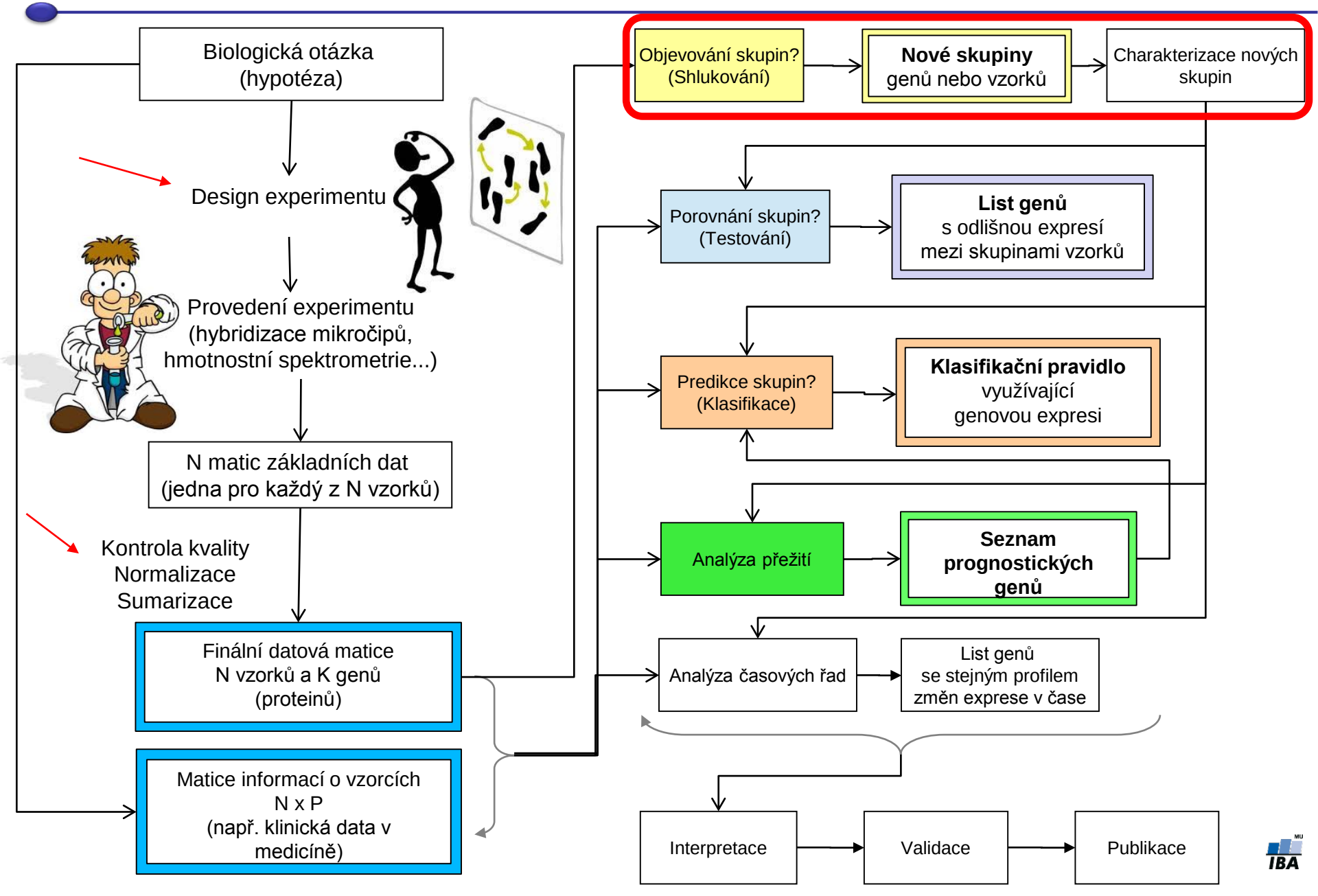
Objevování skupin (class discovery)

Společná schéma analýzy dat



Tradiční schéma analýzy

- **Učení s učitelem (supervised learning)**
  - V tomto případě zobecňujeme známou strukturu dat na nové data
  - **Porovnávání skupin (class comparison)**
    - hledáme rozdíly v expresi, počtu kopií genů nebo abundanci proteinů mezi již definovanými skupinami
  - **Předpovídání skupin (class prediction)**
    - na známých skupinách se snažíme vytvořit klasifikátor, který by dokázal zařadit nového pacienta do jedné ze skupin

- **Učení bez učitele (unsupervised learning)**
  - V tomto případe struktura v datech není známá a musíme ji objevit
  - **Objevování skupin (class discovery)**
    - na základě informací o genech/proteinech hledáme nové skupiny
    - onemocnění X je velmi heterogenní a snažíme se identifikovat specifičtější podtypy, které by mohli být cílem cílené terapie

Společné znaky analýzy dat

- Velké množství proměnných
- Malé množství vzorek
- Proměnné jsou často korelované, s velmi komplexními vztahy
- Data obsahují množství šumu – biologická i technická variabilita

Objevování skupin

- Snažíme se vytvořit závěry o datovém souboru bez (braní do úvahy) jakékoliv předchozí znalostí biologických skupin (=shlukování)
- Cílem je vytvořit skupiny objektů na základě jejich vzájemné podobnosti
- Objekty uvnitř skupiny mají být co nejpodobnější a objekty z různých skupin mají být tak odlišné, jak jen je to možné

- Skupina metod pro objevování skupin je představovaná metodami shlukování bez učitele

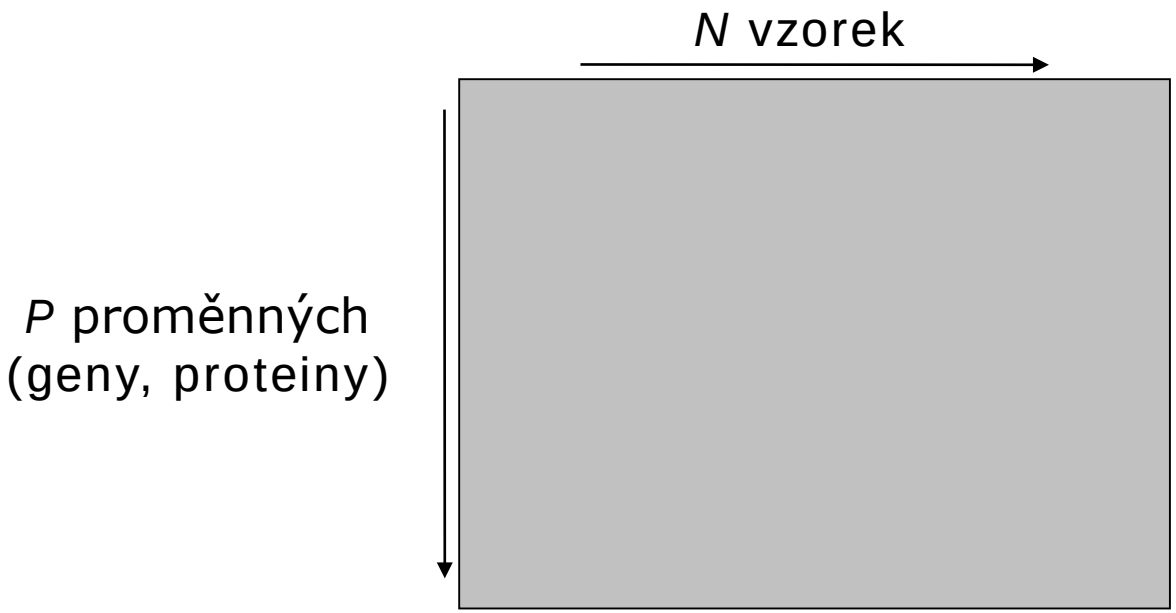
Co shlukujeme v molekulární biologii

- Geny/proteiny
  - Chceme identifikovat skupiny ko-regulovaných genů/proteinů
  - Chceme zredukovat dimenzi dat na základě funkčních genových/proteinových skupin

- Vzorky
  - Kontrolujeme kvalitu vzorků
  - Chceme najít nové skupiny vzorků (například podtypy)
  - Chceme zkontrolovat diskriminační schopnost genů vybraných při porovnávání známých skupin do vzorek

Princip

- Máme datovu matici ***X*** velikosti ***N x P***
  - *N* – počet objektů (vzorek)
  - *P* – počet proměnných (geny/proteiny)



- Hledáme nejlepší rozdělení dat na skupiny tak, aby nalezené skupiny byly uvnitř skupiny vysoce homogenní a mezi sebou vysoce heterogenní

Typy shlukovacích metod

- Shlukovací metody se dělí na dvě hlavní skupiny:

1. **Metody založené na vzdálenostech**
   - neparametrické
   - nejčastěji používané, intuitivní
   - hierarchické a nehierarchické shlukování

2. **Metody založené na modelování**
   - parametrické, kladou silné předpoklady na rozložení dat
   - založeny na statistickém modelování – přiřazují každému objektu pravděpodobnost s jakou patří do daného shluku

Metody založené na vzdálenostech I.

- Princip:
  1. Vypočítáme matici vzdáleností mezi objekty
  2. Vybereme shlukovací algoritmus
  3. Stanovíme počet shluků – jen u některých metod
  4. Aplikujeme shlukovací algoritmus na matici vzdálenosti
     získáme shluky

     →

- Shlukovací algoritmy:
  - Hierarchické
    - Aglomerativní – Single, Complete, Average, Ward linkage, …
    - Divizní - DIANA
  - Nehierarchické
    - K-means
    - PAM

Metriky vzdáleností I.

Máme 2 vektory hodnot $\boldsymbol{x} = (x_1, \ldots, x_n)$, $\boldsymbol{y} = (y_1, \ldots, y_n)$

- Euklideovská vzdálenost: $$d_E(x,y) = \sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - y_i)^2}$$

- Standardizovaná Euklideovská vzdálenost:

$$d_E(x,y) = \sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - y_i)^2 / \sigma_{i^2}}$$

  Metrika penalizuje – snižuje vzdálenost mezi objekty s velkou variabilitou, předpokládajíc, že jsou důležitější než objekty s malou variabilitou.

- Manhattanovská vzdálenost: $$d_M(x,y) = \sum_{i=1}^{n}|x_i - y_i|.$$

  Robustnější vůči odlehlým hodnotám.

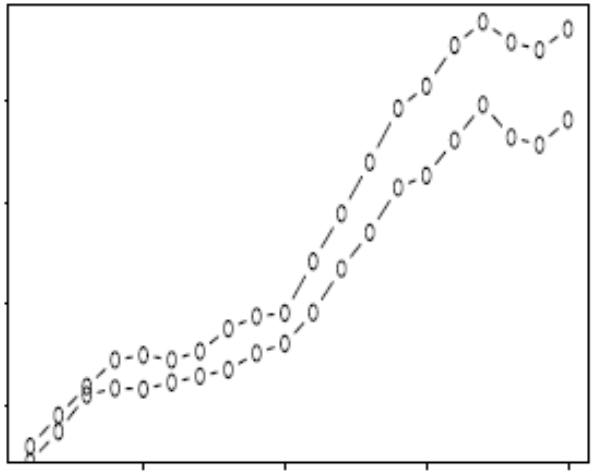
Metriky vzdáleností II.

- Metriky založené **na korelačním koeficientu *r(x,y)***
- *Můžeme odvodit dvě různé metriky:*

$$d_1(x,y) = [1 - r(x,y)]/2$$

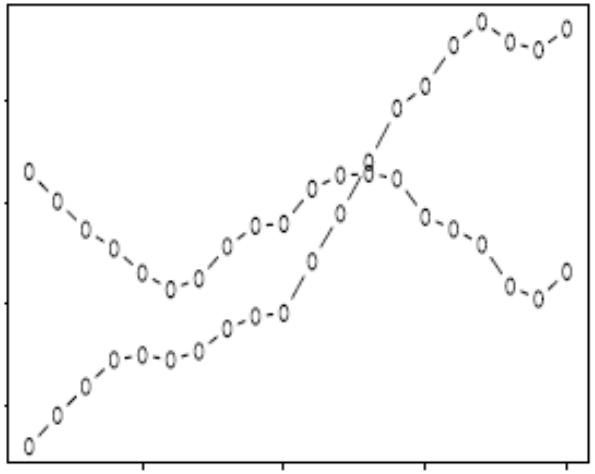
$$d_2(x,y) = 1 - [r(x,y)]^2$$

- Ukázka rozdílu mezi metrikama



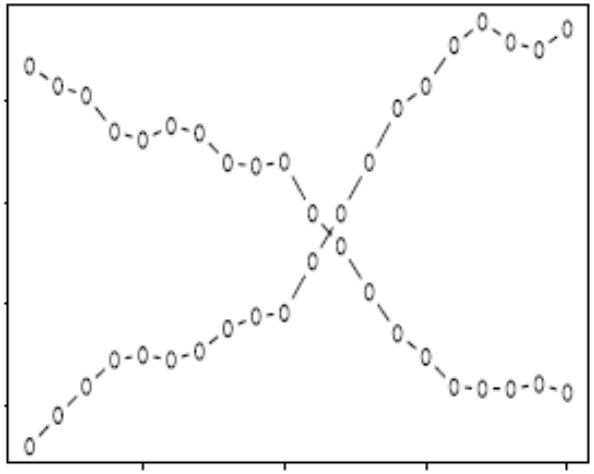
$r = 0.9$

d_1=0.05, d_2=0.19



$r = 0.0$

d_1=0.5, d_2=1



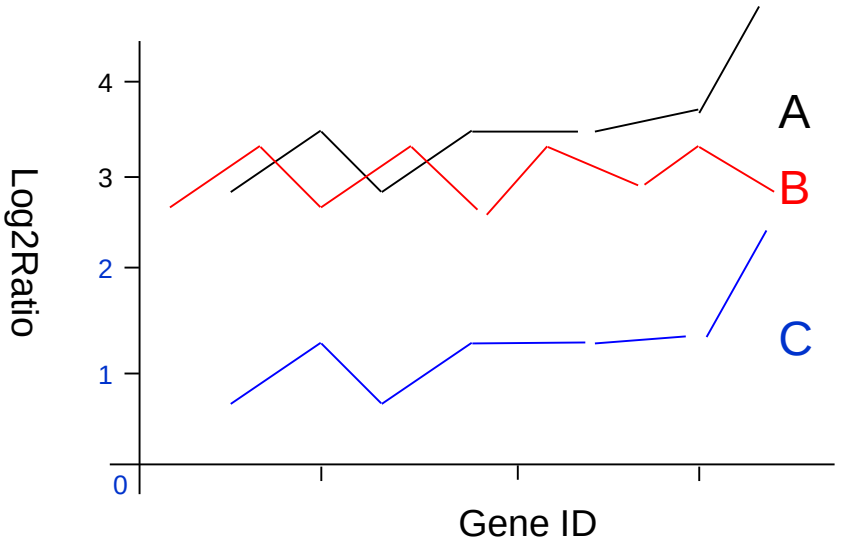
$r = -0.9$

d_1=0.95, d_2=0.19

Pří použití ***d_1*** budou geny s opačnými profily patřit do odlišných shluků, zatímco při použití metriky ***d_2*** budou patřit do toho stejného shluku. Pokud chceme shluky interpretovat jako množiny genů ze stejné regulační sítě, použijeme raději d_2.

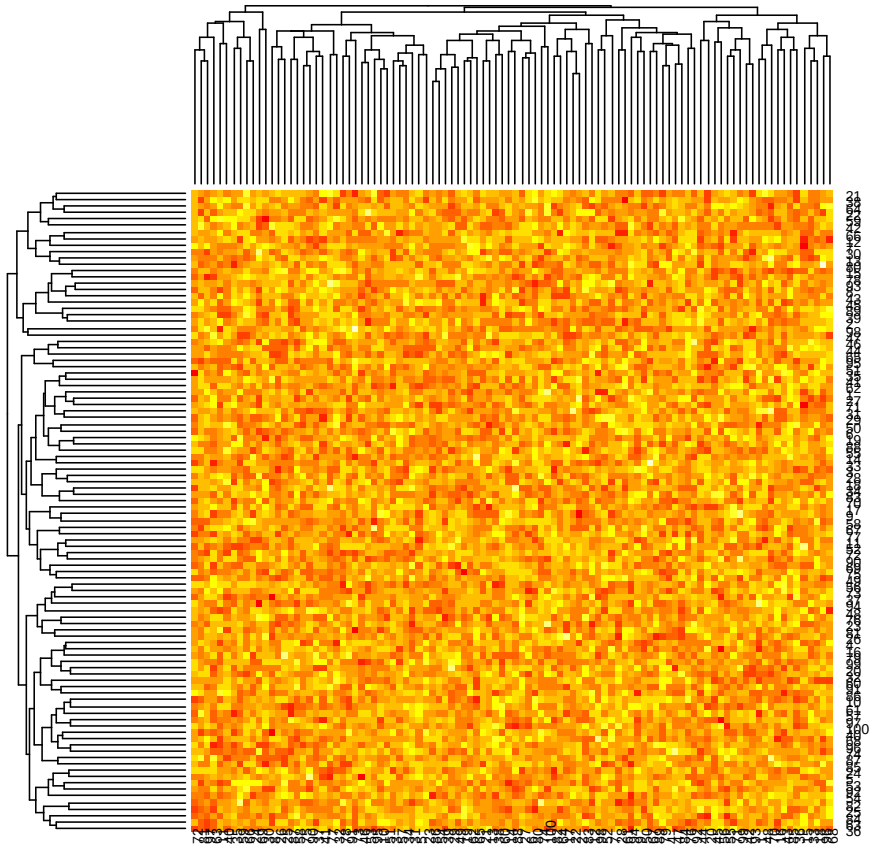
Výběr metriky

- Výběr metriky záleží na tom, jaký typ podobnosti nás zajímá
  - Pokud nás zajímá průměrná exprese genů (A a B jsou podobné), aplikujeme Euklidovskou vzdálenost
  - Pokud nás zajímá vzor exprese genů (A a C jsou podobné), aplikujeme vzdálenost založenou na korelaci



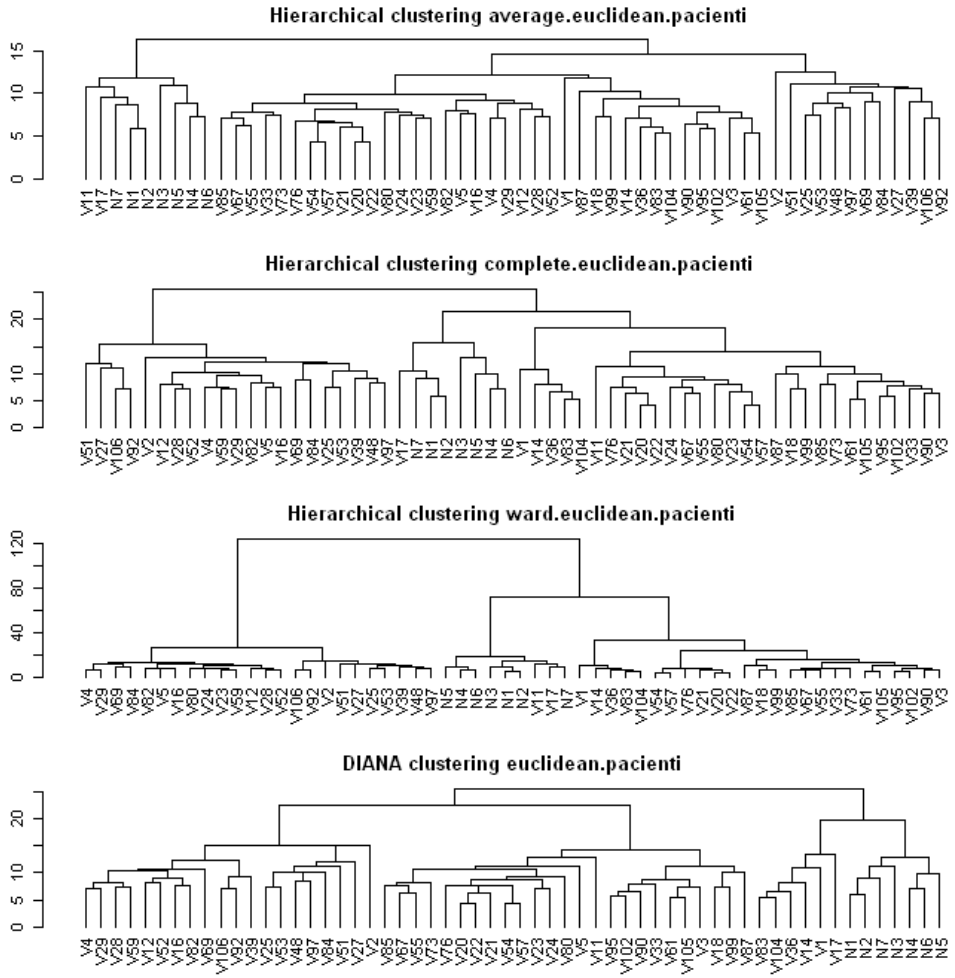
Na co si dávat pozor I.

- Mnoho shlukovacích technik najde shluky i v datech, ve kterých nejsou žádné přirozené shluky, jen proto, že byly pro tento účel zkonstruované



Na co si dávat pozor II.

- Výsledek jediného shlukování by nikdy neměl být považovaný za objektivní reprezentaci informace skryté v datech, protože je závislý od použité metody a také v rámci metody od nastavení!

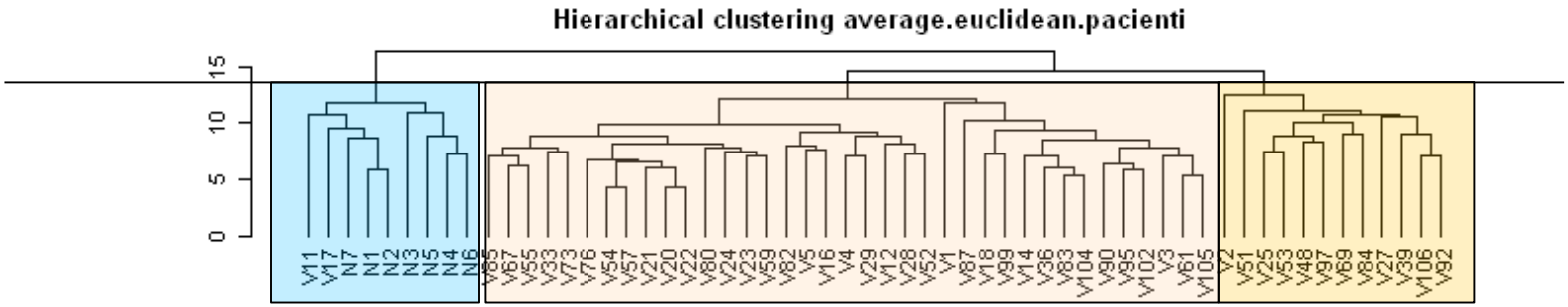


Další problémy

- Výběr shlukovacího algoritmu a metriky ovlivňuje konečné výsledky
- Výsledky jsou závislé na samotných datech
- Kolik shluků?
- Potřebujeme odhad jistoty, že nalezené shluky jsou správné
- Odhad kvality shluků je založen na metrikách z dat z kterých byli shluky vytvořené

Kolik shluků?

- V případě nehierarchických metod počet shluků určujeme dopředu
- V případě hierarchického shlukování vytváříme strom, dendrogram, který se potom prořezává

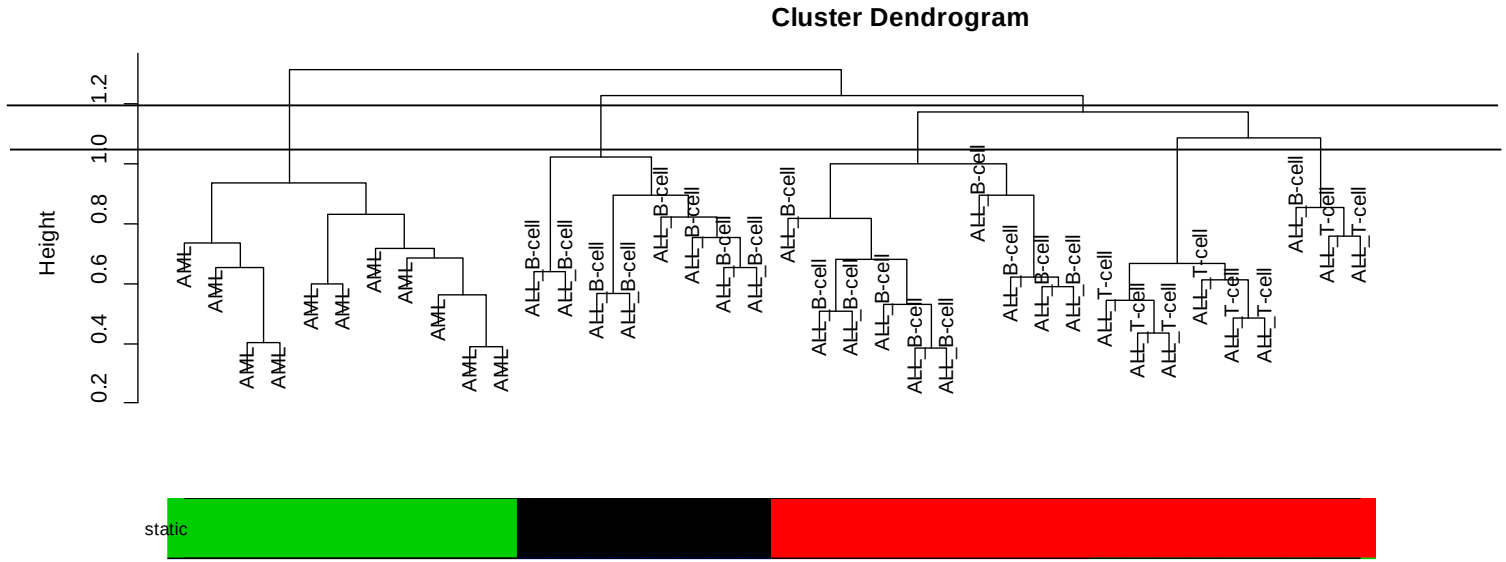


- Počet shluků je následně určený tak, aby heterogenita v rámci shluků byla co nejmenší a mezi shluky co největší
- Různé metriky heterogenity shluků – variabilita, Silhouette, ...

Řezání dendrogamu jeho problém

- U hiararchického shlukování se stanovuje fixní výška řezu dendrogramu

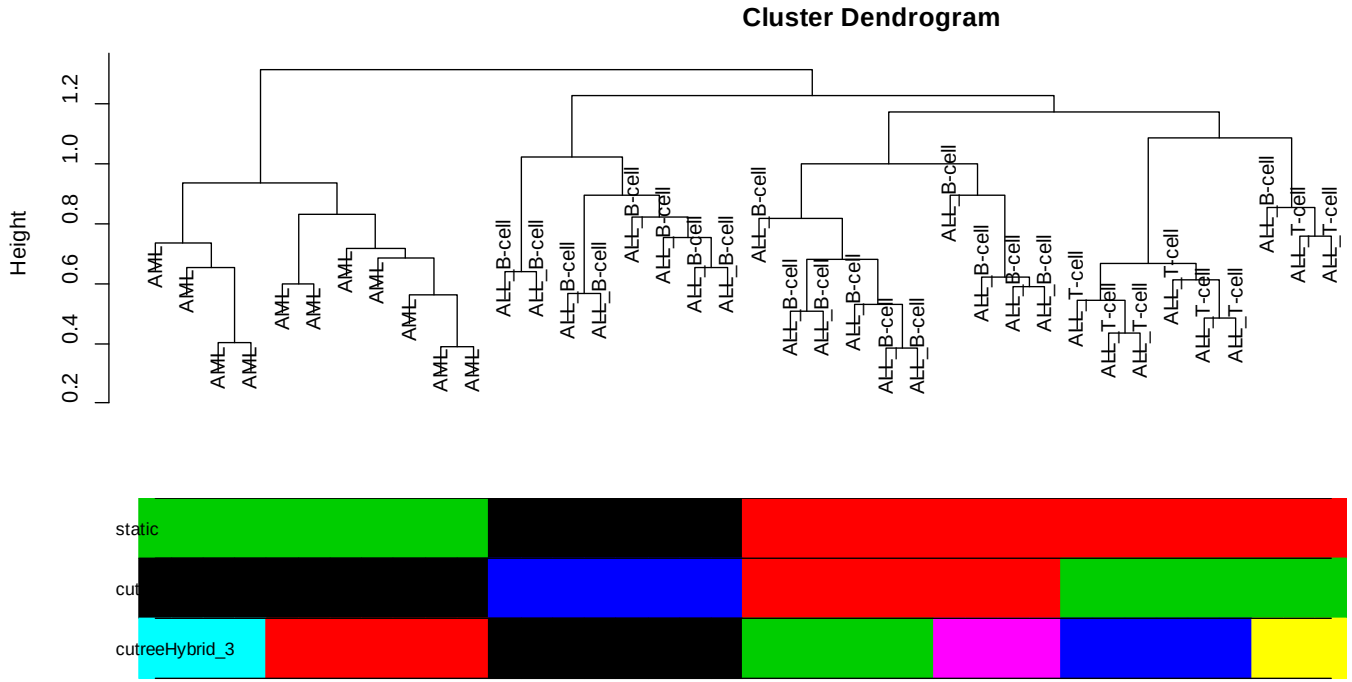
  >cutree()
- Problém: u genomických dat se často vyskytují shluky v různých výškách řezu



Dynamic tree cut

- Metoda prořezávání dendrogramu (Langfelder et al, 2007)
- Dynamické řezání dendrogramu na základě minimální velikosti shluků, maximální výšky řezu a dalších parametrů

```
>library(dynamicTreeCut)
```



Robustní shlukování

- V analýze vysokopokryvných molekulárních dat mají výše uvedené problémy větší váhu
- Malý počet vzorek a vysoký počet genů/proteinů spolu s vyšším množstvím šumu v datech jsou důvodem, proč je shlukování těchto dat citlivé na přeučení (overfitting)
- Shlukování je méně robustní (více ovlivněné variabilitou dat)
- Variabilita dat a výsledky shlukování se dají simulovat opakovaným náhodným výběrem z dat

Consensus clustering

- Forma robustního shlukování (Monti et al., 2003)
- Opakované vzorkování a shlukování jako způsob nalezení konsenzusu mezi jednotlivýma výsledkama shlukování za účelem:
  - Určení počtu a stability shluků v datech
  - Vytvoření nové metriky vzdálenosti - konsenzusu
- Základní princip:
  1. Rozrušení struktůry originální N x P datové matice pomocí náhodného výběru podmnožiny vzorků a/nebo genů
  2. Na novém datovém souboru aplikujeme shlukovací algoritmus se stejnou mírou similarity a počtem shluků

  Oba body jsou opakované L krát pro jiný počet shluků.

Consensus clustering II

- V každém výběru (pro daný počet shluků) vznikají dvě matice *N x N:*
- *Matice konektivity* $\boldsymbol{C^{(l)}}$ – pro každý pár vzorků *i,j* ukládá informaci, zda byly ve stejném shluku

$$C^l(i,j) = \begin{cases} 1 & pokud\ i\ a\ j\ patří\ do\ stejného\ shluku \\ 0 & jinak \end{cases}$$

- *Indikátorová matice* $\boldsymbol{I^{(l)}}$ – pro každý pár vzorků *i,j* ukládá informaci, zda byly vybrané ve společném výběru

$$I^l(i,j) = \begin{cases} 1 & pokud\ i\ a\ j\ patří\ do\ stejného\ výběru \\ 0 & jinak \end{cases}$$

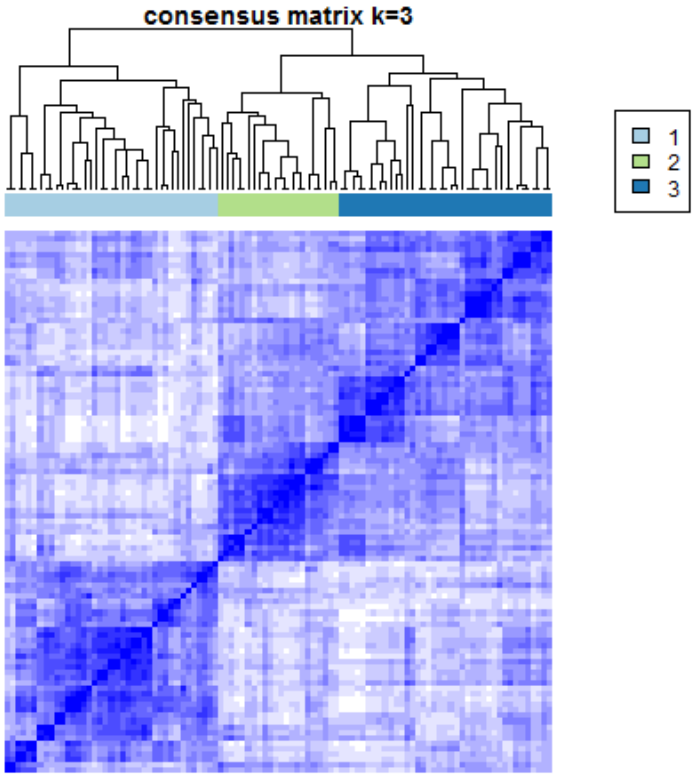
- ***Matice konsenzusu M*** je definovaná jako:

$$M_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^{L} C_{ij}^{(l)}}{\sum_{l=1}^{L} I_{ij}^{(l)}}$$

Consensus clustering III – myšlenka

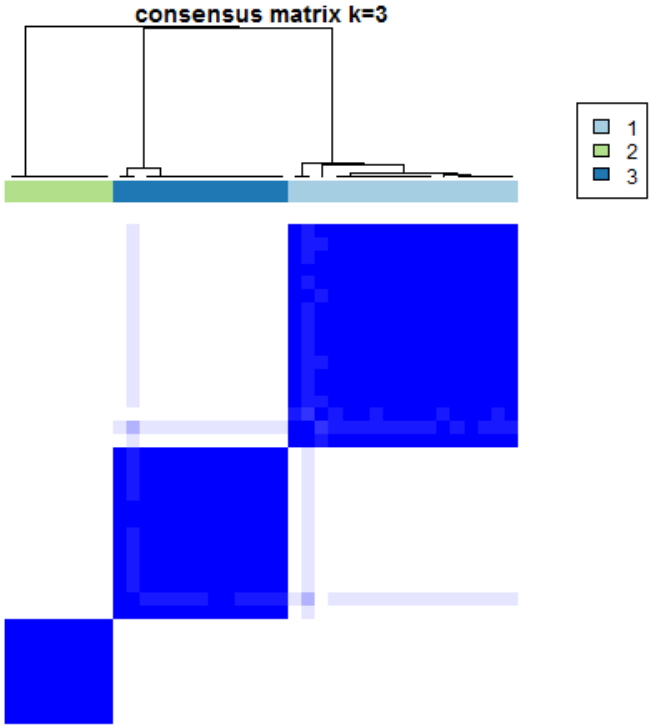
- Pokud se dva vzorky v jednotlivých výběrech nacházejí často spolu ve shluku, jsou důvěryhodnějšími členy shluku než ty, které se ve shluku nacházejí méně často

A.



Data bez struktury (náhodný výběr z normálního rozložení)

B.



Data se třemi skupinami

Consensus clustering IV – další metriky

Konsenzus shluku k

$$m^k = \frac{1}{N_l(N_l - 1)/2} \sum_{\substack{i,j \in I_k \\ i<j}} M_{ij}$$

Konsenzus vzorku s_i v shluku *k*

$$m_i^k = \frac{1}{N_l - 1\{s_i \in I_k\}} \sum_{\substack{j \in I_l \\ j \neq i}} M_{ij}$$

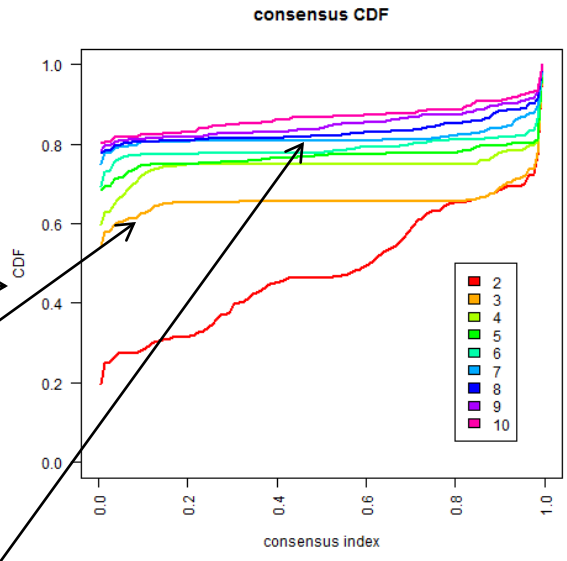
kde $1\{s_i \in I_k\}$ je indikátorová funkcia

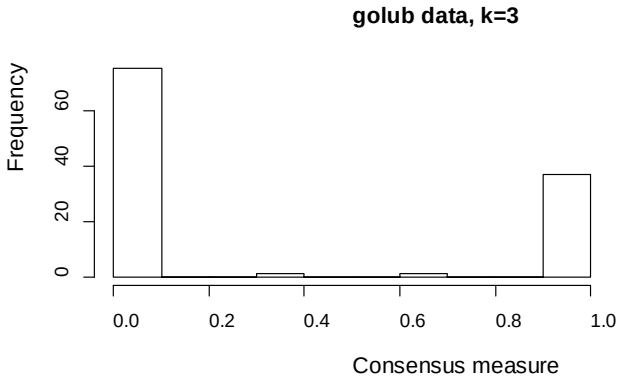
•Obě míry se používají pro identifikaci odlehlých hodnot (vzorky s nízkou mírou konsenzusu k jakémukoliv jinému vzorku v jinak homogenním shluku; shluky s nízkou mírou konsenzusu všeobecně)

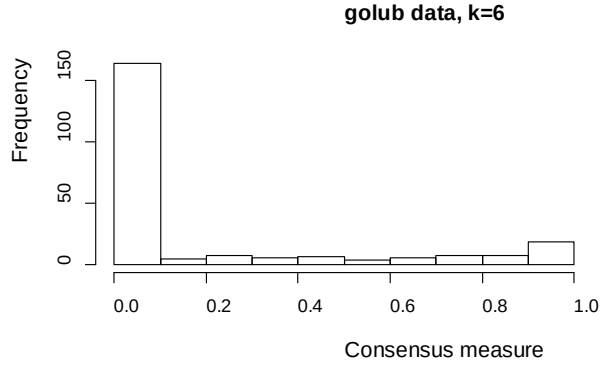
Consensus clustering V - výběr počtu shluků I

Empirická kumulativní distribuční funkce (pravděpodobnost, že proměnná M_{ij} nabyde hodnoty menší anebo rovné jako x)

$$CDF^{x} = \frac{\sum_{i<j} 1\{M_{ij} \le x\}}{N(N-1)/2}$$







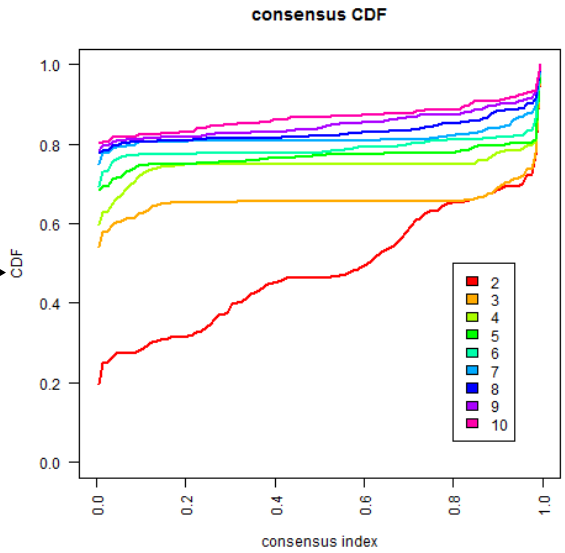
6 shluků má podstatně míň vzorků s konsenzusem 1 a tím pádem jsou tyto shluky míň důvěryhodné

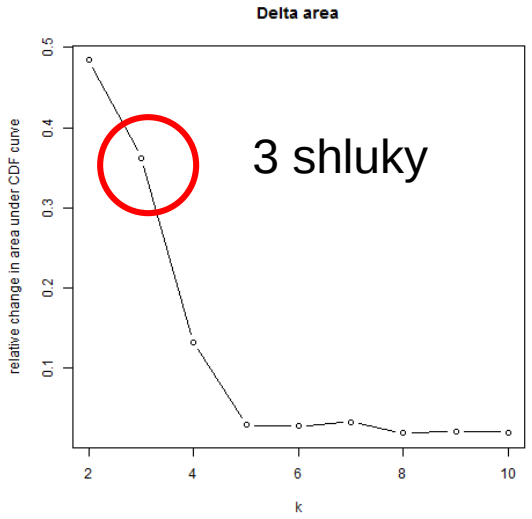
Struktura s 3 shluky naopak vypadá jako optimum

Jako rozhodovací pravidlo – **rozdíl v plochách pod CDF křivkami**

Consensus clustering V - výběr počtu shluků II

$$CDF^{x} = \frac{\sum_{i<j} 1\{M_{ij} \le x\}}{N(N-1)/2}$$





Optimální počet shluků je určený vypočtením ploch pod CDF křivkami jednotlivých počtů shluků a porovnáním relativní změny mezi různým shlukováním (plocha **delta).**

Consensus clustering VI – R balík

```
> source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
> biocLite("ConsensusClusterPlus")
```

Metody založené na modelech

- **Modely Gaussových směsí (mixture models)**
  - Předpokládají, že naměřené hodnoty genu/proteinu g ve všech vzorkách (X_g) jsou náhodným výběrem a jejich rozložení závisí na skupině do které gen g patří
  - Náhodnost X_g souvisí s pozorovanou variabilitou v datech z genomických a proteomických experimentů
  - Na rozdíl od metod založených na vzdálenosti poskytují tyto modely:
    - odhad parametrů, které charakterizují každou skupinu (průměr, rozptyl, …)
    - pravděpodobnost příslušnosti genu ke každé ze skupin
    - statistické kritéria pro výběr počtu skupin

Modely Gaussových směsí

- Skupina G genů pochází ze smíšeného rozdělení K skupin (populací): $C_1, \ldots, C_k$. Každý gen má marginální pravděpodobnost π_k ($\sum \pi_k = 1$) príslušnosti ku skupine C_k.

- V závislosti na skupině, do které patří, genový/proteinový profil X_g genu g má smíšené rozdělení $\Phi(.; \theta_k)$:

$$(X_g | g \in C_k) \sim \Phi(.; \theta_k) \qquad X_g \sim \sum_k \pi_k \, \Phi(.; \theta_k),$$

kde parametr θ_k je specifický pro skupinu C_k

- Podmíněná věrohodnost X_g $(g=1,\ldots,n)$:

$$\log \mathcal{L}(\{X_g\}; \{\pi_k, \theta_k\}) = \sum_g \log\left[\sum_k \pi_k \, \Phi(X_g, \theta_k)\right]$$

- Obvykle se uvažuje mix normálních rozložení
- Odhad parametrů a pravděpodobnosti pomocí Expectation maximization (EM)

Pokud objekt patří do více skupin shluků

- Většina shlukovačích technik vytváří disjunktní shluky: každý objekt je součástí jediného shluku

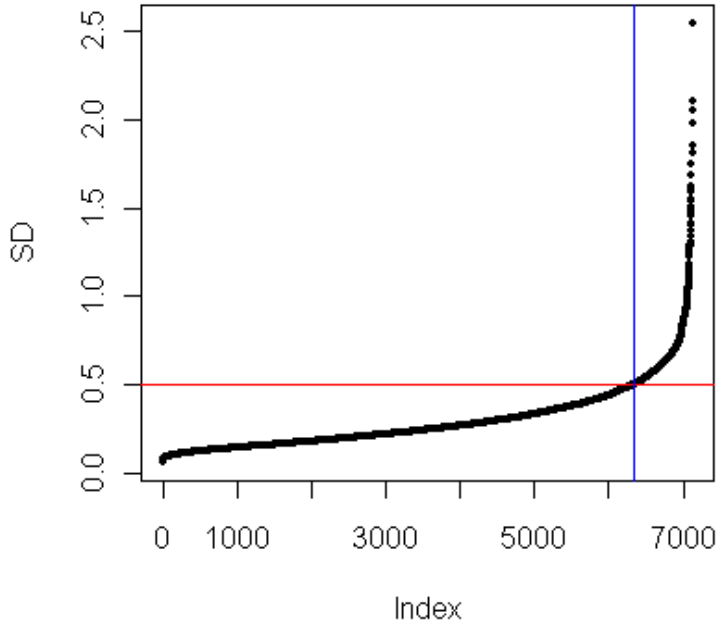
- Toto zvlášť v genomice a proteomice nemusí být nejlepší přístup, protože většina proteinů/genů je součástí více biologických drah -> proto by měli patřit do více skupin

- Jak zohlednit tuto informaci:
  - Aplikujeme speciální shlukovací metody (například fuzzy clustering)
  - Aplikujeme metody založené na modelech a vyvodíme závěry z přiřazených pravděpodobností

- Biclustering (two-way clustering) shlukuje zaráz řádky i sloupce

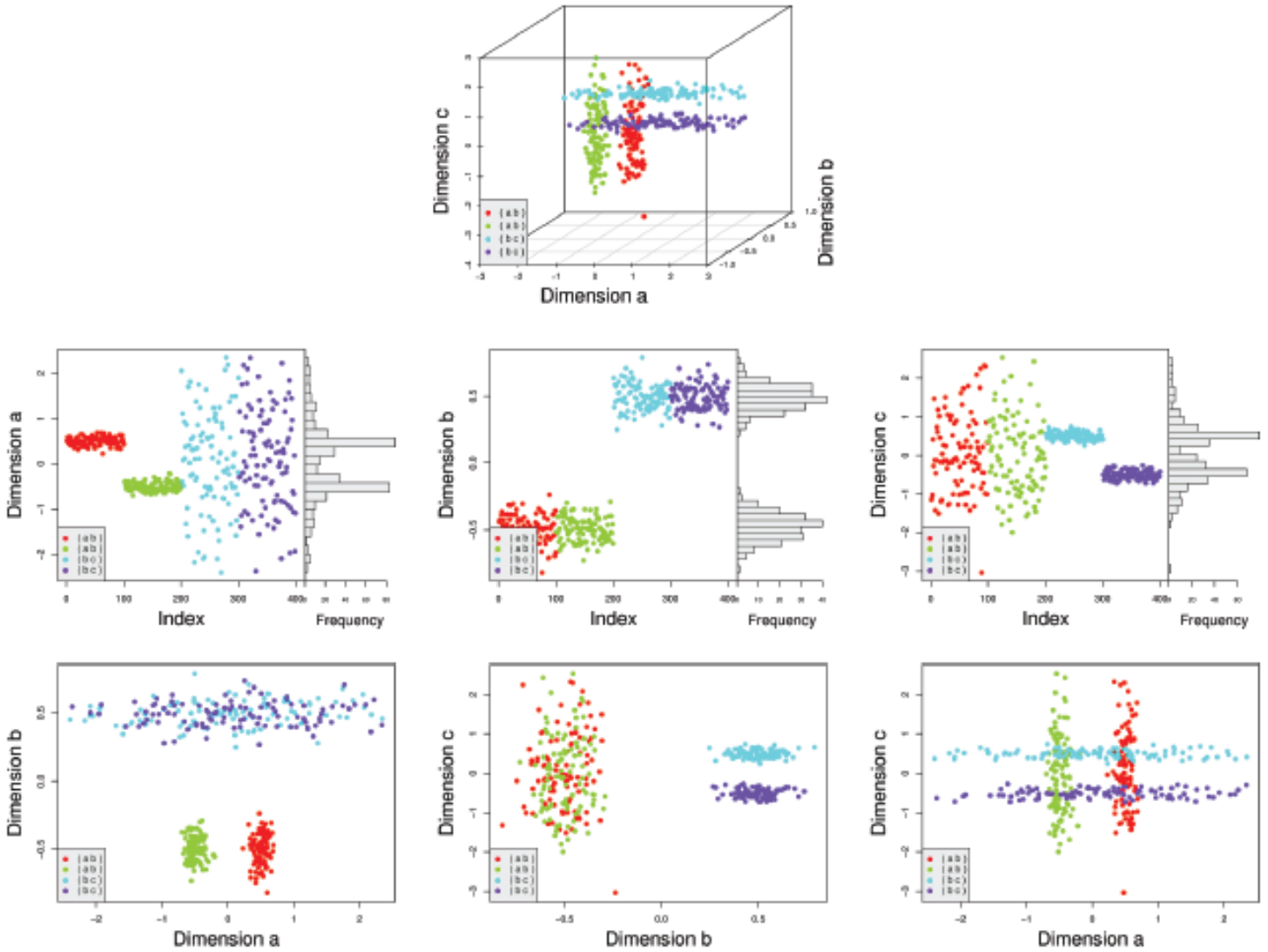
Jak shlukovat efektivně

- V genomice a proteomice obvykle nemá význam shlukovat úplně všechny objekty (proteiny/geny)
  - Většina z nich není významná
  - Vnášejí do procesu šum, který zakryje pravou strukturu dat
- Je vhodné zredukovat dimenzi dat:
  - PCA, gene-shaving, … - dokáží extrahovat informaci o genech/proteinech s podobnými charakteristikami, stačí potom ve shlukování reprezentovat charakteristikami těchto skupin
  - Redukce na základě SD anebo CV



Kde hledat shluky I.

- Data můžou vytvářet shluky v odlišných dimenzích



from Giovanni Montana's presentation

Kde hledat shluky II.

- V případě, že předpokládáme shlukování v nižších dimenzích, můžeme:
  - Hledat v nižších dimenzích vytvořených PCA
  - Použijeme podprostorové shlukovací algoritmy, které jsou schopné detekovat shluky, které existují ve více podprostorech a mohou se překrývat

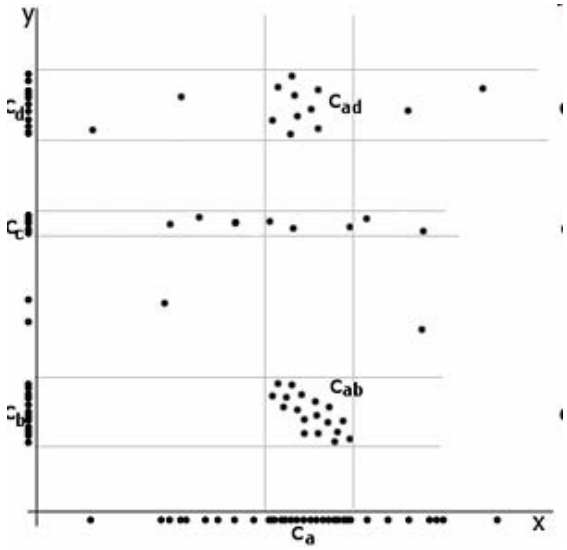
Podprostorové shlukovaní

- Hledá shluky ve všech podprostorech
- Počet podprostorů je 2^d, kde d je počet dimenzí (počet genů/proteinů)

- Typy algoritmů:
  - Top-down – najde iniciální rozložení na všech dimenzích a potom se dívá na podprostory každého shluku, iterativně zlepšují výsledky
  - Bottom-up – najdou regiony v nižších dimenzích a potom je zkombinují a vytvoří shluky

- MAFIA (Nagesh, 1999)
- ENCLUS (Chen, 1999)
- COSA (Damian et al., 2007)
- SMART (Jing et al., 2009)

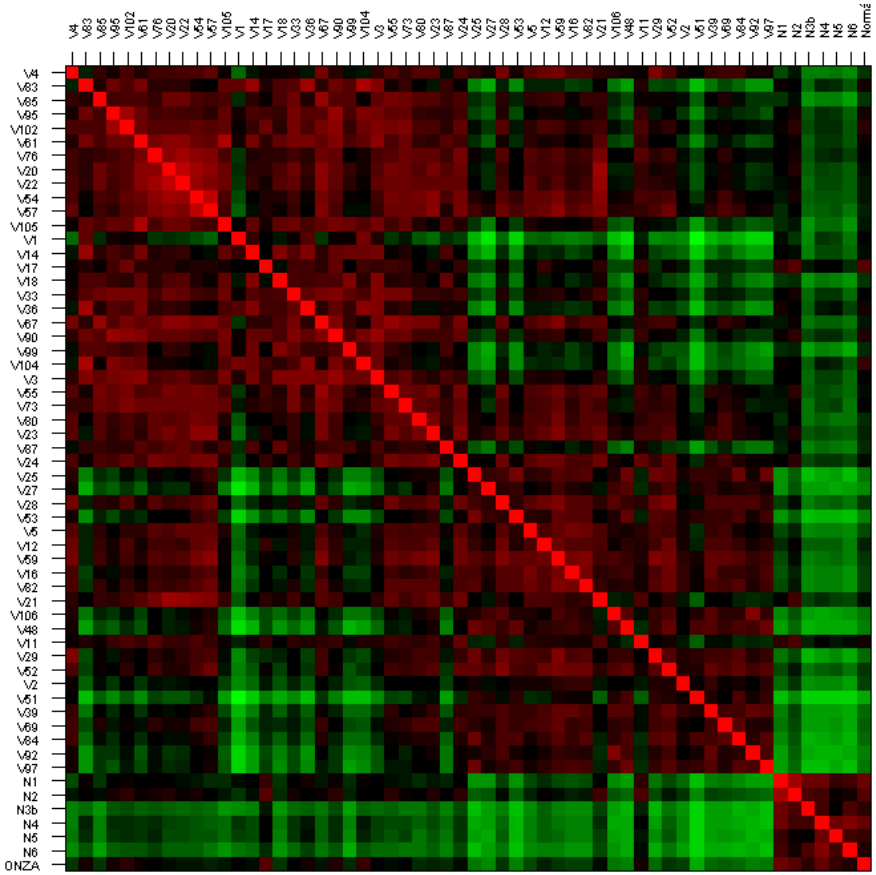
```
> library(orclus)
```



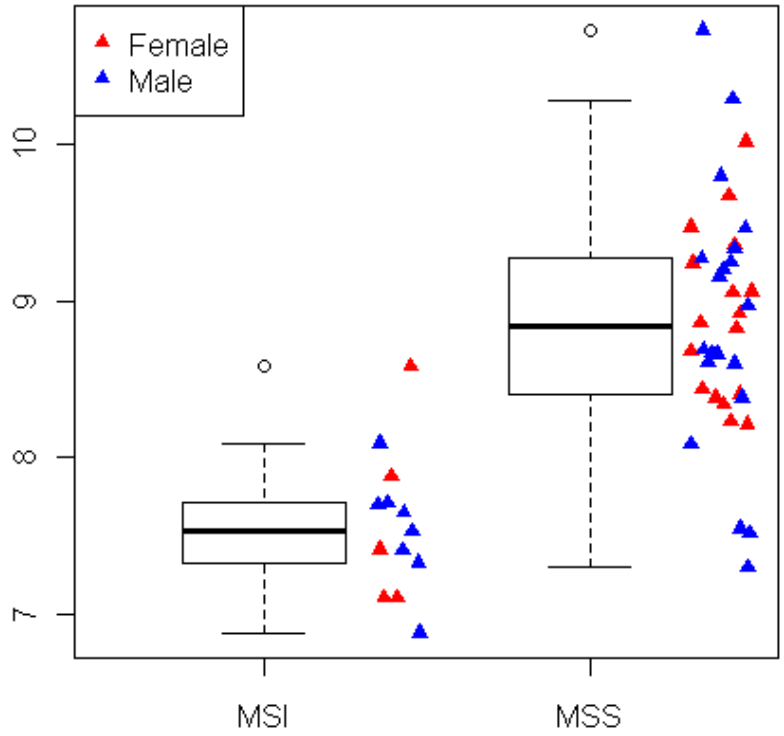
Vizualizace výsledků

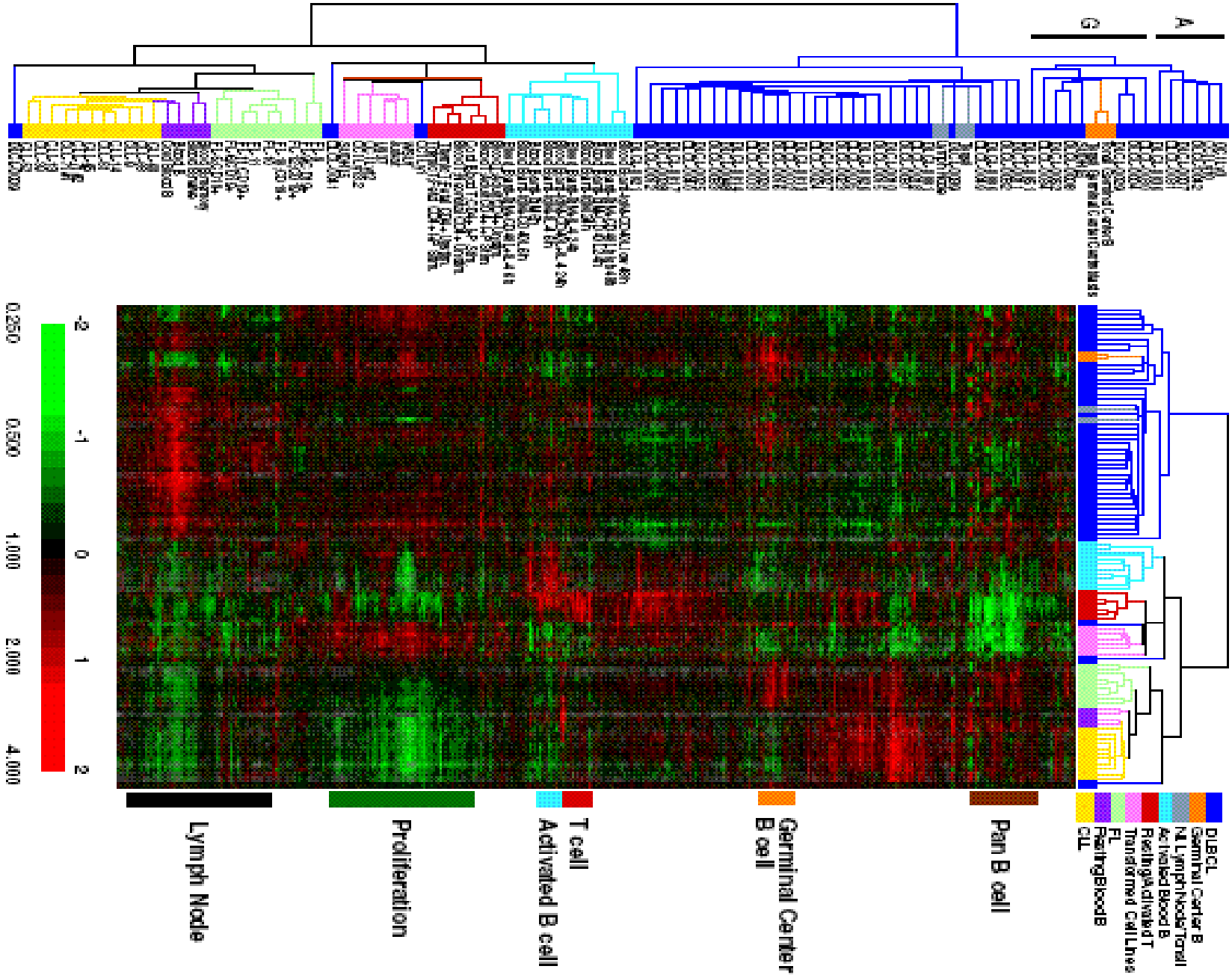
- Správná vizualizace výsledků je nejdůležitější součást analýzy!

Vizualizace korelací mezi vzorky



Boxploty exprese genů





Alizadeh et al., Nature 403:503-11, 2000

Shrnutí

- Více metod v rámci jedné studie
- Konsenzuální shlukování
- Dynamické řezání stromu

- Vizualizace výsledků
- Propojení výsledků s biologickými či klinickými proměnnými
- Validace výsledků na testovém souboru!