRwRegions| ≠ |iFwRegions| then           ▷ split-inconsistent
12:   return -1
13: end if
14: if iRwRegions = iFwRegions then             ▷ Return unique Introns in overlap
15:   return |iRegions|
16: end if
17: return -1                                    ▷ split-inconsistent (default)

```

---

bei einem *return value* von -1 das *ReadPair* als "split-inconsistent" vermerkt und in die Ausgabedatei übernommen, ansonsten wird die Größe der Menge *iRegions* in der Variable *nsplit* gespeichert und das *ReadPair* weiter prozessiert.

Als nächstes wird das *ReadPair* anhand drei Kategorien annotiert (Abbildung 1):

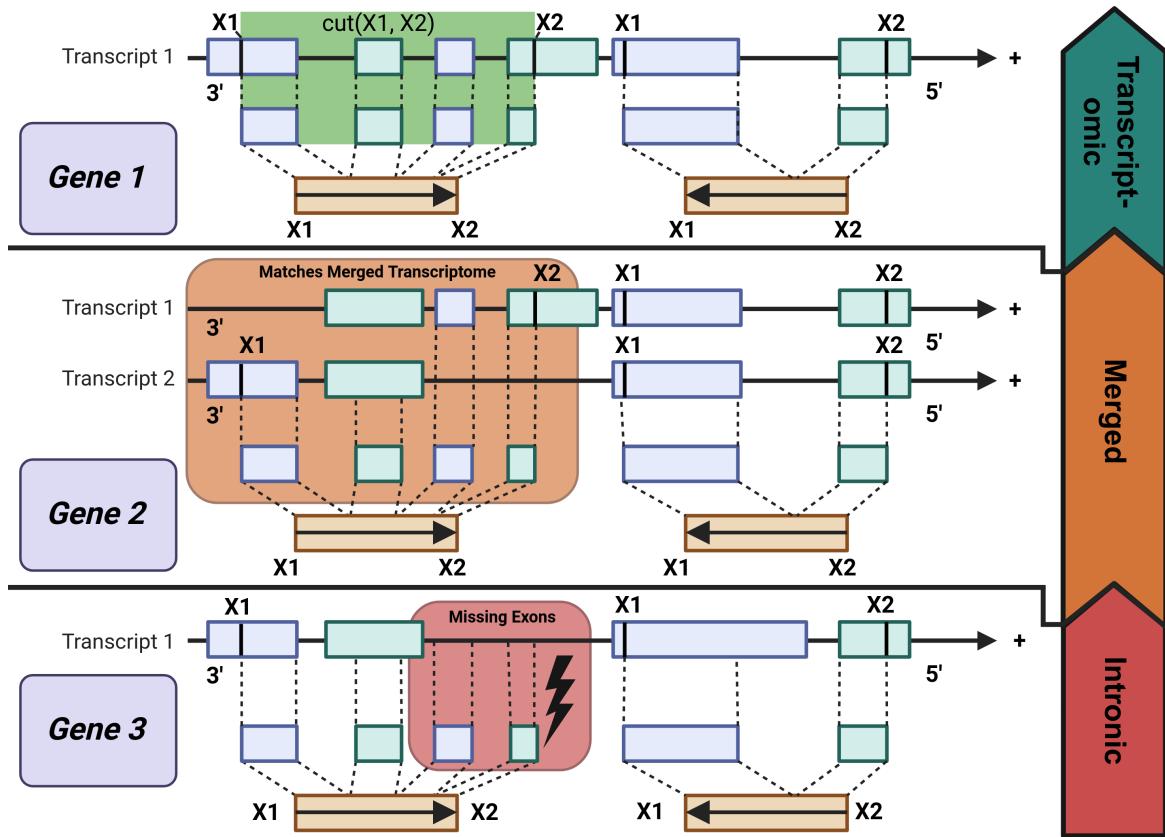


Abbildung 1 – Kategorisierung der *ReadPair*-Regionen in die Klassen „*Transcriptomic*“, „*Merged*“ und „*Intronic*“, wobei eine Priorisierung nach der Reihenfolge „*Transcriptomic*“ > „*Merged*“ > „*Intronic*“ erfolgt. Die *AlignmentBlocks* der *Reads* werden mit den Exons der Transkripte des inkludierenden Gens abgeglichen. Die Abbildung wurde mit **BioRender 2024** erstellt.

Bei der Regions-Annotation wird als erstes die ***Transcriptomic*** Kategorie überprüft. Hierbei wird über alle Gene die das *ReadPair* inkludieren iteriert und für jeden *Read* des *ReadPairs* mit der Methode  $\text{cut}(X1, X2)$  zwei neue *Regionvectors* aus jedem Transkript ausgeschnitten (Abbildung 1), wobei *X1* der *Alignmentstart* und *X2* das *Alignmentende* des momentanen *Reads* ist. Falls beide ausgeschnittenen *Regionvectors* aus dem Transkript gleich der geschmolzenen *Regionvectors* der *Reads* entsprechen, ist das *ReadPair* ***Transcriptomic*** und das entsprechende Transkript wird zusammen mit dem Gen in die Lösungsmenge genommen.

Für die ***Merged*** Kategorie reicht es, wenn die *Regionvectors* der *Reads* in dem geschmolzenen Transkriptom eines Gens enthalten sind (siehe Abbildung 1). Das geschmolzene Transkriptom wird in Algorithmus 2 berechnet und besteht aus allen annotierten Exons eines Gens. Wenn

ein *ReadPair* dieser Kategorie zugeteilt wird, wird das Gen in einer separaten Lösungsmenge gespeichert. Falls die oberen zwei Ansätze beide nicht zutreffen, so handelt es sich um ein ***Intrinsic ReadPair***.

---

### Algorithm 2 Melt Exons into Regions

---

```

1: Input: transcriptList (list of transcripts containing exons)
2: allExons ← ∅
3: for each transcript in transcriptList do
4:   allExons.addAll(transcript.getExonList())      ▷ Add all exons from transcript to the list
5: end for
6: Sort allExons by start position                  ▷ Sort exons by their start positions
7: meltedRegions ← new TreeSet()                  ▷ Create a new set for melted regions
8: if allExons is not empty then
9:   first ← allExons.get(0)                      ▷ Get the first exon
10:  current ← new Region(first.getStart(), first.getStop()) ▷ Create a region for the first exon
11:  for i ← 1 to allExons.size() − 1 do
12:    exon ← allExons.get(i)
13:    if exon.getStart() ≤ current.getStop() + 1 then
14:      current.setStop(max(current.getStop(), exon.getStop())) ▷ Extend the region if
           exons overlap or are adjacent
15:    else
16:      meltedRegions.add(current)                ▷ Add the completed region to the set
17:      current ← new Region(exon.getStart(), exon.getStop()) ▷ Start a new region
18:    end if
19:  end for
20:  meltedRegions.add(current)                  ▷ Add the last region
21: end if
22: return meltedRegions                         ▷ Return the melted regions

```

---

Nach der Regions-Annotation wird der *gcount* mit der Anzahl an annotierten Genen der plausibelsten Kategorie überschrieben. Als nächstes überprüft die *JAR* die Anzahl an *mismatches*

der alignierten *Reads* und die Anzahl an *clipped bases*. *Clipping* bedeutet, dass ein Teil des *Reads* (entweder am Anfang oder am Ende) nicht an das *Referenzgenom* aligniert werden können. Das kann mehrere Gründe haben, z.B. kann an dem Transkript noch der *Poly-A Schwanz* angebracht gewesen sein. Wenn ein Fragment den *Poly-A Schwanz* inkludiert und dieser mit sequenziert wird, so lässt sich der Teil des *Reads* nicht mehr sinnvoll *mappen*. Die Anzahl von *mismatches* und *clipping* sind bereits in dem *Read* vermerkt und werden lediglich für das *ReadPair* aufsummiert.

Ab hier wird angefangen das Ergebnis korrekt zu formatieren.

1. Falls *cgenes* == 0 wird die *gdist* mit in das Ergebnis geschrieben. Wenn es sich um ein *Strang-positives* oder *negatives* handelt wird zusätzlich auf dem *Gegenstrang* nach inkludierenden Genen gesucht und bei einem Ergebnis größer 0 wird der Eintrag mit "antisense:true" vermerkt.
2. Falls *cgenes* > 0 wird *cgenes* und die Regions-Annotation in das Ergebnis übernommen.

Als letztes wird in beiden Fällen noch der *pcr-index* berechnet und mit in das Ergebnis geschrieben. Der *pqr-index* speichert wie oft wir ein *ReadPair* bereits gesehen haben. Wie in 1 beschrieben, werden die Fragmente auf der *Flow Zelle* zuerst durch *PCR* amplifiziert. Dieses Protokoll garantiert nicht eine gleichmäßig starke Amplifikation über allen Fragmenten. Viel mehr kommt es zu starken Diskrepanzen zwischen der Häufigkeit der einzelnen Fragmente. Der *pqr-index* benutzt die *meltedBlocks* der *ReadPairs* als eindeutige Erkennungssignatur und zählt wie oft ein *ReadPair* bereits vorgekommen ist.

Das Ergebnis wird mit einem *BufferedWriter* in die Ergebnisdatei geschrieben und es wird mit dem nächsten *ReadPair* weiter gemacht.

### 3.1.3 Reduktion der Heap Benutzung

Die *Reads* innerhalb der *BAM* sind nach Startposition sortiert. Dies lässt sich ausnutzen um die Arbeitsspeichernutzung zu reduzieren. Sobald ein neues Chromosom in der *BAM* Datei erreicht ist, wird die *seenEntries* *HashMap* geleert. Zusätzlich wird der zu dem alten Chromosom zugehörige *IntervalTree* mit dessen Genen gelöscht und der *pqr-index* ebenfalls neu initialisiert.

## 4 – Ergebnisse

Für die drei vorgegebenen *BAM* Dateien wurden die *RPKM* Werte berechnet und in Abbildung 2 aufgetragen. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$RPKM = \frac{R_G}{\frac{G_L}{1000} \cdot S}$$

Dabei ist  $R_G$  die Anzahl an *Reads* deren Regions-Annotation auf  $G$  verweist,  $G_L$  ist die Länge der aufsummierten geschmolzenen Exons des Gens  $G$  und  $S$  ist der Skalierungsfaktor  $\left(\frac{|R_{total}|}{1000000}\right)$ . Zum Reproduzieren der Ergebnisse wird folgendes *Bash Skript* zur Verfügung gestellt:

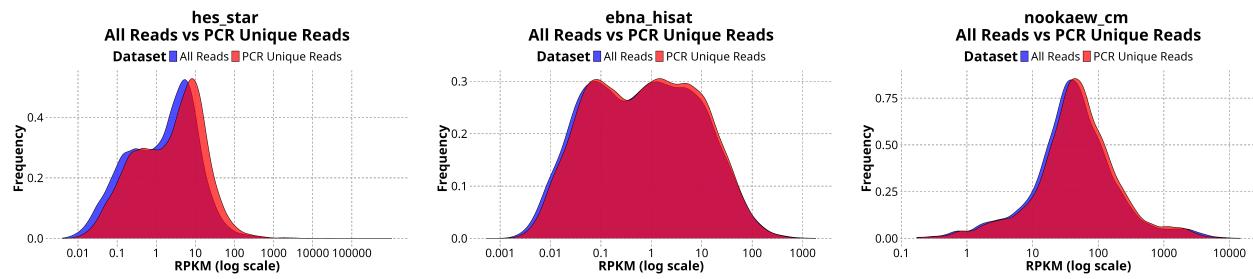
```
bash rpkm.sh <sample.annot> <sample.gene_lengths>
```

Hierbei ist die *<sample.gene\_lengths>* Datei die Tabelle die sich mit der *-lengths* Option der *JAR* in Abschnitt 3 erstellen lässt.

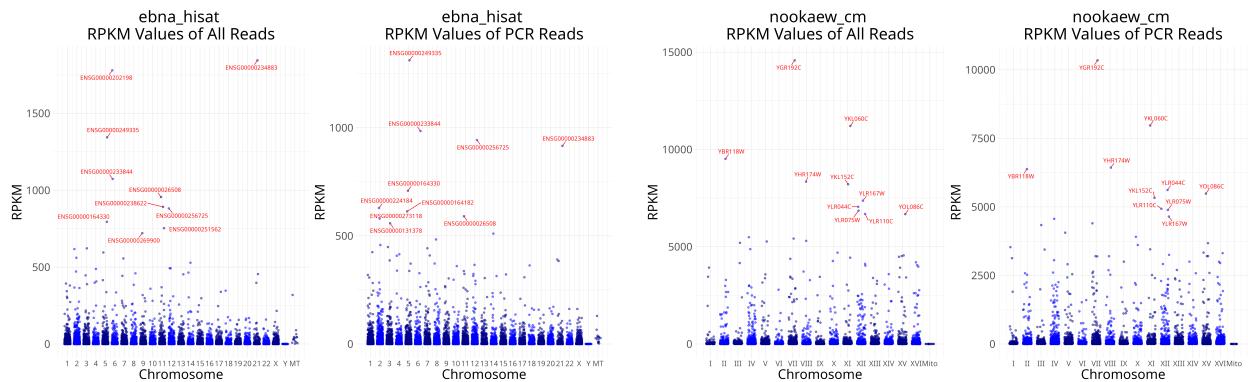
Die zwei menschlichen Samples *hes\_star* und *ebna\_hisat* weisen einen ähnlichen Wertebereich zwischen 0.001 und 100 auf, wobei die Verteilung etwas unterschiedlich ist was unter anderem daran liegt, dass *ebna\_hisat* mehr als doppelt so viele annotierte *ReadPairs* enthält als *hes\_star*. Zudem hat *hes\_star* viel extremere *outlier* als *ebna\_hisat* (vor allem zu sehen in Abbildungen 3 und 4). In allen drei Verteilungen in Abbildung 2 ist ebenfalls die Korrektur der *PCR Unique Reads* klar als *Verschiebung* nach rechts erkennbar, denn der *Skalierungsfaktor S* wird durch das entfernen der *PCR* Artefakte kleiner, wodurch der *RPKM* Wert wiederum größer erscheint.

Die Ergebnisse entsprechen ebenfalls den Erwartungen, denn die meisten Gene sollten in der Zelle inaktiviert sein, während nur ein Bruchteil stark exprimiert vorliegt. In der Hefe sind vor allem Gene wie "YGR192C", "YKL060C" und "YHR174W" (Abbildung 2 Plot rechts) hoch exprimiert, welche jeweils wichtige Enzyme der *Glykolyse* herstellen (*Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase*, *Fruktosephosphat-1,6-Bisphosphatase* und *Enolase*).

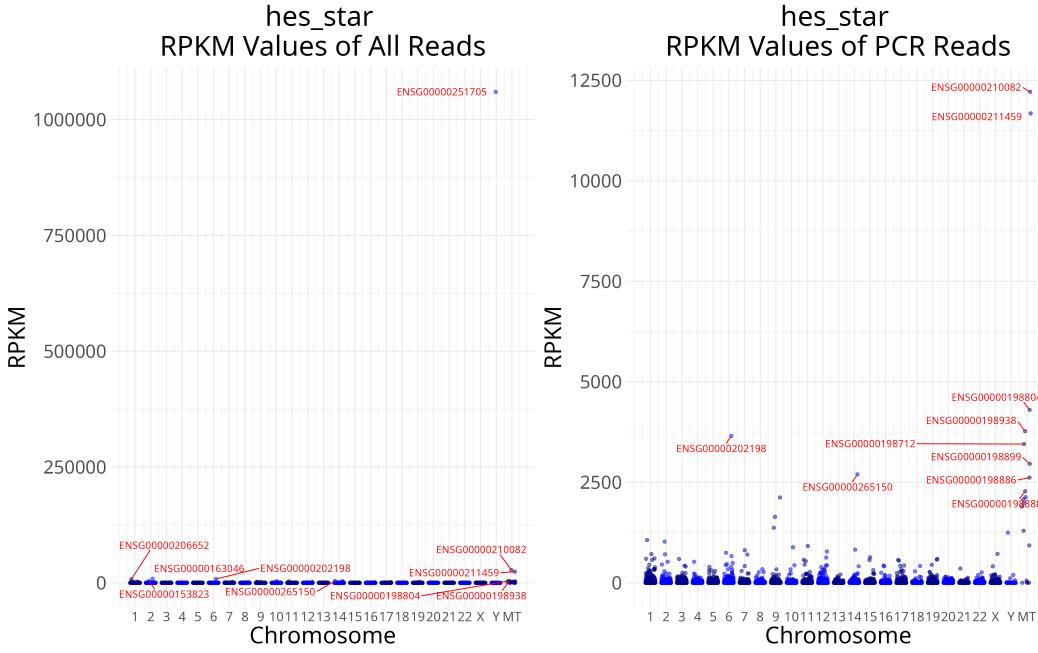
In dem *ebna\_hisat*-Sample codiert "ENSG00000210082" mit dem höchsten *RPKM*-Wert die mitochondriale *16sRNA*, welche die große Untereinheit des mitochondrialen *Ribosoms* bildet, während im *hes\_star*-Sample "ENSG00000249335" als *LincRNA* identifiziert wurde, die an der Genregulation beteiligt ist.



**Abbildung 2 – RPKM Verteilung der Gene per Sample. Dabei wird zwischen *All Reads* und *PCR unique Reads* unterschieden. *All Reads* inkludiert alle *ReadPairs* die eine Regions-Annotation besitzen. Bei *PCR unique Reads* werden nur *ReadPairs* mit *pcr-index = 0* berücksichtigt.**



**Abbildung 3 – RPKM Werte aufgeteilt nach Chromosomen und Vergleich der *All Reads* mit *PCR Unique Reads*. Die Top 10 outlier sind jeweils mit Rot markiert.**



**Abbildung 4 – RPKM Werte aufgeteilt nach Chromosomen und Vergleich der *All Reads* mit *PCR Unique Reads*. Die Top 10 *outlier* sind jeweils mit Rot markiert. Hier ist zusehen wie stark ein PCR amplifiziertes Fragment ("ENSG00000251705") das gesamt Bild verzerren kann.**

#### 4.1. Laufzeit

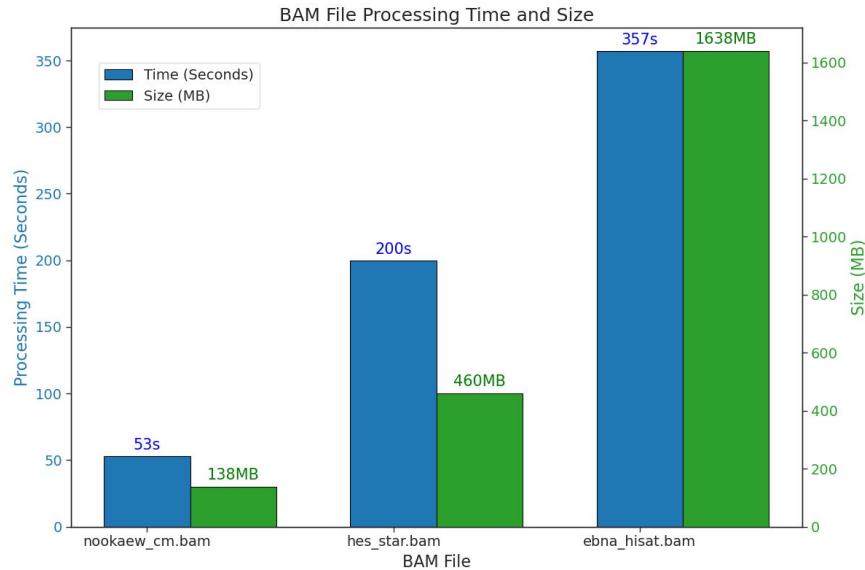
Die Komplexität der *JAR* ist linear in der Anzahl an Einträgen der *BAM* Datei und der *GTF*-Datei, wobei das Einlesen der *GTF-Datei*, bei großen *BAM* Dateien, nur einen Bruchteil  $G$  der Gesamtkosten ausmacht. Im worst case sind alle *Reads* in einer *BAM*-Datei mit  $R$  vielen Einträgen valide. Somit gibt es insgesamt  $\frac{R}{2}$  viele *ReadPairs* welche im worst case alle *genic* sind, d.h eine Regions-Annotation haben. Für jeden dieser *ReadPairs* kostet die gesamte Annotation  $K$  viel Aufwand, wobei dieser Aufwand konstant ist. Somit beträgt die Laufzeit im worst case:

$$\mathcal{O}(G + R + \frac{R}{2} \cdot K) \in \mathcal{O}(G + 2 \cdot R \cdot K) \in \mathcal{O}(G + R) \in \mathcal{O}(R).$$

Da  $G << R$  für große *BAM* Dateien.

#### 4.2. Benchmarking

Die in 4.1 theoretisch bestimmte Laufzeit spiegelt sich in Abbildung 5 wieder. Wenn man zusätzlich die Anzahl an annotierten *ReadPairs* in Tabelle 2 betrachtet, lässt sich grob abschätzen, dass die



**Abbildung 5 – Laufzeit der JAR auf den 3 vorgegebenen *BAMs* in Sekunden verglichen mit dem *BAM* Volumen in *MB*. Die Ausführung der JAR erfolgte auf folgender Hardware (CiP Rechner): Intel(R) Core(TM) i7-8700 CPU @ 3.20GHz mit 6 Kernen (12 Threads), 12 MB L3-Cache, und einer RAM-Limitation von 10 GB (-Xmx10g).**

**Tabelle 2 – Anzahl an annotierten *ReadPairs* per *BAM* Datei**

BAM	Total <i>ReadPairs</i>
ebna_hisat	46536090
hes_star	20098529
nookaew_cm	5054624

JAR pro 20 Mio *ReadPairs* ca. 200s braucht. Sie skaliert sogar etwas besser für noch größere Dateien, denn für > 46 Mio *ReadPairs* in der *ebna\_hisat* Datei benötigt sie unter 400s.

#### 4.3. Korrektheit

Für die Korrektheit wurden die *BAM* Dateien mit einem externen Tool names *featureCounts* (Liao, Smyth, and Shi 2014) analysiert. Das Tool berechnet die Anzahl an alignierten *ReadPairs* pro Gen:

```
featureCounts -p --countReadPairs -a Saccharomyces_cerevisiae.R64-1-1.75.gtf
-o counts.txt -t exon -g gene_id -T 4 nookaew_cm.bam
```

Vergleichen wir den Output mit unserem Ergebnis, so fällt auf, dass ein einige Unterschiede zwischen ihnen gibt. Tabelle 3 zeigt jeweils die Top 10 (rohen und nicht nach *pcr-index* normalisierten)

*ReadPair Counts* pro Gen der *nookaew\_cm BAM* Datei. Gene die in beiden Ergebnissen vorkommen sind jeweils farbig markiert.

Es fällt auf, dass die zwei verschiedenen Programme in sechs Genen (unterstrichen) nicht einig sind (abgesehen von den *ReadPair Counts*). Bei den *ReadPair Counts* scheint es bei allen Genen (außer bei **YHR174W** und **YGR192C**) so, als würde die *JAR* immer etwas weniger (3000-5000) *ReadPairs* zählen als das *featureCounts* Tool. Bei **YHR174W** und **YGR192C** wiederum scheint es als hätte die *JAR* doppelt so viele *ReadPairs* gezählt.

Die Unterschiede können verschiedenen Gründen haben, die Daten lassen vermuten, dass die *JAR* etwas strenger filtert, da sie meist weniger *ReadPairs* zählt als das Programm *featureCounts*. Zudem könnte eine unterschiedliche Behandlung von Mehrfachausrichtungen (*Multimapping Reads*) oder der Umgang mit unzuverlässigen Alignments zu den Abweichungen führen. Diese Unterschiede können auch durch die Art der Annotationen, die im jeweiligen Tool verwendet werden, beeinflusst sein.

Abgesehen von den zwei zu hoch gezählten Genen **YHR174W** und **YGR192C** und den sechs verschiedenen Genen, sind die Trends und der Wertebereich sehr ähnlich, was darauf hindeutet, dass beide Tools grundsätzlich ähnliche Ergebnisse liefern und eine vergleichbare Leistung bei der Zählung der *ReadPairs* aufweisen.

**Tabelle 3 – Top 10 JAR und featureCounts ReadPair Counts pro Gen, Gene die in beiden Ergebnismengen vorkommen sind farbig markiert.**

<i>JAR</i>		<i>featureCounts</i>	
<b>Gen</b>	<b>ReadPair Count</b>	<b>Gen</b>	<b>ReadPair Count</b>
<b>YGR192C</b>	60177	<b>YKL060C</b>	55803
<b>YBR118W</b>	54179	<b>YLR044C</b>	54007
<b>YKL060C</b>	50011	<b>YGL008C</b>	46442
<b>YLR044C</b>	49344	<b>YGR192C</b>	33377
<b>YHR174W</b>	45318	<b>YOL086C</b>	32462
<b>YGL008C</b>	39451	<b>YLR249W</b>	27077
<b>YOL086C</b>	28881	<b>YOR063W</b>	25241
<b>YCR012W</b>	26885	<b>YLR167W</b>	23872
<b>YKL152C</b>	25221	<b>YER091C</b>	23493
<b>YLR249W</b>	24588	<b>YHR174W</b>	21728

## Referenzen

**BioRender.** 2024. *BioRender - Biological Figure Creation Tool*. <https://BioRender.com>. Accessed: 2024-12-09. (Cited on page 6).

**Liao, Yunshun, Gordon K. Smyth, and Wei Shi.** 2014. “featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features.” *Bioinformatics* 30 (7): 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>. (Cited on page 12).