

UNIVERZITET U BEOGRADU
MATEMATIČKI FAKULTET



Andžela R. Mijailović

IMPLEMENTACIJA DODATKA ZA SOFTVER ANNOVAR ZA PRIKAZ FUNKCIJE I FENOTIPA GENA

master rad

Beograd, 2021.

Mentor:

dr Jovana KOVAČEVIĆ, docent
Matematički fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

prof. dr Gordana PAVLOVIĆ-LAŽETIĆ, redovni profesor
Matematički fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Nevena VELJKOVIĆ, naučni savetnik
INN Vinča, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Najmilijima

Naslov master rada: Implementacija dodatka za softver Annovar za prikaz funkcije i fenotipa gena

Rezime: Raznovidnost života na zemlji je zasnovana na različitim varijacijama gena jedne vrste. Zadatak bioinformatičkih alata je da omoguću obradu i analizu podataka o varijacijama i da nam omoguću uvide u osnove fenotipske i funkcionalne raznovidnosti. *ANNOVAR (ANNotate VARiation)* je globalno značajan bioinformatički softver za interpretaciju varijacija određenog genoma. Ipak, nedostaju podaci o funkciji gena i o fenotipu koji je sa njegovom funkcijom povezan. Cilj ovog master rada je da razvije dodatak za softver *Annovar* pod nazivom *AnnoPI* (skraćeno od *Annovar Plug In*). *Annovar* omogućava anotaciju datoteka sa genetskim varijacijama što podrazumeva generisanje nove datoteke sa različitim podacima o genetskim varijacijama koje se nalaze rasute po različitim bazama podataka. Pored podataka koje *Annovar* dodeljuje, od značaja mogu biti i drugi podaci o genima kao što su funkcija gena i fenotipi sa kojima je gen povezan. *AnnoPI* omogućava automatsko pronalaženje ovih podataka u javno dostupnim bazama podataka i zajedno sa podacima iz datoteke generisane od strane *Annovar*-a kreira datoteku sa objedinjenim podacima o genetskim varijacijama. Aplikacija je testirana nad podacima humanih uzoraka koje obezbeđuje projekat za standardizaciju podataka u genomici "Genom u boci". Pisana je u programskom jeziku *Python*, a rezultat predstavlja *.html* stranice koje pregledno prikazuju objedinjene informacije. Trajanje rada softvera *AnnoPI* za testirane ulazne datoteke iznosilo je nekoliko minuta.

Ključne reči: gen, genom, nukleotid, varijacija, SNV, *Annovar*, ontologije, *GO*, *HPO*, funkcija, fenotip

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Genom i SNV	3
2.1	Genom	5
2.2	SNV	6
2.2.1	Metode za detektovanje SNV	6
3	Podaci	8
3.1	Ontologije	8
3.1.1	<i>GO</i>	9
3.1.2	<i>HPO</i>	12
3.2	Genom u boci	14
4	Annovar	15
4.1	Tehnički okvir i upotreba	15
5	Arhitektura i implementacija dodatka <i>AnnoPI</i>	21
5.1	Datoteke	21
5.1.1	Struktura izlazne datoteke	22
5.1.2	Dodatne informacije	24
5.2	Princip rada aplikacije	28
5.2.1	Funkcionalnosti izlazne <i>.html</i> datoteke	33
5.2.2	Implementacija	35
6	Zaključak	38
	Literatura	39

Glava 1

Uvod

Humani genom predstavlja ogroman izazov, kako za istraživanje, tako i za reprezentaciju. Da bi se pročitao, potrebno je prvo podeliti ga na segmente. Njihove dužine moraju biti dužine najviše 100-200 baznih parova jer sekvenceri ne mogu očitati duže segmente. Iscepan humani genom potom treba sastaviti kao slagalicu, s tim što nam često nije poznata slika koju treba dobiti. Rekonstrukcija genoma je olakšana ukoliko su delovi za slaganje veći. Posebni alati koji služe za sklapanje genomske slagalice na osnovu očitavanja nazivaju se asembleri.

Brzi razvoj tehnologija za sekvenciranje genoma doveo je do mogućnosti da se sekvenciraju genomi različitih organizama. Pored toga, za neke vrste postoje takozvani referentni genomi koji predstavljaju genome nastale kombinovanjem genoma određenog broja uzoraka te vrste. U genomskim sekvencama kod različitih jedinki iste vrste, na nivou populacije, može doći do razlika u nukleotidima na istim pozicijama. Ove razlike nazivamo genetskim varijacijama. Naučnicima koji se bave ovom oblašću od značaja su različite informacije o genetskim varijacijama kao što su pozicija na hromozomu na kojoj se nalazi varijacija, kom genu pripada, kakvi su njeni funkcionalni efekti, itd. Ove informacije se agregiraju po raznim bazama podataka, a da bi istraživači mogli da povežu postojeće informacije sa konkretnim podacima koristimo različite alate. Jedan od takvih alata je softver *Annovar*.

Annovar (skraćeno od *ANNotate VARIation*) predstavlja bioinformatički softverski alat koji omogućava tumačenje i određivanje prioriteta pojedinačnih nukleotidnih varijacija (eng. *SNV*), umetanja, brisanja i varijacija broja kopija (eng. *CNV*) datog genoma. *Annovar* pruža mogućnost anotiranja humanih genoma *hg18*, *hg19*, *hg38*, kao i modelovanje genoma organizama kao što su: miš (lat. *Mus musculus*), voćna mušica (lat. *Drosophila melanogaster*), valjkasti crv (lat. *Caenorhabditis*

elegans), kvasac (lat. *Saccharomyces cerevisiae*) i mnogi drugi. Anotacije se mogu koristiti za utvrđivanje funkcionalnih posledica mutacija na genima, u citogenetskoj analizi, za pronalaženje varijacija u očuvanim regionima itd. *Annovar* zajedno sa softverskim alatima *SNP effect* (skraćeno *SnpEFF*) i *Variant Effect Predictor* (skraćeno *VEP*) predstavlja najčešće korišćene softverske alate za anotiranje varijacija [9].

Cilj ovog rada jeste implementacija dodatka *AnnoPI* za softver *Annovar* koji bi omogućio prikaz informacija o genetskim varijacijama koje prikuplja *Annovar* zajedno sa dodatnim informacijama koje *Annovar* ne uključuje, konkretno informacijama o funkciji i fenotipu gena na kom se varijacije nalaze. Implementirani softver je javno dostupan na *GitHub* repozitorijumu projekta *AnnoPI* [2].

Na početku rada, u poglavlju 2, dat je prikaz bioloških pojmova koji se koriste u ovom radu, pre svega genoma i genetskih varijacija. Poglavlje 3 posvećeno je bioinformatičkim podacima gde centralno mesto zauzimaju resursi koji povezuju termine u biološkim ontologijama sa genima. U našem radu bavićemo se resursima za ontologiju gena (*Gene ontology resource*) i ontologiju ljudskih fenotipa (*Human Phenotype Ontology*). Prikazan je i projekat „Genom u bocí” u okviru koga se i nalaze podaci testirani u ovom radu. Tehnički okvir i upotreba softvera *Annovar* objašnjeni su detaljnije u poglavlju 4, dok je peto poglavlje posvećeno rezultatima i detaljnom opisu praktičnog dela rada.

Glava 2

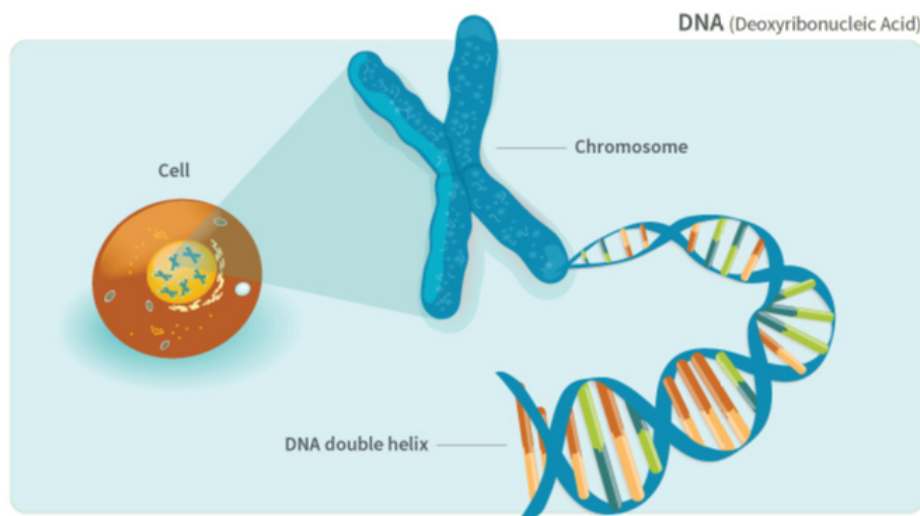
Genom i SNV

Ćelija je osnovna jedinica funkcije i građe svakog živog bića. U zavisnosti od toga kako je u ćeliji organizovan genetski materijal, postoje prokariotske i eukariotske ćelije. Kod prokariotskih ćelija genetski materijal je rasut po ćeliji, dok je kod eukariotskih ćelija genetski materijal grupisan u jezgru koje je od ostatka ćelije odvojeno membranom. Eukariotske ćelije sadrže organele u kojima se odvijaju ćelijski procesi. Jezgro eukariotske ćelije naziva se jedro i predstavlja najveću organelu zaduženu za regulaciju svih ćelijskih procesa. U tim procesima učestvuju jedinjenja kao što su nukleinske kiseline, sastavljene od 4 nukleotida, i proteini, sastavljeni od 20 esencijalnih aminokiselina.

U ćeliji postoje dve vrste nukleinskih kiselina - dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) i ribonukleinska kiselina (RNK). Glavni nosioci genetičke informacije su molekuli DNK. Osnovu svakog nukleotida čini jedna od četiri azotne baze: adenin, citozin, guanin i timin. Nukleotidi RNK sadrže uracil umesto timina. Azotne baze se skraćeno obeležavaju sa **A**, **C**, **G** i **T**, odnosno **U**. Postoji pravilo po kom se ove baze spajaju i to je adenin sa timinom, citozin sa guaninom, a sve sa ciljem formiranja jedinica koje nazivamo bazni parovi (skraćeno **bp**). Sa stanovišta računarstva, DNK možemo posmatrati kao nisku nad azbukom $\{A, T, C, G\}$, a proteine kao nisku nad azbukom od 20 aminokiselina [6].

Za vreme deobe ćelije u jedru se mogu uočiti hromozomi koji imaju ključnu ulogu u nasleđivanju. Ćelija može imati jednostruki skup hromozoma (haploidna ćelija) i dvostruki skup hromozoma (diploidna ćelija), pri čemu je svaki skup dobijen od jednog roditelja. Molekul DNK se nalazi u hromozomima. Celovit deo DNK potreban za sintezu jednog proteina ili jednog molekula RNK naziva se **gen**. On predstavlja fizičku i funkcionalnu jedinicu nasleđivanja. Ilustracija ćelije, hromozoma i DNK

data je na slici 2.1.



Slika 2.1: Čelija, hromozom i DNK ¹

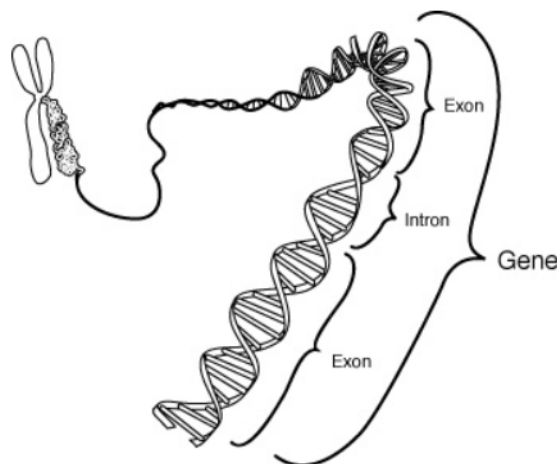
Svaki gen zauzima određeno mesto na hromozomu, ali kako u diploidnoj ćeliji postoje dva hromozoma sa tim genom na istom mestu, može se reći da se jedan gen javlja u dva oblika. Ovi oblici nazivaju se *aleli*. Nameće se pitanje kako se utvrđuje položaj gena na hromozomu. Ovaj postupak se naziva *mapiranje gena* [4]. Jedinstveni skup svih gena jedinke naziva se *genotip*. Na složeni način, uz uslove spoljašnje sredine, genotip upravlja skupom svih osobina jednog organizma, funkcije i ponašanja organizma koji nazivamo *fenotip* [5].

Geni nose informaciju o broju, vrsti i redosledu aminokiselina u proteinskom lancu. Informaciju o redosledu aminokiselina zapravo daje redosled nukleotida u DNK i predstavlja recept za sintezu proteina. Međutim, ne nose svi delovi gena informaciju za sintezu proteina. Oni segmenti gena koji nose informaciju se nazivaju *egzoni*, a oni koji ne nose *introni*.

Možemo uočiti da je građa gena eukariota mozaična: deo gena koji nosi šifru ispresecan je delovima koji ne nose šifru. Stoga, za gene je karakterističan diskontinuitet genetičke informacije. Ilustracija je data na slici 2.2.

Kod prokariota introni ne postoje već su njihovi geni neprekinuti nizovi kodirajućih nukleotida. Biološki značaj introna i njihova funkcija nisu još uvek razjašnjeni. Introni su našli praktičnu primenu u kriminologiji i sudskoj medicini poznatoj kao genetički otisci prstiju.

¹<https://www.ancestry.com/lp/where-is-dna-found>



Slika 2.2: Ilustracija mozaične strukture gena eukariota [10]

2.1 Genom

Kompletan nasledni materijal sadržan u jednoj haploidnoj ćeliji predstavlja **genom**. Humani genom sadrži oko tri milijarde i 200 hiljada baznih parova. Svaka jedinka ima jedinstveni genom pa tako među genomima različitih jedinki ima razlika. Različitosti na nivou genoma nazivamo **genetskim varijacijama**. One mogu biti na pojedinačnom nukleotidu i skraćeno ih označavamo sa **SNV** (eng. *Single Nucleotide Variation*).

Sa jedne strane, varijacije utiču na fenotip i samim tim na to kako izgledamo, funkcionišemo i ponašamo se. Sa druge strane, uzročnici su bolesti, stoga je važno otkriti njihovu funkcionalnu i fenotipsku povezanost. Koristeći prednosti sekvenciranja nove generacije, genetske varijacije se mogu posmatrati na nivou čitavog genoma.

Postupak određivanja genomske sekvence naziva se **sekvenciranje genoma**. Suštinski, predstavlja određivanje redosleda nukleotida na nivou molekula DNK. Sekvenciranje se vrši tako što se iz uzorka očitaju podsekvence DNK koje se nazivaju **očitanja** (eng. *reads*) a koje je nakon toga neophodno sastaviti u polaznu DNK sekvencu pomoću assemblera [7].

Humani referentni genom predstavlja „prosečan” humani genom koji je izračunat na određenom broju uzoraka. Kako je ovakav genom sastavljen sekvencioniranjem DNK većeg broja davalaca, referentni genom ne predstavlja skup gena nijedne pojedinačne osobe. Humani referentni genom u oznaci **GRCh37** (*The Genome Refe-*

rence Consortium human genome (build 37)) je trenutni referentni genom i baziran je na genomima 13 dobrovoljaca iz SAD. Na njegovom usavršavanju se i dalje radi.

2.2 SNV

Pojedinačna varijacija nukleotida (eng. *Single Nucleotide Variation*, skraćeno *SNV*) je tačkasta varijacija koja se javlja na određenom mestu u našem genomu. To mesto se naziva **lokus** [7]. Postoji više formi varijacija, ali je *SNV* najučestalija. Svaka jedinka ima oko nekih 3 miliona ovih pojedinačnih nukleotidnih varijacija, dakle, jedna na svakih hiljadu nukleotida. Pojedinačne varijacije nukleotida se mogu javiti u kodirajućim i nekodirajućim regionima genoma. Kodirajući regioni genoma se sastoje od **kodona**, nukleotidnih tripleta od kojih svaki određuje pojedinačnu aminokiselinu. Ako *SNV* ne menja tip aminokiseline, onda je u pitanju **sinonimni SNV**, u suprotnom je **nesinonimni SNV**. Nesinonimni *SNV* mogu menjati kodon jedne aminokiseline u kodon druge aminokiseline (eng. *missense SNV*) ili kodon jedne aminokiseline u stop kodon (eng. *nonsense SNV*). Pojedinačne varijacije nukleotida mogu značajno izmeniti 3D strukturu i funkciju proteina.

Kada se *SNV* javlja u nekodirajućim regionima, uglavnom je neutralan. Međutim, mogu uticati na ekspresiju gena ako se javljaju na mestima vezivanja transkripcionog faktora (proteina koji se vezuje za specifičnu DNK sekvencu i koji ima uloge kontrole prenosa genetičke informacije sa DNK na iRNK).

2.2.1 Metode za detektovanje SNV

Polazeći od datog skupa očitavanja dobijenog nakon sekvenciranja genoma, jedna od procedura za pronalaženje genetskih varijacija je sledeća [7]:

1. Poravnavaju se sva očitavanja u odnosu na referentni genom i kreiraju se *.bam* datoteke (ove datoteke predstavljaju kompresovane *.sam* datoteke koje sadrže informacije o poravnatim očitavanjima)
2. U slučaju pojave očitavanja koja nisu ispravna vrši se njihovo filtriranje
3. U ovom koraku sakupljaju se aleli na svim lokusima. Postoji mogućnost da su neki aleli koji se pojavljuju na određenom lokusu različiti u odnosu na referentne alele. Na jednom takvom lokusu može postojati SNV.

4. Za lokuse sa nereferentnim alelima primenjuju se različite statistike radi određivanja postojanja SNV na takvom lokusu.
5. Nakon pronalaženja svih SNV, dobijene informacije se smeštaju u *.vcf* (eng. *Variant Calling Format*) datoteku.

Glava 3

Podaci

Bioinformatika kao naučna oblast podrazumeva analizu i interpretaciju različitih tipova bioloških podataka sa ciljem istraživanja i boljeg razumevanja bioloških procesa, što se postiže razvijanjem računarskih metoda i alata. Najvažnije institucije, u čijim okvirima se i nalaze bioinformatičke baze podataka su:

- **NCBI** - Nacionalni centar za biološke informacije, SAD [18]
- **EBI** - Evropski bioinformatički insitut, Velika Britanija [12]
- **SIB** - Švajcarski bioinformatiči institut, Švajcarska [11]
- **KEGG** - Kjoto enciklopedija gena i genoma, Japan [16]

Jedna od važnih procedura u bioinformatičkim istraživanjima jeste anotiranje genetskih varijacija. Informacije o genetskim varijacijama se nalaze u datotekama. Anotacija predstavlja pridruživanje relevantnih informacija svakoj genetskoj varijaciji iz različitih baza podataka, često uz pomoć različitih alata. Primeri relevantnih informacija mogu biti: na kojoj se poziciji na hromozomu nalazi varijacija u odnosu na referentni genom, u kom je genu varijacija, kakvi su njeni predviđeni funkcionalni efekti, itd.

3.1 Ontologije

Pojam ontologije u računarstvu se odnosi na predstavljanje znanja u obliku formalno definisanog sistema pojmova (klasa, izraza, koncepata) i relacija između njih. U biološkim okvirima ovakav koncept služi za organizaciju i objavljivanje bioloških podataka.

3.1.1 GO

Ontologija gena, u oznaci *GO* (engl. *Gene Ontology*) predstavlja najveći izvor informacija vezanih za funkcije gena odnosno genskih produkata¹. Podaci u *GO* su prilagođeni za čitanje i od strane čoveka ali i za računarsku obradu[13]. Funkcija genskog produkta se iz ugla ontologije gena sagledava iz tri različita aspekta: molekularnih funkcija (eng. *Molecular Function*, *MF*), ćelijskih komponenti (eng. *Cellular Component*, *CC*) i bioloških procesa (eng. *Biological Process*, *BP*). Molekulska funkcija podrazumeva biohemijsku aktivnost genskog produkta. Ćelijska komponenta predstavlja mesto u ćeliji gde je genski produkt aktivan. Biološki procesi predstavljaju metaboličke ili regulacione procese kojima genski produkt doprinosi. Ako uzmemo za primer *GO* anotaciju genskog produkta *cytochrome c*, sa aspekta molekulske funkcije govori se o aktivaciji enzima oksidoreduktaze. Kada je reč o biološkom procesu, onda je to oksidativna fosforilacija. Ćelijska komponenta ovog produkta je mitohondrijski matriks.

Kako *GO* projekat nastoji da predstavlja aktuelne informacije, konstatno se ažurira i podleže revizijama. Izmene su često na nedeljnom nivou. Na zvaničnoj internet stranici *GO* projekta [14] moguće je preuzeti aktuelne verzije datoteka sa ontologijama. Ove datoteke imaju ekstenziju *.gaf*. Struktura datoteke je takva da su kolone razdvojene tabovima. Svaki red u *.gaf* datoteci predstavlja jednu vezu između genskog produkta i *GO* funkcije.

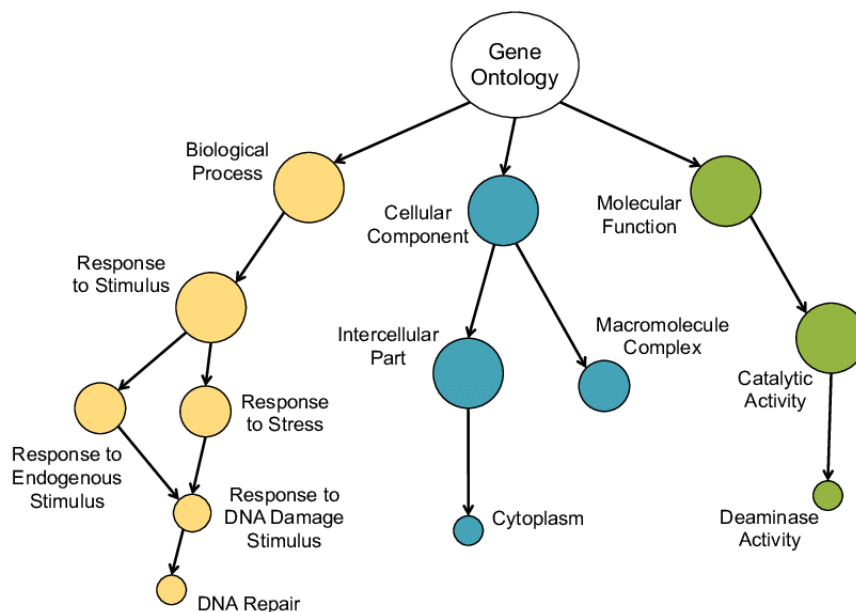
GO termi

Elementi ontologije gena su *GO* klase ili termi. Njihovi suštinski elementi su jedinstveno određeni kod i naziv terma. Jedinstveno određeni kod (u oznaci *GO ID*) predstavlja identifikator koji se sastoji od sedam cifara sa *GO*: prefiksom. Ime terma je takvo da je razumljivo čoveku, npr. vezivanje aminokiselina (engl. *amino acid binding*). Term, takođe, ima aspekt i može biti jedan od tri pomenuta: molekulska funkcija, ćelijska komponenta i biološki proces. Term ima i definiciju. Ona predstavlja opis onoga što term predstavlja. Između termova postoje relacije. One mogu biti *je*, *je deo* i *reguliše*.

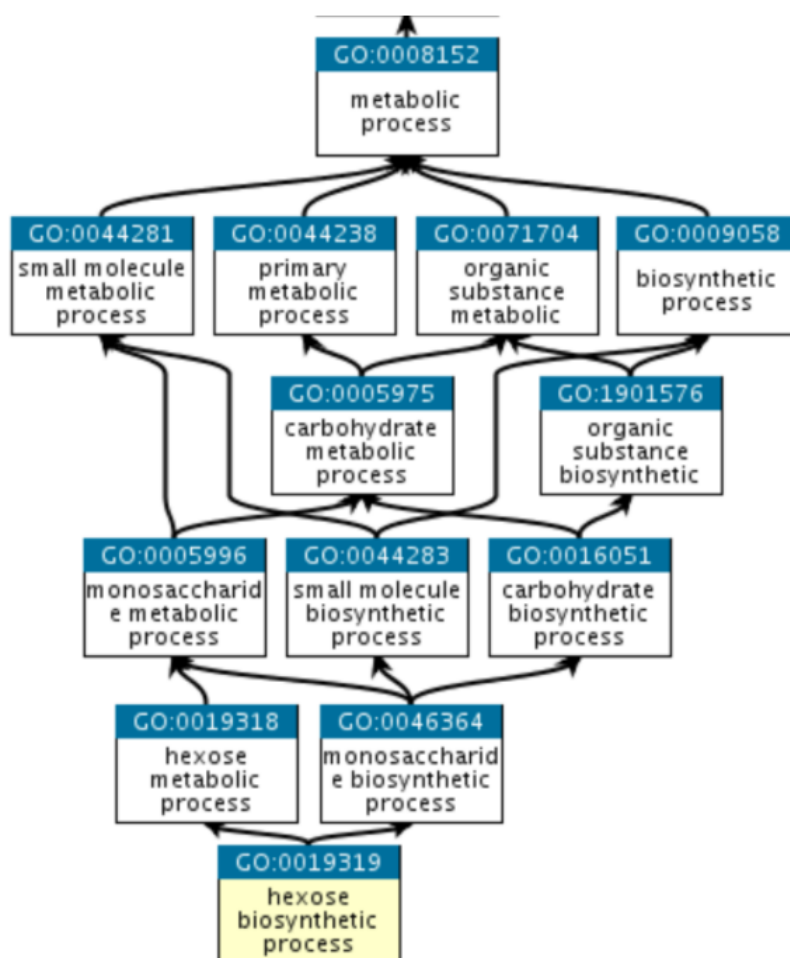
Sa aspekta računarstva, *GO* možemo posmatrati kao usmereni aciklički graf. U takvom grafu, *GO* termi odnosno funkcije predstavljaju čvorove, a relacije između njih predstavljaju grane. *GO* struktura je hijerarhijska. Relacija "dete-

¹Pod genskim produktom se podrazumeva protein, nekodirajuća RNK ili makromolekulski kompleks

roditelj” je relacija ”je” (engl. ”is-a”). To, zapravo, predstavlja odnos specijalizacija-generalizacija. Svaki čvor opisuje specifičniju funkciju u odnosu na svog pretka. U ovoj hijerarhiji moguće je da dete ima više roditelja. Koren ovakvog grafa predstavlja najopštiju funkciju i nosi naziv ontologije (*MFO*, *BPO*, *CCO*) dok listovi predstavljaju najspecifičnije funkcije. Ilustracije *GO* ontologije date su na slikama 3.1 i 3.2.



Slika 3.1: Deo ontologije *GO* [1]



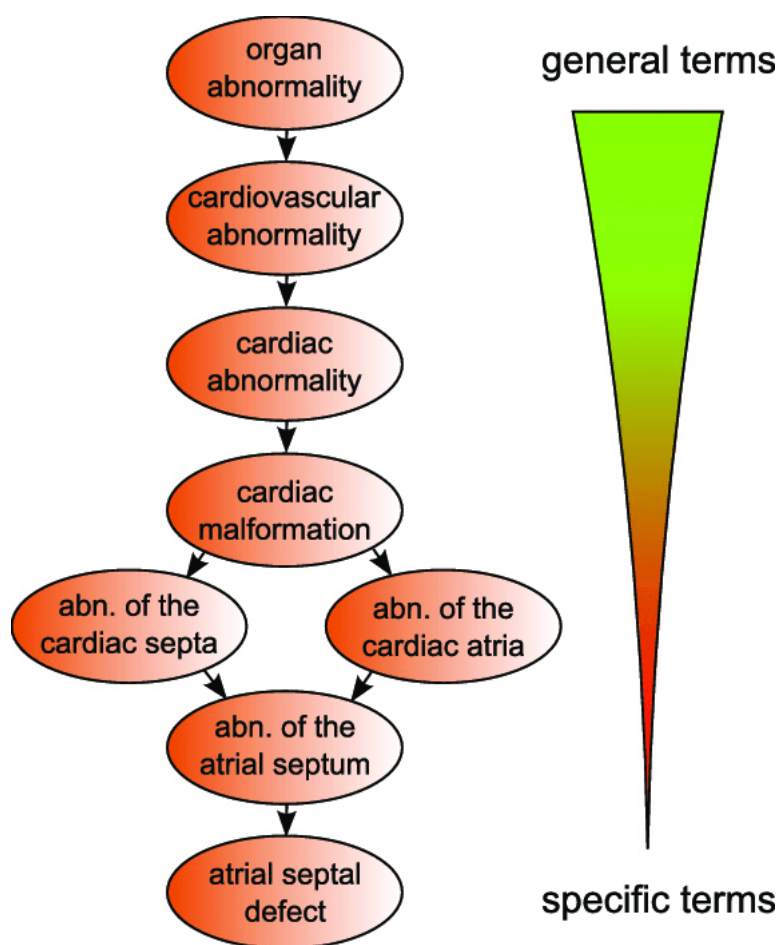
Slika 3.2: Primer podgrafa ontologije *GO* [13]

3.1.2 HPO

The Human Phenotype Ontology u oznaci **HPO** obezbeđuje standardizovan rečnik fenotipskih abnormalnosti koje se sreću kod ljudskih bolesti. Svaki izraz u *HPO* opisuje jednu fenotipsku abnormalnost. To mogu biti opštiji izrazi kao što je npr. abnormalnost građe uha, ali, takođe, mogu biti i prilično specifični kao što je korioretinalna atrofija. *HPO* pruža ontologiju medicinski relevantnih fenotipova, anotacije vezane za fenotip koji se odnosi na bolesti i algoritama koji se primenjuju u ovom kontekstu. Institucije poput međunarodne organizacije za retke bolesti, registri kliničkih laboratorija, biomedicinskih resursa i kliničkih softverskih alata sve više usvajaju *HPO* kao standard za fenotipske abnormalnosti čime u velikoj meri doprinose novonastalim naporima u globalnoj razmeni podataka za identifikovanje uzroka bolesti[15].

Elementi ontologije fenotipa imaju svoj identifikator. To je sedmocifreni kod sa prefiksom **HP:**.

Kao i prethodno opisanu ontologiju, ontologiju fenotipa možemo posmatrati kao usmereni aciklički graf. Čvorovi predstavljaju fenotipske pojmove a grane su relacije između njih. Razlika u odnosu na stabla se ogleda u tome što čvor koji predstavlja specijalizovaniji term (potomak) može imati više predaka - manje specijalizovanih terma. Upravo ovakva relacija ilustruje relaciju „is-a”, odnosno „je”. Na slici 3.3 dat je prikaz dela *HPO* ontologije.



Slika 3.3: Deo ontologije HPO [3]

3.2 Genom u boci

Konzorcijum „Genom u boci”[17] (eng. *Genome In A Bottle*, skraćeno *GIAB*) je javno-privatno-akademski konzorcijum pod pokroviteljstvom američkog Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (eng. *National Institute of Standards and Technology*, skraćeno *NIST*). Cilj ovog konzorcijuma je razvoj kompletne tehničke infrastrukture (referentnih standarda, referentnih metoda, referentnih podataka) koja bi omogućila korišćenje rezultata sekvencioniranja humanog genoma u kliničkoj praksi kao i u tehnološkim inovacijama. Glavni zadatak *GIAB*-a je karakterizacija humanih genoma i obezbeđivanje standardnog skupa podataka. Pored ostalih podataka, *GIAB* obezbeđuje podatke o genetskim varijacijama za tri humana genoma, takozvani ***Aškenazi trio***, nad kojima je testiran praktični deo ovog rada. U poglavlju 5 je naveden detaljan opis korišćenih datoteka.

Glava 4

Annovar

Povećanje efikasnosti i smanjenje cene sekvenciranja stvara sve veći jaz između stvaranja sirovih podataka i izdvajanja značajnih bioloških informacija. Jedan od načina za efikasno anotiranje varijacija nakon obrade sirovih podataka je upotreba softvera *Annovar* (ime predstavlja akronim engleskih reči *ANNOtate VARiation*). Ovaj alat omogućava korišćenje informacija vezanih za anotiranje genetskih varijacija koje se odnose na genome čoveka, kao i miša, muve, crva... *Annovar* može dodeliti anotacije na nivou gena, regiona, filtera, a ima i druge funkcionalnosti.

Na nivou gena možemo doći do informacije da li *SNP* ili *CNV* uzrokuju izmene u proteinu, kao i koje su aminokiseline zapravo izmenjene. Za nazive gena mogu biti korišćeni identifikatori iz različitih nomenklatura: *RefSeq*, *UCSC*, *ENSEMBL*, *GENCODE*, *AceView*. Na nivou regiona govorimo o nalaženju varijacija u posebnim regionima genoma, kao što su npr. zaštićeni regioni u okviru 44 vrste, predviđena mesta vezivanja faktora transkripcije, duplirani regioni u određenim segmentima, itd. U okviru filtera govorimo o identifikovanju varijacija koje se mogu naći u specijalizovanim bazama podataka, na primer je li varijacija prijavljena u *dbSNP*¹, koja je učestalost alela u projektu „1000 genoma” i drugo[19].

4.1 Tehnički okvir i upotreba

Annovar je napisan u programskom jeziku *Perl*. Najjednostavniji način za upotrebu *Annovar*-a je korišćenjem programa `table_annovar.pl` koji se poziva iz komandne linije. Obavezni argumenti komandne linije su:

¹baza podataka koja sadrži, između ostalog, pojedinačne nukleotidne varijacije (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

- putanja do ulazne datoteke
- putanja do direktorijuma u kom se nalaze baze podataka u vidu tekstualnih datoteka

Neki od opcionih argumenata su:

- `-h` (prikazivanje poruke sa uputstvom za korišćenje)
- `-buildver <string>` (verzija genoma)
- `-out <string>` (prefiks imena izlazne datoteke)
- `-remove` (brisanje pomoćnih datoteka)
- `-protocol <string>` (upućuje na imena datoteka koje predstavljaju baze podataka, a koje se nalaze u direktorijumu zadatom kao drugi obavezni argument komandne linije)
- `-operation <string>` predstavlja operacije nad navedenim datotekama argumenta `-protocol` koje upućuju na nivo na kom se vrši anotiranje:
 - `g` (nivo gena)
 - `gx` (nivo gena uz dodatne anotacije)
 - `r` (nivo regiona)
 - `f` (nivo filtera)
- `-nastring <string>` (znak za prikaz praznog polja)
- `-vcfinput` (naznačavanje da je ulazna datoteka u `.vcf` formatu i da će se pored izlazne `.txt` datoteke generisati i izlazna `.vcf` datoteka)
- `-polish` (proteinska notacija)
- `-otherinfo` (prikaz dodatnih informacija)
- `-csvout` (generisanje izlazne datoteke u `.csv` formatu)

Kompletna lista argumenata sa detaljnim objašnjenjima može se naći u uputstvu za korišćenje softvera *Annovar* [8].

Primer pozivanja programa je:

```
perl table_annovar.pl mom/mom.vcf humandb/ -buildver hg19 -out mom  
-remove -protocol refGene -operation g -nastring . -vcfinput -polish
```

Ulazna datoteka za ovaj program je datoteka koja sadrži informacije o genetskim varijacijama, najčešće tipa *.vcf*. Svaki red ovakve datoteke sadrži poziciju na kojoj postoji varijacija u odnosu na referentni genom u odnosu na koji je vršeno mapiranje, identifikator varijacije, tip varijacije, itd. Primer ulazne datoteke u *.vcf* formatu je dat na slici 4.1.

Izlazna datoteka programa je tabelarno organizovana datoteka u kojoj svaki red predstavlja skup anotacija za jednu genetsku varijaciju. Podrazumevani format je *.txt*, a navođenjem odgovarajućih argumenata u komandnoj liniji moguće je generisanje datoteke i u *.vcf* ili *.csv* formatu. Prvih nekoliko kolona odgovara kolonama iz ulazne datoteke. Svaka od narednih kolona odgovora protokolu (jednom ili više njih) navedenom u komandnoj liniji prilikom poziva programa. Kolone **Func.refGene**, **Gene.refGene**, **GeneDetail.refGene**, **ExonicFunc.refGene** i **AAChange.refGene** sadrže informacije kako mutacija utiče na gensku strukturu. Jedna od kolona u nastavku je **ExAC*** i ona predstavlja učestalost alela u uzorcima. Ostale kolone sadrže skorove predviđanja za nesinonimne varijacije.

U slučaju kada je ulazna datoteka *.vcf* tipa, program *AnnoVar*, između ostalog, generiše i novu izlaznu *.vcf* datoteku sa dodatnim poljem *Info* koje je popunjeno informacijama vezanim za anotacije. Vrednost ovog polja na početku sadrži *AnnoVar_Date* i završava se sa *Allele_End*. U slučaju više alela na istom lokusu, polje *Info* će imati više ovakvih segmenata, po jedan za svaki alel.

Primeri izlaznih datoteka u *.txt* i *.vcf* formatu dati su na slikama 4.2 i 4.3.

mom.vcf - glogg
File Edit View Tools Encoding Help

C:\E:\AnnoVarInput\mom.vcf (1.9 GB - 3997534 lines - modified on 5/19/2020 11:10 AM - US-ASCII) X Line 170

##FORMAT=<ID=PS,Number=1,Type=String,Description="Phase set in which this variant falls">
#CHROM POS ID REF ALT QUAL FILTER INFO FORMAT HG004
1 565976 rs9283151 C T PASS PASS platform=2;platformnames=Illumina,10X;datasets=4;datas
1 566048 rs6421780 G A PASS PASS platform=2;platformnames=Illumina,10X;datasets=4;datas
1 567239 rs78150957 CG C PASS PASS platform=2;platformnames=Illumina,10X;datasets=4;datas
1 568214 rs373437560 C T PASS PASS platform=2;platformnames=Illumina,10X;datasets=4;datas
1 568745 rs200850333 C CCA PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 569933 rs368347679 G A PASS PASS platform=2;platformnames=Illumina,10X;datasets=3;datas
1 877715 rs6605066 C C PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 877831 rs6672356 T C PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 879317 rs7523549 C T PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 879676 rs6605067 G A PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 879687 rs2839 T PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;datasetnam
1 880238 rs3748592 A G PASS PASS platform=4;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 880390 rs3748593 C A PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 881627 rs2272757 G A PASS PASS platform=4;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 882803 rs2340582 A A PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 885366 rs199909615 C A PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 885676 rs4970377 G A PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 885689 rs4970452 A A PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 885699 rs4970376 A G PASS PASS platform=3;platformnames=Illumina,CG,10X;datasets=5;da
1 886006 rs4970375 T C PASS PASS platform=3;platformnames=CG,Illumina,10X;datasets=5;da
1 886049 rs146799731 ACAG A PASS PASS platform=3;platformnames=CG,Illumina,10X;datasets=5;da

Text: Search
☐ Ignore case ☐ Auto-refresh

Slika 4.1: Primer ulazne datoteke - .vcf datoteka za Aškenazi majku

mom.hg19_multianno.txt - glogg

File Edit View Tools Encoding Help

C:\E\AnnoVarOutput\mom.hg19_multianno.txt (2.2 GB - 3638468 lines - modified on 5/22/2020 8:26 AM - US-ASCII)

Chr	Start	End	Ref	Alt	Func.refGene	Gene.refGene	GeneDetail.refGene	ExonicFunc.refGene
1	565976	565976	C	T	intergenic	LOC101928626;MIR6723	dist=1587;dist=1729	.
1	566048	566048	G	A	intergenic	LOC101928626;MIR6723	dist=1659;dist=1657	.
1	567240	567240	G	-	downstream	MIR6723	dist=465	1
1	568214	568214	C	T	upstream	MIR6723	dist=421	0.5
1	568745	568745	-	CA	upstream	MIR6723	dist=952	0.5
1	569933	569933	G	A	intergenic	MIR6723;OR4F16	dist=2140;dist=51163	.
1	877715	877715	C	G	intronic	SAMD11	.	1
1	877831	877831	T	C	exonic	SAMD11	non synonymous SNV	1
1	879317	879317	C	T	exonic	SAMD11	synonymous SNV	1
1	879676	879676	G	A	UTR3	NOC2L;SAMD11	NM_015658:c.*398C>T;NM_152486:c.*143G>A	.
1	879687	879687	T	C	UTR3	NOC2L;SAMD11	NM_015658:c.*387A>G;NM_152486:c.*154T>C	.
1	880238	880238	A	G	intronic	NOC2L	.	1
1	880390	880390	C	A	intronic	NOC2L	.	1
1	881627	881627	G	A	exonic	NOC2L	synonymous SNV	1
1	882803	882803	A	G	intronic	NOC2L	NOC2L:NM_015658:exon16:c.C1843T;p.L615L	1
1	885366	885366	G	A	intronic	NOC2L	.	1
1	885676	885676	C	A	intronic	NOC2L	.	1
1	885689	885689	G	A	intronic	NOC2L	.	1
1	885699	885699	A	G	intronic	NOC2L	.	1
1	886006	886006	T	C	intronic	NOC2L	.	1
1	886050	886052	CAG	-	intronic	NOC2L	.	1
1	886183	886183	G	-	intronic	NOC2L	.	1

Text: | Search X

☐ Ignore case ☐ Auto-refresh

Slika 4.2: Primer izlazne datoteke - .txt datoteka za Aškenazi majku

C:\E:\AnnovarOutput\homo_hg19_multianno.vcf (2.5 GB - 3997541 lines - modified on 5/22/2020 8:29 AM - US-ASCII)									
File	Edit	View	Tools	Encoding	Help				
#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	HG004
1	565976	rs9283151	C	T	50	PASS		platforms=2;platformnames=illumina,10X;datasets=4;datas	
1	566048	rs6421780	G	A	50	PASS		platforms=2;platformnames=illumina,10X;datasets=4;datas	
1	567239	rs78150957	CG	C	50	PASS		platforms=2;platformnames=illumina,10X;datasets=4;datas	
1	568214	rs373437560	C	T	50	PASS		platforms=2;platformnames=illumina,10X;datasets=4;datas	
1	568745	rs200850333	C	CCA	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	569933	rs368347679	G	A	50	PASS		platforms=2;platformnames=illumina,10X;datasets=3;datas	
1	877715	rs6605066	C	G	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	877831	rs66672356	T	C	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	879317	rs7523549	C	T	50	PASS		platforms=4;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	879676	rs6605067	G	A	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	879687	rs2839	T	C	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	880238	rs3748592	A	G	50	PASS		platforms=4;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	880390	rs3748593	C	A	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	881627	rs2272757	G	A	50	PASS		platforms=4;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	882803	rs2340582	A	G	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	885366	rs199909615	G	A	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	885676	rs4970377	C	A	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	885689	rs4970452	G	A	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	885699	rs4970376	A	G	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	
1	886006	rs4970375	T	C	50	PASS		platforms=3;platformnames=CG,illumina,10X;datasets=5;da	
1	886049	rs146799731	ACAG	A	50	PASS		platforms=3;platformnames=CG,illumina,10X;datasets=5;da	
1	886182	rs35678314	TG	T	50	PASS		platforms=3;platformnames=illumina,CG,10X;datasets=5;da	

Slika 4.3: Primer izlazne datoteke - *.vcf* datoteka za Aškenazi majku

Glava 5

Arhitektura i implementacija dodatka *AnnoPI*

Praktični deo ovog istraživanja je podrazumevao implementaciju dodatka za softver *Annovar* koji za rezultat ima pregledni prikaz iz *Annovar*-a obogaćenog dodatnim korisnim informacijama. Ulazni podaci su datoteke u *.vcf* formatu koje sadrže podatke o varijacijama na humanom genomu, a izlazni podatak su *.html* stranice koje prikazuju objedinjene informacije - deo podataka iz izlaznih datoteka *Annovar*-a, kao i dodatne informacije o funkciji i fenotipu gena koje se mogu naći u javno dostupnim ontologijama - *Gene Ontology* i *Human Phenotype Ontology*. Kako se one redovno ažuriraju, omogućeno je preuzimanje njihovih najsvežijih verzija zadavanjem odgovarajućih opcija pri pozivu aplikacije.

5.1 Datoteke

Ulazne *.vcf* datoteke koje su korišćene za potrebe rada se nalaze na stranici projekta za obezbeđivanje referentnih uzoraka i podataka “Genom u boci”¹. Predmet analize su podaci Aškenazi otac-majka-sin trija iz projekta “Lični genom”. Jedinstvene šifre podataka su sledeće:

- HG002-NA24385-huAA53E0 (sin)
- HG003-NA24149-hu6E4515 (otac)
- HG004-NA24143-hu8E87A9 (majka)

¹<https://jimb.stanford.edu/giab>

Ulazne datoteke u formatu *.vcf* su preuzete sa naredne lokacije: `ftp://ftp-trace.ncbi.nlm.nih.gov/giab/ftp/release/AshkenazimTrio`. Za Aškenazi trio postoje različite verzije genoma, a u ovom istraživanju korišćena je verzija *NIST v3.3.2/GRCh37* koja je bila najsvežija na početku ovog istraživanja. Datoteke koje su korišćene su:

- HG002
`https://ftp-trace.ncbi.nlm.nih.gov/giab/ftp/release/AshkenazimTrio_GRCh37_GIAB_highconf_CG-IllFB-IllGATKHC-Ion-10X-SOLID_CHROM1-22_v.3.3.2_highconf_triophased.vcf)`
- HG003
`ftp://ftp-trace.ncbi.nlm.nih.gov/giab/ftp/release/AshkenazimTrio_GRCh37_GIAB_highconf_CG-IllFB-IllGATKHC-Ion-10X-SOLID_CHROM1-22_v.3.3.2_highconf_triophased.vcf`
- HG004
`ftp://ftp-trace.ncbi.nlm.nih.gov/giab/ftp/release/AshkenazimTrio_GRCh37_GIAB_highconf_CG-IllFB-IllGATKHC-Ion-10X-SOLID_CHROM1-22_v.3.3.2_highconf_triophased.vcf`

Datoteke sa opisima ontologija se preuzimaju sa zvaničnih stranica *GO/HPO* ontologija:

- `http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/GO/goa/HUMAN/goa_human.gaf.gz`
- `https://ci.monarchinitiative.org/view/hpo/job/hpo.annotations/lastSuccessfulBuild/artifact/rare-diseases/util/annotation/genes_to_phenotype.txt`

5.1.1 Struktura izlazne datoteke

Zadatak *AnnoPI* aplikacije je da na osnovu ulazne *.vcf* datoteke kreira izlaznu *.html* datoteku sa tabelom koja za svaku varijaciju iz ulazne datoteke sadrži red sa pojedinim informacijama iz ulazne datoteke i sa dodatnim, pridruženim informacijama o genu na kom se varijacija nalazi. Preciznije, izlazna *.html* datoteka sadrži sledeće kolone:

- Chr
– hromozom

- odgovara koloni **Chr** preuzetoj iz *AnnoVar*-a
- **Start**
 - početna pozicija varijacije na hromozomu
 - odgovara koloni **Start** preuzetoj iz *AnnoVar*-a
- **End**
 - krajnja pozicija varijacije na hromozomu
 - odgovara koloni **End** preuzetoj iz *AnnoVar*-a
- **Ref**
 - referentni nukleotid
 - odgovara koloni **Ref** preuzetoj iz *AnnoVar*-a
- **Alt**
 - posmatrani nukleotid
 - odgovara koloni **Alt** preuzetoj iz *AnnoVar*-a
- **Exonic Function**
 - vrsta varijacije u odnosu na to da li menja aminokiselinu ili ne (*synonymous SNV* ili *nonsynonymous SNV*)
 - odgovara koloni **ExonicFunc.refGene** preuzetoj iz *AnnoVar*-a
- **Gene**
 - naziv gena
 - odgovara koloni **Gene.refGene** preuzetoj iz *AnnoVar*-a
- **GO Associations**
 - prikazuje identifikatore *GO* funkcija pridruženih genu na kom se data varijacija nalazi
 - svaki *GO* identifikator predstavlja link na stranicu odgovarajuće funkcije²

²Na primer, za identifikator *GO:1990782* to je stranica <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:1990782>

- HPO Annotations

- prikazuje identifikatore *HPO* fenotipa pridruženih genu na kom se data varijacija nalazi
- svaki *HPO* identifikator predstavlja link na stranicu odgovarajućeg fenotipa³

- All GO

- sadrži logo ontologije *GO* i predstavlja link do stranice⁴ koja pruža informaciju o svim *GO* funkcijama odgovarajućeg gena

- All HPO

- sadrži logo ontologije *HPO* i predstavlja link do stranice⁵ koja pruža informaciju o svim *HPO* fenotipovima odgovarajućeg gena na osnovu identifikatora gena

5.1.2 Dodatne informacije

Radi preglednosti sa jedne strane, a prikaza što više važnih informacija sa druge strane, obezbeđeno je da postavljanjem kursora na ime gena, *GO* ili *HPO* identifikator budu prikazane dodatne informacije (eng. *tooltips*) o njima. Informacije uključuju:

- opis gena koji se preuzima iz *Uniprot* baze na osnovu identifikatora gena koji nalazimo u datoteci sa opisom ontologije *GO*
- naziv i opis *GO* funkcije koji se nalaze na stranici na koju vodi link postavljen na identifikator *GO* funkcije
- naziv i opis *HPO* fenotipa koji se nalaze na stranici na koju vodi link postavljen na identifikator *HPO* fenotipa

³Na primer, za identifikator *HP:0100540* to je stranica <https://hpo.jax.org/app/browse/term/HP:0100540>

⁴Na primer, za gen *Q96NU1* to je stranica <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/annotations?geneProductId=Q96NU1>

⁵Na primer, gen *ISG15* ima identifikator *9636* (uparivanje naziva gena *ISG15* i identifikatora gena *9636* vrši se preko datoteke sa opisom ontologije *HPO*) i odgovarajuća stranica je <https://hpo.jax.org/app/browse/gene/9636>

Informacije potrebne za *tooltip*-ove za gen preuzimane su sa *Uniprot* stranice gena⁶. Informacije potrebne za *tooltip*-ove *GO* funkcija i *HPO* fenotipa dobijane su iz *JSON* reprezentacija njihovih veb stranica⁷. Nazivu *GO* funkcije odnosno *HPO* fenotipa odgovara vrednost polja *name*, dok se opis dobija na osnovu vrednosti polja *definition*. Na slici 5.1 možemo videti primer opisa gena, a na slikama 5.2 i 5.3 možemo videti primere pomenutih *JSON* reprezentacija kao i označena pomenuta polja i njihove vrednosti.

The screenshot shows the UniProtKB entry for CAMTA1 (Q9Y6Y1). The page layout includes a top navigation bar with links like BLAST, Align, Retrieve/ID mapping, Peptide search, and SPARQL. The main header displays the UniProtKB logo and the entry title 'UniProtKB - Q9Y6Y1 (CAMTA1_HUMAN)'. Below this, there are tabs for 'Display', 'Help video', 'BLAST', 'Align', 'Format', 'Add to basket', and 'History'. The left sidebar contains links for 'Entry', 'Publications', 'Feature viewer', and 'Feature table'. The main content area is divided into sections: 'Protein' (Calmodulin-binding transcription activator 1), 'Gene' (CAMTA1), 'Organism' (Homo sapiens (Human)), and 'Status' (Reviewed - Annotation score: 5.0 - Experimental evidence at protein levelⁱ). The 'Function' section describes it as a 'Transcriptional activator. May act as a tumor suppressor.' and lists '2 Publications'. The 'Miscellaneous' section mentions a deletion in oligodendroglial tumors. The 'Regions' section includes a table with DNA binding sites.

Feature key	Position(s)	Description
DNA binding ⁱ	63 - 188	CG-1 PROSITE-ProRule annotation

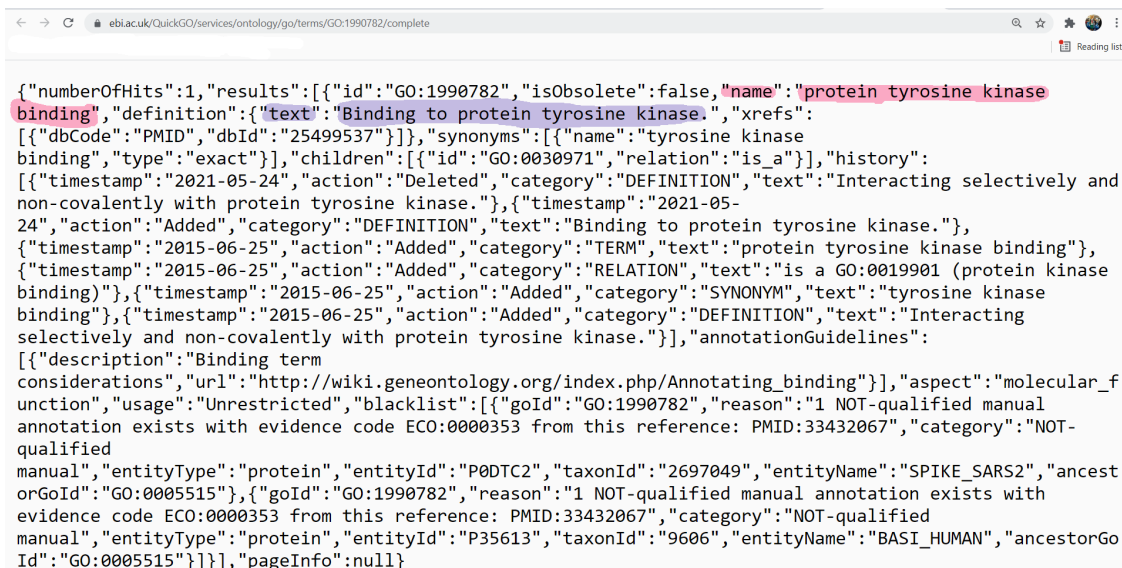
Slika 5.1: *Uniprot* stranica za gen *CAMTA1*

Prilikom testiranja, za svaki gen iz datoteke sa opisom ontologije *GO* opis gena sa *Uniprot* stranice smešten je u pomoćnu tekstualnu datoteku *Output-Gene*. U ovu datoteku smešteni su i opisi gena koji se pojavljuju u anotacijskoj datoteci, a za koje nemamo odgovarajući identifikator na osnovu koga preuzimamo opis sa *Uniprot* stranice. Za njihovu obradu iskorišćen je *Uniprot*-ov *ID Mapper*⁸ koji je na

⁶Na primer, gen *CAMTA1* ima identifikator *Q9Y6Y1* i odgovarajuća stranica je <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y6Y1>

⁷Podsetimo se za *GO* funkciju sa identifikatorom *GO:0005634*, stranica je <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005634>, dok je za *HPO* fenotip sa identifikatorom *HP:0100540* stranica <https://hpo.jax.org/app/browse/term/HP:0100540>

⁸<https://www.uniprot.org/uploadlists/>

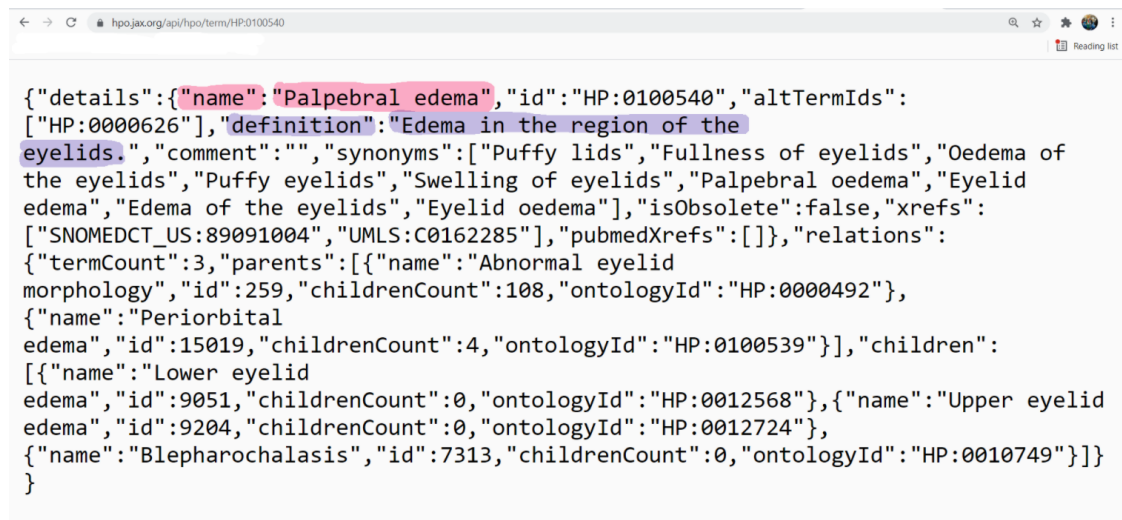


```

{"numberOfHits":1,"results":[{"id":"GO:1990782","isObsolete":false,"name":"protein tyrosine kinase binding","definition":{"text":"Binding to protein tyrosine kinase."},"xrefs":[{"dbCode":"PMID","dbId":"25499537"}],"synonyms":[{"name":"tyrosine kinase binding","type":"exact"}],"children":[{"id":"GO:0030971","relation":"is_a"},"history":[{"timestamp":"2021-05-24","action":"Deleted","category":"DEFINITION","text":"Interacting selectively and non-covalently with protein tyrosine kinase."},{timestamp":"2021-05-24","action":"Added","category":"DEFINITION","text":"Binding to protein tyrosine kinase."},{timestamp":"2015-06-25","action":"Added","category":"TERM","text":"protein tyrosine kinase binding"}, {"timestamp":"2015-06-25","action":"Added","category":"RELATION","text":"is a GO:0019901 (protein kinase binding)"}, {"timestamp":"2015-06-25","action":"Added","category":"SYNONYM","text":"tyrosine kinase binding"}, {"timestamp":"2015-06-25","action":"Added","category":"DEFINITION","text":"Interacting selectively and non-covalently with protein tyrosine kinase."}], "annotationGuidelines":{"description":"Binding term considerations","url":"http://wiki.geneontology.org/index.php/Annotating_binding"},"aspect":"molecular_function","usage":"Unrestricted","blacklist":[{"goId":"GO:1990782","reason":"1 NOT-qualified manual annotation exists with evidence code ECO:0000353 from this reference: PMID:33432067","category":"NOT-qualified manual","entityType":"protein","entityId":"P0DTC2","taxonId":"2697049","entityName":"SPIKE_SARS2","ancestorGoId":"GO:0005515"}, {"goId":"GO:1990782","reason":"1 NOT-qualified manual annotation exists with evidence code ECO:0000353 from this reference: PMID:33432067","category":"NOT-qualified manual","entityType":"protein","entityId":"P35613","taxonId":"9606","entityName":"BASI_HUMAN","ancestorGoId":"GO:0005515"}]}], "pageInfo":null}

```

Slika 5.2: JSON reprezentacija za funkciju GO:1990782



```

{"details":{"name":"Palpebral edema","id":"HP:0100540","altTermIds":["HP:0000626"],"definition":"Edema in the region of the eyelids.","comment":"","synonyms":["Puffy lids","Fullness of eyelids","Oedema of the eyelids","Puffy eyelids","Swelling of eyelids","Palpebral oedema","Eyelid edema","Edema of the eyelids","Eyelid oedema"],"isObsolete":false,"xrefs":["SNOMEDCT_US:89091004","UMLS:C0162285"],"pubmedXrefs":[]},"relations":{"termCount":3,"parents":[{"name":"Abnormal eyelid morphology","id":259,"childrenCount":108,"ontologyId":"HP:0000492"}, {"name":"Periorbital edema","id":15019,"childrenCount":4,"ontologyId":"HP:0100539"}],"children":[{"name":"Lower eyelid edema","id":9051,"childrenCount":0,"ontologyId":"HP:0012568"}, {"name":"Upper eyelid edema","id":9204,"childrenCount":0,"ontologyId":"HP:0012724"}, {"name":"Blepharochalasis","id":7313,"childrenCount":0,"ontologyId":"HP:0010749"}]}}

```

Slika 5.3: JSON reprezentacija za fenotip HP:0100540

osnovu naziva gena dao informacije o identifikatorima gena pomoću kojih su dobijeni odgovarajući opisi. Za svaku GO funkciju, odnosno HPO fenotip iz polja kolona GO Associations i HPO Annotations (npr. GO:005634, odnosno HP:0100540) odgovarajuća JSON datoteka je isparsirana i naziv i opis GO funkcije, odnosno HPO fenotipa su smešteni u pomoćnu tekstualnu datoteku *Output-GO Data*, odnosno *Output-HPO Data*. Nakon učitavanja podataka u ove datoteke, podaci se iz njih smeštaju u rečnik gde je ključ naziv gena odnosno GO ili HPO identifikator,

a vrednost opis gena odnosno naziv i opis funkcije ili fenotipa razdvojeni simbolom „|”. Ove datoteke čuvaju svoj sadržaj između dva pokretanja programa, pa se tako prilikom novog pokretanja programa najpre kreira rečnik na osnovu postojećih pomoćnih datoteka⁹, za svaki gen/*GO*/*HPO* identifikator iz datoteka sa opisima ontologija se proverava da li postoji kao ključ u rečniku, a ukoliko ne postoji čitaju se podaci sa odgovarajuće *Uniprot* stranice gena, odnosno parsira se odgovarajuća *JSON* datoteka i ažurira sadržaj datoteka i rečnika. U tabeli 5.1 možemo videti broj ključeva u rečniku, odnosno broj gena, *GO* i *HPO* identifikatora (kolone Broj različitih gena, Broj različitih *GO* funkcija i Broj različitih *HPO* fenotipa). Ukupan broj pojavljivanja svih identifikatora (sa ponavljanjima) u polaznim datotekama možemo videti u kolonama: Ukupan broj gena (redova u *.html* tabeli), Ukupan broj *GO* funkcija i Ukupan broj *HPO* fenotipa.

Tabela 5.1: Informacije o ukupnom broju redova, *GO* funkcija, *HPO* fenotipa, broju različitih gena, *GO* funkcija i *HPO* fenotipa

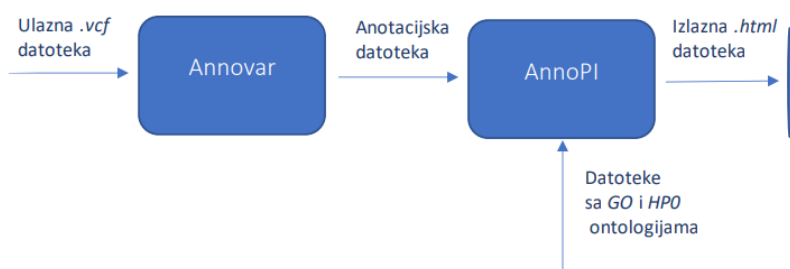
Član trija	Broj različitih gena	Ukupan broj gena (redova u <i>.html</i> tabeli)	Broj različitih <i>GO</i> funkcija	Ukupan broj <i>GO</i> funkcija	Broj različitih <i>HPO</i> fenotipa	Ukupan broj <i>HPO</i> fenotipa
<i>son</i>	8880	21042	127182	299308	6893	229285
<i>mom</i>	7877	17345	116245	255114	6717	199269
<i>dad</i>	7774	17342	115560	257247	6734	199572

⁹pomoćne datoteke su uvedene sa ciljem smanjenja ogromnog broja posećivanja pomenutih veb stranica

5.2 Princip rada aplikacije

Aplikacija je razvijana u programskom jeziku *Python* i pokreće se iz komandne linije. Primer jednog pokretanja programa je: `python AnnoPI.py -g goUrl -h hpoUrl -d vcInputFileName` gde `-g` predstavlja opcioni parametar koji zadajemo ako želimo da preuzmемо najnoviju datoteku sa opisom ontologije *GO* sa *URL* adrese `goUrl`, dok opcioni parametar `-h` zadajemo ukoliko želimo da preuzmемо najnoviju verziju ontologije *HPO* sa *URL* adrese `hpoUrl`. Parametar `-d` je obavezan, nakon koga se zadaje ime datoteke `vcInputFileName` koja predstavlja ulaznu datoteku za softver *Annovar*. Aplikaciju je moguće pokrenuti i u *offline* režimu ne zadavši joj parametre i tada će aplikacija koristiti postojeće lokalne verzije datoteka sa ontologijama.

Grafički prikaz koraka aplikacije dat je na slici 5.4. Aplikacija se sastoji od sledećih koraka:























Slika 5.4: Grafički prikaz koraka aplikacije

1. Ukoliko su zadati opcioni parametri (`-g`, `-h`), aplikacija preuzima najsvežije datoteke sa opisima ontologija sa zadatih lokacija, dok u suprotnom koristi lokalne verzije datoteka. Datoteka koja predstavlja ontologiju *GO* se čuva pod nazivom *goa.human.gaf.gz*. Datoteka ontologije *HPO* se čuva pod nazivom *genes_to_phenotype.txt*
2. Vršī se obrada datoteka sa opisima ontologija (*goa.human.gaf* i *genes_to_phenotype.txt*) i podaci iz njih se smeštaju u rečnik gde je ključ ime gena, a vrednost lista uređenih torki (*goId*, *function*, *geneId*), odnosno (*hpoId*, *phenotype*).

3. Poziva se *Annovar* za *.vcf* datoteku čije ime unosi korisnik kao argument komandne linije. Ukoliko se radi o humanom genomu, *Annovar* se poziva sa opcijom **hg19**. Dobijena izlazna datoteka predstavlja anotacijsku *.txt* datoteku u kojoj svaki red sadrži informacije o jednoj genetskoj varijaciji odgovarajućeg genoma. Anotacijska datoteka predstavlja ulaznu datoteku za *AnnoPI*. Detaljan opis ove datoteke dat je u poglavlju 4.
4. Iz anotacijske datoteke uzima se identifikator gena na kom se nalazi odgovarajuća varijacija. Na osnovu identifikatora gena moguće je doći do informacija o njegovoj funkciji i fenotipu koje *Annovar* ne obezbeđuje (kolone **GO Associations**, **HPO Annotations**, **All GO** i **All HPO**) preko veb stranica navedenih u opisu kolona na početku ovog potpoglavlja.
5. Iz anotacijske datoteke se uzimaju u obzir samo informacije o varijacijama koje se nalaze u egzonima, onih kod kojih je sadržaj kolone **Func.refGene Exonic**
6. Generiše se *.html* kod koji sadrži tabelu gde se u svakom redu nalaze informacije o varijacijama dobijene iz *Annovar*-a (kolone **Chr**, **Start**, **End**, **Ref**, **Alt**, **Exonic Function** i **Gene**) kao i pridružene informacije o funkciji i fenotipu gena (kolone **GO Associations**, **HPO Annotations**, **All GO** i **All HPO**).

Rad *AnnoPI* aplikacije je testiran za *.vcf* datoteke Aškenazi trija sin-majka-otac. Na slikama 5.5, 5.6 i 5.7 prikazane su izlazne *.html* datoteke za svakog člana trija. Dobijene tabele su veoma glomazne - broj različitih varijacija, a time i redova u tabeli, iznosi par desetina hiljada, preciznije za Aškenazi sina 21042, za Aškenazi majku 17345, a za Aškenazi oca 17342. Prikaz sadržaja *tooltip*-a za *GO* funkciju dat je na slici 5.8.

GLAVA 5. ARHITEKURA I IMPLEMENTACIJA DODATKA ANNOPI

Function and phenotype terms associated with human exonic variations									
GO version: 2021-05-01. HPO version: #1271 Mar 27, 2020									
Select first <input type="text"/> rows Show 10 Functions Export All Excel CSV									
Search: <input type="text"/>									
Chr	Start	End	Ref	Alt	Exonic function	Gene	GO associations	HPO annotations	All GO All HPO
2	167163043	167163043	T	C	synonymous SNV	SCN9A	GO:0005244 GO:0005248 GO:0031402 GO:0006814 GO:0006954 GO:0006936 GO:0007291 GO:0019233 GO:0034765 GO:0035725	HP:0700026 HP:0006632 HP:0006623 HP:0031417 HP:0500005 HP:0001660 HP:0007228 HP:0001649 HP:0031284 HP:0700025	 
2	167168093	167168093	C	T	synonymous SNV	SCN9A	GO:0005244 GO:0005248 GO:0031402 GO:0006814 GO:0006954 GO:0006936 GO:0007291 GO:0019233 GO:0034765 GO:0035725	HP:0700026 HP:0006632 HP:0006623 HP:0031417 HP:0500005 HP:0001660 HP:0007228 HP:0001649 HP:0031284 HP:0700025	 
5	135388663	135388663	A	G	synonymous SNV	TGFBI	GO:0062023 GO:0005178 GO:0005201 GO:0005515 GO:0005518 GO:0042802 GO:0005084 GO:0001525 GO:0007062 GO:0007162	HP:0700020 HP:0000486 HP:0000613 HP:0001131 HP:0007759 HP:0000006 HP:0007881 HP:0008039 HP:0000495 HP:0032148	 
5	135391374	135391374	C	T	synonymous SNV	TGFBI	GO:0062023 GO:0005178 GO:0005201 GO:0005515 GO:0005518 GO:0042802 GO:0005084 GO:0001525 GO:0007062 GO:0007162	HP:0700020 HP:0000486 HP:0000613 HP:0001131 HP:0007759 HP:0000006 HP:0007881 HP:0008039 HP:0000495 HP:0032148	 
5	135392426	135392426	T	C	synonymous SNV	TGFBI	GO:0062023 GO:0005178 GO:0005201 GO:0005515 GO:0005518 GO:0042802 GO:0005084 GO:0001525 GO:0007062 GO:0007162	HP:0700020 HP:0000486 HP:0000613 HP:0001131 HP:0007759 HP:0000006 HP:0007881 HP:0008039 HP:0000495 HP:0032148	 
9	12694255	12694255	C	A	synonymous SNV	TYRP1	GO:0004503 GO:0005515 GO:0042802 GO:0046872 GO:0042438 GO:0043438 GO:0048023 GO:0005737 GO:0010008 GO:0016021	HP:0100814 HP:0002227 HP:0011458 HP:0002297 HP:0001480 HP:0700098 HP:0000486 HP:0000635 HP:0002226 HP:0000635	 
9	12698471	12698471	T	C	synonymous SNV	TYRP1	GO:0004503 GO:0005515 GO:0042802 GO:0046872 GO:0042438 GO:0043438 GO:0048023 GO:0005737 GO:0010008 GO:0016021	HP:0100814 HP:0002227 HP:0011458 HP:0002297 HP:0001480 HP:0700098 HP:0000486 HP:0000635 HP:0002226 HP:0000635	 
10	64159333	64159333	G	T	nonsynonymous SNV	ZNF365	GO:0005515 GO:0046872 GO:0000723 GO:0010569 GO:0010977 GO:0021687 GO:0048714 GO:0060997 GO:0110026 GO:0140059	HP:0100785 HP:0001160 HP:0000738 HP:0000504 HP:0002494 HP:0001279 HP:0002524 HP:0010534 HP:0001250 HP:0001213	 
10	64415184	64415184	A	G	nonsynonymous SNV	ZNF365	GO:0005515 GO:0046872 GO:0000723 GO:0010569 GO:0010977 GO:0021687 GO:0048714 GO:0060997 GO:0110026 GO:0140059	HP:0100785 HP:0001160 HP:0000738 HP:0000504 HP:0002494 HP:0001279 HP:0002524 HP:0010534 HP:0001250 HP:0001213	 
12	107395106	107395106	A	G	synonymous SNV	CRY1	GO:0003904 GO:0003914 GO:0003690 GO:0005515 GO:0009852 GO:0016927 GO:0019901 GO:0019902 GO:0042436 GO:0070888	HP:0100785 HP:0000006	 
Chr	Start	End	Ref	Alt	Exonic function	Gene	GO associations	HPO annotations	All GO All HPO
Showing 31 to 40 of 21,042 entries							Previous 1 2 3 4 5 ... 2105 Next		

Slika 5.5: Prikaz *.html* stranice za Aškenazi sina

GLAVA 5. ARHITEKURA I IMPLEMENTACIJA DODATKA ANNOPI







Function and phenotype terms associated with human exonic variations									
GO version: 2021-05-01 HPO version: #1271 Mar 27, 2020									
Select first <input type="text"/> rows									
Show 10 ▾ Functions									
Export All Excel CSV									
Search: <input type="text"/>									
Chr	Start	End	Ref	Alt	Exonic function	Gene	GO associations	HPO annotations	All GO All HPO
12	40742254	40742254	G	A	synonymous SNV	LRRK2	GO:0034260 GO:0000149 GO:0000287 GO:0003779 GO:0003924 GO:0004672 GO:0004674 GO:0004708 GO:0005096 GO:0005513	HP:0100660 HP:0004926 HP:0100315 HP:0004409 HP:0012450 HP:0000338 HP:0002172 HP:0100753 HP:0100710 HP:0002120	 
12	40758652	40758652	T	C	nonsynonymous SNV	LRRK2	GO:0034260 GO:0000149 GO:0000287 GO:0003779 GO:0003924 GO:0004672 GO:0004674 GO:0004708 GO:0005096 GO:0005513	HP:0100660 HP:0004926 HP:0100315 HP:0004409 HP:0012450 HP:0000338 HP:0002172 HP:0100753 HP:0100710 HP:0002120	 
3	184037533	184037533	A	G	nonsynonymous SNV	EIF4G1	GO:0003723 GO:0003729 GO:0003743 GO:0005513 GO:0005524 GO:0008135 GO:0008190 GO:0031369 GO:0042802 GO:0060090	HP:0100660 HP:0004926 HP:0100315 HP:0004409 HP:0012450 HP:0000338 HP:0002172 HP:0100753 HP:0100710 HP:0002120	 
3	184039666	184039666	A	G	nonsynonymous SNV	EIF4G1	GO:0003723 GO:0003729 GO:0003743 GO:0005513 GO:0005524 GO:0008135 GO:0008190 GO:0031369 GO:0042802 GO:0060090	HP:0100660 HP:0004926 HP:0100315 HP:0004409 HP:0012450 HP:0000338 HP:0002172 HP:0100753 HP:0100710 HP:0002120	 
16	46696284	46696284	G	A	synonymous SNV	VPS35	GO:0005739 GO:0005513 GO:0031748 GO:0010628 GO:0010821 GO:0016053 GO:0016241 GO:0031647 GO:0032268 GO:0032456	HP:0100660 HP:0004926 HP:0100315 HP:0004409 HP:0012450 HP:0000338 HP:0002172 HP:0100753 HP:0100710 HP:0002120	 
2	233708806	233708806	A	G	synonymous SNV	GIGYF2	GO:0003723 GO:0005513 GO:0045296 GO:0070064 GO:007631 GO:0008344 GO:0009791 GO:0016441 GO:0021522	HP:0100660 HP:0004926 HP:0100315 HP:0004409 HP:0012450 HP:0000338 HP:0002172 HP:0100753 HP:0100710 HP:0002120	 
2	233712227	233712229	ACA	-	nonframeshift deletion	GIGYF2	GO:0017148 GO:0003723 GO:0005513 GO:0045296 GO:0070064 GO:007631 GO:0008344 GO:0009791 GO:0016441 GO:0021522	HP:0100660 HP:0004926 HP:0100315 HP:0004409 HP:0012450 HP:0000338 HP:0002172 HP:0100753 HP:0100710 HP:0002120	 
4	177605082	177605084	TCA	-	nonframeshift deletion	VEGFC	GO:0005513 GO:0042056 GO:0043183 GO:0002052 GO:0002576 GO:0006929 GO:0007165 GO:0008284 GO:0009887 GO:0016331	HP:0100658 HP:0003828 HP:0100797 HP:0000006 HP:0000962 HP:0000034 HP:0001094 HP:0000286 HP:0002619 HP:0200058	 
10	70641860	70641860	T	C	nonsynonymous SNV	STOX1	GO:0000977 GO:0005513 GO:0007049 GO:0008284 GO:0010468 GO:0010628 GO:0010629 GO:0010800 GO:0010821 GO:0010971	HP:0100602 HP:0010982 HP:0007049 HP:0003255 HP:0002027 HP:0002910 HP:0001511 HP:0001873 HP:0002315 HP:0002117	 
6	167549775	167549775	T	C	synonymous SNV	CCR6	GO:0004950 GO:0005513 GO:0016493 GO:0019957 GO:0038023 GO:0002407 GO:0002523 GO:0006935 GO:0006959 GO:0006968	HP:0100579 HP:0002960 HP:0100958 HP:0001053 HP:0002017 HP:0002206 HP:0009473 HP:0200042 HP:0002015 HP:0002020	 
Chr	Start	End	Ref	Alt	Exonic function	Gene	GO associations	HPO annotations	All GO All HPO
Showing 61 to 70 of 17,345 entries							Previous 1 ... 6 7 8 ... 1735 Next		

Slika 5.6: Prikaz *.html* stranice za Aškenazi majku

GLAVA 5. ARHITEKURA I IMPLEMENTACIJA DODATKA ANNOPI

Function and phenotype terms associated with human exonic variations										
GO version: 2021-05-01. HPO version: #1271 Mar 27, 2020										
Select first <input type="text"/> rows										
Show <input type="text"/> functions										
<input type="button" value="Export All"/> <input type="button" value="Excel"/> <input type="button" value="CSV"/>										
Search: <input type="text"/>										
Chr	Start	End	Ref	Alt	Exonic function	Gene	GO associations	HPO annotations	All GO	All HPO
17	56435885	56435885	G	T	nonsynonymous SNV	RNF43	GO:0004842 GO:0005109 GO:0005515 GO:0046872 GO:0061630 GO:0066511 GO:0072725 GO:0072725 GO:0016055 GO:0016567 GO:0030178	HP:0032222 HP:0000006 HP:0100808 HP:0002862 HP:0100574 HP:0005227 HP:0012189 HP:0003002 HP:0012125 HP:0100615		
17	56436109	56436109	C	T	nonsynonymous SNV	RNF43	GO:0004842 GO:0005109 GO:0005515 GO:0046872 GO:0061630 GO:0066511 GO:0072725 GO:0072725 GO:0016055 GO:0016567 GO:0030178	HP:0032222 HP:0000006 HP:0100808 HP:0002862 HP:0100574 HP:0005227 HP:0012189 HP:0003002 HP:0012125 HP:0100615		
17	56448297	56448297	C	T	nonsynonymous SNV	RNF43	GO:0004842 GO:0005109 GO:0005515 GO:0046872 GO:0061630 GO:0066511 GO:0072725 GO:0072725 GO:0016055 GO:0016567 GO:0030178	HP:0032222 HP:0000006 HP:0100808 HP:0002862 HP:0100574 HP:0005227 HP:0012189 HP:0003002 HP:0012125 HP:0100615		
17	56492800	56492800	T	C	nonsynonymous SNV	RNF43	GO:0004842 GO:0005109 GO:0005515 GO:0046872 GO:0061630 GO:0066511 GO:0072725 GO:0072725 GO:0016055 GO:0016567 GO:0030178	HP:0032222 HP:0000006 HP:0100808 HP:0002862 HP:0100574 HP:0005227 HP:0012189 HP:0003002 HP:0012125 HP:0100615		
22	42159229	42159229	G	T	synonymous SNV	MEI1	GO:0007127	HP:0032192 HP:0000007 HP:0000789		
6	74072937	74072937	G	C	nonsynonymous SNV	KHDC3L	GO:0003723 GO:0005515 GO:0007015 GO:0008150 GO:0031297 GO:0032880 GO:0040019 GO:0043066 GO:0050769 GO:0051656	HP:0032192 HP:0000007		
6	74073531	74073531	C	G	nonsynonymous SNV	KHDC3L	GO:0003723 GO:0005515 GO:0007015 GO:0008150 GO:0031297 GO:0032880 GO:0040019 GO:0043066 GO:0050769 GO:0051656	HP:0032192 HP:0000007		
18	34310668	34310668	C	T	synonymous SNV	FHOD3	GO:0005515 GO:0030837 GO:0030918 GO:0051015 GO:0005737 GO:0051639 GO:0030866 GO:0005856 GO:0055003 GO:0045214	HP:0032092 HP:0012664 HP:0001645 HP:0005157 HP:0003581 HP:0000006 HP:0001297 HP:0005110 HP:0031656 HP:0031295		
2	207631461	207631461	G	A	nonsynonymous SNV	FASTKD2	GO:0003723 GO:0005515 GO:0019843 GO:0006396 GO:0006915 GO:0032543 GO:0044528 GO:0070131 GO:1902775 GO:0005739	HP:0031936 HP:0001250 HP:0001290 HP:0001350 HP:0001639 HP:0002059 HP:0000007 HP:0100660 HP:0002151 HP:0000639		
9	139904037	139904037	A	G	synonymous SNV	ABCA2	GO:0045540 GO:0010872 GO:0032384 GO:0032805 GO:0090370 GO:0150110 GO:1901873 GO:1902004 GO:1902993 GO:1905598	HP:0031936 HP:0000718 HP:0000007 HP:0001324 HP:0002286 HP:0001250 HP:0003141 HP:0002066 HP:0001260 HP:0002311		
Chr	Start	End	Ref	Alt	Exonic function	Gene	GO associations	HPO annotations	All GO	All HPO
Showing 131 to 140 of 17,342 entries										
Previous 1 ... 13 14 15 ... 1735 Next										

Slika 5.7: Prikaz *.html* stranice za Aškenazi oca

Alt	Exonic function	Gene	GO associations	HPO annotations	All GO	All HPO
C	nonsynonymous SNV	SAMD11	GO:0005515 GO:0005634 GO:0003682 GO:0042393 GO:0045892			
T	synonymous SNV	SAMD11	GO:0005515 GO:0005634 GO:0003682 GO:0042393			
<div>histone binding Interacting selectively and non-covalently with a histone, any of a group of water-soluble proteins found in association with the DNA of eukaryotic chromosomes. They are involved in the condensation and coiling of chromosomes during cell division and have also been implicated in nonspecific suppression of gene activity.</div>						
A	synonymous SNV	NOC2L	GO:0005714 GO:0003723 GO:0005515 GO:0031491 GO:0042393 GO:0140007			

Slika 5.8: *GO tooltip* za funkciju *GO:0042393*

5.2.1 Funkcionalnosti izlazne *.html* datoteke

Iz izlazne *.html* datoteke je moguće izvesti podatke u *.xlsx* i *.csv* formatu. Omogućen je izvoz kompletne tabele kao i selektovanih redova. Izvezene datoteke imaju strukturu kao i tabele *.html* datoteke. Kolone *Chr*, *Start*, *End*, *Ref*, *Alt*, *Exonic function* i *Gene* imaju sadržaj isti kao i na odgovarajućoj *.html* stranici. Vrednosti kolona *GO Associations* i *HPO Annotations* razdvojene su razmakom. Kolone *All GO* i *All HPO* umesto ikonice sadrže linkove ka odgovarajućim stranicama koje pružaju informaciju o svim *GO* funkcijama, odnosno *HPO* fenotipu gena tekuće varijacije. Izvezena datoteka takođe sadrži i informaciju o verziji datoteka koje predstavljaju ontologije *GO* i *HPO*. Na slici 5.9 dat je primer izvezene datoteke u *.xlsx* formatu, dok je na slici 5.10 dat primer izvezene datoteke u *.csv* formatu.

GLAVA 5. ARHITEKURA I IMPLEMENTACIJA DODATKA ANNOPI

Chr	Start	End	Ref	Alt	Exonic function	Gene	GO associations	HPO annotations	All GO	All HPO
1	877831	877831	T	C	nonsynonymous SNV	SAMD11	GO:0005515 GO:0005634 GO:000		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005515	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/187831
1	879317	879317	C	T	synonymous SNV	SAMD11	GO:0005515 GO:0005634 GO:000		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005515	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1879317
1	881627	881627	G	A	synonymous SNV	NOC2L	GO:0003682 GO:0003714 GO:0003		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0003682	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1881627
1	881801	881801	A	G	synonymous SNV	NOC2L	GO:0003682 GO:0003714 GO:0003		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0003682	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1881801
1	888639	888639	T	C	synonymous SNV	NOC2L	GO:0003682 GO:0003714 GO:0003		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0003682	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1888639
1	888659	888659	T	C	nonsynonymous SNV	NOC2L	GO:0003682 GO:0003714 GO:0003		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0003682	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1888659
1	897325	897325	G	C	synonymous SNV	KLHL17	GO:0005515 GO:0031208 GO:0060		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005515	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1897325
1	906272	906272	A	C	synonymous SNV	PLEKHN1	GO:0001786 GO:0005515 GO:0070		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0001786	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1906272
1	909238	909238	G	C	nonsynonymous SNV	PLEKHN1	GO:0001786 GO:0005515 GO:0070		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0001786	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1909238
1	949654	949654	A	G	synonymous SNV	ISG15	GO:0005178 GO:0005515 GO:0007	HP:0000007 HP:0002721 HP:000	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005178	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1949654
1	981931	981931	A	G	synonymous SNV	AGRN	GO:0062023 GO:0002162 GO:0005	HP:0002020 HP:0002015 HP:000	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0062023	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1981931
1	982994	982994	T	C	synonymous SNV	AGRN	GO:0062023 GO:0002162 GO:0005	HP:0002020 HP:0002015 HP:000	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0062023	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1982994
1	984302	984302	T	C	synonymous SNV	AGRN	GO:0062023 GO:0002162 GO:0005	HP:0002020 HP:0002015 HP:000	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0062023	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1984302

Slika 5.9: Prikaz .xlsx datoteke za Aškenazi sina

Chr	Start	End	Ref	Alt	Exonic function	Gene	GO associations	HPO annotations	All GO	All HPO
1	949654	949654	A	G	synonymous SNV	ISG15	GO:0005178 GO:0005515 HP:0002135	HP:0002135	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005178	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1949654
1	1875858	1875858	C	G	nonsynonymous SNV	CFAP74	GO:0035082 GO:0005930		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0035082	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1875858
1	1991014	1991014	A	G	synonymous SNV	PRKCZ	GO:0004672 GO:0004674 HP:0000490	HP:0000490	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0004672	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/1991014
1	2938697	2938697	T	G	synonymous SNV	ACTRT2	GO:0005737 GO:0005856		https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005737	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/12938697
1	3301721	3301721	C	T	synonymous SNV	PRDM16	GO:0030512 GO:0000976 HP:0000490	HP:0000490	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0030512	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/13301721
1	3753136	3753136	A	T	nonsynonymous SNV	CEP104	GO:0005515 GO:0016594 HP:0001251	HP:0001251	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005515	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/13753136
1	4772717	4772717	G	A	nonsynonymous SNV	AJAP1	GO:0005515 GO:0008013 GO:0044877	GO:0044877	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005515	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/14772717
1	5924512	5924512	C	A	nonsynonymous SNV	NPHP4	GO:0005198 GO:0005515 HP:0000103	HP:0000103	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005198	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/15924512
1	6158562	6158562	A	G	synonymous SNV	KCNAB2	GO:0005874 GO:0004033 HP:0000490	HP:0000490	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005874	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/16158562
1	6279370	6279370	G	C	nonsynonymous SNV	RNF207	GO:0005515 GO:0008270 GO:0030544	GO:0030544	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005515	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/16279370
1	6305303	6305303	C	A	synonymous SNV	HES3	GO:0000981 GO:0046983 GO:0045892	GO:0045892	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0000981	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/16305303
1	6313938	6313938	C	T	nonsynonymous SNV	GPR153	GO:0004930 GO:0007186 GO:0005886	GO:0005886	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0004930	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/16313938
1	6314138	6314138	C	T	synonymous SNV	GPR153	GO:0004930 GO:0007186 GO:0005886	GO:0005886	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0004930	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/16314138
1	6614535	6614535	G	A	nonsynonymous SNV	NOL9	GO:0003723 GO:0005515 GO:0005524	GO:0005524	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0003723	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/16614535
1	6659505	6659505	G	A	synonymous SNV	KLHL21	GO:0004842 GO:0005515 GO:0097602	GO:0097602	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0004842	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/16659505
1	6693097	6693097	A	G	nonsynonymous SNV	THAP3	GO:0003677 GO:0005515 GO:0046872	GO:0046872	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0003677	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/16693097
1	6705874	6705874	G	C	nonsynonymous SNV	DNAJC11	GO:0005515 GO:0007007 GO:0005654	GO:0005654	https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0005515	https://hpo.jax.org/app/browse/gene/16705874

Slika 5.10: Prikaz .csv datoteke za Aškenazi oca

U kolonama *GO Associations* i *HPO Annotations* *.html* datoteka inicijalno je prikazano najviše pet funkcija. Za prikaz ostalih koristimo funkcionalnost *Show XY functions*. Odabirom vrednosti 10, 20, 30 ili *all* iz padajuće liste, određujemo koliko će se funkcija prikazati.

Stranica nudi pretraživanje tabele po ključnim rečima koje se navode u polju za pretragu. Valja pomenuti da pretraga uzima u obzir cele reči te za pojavljivanje reda sa *GO* funkcijom sa identifikatorom 0000007 moramo u polju za pretragu navesti *GO:0000007*. Kako sadržaj kolone *Exonic function* može biti *synonymous SNV* ili *nonsynonymous SNV*, bilo je potrebno uvesti ovakav princip pretrage zbog razlikovanja redova sa *synonymous SNV* i *nonsynonymous SNV* sadržajem. Na taj način, ukoliko bismo u polje za pretragu uneli *syn*, pojavili bi se samo oni redovi koji se odnose na *synonymous SNV*.

Tabela pored zaglavlja ima i podnožje (eng. *footer*) koje odgovara kolonama iz zaglavlja. Ugrađena je mogućnost sortiranja po kolonama kao i straničenje. Inicijalno je postavljeno deset redova po strani. Korisnik ima mogućnost da odabere stranu unevši broj u polje u donjem desnom uglu.

5.2.2 Implementacija

Izlazna *.html* stranica je implementirana u *Python*-u, a podršku za interakciju sa korisnikom (pretraživanje, izvoz podataka, sortiranje, selektovanje, itd) je pružio *JavaScript*. Tabela predstavlja instancu *DataTable* objekta čiju podršku pruža *jQuery*¹⁰ biblioteka *DataTables*¹¹. Podršku za mogućnost selekcije redova pružila je biblioteka *Select*¹², a za izvoz podataka biblioteka *Buttons*¹³.

Prikazivanje *tooltip*-ova u okviru izlazne *.html* stranice se pokazalo kao svojevrsan izazov. Naime, izlazne *.html* stranice za Aškenazi trio su i bez ovih dodatnih informacija bile glomazne (za Aškenazi sina/majku/oca, redom 66.9 MB/57.3 MB/57.6 MB), a njihovim pridruživanjem su još narasle i njihovo otvaranje u veb pregledačima je bilo značajno usporeno. Pristup ovakvim *.html* datotekama je testiran sa dva pregledača - *Google Chrome* i *Mozilla Firefox*. *Google Chrome* nije uspevao da otvori generisane datoteke, dok *Mozilla Firefox* jeste. U daljem testiranju stoga je korišćen samo *Mozilla Firefox*. U tabeli 5.2 prikazane su veličine

¹⁰<https://ajax.googleapis.com/ajax/libs/jquery/3.4.1/jquery.min.js>

¹¹<https://cdn.datatables.net/1.10.20/js/jquery.dataTables.js>

¹²<https://cdn.datatables.net/select/1.3.1/js/dataTables.select.min.js>

¹³<https://cdn.datatables.net/buttons/1.7.0/js/dataTables.buttons.min.js>

izlaznih *.html* datoteka Aškenazi trija i vremena potrebna za njihovo otvaranje u različitim verzijama aplikacije *AnnoPI* koje su opisane u narednim pasusima.

U prvoj verziji aplikacije, tekst za *tooltip*-ove je pridružen svakom identifikatoru (i za *gen*, i za *GO* funkciju i za *HPO* fenotip) posebno, na nivou polja tabele pod tagom *td*, u okviru atributa *data-tippy-content*. Za njihovo prikazivanje korišćena je *JavaScript* biblioteka *Tippy*¹⁴. Dobijena izlazna *.html* datoteka je tada sadržala veliku količinu redundantnih informacija. Prilikom testiranja za Aškenazi trio, izlazne datoteke su bile veličina 179.5 MB, 154.1 MB i 154.8 MB (tabela 5.2, verzija 1). Korišćenje ove biblioteke rezultiralo je velikom količinom vremena pri otvaranju stranice, pa i nemogućnošću njenog otvaranja na računaru slabije konfiguracije.

U drugoj verziji aplikacije, umesto upisivanja teksta za *tooltip*-ove direktno u *.html* datoteku, ovaj tekst se upisuje u *JavaScript* datoteke *GeneJSMMap.js*, *GOtooltipsJS.js* i *HPOtooltipsJS.js* (svaka od datoteka je veličine par megabajta). Za prikazivanje *tooltip*-ova i u ovoj verziji koristimo biblioteku *Tippy* pri čemu se vrednost *data-tippy-content* atributa postavlja u *scriptFile.js* datoteci čitanjem podataka iz odgovarajućih *.js* datoteka. Svi *tooltip*-ovi smeštaju se u rečnik, konkretno u odgovarajuću instancu *Map* objekta (*geneMap*, *goMap* i *hpoMap*). Izlazne *.html* stranice su u drugoj verziji manje nego u prvoj (66.5 MB, 56.7 MB, 57.3 MB, tabela 5.2, verzija 2) ali učitavanje i dalje traje dugo. Ono što je prednost ovog pristupa je izostanak velikog broja ponavljanja istih funkcija odnosno fenotipskih osobina.

U trećoj verziji, *data-tippy-content* u okviru taga *td* zamenjen je *HTML* atributom *title* u okviru istog taga. Njegove vrednosti se postavljaju u datoteci *scriptFile.js* čitanjem iz datoteka *GeneJSMMap.js*, *GOtooltipsJS.js* i *HPOtooltipsJS.js* pri čemu nema potrebe za korišćenjem *JavaScript* biblioteke *Tippy*.

Treća verzija je rezultovala najmanjim datotekama koje mogu da se otvore i na računarima slabije konfiguracije. Postoje male razlike u veličini u odnosu na drugu verziju, ali su razlike u vremenu prikazivanja velike. Razlog za to leži u činjenici da se u trećoj verziji koristi *title* atribut koji nije neophodno inicijalizovati u *.html* datoteci za razliku od atributa *data-tippy-content* koji se mora inicijalizovati. Dodatno, *tooltip* prikazan pomoću atributa *data-tippy-content* zahtevniji je jer korišćenje *Tippy* biblioteke znači i kreiranje instance objekta u *.js* datoteci. Atribut *title* je ugrađeni *HTML* atribut i za njegovo korišćenje dovoljno je samo u *.js* datoteci postaviti vrednost odgovarajućem elementu.

¹⁴Za njeno korišćenje potrebno je uključiti <https://unpkg.com/@popperjs/core@2> i <https://unpkg.com/tippy.js@6>

Tabela 5.2: Vremena otvaranja *.html* datoteka u različitim verzijama aplikacije na računaru slabije konfiguracije (4 GB RAM memorije, Intel(R) Core(TM) i3-5005U @ 2.00 GHz procesor) i na računaru jače konfiguracije (16 GB RAM memorije, Intel(R) Core(TM) i7-9750H @2.60 GHz procesorom)

Verzija	Ime	Veličina datoteke	Vreme otvaranja na računaru slabije konfiguracije	Vreme otvaranja na računaru jače konfiguracije
1	son	179 MB	neuspešno otvaranje	97 s
	mom	155 MB	neuspešno otvaranje	91 s
	dad	154 MB	neuspešno otvaranje	90 s
2	son	66.5 MB	neuspešno otvaranje	98 s
	mom	56.7 MB	neuspešno otvaranje	91 s
	dad	57.3 MB	neuspešno otvaranje	91 s
3	son	65.4 MB	122 s	34 s
	mom	55.8 MB	120 s	32 s
	dad	56.2 MB	120 s	32 s

AnnoPI je softver koji se jednostavno instalira i koristi. Pored softvera *AnnoPI*, neophodno je da korisnik na lokalnom računaru ima softver *Annovar* kao i interpretere za *Perl* i *Python*. Pokretanje softvera *Annovar* i generisanje anotacijskih datoteka (*.txt* datoteka koje predstavljaju ulaz za *AnnoPI*) može da potraje na slabijim računarima, do sat vremena (4GB RAM memorije). Nakon generisanja anotacijskih datoteka, softver *AnnoPI* kreira izlaznu datoteku za svega nekoliko minuta na računaru slabije konfiguracije. Pretpostavka je da bi izvršavanje bilo značajno brže na računarima jače konfiguracije što zbog nedostatka vremena nije provereno.

Glava 6

Zaključak

U savremenim bioinformatičkim istraživanjima, sekvencioniranje nove generacije dovelo je do svakodnevnog priliva sekvencioniranih genoma i velikih količina podataka o njima. Posebno su značajni podaci o genetskim varijacijama pojedinačnih genoma jer genetske varijacije određuju specifičan fenotip, a mogu se povezati ili biti uzročnik anomalija i oboljenja.

Podaci o genetskim varijacijama se nalaze rasuti po raznim javno dostupnim bazama podataka. Softver *Annovar* automatski prikuplja određene podatke iz pomenutih baza i time olakšava i ubrzava dolazak do njih. Cilj ovog rada je izrada dodatka *AnnoPI* za softver *Annovar* koji sakuplja dodatne podatke o genetskim varijacijama, preciznije podatke o funkciji i fenotipu gena na kojima se genetske varijacije nalaze. *AnnoPI* preuzima ove podatke iz javno dostupnih baza podataka i zajedno sa podacima koje *Annovar* prikuplja pregledno ih prikazuje u okviru *.html* datoteke sa različitim funkcionalnostima (sortiranje, selekcija, izvoz podataka, pretraga). Softver *AnnoPI* je javno dostupan i može da pruži podršku istraživačima različitih profila u genomici kao i u raznim bioinformatičkim disciplinama pri pretraživanju informacija o genetskim varijacijama.

Jedan pravac unapređenja softvera *AnnoPI* bi bila serverska obrada podataka što bi se ogledalo u učitavanju podataka *.html* datoteke „strana-po-strana”, kao i elegantnijem prikazu *tooltipa*-ova. Uz to, s obzirom da se softver pokreće iz komandne linije, implementacija grafičkog interfejsa bi doprinela njegovoj široj upotrebi među istraživačima bez informatičke ekspertize.

Literatura

- [1] Céline Brouard. „Inférence de réseaux d’interaction protéine-protéine par apprentissage statistique”. Doktorska teza. Feb. 2013.
- [2] *GitHub repozitorijum projekta AnnoPI*.
URL: <https://github.com/AndjelaMijailovic/AnnoPI>.
- [3] Xiaofeng Gong et al. “A new method to measure the semantic similarity from query phenotypic abnormalities to diseases based on the human phenotype ontology”. In: *The Sixteenth Asia Pacific Bioinformatics Conference* 15 (2018), pp. 1–2.
- [4] Radivoje Papović i saradnici Medicinskog fakulteta u Beogradu. *Humana genetika*. Medicinski fakultet, Beograd, 2007.
- [5] Board on Environmental Studies National Research Council Commission on Life Sciences i Committee on Developmental Toxicology Toxicology. *Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment*. National Academies Press (US), 2000.
- [6] Philip Compeau Pavel A. Pevzner. *Bioinformatics algorithms: An Active Learning Approach*. English. 2015.
- [7] Wing-Kin Sung. *Algorithms for Next-Generation Sequencing*. CRC Press, 2017.
- [8] *Uputstvo za korišćenje softvera Annovar*.
URL: <https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/user-guide/startup/>.
- [9] *Wiki stranica softvera Annovar*. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/ANNOVAR>.
- [10] *Zvanična prezentacija Nacionalnog istraživačkog instituta za humani genom (National Human Genome Research Institute, NHGRI)*. URL: <https://www.genome.gov/>.

LITERATURA

- [11] *Zvanična stranica Švajcarskog bioinformatičkog instituta.* URL: <https://www.sib.swiss/>.
- [12] *Zvanična stranica Evropskog bioinformatičkog instituta.* URL: <https://www.ebi.ac.uk/>.
- [13] *Zvanična stranica Gene Ontology.* URL: <http://geneontology.org/docs/ontology-documentation/>.
- [14] *Zvanična stranica GO projekta.* URL: <http://current.geneontology.org/annotations/index.html>.
- [15] *Zvanična stranica Human Phenotype Ontology.* URL: <https://hpo.jax.org/app/help/introduction>.
- [16] *Zvanična stranica Kjoto enciklopedije gena i genoma.* URL: <https://www.genome.jp/kegg/>.
- [17] *Zvanična stranica konzorcijuma „Genom u boci”.* URL: <https://www.nist.gov/programs-projects/genome-bottle/>.
- [18] *Zvanična stranica Nacionalnog centra za biološke informacije.* URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [19] *Zvanična stranica softvera Annovar.*
URL: <https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>.

Biografija autora

Andela Mijailović rođena je u Kraljevu 21. oktobra 1994. godine. Završila je Osnovnu školu „Braća Vilotijević” u Kraljevu kao đak generacije i nosilac diplome „Vuk Karadžić”. Gimnaziju u Kraljevu, prirodno-matematički smer, upisala je 2009. godina i završila 2013. godine kao nosilac diplome „Vuk Karadžić”. Iste godine upisala je Matematički fakultet u Beogradu, smer Računarstvo i informatika i završila 2017. godine. Nakon diplomiranja, upisala je master studije na istom smeru. Položila je sve ispite 2018. godine. Od decembra 2017. godine zaposlena je u firmi „Beolink” gde i trenutno radi.