Instrukcja do ćwiczenia nr 2 z MBI
Adnotacja DNA

Wiktor Kuśmirek Robert Nowak

2024Z

1 Wstęp

Nić DNA składa się z regionów kodujących i niekodujących. W regionach kodujących (eksonach) zawarta jest informacja o sekwencji aminokwasów w cząsteczce białka, regiony niekodujące (introny) rozdzielają eksony, ich rola w organizmie człowieka nie jest jeszcze do końca zbadana.

Przedmiotem niniejszego ćwiczenia jest adnotacja DNA, czyli identyfikacja regionów kodujących nici DNA i przypisanie im pełnionych w organizmie człowieka funkcji. Kolejnymi etapami ćwiczenia będą:

- zamaskowanie sekwencji repetytywnych - proces maskowania sekwencji repetytywnych w wejściowej sekwencji DNA pozwoli na uzyskanie poprawniejszych wyników adnotacji
- mapowaniu znanych sekwencji białek i mRNA na sekwencje DNA (białka i mRNA są zakodowane w eksonach, zmapowanie pozwoli na oznaczenie sekwencji kodujących w wejściowym DNA)
- oznaczeniu sekwencji kodujących i niekodujących w wejściowej sekwencji DNA
- ekstrakcji sekwencji do dalszych analiz (geny)
- przypisaniu funkcji zidentyfikowanym genom

2 Adnotacja DNA

Instrukcja pokazuje poszczególne kroki na Ubuntu 20.04 w wersji 64 bitowej. Wymagania wstępne to instalacja aplikacji docker.

```
sudo apt-get install docker
```

2.1 Sekwencje kontigów i aplikacje

Pobierz sekwencje kontigów badanego w ćwiczeniu organizmu oraz potrzebne do ćwiczenia aplikacje

```
sudo docker pull wkusmirek/repeatmasker
sudo docker pull wkusmirek/maker

wget path_to_genome
wget path_to_proteins
wget path_to_mRNA_transcripts
```

Odnośniki do danych (pliki FASTA) są dostępne na stronie przedmiotu MBI.

2.2 Przygotowanie danych

Rozpakuj pobrane pliki FASTA, np:

```
gzip -d *
```

Następnie z pliku zawierającego wyniki assemblingu (plik ze skafoldami) wybierz jedną sekwencję DNA. Proszę wybrać identyfikator sekwencji o indeksie numer_indeksu mod 150. Jeżeli w numerze indeksu występują jakieś litery - pomijamy je. Rozważamy numer indeksu jednej osoby z zespołu. Przykładowo dla numeru 01027972 wybieramy identyfikator sekwencji z linii o indeksie 22 (1027972 mod 150 = 22). Proszę zamieścić w sprawozdaniu informacje o numerze indeksu oraz identyfikatorze wybranej sekwencji. Plik z mapowaniem indeksów na identyfikatory sekwencji dostępny jest na stronie przedmiotu. Po wybraniu identyfikatora sekwencji wybierz odpowiednią sekwencje z pliku ze skafoldami i zapisz ją w oddzielnym pliku o nazwie 'single_scaffold.fa'.

2.3 Maskowanie genomu

Wygeneruj zmodyfikowaną sekwencję DNA, która będzie miała zamaskowane (oznaczone symbolami 'N') podsekwencje powtarzające się. Wykorzystaj program RepeatMasker:

```
sudo docker run -it --rm -v /tmp:/tmp
 -w /tmp wkusmirek/repeatmasker RepeatMasker
 --species arabidopsis /tmp/single_scaffold.fa
```

Zapoznaj się z wygenerowanym plikiem oraz z logami aplikacji z konsoli. Porównaj pliki 'single_scaffold.fa' i plik 'single_scaffold.fa.masked'.

Odpowiedz w sprawozdaniu na następujące pytania:

- **Ile nukleotydów zostało zamaskowanych?**
- **Czy zamaskowane nukleotydy były pojedyńczymi nukleotydami, czy ciągami nukleotydów?**
- **Kolejnym etapem ćwiczenia będzie zmapowanie sekwencji mRNA i białek na genom z zamaskowanymi sekwencjami repetytywnymi. W jaki sposób maskowanie sekwencji repetytywnych może wpłynąć na wynik mapowania?**

2.4 Mapowanie znanych sekwencji i adnotacja strukturalna

Adnotacja strukturalna dostarcza dodatkowych danych ułatwiających zidentyfikowanie struktur genowych. Główną metodą adnotacji jest zmapowanie białek i mRNA na genom. Wykorzystaj program Maker:

- wygeneruj pliki konfiguracyjne:

  ```
  sudo docker run --rm -v /tmp:/tmp -w /tmp wkusmirek/maker maker -CTL
  ```

- zmodyfikuj plik 'maker_opts.ctl', ustawiając odpowiednie ścieżki do plików dla opcji: 'genome', 'est', 'protein'. Ścieżka dla 'genome' powinna wskazywać na ścieżkę do zamaskowanego pliku 'single_scaffold.fa.masked'.

- uruchom aplikację Maker

  ```
  sudo docker run --rm -v /tmp:/tmp -w /tmp wkusmirek/maker maker
  ```

Zapoznaj się z wygenerowanym plikiem .gff. Przykładowa ścieżka do pliku .gff to:

```
/tmp/single_scaffold.fa.maker.output/single_scaffold.fa_datastore
/F8/34/HDID_contig0001624/HDID_contig0001624.gff
```

Ścieżka ta może nieznacznie różnić się w zależności od użytej sekwencji DNA. Wklej 10 pierwszych wierszy z tego pliku do sprawozdania.

Odpowiedz w sprawozdaniu na następujące pytania:

- **Jakie informacje można odcztać z wygenerowanego pliku .gff?**
- **Oblicz ilość wygerowanych zdarzeń typu *expressed_sequence_match* i *protein_match*. Co oznaczają wymienione typy zdarzeń?**

2.5 Adotacja funkcjonalna

Znajdź w pliku .gff wiersz opisujący fragment genu zawierający w opisie znacznik 'expressed_sequence_match'. Przykładowy wiersz może wyglądać w następujący sposób:

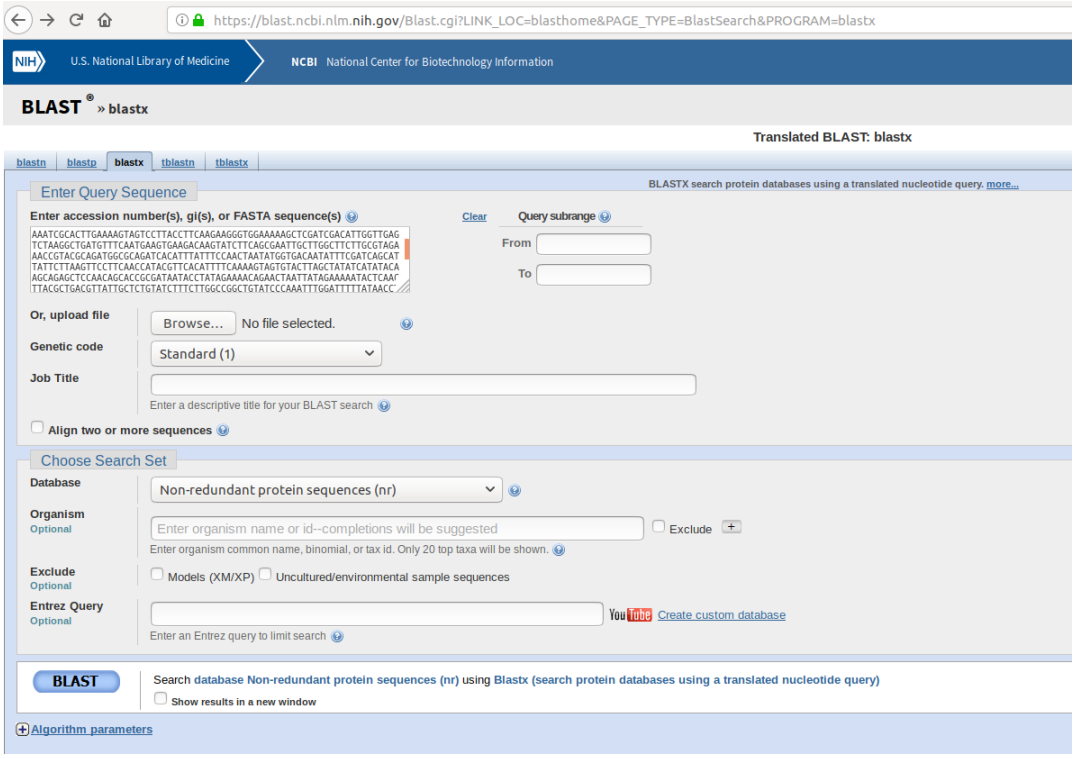
```
HDID_scaffold0000001 blastn expressed_sequence_match 17669 18426 40 -.
ID=HDID_scaffold0000001:hit:57:3.2.0.0;Name=HDID_0000675501-mRNA-1
```

Jeśli wiersz ze znacznikiem 'expressed_sequence_match' nie jest obecny w pliku gff, to powtórz całe ćwiczenie dla innej sekwencji wejściowej, która została wybrana na początku ćwiczenia. Sekwencje wybierz w sposób losowy, opisz w sprawozdaniu fakt braku 'expressed_sequence_match' oraz identyfikator nowej sekwencji.

Następnie z sekwencji FASTA, zapisanych na końcu pliku .gff, wyodrębnij sekwencję fragmentu genu. Dla zaprezentowanego powyżej wiersza należy z sekwencji o identyfikatorze HDID_scaffold0000001 wyodrębnić sekwencję nukleotydów o indeksach 17669 – 18426.

Dla otrzymanej sekwencji przypisz funkcje zidentyfikowanym genom: użyj algorytmu BLASTX z bazy NCBI (`https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&`

`PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastx`) i wyszukaj opisy dla wybranych sekwencji genów. Wklej wyodrębnioną sekwencję DNA, nie zmieniaj żadnych opcji i kliknij przycisk "BLAST".



przkładowy wynik

Dodaj do sprawozdania nazwy organizmów, które mają 5 najbardziej podobnych sekwencji do badanej, procent podobieństwa oraz istotność wyniku (E-value).

Odpowiedz w sprawozdaniu na następujące pytania:

- **Co oznacza oraz jak interpretować wartość E-value?**
- **Zinterpretuj liste uzyskanych organizmów (w ćwiczeniu pracujemy na genomie tasiemca szczurzego *Hymenolepis diminuta*).**

3 Zadanie implementacyjne

Proszę zapoznać się z tematyką konwersji sekwencji aminokwasów na mRNA. Proszę zaimplementować prosty skrypt umożliwiający odczytać zawartość pliku w formacie FASTA

z sekwencjami aminokwasów. Następnie aplikacja konwertuje sekwencje aminokwasów na sekwencje RNA i zapisuje ją oddzielnego pliku w formacie FASTA. Proszę wykorzystać biblioteki dedykowane do przetwarzania danych genomowych, np.:

- SeqAn;
- Biopython;
- BioJava.

Uwaga: Jeden aminokwas może być kodowany przez więcej niż jedną trójkę nukleotydów - w takim wypadku należy na wyjściu podać dowolną trójkę kodującą ten aminokwas.