

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. Обзор предметной области .....	7
1.1. Биоинформатика .....	7
1.1.1. Анализ экспрессии генов .....	7
1.1.2. Используемые методы .....	7
1.2. Существующие решения для анализа экспрессии генов .....	8
1.2.1. R/Bioconductor .....	8
1.2.2. GENE-E .....	8
1.2.3. morpheus.js .....	9
1.3. Инструменты, которые могут быть применены .....	9
1.3.1. Язык R и библиотека Bioconductor .....	9
1.3.2. JavaScript и Node.js .....	9
1.3.3. R shiny.....	9
1.3.4. OpenCPU .....	9
1.3.5. Gene Expression Omnibus .....	10
1.3.6. Docker .....	10
1.3.7. Protocol Buffers .....	11
1.3.8. Apache.....	11
1.3.9. HTML.....	11
1.4. Постановка задачи.....	11
1.4.1. Цель работы .....	11
1.4.2. Основные задачи.....	11
1.4.3. Требования к веб-приложению phantasus.....	11
Выводы по главе 1.....	12
2. Архитектура проекта phantasus.....	13
2.1. morpheus.js .....	13
2.1.1. Чтение данных .....	13
2.1.2. Класс Dataset.....	14
2.1.3. Класс SlicedDatasetView.....	14
2.1.4. Класс HeatMap .....	15
2.1.5. Реализованные методы .....	15

2.2. phantasus.js.....	15
2.2.1. Клиентская сторона OpenCPU — opencpu.js .....	15
2.2.2. Поддержка Protocol Buffers — protobuf.js .....	16
2.2.3. Интерактивные графики — plotly.js.....	16
2.2.4. Поддержка ExpressionSet .....	17
2.2.5. Инструмент PcaPlotTool.....	17
2.2.6. Инструмент KmeansTool .....	18
2.2.7. Инструмент LimmaTool .....	18
2.3. R-пакет phantasus.....	18
2.3.1. Biobase и ExpressionSet.....	18
2.3.2. Поддержка Protocol Buffers — protolite.....	19
2.3.3. Создание ExpressionSet из данных.....	19
2.3.4. Загрузка данных из GEO — loadGEO .....	20
2.3.5. Дифференциальная экспрессия — limmaAnalysis .....	20
2.3.6. Статистические функции — stats.....	21
Выводы по главе 2.....	22
3. Реализация .....	25
3.1. Структура git-репозитория.....	25
3.2. Кэш для данных из GEO .....	25
3.3. Единый R-пакет phantasus .....	25
3.4. Docker-образ phantasus.....	25
3.4.1. Запуск Docker-контейнера.....	26
3.5. Настройка с помощью Apache .....	26
3.5.1. Переадресация OpenCPU-сервера.....	26
3.5.2. Балансировщик для multi-user соединения .....	27
3.6. Статистика использования.....	27
Выводы по главе 3.....	27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	28
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	29
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Протокол сериализации в ProtoBuf .....	31
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Dockerfile.....	32

## **ВВЕДЕНИЕ**

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ПРЕДМЕТНОЙ ОБЛАСТИ

### 1.1. Биоинформатика

**Биоинформатика** — наука, объединяющая в себе методы прикладной математики, статистики, информатики для создания новых методов и алгоритмов для анализа разного рода биологических данных.

Биоинформатика занимается биохимией, биофизикой, экологией и многими другими областями биологии. Однако в данной работе фокус направлен на геномную биоинформатику и на конкретную ее задачу — анализ экспрессии генов.

#### 1.1.1. Анализ экспрессии генов

**Экспрессия генов** — процесс преобразования наследственной информации от гена (в виде последовательности нуклеотидов ДНК) в функциональный продукт (РНК или белок).

Анализ экспрессии генов позволяет выяснить как ведет себя отдельный ген в разных условиях, тканях или организмах. Так, например, можно исследовать экспрессию вирусных белков или экспрессию онкогенов.

#### 1.1.2. Используемые методы

Как было сказано ранее, биоинформатика использует в себе математику, информатику и статистику. Соответственно, задача анализа экспрессии генов сводится к исследованию путем статистических методов и алгоритмов числовой двумерной матрицы, как, например, небольшой срез матрицы в таблице 1.

Таблица 1 – Срез матрицы GSE14308. Строки матрицы соответствуют генам, столбцы — образцам.

	GSM357839	GSM357841	GSM357842	GSM357843	GSM357844
Rps29	16.32	16.30	16.25	16.32	16.30
Rpl13a	16.27	16.23	16.32	16.30	16.27
Rps3a1	16.23	16.19	16.30	16.25	16.25
Rpl38	16.21	16.25	16.27	16.27	16.21
Tmsb4x	16.30	16.32	16.23	16.21	16.32

На рисунке можно увидеть визуализацию матрицы экспрессии в виде тепловой карты.

Также к основным методам анализа относятся:

- Иерархическая и вероятностная кластеризации;
- Дифференциальная экспрессия;
- Метод главных компонент и визуализация его результатов.

## 1.2. Существующие решения для анализа экспрессии генов

### 1.2.1. R/Bioconductor

**R** - язык программирования для статистического анализа данных и работы с графикой [1].

**Bioconductor** - библиотека, содержащая в себе множество реализаций биоинформатических алгоритмов и методов обработки биологических данных на R. Она постоянно обновляется, пополняется новыми библиотеками, модерируется сообществом [2]. R и Bioconductor очень популярны в биоинформатической среде ввиду предоставляемых возможностей.

Однако для качественного и полноценного анализа с помощью этих инструментов, нужно иметь навыки программирования на R, что весьма неудобно для исследователей биологических специальностей.

### 1.2.2. GENE-E

**GENE-E** - Платформа для анализа данных и визуального исследования данных, созданная на Java и R [3]. Содержит в себе множество полезных для исследования инструментов: тепловые карты, кластеризацию, фильтрацию, построение графиков и т.д. Позволяет исследовать любые данные в виде матрицы. К тому же, содержит дополнительные инструменты для геномных данных.

Недостатки:

- Чтобы использовать, необходимо устанавливать на свой компьютер;
- Поддержка данного приложения прекратилась в связи с созданием morpheus.js [4];
- Не имеет открытого исходного кода, а только API для взаимодействия и создания новых приложений на его основе.

### 1.2.3. morpheus.js

**Morpheus.js** - веб-приложение для визуализации и анализа матриц от создателя GENE-E [4]. Создано уже на JavaScript и с открытым исходным кодом. Удобно для использования исследователями без навыков программирования и так же, как и GENE-E, применимо к любым матрицам.

Недостатки:

- Ограниченный набор функций, которых недостаточно для полноценного анализа;
- Для расширения биоинформатическими алгоритмами, не прибегая к дополнительным инструментам, требуется реализовывать их заново на JavaScript.

## 1.3. Инструменты, которые могут быть применены

### 1.3.1. Язык R и библиотека Bioconductor

Как было сказано ранее, Bioconductor полон актуальными и широко используемыми биоинформатическими алгоритмами, в том числе и для анализа экспрессии генов. Соответственно, реализовывать их заново обычно нет необходимости и можно использовать их для достижения целей этой работы.

### 1.3.2. JavaScript и Node.js

**JavaScript** — мультипарадигменный скриптовый язык программирования, широко используемый для создания веб-приложений.

**Node.js** — [5]

### 1.3.3. R shiny

### 1.3.4. OpenCPU

#### 1.3.4.1. Необходимые определения

HTTP HTTP API RPC Веб-сервер

**OpenCPU** — система для встроенных научных вычислений и воспроизводимых исследований, предоставляющая HTTP API для взаимодействия с R-серверами [6].

Имеется также библиотека *opencpu.js* для интеграции JavaScript и R.

### 1.3.5. Gene Expression Omnibus

**Gene Expression Omnibus (GEO)** — международный публичный репозиторий, агрегирующий и распространяющий различные формы геномных данных от исследовательского сообщества [7].

В библиотеке Bioconductor есть R-пакет *GEOquery* для удобной загрузки данных из GEO [8].

### 1.3.6. Docker

**Docker** — программное обеспечение для автоматизации запуска и внедрения приложений внутри контейнеров [9].

Для дальнейшего описания данного инструмента введем несколько определений.

**Образ** — отдельный исполняемый пакет, включающий себя все необходимое для запуска единицы программного обеспечения, в том числе исходный код, библиотеки, переменные окружения, конфигурационные файлы. Зачастую образ построен на основе другого образа с дополнительной конфигурацией. Образ компилируется по *Dockerfile*, каждая команда в котором соответствует новому слою. При перекомпиляции обновляются только те слои, которые изменились.

**Контейнер** — запущенный экземпляр образа. Контейнер обычно выполняется изолированно от окружения, имея доступ к файлам или портам хост-системы только при наличии соответствующей конфигурации.

В отличие от виртуальных машин, которые запускают гостевую операционную систему в каждом экземпляре, контейнеры могут разделять общее ядро, и вся информация, которая должна быть в контейнере, это исполняемый процесс и его зависимости. Исполняемые процессы из контейнеров работают как нативные процессы, и могут управляться по отдельности.

Для контроля версий и хранения образов в открытом доступе используется Docker Hub [10]. В этом хранилище можно как добавлять репозитории, управляемые вручную, так и поддерживать автоматические сборки (*Automated Build*), которые привязаны к репозиториям на в популярных системах контроля версий: GitHub [11] и Bitbucket [12].

### 1.3.7. Protocol Buffers

**Protocol Buffers (Protobuf)** — гибкий, универсальный и автоматизированный механизм для сериализации структурированных данных [13].

Структура информации задается с помощью \*.proto файлов в форме сообщений (Message).

### 1.3.8. Apache

### 1.3.9. HTML

## 1.4. Постановка задачи

Рассмотрев существующие решения для анализа экспрессии генов и инструментов, которые могли бы пригодиться для будущих решений, можно сформулировать цель и основные задачи данной работы

### 1.4.1. Цель работы

Создать веб-приложение, интегрирующее существующие возможности веб-приложения morpheus.js и методы анализа, реализованные в Bioconductor.

### 1.4.2. Основные задачи

- а) Разработать способ взаимодействия между js-клиентом и R и встроить его в morpheus.js, чтобы избежать реализации с нуля уже существующих алгоритмов;
- б) Реализовать графический интерфейс в js-клиенте и серверную реализацию в R-пакете;
- в) Соединить все составляющие в одном веб-приложении phantassus;
- г) Запустить веб-приложение в открытый доступ для исследователей.

### 1.4.3. Требования к веб-приложению phantassus

#### 1.4.3.1. Доступность

Необходимо, чтобы веб-приложение phantassus было доступно для исследователей независимо от их местоположения и времени суток. Варианты действий:

- а) Сделать его доступным по определенному веб-адресу, и тогда пользователь сможет продолжать исследования из любой точки, где есть подключение к интернету;



- б) Предоставить возможность запускать приложение локально, например, с помощью Docker или внутри R.

#### **1.4.3.2. Возможность дальнейшего расширения функционала**

Как уже было сказано выше, библиотека Bioconductor постоянно обновляется и пополняется новыми алгоритмами, а исследователи находят новые методы для анализа экспрессии генов, так что необходимо не только реализовать дополнительные методы, но и отладить и описать алгоритм действий для добавления новых.

### **Выводы по главе 1**

## ГЛАВА 2. АРХИТЕКТУРА ПРОЕКТА PHANTASUS

В этой главе будут подробно рассмотрены составляющие проекта:

- `morpheus.js`;
- R-пакет `phantasus`;
- OpenCPU.

Также будут описаны взаимосвязи между компонентами, сопутствующие инструменты и их предназначение в системе и ключевые для архитектуры выдержки из исходного кода.

### 2.1. `morpheus.js`

Как уже было рассказано в обзоре, `morpheus.js` — веб-приложение, полностью созданное на JavaScript, для визуализации и анализа матриц.

В этом разделе будут описаны основные классы и функции, реализованные в исходном коде `morpheus.js`, которые будут в дальнейшем необходимы для расширения функционала.

#### 2.1.1. Чтение данных

В `morpheus.js` данные могут быть загружены из файла, полученного одним из следующих путей:

- Из компьютера;
- По URL-ссылке;
- Из Dropbox.

Допустимые форматы загружаемых файлов:

- txt-файл с tab-разделителями;
- Excel-таблица;
- MAF [14];
- GCT [15];
- GMT [16].

Для каждого формата файла в исходном коде `morpheus.js` присутствует соответствующий обработчик данных.

Также, `morpheus.js` предлагает набор предзагруженных данных из базы TCGA [17].

### 2.1.2. Класс Dataset

Одним из ключевых классов всего веб-приложения является класс Dataset. В каждом экземпляре этого класса хранится вся необходимая информация о данных, в которую входят:

- Числовая матрица, характеризующая уровень экспрессии всех генов во всех образцах;
- Количество строк и столбцов в матрице;
- Аннотация к образцам, например:
  - пол, возраст, контактную информацию испытуемых, если образцы были взяты с людей;
  - есть или нет инфекция в данном образце;
  - способ лечения;
  - контакты ответственного за взятие данного образца и пр.;
- Аннотация к генам, например:
  - Идентификатор гена в том или ином стандарте;
  - Числовые характеристики гена (средний уровень экспрессии по образцам, номер кластера) и пр.

Аннотация реализована в классе MetadataModel, который представляет собой не что иное, как набор именованных векторов с характеристиками. В каждом векторе хранятся:

- Название;
- Формат (строка, число);
- Массив значений.

Для векторов так же предусмотрены утилиты для визуализации. Так, например, есть возможность показать аннотацию в виде текста и/или цветом, что удобно для категориальных характеристик.

### 2.1.3. Класс SlicedDatasetView

Чаще всего во время работы программы экземпляры класса Dataset становятся обернуты в оболочку из SlicedDatasetView. Этот дополнительный класс дает возможность не пересоздавать каждый раз Dataset, а просто добавляет к данным информацию о том, какие индексы строк и столбцов выбраны и используются в данный момент.

### 2.1.4. Класс HeatMap

Данный класс предназначен для визуализации данных, обернутых в класс Dataset или SlicedDatasetView. Он дает возможность выбирать, какая аннотация будет представлена на экране, цветовой код, выбирать строки и столбцы, с которыми будут работать те или иные инструменты.

### 2.1.5. Реализованные методы

В morpheus.js имеются реализации следующих методов:

- Adjust — инструмент для корректировки данных:
  - $\log_2$ ;
  - $\log_2^{-1}$ ;
  - Квантиль-нормализация;
  - Z-тест;
  - Устойчивый Z-тест;
- Collapse — инструмент, позволяющий агрегировать строки или столбцы с одинаковыми значениями с помощью функции: *min*, *max*, *mean*, *median*, *sum*, максимум 25-го и 75-го перцентилей;
- Создать вычисленную аннотацию для строк или столбцов;
- Similarity Matrix;
- Transpose;
- t-SNE;
- Построение графиков.

Также присутствуют фильтрация и сортировка.

## 2.2. phantasus.js

В этом разделе будет рассмотрен модифицированный вариант morpheus.js и потребовавшиеся для его расширения компоненты.

### 2.2.1. Клиентская сторона OpenCPU — opencpu.js

В обзоре было рассказано об OpenCPU и его необходимости. В данной работе он нужен для связи JavaScript-клиента и R-сервера.

Opencpu.js реализует RPC-вызовы по принципу Asynchronous JavaScript and XML (Ajax [18]), позволяя тем самым пользоваться HTTP API: отправлять и получать HTTP-сообщения в фоновом режиме, тем самым не замедляя работу графического интерфейса и вычислений, осуществляемых на стороне клиента.

В данной библиотеке реализован класс `Session`, хранящий в себе ключ сессии, адреса на ссылки, файлы и переменные, содержащиеся внутри сессии.

Для подключения к R-пакету на R-сервере удобно использовать код, представленный на листинге 1. Для успешного подключения R-пакет должен быть предварительно установлен на host-машину, на которой располагается сервер.

```
1 ocpu.seturl("//hostname/ocpu/library/phantasus/R");
```

Листинг 1 – Подключение к R-пакету

После этого можно вызывать и запускать функции, содержащиеся в данном R-пакете, например, как в листинге 2.

```
1 var req = ocpu.rpc("function.name", arguments, callback(session) {
2   \\ Handling result
3 });
```

Листинг 2 – Пример вызова R-функции из JavaScript

### 2.2.2. Поддержка Protocol Buffers — `protobuf.js`

Чаще всего размеры обрабатываемых матриц 10000-40000 строк на 12-40 столбцов. Соответственно, пересылать их между клиентом и сервером в JSON-формате слишком долго.

Как было сказано в обзоре, Protocol Buffers позволяют лучше сериализовать данные, чтобы уменьшить размер пересылаемого пакета.

К сожалению, Google Developers официально поддерживают только Java, Python, C++, Go, Objective-C, Ruby, JavaNano и C#. Для JavaScript сообщество создает поддержку самостоятельно. После анализа существующих решений, было решено выбрать библиотеку `ProtoBuf.js` [19].

С помощью класса `Builder`, обрабатывающего файлы с протоколом структуры (\*.proto), можно закодировать соответствующий JSON объект в `Uint8Array`, чтобы после пересылать его на сервер.

### 2.2.3. Интерактивные графики — `plotly.js`

Для отображения интерактивных графиков используется библиотека `plotly.js` [20], которая предоставляет удобное API, в котором опи-

сание графика строится в JSON-формате. Соответственно, вся графическая работа лежит на клиенте.

#### 2.2.4. Поддержка ExpressionSet

В `phantasus.js` в `Dataset` добавлено дополнительное поле `esSession`, в котором находится объект класса `Promise` для асинхронного обновления ключа сессии в этом поле. Как только `Dataset` обновляется или только загружается, его актуальное содержимое, сериализованное в `ProtoBuf`, пересылается в функцию `createES` в R-пакете `phantasus` с помощью `opencpu.js`. При создании экземпляра класса `Promise` указываются две функции `reject` и `resolve`. Соответственно, происходит `reject(error)` с текстом ошибки при ее возникновении и `resolve(session)`, как только обработка на сервере завершается.

Все функции, использующие `ExpressionSet` в качестве аргумента (`pcaPlot`, `kmeans`, `limma`), ждут, пока `Promise` в поле `esSession` не будет в завершенном состоянии.

#### 2.2.5. Инструмент PcaPlotTool

Данный инструмент предназначен для построения графиков в соответствии с методом главных компонент. В качестве аргументов на вход к инструменту подается:

- Номера образцов для сравнения;
- Категориальная аннотация для различения точек по цвету (если не указана, то стандартный цвет);
- Числовая аннотация для различения точек по размеру (если не указана, то стандартный размер);
- Аннотация для подписей к точкам (если не указана, то без подписи);
- Функция замены NA в данных при вычислении матрицы PCA (`mean` или `median`).

На сервер отправляется только ключ сессии и функция замены, содержащей актуальный `ExpressionSet`. После чего на клиент возвращается матрица PCA, по которой уже на клиенте отрисовывается интерактивный график с учетом графических аргументов в `PcaPlot`.

### 2.2.6. Инструмент KmeansTool

На клиенте в инструменте KmeansTool осуществляется только сбор значений аргументов:

- Количество кластеров, на которые нужно разбить данные;
- Функция замены NA в данных.

Данные аргументы и ключ сессии актуального ExpressionSet отправляются на сервер, после чего, получив список Ген-Номер кластера на клиенте отрисовывается новая аннотация к строкам.

### 2.2.7. Инструмент LimmaTool

На клиенте осуществляется получение аргументов:

- Какие аннотации образцов участвуют в сравнении;
- Какая комбинация значений указанных выше аннотаций обозначает класс А;
- Аналогично для класса В.

После чего образцы разбиваются на классы А и В, либо обозначаются пустыми, в соответствии с полученными аргументами. Список Образец-Класс и ключ сессии актуального ExpressionSet после отправляются на сервер, где происходит вычисление. От сервера приходит файл с сериализованной матрицей результатов, которые с помощью protobuf.js разбираются и отрисовываются в виде аннотации к строкам.

## 2.3. R-пакет phantassus

Весь реализованный функционал должен иметь клиентскую часть в виде графического интерфейса и серверную в виде R-функции. Прежде чем рассматривать созданные функции, будут представлены имеющиеся необходимые элементы.

### 2.3.1. Biobase и ExpressionSet

Необходимый минимум функций для работы с геномными данными содержится в R-пакете Biobase [21].

Класс ExpressionSet [22] так же содержится в Biobase. Он помогает представлять данные об экспрессии генов в удобном формате:

- assayData — описание матрицы:
  - features — количество генов;

- samples — количество образцов;
- exprs — числовая матрица экспрессии;
- phenoData — аннотация к образцам:
  - sampleNames — идентификаторы образцов;
  - varLabels — названия характеристик;
  - varMetadata — описание характеристик;
  - pData — матрица характеристик;
- featureData — аннотация к генам:
  - featureNames — идентификаторы генов;
  - fvarLabels — названия характеристик;
  - fvarMetadata — описание характеристик;
  - fData — матрица характеристик.

Для доступа к каждому из элементов есть одноименная функция, что позволяет удобно взаимодействовать с экземплярами класса. Также многие из функций обработки данных в Bioconductor и в Biobase в частности завязаны на использование ExpressionSet.

Все реализованные в R-пакете phantasus функции принимают на вход в качестве одного из аргументов экземпляр класса ExpressionSet.

### 2.3.2. Поддержка Protocol Buffers — protolite

Поддержка ProtoBuf со стороны R-сервера осуществляется с помощью R-пакета protolite [23]. В реализованных функциях данный пакет используется каждый раз, когда необходимо вернуть матрицу больших размеров. Вместо отправки ее в исходном виде или в JSON предпочтительнее сериализовать результат и сохранить в файл, который после будет прочитан на клиенте.

### 2.3.3. Создание ExpressionSet из данных

В начале работы с phantasus необходимо загрузить данные. Если данные загружены из файла, то они будут сначала обработаны на клиенте, а после пересланы на сервер для создания ExpressionSet из них с помощью кода на листинге 3

По завершении функция отправляет es в глобальные переменные, чтобы ExpressionSet был доступен по адресу: /ospu/tmp/session-key/R/es. Таким образом, получив ключ данной сессии, можно иметь доступ и к ExpressionSet, находящемуся в ней.



```

1 createES <- function(data, pData, varLabels, fData, fvarLabels) {
2   exprs <- t(data)
3   phenoData <- AnnotatedDataFrame(data.frame(pData))
4   varLabels(phenoData) <- varLabels
5
6   featureData <- AnnotatedDataFrame(data.frame(fData))
7   varLabels(featureData) <- fvarLabels
8
9   es <- ExpressionSet(assayData = exprs, phenoData=phenoData, featureData =
   featureData)
10  assign("es", es, envir = parent.frame())
11  es
12 }

```

Листинг 3 – Функция создания ExpressionSet из исходных данных

Ключ сессии обновляется каждый раз при изменении Dataset в phantastus.js (Adjust, Collapse, new HeatMap, Transpose). Изменные данные пересылаются на сервер и ключ сессии обновляется в поле esSession в Dataset.

#### 2.3.4. Загрузка данных из GEO — loadGEO

В обзоре были описаны форматы данных в репозитории Gene Expression Omnibus. В phantastus загрузка данных из GEO осуществляется следующим образом:

- а) Функция loadGEO принимает на вход идентификатор GEO;
- б) В зависимости от его вида (GSE или GDS) запускаются дополнительные функции (getGSE на листинге 4 и getGDS на листинге 5);
- в) После с помощью GEOquery::getGEO загружаются данные с аннотацией (или подгружаются из кэша, если их уже загружали);
- г) Результат обрабатывается, создается ExpressionSet и отправляется в глобальные переменные;
- д) В файл записываются сериализованные в ProtoBuf данные, которые после считывает и обрабатывает клиент

Код и его дополнительные рутины можно увидеть на листинге 6.

#### 2.3.5. Дифференциальная экспрессия — limmaAnalysis

R-пакет limma [24] предоставляет методы для вычисления дифференциальной экспрессии. Данная функция помогает увидеть, насколько случайны или нет различия между образцами в генах в разных условиях.

Соответственно, было решено включить в phantastus поддержку такой функции.

```

1 getGSE <- function(name, destdir = tempdir()) {
2   es <- getGEO(name, AnnotGPL = T, destdir = destdir)[[1]]
3   featureData(es) <- featureData(es)[,grepl("symbol", fvarLabels(es), ignore.case
4     = T)]
5   phenoData(es) <- phenoData(es)[,grepl("characteristics", varLabels(es), ignore.
6     case = T)
7     | (varLabels(es) %in% c("title", "id", "geo_
8       accession"))]
9   chr <- varLabels(es)[grepl("characteristics", varLabels(es), ignore.case = T)]
10  take <- function(x, n) {
11    sapply(x, function(x) { x[[n]] })
12  }
13  rename <- function(prevName, x) {
14    splitted <- strsplit(x, ": ")
15    sumlength <- sum(sapply(as.vector(splitted), length))
16    if (sumlength != 2 * length(x)) {
17      return(list(name = prevName, x = x))
18    }
19    splittedFirst <- unique(take(splitted, 1))
20    if (length(splittedFirst) == 1) {
21      res = list(name = splittedFirst[1], x = take(splitted, 2))
22    }
23    else {
24      res = list(name = prevName, x = x)
25    }
26    res
27  }
28  renamed <- lapply(chr, function(x) { rename(x, as.vector(pData(es)[,x])) })
29  phenoData(es) <- phenoData(es)[, !(varLabels(es) %in% chr)]
30  pData(es)[,take(renamed,1)] <- take(renamed,2)
31  es
32 }

```

Листинг 4 – Загрузка данных типа GSE из Gene Expression Omnibus

Реализация функции `limmaAnalysis` в R-пакете `phantasus` принимает в себя `ExpressionSet` и вектор с соответствием Образец-Класс. Класс в этом векторе может быть А, В или пустым. Необходимо сравнить классы А и В, а для этого нужно дополнить фенотипические данные `ExpressionSet` полученным вектором. После дизайн сравнения передается в функцию, которая возвращает матрицу статистических характеристик к каждому гену. Эта матрица далее сериализуется в `ProtoBuf`, записывается в файл, который будет в дальнейшем разобран на клиенте.

Код функции `limmaAnalysis` представлен на листинге 7.

### 2.3.6. Статистические функции — stats

R-пакет `stats` [25] содержит в себе большинство современных используемых методов статистического анализа. В данной работе используются два: PCA (метод главных компонент) и `kmeans` (кластеризация).

```

1 getGDS <- function(name, destdir = tempdir()) {
2   l <- getGEO(name, destdir = destdir)
3   table <- slot(l, 'dataTable') # extracting all useful information on dataset
4   data <- Table(table) # extracting table ID_REF | IDENTIFIER/SAMPLE | SAMPLE1 |
5   ...
6   columnsMeta <- Columns(table) # phenoData
7   sampleNames <- as.vector(columnsMeta[["sample"]])
8   rownames <- as.vector(data[["ID_REF"]])
9   symbol <- as.vector(data[["IDENTIFIER"]])
10  data <- data[, sampleNames] # expression data
11  exprs <- as.matrix(data)
12  row.names(exprs) <- rownames
13  row.names(columnsMeta) <- sampleNames
14  # columnsMeta <- columnsMeta[,!(colnames(columnsMeta) %in% c('sample'))]
15  pData <- AnnotatedDataFrame(data.frame(columnsMeta, check.names = F))
16  fData <- data.frame(matrix(symbol, nrow(exprs), 1));
17  colnames(fData) <- "symbol"
18  fData <- AnnotatedDataFrame(fData)
19  featureNames(fData) <- rownames
20  ExpressionSet(assayData = exprs, phenoData = pData, featureData = fData)
}

```

Листинг 5 – Загрузка данных типа GDS из Gene Expression Omnibus

## Выводы по главе 2

В данной главе были рассмотрены основные составляющие проекта:

- morpheus.js — база для расширения, поэтому были описаны важные компоненты, с которыми необходимо взаимодействовать во время дополнения проекта новым функционалом;
- phantasus.js — расширенный morpheus.js. Были описаны дополнения: новые инструменты, поддержка ProtoBuf, поддержка актуального состояния ключа сессии ExpressionSet для каждого Dataset;
- R-пакет phantasus — R-пакет, содержащий в себе серверные реализации всех добавленных методов и инструментов.

```

1 loadGEO <- function(name, type = NA) {
2   es <- getES(name, type, destdir = "/var/phantasus/cache")
3   assign("es", es, envir = parent.frame())
4   data <- as.matrix(exprs(es)); colnames(data) <- NULL; row.names(data) <- NULL
5
6   pdata <- as.matrix(pData(es)); colnames(pdata) <- NULL; row.names(pdata) <-
      NULL
7
8   participants <- colnames(es)
9   rownames <- rownames(es)
10
11  fdata <- as.matrix(fData(es))
12  colnames(fdata) <- NULL
13  row.names(fdata) <- NULL
14
15  res <- list(data = data, pdata = pdata,
16             fdata = fdata, rownames = rownames,
17             colMetaNames = varLabels(phenoData(es)),
18             rowMetaNames = varLabels(featureData(es)))
19
20  f <- tempfile(pattern = "gse", tmpdir = getwd(), fileext = ".bin")
21  writeBin(protolite::serialize_pb(res), f)
22  f
23 }
24 getES <- function(name, type = NA, destdir = tempdir()) {
25   if (is.na(type)) {
26     type = substr(name, 1, 3)
27   }
28   if (type == 'GSE') {
29     es <- getGSE(name, destdir)
30   }
31   else if (type == 'GDS') {
32     es <- getGDS(name, destdir)
33   }
34   else {
35     stop("Incorrect name or type of the dataset")
36   }
37   es
38 }

```

Листинг 6 – Загрузка данных из Gene Expression Omnibus

```

1 limmaAnalysis <- function(es, rows = c(), columns = c(), fieldValues) {
2   assertthat::assert_that(length(columns) == length(fieldValues) || length(
3     columns) == 0)
4   rows <- getIndicesVector(rows, nrow(exprs(es)))
5   columns <- getIndicesVector(columns, ncol(exprs(es)))
6   fieldName <- "Comparison"
7   fieldValues <- replace(fieldValues, fieldValues == '', NA)
8   new.pdata <- pData(es)[columns,]
9   new.pdata[[fieldName]] <- as.factor(fieldValues)
10  new.pdata <- new.pdata[!is.na(new.pdata[[fieldName]]),]
11  new.sampleNames <- row.names(new.pdata)
12  es.copy <- es[rows, new.sampleNames]
13  pData(es.copy) <- new.pdata
14  fData(es.copy) <- data.frame(row.names=row.names(es.copy))
15  es.design <- model.matrix(~0 + Comparison, data = pData(es.copy))
16  colnames(es.design) <- gsub(pattern = fieldName,
17    replacement = '',
18    x = make.names(colnames(es.design)))
19  fit <- lmFit(es.copy, es.design)
20  fit2 <- contrasts.fit(fit, makeContrasts(B - A,
21    levels=es.design))
22  fit2 <- eBayes(fit2)
23  de <- topTable(fit2, adjust.method="BH", number=Inf)
24  de <- de[row.names(fData(es.copy)),]
25  f <- tempfile(pattern = "de", tmpdir = getwd(), fileext = ".bin")
26  writeBin(protolite::serialize_pb(as.list(de)), f)
27  f
28 }

```

Листинг 7 – Реализация дифференциальной экспрессии в R-пакете phantassus

## ГЛАВА 3. РЕАЛИЗАЦИЯ

### 3.1. Структура git-репозитория

Как следует из главы об архитектуре проекта, проект состоит из двух составляющих:

- `phantasus.js` — fork репозитория `morpheus.js` [4];
- `phantasus` — репозиторий для R-пакета.

Внутри репозитория `phantasus` находится подмодуль для репозитория `phantasus.js`. Соответственно, чтобы загрузить целиком весь проект достаточно вызвать команду из листинга 8.

```
1 git clone --recursive https://github.com/ctlab/phantasus.git
```

Листинг 8 – Клонирование репозитория проекта `phantasus`

### 3.2. Кэш для данных из GEO

Независимо от способа запуска, данные, загруженные из GEO, кэшируются в определенной папке, чтобы не было необходимости перескачивать их заново.

### 3.3. Единый R-пакет `phantasus`

Так как проект теперь существует в виде почти единого git-репозитория, его легко можно использовать как полноценный R-пакет, содержащий в себе в том числе и файлы для веб-приложения. С помощью функции, представленной на листинге 9, можно запускать веб-приложение `phantasus` непосредственно из R.

### 3.4. Docker-образ `phantasus`

На `hub.docker.com` существует автоматический репозиторий, привязанный к git-репозиторию `phantasus`. Для каждой перекомпиляции он использует `Dockerfile` с листинга Б.1, расположенный в репозитории.

На данный момент существуют две ветки Docker-образа:

- `master` — компиляция происходит из `master`-веток составляющих проекта, чаще всего эти скомпилированные образы стабильны и отправляются в открытый доступ для использования;

```

1 #' Starts http server handling morpheus static files and opencpu
2 #' @param host host to listen
3 #' @param port port to listen
4 #' @param morpheusRoot path to static files with morpheus (on local file system)
5 #' @import opencpu
6 #' @import httpuv
7 #' @import Rook
8 #' @export
9 serveMorpheus <- function(host, port, morpheusRoot) {
10   app <-
11     Rook::URLMap$new(
12       "/ocpu"=opencpu:::rookhandler("/ocpu"),
13       "/?"=Rook::Static$new(
14         urls = c('/'),
15         root = morpheusRoot
16       ))
17
18   httpuv::runServer(host,
19                     port,
20                     app=app)
21 }
22

```

Листинг 9 – Функция для запуска приложения из R

- develop — компиляция происходит из develop-веток составляющих проекта, эти образы используются для тестирования всего приложения в целом, тестирования нового функционала и не предназначены для использования на серверах.

Чтобы загрузить Docker-образ, нужно воспользоваться командой с листинга 10

```

1 docker pull dzenkova/phantasus

```

Листинг 10 – Загрузка Docker-образа phantasus

### 3.4.1. Запуск Docker-контейнера

## 3.5. Настройка с помощью Apache

### 3.5.1. Переадресация OpenCPU-сервера

После того, как сравнили скорость работы с использованием single-user OpenCPU-сервера и multi-user, пришли к выводу, что скорость доступа к первому выше из-за того, что RApache работает достаточно медленно.

Соответственно, происходит переадресация запросов с /ocpu на //localhost:8001/ocpu.

### **3.5.2. Балансировщик для multi-user соединения**

Из-за того, что используется single-user OpenCPU-сервер, несколько людей, использующих веб-приложение phantastus одновременно, вынуждены ждать, пока закончится запрос для одного.

Чтобы такого не происходило, запускается четыре экземпляра OpenCPU-сервера и с помощью Apache-балансировщика можно получать доступ к R-серверу параллельно.

## **3.6. Статистика использования**

### **Выводы по главе 3**

В данной главе были рассмотрены технические подробности реализации веб-приложения: инструкции для запуска, варианты использования и подробности настройки веб-приложения на сервере.



## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 *Gentleman R., Ihaka R.* R project. — URL: <https://www.r-project.org/>. [Электронный ресурс].
- 2 *Bioconductor / A. Sonali [и др.].* — URL: <https://www.bioconductor.org/>. [Электронный ресурс].
- 3 *Gould J.* GENE-E. — URL: <http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/>. [Электронный ресурс].
- 4 *Gould J.* morpheus.js. — URL: <https://clue.io/morpheus.js/>. [Электронный ресурс].
- 5 *Foundation N.* Node.js. — URL: <https://nodejs.org/>. [Электронный ресурс].
- 6 *Jeroen O.* OpenCPU. — URL: <https://www.opencpu.org/>. [Электронный ресурс].
- 7 *Biotechnology Information N. C. for.* Gene Expression Omnibus. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. [Электронный ресурс].
- 8 *Davis S., Meltzer P.* GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor // *Bioinformatics*. — 2007. — Т. 14. — С. 1846–1847.
- 9 *Hykes S.* Docker. — URL: <https://www.docker.com>. [Электронный ресурс].
- 10 *Docker I.* Docker Hub. — URL: <https://hub.docker.com/>. [Электронный ресурс].
- 11 *GitHub.* GitHub. — URL: <https://github.com/>. [Электронный ресурс].
- 12 *Atlassian.* Bitbucket. — URL: <https://bitbucket.org/>. [Электронный ресурс].
- 13 *Developers G.* Protocol Buffers. — URL: <https://developers.google.com/protocol-buffers/>. [Электронный ресурс].
- 14 *Institute N. C.* Mutation Annotation Format. — URL: <https://wiki.nci.nih.gov/display/TCGA/Mutation+Annotation+Format+%28MAF%29+Specification/>. [Электронный ресурс].

- 15 GCT. — URL: <http://software.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/file-formats-guide#GCT/>. [Электронный ресурс].
- 16 Gene Matrix Transposed file format. — URL: [http://software.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/Data\\_formats#GMT:\\_Gene\\_Matrix\\_Transposed\\_file\\_format\\_.28.2A.gmt.29/](http://software.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/Data_formats#GMT:_Gene_Matrix_Transposed_file_format_.28.2A.gmt.29/). [Электронный ресурс].
- 17 *Insitute N. C. The Cancer Genome Atlas.* — URL: <https://cancergenome.nih.gov/>. [Электронный ресурс].
- 18 Asynchronous JavaScript and XML. — URL: <http://api.jquery.com/jquery.ajax/>. [Электронный ресурс].
- 19 *dcode. Protocol Buffers for JavaScript (& TypeScript).* — URL: <https://github.com/dcodeIO/ProtoBuf.js/>. [Электронный ресурс].
- 20 *Plotly. plotly.* — URL: <https://plot.ly/company/team/>. [Электронный ресурс].
- 21 Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor / Huber [и др.] // *Nature Methods*. — 2015. — Т. 12, № 2. — С. 115–121. — URL: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v12/n2/full/nmeth.3252.html>.
- 22 *Falcon S., Morgan M., Gentleman R. An Introduction to Bioconductor's ExpressionSet Class.* — 2006. — URL: <https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/Biobase/inst/doc/ExpressionSetIntroduction.pdf>. [Электронный ресурс].
- 23 *Ooms J. protolite: Fast and Simple Object Serialization to Protocol Buffers.* — URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/protolite/index.html/>. [Электронный ресурс].
- 24 *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies / M. E. Ritchie [и др.] // Nucleic Acids Research.* — 2015. — Т. 43, № 7. — e47.
- 25 *R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing / R Foundation for Statistical Computing.* — Vienna, Austria, 2017. — URL: <https://www.R-project.org/>.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А. ПРОТОКОЛ СЕРИАЛИЗАЦИИ В PROTOBUF

R-пакет protolite использует стандартный протокол сериализации, представленный на листинге А.1. Этот же протокол было решено использовать и при сериализации на клиенте для однообразия и для корректного разбора сообщений как на клиенте от сервера, так и на сервере от клиента.

```

1 package rexp;
2
3 option java_package = "org.godhuli.rhipe";
4 option java_outer_classname = "REXPProtos";
5
6 message REXP {
7     enum RClass {
8         STRING = 0;
9         RAW = 1;
10        REAL = 2;
11        COMPLEX = 3;
12        INTEGER = 4;
13        LIST = 5;
14        LOGICAL = 6;
15        NULLTYPE = 7;
16        NATIVE = 8;
17    }
18    enum RBOOLEAN {
19        F=0;
20        T=1;
21        NA=2;
22    }
23
24    required RClass rclass = 1;
25    repeated double realValue = 2 [packed=true];
26    repeated sint32 intValue = 3 [packed=true];
27    repeated RBOOLEAN booleanValue = 4;
28    repeated STRING stringValue = 5;
29
30    optional bytes rawValue = 6;
31    repeated CMPLX complexValue = 7;
32    repeated REXP rexpValue = 8;
33
34    repeated string attrName = 11;
35    repeated REXP attrValue = 12;
36    optional bytes nativeValue = 13;
37 }
38 message STRING {
39     optional string strval = 1;
40     optional bool isNA = 2 [default=false];
41 }
42 message CMPLX {
43     optional double real = 1 [default=0];
44     required double imag = 2;
45 }

```

Листинг А.1 – Протокол сериализации R-пакета protolite

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б. DOCKERFILE

```

1 FROM ubuntu
2 RUN apt-get -y update && apt-get -y dist-upgrade && apt-get -y install \
3     software-properties-common \
4     git \
5     libcairo2-dev \
6     libxt-dev \
7     libssl-dev \
8     libssh2-1-dev \
9     libcurl4-openssl-dev \
10    apache2 \
11    locales && \
12    apt-add-repository -y ppa:opencpu/opencpu-1.6 && \
13    apt-get -y update && apt-get -y install opencpu-lib
14
15 RUN touch /etc/apache2/sites-available/opencpu2.conf
16 RUN printf "ProxyPass /ocpu/ http://localhost:8001/ocpu/\nProxyPassReverse /ocpu/\n" >> /etc/apache2/sites-available/opencpu2.conf
17 RUN a2ensite opencpu2
18
19 RUN sh -c 'echo "deb http://cran.rstudio.com/bin/linux/ubuntu trusty/" >> /etc/apt/sources.list'
20 RUN gpg --keyserver keyserver.ubuntu.com --recv-key E084DAB9
21 RUN gpg -a --export E084DAB9 | apt-key add -
22 RUN apt-get -y update && apt-get -y install \
23     r-base \
24     libprotobuf-dev \
25     protobuf-compiler \
26     r-cran-xml
27
28 RUN git clone --recursive https://github.com/ctlab/phantasus /root/phantasus
29 RUN cp -r /root/phantasus/inst/www/phantasus.js /var/www/html/phantasus
30 RUN R -e 'source("https://bioconductor.org/biocLite.R"); install.packages("XML", repo = "http://cran.gis-lab.info"); biocLite("Biobase"); biocLite("limma"); biocLite("org.Mm.eg.db")'
31 RUN R -e 'install.packages("devtools", repo = "http://cran.gis-lab.info"); library(devtools); install_github("hadley/scales"); install_github("assaron/GEQuery"); install("/root/phantasus")'
32
33 RUN a2enmod proxy_http
34 EXPOSE 80
35 EXPOSE 443
36 EXPOSE 8004
37 RUN locale-gen en_US.UTF-8
38 ENV LANG en_US.UTF-8
39 ENV LANGUAGE en_US:en
40 ENV LC_ALL en_US.UTF-8
41
42 RUN mkdir -p /var/phantasus/cache
43 VOLUME ["/var/phantasus/cache"]
44
45 CMD service apache2 start && \
46     R -e 'opencpu::opencpu$start(8001)' && \
47     tail -F /var/log/opencpu/apache_access.log

```

Листинг Б.1 – Dockerfile для Docker-образа веб-приложения phantasus