



Universitat Oberta
de Catalunya

Implementació d'una eina en R/Shiny per a l'anàlisi de significació biològica utilitzant l'anàlisi de les rutes

Vasyl Druchkiv
Bioinformàtica i Bioestadística
Estadística y bioinformática

Consultor: Alex Sánchez-Pla
Professor responsable de l'asignatura: Alex Sánchez-Pla

Data d'entrega: 05/06/2017

Copyright © 2019 Vasyl Druchkiv.

Permission is granted to copy, distribute and/or modify this document under the terms of the GNU Free Documentation License, Version 1.3 or any later version published by the Free Software Foundation; with no Invariant Sections, no Front-Cover Texts, and no Back-Cover Texts.

A copy of the license is included in the section entitled "GNU Free Documentation License".

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Títol del treball:	Implementació d'una eina en R/Shiny per a l'anàlisi de significació biològica utilitzant l'anàlisi de les rutes
Nom d'autor:	Vasyl Druchkiv
Nom del consultor:	Alexandre Sánchez Pla
Nom del PRA:	<i>Nombre y dos apellidos</i>
Data d'entrega (mm/aaaa):	06/2019
Titulació:	<i>Bioinformàtica I bioestadística</i>
Àrea del Treball Final:	<i>Anàlisi de dades òmiques</i>
Idioma del trabajo:	Català
Paraules clave	<i>Pathway analysis, R, Shiny</i>
Resum del Treball (máximo 250 palaules): Amb la finalitat, context d'aplicació, metodologia, resultats i conclusions del treball.	
<p>L'objectiu de teball és trobar paquets de Bioconductor i desenvolupar una aplicació Shiny per dur a terme l'anàlisi de les rutes (<i>Pathway analysis</i>). Un <i>Pathway</i> és el conjunt de gens relacionats amb una funció biològica i descriu la relació entre els gens. Primer s'identifiquen els mètodes teòrics actualment presents per trobar i visualitzar les rutes diferencialment expressades. També s'identifiquen les bases de dades per anotar les rutes i els paquets de Bioconductor específics per fer l'anàlisi. D'aquesta manera es crea una aplicació Shiny que ofereix l'anàlisis ORA (Over-representation Analysis), GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) i l'anàlisi de la topografia de les rutes. Els paquetst elegits per a anàlisi de les rutes de Bioconductor són: <i>clusterProfiler</i>, <i>ReactomePA</i> i <i>patview</i>. L'anotació de gens es fa finalment via tres bases de dades: GO (Gene Ontology), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) i Reactome.</p> <p>L'usuari pot seleccionar les ontologies de GO, especificar el nivell de significació i el mètode d'ajustament. Es obté per cada base de dades una taula per a l'anàlisi ORA i l'altra per GSEA. Els resultats es visualitzen via Bar plot, Dot plot, enrichment map, gene-concept network, GO plot, KEGG pathway i Reactome pathway. Es fa possible la descarga de les taules en format de .csv i la de les imatges en format .png. L'usuari pot especificar la resolució i altres atributs d'imatges.</p> <p>La creació de l'aplicació està seguida per la seva validació, on és presenta la seva funcionalitat i es compara el resultat amb l'estudi original.</p>	

Abstract (in English, 250 words or less):

Objective of the thesis is to find Bioconductor packages for pathway analysis and implement them using Shiny. A pathway is a set of genes related to a specific biological function and describes a relation between those genes. First I identify theoretic methods available at the moment for finding and visualising the differentially expressed pathways. Furthermore I identify data bases for gene annotation and specific Bioconductor packages for performing analysis. Second, I develop Shiny application which offers ORA (Over-representation Analysis), GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) and topologic analysis of the pathways. The packages selected for the analysis are *clusterProfiler*, *ReactomePA* i *pathview*. Gene annotation is done using three data bases: GO (Gene Ontology), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) and Reactome.

User can select GO ontologies, specify significance level and adjustment method. For each annotation data base a table with results is generated. Additionally results are visualized with bar plot, dot plot, enrichment map, gene-concept network, GO plot, KEGG pathway and Reactome pathway. It is possible to download results as .csv files and images as .png files. User can customize image resolution and other image attributes.

Development of the application is followed up with its validation, where its functionality is shown and its results are compared to original study.

Contingut

1	Introducció	1
1.1	Context i justificació del treball	2
1.2	Objectius	2
1.2.1	Objectius generals	2
1.2.2	Objectius específics	3
1.3	Enfocament i mètode de seguir	3
1.4	Planificació del treball	4
1.5	Breu sumari dels productes obtinguts	5
1.6	Breva descripció dels capítols del treball	6
2	El marc teòric	8
2.1	Les dades d'expressió genètica	8
2.2	Annotació dels gens	12
2.2.1	Gene ontology	12
2.2.2	KEGG	13
2.2.3	Reactome	14
2.3	ORA	14
2.4	GSEA	15
2.5	L'anàlisi topològic de les rutes	18
2.5.1	El mapa d'enriquement	18
2.5.2	Gene-Concept-Network	18
2.5.3	GOplot	19
2.5.4	KEGG Pathway	19
2.5.5	Reactome Pathway	20
2.6	Desenvolupament del protocol	21
3	Tractament bioinformàtic	24
3.1	Cerca dels paquets de Bioconductor	24
3.2	Instal·lació de l'aplicació	25

Contingut

4 L'aplicació	27
4.1 ORA	31
4.1.1 GO	31
4.1.2 KEGG	33
4.1.3 Reactome	34
4.2 GSEA	35
4.2.1 GO	35
4.2.2 KEGG	35
4.2.3 Reactome	36
4.3 Visualització i l'anàlisi topològic	37
4.3.1 Bar-Plots	37
4.3.2 Dot-Plots	38
4.3.3 Enrichment Plots	40
4.3.4 Category-Gene-Network Plot	41
4.3.5 GSEA Plot	41
4.3.6 GO Plot	43
4.3.7 KEGG Pathway	44
4.3.8 Reactome Pathway	45
4.4 Manual i les ajudes del programa	45
5 Validació dels resultats	51
5.1 Exemple d'anàlisi 1. GEO: GSE100924	52
6 Conclusió	62
Bibliography	64

Llista de les imatges

1.1	Gantt Plot	5
2.1	El procès d'anàlisi de microarrays	9
2.2	El procès d'anàlisi de les rutes	10
2.3	El mètode GSEA	17
2.4	L'anotació de les relacions dins de les rutes KEGG	20
2.5	Lucidchart per a l'aplicació	22
4.1	Pàgina d'entrada	28
4.2	Resum de les dades pujades	29
4.3	Els elements de les seccions d'anàlisi	31
4.4	Especificació d'ORA dels termes GO	32
4.5	El resultat d'anàlisi ORA. GO.	33
4.6	Configuració d'anàlisi KEGG	33
4.7	El resultat de l'anàlisi ORA. KEGG.	34
4.8	El resultat d'anàlisi ORA. Reactome.	34
4.9	El resultat de l'anàlisi GSEA. GO.	35
4.10	El resultat de l'anàlisi GSEA. KEGG.	36
4.11	El resultat d'anàlisi GSEA. Reactome.	37
4.12	Bar-Plot. GO.	38
4.13	Bar-Plot. GO.	39
4.14	Bar-Plot. GO.	40
4.15	Category-Gene-Network Plot. GO.	41
4.16	GSEA Plot. GO.	42
4.17	GO Plot	43
4.18	KEGG pathway	44
4.19	Reactome pathway	45
4.20	Manual per a aplicació	46
4.21	Manual per a l'anàlisi ORA amb l'anotació KEGG	46

Llista de les imatges

4.22 Senyals d'ajuda	47
4.23 Ajuda per a l'elecció de l'espècie	48
4.24 Ajuda per pujar les dades	48
4.25 Infromació per la interpretació d'anàlisi ORA	49
4.26 L'ajuda per a la selecció del mètode d'ajustament	49
4.27 Ajuda per la interpretació de GSEA	50
5.1 Selecció d'espècie	52
5.2 Selecció d'espècie	53
5.3 Resultat d'anàlisi ORA de Reactome	53
5.4 Gràfic de barres	54
5.5 Gràfic de punts	55
5.6 Mapa d'enriquement	56
5.7 Red de les categories i gens	57
5.8 Rutes Reactome	58
5.9 Anàlisi GSEA	59
5.10 Gràfic GSEA	59
5.11 Anàlisi ORA de KEGG	60
5.12 Gràfic de les rutes KEGG	60
5.13 L'anàlisi ORA de GO	61

1 Introducció

El treball consistirà en el desenvolupament d'una aplicació per dur a terme l'anàlisi de les rutes (*Pathway analysis*). Amb les rutes entenem un conjunt de gens que actuen junts per dur a terme un procès biològic. Així doncs aquest аналіз permet donar més sentit a una expressió genètica diferencial entre les proves biològiques d'interès. Recordem que recents avenços tecnològics permeten mesurar els nivells d'expressió en una gran quantitat de gens, cosa que implica una gran quantitat de dades. Al nivell dels gens individuals es poden fer servir mètodes estadístics per comprovar si les diferències en les expressions entre els grups (provees biològiques) són estadísticament significatives. Per dotar encara de més sentit aquesta anàlisi és necessari agregar els resultats al nivell més raonable com ara al nivell de les rutes. Al final el que volem és comprovar si hi ha diferències estadísticament significatives entre les provees no al nivell dels gens particulars sinó al nivell de les rutes. Tan com en el cas dels gens particulars també en el nivell de les rutes s'han desenvolupat mètodes estadístics específics [Khatri et al., 2012]. En aquest treball vull analitzar quins mètodes són i quins tenen més avantatges que d'altres. A part d'aquest component més biològic i teòric del treball he buscat la possibilitat d'implementar aquests mètodes d'anàlisi en una aplicació intuitiva i d'un ús fàcil a la qual qualsevol científic que no disposi dels coneixements informàtics suficients per fer aquesta anàlisi podrà accedir gratuïtament. La plataforma que he utilitzat per crear l'aplicació és l'eina Shiny de Rstudio [Chang et al., 2018]. La feina ha consistit en la cerca dels paquets de Bioconductor que inclouen els mètodes per l'anàlisi de les rutes, selecció dels paquets més apropiats i la seva integració en una aplicació Shiny amb una interfície atractiva.

1 Introducció

1.1 Context i justificació del treball

La justificació d'aquest tema ve de dues fonts diferents: d'una banda tinc un interès personal i d'altra banda entenc la importància de la meva aportació per a la comunitat científica. El meu interès personal és degut al fet que durant el màster he fet servir àmpliament el programa R però no he arribat a conèixer bé la creació d'una aplicació estadística amb Shiny. Per completar aquesta deficiència i entenent que aquesta eina és útil per al meu desenvolupament professional he buscat el tema que en requeria l'ús. Encara que hi ha algunes aplicacions de Shiny relacionats amb l'anàlisi de les rutes¹ i tanbé en altres plataformes [Reimand et al., 2019], elles no representen tota la diversitat dels paquets disponibles a Bioconductor. L'ús d'aquests paquets queda restringit per a experts en informàtica i estadística i per tant són difícilment accessibles per la gran part de la comunitat científica, de modo que seria convenient donar-hi més accessibilitat via una aplicació amb interfíci visual.

1.2 Objectius

Entre els objectius del treball podem distingir els general i els més específics:

1.2.1 Objectius generals

1. Identificar els objectius i mètodes de l'anàlisi de les rutes (Bio/Stat)
2. Identificar els paquets de Bioconductor en R que s'aproximin als mètodes (Info)
3. Desenvolupar l'aplicació Shiny amb els paquets escollits per aproximar el resultat als objectius de l'anàlisi de les rutes (Info)

¹Algunes splicacions existents de Shiny són: iDINGO [Class et al., 2017], ShinyGO [Ge and Jung, 2018], PAEA [Clark et al., 2015]

1 Introducció

1.2.2 Objectius específics

1. Biologia/Estadística
 - a) Buscar literatura sobre l'anàlisi de rutes
 - Quins mètodes hi ha? Enumerar-los i explicar-los, especialment els tests estadístics.
 - Quines bases de dades es fan servir?
 - Determinar les opcions per visualitzar els resultats de l'anàlisi de les rutes.
 - b) Identificar les aplicacions existents i investigar què ofereixen
 - c) Analitzar els vignettes dels paquets de Bioconductor i provar-ne el seu ús localment amb R
2. Informàtics
 - a) Crear i documentat un protocol (pipeline) de l'anàlisi utilitzant els paquets seleccionats.
 - b) Identificar les dades experimentals per passar-les pel pipeline creat
 - c) Fer proves amb les dades seleccionades
 - d) Fer canvis en el protocol si és necessari
 - e) Integrar el pipeline a l'aplicació Shiny

1.3 Enfocament i mètode de seguir

Com es pot entendre dels objectius la feina ha consistit d'una banda en l'anàlisi teòrica dels mètodes disponibles actualment per a l'anàlisi de rutes, i d'altra banda en el desenvolupament d'una aplicació que incorporarà aquests mètodes. El mètode triat per aconseguir aquests objectius era el mètode simultani on la programació es desenvolupava alhora de l'anàlisi dels conceptes teòrics. D'aquesta manera he seguit aquests pasos:

1. Trobar un mètode teòric que proporcioni un resultat interessant;
2. Buscar en Bioconductor aquest mètode;
3. Repetir 1 i 2 fins que el conjunt dels mètodes facin l'anàlisi de les rutes complet.

1 Introducció

4. Quan tots els mètodes son triats dissenyar un protocol;
5. Aplicar el protocol a les dades independents;
6. Comparar els resultats amb els estudis d'on provenen les dades;
7. Ajustat últimament el protocol;
8. Desenvolupar l'aplicació

S'ha d'emfatitzar el punt 5 i 6. Era essencial trobar les dades que s'utilitzin per fer les proves durant la fase de desenvolupament de *pipeline*. Les dades havien de provenir d'uns resultats ja publicats per poder comparar-los amb els resultats obtinguts amb el programari elaborat.

1.4 Planificació del treball

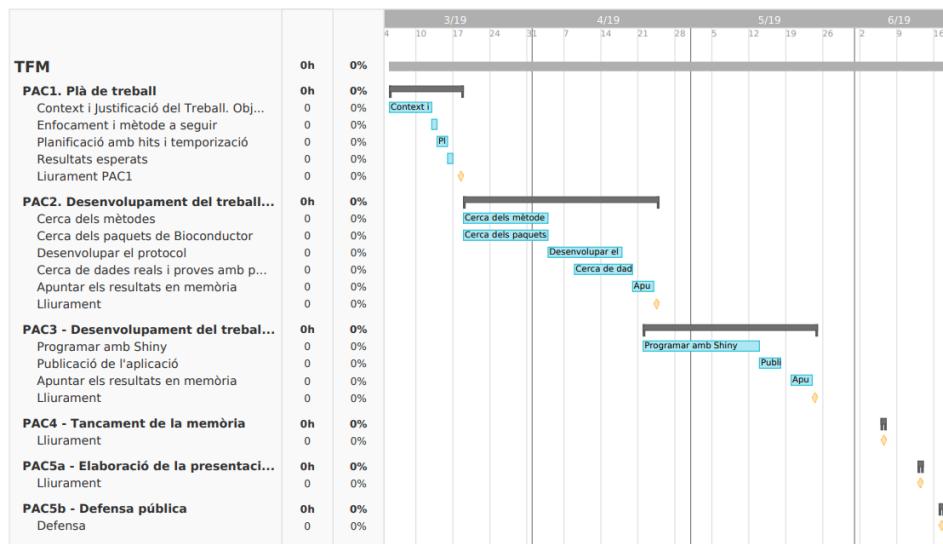
Es van definir les tasques següents per aconseguir els objectius:

1. Cerca de la literatura sobre els mètodes de l'anàlisi de les rutes;
2. Relacionar els mètodes trobats en 1 amb els paquets actuals de Bio-conductor;
3. Decidir sobre quals resultats son més interessants per a una aplicació Shiny i desenvolupar un protocol de l'anàlisi (*pipeline*) que formarà la base de l'aplicació. Documentar el protocol;
4. Buscar 3-5 exemples de dades i fer proves aplicant el protocol i comparant els resultats amb els resultats publicats sobre aquestes dades (si n'hi ha);
5. Fer últims canvis en el protocol;
6. Dissenyar i programar l'aplicació de Shiny;
7. Publicar l'aplicació en web;
8. Tancar la memòria i fer la presentació per la defensa.

Aquestes tasques he distribuït de modo següent:

1 Introducció

Imatge 1.1: Gantt Plot



Els treballs previstos per plà docent i realitzades i entregades a temps eren els següents:

Activitat	Nom d'activitat	Data d'inici	Data d'entrega
PACo	Definició dels continguts del treball	20/02/19	04/03/2019
PAC1	Pla de treball	05/03/19	18/03/19
PAC2	Desenvolupament del treball - Fase 1	19/03/19	4/04/19
PAC3	Desenvolupament del treball - Fase 2	25/04/19	20/05/19
PAC4	PAC4 - Tancament de la memòria	21/05/19	05/06/19

1.5 Breu sumari dels productes obtinguts

El producte central obtingut és l'aplicació Shiny que actualment es pot descarregar del meu repositori a Github (veure l'apartat instal·lació de l'aplicació). Al mateix repositori es pot trobar tot el material relacionat amb la creació de l'aplicació: els arxius de latex per a les proves d'avaluació continuada, les

1 Introducció

captures de pantalla utilitzades en aquestes PACs, també el paquet modificat (pathview) que es diu pathviewPatched i que permet guardar les imatges de les rutes al directori especificat.

1.6 Breva descripció dels capítols del treball

Al primer capítol més teòric presentaré els mètodes més relevant per a anàlisi de les rutes. Començaré però amb el context d'investigació de l'expressió genètica i més específicament amb l'anàlisi de microarrays per poder situar millor l'anàlisi biològic de les rutes. Donat les dades d'experiment explicaré brevement quins resultats habitualment s'en deriven. Veurem que aquests resultats són la llista de gens diferencialment expressats i el magnitud d'expressió diferencial mesurada via *logRatio* per tots als gens.

Seguidament investigaré quines estratègies existen per dur a terme l'anàlisi de les rutes. Aquí identificaré tres estratègies generals: l'anàlisi ORA (Over-Representation Analysis), FCS (Functional Class Scoring) i l'anàlisi topològic de les rutes. Veurem que aquests análisis accepten com les dades d'entrada els resultats obtinguts via *microarrays* descrits anteriorment. Per poder fer us d'aquestes dades però és necessari anotar els gens d'experiment. Per aquest motiu presentaré els tres bases de dades més relevant per anotar els gens amb objectiu de fer anàlisi de les rutes: GO, KEGG i Reactome.

Finalment parlaré sobre els mètodes ORA i GSEA més detalladament enfocant especialment als resultat que preprocionen. També descriure brevement la visualitzacions possible de les rutes. Per acabar presentaré el protocol que utilitzaré per crear l'aplicació.

Al capítol següent explicaré els paquets de Bioconductor per dur a terme l'anàlisi descrit al capítol anterior i el modo amb el qual he fet l'aplicació accessible. Veurem que al moment de redacció d'aquesta memòria l'aplicació es pot ser descargada de GitHub utilitzant el paquet *devtools* de R. S'intentarà però habilitat l'aplicació per a internet utilitzant el servidor de l'àrea d'estadística i bioinformàtica.

1 Introducció

Al capítol següent presentaré l'aplicació. Aquí utilitzaré les dades del paquet clusterProfiler per mostrar el funcionament d'aplicació: des de pujament de les dades fins obtenció de les representacions gràfiques.

Al capítol següent intentaré validar l'aplicació. Parlaré dels problemes a l'hora de trobar les dades preprocessades i presentaré les dades amb les quals en faig intent i em concentraré més en l'estudi de l'expressió gènica dels ratolins midificats genèticament de tal manera, que el seu gen *Zbtb7b* està silenciat. Veurem que els resultats obtinguts amb l'aplicació s'assemblen als resultats descrits al *paper* original.

Per acabar faré conlusions del meu treball.

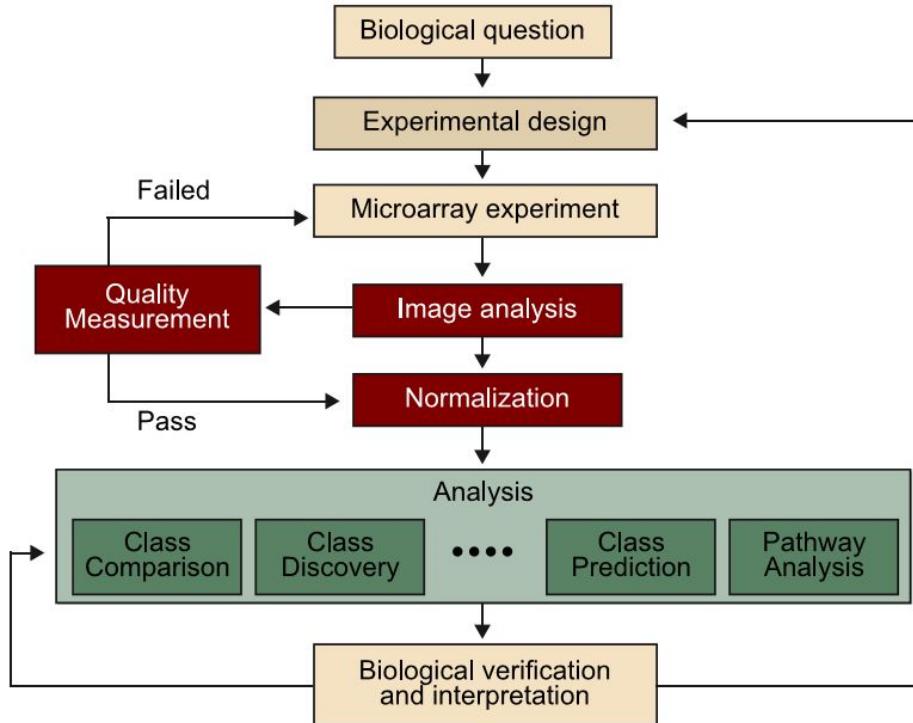
2 El marc teòric

2.1 Les dades d'expressió genètica

Les dades d'entrada per a l'anàlisi de les rutes provenen típicament de l'anàlisi de *microarrays* d'ADN, que produex dades d'expressió de m gens (variables) per a n mARN mostres (observacions). Les dades com aquestes poden resultar d'un estudi d'investigació sobre efectes d'una proteïna com per exemple a l'estudi de [Li et al., 2017] on s'investiga la correlació entre la proteïna Zbtb7b (Zinc finger and BTB domain-containing protein 7B) i la formació de teixit adipós marró i beix i d'aquesta manera influex sobre fisiologia metabòlica. En aquest cas l'objectiu és comparar teixits de dos ratolins un de tipo salvatge i l'altre amb el gen ZBTB7B silenciat i investigar quins gens són diferencialment expressats entre aquestes mostres biològiques.

Al gràfic següent veiem l'estructura habitual d'un experiment de *Microarray*.

2 El marc teòric



imatge 2.1: El procès d'anàlisi de microarrays

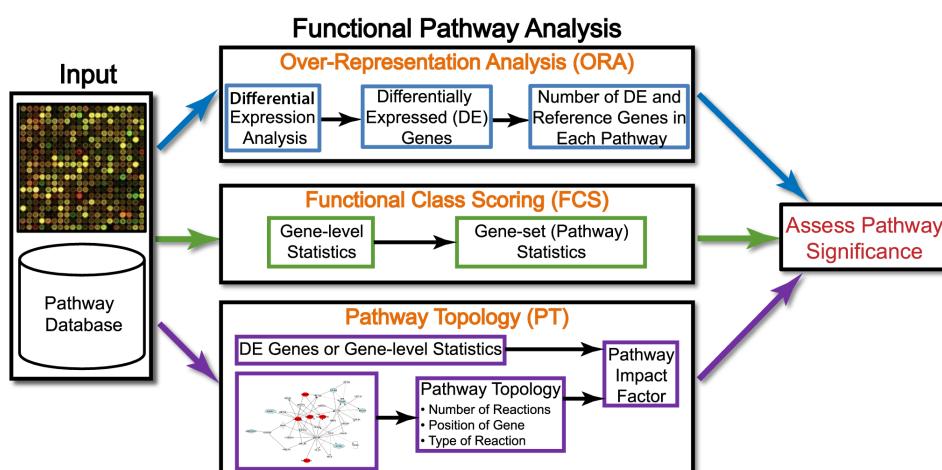
El *pipeline* de l'anàlisi consisteix doncs en plantejament d'una pregunta i un disseny experimental a partir del qual és fa l'experiment de *microarrays*. El producte d'experiment són bàsicament les imatges d'intensitats que es tradueixen als valors numèrics. Habitualment aquests valors són encara *raw values* i han de ser processats adequadament. Aquest processament inclou el control de qualitat d'imatges i la normalització dels valors d'intensitat per reduir la variabilitat tècnica. Finalment les dades normalitzades s'utilitzen per a l'anàlisi estadístic. Habitualment la mesura natural per comparar les mostres és el *log ratio* el qual podem denominar alternativament *logFC* on *FC* es refereix a *fold change*. Hi ha diversos tests estadístics per comprobar les diferències entre les mostres. En el cas de l'array d'un color podem fer servir tan els mètodes paramètrics com ara el test T o mètodes del modelatge lineal o bé mètodes nonparamètrics com ara la prova de Mann-Whitney.

2 El marc teòric

El test adequat depèndrà bàsicament de la distribució de les dades. El resultat d'aquest anàlisi serveix com a base per a interpretació biològica dels resultats d'experiment. Per poder fer sentit de les dades d'expressió i de l'anàlisi estadístic al nivell de gens és imprescindible fer un anàlisi a nivell de les categories de gens o les rutes. Per aquest anàlisi es necessita, com ho veurem a l'apartat següent, una llista ordenada de les expressions relatives (*logFC*) i una subllista de gens que hem identificat mitjançant els tests estadístics com a diferencialment expressats.

En aquest treball m'ocupó de l'últim pas d'experiment d'escript, més específicament amb l'anàlisi de rutes (*Pathway analysis*).

La vista general de l'anàlisi de les rutes ofereix el gràfic següent:



Imatge 2.2: El procès d'anàlisi de les rutes

A part de les dades d'expressió, de les quals he parlat anteriorment, l'anàlisi requereix com a *input* també la base de dades de les rutes. De les dades que utilitzaré a la meva aplicació en parlaré a la secció següent. Per ara heis important entendre que els resultats d'expressió s'anoten a les bases de dades existents per comprobar si els gens sobre o sotaexpressats pertanyen a unes rutes específica. Per comprobar aquesta, o millor dit, aquestes hipòtesis (per que hi hauran hipòtesis múltiples) s'han establert tres grups dels mètodes:

2 El marc teòric

- **Over-Representation Analysis (ORA).** Aquest anàlisi necessita la preselecció dels gens diferencialment expressats (DE) i compara la freqüència dels gens de la ruta d'interès en la mostra dels gens diferencialment expressats i la freqüència dels gens de la ruta a la distribució de fons ([Boyle et al., 2004]).
- **Functional Class Scoring (FCS)** Per a aquesta anàlisi no necessitem cap preselecció dels gens diferencialment expressats (DE) sinó ja basta amb tenir les estadístiques a nivell de gens, que al cas de l'aplicació és el *logFC*. Hi ha diversos mètodes que generen una estadística per a tot conjunt de gens d'una ruta i la comparen amb una distribució teòrica per a contrastar la hipòtesi nulla. Els mètodes es diferencien bàsicament en calculació de la puntuació d'enriquement que poden incluir l'estadística de Kolmogorov-Smornov, la suma, media o mediana d'estadístiques al nivell de gens etc. [Khatri et al., 2012]. O bé es poden diferenciar en calculació de la distribució teòrica: aquí alguns mètodes utilitzen la permutació de les mostres o de gens, cosa que implica dos hipòtesis diferents.
- **Pathway Topology (PT).** Aquest mètode enfoca la posició de gens diferencialment expressats en la ruta i d'aquesta manera utilitza el coneixement de les bases de dades més àmpliament. Per exemple, si una ruta està activada per un sol producte genètic o mitjançant un receptor i si aquesta proteïna particular no està produïda, la ruta estarà molt afectada, o fins i tot apagada. Més especificativament, si el receptor d'insulina no és en la ruta d'insulina (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa04910) tota la ruta serà desactivada ([Tarcia et al., 2008]). D'altra banda si un nombre de gens està involucrar en la ruta però apareixen riu abaux el seu efecte podria ser menys important. A més a més també el nombre de coneccions amb altres gens a la ruta podria ser important [Rahnenführer et al., 2004]. O fins i tot les estadístiques que incorporen factors diferents com ara la posició, el tipus d'interacció etc. [Draghici et al., 2007]. Aquesta idea l'ha implementat en l'aplicació afegint les rutes dibuixades de KEGG i Reactome, on els gens estan emfatitzats d'acord amb els *logFCs* obtinguts mitjançant l'experiment.

En els capítols següents presisaré més formal els mètodes d'ORA i GSEA i també descriuré algunes possibilitats per visualitzar les dependències de gens dins de les rutes específiques i també les relacions

entre les rutes diferencialment expressades.

2.2 Anotació dels gens

Com veurem més endavant per a l'anàlisi de les rutes és imprescindible tenir com a referència anotacions dels gens. Per a aplicació he utilitzat tres bases de dades: Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) i Reactome. clusterProfiler també inclou WikiPathways però per raons de temps he decidit focusar-me només a les tres mencions anteriorment. Aquestes bases de dades no són però úniques. N'hi ha també altres com per exemple *Pathway Studio pathways* o *IPA* amb inconvenient que són comercials i no gratuites.

2.2.1 Gene ontology

Gene Ontology [Consortium, 2004] dona tan un vocabulari estructurat i controlat (ontologies) com la classificació que cobreix alguns dominis de la biologia molecular i cel·lular. És una base de dades gratuïta per a anotació de gens, el seu producte i les seqüències. El projecte GO proporciona ontologies per a descriure els atributs dels productes de gens als tres dominis separats de la biologia molecular:

1. **Molecular Function (MF).** Aquest domini descriu activitats al nivell molecular. És important entendre que el terme "molecular function" representa més les activitats i no pas les entitats (com per exemple molècules o complexos) que fan aquestes accions i a més a més no espeifiquen quan o a quin context l'acció té lloc. Un exemple podria ser *catalytic activity* o un terme més específic *adenylate cyclase activity*.
2. **Biological Process (BP).** Aquest domini descriu els objectius biològics aconseguits per una o conjunt de les funcions moleculars. Un exemple d'un procès biològic ampli podria ser *DNA repair*. Un exemple més específic podria ser *pyrimidine nucleobase biosynthetic process*.

2 El marc teòric

3. **Cellular Component (CC).** EL CC descriu l'emplaçaments al nivell d'estructures subcel·lulars (com *mitocondri*) i els complexos macromoleculars (com *ribosomes*) on el producte de gen fa la seva funció.

Dins de cada ontologia, els termens tenen tan una definició de text com un identificador únic. El vocabulari està estructurat en una classificació que manté les relacions "is-a" i "part-of" i "regulates". Aquestes relacions les descriu amb més detall més endavant en la secció dedicada al gràfic acíclic de GO termes.

2.2.2 KEGG

La base de dades KEGG és la col·lecció del mapes dibuixades manualment que representen el coneixement sobre interacció molecular dividit en set dominis principals:

1. Metabolism
2. Genetic Information Processing
3. Environmental Information Processing
4. Cellular Processes
5. Organismal Systems
6. Human Diseases
7. Drug Development

Els mapes són dibuixades amb un software específí (KegSketch) que genera un arxiu KGML+. Aquest arxiu és un arxiu SVG que conté els objectes gràfics que són associats amb els objectes KEGG. Els objectes gràfics bàsics de les rutes KEGG són:

- caixes: gens o el seu producte
- cercles: altres molècules
- línies: reaccions

El significat més detallat d'aquests elements el presentaré a la secció dedicada a les rutes KEGG.

2.2.3 Reactome

Reactome és una base de dades gratuïtament accessible i manualment curada per a reaccions i rutes biològiques. Al centre de Reactome són reaccions que es definexen com qualsevol esdeveniment molecular com ara unió, fosforilització, catàlisi bioquèmic, transport molecular o esdeveniments moleculars espontàni. Aquestes reaccions involucren qualsevol molècula, però més típicament passen entre proteïnes i les molècules petites. Encara que els mapes de Reactome disponibles online contenen una relació entre les molècules més detallada el paquete de Bioconductor que utilitzaré per generar els mapes visualitza només la connexió bàsica entre els gens.

2.3 ORA

L'anàlisi de sobreexpressió és una tècnica d'identificació de les rutes significativament enriquitges en la mostra d'interès.

El paper original que se cita habitualment quan es parla d'anàlisi d'expressió genètica és de [Boyle et al., 2004]. El mètode estadístic descrit consisteix bàsicament en els passos següents:

1. **De tots els gens de la mostra seleccionar un grup de gens que es considera que són significativament expressats.**

Els criteris de selecció poden basar-se en *log ratios* i/o en el valor de *p* provenint d'un test estadístic. *Log ratios* donen la magnitud amb la qual un gen és sobre o sotaexpressat. Les diferències entre els grups però són el resultat d'un procés estochàstic i per tant hem d'intentar de minimitzar el risc de prendre decisions falses. El valor de *p* representa la probabilitat d'aquest risc i per tant dona certa confiança sobre la significació de les diferències observades.

2. **Determinar si algunes rutes anoten la llista especificada de gens amb la freqüència més alta que la que s'esperaria per casualitat.**

El test estadístic es basa en la distribució hipergeomètrica:

$$p = 1 - \sum_{i=0}^{k-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

2 El marc teòric

En aquesta equació N és el nombre total de gens en la distribució de fons, M és el nombre de gens dins d'aquesta distribució que són anotats a la ruta d'interès, n és el nombre total en la llista especificada de gens i k és el nombre de gens dins d'aquesta llista que són anotats a la ruta. La distribució de fons pot ser o bé tots els gens en la base de dades d'anotació o bé tots els gens de l'experiment.

El valor de P obtingut amb aquesta fórmula dona la probabilitat de veure el nombre x de gens de la llista relacionats amb la ruta específica en la llista del nombre total de gens n donat la proporció de gens relacionats amb aquesta ruta en la distribució de fons.

L'aplicació utilitza aquesta idea i calcula una taula amb els camps següents:

- Description. El nom del terme GO;
- GeneRatio. El quocient $\frac{M}{N}$ on M és el nombre dels gens diferencialment expressats que pertanyen al conjunt de gens i N és el nombre total dels gens diferencialment expressats
- BgRatio. El quocient: $\frac{k}{n}$ on k és el nombre dels gens del conjunt d'interès en la distribució de fons i n és el nombre total dels gens en la distribució de fons;
- pvalue. Valor de p basat en la distribució hipergeomètrica descrita anteriorment.
- p.adjust. El valor de P ajustat. L'usuari pot seleccionar el mètode d'ajustament.

2.4 GSEA

Amb l'anàlisi GSEA podem analitzar els resultats d'un experiment d'expressió per a dos grups. Aquí els gens són ordenats basant-se en la correlació entre la seva expressió i la separació entre les classes. Aquest llistat ordenat L el podem crear utilitzant els *logRatios*.

Donat el conjunt definit dels gens S , que pertanyen per exemple al mateix terme de Gene Ontology, l'objectiu de GSEA és determinar si els membres de S són distribuïts aleatoriament en el L o es troben més al cap o a la cua.

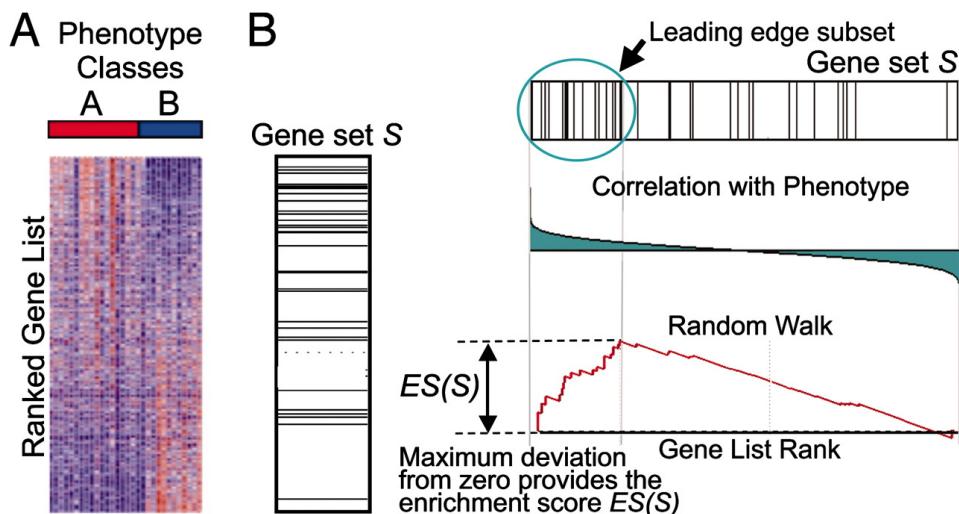
2 El marc teòric

S'esperaria que els gens relacionats amb la separació fenotípica mostraran aquesta última distribució.

L'anàlisi GSEA consisteix en tres passos subramanian2005gene:

1. Càcul de la puntuació d'enriquement (*ES: Enrichment Score*). La puntuació està calculada anant per la llista i augmentant la suma corrent sempre quan es troba un gen que pertany a S o, al contrari, restant-la quan el gen no forma part del conjunt S . La puntuació és la desviació màxima del zero observada en aquet camí. L'estadística obtinguda és l'estadística de Kolmogorov-Smirnov amb pesos.
2. Estimació del nivell de significació per a la puntuació *ES*. El valor de P nominal es pot obtenir mitjançant o bé la permutació de les classes o bé la permutació de gens, on l'estadística *ES* observada es compara amb la distribució obtinguda amb permutació. Els dos modos de permutació comproven les hipòtesis diferents. Mentre la permutació de gens comprova la hipòtesi que *els gens en la ruta com a màxim són diferencialment expressats com els gens fora de la ruta*, la permutació de les mostres implica la hipòtesi que cap de gens en la ruta són diferencialment expressats. Es diferencies doncs en tractament de gens fora de la ruta. A l'aplicació es fa ús de la permutació de gens degut bàsicament a la selecció dels paquets de Bioconductor per a aplicació.
3. Càcul del valor de P ajustat. El valor de P nominal s'ajusta per controlar l'error global que es produeix com a resultat de les comparacions múltiples.

2 El marc teòric



Imatge 2.3: El mètode GSEA

L'aplicació que he desenvolupat agafa aquesta idea i calcula la taula que inclou les estadístiques següents:

- enrichmentScore. Enrichment score per al conjunt dels gens. Amb altres paraules: el grau amb el qual el conjunt dels gens està sobre-expressat a dalt o a baix del llistat ordenat dels gens en les dades d'expressió.
- NES. Normalized enrichment score. La puntuació per al conjunt de gens després de ser normalitzat tenint en compte tots els conjunts de gens analitzats (la seva mida i la seva correlació amb les dades d'expressió). Aquesta puntuació ajuda a comparar els resultats entre els conjunts de gens.
- pvalue. El valor de p nominal.
- p.adjust. El valor de p ajustat.
- leading_edge
 - Tags. El percentatge de les ocurredades de gens del conjunt específic abans (per als ES positius) o després (per als ES negatius) del cim en la puntuació corrent d'enriquiment. Aquest valor indica el percentatge dels gens que contribueixen a la puntuació d'enriquiment.

2 El marc teòric

- List. El percentatge dels gens en el llistat ordenat de tots els gens abans o després del pic en la puntuació corrent d'enriquiment. Aquest valor ens indica on exactament el pic es produueix.
- Signal. La fortalesa del senyal d'enriquiment que combina els dos valors anteriors.
- rank. La posició del pic en la llista ordenada dels gens. Els conjunts dels gens més interessants assoleixen el seu màxim o bé al principi o al final de la llista ordenada. Vol dir que tenen aquest valor o bé molt baix o bé molt alt.

2.5 L'anàlisi topològic de les rutes

Tan ORA com GSEA no visualitzen les relacions entre les rutes i entre els gens dins de les rutes. Els avenços en anotació manual de les bases de dades disponibles (GO, KEGG i Reactome) contenen però aquesta informació i l'aplicació, gràcies al paquet clusterProfiler, hi treu l'avantatge i visualitza aquestes relacions més detalladament.

2.5.1 El mapa d'enriquement

Navegant a la categoria **Enrichment plot** l'usuari obté el mapa d'enriquiment. El mapa organitza les rutes en una xarxa amb les línies que connecten les rutes amb els gens solpats. D'aquesta manera les rutes amb gens en comú s'agrupen més a prop l'una de l'altra.

2.5.2 Gene-Concept-Network

L'anàlisi ORA no visualitza per si sola els gens que contribueixen al fet que la ruta sigui diferencialment expressada. Amb la xarxa de gens-concepte es pretén visualitzar els gens al voltant dels conceptes on els gens poden ser connectats amb les rutes (conceptes) diferents. D'aquesta manera es fa

2 El marc teòric

possible identificar les associacions biològiques més complexes entre les rutes mitjançant els gens.

2.5.3 GOplot

El gràfic de GO està organitzat com direccional acíclic gràfic (Directed Acyclic Graph). Una manera útil de veure els resultats és mirar com els termes GO estan distribuïts per aquest gràfic. L'aplicació ensenya el gràfic GO induït pels els gens més significatius. El gràfic mostra tres relacions possibles entre les rutes:

1. *is a*: Si dèiem que A *is a* B, volem dir que A és un subtip de B. Per exemple el cicle mitòtic de la cèl·lula *is a* cicle de la cèl·lula.
2. *part of*: Aquesta relació s'utilitza per representar la relació entre una part i el tot. Aquesta relació entre A i B existeix només si B és necessàriament una part d'A: quan B existeix, ho fa només com una part de B i la presència de B implica la presència d'A.
3. *regulates*: La relació descriu el cas on un procès afecta directament la manifestació de l'altre procès.

Els conceptes al llarg del gràfic són marcats amb color depenent si són estadísticament significatius o no.

2.5.4 KEGG Pathway

Aquest gràfic mostra les relacions entre els gens dins de la ruta específica. Els gens són remarcats amb el color depenent de l'expressió diferencial mesurada amb LogRatios. Per poder interpretar el gràfic és útil tenir present l'anotació següent:

2 El marc teòric

Notation	Objects	Arrows
	gene product, mostly protein but including RNA	→ molecular interaction or relation
○	chemical compound, DNA and other molecule	→ link to/from another map - - → indirect link or unknown reaction
[]	map	/ → missing interaction (e.g., by mutation) → drug structure link or pointer used to add legend
Protein-protein interactions		
[] +p []	phosphorylation	[] → ○ → [] expression
[] -p []	dephosphorylation	[] → ○ → [] repression
[] +u []	ubiquitination	[] → e [] expression
[] -u []	deubiquitination	[] → e [] repression
[] +g []	glycosylation	
[] +m []	methylation	
[] → []	activation	
[] → []	inhibition	
[] - - → []	indirect effect or state change	
[] → []	binding / association	
[] + []	dissociation	
[] []	complex	
Gene expression relations		
Enzyme-enzyme relations		
		→ two successive reaction steps

Imatge 2.4: L'anotació de les relacions dins de les rutes KEGG

2.5.5 Reactome Pathway

Les rutes de Rectome són similares a les rutes de KEGG. La seva implementació amb Bioconductor, com ho veruem properament, no visualitza les rutes originals mostrades per [Pathway Browser](#) de Reactome. La visualització amb el paquet ReactomePA és més modesta i ofereix només les relacions nominals sense mostrar direccionalitat, com ho fa el gràfic de la ruta original de Reactome. Tot i així podem identificar quantes coneccions amb

2 El marc teòric

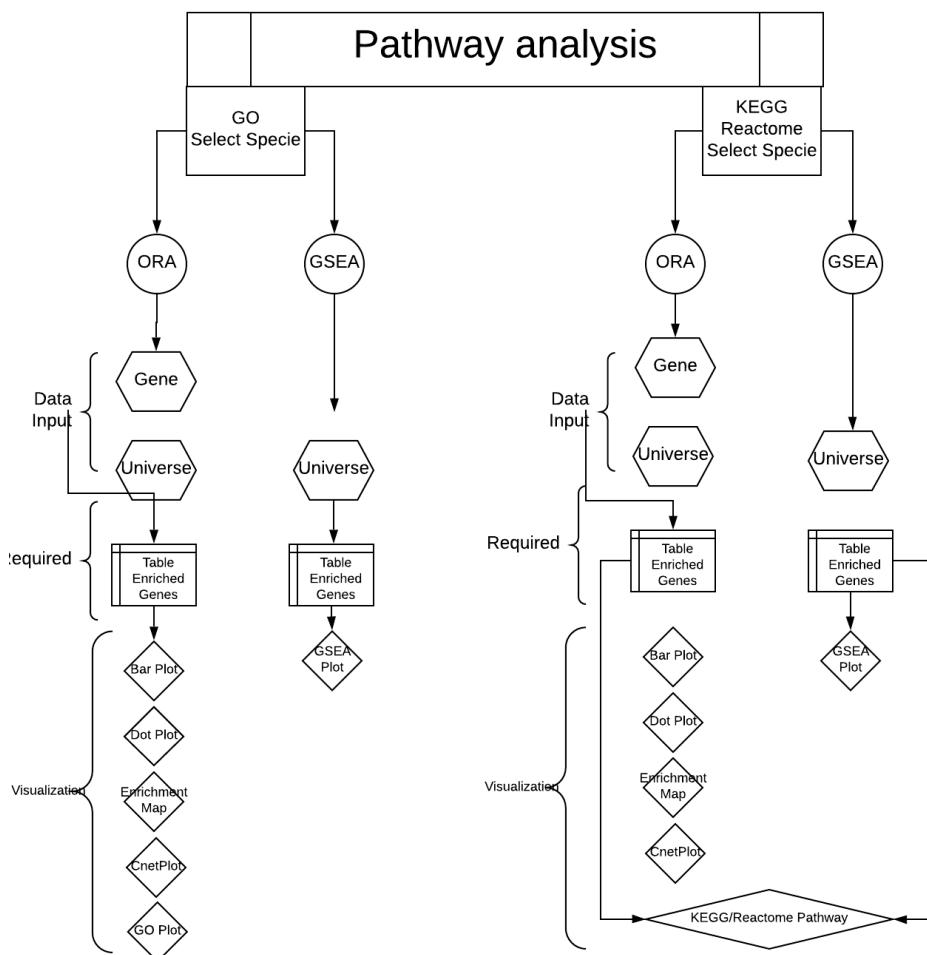
altres gens de la ruta tenen els gens diferencialment expressats i d'aquesta maner intuir la seva importància relativa.

En canvi a Goplot i les rutes KEGG les relacions entre els gens dins les rutes Reactome són més senzilles. Aquí les relacions són mostrades només amb les línies, on es pot interpretar només la distància entre els gens.

2.6 Desenvolupament del protocol

Tenint en compte el marc teòric he intentat dessenyar l'aplicació que ofereix els mètodes com ara ORA, GSEA i algunes visualitzacions de la topografia de les rutes. Igual amb quina base de dades l'usuari vol anotar les dades d'expressió l'usuari podrà decidir quin mètode voll aplicar. En el millor dels casos l'usuari faria els dos mètodes ORA i GSEA. Això implicaria la disponibilitat de dos arxius: l'arxiu amb tots els gens (Universe) i l'arxiu amb el grup de gens diferencialment expressats (Gene set). Si l'usuari vol fer només l'anàlisi GSEA haurà de pujar només l'arxiu amb tots els gens. Una vegada seleccionada l'estrategia l'usuari puja els arxius necessaris i gener el resultat de ORA i/o GSEA aplicant uns criteris com ara selecció d'ontologia en ORA, valor de P com al filtre de visualització de les rutes més significatives, i el mètode d'ajustament.

2 El marc teòric



imatge 2.5: Lucidchart per a l'aplicació

D'aquí podem definir per exemple el protocol:

1. Decidir quin anàlisi vol fer: GO, KEGG o Reactome
2. Seleccionar l'espècie de referència
3. Decidir quin mètode vol implementar: ORA o GSEA i respectivament pujar les dades necessàries.
→ Per a anàlisi GO tots dos arxius són necessaris: Gens Seleccions (Gene) i Tots els gens (Universe).

2 El marc teòric

- Per a l'anàlisi KEGG o Reactome les dades necessàries varien: Pel mètode ORA l'arxiu amb els gens seleccionats és suficient. Dos arxius són necessaris pel mètode GSEA.
4. En el cas que volguem fer l'anàlisis ORA seleccionar a l'apartat corresponent (GO, KEGG o Reactome) la pestanya ORA i definir els criteris.
→ Els gràfics: Bar Plot, Dot Plot Enrichment Map, Cnet Plot, GO Plot (en cas d'anàlisi GO) i els gràfics de les rutes (KEGG/Reactome) es calculen automàticament
 5. En el cas que volguem fer l'anàlisi GSEA seleccionar a l'apartat corresponent (GO, KEGG o Reactome) la pestanya GSEA i definir els criteris.
→ El gràfic GSEA es genera automàticament. Es pot elegir la ruta mitjançant un menú desplegable.

3 Tractament bioinformàtic

3.1 Cerca dels paquets de Bioconductor

Bioconductor ofereix molts paquets per dur a terme l'anàlisi de les rutes implementat algoritmes diferents a l'hora de calcular les estadístiques de les anàlisis ORA i GSEA. La busqueda s'ha reduït a tres paquets principals: clusterProfiler, ReactomePA i pathview. D'aquests tres paquets el paquet clusterProfiler és més complet i integra els mètodes per dur a terme l'anàlisi de les rutes basant-se en les bases de dades GO, KEGG i Reactome. Els dos mètodes principals són ORA (Overrepresentation analysis) i GSEA (Gene set enrichment Analysis). També inclou les possibilitats de visualització dels resultats suficients per considerar l'anàlisi de les rutes complet. Notem però que el test de permutació a l'anàlisi GSEA implementat per clusterPrifiler es basa en la permutació dels gens i no de les mostres com originalment és proposat per [Subramanian et al., 2005].

Els paquets i les seves funcions per generar els resultats són els següents:

Base de dades	Mètode	Paquet Bioconductor	Funció	Observació
GO	ORA	clusterProfiler	enrichGO()	Només 7 espècies disponibles
GO	GSEA	clusterProfiler	gseGO()	Permutació de gens
GO	Bar-Plot	enrichplot	barplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
GO	Enrichment Map	enrichplot	emapplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
GO	Gene-Concept Network	enrichplot	cnetplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
GO	GO directed acyclic graph	enrichplot	goplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
KEGG	ORA	clusterProfiler	enrichKEGG()	Totes les espècies de KEGG
KEGG	GSEA	clusterProfiler	gseKEGG()	Permutació de gens
KEGG	Bar-Plot	enrichplot	barplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
KEGG	Enrichment Map	enrichplot	emapplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
KEGG	Gene-Concept Network	enrichplot	cnetplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
KEGG	Pathway	pathview	pathview()	Cal modificar la funció per guardar els gràfics en el directori temporal
Reactome	ORA	ReactomePA	enrichPathway()	Totes les espècies de KEGG
Reactome	GSEA	ReactomePA	gsePathway()	Permutació de gens
Reactome	Bar-Plot	enrichplot	barplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
Reactome	Enrichment Map	enrichplot	emapplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
Reactome	Gene-Concept Network	enrichplot	cnetplot()	Necessita l'objecte del class enrichResult
Reactome	Pathway	ReactomePA	viewPathway()	

Table 3.1: Resum de les anàlisis disponibles i recursos de Bioconductor R

3.2 Instal·lació de l'aplicació

La solució més plausible i ràpida era empaquetar tota l'aplicació dins d'un paquet R i fer-la disponible d'aquesta manera en el GitHub. Hi havia també dues opcions més:

- Publicar l'aplicació a CRAN
- Publicar l'aplicació en un servidor Shiny

La primera opció, publicació en CRAN, no l'he contemplat encara, perquè la solució no és immediata, sino que és un procès que no és fàcil i pot tardar fins que el paquet estigui publicat amb èxit. Com comenta [Wickham, 2015] “submitting to CRAN is a lot more work than just providing a version on github, but the vast majority of R users do not install packages from github, because CRAN provides discoverability, ease of installation and a stamp of authenticity. The CRAN submission process can be frustrating, but it's worthwhile...”. Normalment els paquets han d'estar en perfectes condicions abans d'entregar-los i seran revisats manualmet per un equip dels voluntaris. D'aquesta manera l'aplicació no seria avaluable dins del marc temporal previst per al treball de màster. A més a més considero que podria millorar encara més l'aplicació abans d'entregar-lo.

La segona opció, publicació via Shiny Server, és molt interessant, però implicaria un treball considerable per configurar el servidor. Com que ho faria per primera vegada, no puc assegurar que tot estigui preparat a temps.

Per tant, el paquet PathwayApp es pot instal·lar del repositori GitHub seguint els passos següents:

1. Instal·lar, si encara no està fet, la versió actual de R;
2. Instal·lar, si encara no està fet, el Bioconductor;
3. Instal·lar, si encara no està fet, el paquet `devtools`

```
install.packages('' devtools '')
library(devtools)
```

4. Instal·lar el paquet PathwayApp

```
devtools::install_github("vdruchkiv/TFM/5_Packages/PathwayApp/Path
```

3 Tractament bioinformàtic

5. Iniciar l'aplicació

```
PathwayApp :: runPathwayApp()
```

La funció `runPathwayApp()` iniciarà la comprovació dels paquets necessaris i començarà l'aplicació. Els paquets següents seran instal·lats, si no ho són encara:

Paquet	Font
clusterProfiler	Bioconductor
ReactomePA	Bioconductor
pathview	Bioconductor
pathviewPatched	GitHub vdruchkiv/TFM
dplyr	CRAN
ggplot2	CRAN
knitr	CRAN
kableExtra	CRAN
formattable	CRAN
shiny	CRAN
shinydashboard	CRAN
shinyhelper	CRAN
shinycssloaders	CRAN

4 L'aplicació

Després d'instal·lació l'aplicació és completament funcional localment i ofereix l'anàlisi a partir de les bases de dades GO, KEGG i Reactome. A l'apartat **Input data** l'usuari primer ha d'indicar l'espècie per a totes tres bases de dades. Per les bases de dades de Reactome l'usuari pot elegir entre Homo Sapiens, Rat, Mouse, Celegans, Yeast, Zebrafish, Fly. Per a l'anàlisi GO, a més de les anteriors, hi ha disponibles aquestes espècies addicionals: Arabidopsis, Bovine, Chicken, Canine, Pig, Rhesus, E coli strain K12, Xenopus, Anopheles, Chimp, Malaria, E coli strain Sakai. Hi ha més espècies disponibles per a l'anàlisis KEGG, perquè la funció de `culsterProfiler enrichKEGG()` descarrega les últimes anotacions directament de la base de dades KEGG. Es poden trobar totes les espècies [aquí](#). També l'usuari pot buscar l'espècie introduint els termes de cerca. Finalment l'usuari puja l'arxiu amb els gens i els LogRatios provinents de l'estudi de *microarrays*.

A la presentació següent fer us de les dades disponibles al paquet DOSE de Bioconductor que provenen de l'estudi de schmidt2008humoral on es comparen les mostres del càncer de mama del grau III vs. el grau I.

4 L'aplicació

Imatge 4.1: Pàgina d'entrada

The screenshot shows the 'Pathway analysis' input page. On the left, a sidebar lists 'Data input' options: 'GO Analysis', 'KEGG Analysis', and 'Reactome Analysis'. The main area is divided into three sections:

- GO**: A dropdown menu titled 'Select Specie:' with 'Homo Sapiens' selected.
- Reactome**: A dropdown menu titled 'Select Specie:' with 'Homo Sapiens' selected.
- KEGG**: An input field 'Enter Search Term for Species' containing 'homo'. Below it is a dropdown menu titled 'Select KEGG Specie' with 'Homo sapiens' selected.

Below these sections are two file upload fields:

- File with all genes**: A 'Browse...' button and a 'No file selected' placeholder.
- File with selected genes**: A 'Browse...' button and a 'No file selected' placeholder.

A note at the bottom states: 'Note: The file should contain two columns, one for gene ID (no duplicated ID allowed) and another one for fold change.'

L'usuari té la possibilitat d'introduir l'arxiu amb tots els gens i els gens seleccionats. Un cop introduïdes les dades es mostra un petit resum del contingut dels arxius.

4 L'aplicació

Imatge 4.2: Resum de les dades pujades

The screenshot shows a web-based application interface for managing gene lists. At the top, there are two sections: "File with all genes" and "File with selected genes". Both sections include a "Browse..." button, a file input field containing "Dose_geneList.csv", and a blue "Upload complete" button.

Below these sections is a note: "Note: The file should contain two columns, one for gene ID (no duplicated ID allowed) and another one for fold change."

Under the "File with all genes" section, it says "You uploaded: 12495 genes" and "First 10 entries". A table displays the following data:

Entrez ID	FoldChange
4312	4.573
8318	4.515
10874	4.418
55143	4.144
55388	3.876
991	3.678
6280	3.502
2305	3.292
9493	3.286
1062	3.220

Under the "File with selected genes" section, it says "You selected: 207 genes" and "First 10 entries". A table displays the following data:

Entrez ID	FoldChange
...	...
...	...

L'aplicació està dividida doncs en 4 parts substancials:

1. Entrada de les dades;
2. Anàlisi GO;
3. Anàlisi KEGG;
4. Anàlisi Reactome.

L'aplicació ofereix dos mètodes d'anàlisi: d'una banda es pot fer ORA (Over-Representation Analysis) i d'altra banda l'anàlisi GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Recordem que l'ORA consisteix a seleccionar els gens

4 L'aplicació

diferencialment expressats i basant-se en GO, KEGG o Reactome comprovar si una de les agrupacions de gens suggerides per aquestes bases de dades està sobre o sotraexpressada en els gens seleccionats. Per dur a terme l'ORA l'usuari té l'opció de definir un *cut-off* de Log-Ratio per formar el conjunt dels gens que s'hi utilitzarà (*gene set*). ORA és una bona eina per veure els efectes grans però els efectes petits se li escapen. Els efectes petits derivats dels gens individuals poden acumular-se en un efecte conjunt substancial el qual ORA no serà capaç de detectar. És aquí on GSEA mostra la seva utilitat.

Els apartats d'anàlisi (GO, KEGG i Reactome) ofereixen tan representacions comunes com representacions específiques.

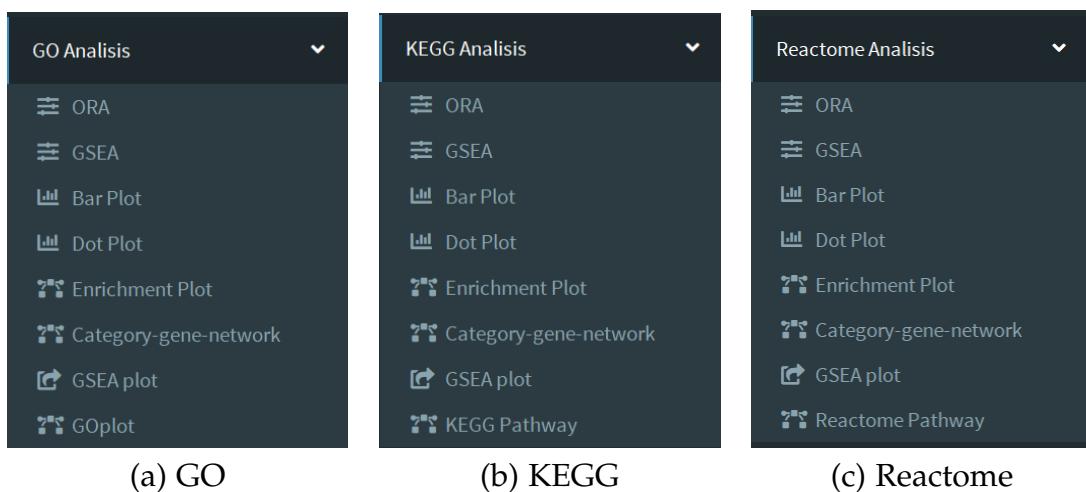
Els anàlisis i representacions en comú són:

- Taula dels resultats ORA;
- Taula dels resultats GSEA;
- Gràfic de barres del resultat ORA;
- Gràfic de punts del resultat ORA;
- El mapa d'enriquement (Enrichment Map);
- La xarxa dels gens en categories (Category-gene-network);
- El gràfic de GSEA.

Les anàlisis específics són:

- GO → Gràfic GO
- KEGG → Rutes de la base de dades KEGG
- Reactome → Rutes de la base de dades Reactome

4 L'aplicació



imatge 4.3: Els elements de les seccions d'anàlisi

4.1 ORA

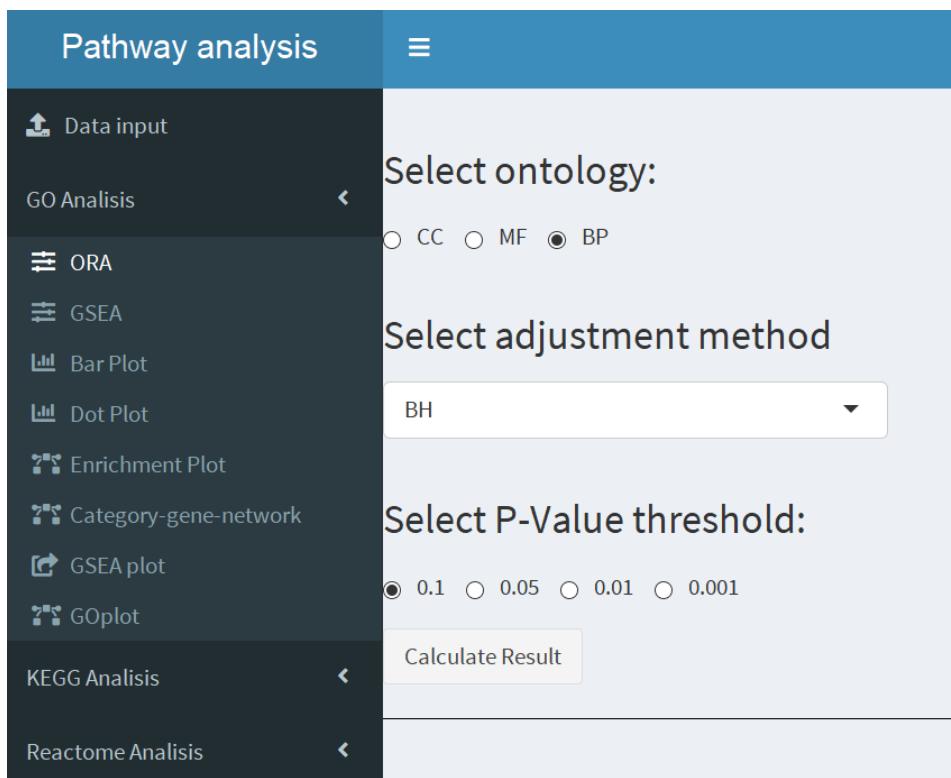
4.1.1 GO

Per realitzar l'anàlisi ORA per a termes GO s'utilitza la funció `enrichGO` del paquet `clusterProfiler`.

He implementat els valors per defecte amb la possibilitat per a l'usuari d'elegir entre:

- Ontologies GO
 - Molecular function, Biological proces, Cellular Components;
- Nivell de significació basant-se en els valors de P ajustats
 - 0.1, 0.05, 0.01, 0.001;
- Mètode d'ajustament
 - Holm; Hochberg; Hommel; Bonferroni; BH; BY; FDR; None.

4 L'aplicació



imatge 4.4: Especificació d'ORA dels termes GO

L'execució de la funció és un procès temporalment costós. Per aquest motiu he afegit el botó d'acció, en lloc de deixar la funció reactiva. D'aquesta manera l'usuari ha de fer una decisió conscient de repetir l'anàlisi amb altres valors.

Prement el botó apareix la taula i el botó nou mitjançant el qual l'usuari pot descarregar els resultats en format .csv. He formatejat la taula amb els paquets knitr, kableExtra, formattable i dplyr. Amb els dos últims he afegit les barres de color pel nombre dels gens diferencialment expressats del terme específic de GO i la gradació de color del verd fins al vermell pels valors dels més petits fins els més grans.

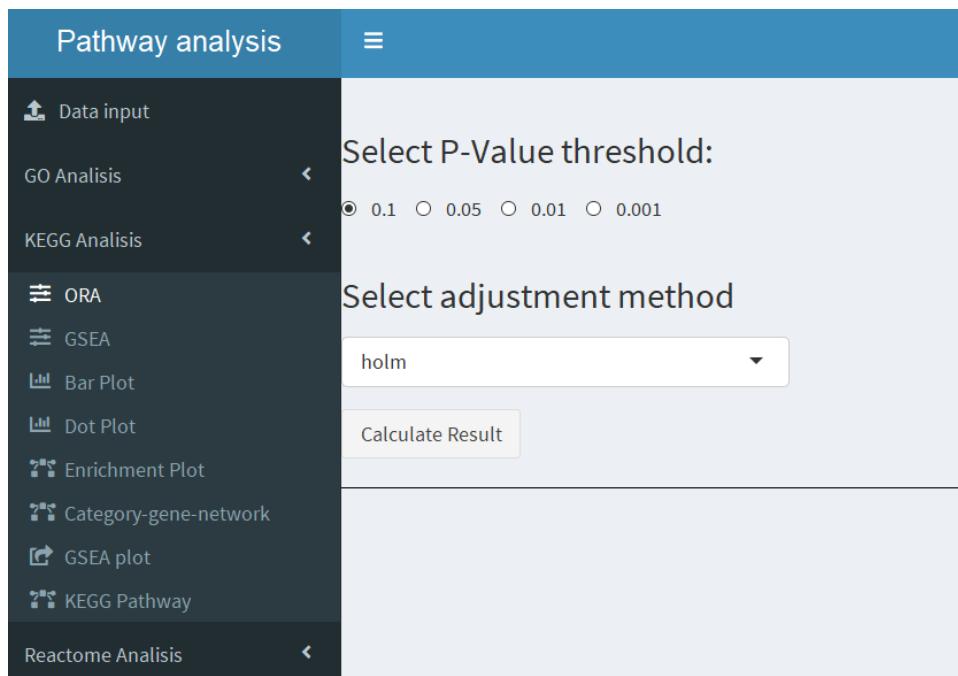
4 L'aplicació

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	Count	genelD
GO:0140014	mitotic nuclear division	33/193	232/11468	0.000	4.00e-18	0.000	33	CDCA8/CDC20/KIF23/CENPE/MYBL2/CCNB2/I
GO:0000280	nuclear division	35/193	316/11468	0.000	4.50e-16	0.000	35	CDCA8/CDC20/KIF23/CENPE/MYBL2/CCNB2/I

Imatge 4.5: El resultat d'anàlisi ORA. GO.

4.1.2 KEGG

Per l'ORA de base de dades KEGG he utilitzat la funció `enrichKEGG()` del paquet `clusterProfiler`.



Imatge 4.6: Configuració d'anàlisi KEGG

Una vegada introduïts els paràmetres i premut el botó **Calculate** apareix el

4 L'aplicació

botó **Download .csv** i la taula previsualitzada. Els camps de la taula són els mateixos com en l'anàlisi dels termes GO.

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	Count	geneID
hsa04110	Cell cycle	11/92	124/7841	0.000	3.48e-05	0.000	11	8318/991/9133/890/983/4085/7272/1111/891/4174/9232
hsa04114	Oocyte meiosis	10/92	125/7841	0.000	1.70e-04	0.000	10	991/9133/983/4085/51806/6790/891/9232/3708/5241
hsa04218	Cellular senescence	10/92	160/7841	0.000	1.04e-03	0.001	10	2305/4605/9133/890/983/51806/1111/891/776/3708

Imatge 4.7: El resultat de l'anàlisi ORA. KEGG.

4.1.3 Reactome

En el cas de Reactome el procediment és similar. La funció usada és `enrichPathway()` del paquet `ReactomePA`:

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	Count	geneID
R-HSA-2500257	Resolution of Sister Chromatid Cohesion	15/142	124/10554	0.000	4.38e-06	0.000	15	CDCA8/CDC20/CENPE/CCNB2/NDC80/SKA1/CENP
R-HSA-68877	Mitotic Prometaphase	18/142	198/10554	0.000	2.83e-06	0.000	18	CDCA8/CDC20/CENPE/CCNB2/NDC80/NCAPH/SKAP1
R-HSA-69620	Cell Cycle Checkpoints	21/142	293/10554	0.000	4.30e-06	0.000	21	CDC45/CDCA8/MCM10/CDC20/CENPE/CCNB2/NDC80
R-HSA-1100000	Mitotic Spindle	13/142	112/10554	0.000	9.01e-06	0.000	13	CDCA8/CDC20/CENPE/NDC80/UBE2C/SKA1/CENP

Imatge 4.8: El resultat d'anàlisi ORA. Reactome.

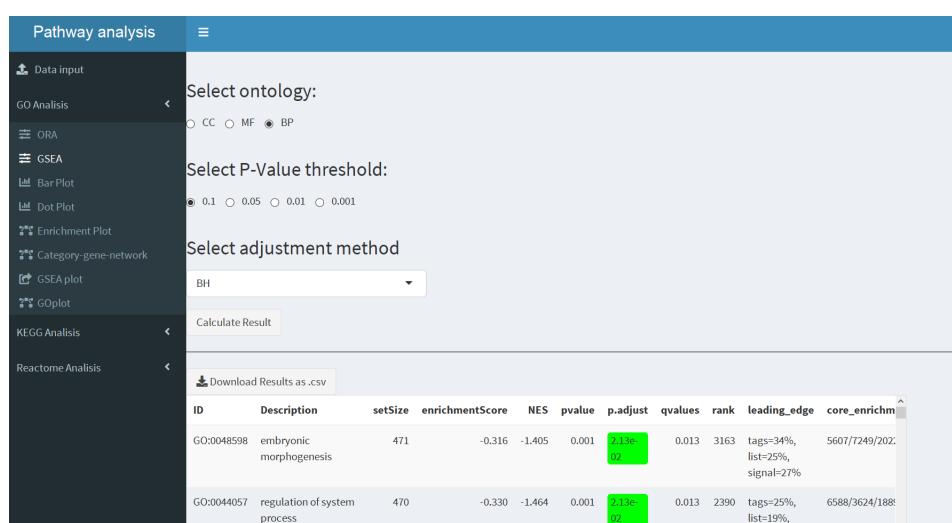
4 L'aplicació

4.2 GSEA

4.2.1 GO

El mètode GSEA per a termes GO es calcula amb la funció `gseGO()` del paquet `clusterProfiler`.

L'usuari pot elegir l'ontologia GO, el *cut-off* del valor P i el mètode d'ajustament.

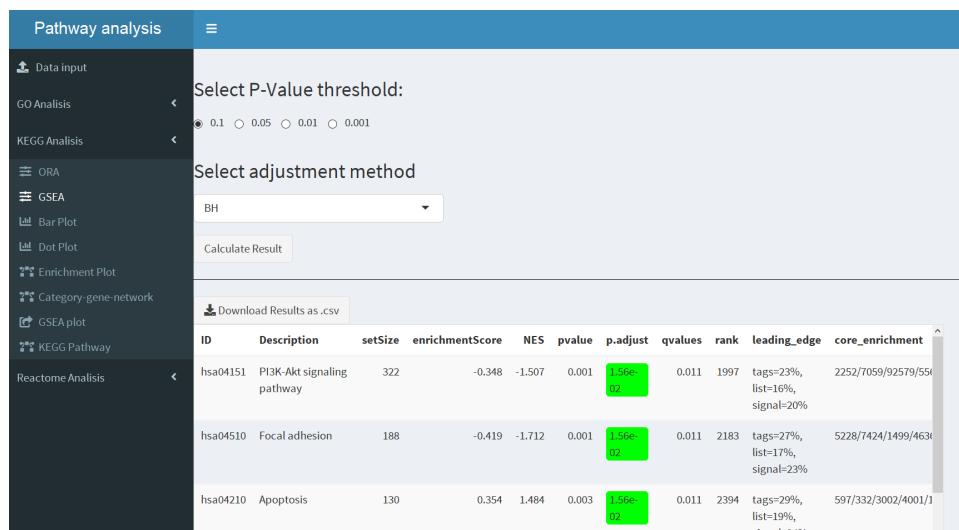


imatge 4.9: El resultat de l'anàlisi GSEA. GO.

4.2.2 KEGG

De la mateixa manera es calcula GSEA amb la funció `gseKEGG()` del paquet `clusterProfiler`:

4 L'aplicació



imatge 4.10: El resultat de l'anàlisi GSEA. KEGG.

4.2.3 Reactome

Per completar l'anàlisi l'usuari pot calcular GSEA per a base de dades Reactome. Com als altres casos utilitzo el paquet `clusterProfiler` i específicament la funció `gsePathway()`

4 L'aplicació

The screenshot shows the 'Pathway analysis' interface. On the left, a sidebar lists analysis types: GO Analysis, KEGG Analysis, Reactome Analysis, ORA, GSEA, Bar Plot, Dot Plot, Enrichment Plot, Category-gene-network, GSEAplot, and Reactome Pathway. The main area has two dropdown menus: 'Select P-Value threshold:' (set to 0.1) and 'Select adjustment method:' (set to BH). A 'Calculate Result' button is below these. At the bottom is a 'Download Results as .csv' button. A table displays enrichment results:

ID	Description	setSize	enrichmentScore	NES	pvalue	p.adjust	qvalues	rank	leading_edge	core_enrichment
R-HSA-9006934	Signaling by Receptor Tyrosine Kinases	416	-0.340	-1.489	0.001	1.32e-02	0.006	2788	tags=28%, list=22%, signal=22%	5580/2242/5802/9101
R-HSA-1474244	Extracellular matrix organization	266	-0.458	-1.922	0.001	1.32e-02	0.006	1943	tags=33%, list=16%, signal=29%	8038/11132/4017/1281
R-HSA-5693538	Homology Directed Repair	102	0.558	2.283	0.003	1.32e-02	0.006	1990	tags=37%, list=16%, signal=32%	10635/890/1111/9156

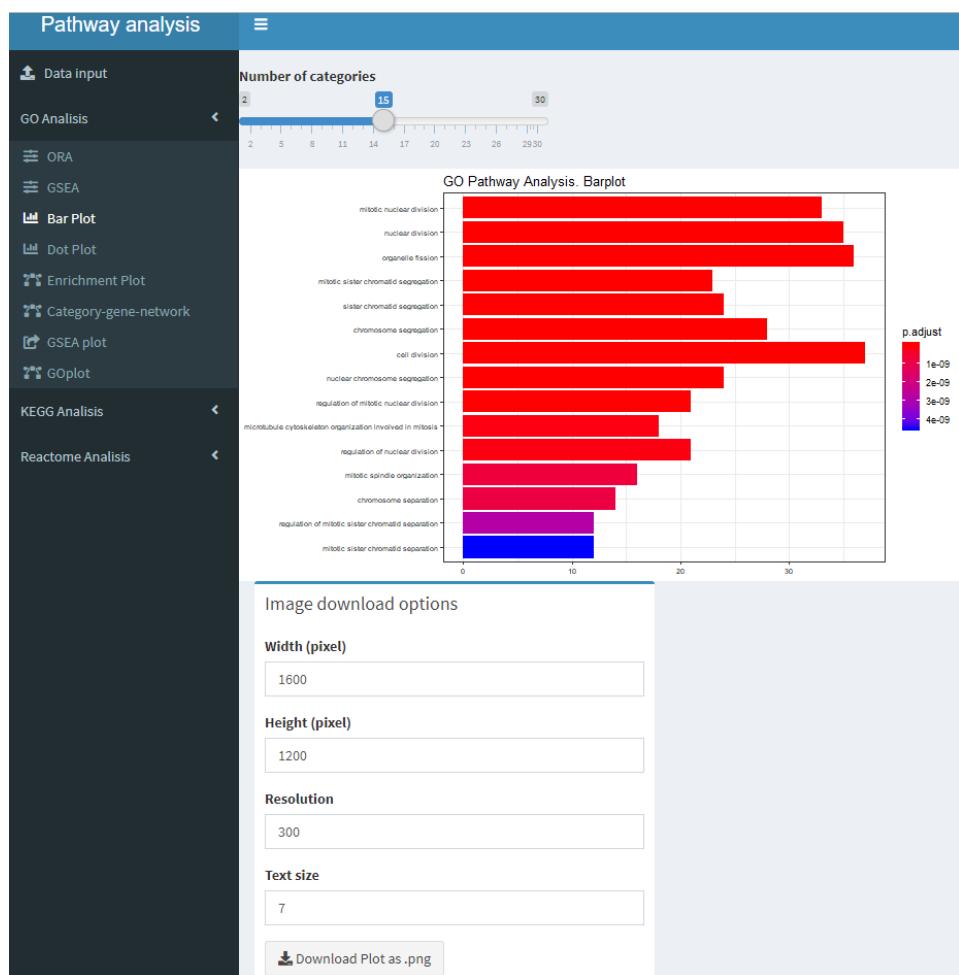
imatge 4.11: El resultat d'anàlisi GSEA. Reactome.

4.3 Visualització i l'anàlisi topològic

4.3.1 Bar-Plots

Els resultats de enrichGO, enrichKEGG i enrichPathway es poden visualitzar amb el gràfic de barres. L'usuari pot elegir el nombre de les categories visualitzades entre 2 i 30. Es dona l'opció per descarregar el gràfic en format .png.

4 L'aplicació

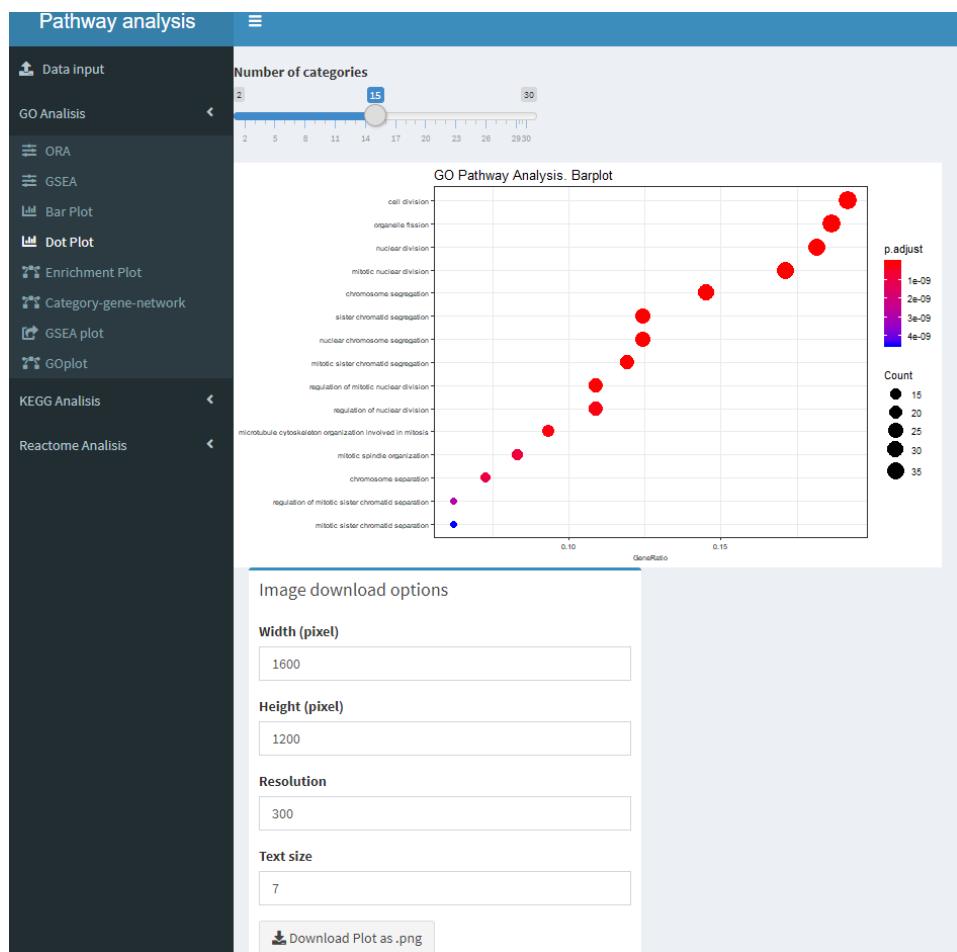


Imatge 4.12: Bar-Plot. GO.

4.3.2 Dot-Plots

El *dot plot* visualitza addicionalment el *gen ratio*. També aquí l'usuari pot seleccionar el nombre de categories.

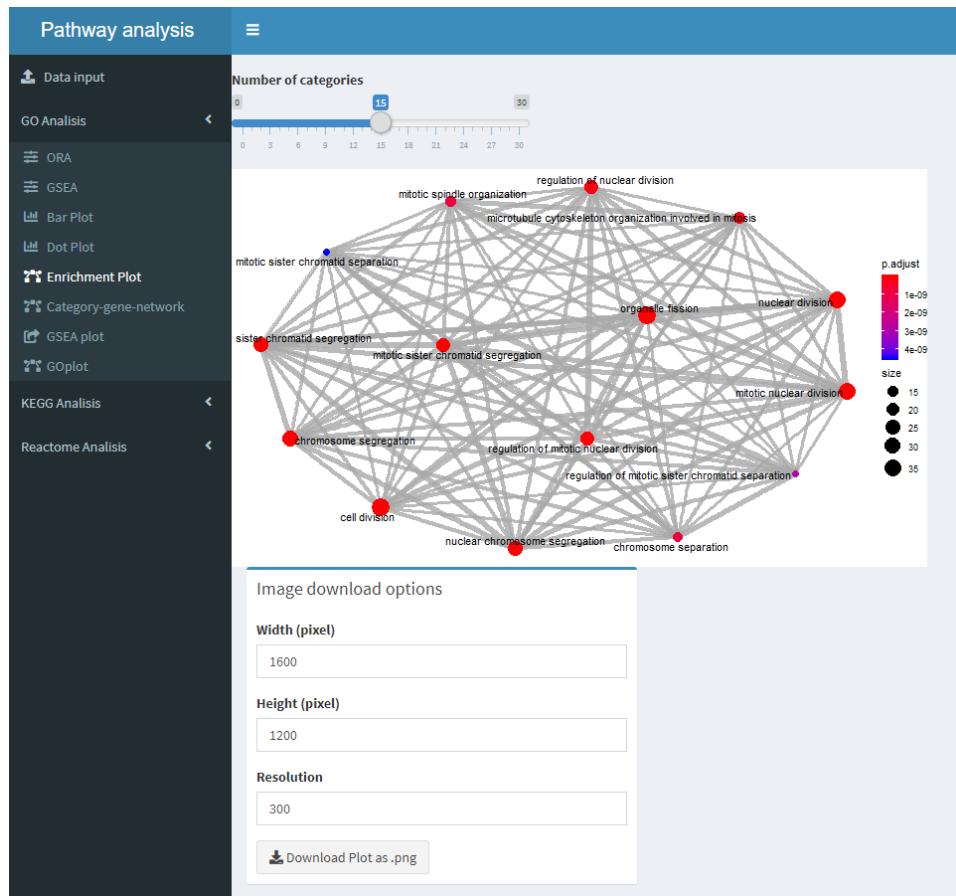
4 L'aplicació



Imatge 4.13: Bar-Plot. GO.

4 L'aplicació

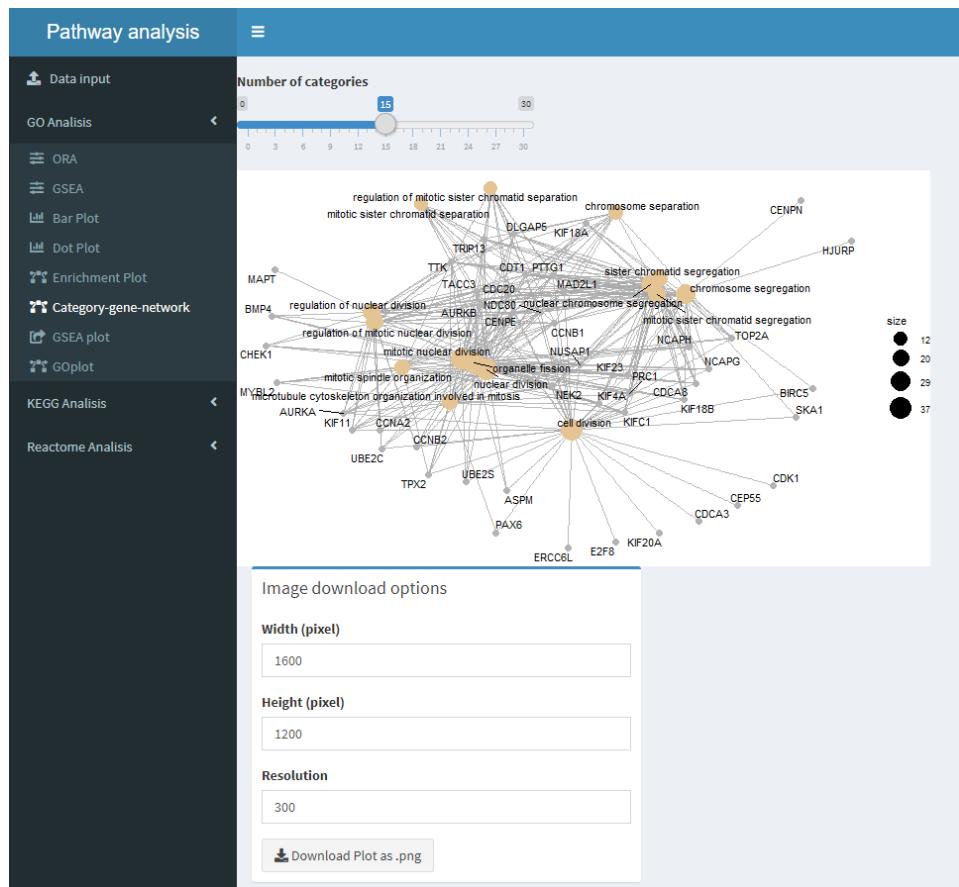
4.3.3 Enrichment Plots



imatge 4.14: Bar-Plot. GO.

4 L'aplicació

4.3.4 Category-Gene-Network Plot

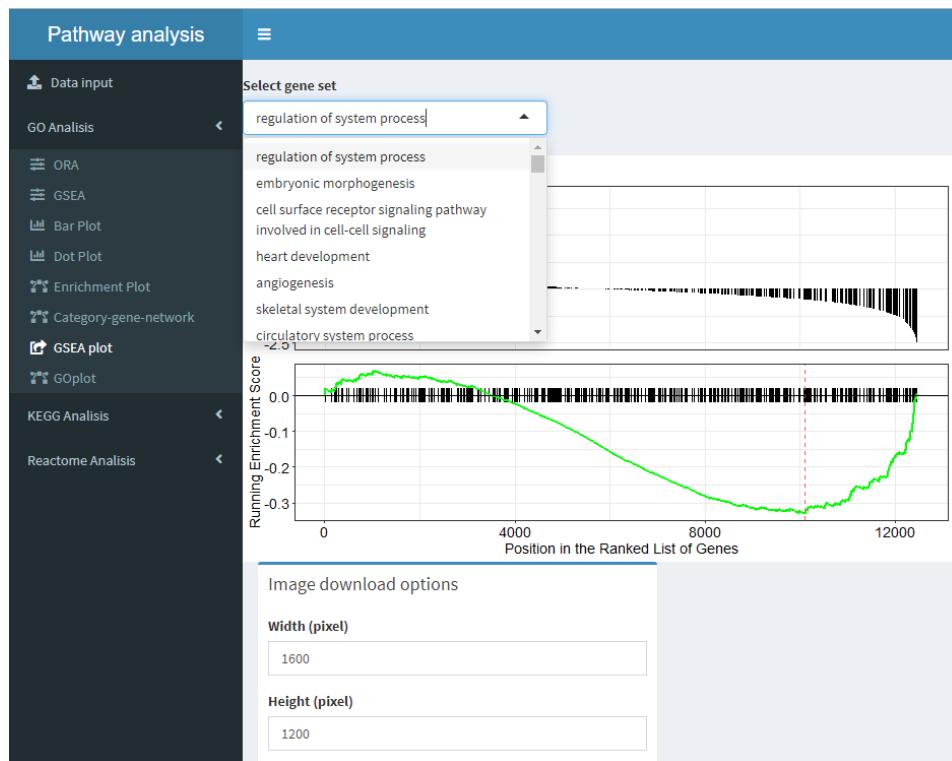


Imatge 4.15: Category-Gene-Network Plot. GO.

4.3.5 GSEA Plot

L'usuari pot visualitzar una de les categories disponibles via *dropdown list*. El llistat inclou totes les rutes generades durant l'anàlisi GSEA en els apartats *Go Analysis*→*GSEA*; *KEGG*→*GSEA*

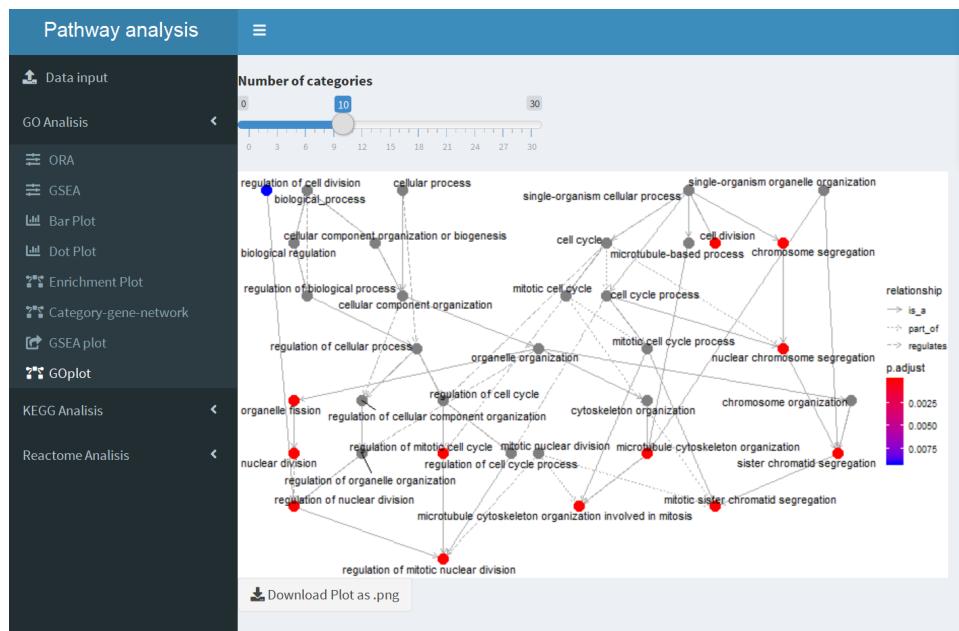
4 L'aplicació



imatge 4.16: GSEA Plot. GO.

4 L'aplicació

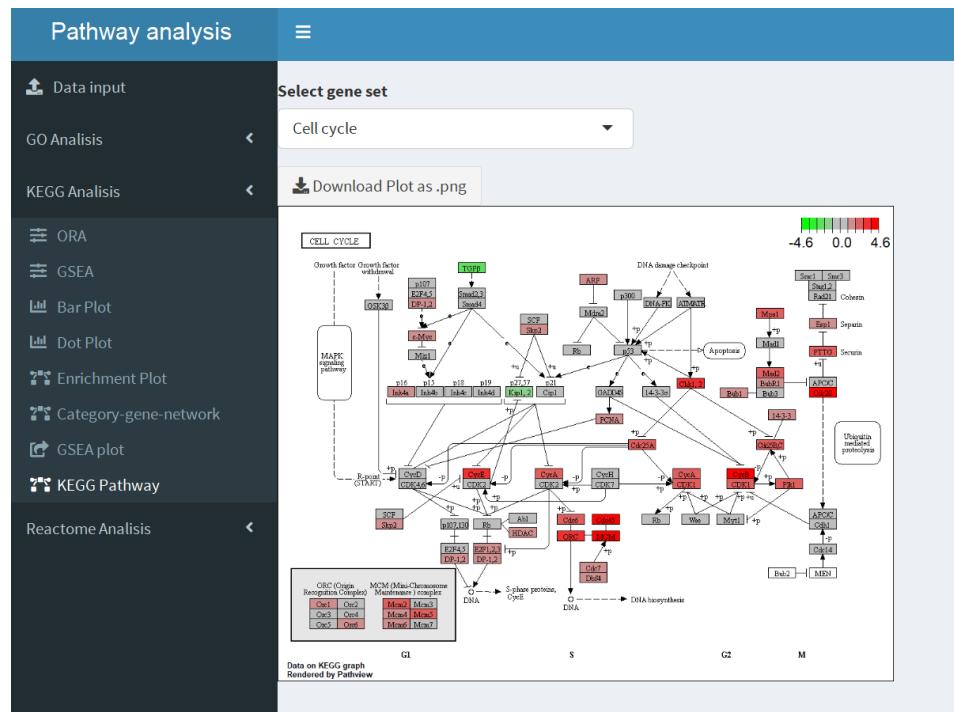
4.3.6 GO Plot



imatge 4.17: GO Plot

4 L'aplicació

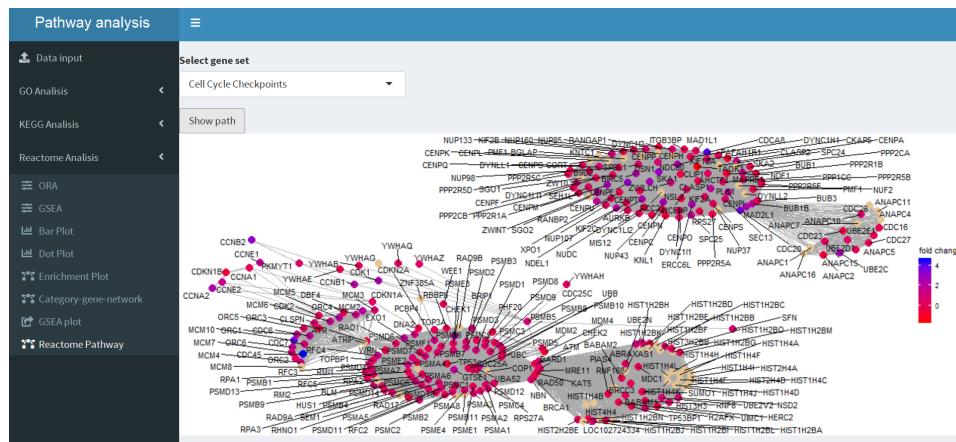
4.3.7 KEGG Pathway



Imatge 4.18: KEGG pathway

4 L'aplicació

4.3.8 Reactome Pathway

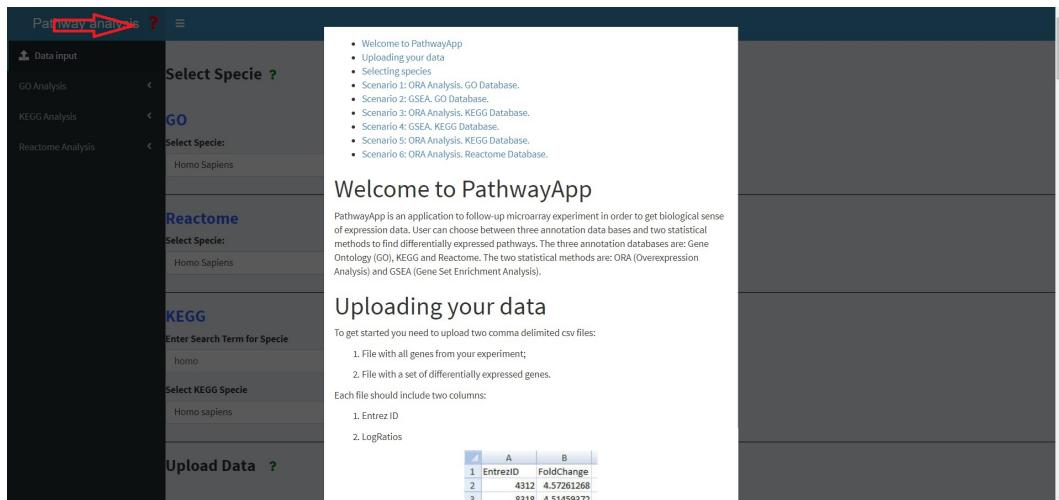


Imatge 4.19: Reactome pathway

4.4 Manual i les ajudes del programa

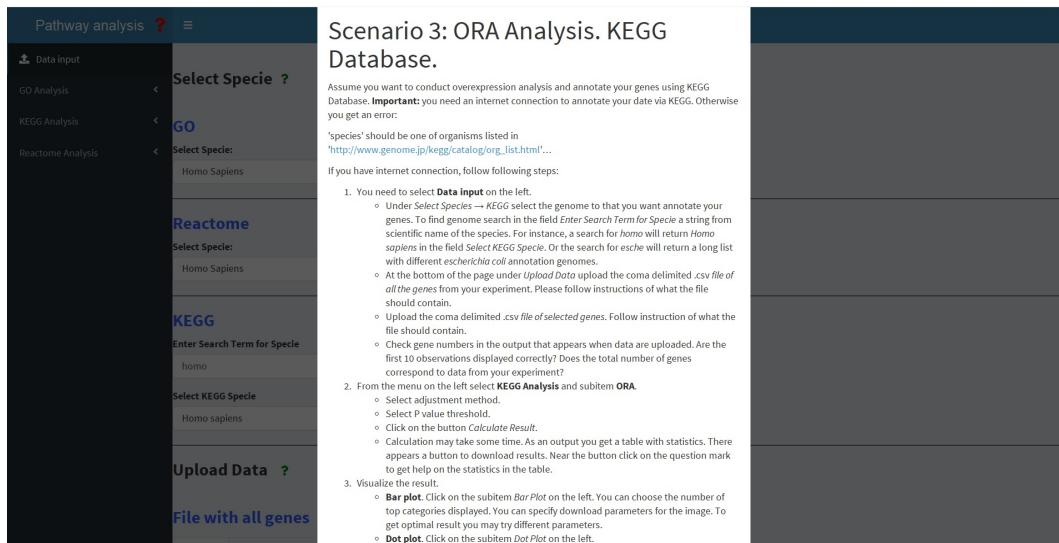
Per facilitar l'ús de l'aplicació he pensat com es podria fer de manera més intuïtiva possible. Primer cal destacar que com a llengua de manual he elegit l'anglès per poder fer l'ús de l'aplicació el més inclusiu possible. Segon, l'usuari pot accedir tant al manual com a l'ajuda, que es guarden en arxius .Md separats. Per accedir al manual l'usuari ha de clicar al símbol d'interrogació a prop del títol **Pathway analysis**:

4 L'aplicació



Imatge 4.20: Manual per a aplicació

Com es veu hi ha apartats diferents. Dependent dels objectius de l'usuari, aquest pot seleccionar l'apartat que més l'interessi. Així, si l'usuari vol fer l'anàlisi ORA amb l'anotació KEGG pot navegar en la secció —textbf{Scenario 3: ORA Analysis. KEGG Database}.

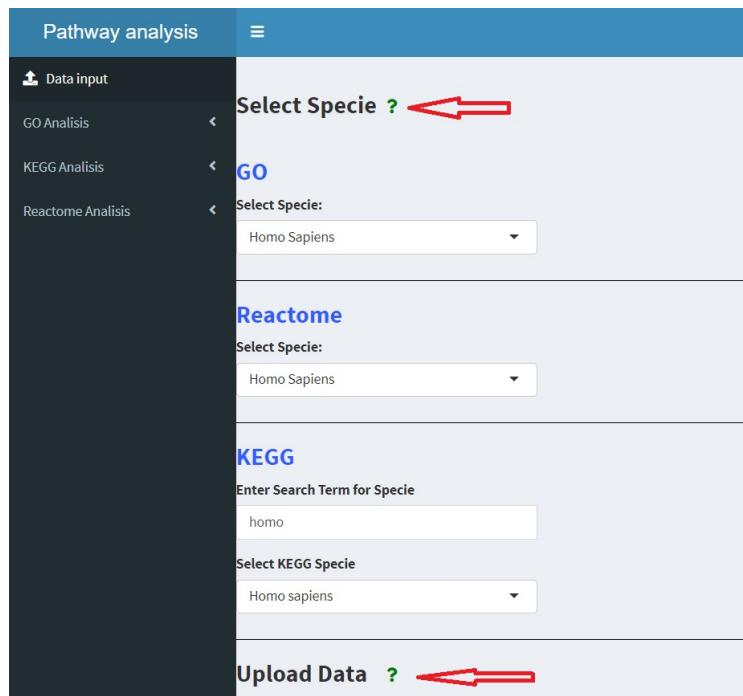


Imatge 4.21: Manual per a l'anàlisi ORA amb l'anotació KEGG

4 L'aplicació

També, l'usuari pot accedir a l'ajuda clicant als símbols d'interrogació distribuïts per l'aplicació en els llocs que penso que poden generar dubtes.

Per fer-ho possible s'utilitza el paquet `shinyhelper` que s'instal·la en executar la funció `runPathwayApp()`.

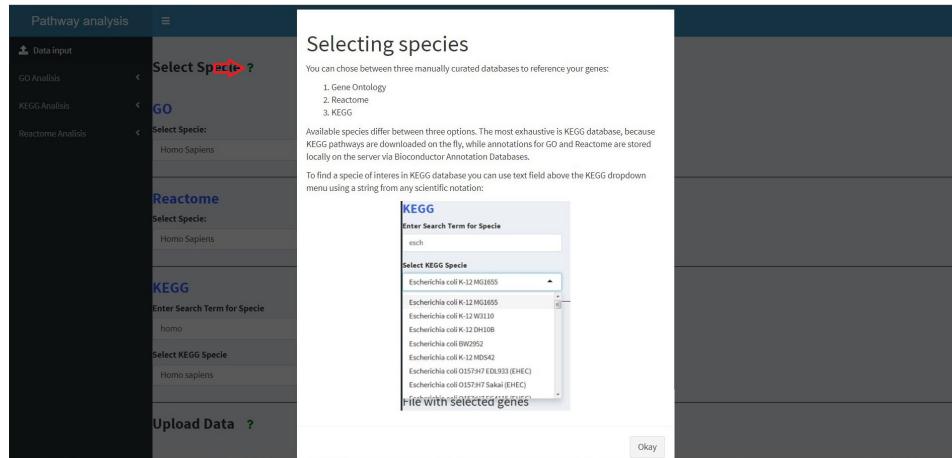


imatge 4.22: Senyals d'ajuda

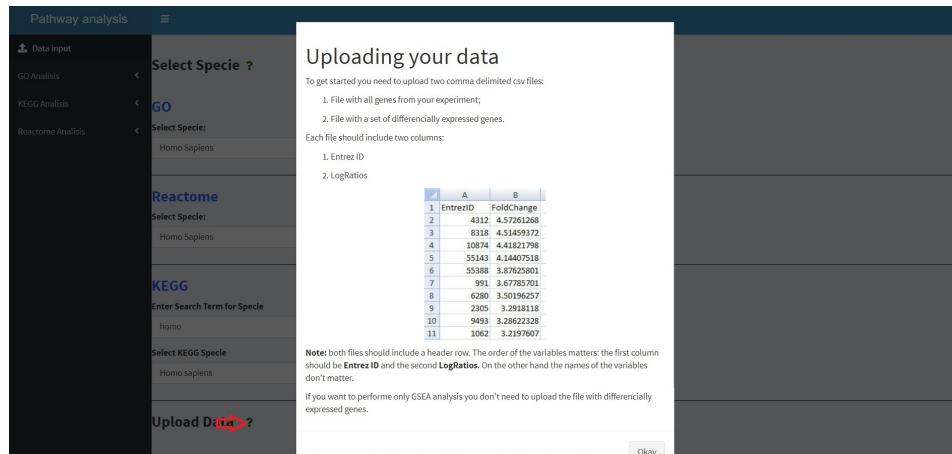
El clic en aquests senyals fa que aparegui una finestreta amb la informació d'ajuda.

Aquí hi ha informació de l'apartat **Data Input**:

4 L'aplicació



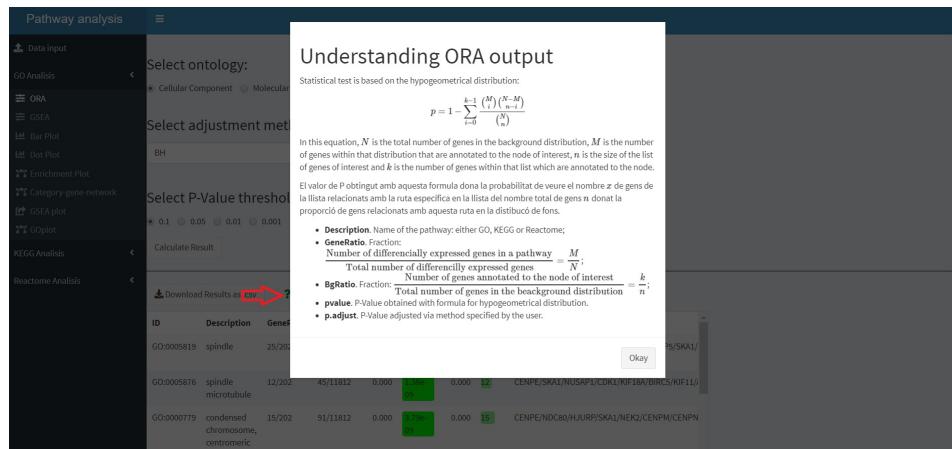
Imatge 4.23: Ajuda per a l'elecció de l'espècie



Imatge 4.24: Ajuda per pujar les dades

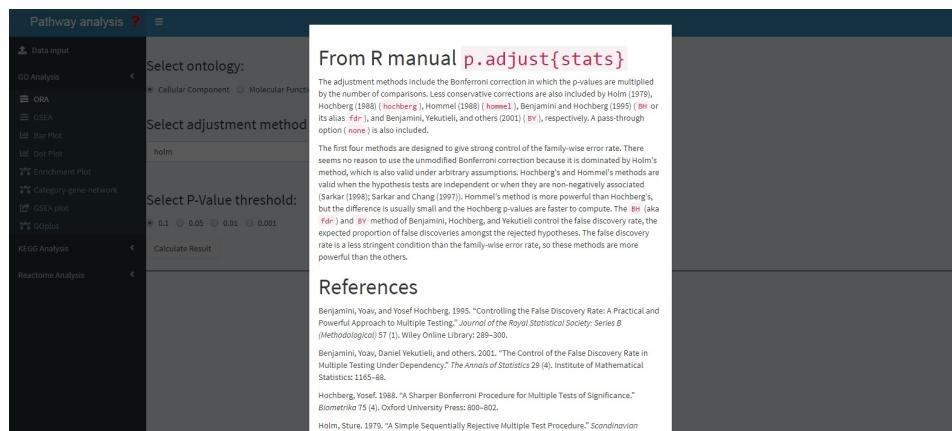
Les informacions per a l'apartat ORA són les següents:

4 L'aplicació



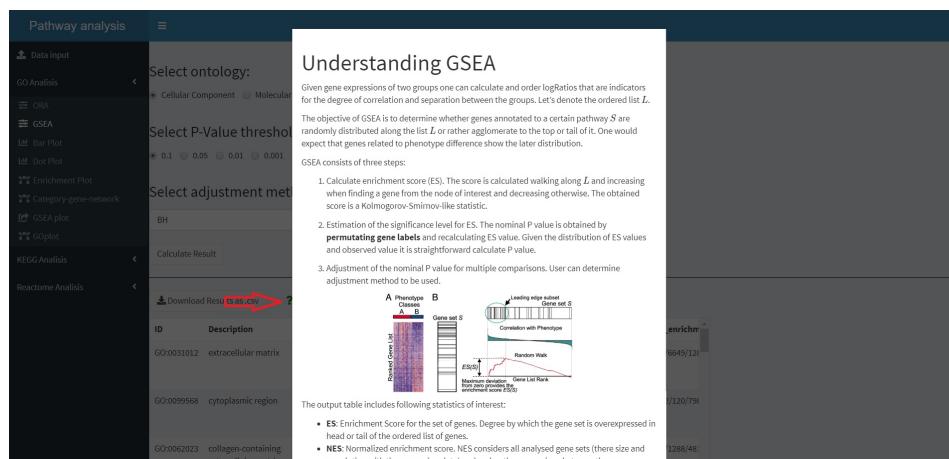
Imatge 4.25: Infromació per la interpretació d'anàlisi ORA

Aquí cal destacar que les fòrmules, depenen de l'ordinador, no apareixen degudament en el RStudio Browser. Sí que apareixen bé quan l'aplicació s'obre via l'internet browser. L'usuari ha de tenir connexió amb internet perquè l'aplicació pugui descodificar la fòrmula via MathJax. Encara no he trobat la causa per la qual el Rstudio Browser en alguns ordinadors no visualitza bé les fòrmules. Pot ser un problema amb Java, que s'ha d'actualitzar? Ho estic investigant.



Imatge 4.26: L'ajuda per a la selecció del mètode d'ajustament

4 L'aplicació



Imatge 4.27: Ajuda per la interpretació de GSEA

5 Validació dels resultats

L'anàlisi de les rutes representa l'últim pas de l'anàlisi d'expressions. Per dur a terme l'anàlisi de rutes és necessari tenir unes dades que ja estiguin processades prèviament (normalització, càcul de les LogRatios, ajustament dels gens repetits a l'array, selecció dels gens diferencialment expressats, etc.). Les dades de [GEO \(Gene Expression Omnibus\)](#) estan però disponibles com a màxim en format normalitzat. Caldria doncs fer una anàlisi per arribar a un llistat de gens diferencialment expressats amb les logRatios per tots els gens de la mostra. Fer això no seria cap problema i de fet ho he fet per altres estudis. El problema és que arribo a resultats diferents dels resultats dels estudis d'on provenen les dades. Per tant les dades que entraria a l'aplicació serien diferents de les dades de l'estudi i lògicament amb aquesta comprovació no comprovo el que realment m'interessa. He procedit a contactar el meu professor per si tindria (o coneixeria) dades preprocessades fins a un llistat de gens amb logRatios i amb el set de gens diferencialment expressats, per tal que les pugui utilitzar en la meva aplicació. El meu professor m'ha redirigit, entre altres enllaços molt útils, al seu repositori en [github.com](#).

Estudi	GEO ID	Especie	Tipo d'experiment	Font
[Schmidt et al., 2008]	GSE11121	Homo sapiens	Microarrays	Paquet DOSE de Bioconductor
[Li et al., 2017]	GSE100924	Mus musculus	Microarrays	Github Sanchez Pla
[Farmer et al., 2005]	GSE1561	Homo sapiens	Microarrays	Github Sanchez Pla
[Hengel et al., 2003]	DAVID Demo List 1	Homo sapiens	Microarrays	DAVID

Les dades de [Schmidt et al., 2008], que s'utilitzen en els vignettes de clusterProfiler i ReactomePA, ja les he mostrat en gran part a dalt quan explicava el contingut de l'aplicació. Els resultats obtinguts amb l'aplicació són iguals als resultats en els vignettes mencionats. Procediré doncs amb l'exemple basat en les dades de [Li et al., 2017] .

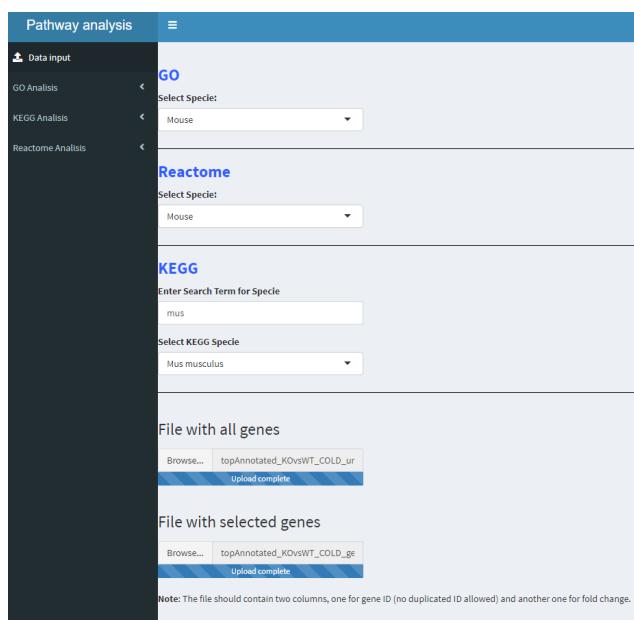
5 Validació dels resultats

5.1 Exemple d'anàlisi 1. GEO: GSE100924

[Li et al., 2017] analitzen l'associació del gen *Zbtb7b* amb la producció de les grasses marons que al seu torn influeixen termogenèsi i processos metabòlics diferents. D'aquesta manera les grasses marons són importants per a tractament dels disorders metanòlics.

Les dades d'estudi són ja preprocessades per Ricardo Gonzalo Sanz i Sanchez Pla i estan disponibles a [github](#). De la carpeta *results* he agafat la taula *topAnnotated_KOvsWT_COLD.csv*. Sanz i Pla utilitzen el paquet ReactomePA per a l'anàlisi d'enriquiment. Repeteixo doncs el seu anàlisi utilitzant l'aplicació.

1. Ellegeixo l'espècie *Mus musculus* per a GO, KEGG i Reactome.



imatge 5.1: Selecció d'espècie

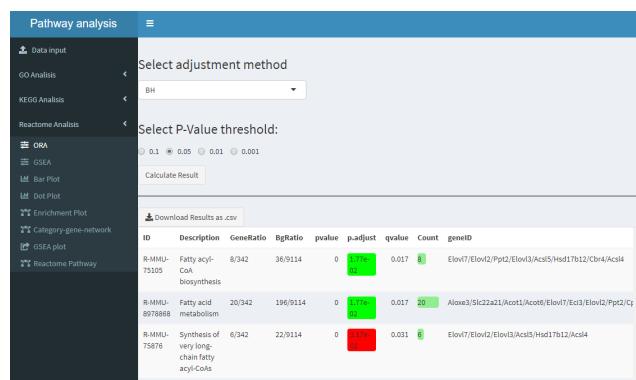
L'output a baix indica que s'ha pujat el total de 5995 gens. Per a l'arxiu dels gens seleccionats l'aplicació diu que s'han pujat 769 gens.

5 Validació dels resultats

Note: The file should contain two columns, one for gene ID (no duplicated ID allowed) and another one for fold change.	
You uploaded: 5995 genes	
First 10 entries	
Entrez ID FoldChange	
108664 -0.420	
319263 0.049	
59014 -0.143	
109294 0.114	
320492 -1.454	
98711 0.072	
17087 -0.553	
75712 -0.384	
14869 -0.378	
27993 -0.113	
You selected: 769 genes	
First 10 entries	
Entrez ID FoldChange	
320492 -1.454	
50785 0.743	

Imatge 5.2: Selecció d'espècie

- Clico en l'apartat *Reactome Analysis*→ORA. Selecciono com a mètode d'ajustament BH i el cut-off del valor de P ajustat 0.05. Clico a *Calculate results*



Imatge 5.3: Resultat d'anàlisi ORA de Reactome

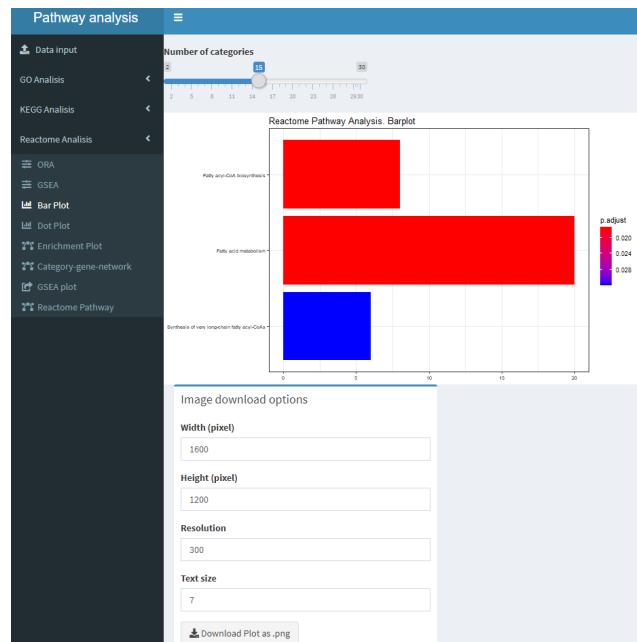
Observem que les rutes mostrats són els mateixos esmentats per Sanz i Pla. També destaquem que el resultat conicideix amb les torbades d'estudi de [Li et al., 2017]. S'observa la perturbació de les rutes relacionades amb les grasses marrons **Fatty acyl-CoA biosynthesis** i **Fatty-acid metabolism**.

- Visualització del resultat ORA

5 Validació dels resultats

L'aplicació permet visualitzar els resultats obtinguts amb la ORA.

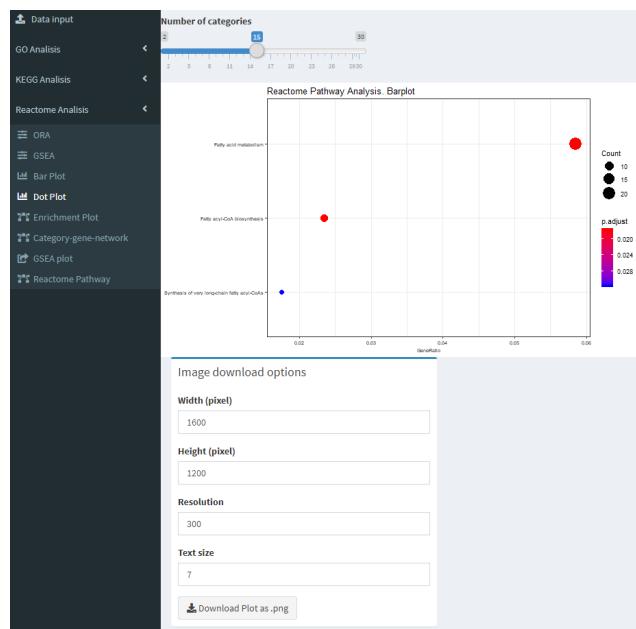
- Selecciono *Reactome Analysis*→*Bar Plot*



Imatge 5.4: Gràfic de barres

- Selecciono *Reactome Analysis*→*Dot Plot*

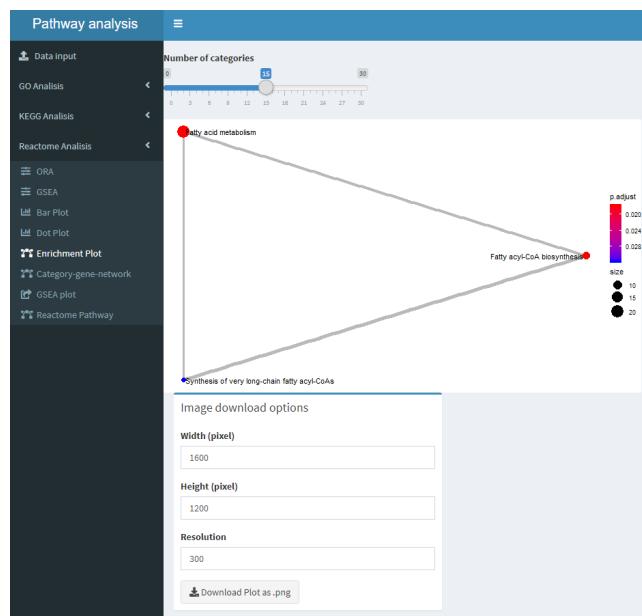
5 Validació dels resultats



Imatge 5.5: Gràfic de punts

- Seleccionso *Reactome Analysis*→*Enrichment Map Plot*

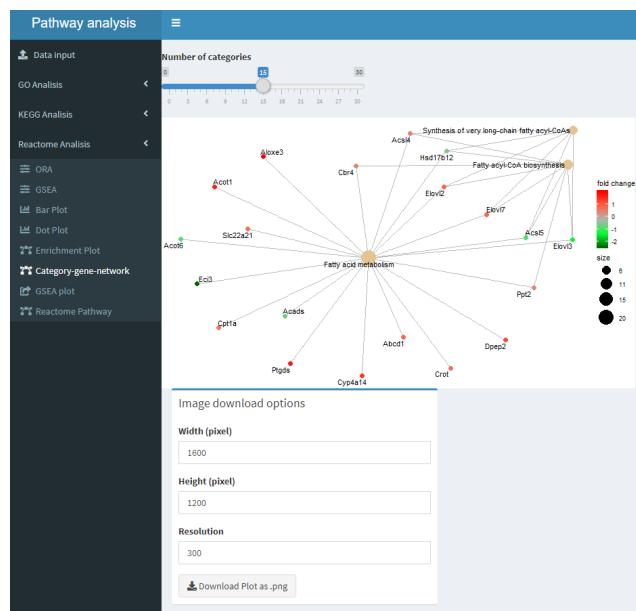
5 Validació dels resultats



Imatge 5.6: Mapa d'enriquement

- Seleccio de *Reactome Analysis* → *Category Gene Network*. Aquesta visualització incorpora les gens individuals de la ruta i el magnitud de la seva expressió diferencial. Observem que el gen *Evol3* està sotaexpressat, tal com es comenta al paper de [Li et al., 2017].

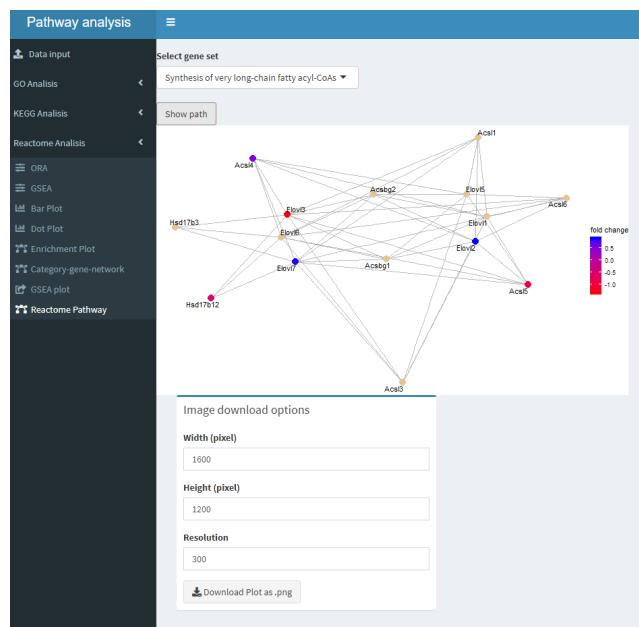
5 Validació dels resultats



Imatge 5.7: Red de les categories i gens

- Selecciono *Reactome Analysis* → *Reactome Pathway*

5 Validació dels resultats

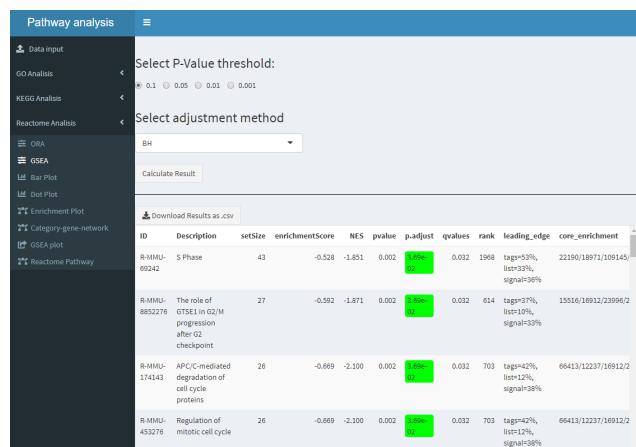


Imatge 5.8: Rutes Reactome

Addicionalment a l'anàlisi ORA podem fer, mitjançant l'aplicació, l'anàlisi GSEA per les rutes de Reactome. Per fer-ho:

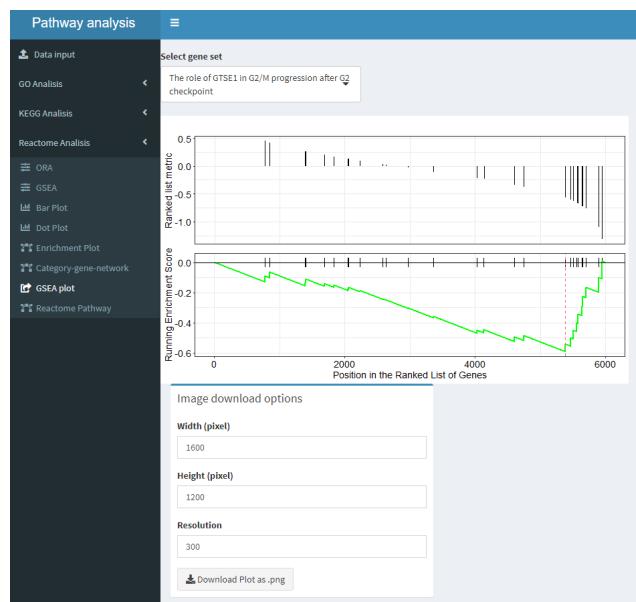
1. Clico en l'apartat *Reactome Analysis* → *GSEA*. Seleccioño com a mètode d'ajustament *BH* i el cut-off del valor de *P* ajustat 0.05. Clico a *Calculate results*
Amb el valor de *P* de 0.05 l'anàlisi no troba cap ruta enriquida.
2. Augmento el Cut-Off del valor de *P* a 0.1
Amb el Cut-Off més alt l'aplicació retorna un llistat de gens.

5 Validació dels resultats



Imatge 5.9: Anàlisi GSEA

3. Per obtenir els gràfics GSEA anem a *Reactome Analysis*→*GSEA plot*

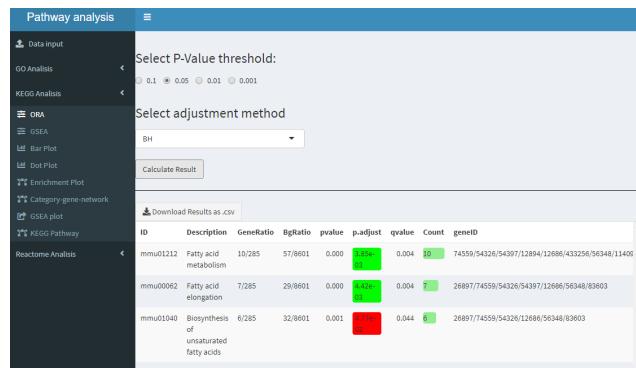


Imatge 5.10: Gràfic GSEA

També podem fer l'anàlisi de KEGG. El resultat de KEGG és similar a l'anàlisi de Reactome. L'aplicació permet però generar les rutes KEGG. Per obtenir-les:

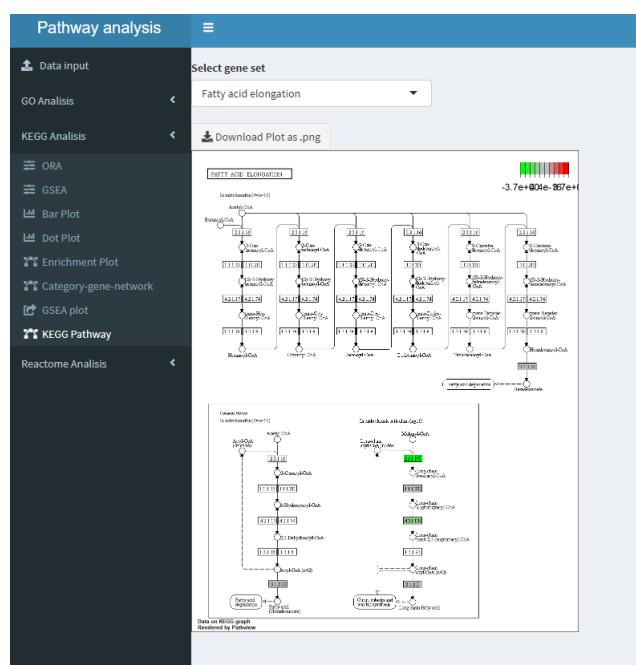
5 Validació dels resultats

1. Clico en l'apartat *KEGG Analysis*→*ORA*. Selecciono com a mètode d'ajustament *BH* i el cut-off del valor de P ajustat 0.05. Clico a *Calculate results*



Imatge 5.11: Anàlisi ORA de KEGG

2. Anem a *KEGG*→*KEGG Pathway*

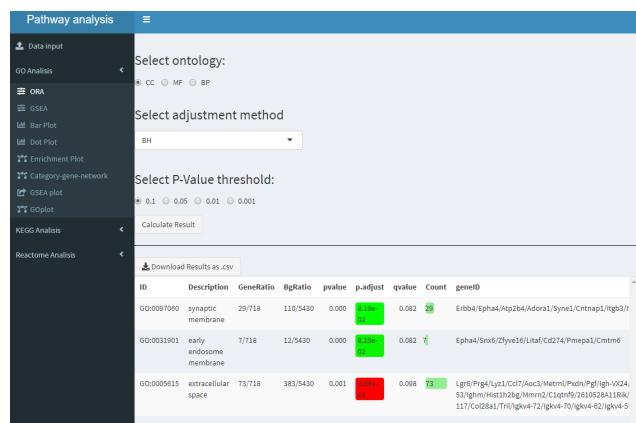


Imatge 5.12: Gràfic de les rutes KEGG

5 Validació dels resultats

L'anàlisi GO no retorna cap terme GO amb el nivell de significació de 0.05. Pujant el nivell de significació fins 0.1 retorna un llistat dels termes enriquits per als components cel·lulars.

Clico en l'apartat *GO Analysis* → *ORA*. Selecciono com a mètode d'ajustament *BH* i el cut-off del valor de P ajustat 0.1. Selecciono també *CC*. Clico a *Calculate results*



Imatge 5.13: L'anàlisi ORA de GO

6 Conclusió

Al treball final he tingut com a objectiu la creació d'una aplicació per a l'anàlisi de les rutes. Primer he determinat que és l'anàlisi de les rutes i on es situa a l'anàlisi global d'expressió genètica. He explicat que l'anàlisi de les rutes és l'últim pas de l'anàlisi d'expressió gènica on es prenen fer sentit biològic de les dades d'expressió. Per dur a terme aquesta anàlisi s'utilitza una llista dels gens diferencialment expressats i els logRatios de tots els gens d'experiment. He explicat que es necessari anotar aquests gens a les bases existents per poder agrupar-los als conceptes (o rutes). He triat les bases de dades més coneguts i que són utilitzades pels paquets de Bioconductor. Aquestes bases de dades són: GO (Gene Ontology), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) i Reactome. He descrit quins mètodes existen per calcular la significació biològica de les rutes. Entre altres he identificat tres estratègies: ORA (Over-Representation Analysis), FCS (Functional Class Scoring) i l'anàlisi topològic de les rutes. He descrit amb més detall les mètodes ORA i GSEA i també he identificat les possibilitats per visualitzar les rutes. Després de formular un protocol d'anàlisi he buscat i identificat els paquets de Bioconductor que permeten aplicar els mètodes descrits. Entre altres he triat clusterProfiler, ReactomePA i pathview. He posat aquests paquets com a base per la futura aplicació. El resultat era l'aplicació dividida en quatre apartats: 1) Entrada de les dades; 2) Anàlisi amb la base d'anotació GO; 3) L'anàlisi amb la base d'anotació KEGG i l'anàlisi amb la base d'anotació Reactome. Per a cada base de dades l'usuari pot fer ORA, GSEA i obtenir visualització de la topologia de les rutes. L'aplicació permet descargar els resultats com a l'arxiu .csv i imatges .png, les quals l'usuari pot personalitzar. La validació dels resultats ha mostrat una bona coincidència amb l'estudi triat per validar les dades. Aquest estudi investiga l'impacte del gen *Zbtb7b* sobre la producció de les grasses marrons. Justament les rutes relacionades amb el síntesi de grasses marrons estaven identificades amb l'aplicació. L'aplicació pot ser descargada

6 Conclusió

i instal·lada llibrement del repositori GitHub i la via per fer-ho s'explica a la memòria. Actualment es busca el mètode per publicar l'aplicació a l'internet per fer-la encara més accessible.

Bibliography

- [Boyle et al., 2004] Boyle, E. I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J. M., and Sherlock, G. (2004). Go:: Termfinder—open source software for accessing gene ontology information and finding significantly enriched gene ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics*, 20(18):3710–3715.
- [Chang et al., 2018] Chang, W., Cheng, J., Allaire, J., Xie, Y., and McPherson, J. (2018). *shiny: Web Application Framework for R*. R package version 1.2.0.
- [Clark et al., 2015] Clark, N. R., Szymkiewicz, M., Wang, Z., Monteiro, C. D., Jones, M. R., and Ma'ayan, A. (2015). Principle angle enrichment analysis (paea): Dimensionally reduced multivariate gene set enrichment analysis tool. In *2015 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM)*, pages 256–262. IEEE.
- [Class et al., 2017] Class, C. A., Ha, M. J., Baladandayuthapani, V., and Do, K.-A. (2017). idingo—integrative differential network analysis in genomics with shiny application. *Bioinformatics*, 34(7):1243–1245.
- [Consortium, 2004] Consortium, G. O. (2004). The gene ontology (go) database and informatics resource. *Nucleic acids research*, 32(suppl_1):D258–D261.
- [Draghici et al., 2007] Draghici, S., Khatri, P., Tarca, A. L., Amin, K., Done, A., Voichita, C., Georgescu, C., and Romero, R. (2007). A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome research*, 17(10):1537–1545.
- [Farmer et al., 2005] Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., MacGrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., et al. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Breast Cancer Research*, 7(2):P2–11.

Bibliography

- [Ge and Jung, 2018] Ge, S. and Jung, D. (2018). Shinygo: a graphical enrichment tool for animals and plants. *bioRxiv*, page 315150.
- [Hengel et al., 2003] Hengel, R. L., Thaker, V., Pavlick, M. V., Metcalf, J. A., Dennis, G., Yang, J., Lempicki, R. A., Sereti, I., and Lane, H. C. (2003). Cutting edge: L-selectin (cd62l) expression distinguishes small resting memory cd4+ t cells that preferentially respond to recall antigen. *The Journal of Immunology*, 170(1):28–32.
- [Khatri et al., 2012] Khatri, P., Sirota, M., and Butte, A. J. (2012). Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS computational biology*, 8(2):e1002375.
- [Li et al., 2017] Li, S., Mi, L., Yu, L., Yu, Q., Liu, T., Wang, G.-X., Zhao, X.-Y., Wu, J., and Lin, J. D. (2017). Zbtb7b engages the long noncoding rna blnc1 to drive brown and beige fat development and thermogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34):E7111–E7120.
- [Rahnenführer et al., 2004] Rahnenführer, J., Domingues, F. S., Maydt, J., and Lengauer, T. (2004). Calculating the statistical significance of changes in pathway activity from gene expression data. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 3(1):1–29.
- [Reimand et al., 2019] Reimand, J., Isserlin, R., Voisin, V., Kucera, M., Tannus-Lopes, C., Rostamianfar, A., Wadi, L., Meyer, M., Wong, J., Xu, C., et al. (2019). Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g: Profiler, gsea, cytoscape and enrichmentmap. *Nature protocols*, page 1.
- [Schmidt et al., 2008] Schmidt, M., Böhm, D., Von Törne, C., Steiner, E., Puhl, A., Pilch, H., Lehr, H.-A., Hengstler, J. G., Kölbl, H., and Gehrmann, M. (2008). The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer research*, 68(13):5405–5413.
- [Subramanian et al., 2005] Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43):15545–15550.

Bibliography

- [Tarcă et al., 2008] Tarca, A. L., Draghici, S., Khatri, P., Hassan, S. S., Mittal, P., Kim, J.-s., Kim, C. J., Kusanovic, J. P., and Romero, R. (2008). A novel signaling pathway impact analysis. *Bioinformatics*, 25(1):75–82.
- [Wickham, 2015] Wickham, H. (2015). R packages.