Automatizzazione di ricerca biotecnologica

Davide Quaglia, Davide Girlanda

In questa esercitazione vedremo come realizzare dei programmi Java che si interfaccino al server KEGG allo scopo di aumentare l'automatizzazione nella ricerca biotecnologica.
Per fare ciò KEGG mette a disposizione delle API che, tramite metodologia REST, forniscono una serie di metodi per recuperare le informazioni che si trovano sul database attraverso programmi di interrogazione scritti dall'utente (ad es. noi useremo il linguaggio Java) in alternativa alla consultazione manuale tramite form web. Questa interfaccia al server KEGG è fondamentale per costruire programmi che automatizzano il ricupero di informazioni evitando noiose e lente opreazioni di interrogazione manuale.

Cenni teorici

REST è un approccio alternativo a SOAP per la realizzazione di web services. SOAP si basa sul concetto di chiamata remota e utilizza una complessa infrastruttura di messaggi XML, stub/skeleton e application container. Al contrario, REST è molto più leggero perché si basa sulla corrispondenza diretta tra:

- oggetti remoti da leggere/scrivere → Uniform Resource Identifiers (URI) cioè i comuni link web
- comandi da applicare agli oggetti → comandi HTTP (GET, PUT, POST, DELETE)

Se ad esempio vogliamo leggere la lista dei prodotti presenti su un catalogo, verrà semplicemente invocato il metodo HTTP GET sulla URI che rappresenta il catalogo prodotti; siccome il metodo GET è quello usato per default dai browser web nell'accesso alle pagine, sarà quindi sufficiente aprire la pagina

```
http://www.mionegozio.it/lista/prodotti
```

Sarà stata ovviamente cura del progettista del server far corrispondere l'URI `lista/prodotti` all'opportuna query sul database.

Se il server lo supporta, la stessa risorsa può essere richiesta in formati diversi, come ad esempio TXT, HTML, XML o JSON.
REST assume che le interazioni tra client e server devono avvenire senza memorizzazione di informazioni di stato sul server. Cioè le interazioni tra client e server devono essere senza stato. È importante sottolineare che sebbene REST assuma la comunicazione stateless, non vuol dire che un'applicazione non deve avere stato. Tuttavia la responsabilità della gestione dello stato dell'applicazione non deve essere conferita al server, ma rientra nei compiti del client.

Esercitazione

NOTA: in laboratorio si consiglia di operare nella cartella `/tmp/` in cui vi è tutto la spazio necessario; tale cartella viene svuotata ad ogni avvio della macchina per cui sui propri PC personali se ne sconsiglia l'uso.

Occorre creare una cartella di lavoro (ad esempio basta copiare la cartella sorgenti/ dell'archivio) all'interno della quale andremo a mettere i seguenti files:

- **Definition.java** (classe corrispondente alla definizione di organismo nel DB di KEGG)
- **RESTCall.java** (classe che incapsula le chiamate REST per il KEGG, utilizza gli oggetti httpclient)
- **httpclient-4.2.5.jar** (jar scaricabile dal sito apache fondation, serve per eseguire una richiesta HTTP)
- **httpcore-4.2.4.jar** (jar scaricabile dal sito apache fondation, serve per eseguire una richiesta HTTP)
- **commons-logging-1.1.1.jar** (libreria che fornisce un sistema evoluto di logging)

I file jar sono anche scaricabili da questo link: http://apache.panu.it//httpcomponents/httpclient/binary/httpcomponents-client-4.2.5-bin.zip

Infine occorre mettere nella cartella di lavoro tutti i programmi Java che si vogliono compilare ed eseguire. Al momento della compilazione e della esecuzione dei nostri programmi Java, dovremmo aver cura di comprendere i file di supporto elencati; per farlo dobbiamo includere nel classpath le librerie come spiegato di seguito.

Portarsi nella cartella sorgenti/

Compilazione:

```
javac -classpath :./httpclient-4.2.5.jar:./httpcore-4.2.4.jar:./commons-logging-1.1.1.jar *.java
```

Esecuzione:

```
java -classpath :./httpclient-4.2.5.jar:./httpcore-4.2.4.jar:./commons-logging-1.1.1.jar classe
[parametri]
```

Vediamo quindi subito un esempio:

```
public class KeggOrganismsList {
	public static void main(String[] args) {
		// creazione di un oggetto RESTCall che effettua le chiamate al KEGG
		RESTCall rest= new RESTCall();
		// richiediamo la lista degli organismi presenti in KEGG
		Definition[] def = rest.list_organisms();
		// tramite un ciclo for stampiamo la lista degli organismi
		for (int i = 0; i < def.length; i++) {
			System.out.println(i+")"+def[i].getDefinition());
		}
	}
}
```

Compilate ed eseguite il codice; come si evince dai commenti, questo semplice programma recupera la lista degli organismi contenuti nel database KEGG e ne stampa la descrizione a video.
Se si analizza l'implementazione del metodo `list_organisms()` in `RESTCall.java` si vede che la chiamata REST è http://rest.kegg.jp/list/organism
`Definition` è una classe che contiene informazioni su un organismo; di conseguenza un array di `Definition` contiene un organismo per ogni valore. La descrizione della classe `Definition` è in Appendice C; si chiede di analizzarne i metodi.

Esercizio 1
Si voglia verificare la presenza di un certo organismo all'interno del database e stamparne anche l'Entry_id oltre che al nome (vedere metodo corrispondente). Modificate quindi il codice in modo da ricercare un particolare organismo passato come input sulla riga di comando.
Suggerimento: ricavare la stringa con `def[i].getDefinition()` e su questa chiamare il metodo `indexOf(args[0])`.
Si noti che passando sulla linea di comando un nome di organismo senza delimitarlo da doppi apici solo la prima stringa viene messa in `args[0]` e quindi possono essere associati più risultati che contengono tale stringa .

Vediamo ora un altro esempio:

```
public class GetGenesByEnzyme {
	public static void main(String[] args) {
	// come sopra
	RESTCall serv= new RESTCall();
	String[] result;
	// recuperiamo il numero di geni dato l'organismo
	result = serv.get_genes_by_enzyme("ec:2.7.1.6","ljo");
	System.out.println(result[0]);
	}
}
```

Il metodo `get_genes_by_enzime()` accetta come parametro due stringhe, una corrispondente all'enzima e l'altra corrispondente all'id dell'organismo. Se si va ad analizzarne l'implementazione si vede che la chiamata REST corrispondente è http://rest.kegg.jp/link/ljo/ec:2.7.1.6

I due sorgenti appena visti non avrebbero molto senso se eseguiti da soli, ma componendo il codice del primo con il codice del secondo si incomincia a vedere l'utilità di applicazioni che automatizzino la ricerca.

Esercizio 2
Provate quindi a scrivere un programma che dato il nome di un organismo ne ricavi il suo id e dall'id ricavi il gene associato all'enzima ec:2.7.1.6 (la spiegazione della scrittura ec:2.7.1.6 si trova più avanti nella dispensa).
Provatelo con input: “Lactobacillus johnsonii NCC 533”, il vostro codice dovrebbe restituire:
ljo:LJ0859 (dove ljo è l'organismo e LJ0859 il gene, questa scrittura sarà spiegata più avanti nella dispensa). Si noti che passando sulla linea di comando un nome di organismo senza delimitarlo da doppi apici solo la prima stringa viene

messa in `args[0]` e quindi possono essere associati più risultati che contengono tale stringa. Questo caso deve essere rilevato (quanti parametri vedo sulla linea di comando?) e bisogna avvisare l'utente di delimitare il nome dell'organismo con doppi apici.

Passiamo ora a vedere una struttura diversa chiamata DBGET. Si tratta di un metodo di recupero delle informazioni formattate come file di testo, detti anche flat-file. La definizione di flat-file di KEGG non è limitata ai soli file di testo ma si estende a immagini GIF (per i pathway di KEGG), grafica 3D per la struttura di proteine ecc.
La maggior parte degli attuali database biologici possono essere utilizzati in questa specifica.
Quando si passa un input ad un metodo di DBGET bisogna seguire un certo pattern:

dbname:identifier

ovvero nome del database (abbreviato) seguito dall'identificatore di ciò che ci interessa.
(per una lista completa dei database si rimanda a: http://www.genome.jp/dbget/)
Il catalogo dei geni in KEGG considera anche come identificatore la combinazione organismo e gene:

organismo:gene

Vediamo subito un esempio di codice e cosa ci restituisce:

```
public class KeggEsDBGET {
	public static void main(String[] args) {
		RESTCall serv= new RESTCall();
		String result = serv.bget(args[0]);
		System.out.println(result);
	}
}
```

Provate a compilare ed eseguire questo codice con input “eco:b0004” dove in questo caso “eco” è l'organismo Escherichia coli e “b0004” è l'id del gene. Se si va ad analizzarne l'implementazione si vede che la chiamata REST corrispondente è http://rest.kegg.jp/get/eco:b0004

Il metodo bget() restituisce una stringa che contiene tutte le informazioni relative all'argomento della ricerca.

```
ENTRY       b0004             CDS       E.coli
NAME        thrC, ECK0004, JW0003
DEFINITION  threonine synthase (EC:4.2.3.1)
ORTHOLOGY   K01733  threonine synthase [EC:4.2.3.1]
PATHWAY     eco00260  Glycine, serine and threonine metabolism
            eco00750  Vitamin B6 metabolism
            eco01100  Metabolic pathways
CLASS       Metabolism; Amino Acid Metabolism; Glycine, serine and threonine
            metabolism [PATH:eco00260]
            Metabolism; Metabolism of Cofactors and Vitamins; Vitamin B6
            metabolism [PATH:eco00750]
POSITION    3734..5020
MOTIF       Pfam: PALP
            PROSITE: DEHYDRATASE_SER_THR
DBLINKS     NCBI-GI: 16127998
            NCBI-GeneID: 945198
            RegulonDB: B0004
            EcoGene: EG11000
            UniProt: P00934
STRUCTURE   PDB: 1VB3
AASEQ       428
            MKLYNLKDHNEQVSFAQAVTQGLGKNQGLFFPHDLPEFSLTEIDEMLKLDFVTRSAKILS
            AFIGDEIPQEILEERVRAAFAFPAPVANVESDVGCLELFHGPTLAFKDFGGRFMAQMLTH
            IAGDKPVTILTATSGDTGAAVAHAFYGLPNVKVVILYPRGKISPLQEKLFCTLGGNIETV
            AIDGDFDACQALVKQAFDDEELKVALGLNSANSINISRLLAQICYYFEAVAQLPQETRNQ
            LVVSVPSGNFGDLTAGLLAKSLGLPVKRFIAATNVNDTVPRFLHDGQWSPKATQATLSNA
            MDVSQPNNWPRVEELFRRKIWQLKELGYAAVDDETTQQTMRELKELGYTSEPHAAVAYRA
            LRDQLNPGEYGLFLGTAHPAKFKESVEAILGETLDLPKELAERADLPLLSHNLPADFAAL
            RKLMMNHQ
NTSEQ        1287
            atgaaactctacaatctgaaagatcacaacgagcaggtcagctttgcgcaagccgtaacc
            caggggttgggcaaaaatcaggggctgttttttccgcacgacctgccggaattcagcctg
            actgaaattgatgagatgctgaagctggattttgtcacccgcagtgcgaagatcctctcg
            gcgtttattggtgatgaaatcccacaggaaatcctggaagagcgcgtgcgcgcggcgttt
            gccttcccggctccggtcgccaatgttgaaagcgatgtcggttgtctggaattgttccac
```

```
            gggccaacgctggcatttaaagatttcggcggtcgctttatggcacaaatgctgacccat
            attgcgggtgataagccagtgaccattctgaccgcgacctccggtgataccggagcggca
            gtggctcatgctttctacggtttaccgaatgtgaaagtggttatcctctatccacgaggc
            aaaatcagtccactgcaagaaaaactgttctgtacattgggcggcaatatcgaaactgtt
            gccatcgacggcgatttcgatgcctgtcaggcgctggtgaagcaggcgtttgatgatgaa
            gaactgaaagtggcgctagggttaaactcggctaactcgattaacatcagccgtttgctg
            gcgcagatttgctactactttgaagctgttgcgcagctgccgcaggagacgcgcaaccag
            ctggttgtctcggtgccaagcggaaacttcggcgatttgacggcgggtctgctggcgaag
            tcactcggtctgccggtgaaacgttttattgctgcgaccaacgtgaacgataccgtgcca
            cgtttcctgcacgacggtcagtggtcacccaaagcgactcaggcgacgttatccaacgcg
            atggacgtgagtcagccgaacaactggccgcgtgtggaagagttgttccgccgcaaaatc
            tggcaactgaaagagctgggttatgcagccgtggatgatgaaaccacgcaacagacaatg
            cgtgagttaaaagaactgggctacacttcggagccgcacgctgccgtagcttatcgtgcg
            ctgcgtgatcagttgaatccaggcgaatatggcttgttcctcggcaccgcgcatccggcg
            aaatttaaagagagcgtggaagcgattctcggtgaaacgttggatctgccaaaagagctg
            gcagaacgtgctgatttacccttgctttcacataatctgcccgccgattttgctgcgttg
            cgtaaattgatgatgaatcatcagtaa
///
```

Chiaramente questa rappresentazione dei dati contiene un po' troppe informazioni e nessuna utilizzabile per qualche elaborazione successiva, è quindi necessario suddividere questa grossa stringa “ritagliando” solo le parti che ci interessano.

Esercizio 3

Recuperare il valore di POSITION.

SUGGERIMENTO: utilizzate il metodo `indexOf()` per recuperare l'indice della parola POSITION e la posizione del primo punto dopo la parola POSITION con il metodo `indexOf(int ch, int fromIndex)`, poi recuperate la sottostringa con il metodo `substring(start_index+12, end_index)`.

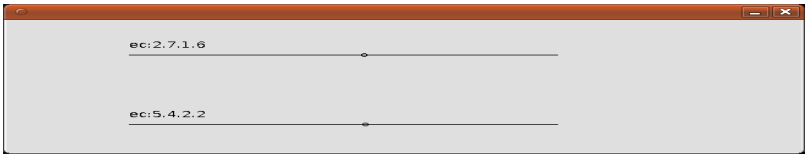
Esercizio finale

Scrivere un programma che:

1) Riceva il nome di un organismo come primo parametro sulla linea di comando e ne recuperi l'ID.
   ATTENZIONE: abbiamo già visto un possibile codice che lo fa, ma ad una voce inserita dall'utente possono essere associati più risultati, sarà quindi necessario gestire questa evenienza (anche semplicemente prendendo il primo risultato).
2) Dato l'ID dell'organismo e una serie di enzimi, restituisca la posizione dei geni corrispondenti. Provate con i seguenti enzimi:
   - ec:2.7.1.6
   - ec:5.4.2.2

   SUGGERIMENTO: usate il metodo `get_genes_by_enzyme()` per recuperare il gene e passate ciò che viene restituito al metodo `bget()` già visto precedentemente. Notare che la stringa ottenuta va convertita in numero.
3) Recuperi la lunghezza del genoma:
   SUGGERIMENTO: usate sempre `bget()` con la stringa “gn:”+id_organismo (vedere in Appendice B un esempio di output) e recuperate il numero che segue la stringa “LENGTH” estraendo la sotto-stringa da LENTGH+10 alla stringa “\n”. Notare che la stringa ottenuta va convertita in numero.
4) Tramite l'oggetto Canvas disegni una retta che identifica il genoma e un pallino che identifica la posizione degli enzimi sul genoma (vedere Appendice A).

Attenzione alla scala e disegnate ogni enzima su una retta diversa, come in figura:



Provate usando come input “Lactobacillus johnsonii NCC 533” tra doppi apici. Se non usate i doppi apici o passate solo “johnsonii”, il vostro programma dovrebbe farvi scegliere attraverso un menu composto da indice e nome dell’organismo, tra altri organismi che contendono quella parola.

NOTA: il programma è solo un esempio prototipale e funziona bene solo con “Lactobacillus johnsonii NCC 533”; altri organismi potrebbero non contenere gli enzimi specificati oppure generare l'informazione della posizione con una sintassi diversa da quella vista e parserizzata negli esercizi.

Appendice A
Java e le primitive grafiche

Introduciamo brevemente le primitive che Java mette a disposizione del programmatore per la gestione della grafica elementare. Queste primitive consentono da un lato di implementare GUI (Graphical User Interface) interattive con l'utente, dall'altro di giocare con i costrutti geometrici fondamentali e realizzare ogni sorta di disegno e rappresentazione grafica. Vedremo dunque come implementare a livello applicativo la visualizzazione di un semplice grafico per la rappresentazione di figure geometriche elementari, al fine di visualizzare semplici rappresentazioni grafiche dei risultati.

Panoramica sul package AWT

Di seguito faremo riferimento all'Abstract Window Toolkit, la libreria contenente le classi e le interfacce fondamentali per la creazione di elementi grafici, inserita nelle API standard di Java.
I package fondamentali in cui si articola sono i seguenti:

- java.awt package principale che contiene le classi di tutti i componenti che possiamo utilizzare nella GUI, quali ad esempio Frame, Panel, Button, Label, Checkbox, Canvas, Menu, MenuBar, TextArea e molti altri
- java.awt.event fornisce le classi per la gestione degli “eventi”, ovvero il sistema che awt utilizza per passare il controllo al programmatore in seguito ad azioni avvenute sui componenti, come la pressione di un bottone, il passaggio del mouse su un componente, l'apertura di una finestra

La classe che rappresenta una “finestra” di interazione grafica con l'utente è la `java.awt.Frame`. Essa presenta fondamentalmente la classica barra del titolo e un bordo.

Ci concentreremo sull'uso di oggetti Canvas. Canvas è un componente che rappresenta un rettangolo vuoto dello schermo all'interno del quale è possibile disegnare oggetti geometrici elementari.
Vediamo subito un esempio per spiegare come utilizzare questo componente.

```
import java.awt.*;
import java.awt.event.*;

public class DrawExample extends Canvas {

	public void paint(Graphics g){
		g.drawRect(10, 50, 400, 1);
	}

	public static void main (String args[]){
		Canvas frame = new DrawExample();
		Frame finestra = new Frame();
		finestra.add(frame);
		finestra.setSize(450, 90);
		finestra.setResizable(false);
		finestra.setVisible(true);
	}

}
```

Come vedete la classe DrawExample estende Canvas, infatti per poter disegnare qualcosa sul canvas è necessario ridefinire il metodo paint(). L'oggetto passato come parametro al metodo paint() è un oggetto Graphics, che definisce un contesto grafico con il quale disegnare sul Canvas.
Graphics mette a disposizione molti metodo per disegnare delle figure geometriche elementari quali rettangoli, cerchi, rette ecc. Nell'esempio si utilizza il metodo drawRect(int x, int y, int width, int height) i cui argomenti sono abbastanza autoesplicativi.
Analizziamo ora il main del progetto:

- Come prima cosa si crea un oggetto della classe che estende Canvas e quindi definisce cosa bisogna disegnare;
- L'oggetto Canvas appena creato deve essere messo in un Frame per poterlo visualizzare a video e quindi creiamo un oggetto di tipo Frame;
- Una volta creato il Frame basta impostare le dimensioni, togliere il resize della finestra e settare la visibilità.

Come già detto Graphics mette a disposizione un metodo per quasi tutte le forme geometriche elementari, si rimanda quindi alla Javadoc di Graphics per una lista completa:
(Graphics:http://java.sun.com/j2se/1.4.2/docs/api/java/awt/Graphics.html)

Appendice B
Esempio di output della chiamata bget() con argomento “gn:”+id_organismo

```
ENTRY       T00158            Complete  Genome
NAME        ljo, L.johnsonii, LACJO, 257314
DEFINITION  Lactobacillus johnsonii NCC 533
ANNOTATION  manual
TAXONOMY    TAX:257314
  LINEAGE   Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus
DATA_SOURCE RefSeq
ORIGINAL_DB Nestle
CHROMOSOME  Circular
  SEQUENCE  RS:NC_005362
  LENGTH    1992676

STATISTICS  Number of nucleotides:       1992676
            Number of protein genes:        1821
            Number of RNA genes:              97
REFERENCE   PMID:14966310
  AUTHORS   Pridmore RD, et al.
  TITLE     The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium
            Lactobacillus johnsonii NCC 533.
  JOURNAL   Proc Natl Acad Sci U S A : (2004)
///
```

Appendice C
Descrizione della classe Definition

Definition è una classe che contiene informazioni su un organismo; di conseguenza un array di Definition contiene un organismo per ogni valore.

```
public class Definition {
	private String definition=null;
	private String Entry_id;
	private String org;

	public String getDefinition() {
		return definition;
	}
	public void setDefinition(String definition) {
		this.definition = definition;
	}
	public String getEntry_id() {
		return Entry_id;
	}
	public void setEntry_id(String entry_id) {
		Entry_id = entry_id;
	}
	public String getOrg() {
		return org;
	}
	public void setOrg(String org) {
		this.org = org;
	}
}
```