

MUNI | RECETOX

Analýza genomických a proteomických dat

Vznik a charakter dat -> Oligonukleotidové čipy

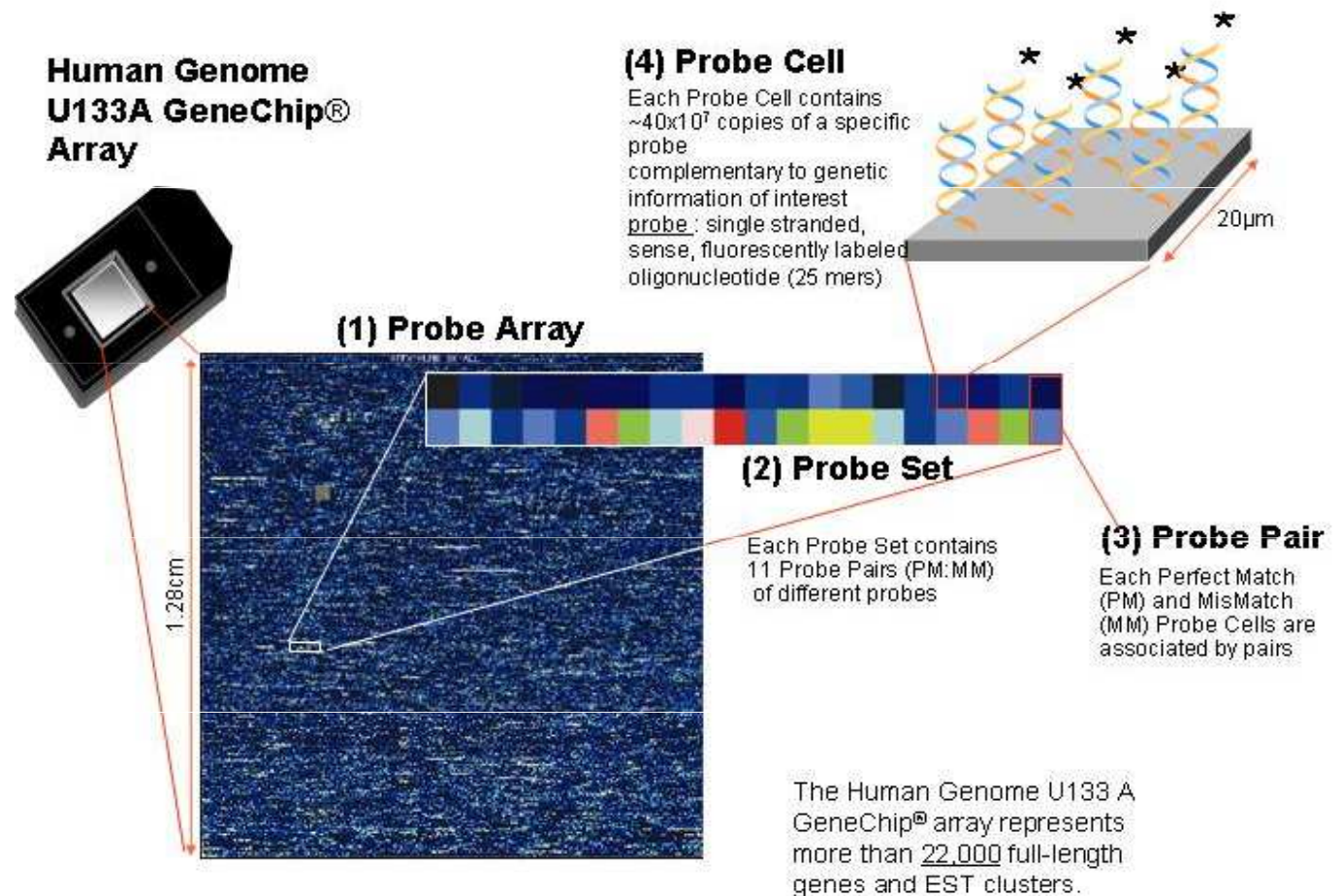
Jaro 2024

27. Březen, 3. Duben 2024

Eva Budinská (eva.budinska@recetox.muni.cz)

Anatomie Affymetrix* GeneChipu™ - část I.

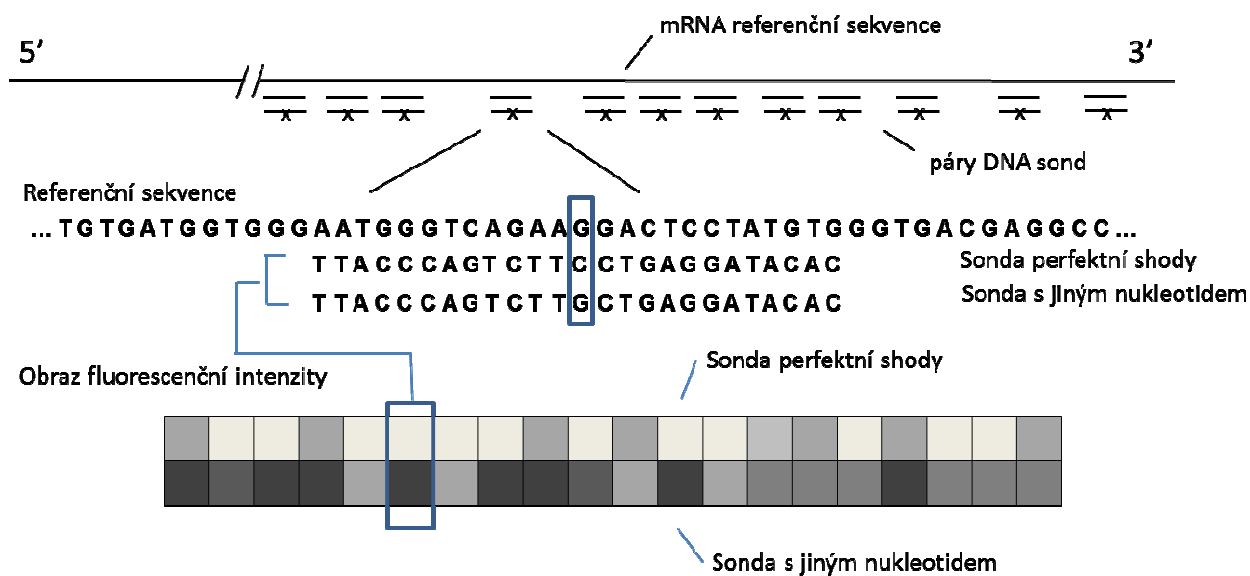
https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fbrochures%2Fhgu133_p2_technote.pdf



*Affymetrix je nyní Applied Biosystems, což je řada produktů DNA mikročipů prodávaných společností Thermo Fisher Scientific

Anatomie GeneChipu™ -část II.

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



Další oligonukleotidové mikročipy

GeneChip™ Human Gene 2.0 ST, *AppliedBiosystems - CLARIOM S a CLARIOM D

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/EMI07313-2_DS_Clariom-D_solutions_HMR.pdf

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fbrochures%2FEMI07387-2_DS_Clariom-S_solutions_HMR.pdf

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fbrochures%2Fhugene_2_st_datasheet.pdf

*Affymetrix je nyní součástí Applied Biosystems, což je řada produktů DNA mikročipů prodávaných společností Thermo Fisher Scientific

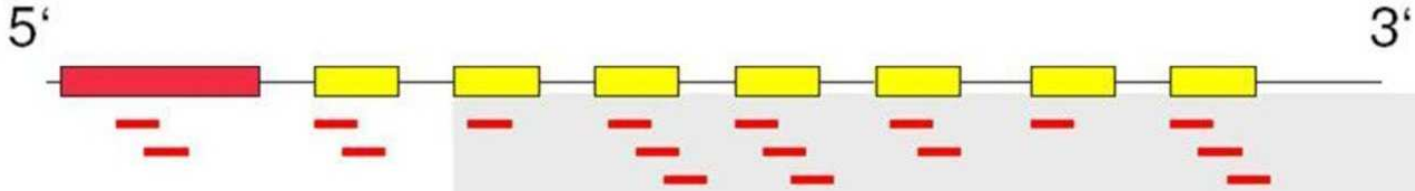
Úkol (za 1 bod)

Porovnejte dizajn mikročipů Affymetrix GeneChip a AppliedBiosystems - CLARIOM S a CLARIOM D, Human ST s ohledem na počty sond/transkriptů/genů, které reprezentují, délku sond, počet sond v sadě sond apod.

Vytvořte srovnávací tabulku.

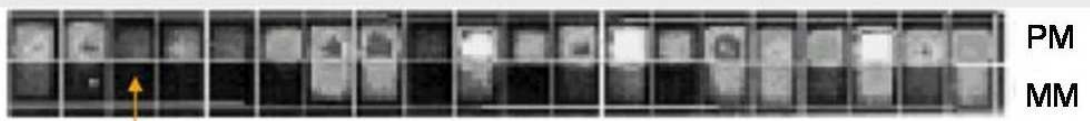
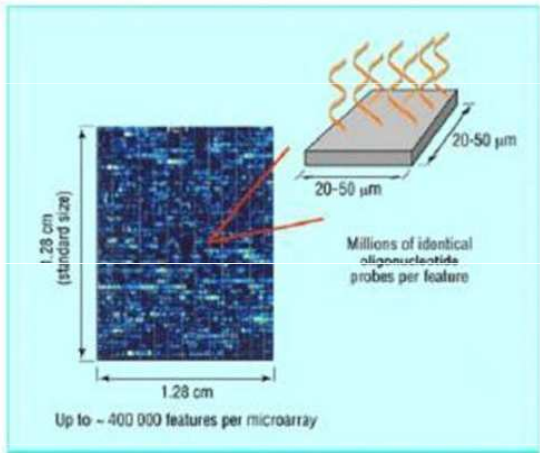
Skenování a analýza obrazu Affymetrix GeneChip

- 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 a to z těchto důvodů:
 - s největší pravděpodobností můžou patřit jinému spotu vzhledem k možnosti špatného nasazení mřížky (vyhodnocuje se pouze 36 pixelů z celkových 64)
 - signál na obvodu bývá nejslabšíZ 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

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

Stored in CEL file

Affymetrix vs cDNA

- Vzhledem k odlišnému kontextu sond, odlišné úpravy dat než u cDNA
- 11-20 sond na gen (transkript) - 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.**

Kontrola kvality na úrovni sondy/sady sond

- Nejčastější v případě, pokud potřebujeme vědět, zda je určitá sada sond funkční ve smyslu správné reprezentace cílové sekvence
- Nedělá se plošně na všech sondách! Můžeme úplně přeskočit!
- POZOR – jeden ze způsobů kontroly kvality celého mikročipu využívá modelu úrovně sondy (PLM model)

AffyBatch

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

oligo

- Čipy Clariom D a clariom S se dají analyzovat s pomocí balíku oligo který má podobné funkce jako balík `affy`

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 součástí 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)
```

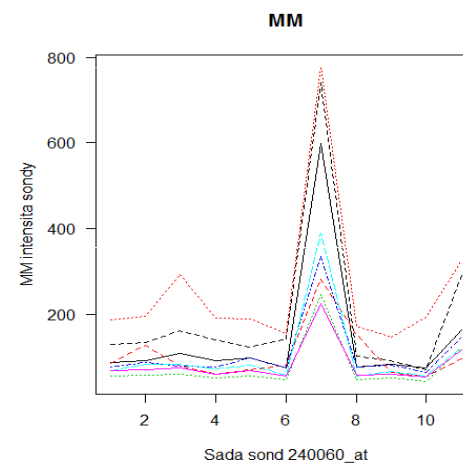
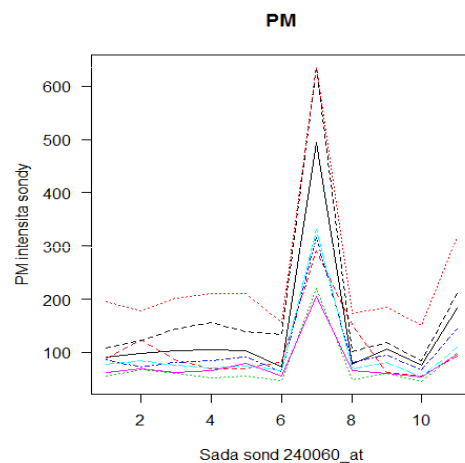
Příklad - kontrola kvality na úrovni sady sond

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

```
par(mfrow=c(1,2))
```

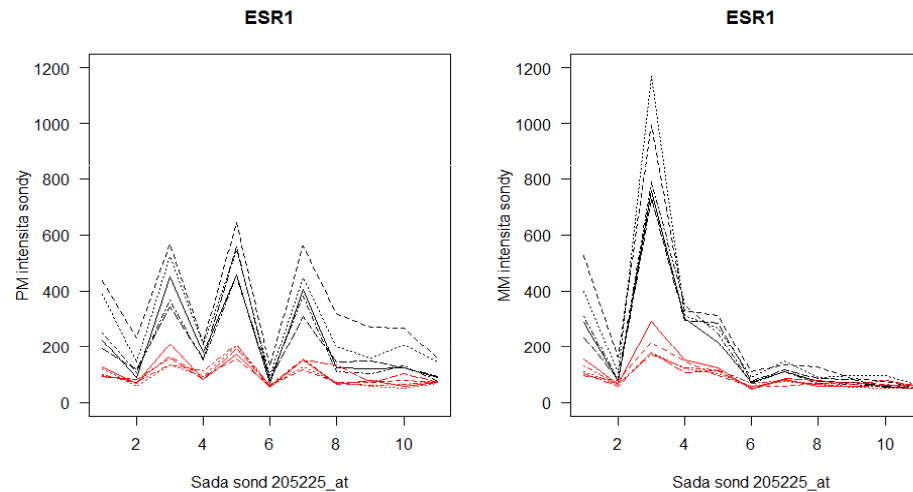
```
matplot(pm(Data,"240060_at"), type="l", ylab="PM intensita sondy", xlab="Sada sond  
240060_at", las=1, main="PM")
```

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



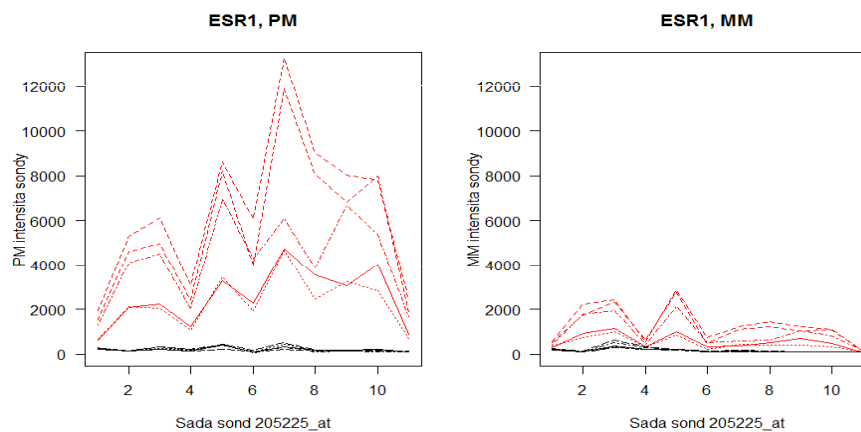
Příklad - kontrola kvality na úrovni sady sond

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

Efekt barviva není problémem, protože máme pouze jeden kanál.

Kontrola kvality na základě doporučených parametrů Affymetrix

Kontrola kvality na základě parametrů Affymetrix

Affymetrix vydal sadu doporučení k analýze dat GeneChip mikročipů "**GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals**"

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

Ve zkratce:

- **průměrné hodnoty pozadí měly být porovnatelné** (a mezi 20 a 100)
- škálové faktory by se mezi čipy neměly lišit více než trojnásobně
- **procento nalezených (present) sond by mělo být porovnatelné**, přičemž **extrémně nízké hodnoty** jsou znakem **nízké kvality**
- Nakonec, **3'/5' poměry interních kontrolních genů (beta actin a GAPDH)** by neměly překročit hranici 3

Kontrola kvality na základě parametrů Affymetrix

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

- **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 s pomocí základních diagnostických grafů

Tyto grafy jsou stejné jako pro cDNA mikročipy

Kontrola kvality s pomocí základních diagnostických grafů

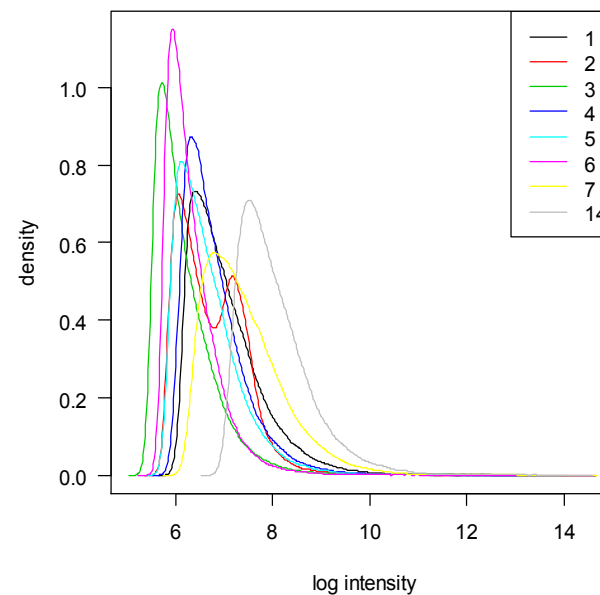
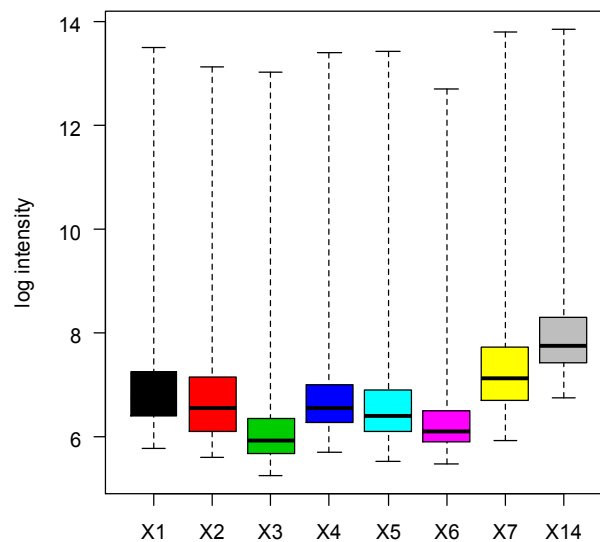
- Krabicové grafy a hustoty rozložení **logaritmovaných** hodnot intenzit sond u všech mikročipů

```
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))
```



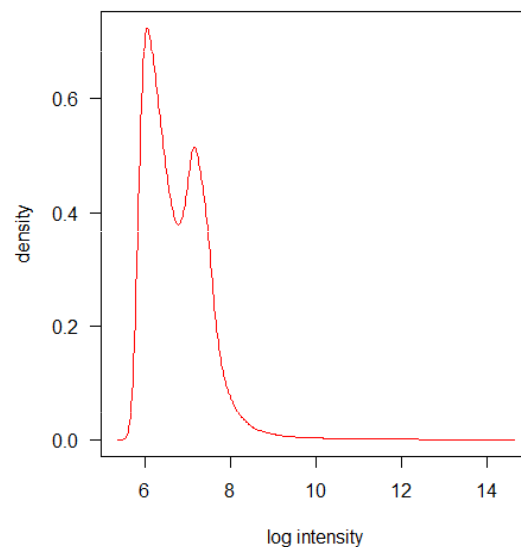
Kontrola kvality s pomocí základních diagnostických grafů

- 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 a zobrazení rozložení hodnot

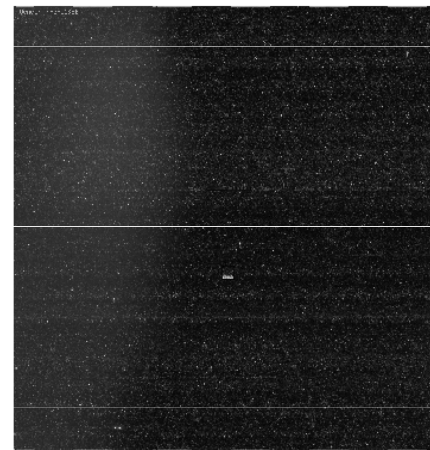
```
par(mfrow=c(1,2))
```

```
hist(Data[,2], las=1, col=2, lty=1)
```

```
image(Data[,2])
```



2



Kontrola kvality s pomocí základních diagnostických grafů

- 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)

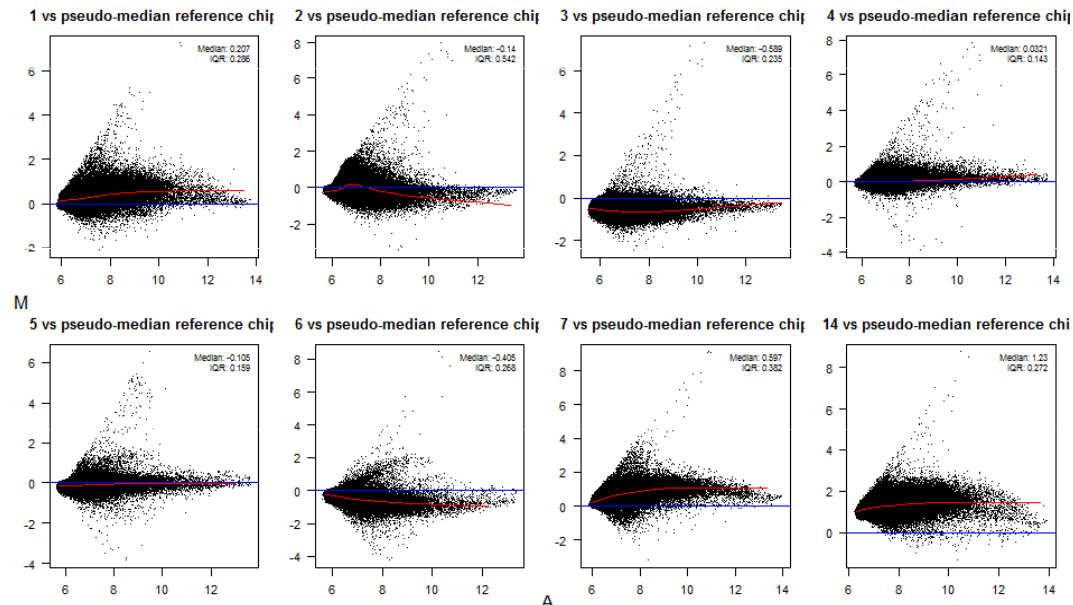
```
windows(12,7)
```

```
par(mfrow=c(2,4), mar=c(2,2,3,1))
```

```
Mplot(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 tzv modelu úrovně sondy (PLM – probe level model)

Bolstad BM (2004). *Low Level Analysis of High-density Oligonucleotide Array Data: Background, Normalization and Summarization*. Ph.D. thesis, University of California, Berkeley.

Bolstad BM, Collin F, Brettschneider J, Simpson K, Cope L, Irizarry RA, Speed TP (2005). “Quality Assessment of Affymetrix GeneChip Data.” In Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Dudoit S (eds.), *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, chapter 3, 33–47. Springer, New York.

Brettschneider J, Collin F, Bolstad BM, Speed TP (2007). “Quality assessment for short oligonucleotide arrays.” *Technometrics*

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

Tento typ kontroly kvality staví na lineárním modelu Y_{gik} - intenzit 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

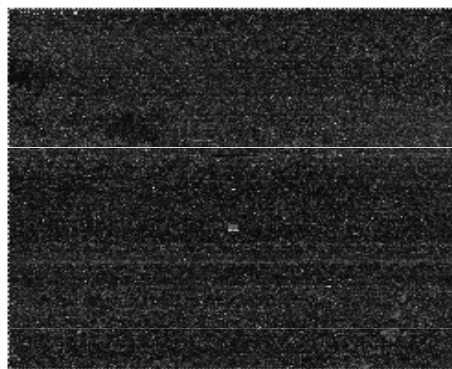
ϑ_{gk} - efekt k -té sondy reprezentující transkript g a ϵ_{gik} je chyba měření

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

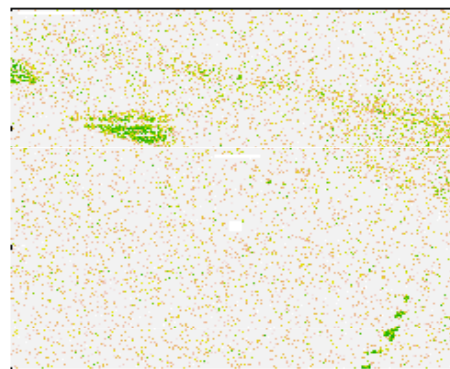
```
> library(affyPLM)
  PLMres <- fitPLM(Data)
```

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

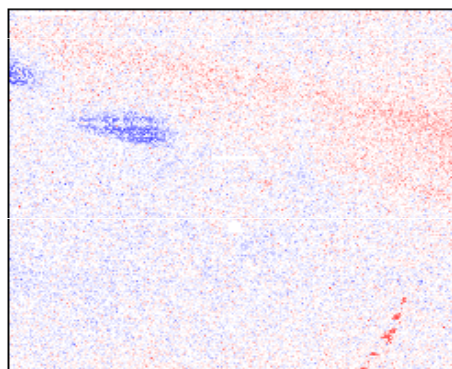
intenzita signálu



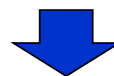
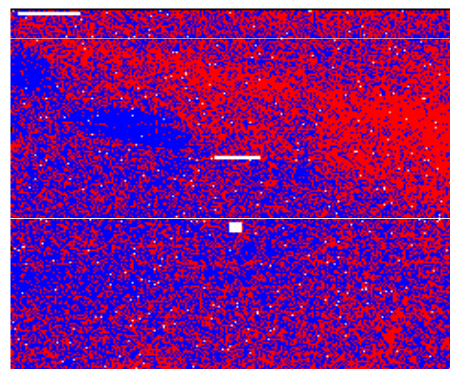
váhy



rezidua



znaménka reziduí



Jak kvantifikovat kvalitu?

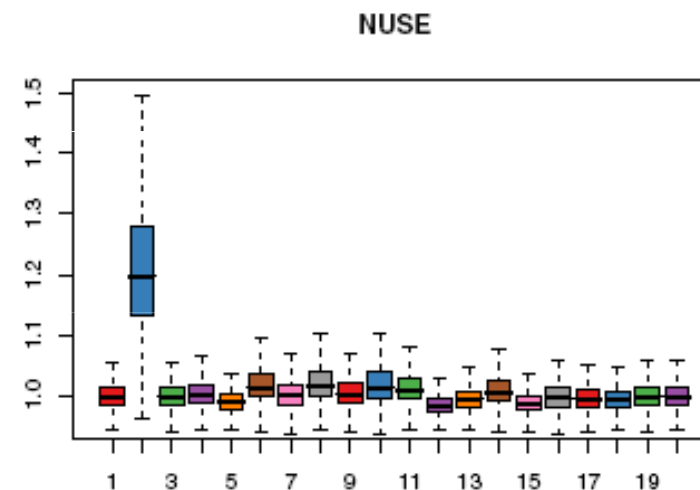
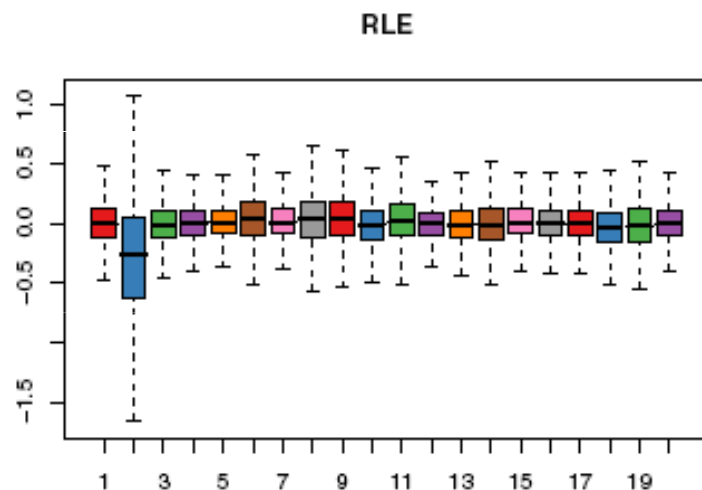
Kontrola kvality na základě tzv modelu úrovně sondy (PLM – probe level model)

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

$$\text{NUSE}(\hat{\theta}_{gi}) = \frac{\text{SE}(\hat{\theta}_{gi})}{\text{med}_i(\text{SE}(\hat{\theta}_{gi}))}$$

kde θ_{gi} představuje intenzitu genu g na sklíčku i a m_g medián genu g počítaný přes všechny sklíčky

- Počítané pro každý gen, mohou se využít jako kontrola kvality sond i sklíčků



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

- 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 na pozadí 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.
- Nejznámější algoritmy
 - MAS 5.0 (Microarray Suite 5.0)
 - PLIER (Probe Logarithmic Intensity ERror)
 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2623311/>
 - RMA (log scale Robust Multi-array Analysis)
 - Methods for Affymetrix Oligonucleotide Arrays R package
 - <http://www.bioconductor.org>
 - GCRMA

MAS 5.0 algoritmus korekce signálu

- Používá PM i MM sondy
- 2 přístupy:
 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 intenzitou je pak použito pro odhad signálu pozadí u každé oblasti b_{z_k} . Odhad pozadí pro sondu na pozici (x,y) je pak vypočten váženým průměrem odhadů signálů všech zón.
> `Data.bg.mas5 <- bg.correct(Data, method="mas")`
 2. Odečtení signálu nespecifické hybridizace sondy i v sadě sond 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.
> `Data.bg.masim <- threestep(Data, background.method="MASIM")`

PLIER

$$E(pm_{ij}) = \mu_{ij} = a_i c_j + B_{ij}$$

$$E(mm_{ij}) = B_{ij}$$

- B_{ij} je nespecifická hybridizace na pozadí příslušná sondě i na mikročipu j (pozadí je stejné pro každý PM a MM pár)
- μ_{ij} je vazební hladina sondy i na čipu j
- a_i je vazební afinita sondy i ,
- c_j je koncentrace RNA vzorku j , který je hybridizován na čip j

RMA (Robust Multichip Average) konvoluce

- Tato metoda, po které byl pojmenován jeden celý algoritmus normalizace dat zahrnující normalizaci mezi sklíčkami a následnou sumarizaci (Irrizary a kol, 2003), normalizuje PM hodnoty s pomocí globálního modelu rozdělení *PM* intenzit sond. **Pracuje tedy se všemi čipy v experimentu**. Robust Multichip Average:
 1. Odpočet hodnoty pozadí (odhadnutá ze všech *MM*)
 2. Kvantilová normalizace
 3. Sumarizace
 - Používá už všechny čipy, 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**
 - **Cyklická loess**
 - **Kvantilová normalizace**
- Některé metody využívají informaci všech mikročipů i pro normalizaci pozadí a sumarizaci (RMA)

- 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 vrátí již sumarizované hodnoty.

Sumarizace

- Sumarizace intenzit sond ze sady do jediné hodnoty představující expresi transkriptu (genu) je poslední částí zpracování základních dat oligonukleotidových mikročipů.
- Podobně jako u normalizace, některé sumarizační metody operují pouze v rámci jednoho mikročipu, jiné berou do úvahy všechny mikročipy.

Metody sumarizace v rámci jednoho mikročipu

Nejjednodušším druhem sumarizace je průměr, nebo medián logaritmů sond. Dalším často používaným je Tukeyho dvouváhový odhad, který se používá v algoritmu MAS5.0.

Metody sumarizace vícečipové

Tyto metody zahrnují lineární regresi, robustní regresi (PLM model) a mediánové vyhlazování.

Poslední metoda je specifická pro algoritmus RMA, který je implementovaný ve funkci `rma`, která provede korekci na pozadí pomocí RMA konvoluce, kvantilovou normalizaci a sumarizaci založenou na **mediánovém vyhlazování**.

```
Data.rma = rma(Data.clean)
```

Cvičení

- Pracujte se souborem Cviceni-Affy-breast.zip, který rozbalíte
- Pokračujte instrukcemi v souboru Affy-normalize.R

- Pro čipy Clariom se podívejte na Clariom-priklad.R, není soubor, nutno mít vlastní

Affymetrix .cdf files

Popis formátu cdf file:

<http://dept.stat.lsa.umich.edu/~kshedden/Courses/Stat545/Notes/AffxFileFormats/cdf.html>

Stáhnutí .cdf ke konkrétní platformě (např. hg-u133-plus)

<http://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=hg-u133-plus>

```
BiocInstaller::biocLite("hgu133a2cdf") # instalace již existující platformy
```

```
BiocInstaller::biocLite("makecdfenv") # nástroj pro vytvoření prostředí k jakékoliv platformě (nutno mít cdf file)
```

Další čtení

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

Online skripta předmětu

<https://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=analyza-genomickych-a-proteomickych-dat--analyza-genomickych-a-proteomickych-dat>

Konečná podoba dat

		Vzorky					
		vzorek1	vzorek2	vzorek3	vzorek4	vzorek5	...
Gen	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

$$\mathbf{M} = \left\{ \begin{array}{l} \text{Log}_2(\text{Cy5} / \text{Cy3}) - \text{cDNA arrays} \\ \text{Funkce}(\text{PM}, \text{MM}) \text{ z MAS, dchip nebo RMA} \end{array} \right.$$