

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET ELEKTROTEHNIKE I RAČUNARSTVA

ZAVRŠNI RAD br. 2324

**Orthobalancer: aplikacija za
kreiranje skupova bioloških vrsta
usporedive taksonomske širine**

Ivan Slijepčević

Zagreb, lipanj 2012.

*Umjesto ove stranice umetnite izvornik Vašeg rada.
Da biste uklonili ovu stranicu obrišite naredbu \izvornik.*

zahvale

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Teoretski uvod	2
2.1. Homologija proteina	2
3. Podaci	3
3.1. FASTA format	3
3.2. Neredundantna baza	3
3.3. Taksonomsko stablo živog svijeta	4
3.4. Ulaz	4
3.5. Izlaz	4
4. Implementacija	6
4.1. Cjevovod	6
4.2. Nalaženje zajedničkih vrsta	11
4.3. Web aplikacija	12
4.4. sinkronizacija ulaza	16
5. Rezultati	17
6. Zaključak	18
Literatura	19

1. Uvod

automatizacija (posla kroz cjevovod->treba ići u neko uvodno poglavlje o namjeri)

robusnost

2. Teoretski uvod

ključna uloga proteina

srodnost / evolucija / otkrivanje

2.1. Homologija proteina

Homologija u biološkom smislu predstavlja slične osobine među vrstama na različitim razinama organizacije života, poput organa, tkiva, stnice ili molekule. Homologne osobine uočene među jedinkama različitih vrsta obično upućuju na zajedničke pretke tih vrsta u evoluciji. Međutim, u molekularnoj biologiji termin homolog se često koristi i za naznačavanje sličnosti, bez obzira na genetsko srodstvo [1]

Za homologne sekvence proteina kažemo da su ortologne kad su direktni potomci neke sekvence u zajedničkom pretku, bez da su prošle duplikaciju gena. Drugim riječima, ortologne sekvence se mogu naći u jedinkama različitih vrsta, a obavljaju istu funkciju u svim tim vrstama. Paralogne sekvence su homologne sekvence koje su nastale od dvije različite kopije nekog gena koji je prošao kroz proces duplikacije gena u nekom zajedničkom evolucijskom pretku. Paralozima se mogu naći u jedinkama jedne ili više vrsta te obavljaju slične funkcije.

chart ortho-para

ideja...

3. Podaci

Orthobalancer radi sa primarnim proteinskim strukturama — sekvencama reziduuma, odnosno aminokiselina. Za zapis sekvenci koristi se standardizirani FASTA format. Orthobalancer za svoj rad koristi dvije NCBI-jevih¹ baza podataka od kojih jedna sadrži sekvence formatirane u FASTA format, a druga taksonomsko stablo živog svijeta.

3.1. FASTA format

FASTA je jedan od standardnih formata zapisa genetskih informacija na računalu. Format je tekstualnog oblika, a koristi se u NCBI-jevim alatima i bazama podataka, poput BLAST-a i neredundantne baze proteinskih sekvenci. Jedan zapis u datoteci s FASTA sekvencama se sastoji od zaglavlja i sekvence. Zaglavlje je jedan redak koji započinje s znakom '>' te nakon njega može imati razne informacije koje opisuju dan zapis. Zapisi proteinskih sekvenci u NCBI-jevoj neredundantnoj bazi obično imaju jedinstveni ključ sekvence, ime proteina, ime vrste u kojoj se protein nalazi, podatke o originalnoj bazi i slično. Nakon zaglavlja slijede retci koji sadrže zapisanu sekvencu gdje svaki znak predstavlja jedan reziduum aminokiseline u peptidnom lancu. Kad bi ti se retci slijepili zajedno, dobila bi se sekvenca u jednom nizu. Prazne linije nisu dopuštene.

3.2. Neredundantna baza

Neredundantna baza je baza podataka koju nudi NCBI, a sadrži prikupljene zapise iz nekoliko baza sa raznih instituta u svijetu, poput GenPept, Swissprot, PIR, PDF, PDB i NCBI RefSeq. Za neredundantnu bazu se garantira da ne sadrži dvije jednake sekvence, već se one tada spajaju u jedan FASTA zapis sa proširenim zaglavljem.

¹National Center for Biotechnology Information

3.3. Taksonomsko stablo živog svijeta

Taxonomy baza, odnosno baza taksonomskog stabla živog svijeta dostupna je u obliku nekoliko tekstualnih datoteka. Najbitnije, koje se koriste u Orthobalanceru su *nodes.dmp* i *names.dmp*. Za svaki čvor stabla, *nodes.dmp* sadrži identifikacijski broj čvora, identifikacijski broj roditelja te niz dodatnih informacija, poput ranga ovog čvora u stablu (carstvo, rod, vrsta, ...). *names.dmp* za svaki čvor čuva niz raznih imena, od kojih je jedno jedinstveno, odnosno znanstveno, a ostala su prisutna za lakše raspoznavanje od strane čovjeka.

3.4. Ulaz

Aplikacija kao ulaz prima nekolicinu paralognih proteina u FASTA formatu. Ako korisnik posjeduje samo sekvencu proteina, može ju zadati bez FASTA zaglavlja, no u tome je slučaju dužan dati ime unesenoj sekvenci. Nužno je imati ime za svaki ulazni paralog te je nužno da su sva međusobno jedinstvena.

Dodatno, korisnik može specificirati čvorove taksonomskog stabla za čija podstabla smatra da sadrže zamjenjive vrste. Ponuđen je i osnovni skup zamjenskih čvorova za koje se vjeruje da bi mogli biti od koristi korisniku.

3.5. Izlaz

Web aplikacija za završetak izvođenja prikazuje tablicu balansiranih vrsta. Stupci tablice su imenovani po paralozima s ulaza. Retci su grupirani u zamjenske čvorove. Svaki redak predstavlja jedan balansirani skup vrsta. U stupcu pod pojedinim paralogom nalazi se ortologna vrsta, a lijevo od svih vrsta je zapisan čvor na kojem su vrste tog retka balansirane. Primjer tablice se može vidjeti naslici 3.1.

Također, završna stranica sadrži poveznice za preuzimanje generiranih datoteka tijekom izvođenja. Datoteke su opisane u nastavku.

Exchangeable nodes	Balanced node	CAL1	COF1
Mammalia	Ornithorhynchus anatinus	Ornithorhynchus anatinus	Ornithorhynchus anatinus
	Monodelphis domestica	Monodelphis domestica	Monodelphis domestica
	Equus caballus	Equus caballus	Equus caballus
	Canis lupus familiaris	Canis lupus familiaris	Canis lupus familiaris
	Ailuropoda melanoleuca	Ailuropoda melanoleuca	Ailuropoda melanoleuca
	Ovis aries	Ovis aries	Ovis aries
	Bos taurus	Bos taurus	Bos taurus
	Sus scrofa	Sus scrofa	Sus scrofa
	Callithrix jacchus	Callithrix jacchus	Callithrix jacchus
	Macaca fascicularis	Macaca fascicularis	Macaca fascicularis
	Macaca mulatta	Macaca mulatta	Macaca mulatta
	Nomascus leucogenys	Nomascus leucogenys	Nomascus leucogenys
	Pan troglodytes	Pan troglodytes	Pan troglodytes
	Homo sapiens	Homo sapiens	Homo sapiens
	Pongo abelii	Pongo abelii	Pongo abelii
	Primates	Otolemur garnettii	Papio anubis
	Oryctolagus cuniculus	Oryctolagus cuniculus	Oryctolagus cuniculus
	Mus musculus	Mus musculus	Mus musculus
	Rattus norvegicus	Rattus norvegicus	Rattus norvegicus
	Eutheria	Mustela putorius furo	Mus spretus
Sauropsida	Gallus gallus	Gallus gallus	Gallus gallus
	Taeniopygia guttata	Taeniopygia guttata	Taeniopygia guttata
	Squamata	Anolis carolinensis	Gekko japonicus
Actinopterygii	Salmo salar	Salmo salar	Salmo salar
	Osmerus mordax	Osmerus mordax	Osmerus mordax
	Esox lucius	Esox lucius	Esox lucius
	Epinephelus coioides	Epinephelus coioides	Epinephelus coioides
	Tetraodon nigroviridis	Tetraodon nigroviridis	Tetraodon nigroviridis
	Percomorpha	Sparus aurata	Anoplopoma fimbria
	Danio rerio	Danio rerio	Danio rerio
	Clupeocephala	Ictalurus punctatus	Oncorhynchus mykiss
	Ancestral node	unbalanced	
	Percomorpha	Dicentrarchus labrax	
Amphibia	Xenopus (Silurana) tropicalis	Xenopus (Silurana) tropicalis	Xenopus (Silurana) tropicalis
	Xenopus laevis	Xenopus laevis	Xenopus laevis
unclassifiable homologues		synthetic construct	
		Saccoglossus kowalevskii	
		Trichoplax adhaerens	

Slika 3.1: Izlazna tablica sa web stranice Orthobanalcera

4. Implementacija

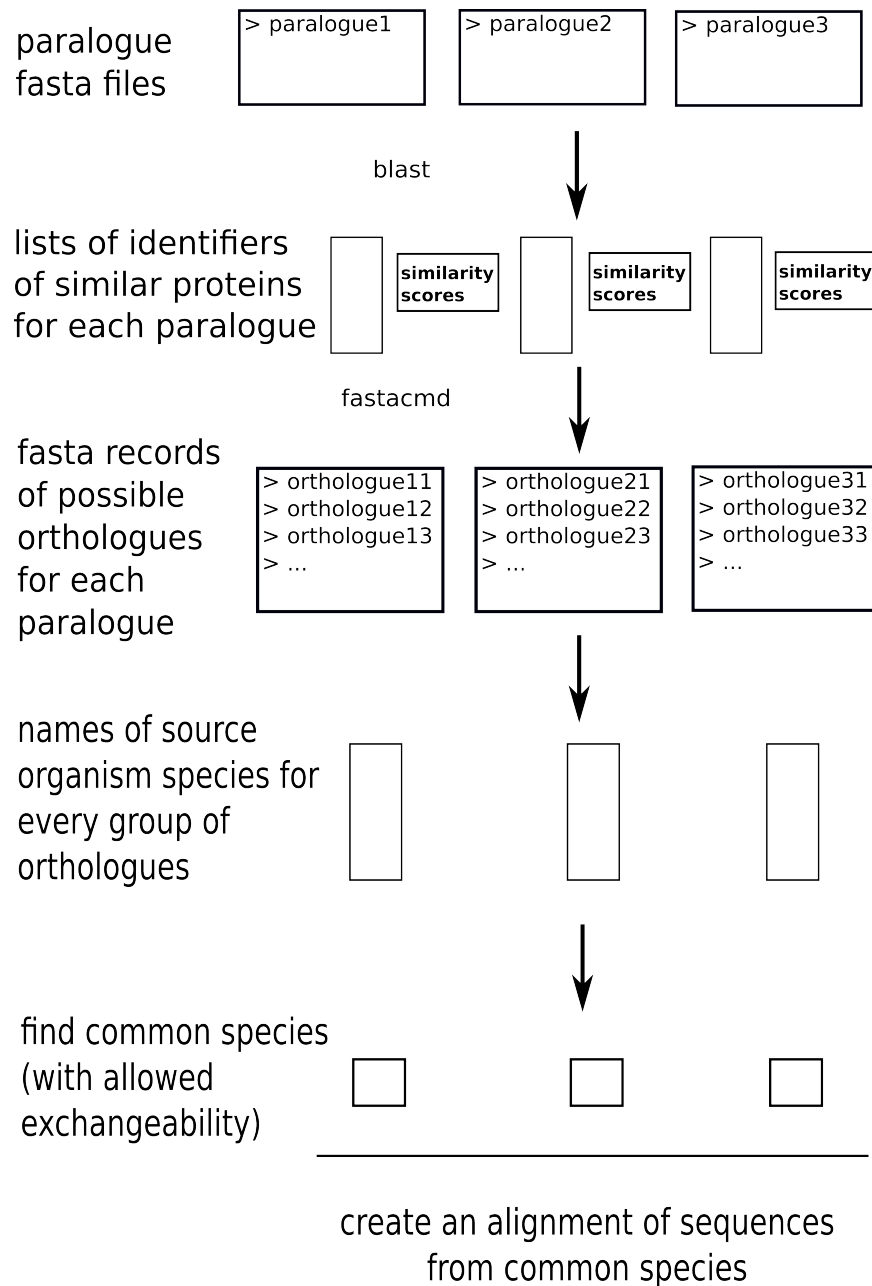
Aplikacija je pisana u programskom jeziku Python verzije 2.7. Aplikacija se dijeli u nekoliko zasebnih cjelina. U središtu aplikacije nalazi se cjevovod koji poziva alate poput BLAST-a i fastacmd-a za komuniciranje sa NCBI-jevom neredundantnom bazom, zatim dio aplikacije za odabir i balansiranje vrsta na taksonomskom stablu te alat mafft[2] za poravnanje sekvenci. Pored cjevovoda implementirana je web aplikacija kao korisničko sučelje za cijeli program. Web aplikacija je implementirana koristeći Flask microframework, dok su operacije na klijentskoj strani implementirane u javascriptu uz korištenje biblioteke jQuery.

4.1. Cjevovod

Cjevovod je arhitektonski programski obrazac u kojem prolaze kroz filtre koji su postavljeni jedan za drugim. Time se simulira jedan tok koji ulazne podatke transformacijom kroz filtre generira izlazne podatke. U ovome projektu cjevovodna arhitektura je samo logički kostur koji se enkapsulira unutar razreda *Pipeline*. Iako je u začetku razvoja aplikacije svaki filter bio zaseban proces, vrlo ubrzo je ustanovljeno kako većina filtera generira podatke koji su potrebni na raznim mjestima u cijeloj aplikaciji te se činilo lakše imati sve podatke u memoriji pojedinog cjevovoda. To je omogućilo da razred *Pipeline* naslijedi razred *Thread* iz modula *threading* te se može pozivati kao zasebna dretva.

Tok cjevovoda se može vidjeti na slici 4.1. Ulaz u cjevovod predstavljaju paralogni proteini u FASTA formatu koje zadaje korisnik. Ti se podaci zadaju pri stvaranju objekta *Pipeline* kako bi se mogli zapisati na disk u direktorij vezan za instancu *Pipeline-a*. Stvarni objekt kojeg prima konstruktor *Pipeline-a* je rječnik prilagođen uporabi web aplikacije, što je detaljnije opisano u odjeljku 4.3.

Pri pokretanju cjevovoda za svaku se od unesenih sekvenci stvara objekt razreda *ProteinHolder* prilikom čega se obavljaju pozivi filtera nezavisnih za svaku pojedinu sekvencu. Prvi filter koji se koristi je alat *BLAST* te je izveden kao poziv zasebnog



Slika 4.1: Protok podataka kroz cjevovod. Prikazuju se podaci rađe nego filtri radi boljeg uvida u rad cjevovoda

izvršnog programa *blastall* na sljedeći način:

```
blastall -p blastp -i <ulaz-FASTA> -d <nr-baza> -m 8 -a <broj-dretvi>
```

Argument *p* s parametrom *blastp* označava programu da se koristi algoritam za uspoređivanje jedne ulazne sekvence amino kiselina sa bazom proteinskih sekvenci. S argumentom *i* se zadaje put do ulazne datoteke s FASTA sekvencom. Nadalje, argument *d* prima put na disku do NCBI-jeve neredundantne baze sekvenci koja je prethodno

formatirana za pretraživanje sekvenci u FASTA formatu. Argument *m* određuje format ispisa koji generira *blastall*, a parametar 8 označava tabularni ispis bez dodatnih komentara koji je pogodan za parsiranje. Konačno, argument *a* upućuje *blastall* na broj dretvi koji treba koristiti kako bi se ubrzalo njegovo izvođenje. Broj dretvi se u Orthobalanceru može postaviti prilikom instalacije.

Izlaz koji generira *BLAST* predstavlja informacije o sekvencama sličnim ulaznoj sekvenci, odnosno informacije o potencijalnim ortolozima za ulazni paralog. Svaki redak, između ostalih, sadrži dvije bitne informacije: jedinstveni ključ sekvence u neredundantnoj bazi — gi-broj — te ocjenu sličnosti ulaznome paralogu. Nakon parsiranja tog izlaza ocjene sličnosti se spremaju za kasniju upotrebu, a gi-brojevi se zapisuju u privremenu datoteku za sljedeći korak u cjevovodu.

Sljedeći filter je izvršni program *fastacmd* koji za svaki gi-broj pronalazi i ispisuje sekvencu u FASTA formatu, također koristeći NCBI-jevu neredundantnu bazu. Program se poziva ovako:

```
fastacmd -i <ulaz> -d <nr-baza>
```

Budući da program *fastacmd* dolazi u paketu zajedno sa *BLAST* alatima, argumenti imaju sličnu konotaciju kao i za *blastall*: s argumentom *i* se zadaje ulazna datoteka, a s *d* put do neredundantne baze.

Izlaz *fastacmd*-a se parsira pomoću razreda *FastaRecord*. Svaka dobivena sekvenca kao kandidat za ortologa dobiva instancu razreda *FastaRecord* u kojoj je sadržana sekvenca te sve bitne informacije iz zaglavlja pojedinog FASTA zapisa. Dodatno, instanci *FastaRecord* se pridružuje ocjena sličnosti sekvence koju opisuje prema ulaznom paralogu. Kako bi bilo lakše objasniti što je preuzeto iz zaglavlja pojedinog FASTA zapisa, bitno je imati na umu strukturu neredundantne baze što je objašnjeno u poglavlju 3. Naime, ako je za nekoliko proteina zabilježeno da imaju identičnu sekvencu, tada će zaglavlje takve FASTA sekvence u neredundantnoj bazi sadržavati spojene podatke o navedenim proteinima. Zato objekt razreda *FastaRecord* sadrži listu elemenata zaglavlja, gdje se svaki od tih elemenata opisuje n-torkom (gi-broj elementa, ime vrste, ime proteina, zastavica: najbolja sekvenca za ovaj gi-broj). Iako je poznato da neredundantna baza sadrži sekvence sakupljene iz raznih baza što implicira činjenicu da zaglavlja pojedinih sekvenci ne moraju imati identičan oblik, uočeno je određeno pravilo po kojem *fastacmd* ispisuje sekvence te se ono koristi kao heuristika ugrađena u parser. Pretpostavljeni oblik pojedinog elementa zaglavlja je sljedeći:

```
>gi|"gi-broj"|nebitne-informacije IME PROTEINA  
[IME VRSTE]nebitna-informacija.
```

Na primjer:

```
>gi|344243907|gb|EGW00011.1| Cofilin-1 [Cricetulus griseus]
```

Na kraju obrade podataka za pojedini paralog s ulaza prolazi se listom svih objekata FastaRecord te se za svaku pronađenu vrstu odabire sekvenca s najboljom ocjenom sličnosti. Time nastaje jedan podskup sekvenci za koje možemo reći da predstavljaju grupu ortologa za dani paralog.

Nakon što je svaki paralog opisan jednim objektom razreda *ProteinHolder* potrebno je odrediti postoji li koji gi-broj koji se može pronaći u grupama ortologa različitih paraloga. Donesena je odluka kako to svojstvo nije poželjno jer jedan te isti protein ne želimo imati kao predstavnika neke vrste u različitim grupama ortologa. Za potrebe ove funkcionalnosti dodani su razredi *BestScore* i *BestScoreCollection*. Razred *BestScore* sadrži informaciju koja upućuje u kojoj se grupi ortologa, na kojem FASTA zapisu te sa kojim elementom zaglavlja FASTA zapisa nalazi najbolje ocijenjena sekvenca za dani gi-broj identifikator. Razred *BestScoreCollection* služi kao sučelje za korištenje rječnika najboljih sekvenci, a nudi metode za ažuriranje rječnika kandidata za najbolje sekvence te metodu za dohvat trenutno postavljene najbolje instance razreda *BestScore*. Skica algoritma za pronalazak najbolje ocijenjenih dana je algoritmom 1. Nakon provedbe algoritma nepoželjni proteini imaju spuštenu zastavicu najbolje sekvence za svoj gi-broj te se ne razmatraju u nastavku programa.

Ovdje bi se još mogla dodati funkcionalnost kojom bi se za vrstu kojoj je protein odbačen pronašao sljedeći najbolji nezauzeti protein, no to nije razmatrano. Za takve slučajeve ne može se sa sigurnošću reći jesu li kodirajući geni doista ortološki ili se u nekoj roditeljskoj vrsti gen duplicirao te se sa takvim nejednoznačnostima aplikacija ne bavi.

Najbitniji korak u cjevovodu je pronalaženje i balansiranje zajedničkih vrsta na stablu taksonomije živog svijeta. Ovaj korak je detaljno opisan u odjeljku 4.2. Ovom se filtru kao ulaz predaju kompletni opisnici proteina, odnosno objekti razreda *ProteinHolder* iz kojih sam filter povlači sve potrebne informacije. Nakon što završi obrada, izlaz filtra je predodčen višeslojnim rječnikom koji razdvaja podatke po sljedećim slojevima: grupe ortologa, grupe zamjenskih čvorova u taksonomskom stablu, grupe balansiranih čvorova u taksonomskom stablu te su zadnje vrijednosti balansirane vrste.

Zadnji korak u cjevovodu prije zapisivanja svih skupljenih podataka na disk je poravnanje sekvenci dobivenih kao izlaz programa *fastacmd*. Za poravnanje se koristi alat *mafft*[2] te mu je ulaz datoteka sa zapisanim sekvencama u FASTA formatu, a izlaz datoteka sa istim, ali poravnatim sekvencama. *mafft* se poziva na sljedeći način:

Algorithm 1 Nalaženje najbolje ocijenjenih proteina

```
1: function PROTEINHOLDER::IZRAČUNAJNAJOCJENE
2:   ocjene  $\leftarrow$  BestScoreCollection()
3:   for all fastaRecord  $\in$  this.records do
4:     for all element  $\in$  fastaRecord.elementiZaglavljaja do
5:       ocjena  $\leftarrow$  BestScore(element)
6:       ocjene.auriraj(ocjena, fastaRecord.ocjena)
7:     end for
8:   end for return ocjene
9: end function
10: function PROTEINHOLDER::PROPAGIRAJ(najOcjene)
11:   for all fastaRecord  $\in$  this.records do
12:     for all element  $\in$  fastaRecord.elementiZaglavljaja do
13:       najOcjena  $\leftarrow$  najOcjene.dohvati(element['gid'])
14:       if  $\neg$ najOcjena.provjeriElement(element) then
15:         element['zastavicaNajbolji']  $\leftarrow$   $\perp$ 
16:       end if
17:     end for
18:   end for
19: end function
20: function PRONAĐINAJOCJENE(proteinHolders) ▷ funkcija je isječak iz
   cjevovoda
21:   najOcjene  $\leftarrow$  newBestScoreCollection()
22:   for all protein  $\in$  proteinHolders do
23:     ocjene  $\leftarrow$  protein.izraunajNajOcjene()
24:     najOcjene.aurirajKolekcijom(ocjene)
25:   end for
26:   for all protein  $\in$  proteinHolders do ▷ propagacija najboljih ocjena
27:     protein.propagiraj(najOcjene)
28:   end for
29: end function
```

`mafft --auto <ulaz> > <izlaz>`

Argument `--auto` upućuje *mafft* da automatski odabere najbolju strategiju poravnavanja sekvenci, uzimajući u obzir veličinu podataka. Izlaz se direktno preusmjerava u novu datoteku na disk jer poravnate sekvence nisu potrebne u memoriji.

4.2. Nalaženje zajedničkih vrsta

Pronalazak zajedničkih vrsta najbitniji je modul Orthobalancera. U suštini, ovaj modul nije logički vezan za nalaženje ortologa, no za potrebe Ortobalancera je svojim sučeljima prilagođen njegovom cjevovodu. Nalaženje zajedničkih vrsta među skupovima ulaznih vrsta predstavlja jednu novu dimenziju u pronalasku ortolognih proteina. Konvencionalno traženja ortologa[? ?] jest kvalitetnije jer se pretraživanje odvija na razini sekvence, ali je moguće samo za genome koji su u potpunosti istraženi i zapisani u baze podataka.[?] Podizanje potrage za ortolozima na razinu vrsta omogućava da se ortolozi pronađu i među vrstama čiji genomi nisu još zabilježeni.

Ovaj modul za svoj rad koristi podatke iz NCBI-jeve *Taxonomy* baze. Koristi se čvorovi taksonomskog stabla živog svijeta i znanstvena imena pridijeljena čvorovima. Čvorovi su identificirani svojim jedinstvenim identifikatorima *tax_id*, a svaki čvor ima pridruženo jedno ili više korištenih imena. Samo jedno od tih imena je označeno kao znanstveno i također je jedinstveno za svaki čvor, uz neke iznimke poput sintetički stvorenih vrsta koje dijele znanstveno ime *Synthetic construct*. Datoteke koje sadrže podatke iz ovih baza su prilično velike te njihovo učitavanje, prilagođavanje i korištenje najviše utječe na trajanje izvođenja programa.

Na početku rada modula svi podaci se prilagođavaju za potrebe modula. Iz cjevovoda se od svake instance *ProteinHolder*-a uzimaju zabilježene vrste, a iz popisa zamjenjivih čvorova koje zadaje korisnik se prikupljaju svi zadani čvorovi. Svim prikupljenim imenima se tada pridružuje *tax_id* iz baze.

Nakon toga se gradi taksonomsko stablo u memoriji. Stablo je izvedeno kao veliki rječnik kojem za ključeve koristi *tax_id*, a svaki čvor je objekt razreda *Node*. Razred *Node* sadrži sljedeće bitne podatke: *tax_id* roditeljskog čvora, listu djece, brojač za svaku grupu ortologa, ukupni brojač grupa, listu zamjenskih roditeljskih čvorova te zastavicu je li balansiran. Brojači se inicijaliziraju na nulu, a kasnije tijekom algoritma će koristiti kao broj vrsta pojedine grupe ortologa koje se nalaze pod danim čvorom. Ukupni brojač grupa govori koliko ortolognih grupa ima svoga predstavnika pod nekim čvorom. Lista zamjenskih roditeljskih čvorova se inicijalizira na praznu listu, a bit će popunjena svim čvorovima koji su od korisnika označeni kao zamjenski te se nalaze iznad trenutno razmatranog čvora. Zastavica za balansiranje koristi se kasnije tijekom postupka balansiranja podstabala ispod zamjenskih čvorova. Algoritam je opisan u nastavku, a dan je i njegov pseudokod 2.

Sljedeći koraci predstavljaju inicijalizaciju stabla. Najprije se za svaku ortolognu grupu prolazi kroz sve vrste. Za svaku vrstu pronalazi se njen čvor, odnosno list u

stablu. Brojač tog lista za trenutnu ortolognu grupu se inicijalizira na 1. Istovremeno se ukupni brojač grupa u tome listu postavi na 1 te se pozove metoda koja propagira ukupni brojač grupa sve do korijena stabla, pazeći da ukupni brojač niti u jednom čvoru ne bude više od jednom povećan za neku grupu ortologa.

Nakon toga treba inicijalizirati zamjenske čvorove i pripadna podstabla. Za svaki zamjenski čvor poziva se rekurzivna funkcija koja se spušta do listova i svakome čvoru u njegovu listu zamjenskih roditeljskih čvorova dodaje *tax_id* zamjenskog čvora nad kojim je rekurzija pozvana. Time svaki čvor sadrži informaciju kojim zamjenskim podstablama pripada.

Sljedi algoritam 2. Algoritam rekurzivno prolazi stablom, polazeći od listova. U zamjenskim podstablama balansira grupe ortologa na sljedeći način. Nakon što se običu listovi, svaki čvor, za svaku od grupa ortologa, postavlja svoj brojač za tu grupu na vrijednost zbroja brojača svoje djece, pri čemu se od djece ne razmatraju već balansirani čvorovi. U slučaju da nijedan brojač u čvoru ne ostane na vrijednosti 0, čvor se proglašava balansiranim. Drugim riječima, u svakoj grupi ortologa postoji barem jedna vrsta ispod toga čvora te se one mogu ispisati kao uparene ili zamjenjive vrste. U idealnom, ali i najčešćem slučaju, desit će se da je vrsta prisutna u svim grupama ortologa te će tada sam čvor promatrane vrste biti proglašen balansiranim i roditelji ga zbog toga neće razmatrati. Za primjenu nalaženja ortolognih proteina to bi značilo da neka vrsta, na primjer *Homo sapiens*, sadrži ortologni protein svakome od ulaznih parologa. Algoritam je tako osmišljen kako bi se balansirale što srodnije vrste. Što se tiče dijelova stabla koji nisu pod niti jednim zamjenskim čvorom, algoritam ne provodi postupak balansiranja te se u izlaz dodaju jedino one vrste koje su prisutne u svim grupama ortologa. Izlaz ovog algoritma vraća se pozivatelju, odnosno cjevovodu.

4.3. Web aplikacija

Korisničko sučelje Orthobalancera ostvareno je kao web aplikacija implementirana također u Pythonu koristeći Flask microframework. Flask je izgrađen na Werkzeug WSGI¹ web alatu i Jinja2 sustavu predložaka. Flask je zvan *microframeworkom* jer svoju jezgru drži jednostavnom, ali proširivom. Flask također nudi određene konvencije koje pojednostavljaju izgradnju web aplikacije. Osim Flaska, za razvoj aplikacije korišten je javascript uz većinu koda napisanu pomoću biblioteke jQuery. Osim za asinkronu komunikaciju s poslužiteljem pomoću AJAX-a², javascript se najviše koris-

¹Web Server Gateway Interface[?]

²Asynchronous JavaScript and XML

Algorithm 2 Obilazak stabla — balansiranje vrsta

```
1: algoritam obilaska počinje funkcijom obidiStablo()
2: ULAZ : korijenski čvor stabla;  $n$  skupova vrsta
3: IZLAZ : višeslojni rječnik izlaz koji za svaki balansirani čvor sadrži listu vrsta
   predstavnica iz svake grupe  $g$ 
4: function BALANSIRAJ(cvor, grupe)
5:   izlaz  $\leftarrow$  new izlaz
6:   for all dijete  $\in$  cvor.djeca do
7:     izlaz  $\leftarrow$  izlaz  $\cup$  balansiraj(dijete, grupe)
8:     if  $\neg$ dijete.balansiran then
9:       for all  $g \in$  grupe do
10:        cvor.brojac[ $g$ ]  $\leftarrow$  cvor.brojac[ $g$ ] + dijete.brojac[ $g$ ]
11:      end for
12:    end if
13:  end for
14:  if cvor.brojac[ $g$ ] > 0  $\forall g \in$  grupe then
15:    cvor.balansiran  $\leftarrow$   $\top$ 
16:    if  $\exists k \forall g \in$  grupe (cvor.brojac[ $g$ ] =  $k$ ) then
17:       $A \leftarrow$  skup svih pripadajućih vrsta pod cvorom cvor
18:      izlaz.pridruzi( $A$ )
19:    else
20:       $n \leftarrow \min\{\text{brojac}[g] \in \text{cvor}\}$ 
21:       $R \leftarrow \forall g \in$  grupe odaberi  $n$  slučajnih vrsta pod cvorom cvor
22:      izlaz.pridruzi( $R$ )
23:    end if
24:  end if
25:  return izlaz
26: end function
```

tio za postizanje dinamike te robusnosti provjere i sinkronizacije ulaznih podataka.

HTML³ stranice koje aplikacija generira bazirane su na Jinja2 predlošcima. Jedno od njihovih pogodnih svojstava je nasljeđivanje predložaka. Time se omogućuje da postoji jedan temeljni predložak koji sadrži osnovne elemente svake stranice, a ostali samo nasljeđuju te elemente i popunjavaju potrebni sadržaj. HTML predlošci Ortho-balancera su sljedeći:

³HyperText Markup Language

```

27: function OBIDISTABLO(cvor, grupe)
28:   if cvor.zamjenski() then      ▷ vraća  $\top$  ako je čvor u zamjenskom podstablu
29:     return balansiraj(cvor, grupe)
30:   else
31:     if cvor.list() then          ▷ vraća  $\top$  ako je čvor list
32:       for all  $g \in \textit{grupe}$  do
33:         izlaz[ $g$ ]['nezamjenski']  $\leftarrow$  cvor.ime
34:       end for
35:     else
36:       izlaz  $\leftarrow$  new izlaz
37:       for all dijete  $\in$  cvor.djeca do
38:         if dijete.ukupniBrojac = cvor.ukupniBrojac then
39:           izlaz  $\leftarrow$  izlaz  $\cup$  obidiStablo(dijete, grupe)
40:         end if
41:       end for
42:     end if
43:   end if
44:   return izlaz
45: end function

```

- *layout.html* definira raspored svih elemenata te ga svi ostali predlošci nasljeđuju.
- *input.html* prihvaća ulazne podatke od korisnika. Detaljniji opis mogućnosti koje su ostvarene za ulazne podatke se nalazi u odjeljku. 4.4
- *manipulate_exchangeable.html* je stranica koja se prikazuje samo kada korisnik želi unijeti vlastite zamjenske čvorove taksonomskog stabla. Stranica se otvara s ponuđenim pretpostavljenim skupom zamjenskih čvorova.
- *execution.html* prikazuje trenutno stanje izvođenja, asinkrono komunicirajući sa poslužiteljem, kako bi korisnik imao jasniju predodžbu o zadacima koje poslužitelj obavlja te o trajanju izvođenja. Jednom kada stranica za ispis primi poruku o kraju izvođenja, automatski se preusmjerava na URL **'/output'**.
- *output.html* prikazuje izlaz aplikacije korisniku. Prikazani izlaz je tablica na slici 3.1. Osim tablice, nude se poveznice na niz datoteka za preuzimanje. Izlazne datoteke su opisane u odjeljku 3.5.
- *error.html* se prikazuje ukoliko na poslužitelju dođe do pogreške.

Poslužitelj Orthobalancera se može zamisliti kao stroj stanja kojemu su stanja predočena URL-om⁴. Flask radi tako da veže URL na jednu funkciju Pythona⁵ koristeći mehanizam dekoriranja[?] funkcije kojeg nudi Python. Na taj se način uz svaki URL veže određeni posao koji treba obaviti. Bitniji URL-ovi su sljedeći:

- **’/’** ulazna točka za pokretanje novog upita. Upit dobiva jedinstveni identifikacijski broj te se za njega inicijaliziraju određeni podaci na poslužitelju kao sjednički podaci. Automatski se preusmjerava na **/start**. Od ove točke na dalje svaki URL ima identifikacijski broj upita u svome parametru, što nije posebno naznačeno. Takav je način prenošenja identifikacijskog broja odabran kako bi korisnik samo pomoću URL-a mogao dohvatiti svoje rezultate.
- **’/start’** pozvan za inicijalizirani upit. Generira i vraća HTML stranicu baziranu na predlošku *input.html*.
- **’/finish_input’** poziva se tek u trenutku kad su na klijentskoj strani svi ulazni podaci pravilno uneseni. Podaci su tada već spremljeni u sjedničkim varijablama te se može stvoriti instanca razreda *Pipeline*, odnosno nova dretva cjevovoda. Ovisno o korisnikovom odabiru na stranici *input.html*, sljedeće stanje izvođenja može biti na URL-u **’/get_exchangeable’** ako korisnik želi zadati svoje zamjenske čvorove, odnosno na URL-u **’/preparations’** za pokretanje cjevovoda s predloženim zamjenskim čvorovima.
- **’/preparations’** čita sadržaj datoteke sa predloženim zamjenskim čvorovima, sprema ih u argumente sjednice te se preusmjerava na URL **’/executing’**.
- **’/get_exchangeable’** generira stranicu baziranu na predlošku *manipulate_exchangeable.html* s podacima iz datoteke s predloženim zamjenskim čvorovima.
- **’/save_exchangeable’** sprema korisnikove zamjenske čvorove u argumente sjednice te se preusmjerava na URL **’/executing’**.
- **’/executing’** pokreće rad dretve cjevovoda te generira stranicu baziranu na predlošku *execution.html*.
- **’/output’** generira stranicu iz predloška *output.html* predajući joj sve potrebne informacije dohvaćene iz datoteka koje je stvorio izlaz cjevovoda.

Vrijeme izvođenja posla u cjevovodu može potrajati nekoliko minuta te je zato bilo potrebno osmisliti način kako predočiti korisniku napredak izvođenja u nekom

⁴unified resource locator

⁵view funkcija

trenutku. Rješenje je osmišljeno na način da cjevovod svoj napredak zapisuje u *log* datoteke, a klijent asinkrono traži od poslužitelja sadržaj tih datoteka svakih nekoliko sekundi. Za odvajanje funkcionalnosti ispisa stanja cjevovoda u *log* datoteke iskorišten je Pythonov mehanizam dekoriranja funkcija. Implementirani su razredi *beforeMessage* i *afterMessage* koji imaju funkcionalnost dekoratora. Oba dekoratora imaju argument — ključ rječnika koji sadrži konkretan tekst za ispis u *log* datoteke. *beforeMessage* dekorira funkciju tako da obavlja ispis prije poziva dekorirane funkcije, a *afterMessage* nakon izvršavanja dekorirane funkcije. Oba razreda dekoratora nasljeđuju temeljni dekorator *messagingDecorators* koji sadrži implementaciju samog zapisivanja statusa u *log* datoteke, a izvedeni razredi se samo brinu o načinu dekoriranja.

4.4. sinkronizacija ulaza

Jedan od nužnih preduvjeta za uspješan rad aplikacije jest pažljivo preuzimanje ulaznih podataka uz robusne provjere. S druge strane bitno je omogućiti raznolike načine unošenja podataka za lakše rukovanje aplikacijom. Orthobalancer na ulazu očekuje dvije ili više proteinskih sekvenci od kojih će svaka sadržavati različito ime. Elemente za unos podataka pojedinog proteina na stranici moguće je dodavati dinamički. Sam FASTA zapis se može izravno upisati u površinu za unos teksta, ili se može predati datoteka sa sadržajem FASTA zapisa.

Inicijalna ideja bila je sve provjere implementirati na strani klijenta pomoću javascripta, no budući da javascript nije pogodan za otvaranje sadržaja datoteka odlučeno je da se podaci čuvaju na poslužitelju. Zbog toga je potrebno prilikom svake promjene sadržaja bilo kojeg elementa unosa na stranici sinkronizirati podatke sačuvane u sjedničkim varijablama na poslužitelju sa trenutnim stanjem na stranici koju gleda korisnik. Sinkronizacije se događaju u pozadini asinkronim komuniciranjem klijenta i poslužitelja.

- unos imena, sequence diagram
- brisanje proteina sa stranice (sequence diagram)
- unos FASTA (mislim da ne treba diagram)

5. Rezultati

6. Zaključak

LITERATURA

- [1] Andreas D. Baxevanis. *Bioinformatics and The Internet*. John Wiley & Sons, Inc., 2002. ISBN 9780471223924.
- [2] K. Katoh, K. Kuma, H. Toh, i T. Miyata. Mafft version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.*, 33:511–518, 2005.

**Orthobalancer: aplikacija za kreiranje skupova bioloških vrsta usporedive
taksonomske širine**

Sažetak

Ključne riječi:

**Orthobalancer: web application for creation of taxonomically balanced sets of
orthologous protein sequences**

Abstract

Keywords: