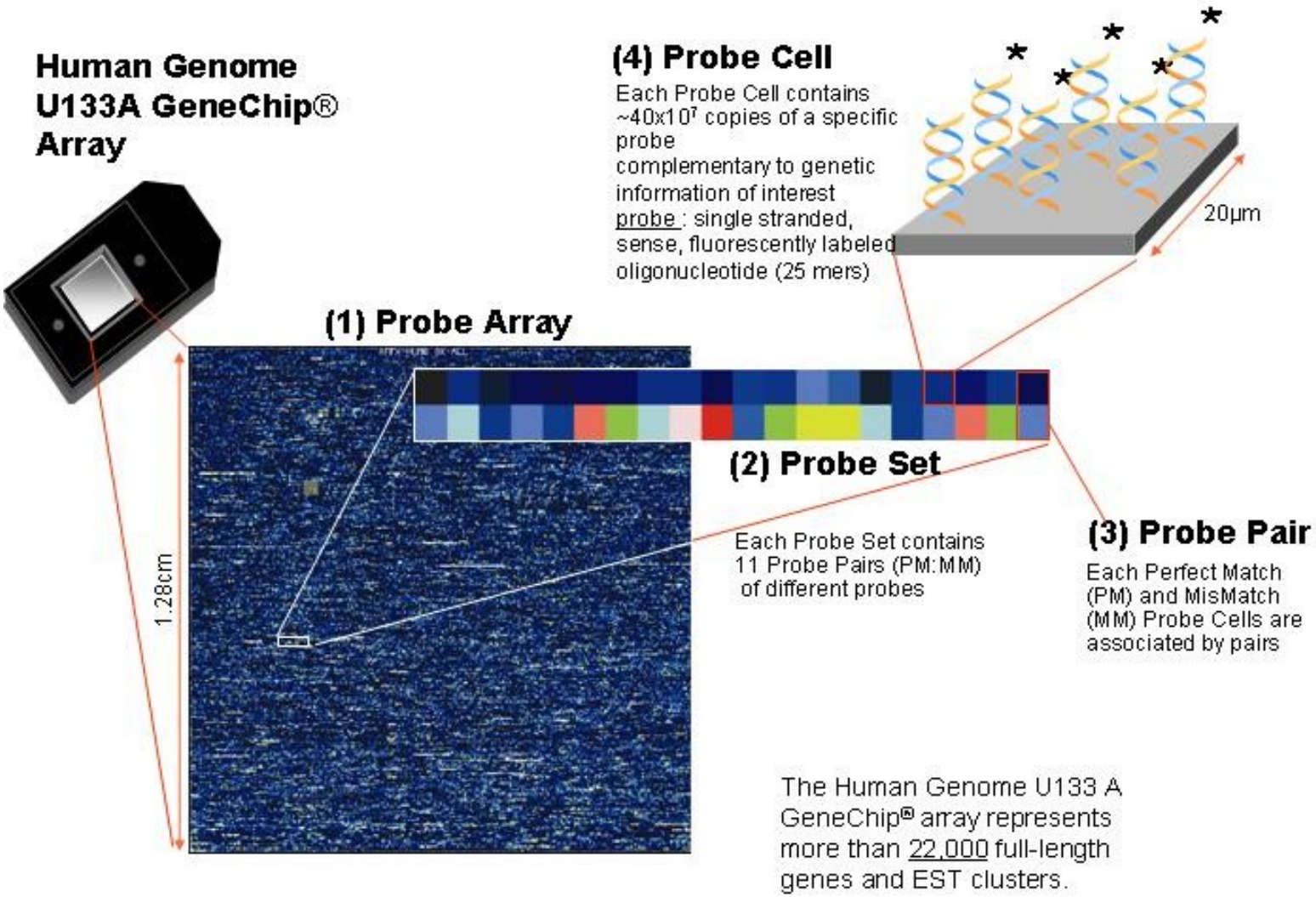
Kapitola II.2.2

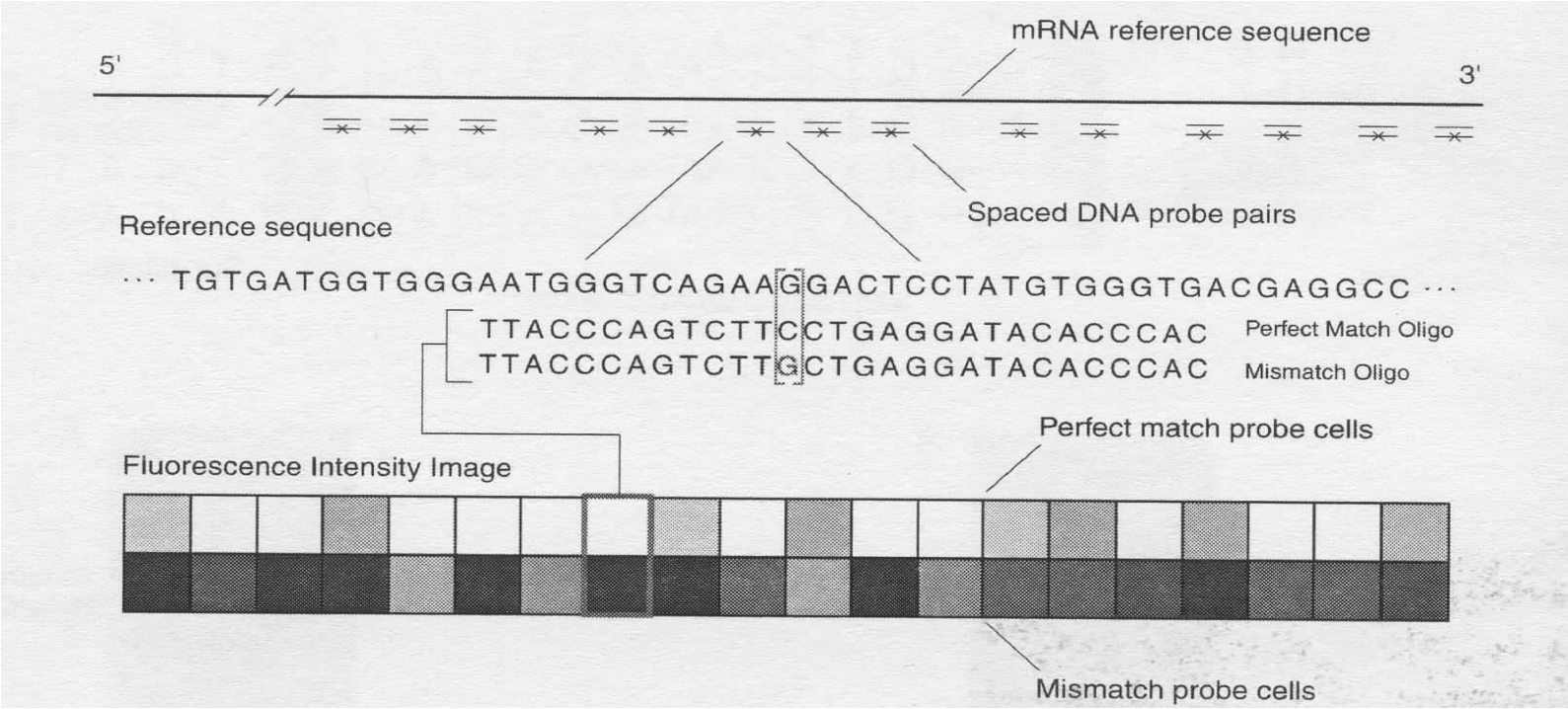
Vznik a charakter dat -> Affymetrix čipy

Anatomie GeneChipu® I.



Anatomie GeneChipu® II.

- Sondy = oligonukleotidy, jednořetězcové, délky 25 bp (AGCATGACTAG……)
- Každý gen reprezentovaný sadou 11-20 párů sond (**probeset**)
- Každý pár sond se skládá z Perfect Match (PM) a Mismatch (MM) sondy
  - PM je perfektní komplementární sekvenece genu
  - MM – jako PM, kromě prostřední (13^{té}) báze
  - MM je interní kontrola, měřící nespecifické vazby



Skenování a analýza obrazu Affymetrix

- U jednokanálových oligonukleotidových mikročipů je použita pouze jedna vlnová délka a pomocí UV skeneru je vytvořený jen jeden obraz

- U Affymetrix mikročipů je tento obraz ve formátu *DAT*, a je zpracovaný v software firmy Affymetrix

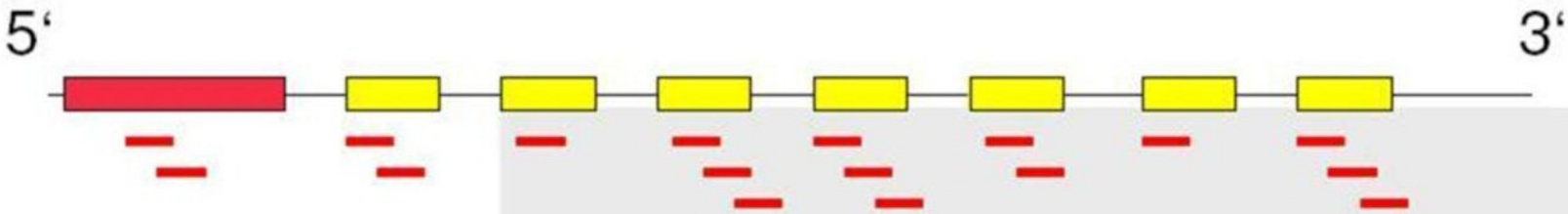
- Po nasazení mřížky pro identifikaci čtvercových spotů, jsou obvodové pixely každého spotu vyřazeny z těchto důvodu:

  - tyto s největší pravěpodobností můžou patřit jinému spotu vzhledem k možnosti špatného nasazení mřížky

  - signál na obvodu bývá nejslabší

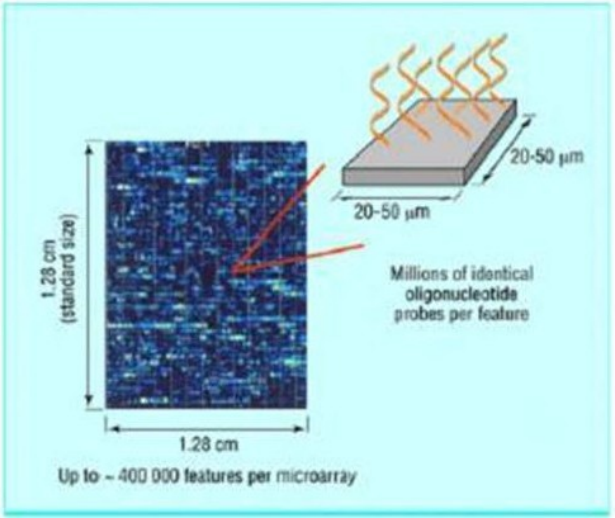
  Z pixelů, které jsou zařazeny je signál odhadnut jako 75% kvantil – tato informace/kvantifikace je uložena v **.CEL** souboru

  Mapování sond na sady sond je uloženo v souboru s příponou **.CDF**



several *probe pairs* (perfect match PM and mismatch MM) per *probeset*

PM: ATGAGCTGTACCAATGCCAACCTGG
MM: ATGAGCTGTACCTATGCCAACCTGG



64 pixels; Signal intensity is upper quartile of the 36 inner pixels

Stored in CEL file

16-20 probe pairs: HG-U95a
11 probe pairs: HG-U133

Affymetrix vs cDNA

- Vzhledem k odlišnému kontextu sond, odlišné úpravy dat než u cDNA
- 11-20 sond na gen - nutná sumarizace, je potřebná jediná hodnota reprezentující gen!
- Rozlišujeme dvě úrovně základních datových matic – **úroveň sondy** (anglicky *probe level*) a **úroveň sady sond** (anglicky *probeset level*)

Kontrola kvality a normalizace

- Jen jeden kanál => většina kontroly kvality a normalizace se vykonává vzhledem k ostatním čipům v experimentu

- Některé nástroje kontroly kvality využívají statistiky, které jsou výsledkem modelování **normalizovaných** intenzit sond

- Kontrolu kvality a normalizaci proto nebudeme dělit na uvnitř čipu a mezi čipy, jako u dvoukanálových cDNA experimentů, ale na **kontrolu sond** a **kontrolu a normalizaci celých mikročipů.**

AffyBatch

- třída pro uskladnění a analýzu Affymetrix GeneChip dat v Bioconductoru
- Tvoří se s pomocí read.affybatch() nebo ReadAffy()
- Sloty: cdfName, nrow, ncol, assayData, phenoData, annotation, protocolData, featureData, experimentData

Příkladová data pro ilustraci

- Zde si načteme další datový soubor, na kterém budeme demonstrovat kontrolu kvality. Jedná se o data akutní lymfoblastické leukemie (Ross a kol., 2004). Soubor je součastí balíku ALLMLL a již je ve formátu AffyBatch.

```
install.packages(ALLMLL)

library(ALLMLL)

data(MLL.B)
```

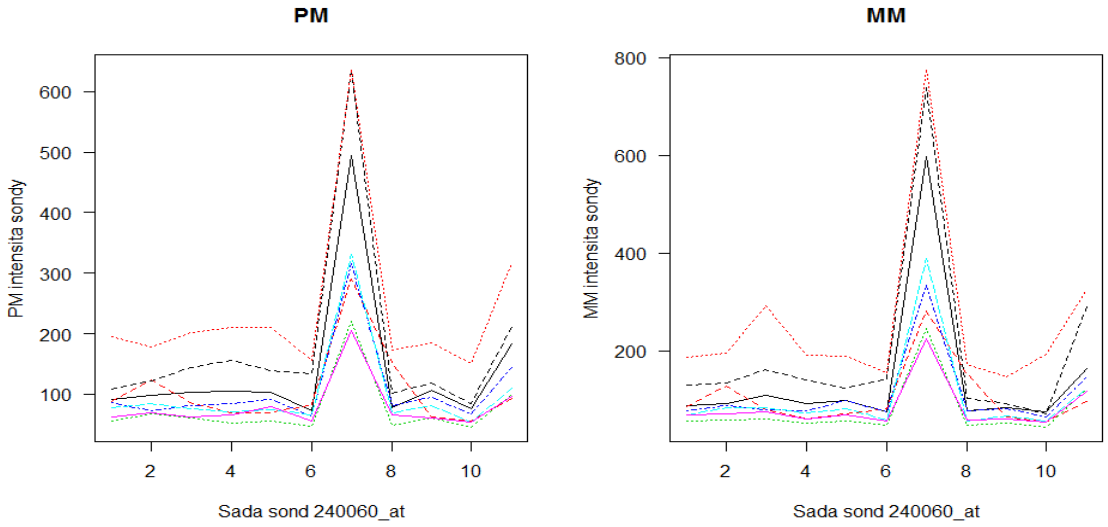
- Pro ilustraci z dat vybereme pouze osm mikročipů a jejich názvy změníme na čísla.

```
Data = MLL.B[,c(1:7,14)]

sampleNames(Data) = c(1:7,14)
```

Kontrola kvality na úrovni sady sond I

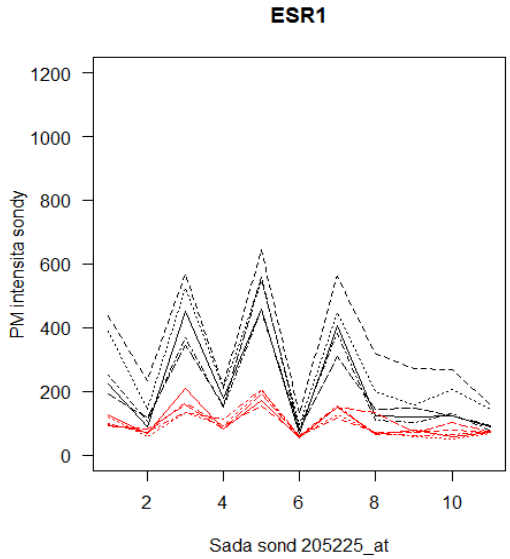
- Najčastejší v případě, pokud potřebujeme vědět, zda je určitá sada sond funkční ve smyslu správné reprezentace cílové sekvence.

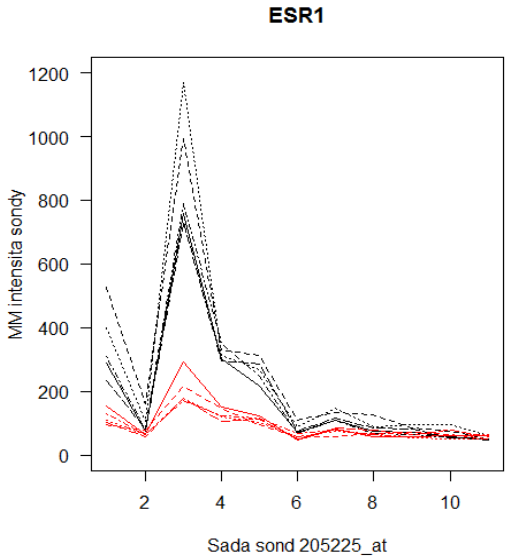
```
pm(Data,"240060_at")

par(mfrow=c(1,2))

matplot(pm(Data,"240060_at"), type="l", ylab="PM intensita
   sondy", xlab="Sada sond 240060_at", las=1, main="PM")

matplot(mm(Data,"240060_at"), type="l", ylab="MM intensita
   sondy", xlab="Sada sond 240060_at", las=1, main="MM")
```



Kontrola kvality na úrovni sady sond II

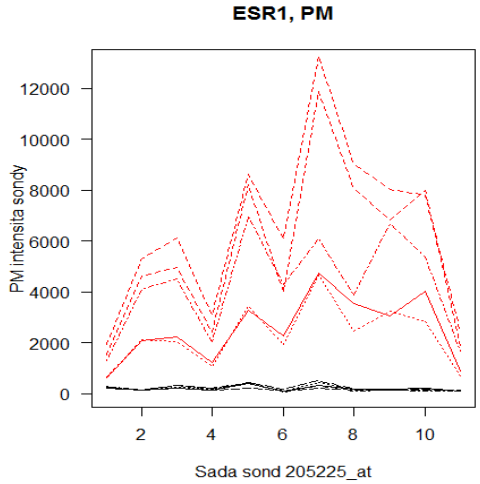
- Efekt dávky, gen ESR1, data karcinom kolorekta

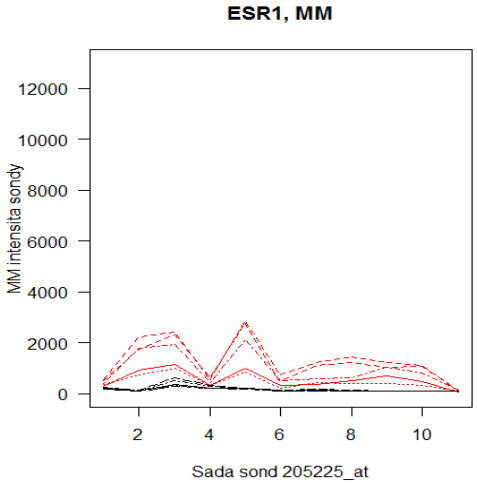




Dávka 1
Dávka 2

- Porovnání ESR1 MM a PM intenzit u ER+ a ER- karcinomu prsu





ER+
ER-

Kontrola kvality na úrovni mikročipu

Rozlišujeme 3 hlavní způsoby kontroly kvality na úrovni mikročipu:

- Kontrola kvality na základě **parametrů Affymetrix**
- Kontrola kvality s pomocí **základních diagnostických grafů**
- Kontrola kvality na základě **modelu úrovně sondy (PLM – probe level model)**

Efekt barviva není problémem, protože máme pouze jeden kanál.

Kontrola kvality na úrovni mikročipu

Rozlišujeme 3 hlavní způsoby kontroly kvality na úrovni mikročipu:

- Kontrola kvality na základě **parametrů Affymetrix**
- Kontrola kvality s pomocí **základních diagnostických grafů**
- Kontrola kvality na základě **modelu úrovně sondy (PLM – probe level model)**

Efekt barviva není problémem, protože máme pouze jeden kanál.

Kontrola kvality na základě parametrů Affymetrix

Affymetrix vydal sadu odporúčaní k analýze dát GeneChip mikročipu **”GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals”**

http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf

Kontrola kvality na základě parametrů Affymetrix I

Balík `simpleaffy` implementuje základní funkce, které počítají sumarizace parametrů kvality Affymetrix GeneChip mikročipu

```
library(simpleaffy)
Data.qc = qc(Data) #funkce qc()
```

- Podle návodu Affymetrixu by **průměrné hodnoty pozadí měly být porovnatelné** (a mezi 20 a 100)

```
> avbg(Data.qc)
```

1	2	3	4	5	6	7	14
67.34494	68.18425	42.12819	61.31731	53.64844	49.39112	75.14030	128.41264

- Škálové faktory by se neměly lišit více než trojnásobně mezi čipy:

```
> sfs(Data.qc)
```

4.905489 9.765986 10.489529 7.053323 7.561613 13.531238 3.394921 2.475224

Kontrola kvality na základě parametrů Affymetrix II

- **Procento nalezených (present)** sond by mělo být **porovnatelné**, přičemž **extrémně nízké hodnoty** jsou znakem **nízké kvality**. V našem případě je na tom nejhůř čip 6.

```
> percent.present(Data.qc)
```

1.present	2.present	3.present	4.present	5.present	6.present	7.present	14.present
26.53124	21.65158	25.58181	23.53279	23.35615	17.96423	25.98808	25.25061

- Nakonec, **3'/5' poměry interních kontrolních genů (beta actin a GADPH)** by neměly překročit hranici tří, v našem příkladu tedy nenalézáme problém s degradací RNA.

```
> ratios(Data.qc)
```

Kontrola kvality na úrovni mikročipu

Rozlišujeme 3 hlavní způsoby kontroly kvality na úrovni mikročipu:

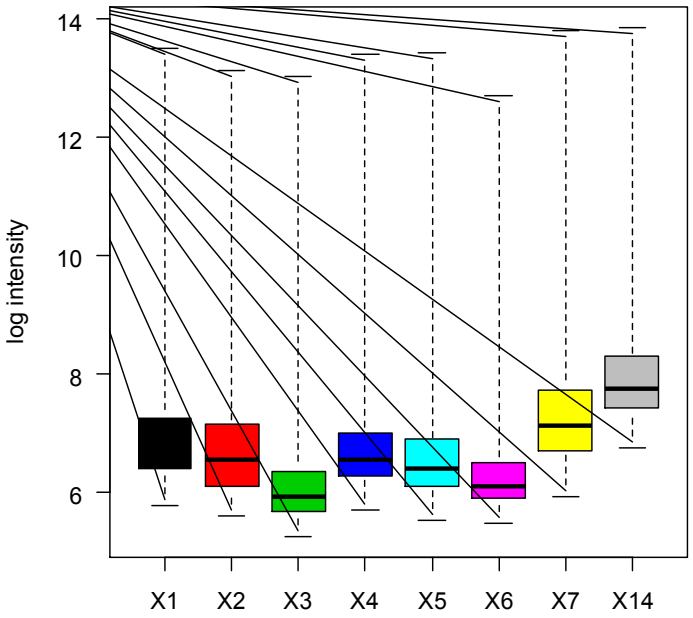
- Kontrola kvality na základě **parametrů Affymetrix**
- Kontrola kvality s pomocí **základních diagnostických grafů**
- Kontrola kvality na základě **modelu úrovně sondy (PLM – probe level model)**

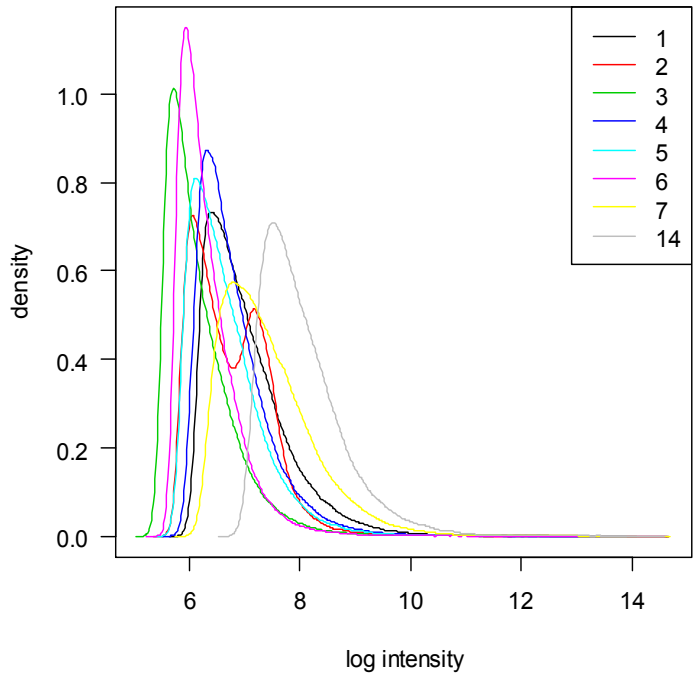
Efekt barviva není problémem, protože máme pouze jeden kanál.

Kontrola kvality na základě základních diagnostických grafů I

- Krabicové grafy a hustoty rozložení **logaritmovaných** hodnot intensit sond u všech mikročipů

```
par(mfrow=c(1,2))
boxplot(Data, las=1, ylab="log intensity")
hist(Data, las=1, col=c(1:8), lty=1)
legend("topright",col=c(1:8), lty=1, legend=c(1:7,14))
```

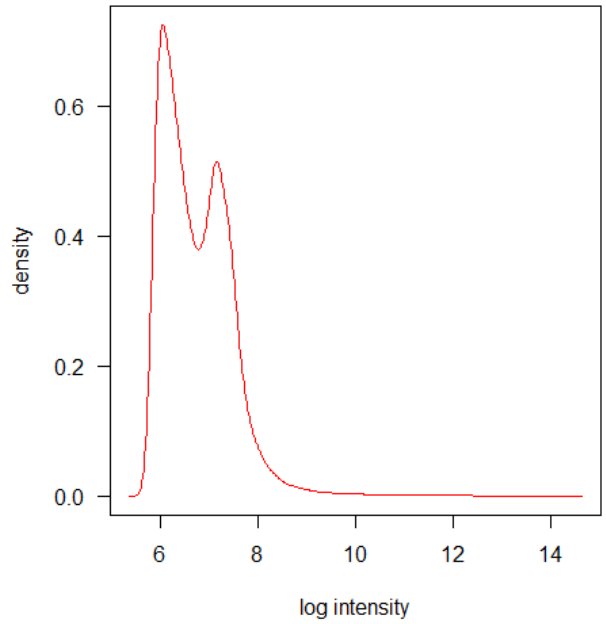


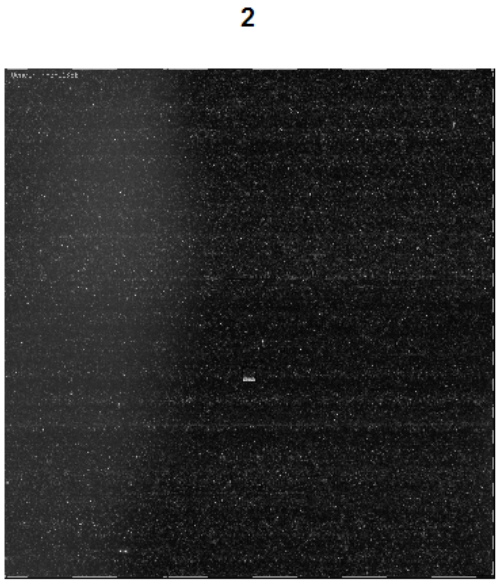


Kontrola kvality na základě základních diagnostických grafů II

- Podobně jako u cDNA mikročipů, i u oligonukleotidových čipů může dojít k prostorovému efektu nerovnoměrné hybridizace, která se pak také odhaluje pomocí heatmapy virtuálně zrekonstruovaného mikročipu

```
par(mfrow=c(1,2))
hist(Data[,2], las=1, col=2, lty=1)
image(Data[,2])
```

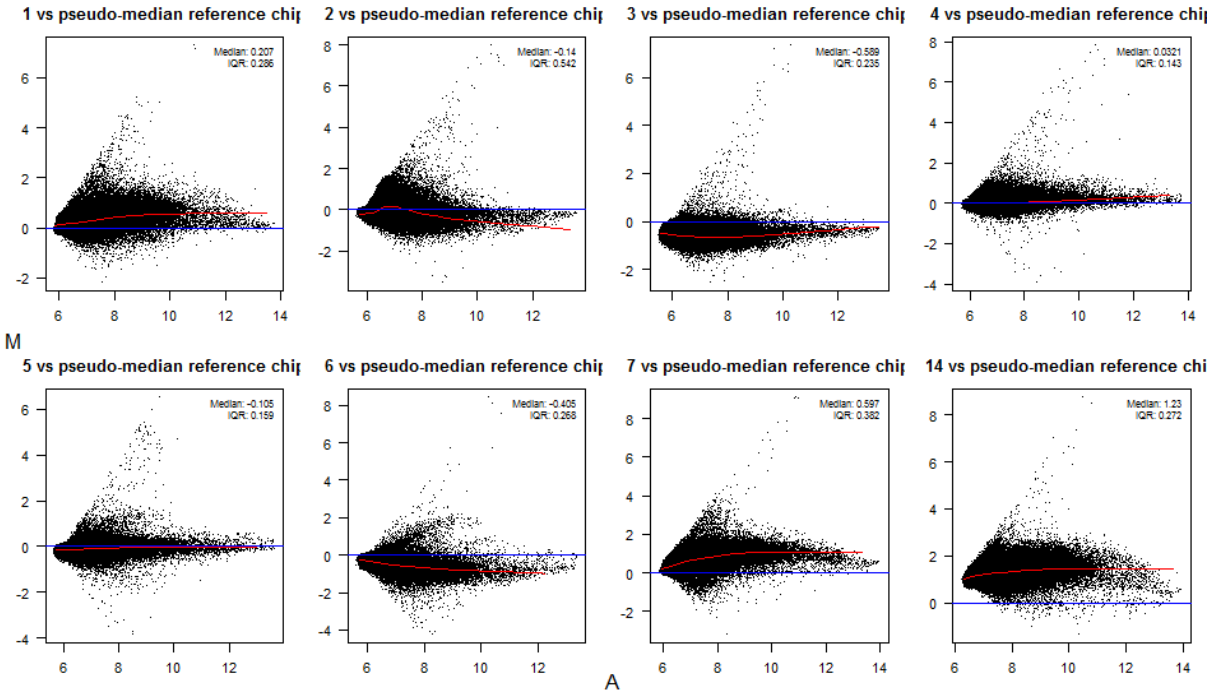




Kontrola kvality na základě základních diagnostických grafů III

- Jako další lze podobně jako u cDNA čipů vykreslit ***MA* graf**
- *M* a *A* hodnoty se buď počítají mezi dvěma mikročipy, nebo úlohu referenčního kanálu zastoupí referenční pseudo-mikročip (medián)

```
windows(12,7)
par(mfrow=c(2,4), mar=c(2,2,3,1))
MAplot(Data, cex=0.75, las=1)
mtext("M", 2, outer=T, line=-1.5, las=1)
mtext("A", 1, line=2, at=-6)
```



Kontrola kvality na základě modelu úrovně sondy (PLM – probe level model) I.

Tento typ kontroly kvality staví na lineárním modelu Y_{gik} - intensit normalizovaných na pozadí pomocí RMA, který se nazývá PLM model a je definován následovně:

$$\log(Y_{gik}) = \theta_{gi} + \vartheta_{gk} + \epsilon_{gik},$$

θ_{gi} - logaritmovaná hladina exprese transkriptu (genu) g na mikročipu i

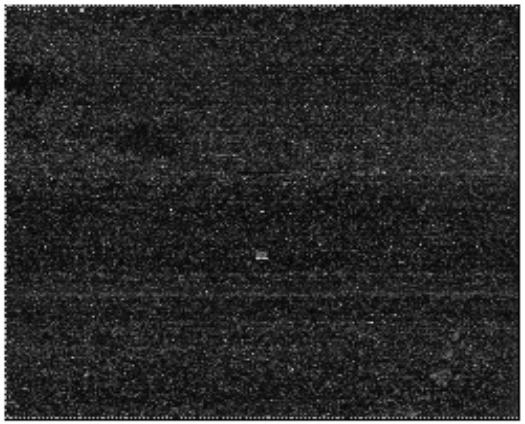
ϑ_{gk} - efekt k-té sondy reprezentující transkript g a ϵ_{gik} je chyba měření

θ_{gi} je tedy již **sumarizovaná hodnota signálů všech sond** ze sady reprezentující gen g a odhaduje se buď pomocí mediánového vyhlazování, nebo pomocí robustní lineární regrese

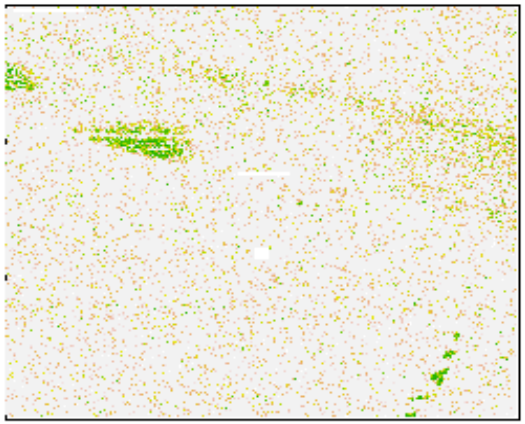
```
> library(affyPLM)
PLMres <- fitPLM(Data)
```

Kontrola kvality na základě modelu úrovně sondy (PLM – probe level model) II.

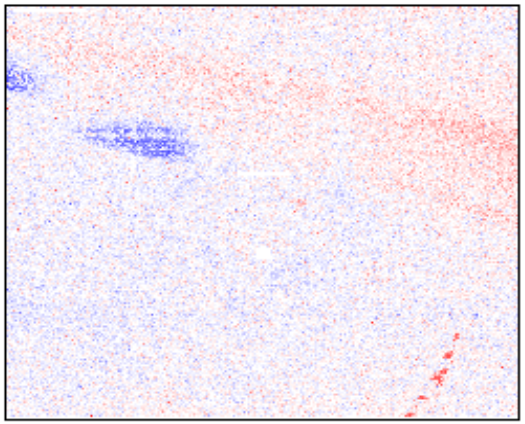
intensita signálu



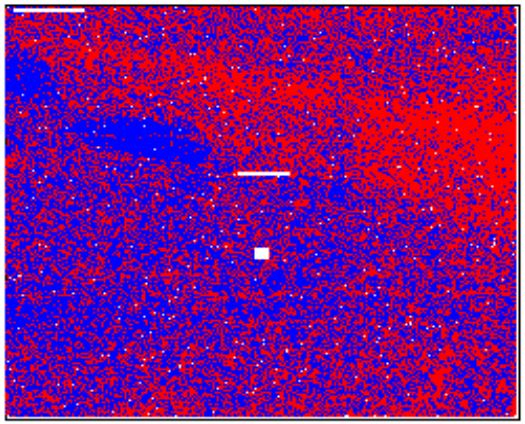
váhy



rezidua



znaménka reziduí



Jak kvantifikovat kvalitu?

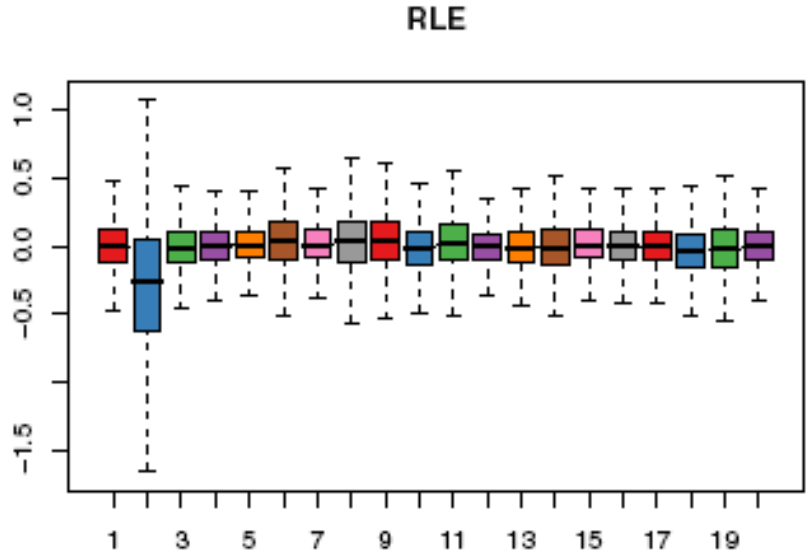
Kontrola kvality na základě modelu úrovně sondy (PLM – probe level model) III.

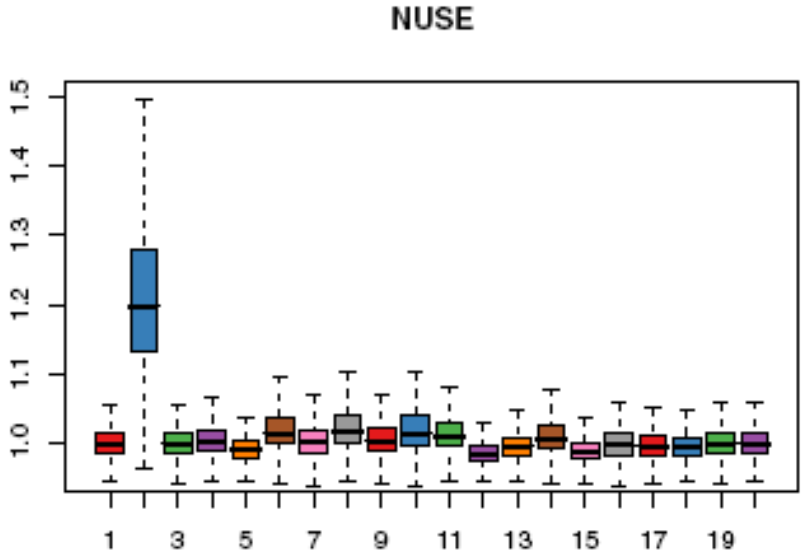
- Relative Log Expression (RLE) $RLE_{gi} = \hat{\theta}_{gi} - m_g$,
- Normalized Unscaled Standard Error (NUSE)

$$\mathrm{NUSE}\left(\hat{\theta}_{gi}\right) = \frac{\mathrm{SE}\left(\hat{\theta}_{gi}\right)}{\mathrm{med}_i\left(\mathrm{SE}\left(\hat{\theta}_{gi}\right)\right)}.$$

kde θ_{gi} *predstavuje intenzitu genu g na sklíčku i a* m_g *medián genu i počítaný přes všechny sklíčka*

- Počítané pro každý gen, mohou se využít jako kontrola kvality sond aj sklíček





Kontrola kvality na základě modelu úrovně sondy (PLM – probe level model) IV.

- Pokud vzhledem k druhu experimentu a mikročipu můžeme očekávat, že platí předpoklad o nezměněné expresi většiny transkriptů, můžeme odstranit čip jako nekvalitní, pokud má výrazně posunuté *RLE* hodnoty mimo 0, a *NUSE* hodnoty nad 1 (>1.02)

```
> nuse.stat = nuse(PLMres, type="stats")
> W = nuse.stat["median",]<1.02
> W
    1     2     3     4     5     6     7    14
 TRUE FALSE  TRUE  TRUE  TRUE  TRUE  TRUE  TRUE
> Data.clean = Data[,W]
```

Funkce Mbox vykreslí krabicové grafy *RLE* hodnoty pro všechny čipy a funkce NUSE vykreslí krabicové grafy hodnot *NUSE* :

```
> Mbox(PLMres, main="RLE", las=1)
> NUSE(PLMres, ylim=c(0.9,2), las=1, main="NUSE")
```

Normalizace a sumarizace

- Mnoho metod pro úpravy dat oligonukleotidových mikročipů představuje algoritmy, které provedou komplexní normalizaci a sumarizaci dat.
- V případě, že tyto metody poprvé představily některou z metod, na tuto metodu se pak odkazuje jménem algoritmu.
- 2 nejznámější algoritmy
  - MAS 5.0 (Microarray Suite 5.0)
    - http://www.affymetrix.com/products/software/specific/mas.affx
  - RMA (log scale Robust Multi-array Analysis)
    - Methods for Affymetrix Oligonucleotide Arrays R package
    - http://www.bioconductor.org

MAS 5.0 algoritmus

- Používá PM i MM sondy

1. **Odečtení intensity pozadí od každé sondy (*PM* i *MM*)**
   - Metoda odhadu signálu pozadí: Rozdělení čipu na *K* čtvercových oblastí (*K*=16), označme je *Z*. 2% sond s nejnižší intensitou je pak použito pro odhad signálu pozadí u každé oblasti (b_{Z_k}). Odhad pozadí pro sondu na pozici (x, y) pak je vypočten váženým průměrem odhadů signálů všech zón

```
> Data.bg.mas5 = bg.correct(Data, method="mas")
```

2. **Odečtení signálu nespecifické hybridizace sondy *i* v sadě *j***

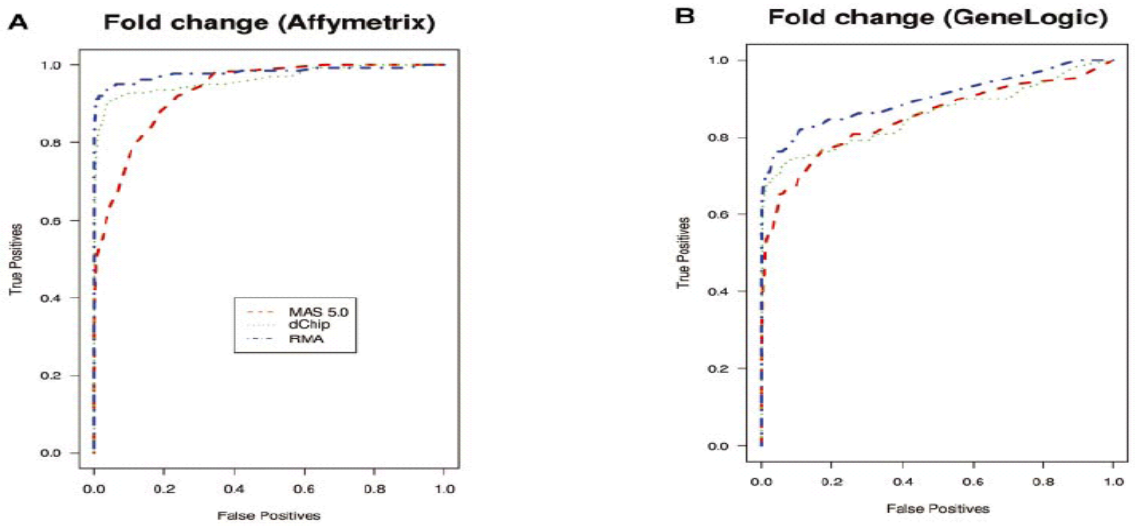
$$V_{i,j} = PM_{i,j} - IM_{i,j}$$

   - *IM* je "ideal mismatch". Je to vlastně *MM*, ale v případě, že *MM* > *PM*, *MM* se odhadne na základě ostatních sond ze sady.

```
> threestep(Dilution, background.method = "MASIM")
```

RMA algoritmus

- Robust Multichip Average:
  1. Odpočet hodnoty pozadia (odhadnutá zo všetkých MM)
  2. Kvantilová normalizace
  3. Sumarizace
- Používá už všechny microarray sklíčka, počítá jen s PM hodnotami, všechny MM používá na odhad pozadí



> Data.bg.rma = bg.correct(Data, method="rma")

Normalizace mezi mikročipy

- Podobně jako u cDNA mikročipů hlavně:
  - **Centrování mediánem**
  - **Loess**
  - **Kvantilová normalizace**
- Funkce normalize implementuje několik normalizačních metod.
  Centrování průměrem:

```
> Data.norm.scale = normalize(Data, method="constant")
```

Kvantilová normalizace:

```
> Data.norm.quant = normalize(Data, method="quantiles")
```

Cyklická loess:

```
> Data.norm.loess = normalize(Data, method="loess")
```

Také funkce threestep balíku affyPLM implementuje několik druhů normalizace. Jak již bylo řečeno výše, tato funkce vrací již sumarizované hodnoty.

Příklad 2

- Načteme knihovnu `affy` pro základní práci s Affymetrix GeneChip daty:

```
library(affy)
```

- Vytvoření datové struktury `AffyBatch` budeme demonstrovat na příkladu mikročipů z experimentu porovnávajícího ER (estrogen receptor) pozitivní a ER negativní karcinomy prsu.
- Pomocí funkce ReadAffy načteme základní datové matice (CEL soubory) našeho příkladu do datové struktury AffyBatch.

```
breast = ReadAffy(celfile.path="Raw/")
```

Názvy čipů upravíme, odstraníme koncovku ".CEL":

```
ns = length(sampleNames(breast))
nm = unlist(strsplit(sampleNames(breast), split=".",
  fixed=TRUE))[seq(1,2*ns,2)]
sampleNames(breast) = nm
```

Konečná podoba dat

mRNA vzorky

Gén	vzorek1	vzorek2	vzorek3	vzorek4	vzorek5	...	
1		0.46	0.30	0.80	1.51	0.90	...
2		-0.10	0.49	0.24	0.06	0.46	...
3		0.15	0.74	0.04	0.10	0.20	...
4		-0.45	-1.03	-0.79	-0.56	-0.32	...
5		-0.06	1.06	1.35	1.09	-1.09	...

M hodnota genu *i* vzorku *j*

M =

- Log_2(Cy5 / Cy3) – cDNA arrays
- Funkce(PM, MM) z MAS, dchip nebo RMA