MUNI | RECETOX

Detekce biomarkerů z omics experimentů

- Mgr. Eva Budinská, PhD
- RECETOX
- budinska@recetox.muni.cz
- Experimentální onkologie,
podzim 2019

MUNI | RECETOX

Analýza genových sad

(pathway analýza)

MUNI | RECETOX

Motivace

- Geny, proteiny a další molekuly jsou navzájem propojené ve velké spleti různých signálních, metabolických a různych jiných drah
- Jak odhalit tyto závislosti?
  - Geny, které najdeme odlišně exprimované mezi skupinami (porovnání skupin) můžeme ad-hoc vložit do databáze a podívat se kam patří (KEGG, MsigDB....)
    - nevýhoda – nemáme statistickou významnost, která z drah je zastoupená nejvíce
  - Můžeme přímo porovnávat všechny geny se skupinami genů v jednotlivých dráhách
- **Předpoklad těchto analýz:** operují s již definovanými skupinami genů

Genová sada vs dráha

Génová sada je jakákoliv množina genů, například

všechny geny patřící do jedné dráhy	všechny geny které mají podobnou funkci	...

Sada genů nemusí být dráha – je to všeobecnější a méně specifický pojem

Cíl

- Cíl je přiřadit každé genové sadě, případně dráze jedno číslo - skóre, a nebo p-hodnotu, abychom mohli odpovědět na otázku:

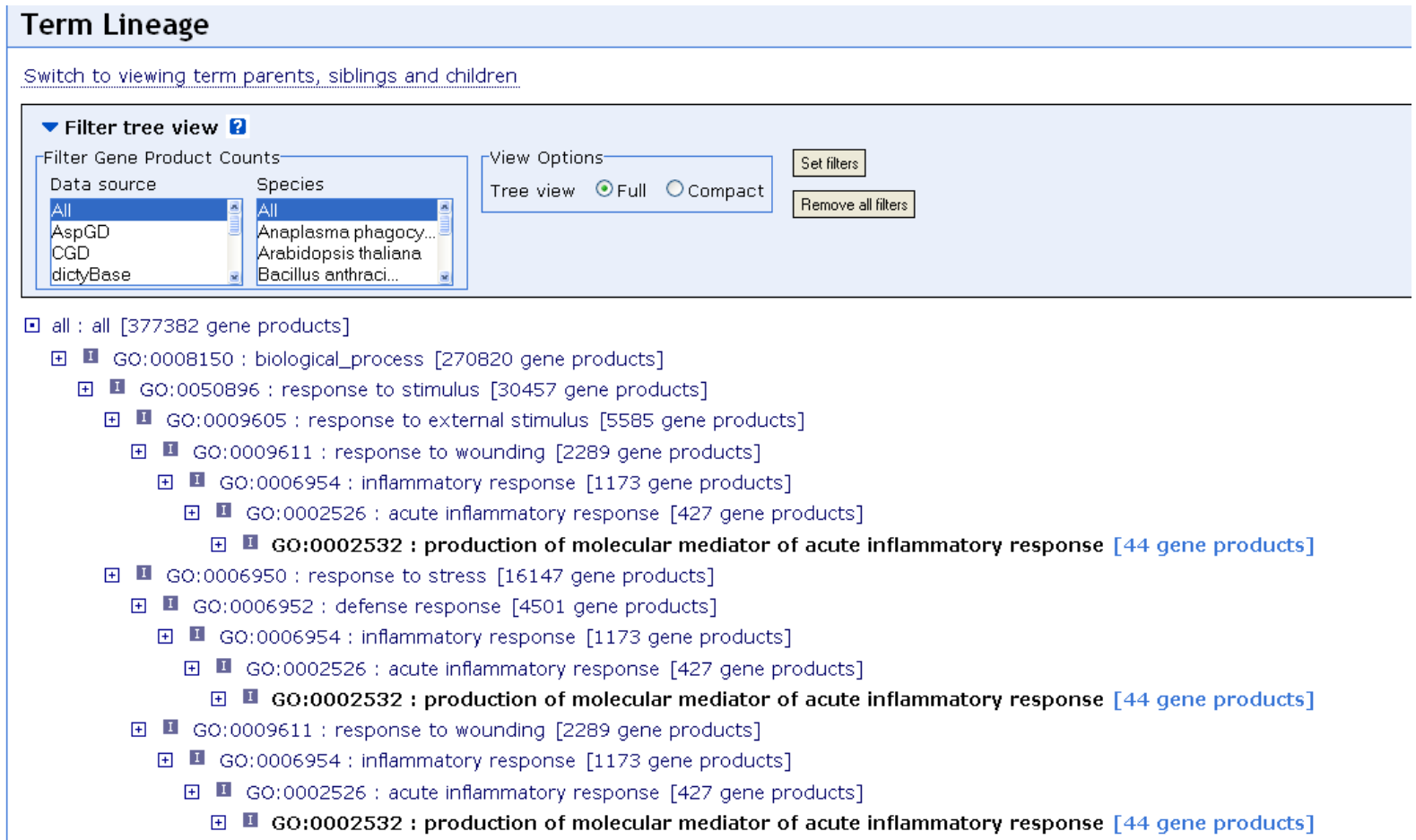
  Kolik genů je v sadě(pathway) odlišně exprimovaných a je to dostatečně statisticky významné, abychom mohli říct, že je tato dráha specifická jen pro naše porovnávané skupiny?

Databáze genových sad (pathways)

Gene Ontology (GO) databáze

- http://www.geneontology.org/
- Hierarchická databáze
- Rodičovské uzly: obecnější termíny
- Potomci uzlů: víc specifické
- Na konci hierarchie jsou molekuly (geny/proteiny)
- Na vrcholu jsou 3 rodičovské uzly:
  - Biologické procesy
  - Molekulární funkce
  - Buněčné složky

GO databáze

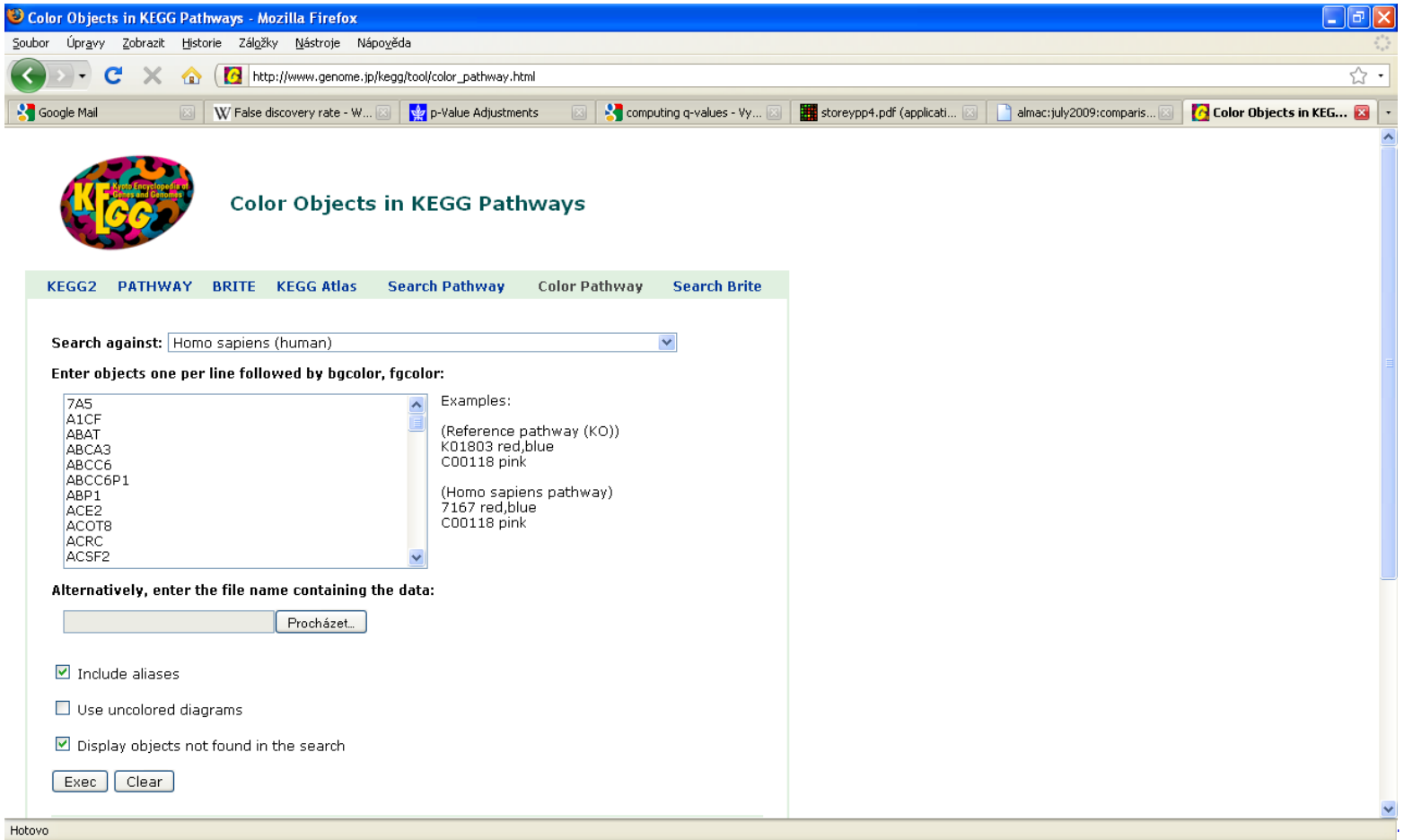


MUNI | RECETOX

KEGG pathway databáze

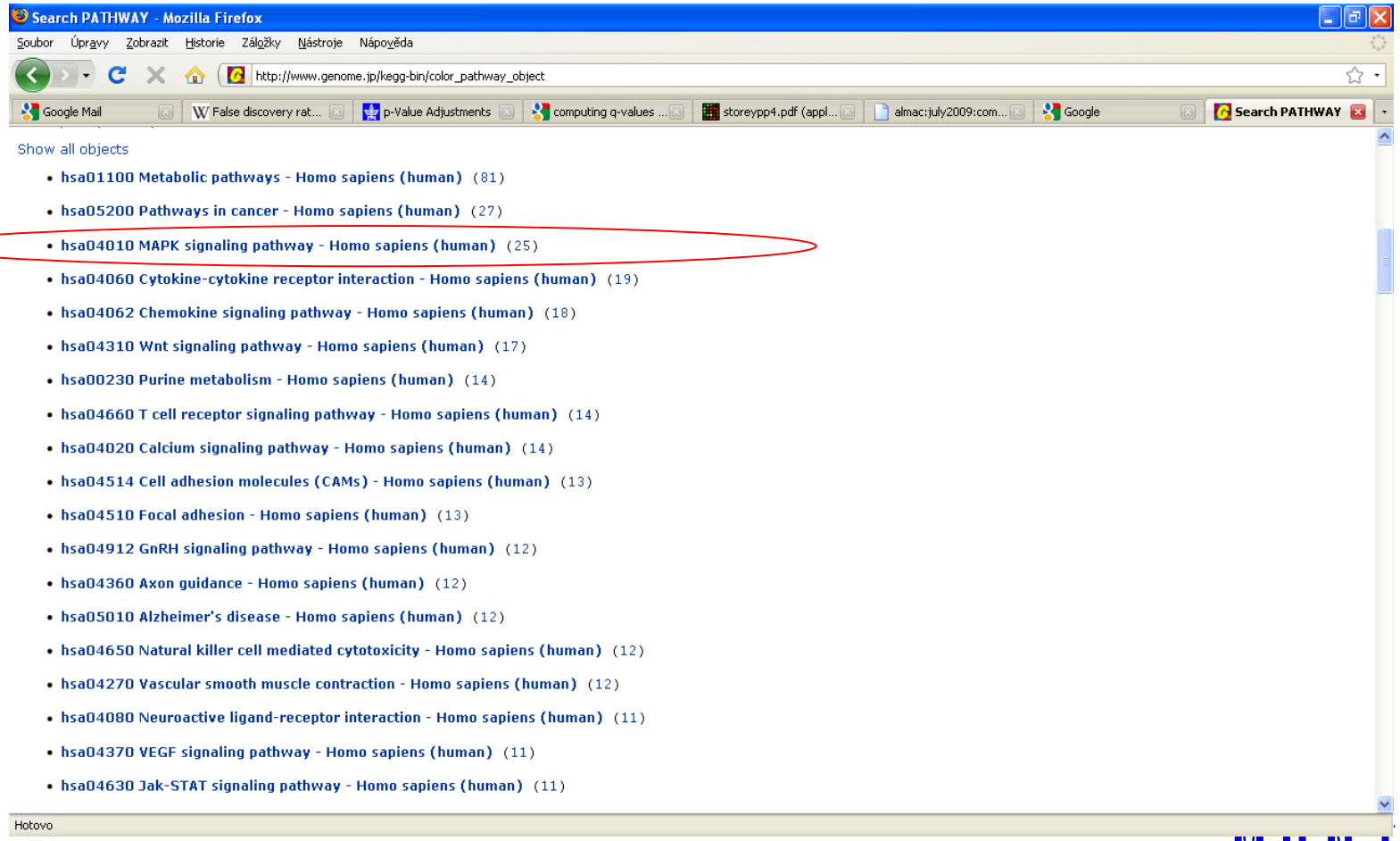
- KEGG = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- http://www.genome.jp/kegg/pathway.html
- Více informací než GO, máme tu již vztahy mezi geny a genovými produkty
- Detailní informáce jen pro některé organizmy a procesy
- Využívá hlavně ověřené poznatky, nemůže ji kdokoliv změnit
- Proto se tu nenachází všechny geny (obvykle tak třetina až polovina z hledaných)
- Aktualizovaná databáze není volně přístupná

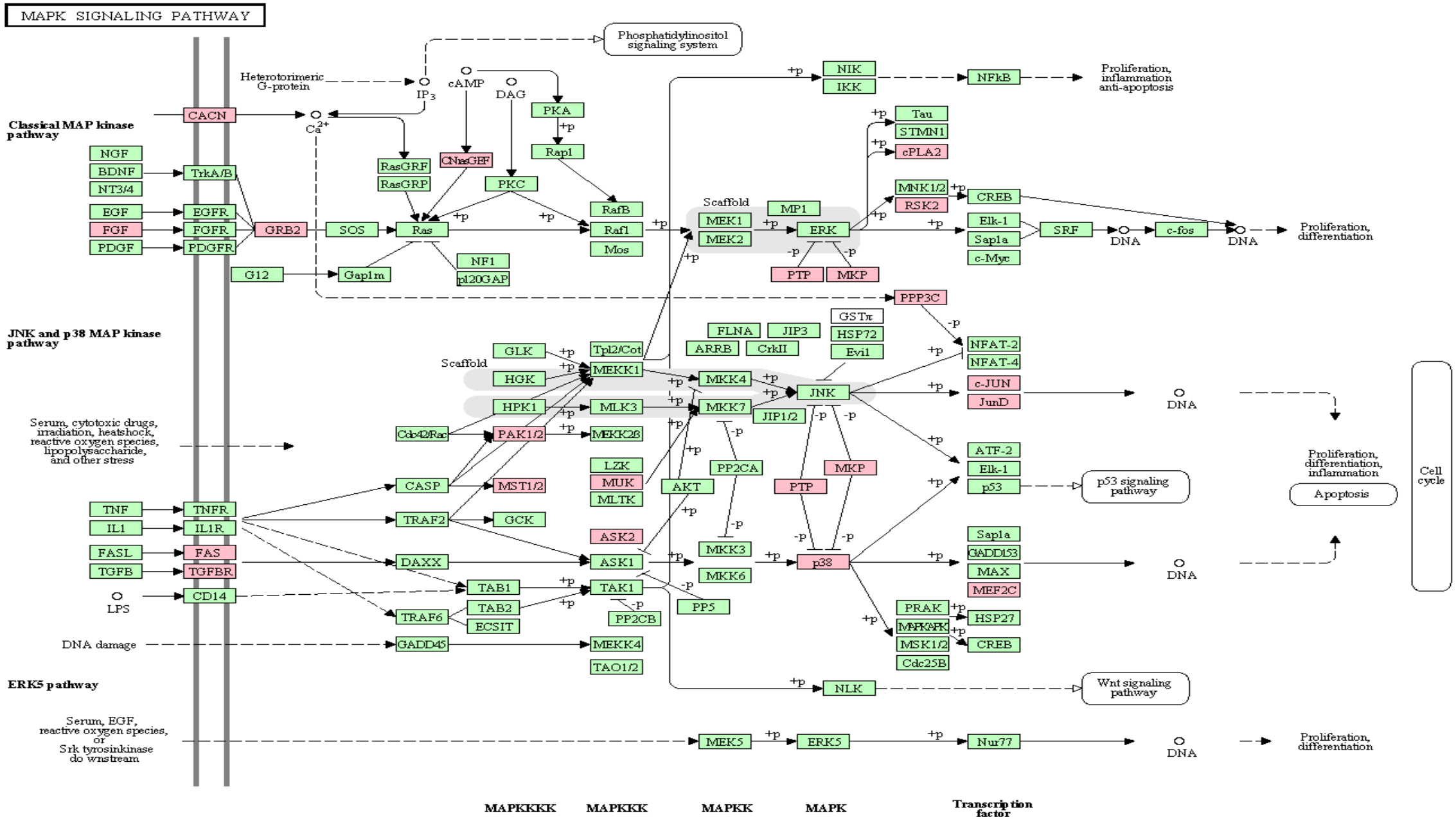
KEGG



MUNI | RECETOX

KEGG


Search PATHWAY - Mozilla Firefox
Soubor Úpravy Zobrazit Historie Záložky Nástroje Nápověda
http://www.genome.jp/kegg-bin/color_pathway_object
Google Mail
False discovery rat...
p-Value Adjustments
computing q-values ...
storeypp4.pdf (appl...
almac:july2009:com...
Google
Search PATHWAY
Show all objects
hsa01100 Metabolic pathways - Homo sapiens (human) (81)
hsa05200 Pathways in cancer - Homo sapiens (human) (27)
hsa04010 MAPK signaling pathway - Homo sapiens (human) (25)
hsa04060 Cytokine-cytokine receptor interaction - Homo sapiens (human) (19)
hsa04062 Chemokine signaling pathway - Homo sapiens (human) (18)
hsa04310 Wnt signaling pathway - Homo sapiens (human) (17)
hsa00230 Purine metabolism - Homo sapiens (human) (14)
hsa04660 T cell receptor signaling pathway - Homo sapiens (human) (14)
hsa04020 Calcium signaling pathway - Homo sapiens (human) (14)
hsa04514 Cell adhesion molecules (CAMs) - Homo sapiens (human) (13)
hsa04510 Focal adhesion - Homo sapiens (human) (13)
hsa04912 GnRH signaling pathway - Homo sapiens (human) (12)
hsa04360 Axon guidance - Homo sapiens (human) (12)
hsa05010 Alzheimer's disease - Homo sapiens (human) (12)
hsa04650 Natural killer cell mediated cytotoxicity - Homo sapiens (human) (12)
hsa04270 Vascular smooth muscle contraction - Homo sapiens (human) (12)
hsa04080 Neuroactive ligand-receptor interaction - Homo sapiens (human) (11)
hsa04370 VEGF signaling pathway - Homo sapiens (human) (11)
hsa04630 Jak-STAT signaling pathway - Homo sapiens (human) (11)
Hotovo


MAPK SIGNALING PATHWAY
Phosphatidylinositol signaling system
Heterotorimeric G-protein
IP3
cAMP
DAG
Ca2+
CACN
PKA
Rap1
RasGRF
RasGRP
CNasGEF
PKC
Classical MAP kinase pathway
NGF
BDNF
NT3/4
TrkA/B
EGF
FGF
PDGF
EGFR
FGFR
PDGFR
GRB2
SOS
Ras
RafB
Raf1
Mos
NF1
p120GAP
G12
Gap1m
Scaffold
MP1
MEK1
MEK2
ERK
PTP
MKP
NIK
IKK
NFkB
Proliferation, inflammation anti-apoptosis
Tau
STMN1
cPLA2
MNK1/2
RSK2
CREB
Elk-1
Sap1a
c-Myc
SRF
DNA
c-fos
DNA
Proliferation, differentiation
PPP3C
JNK and p38 MAP kinase pathway
GLK
HGK
HPK1
Cdc42/Rac
PAK1/2
Tpl2/Cot
MEKK1
MLK3
MEKK2/3
LZK
MUK
MLTK
ASK2
ASK1
TAK1
PP2CB
TAB1
TAB2
ECSIT
TRAF6
GADD45
MEKK4
TAO1/2
FLNA
JIP3
ARRB
CrkII
GSTπ
HSP72
Evi1
MKK4
MKK7
JIP1/2
JNK
PP2CA
AKT
PP5
MKK3
MKK6
p38
NFAT-2
NFAT-4
c-JUN
JunD
DNA
ATF-2
Elk-1
p53
p53 signaling pathway
Sap1a
GADD153
MAX
MEF2C
DNA
PRAK
MAPKAPK
MSK1/2
Cdc25B
HSP27
CREB
Proliferation, differentiation, inflammation
Apoptosis
Cell cycle
Serum, cytotoxic drugs, irradiation, heatshock, reactive oxygen species, lipopolysaccharide, and other stress
TNF
IL1
FASL
TGFB
LPS
TNFR
IL1R
FAS
TGFBR
CD14
CASP
TRAF2
DAXX
DNA damage
ERK5 pathway
Serum, EGF, reactive oxygen species, or Src tyrosinkinase do wnstream
NLK
Wnt signaling pathway
MEK5
ERK5
Nur77
DNA
Proliferation, differentiation
MAPKKKK
MAPKKK
MAPKK
MAPK
Transcription factor
04010 7/15/09
(c) Kanehisa Laboratories

KEGG pathway databáze

Poklikání na jednotlivé uzly zobrazí víc informací o jednotlivých genech:

Všechny ostatní dráhy do kterých patří gen	Identifikátory daného genu v různých jiných databázích	Odkaz na literaturu z které byly informace čerpané, případně další důležité články	Informaci o sekvenci

Je možné zabarvit jednotlivé geny podle rozdílných barev

MUNI | RECETOX

Metody analýzy genových sad

MUNI | RECETOX

Rozdělení metod

Podle toho s jakou informací pracují na

- *metody dělící hranice* – berou do úvahy jen informaci "významný" vs. "nevýznamný" gen
- *metody celého seznamu genů* – pracují přímo se všemi *p*-hodnotami (i nevýznamnými!) a teda s pořadím

Podle skupiny molekul které analyzují na:

- *uzavřené* – analýza jen v rámci genů v sadě
- *kompetitivní* – porovnání se všemi geny experimentu

Nové metody pracují i s topologií dráhy

MUNI | RECETOX

Dělení metod dle skupiny molekul které analyzují

Uzavřené vs. kompetitivní I.

Uzavřená metoda používá jen hodnoty genů z dané množiny:

- H_0 : "Žádné geny z genové množiny nejsou odlišně exprimované"

Kompetitivní test porovnává geny v genové množině s ostatními geny v experimentu

- H_0 : "Geny v genové množině nejsou víc odlišně exprimované než ostatní geny v experimentu"

MUNI | RECETOX

Příklad

Datový soubor 12 639 genů.
Z nich $p<0.05$ má 1272 genů

96 genů v genové sadě, z toho 8 má p-hodnoty < 5%

Kolik odlišně exprimovaných genů očekáváme náhodně?

1. Náhodně očekáváme 96 x 5% = 4.8 významných genů

2. Pomocí binomického testu vypočteme pravděpodobnost pozorování **8** a více významných genů: p = 0.1079, teda není významné

3. binom.test(x=8,n=96,p=0.05, alternative="greater")

Příklad, uzavřená metoda dělící hranice

Příklad, kompetitivní metoda dělící hranice

	V GS	Není v GS
Význ	8	1264
Nevýzn	88	11279

p = 0.73 (Fisherův test – jednostranný)

- 1272 z 12639 genů je odlišně exprimovaných v tomto datovém souboru (to je zhruba 10%)
- V množině náhodně vybraných 96 genů očekáváme tedy 96 x 10% = 9.6 významných genů
- p-hodnotu vypočítáme z kontingenční tabulky pomocí Fisherova nebo Chi-kvadrát testu

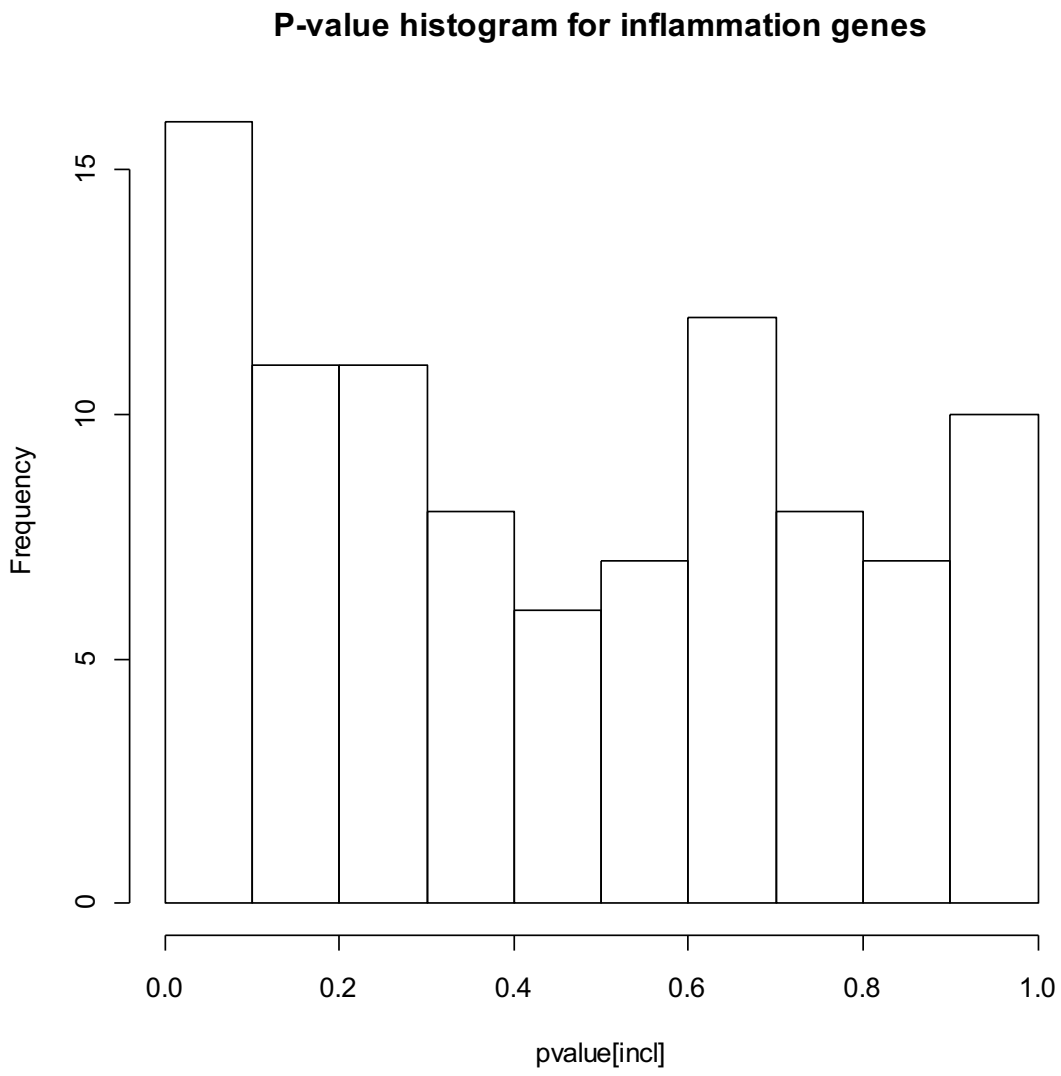
Dělení metod podle toho s jakou informací pracují

Metody dělící hranice vs. metody celého seznamu

- Dvě předchozí metody byly závislé na dělících hranicích – cut-offs a tedy závislé na N
- V případě, že řekneme, že gen je pro nás významný již na 10% FDR, výsledek se změní!
- Dále ztrácíme informaci tím, že redukujeme p-hodnotu na binární proměnné (významné/nevýznamné)
- Je rozdíl vědět jestli statisticky nevýznamné geny v naší množině jsou významné na hranici významnosti a nebo vůbec ne

Metoda celého seznamu genů: *uzavřená*

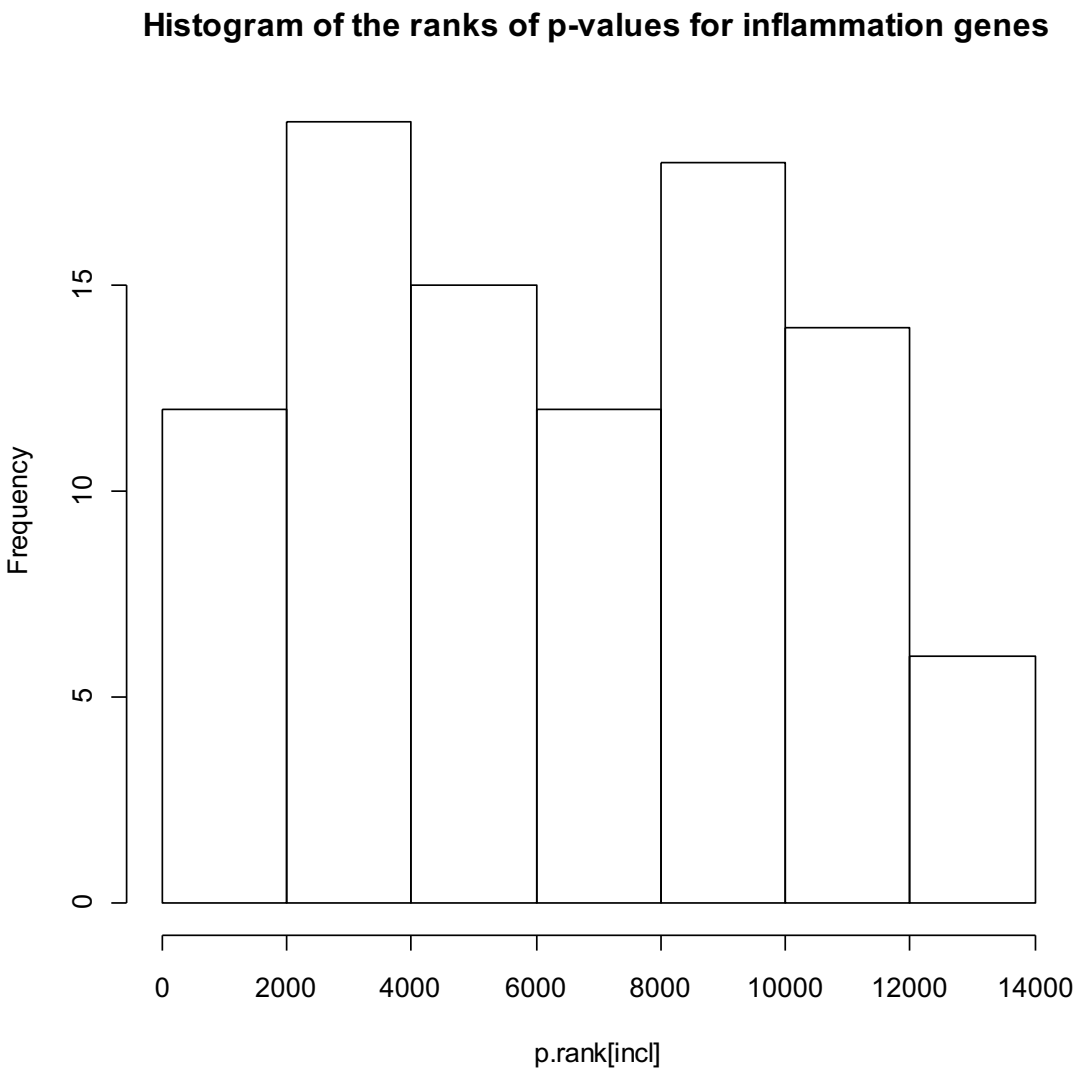
- Můžeme studovat **rozložení p-hodnot v genové sadě**
- V případě, že žádné geny nejsou odlišně exprimované, mělo by se jednat o uniformní rozložení
- Pík vlevo indikuje významnost některých genů
- Aplikujeme Kolmogorův-Smirnovův test pro porovnání rozložení
- p = 8.2%, není velmi významné
- Je to **uzavřená** metoda, protože používáme jen geny z genové sady



MUNI | RECETOX

Metoda celého seznamu genů: *kompetitivní*

- Alternativně se můžeme dívat na rozložení **pořadí** p-hodnot
- Toto by byla kompetitivní metoda, protože porovnáváme naši genovou sadu s ostatními geny v experimentu
- Opět můžeme aplikovat KS test
- p=85.1%, velmi nevýznamné



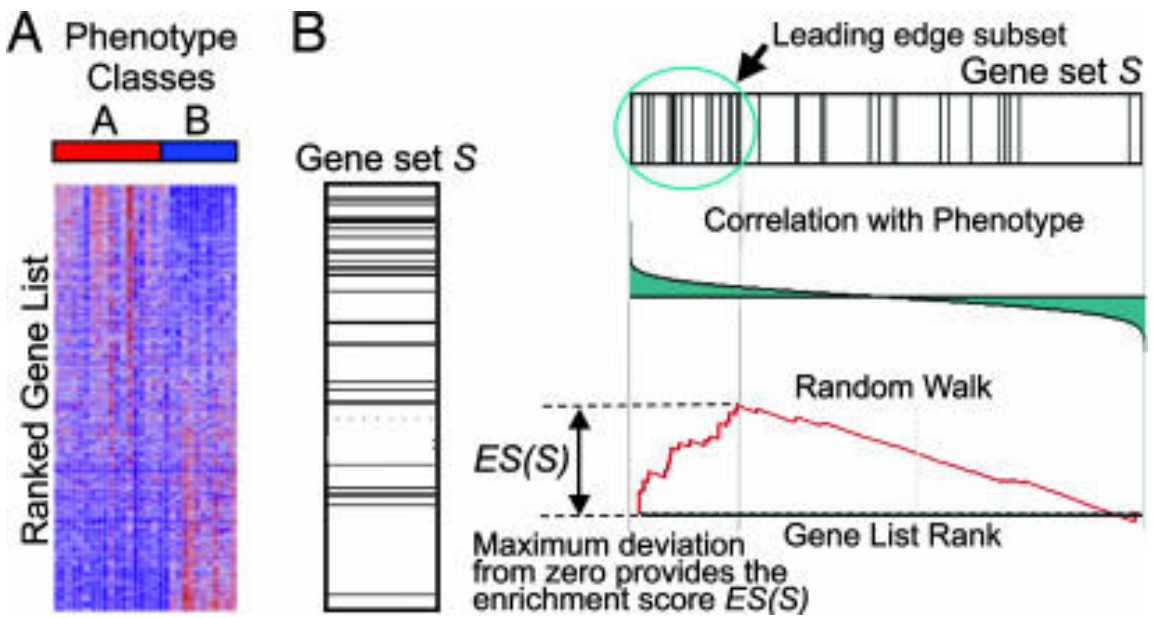
MUNI | RECETOX

Uzavřené vs. kompetitivní II.

- Výsledky kompetitivních testů závisí na počtu testovaných genů (např. genů na microarray sklíčku a předcházejícím filtrování)
  - Na malém mikročipovém sklíčku, kde jsou změněné všechny geny, kompetitivní metoda nenajde žádné odlišně exprimované množiny genů.
- Kompetitivní metody dávají méně významných výsledků než metody uzavřené

Smíšené metody

- Najznámější je GSEA – gene set enrichment analysis (analýza obohacení genové sady)
- Počítá se na seřazených p-hodnotách a sleduje se, zda jsou geny z genové sady náhodně rozložené v tomto seřazeném listě, a nebo se vyskytují v horních, významných pozicích
- Postup: 1. Výpočet skóre obohacení (ES)
    - 2. Odhad významnosti ES (p-hodnota) na základě permutačního testu
    - 3. Upravení p-hodnot na problém mnohonásobného porovnávání



MUNI | RECETOX

Další aspekty

Směr změny

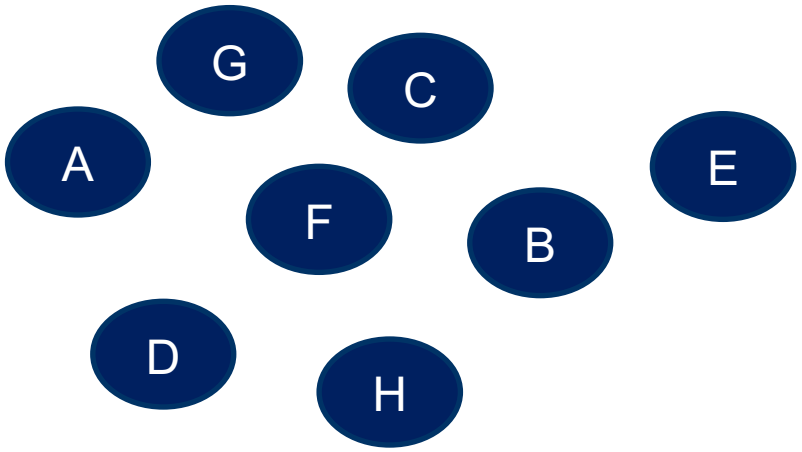
- Pokud chceme zjistit **směr** změny, musíme zopakovat analýzu pro jednostranný test
  - jen up-regulované
  - jen down-regulované

Mnohonásobné testování

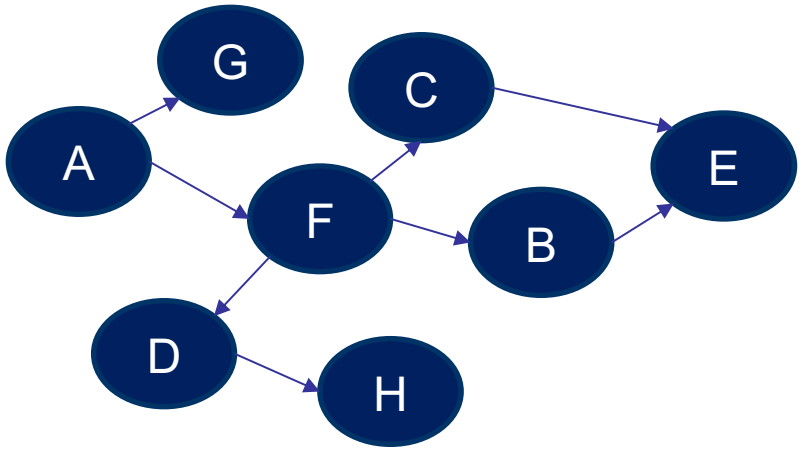
- Stejně jako u testování hypotéz na genech mezi skupinami, i pokud máme velký počet genových sad!
- FDR je trochu komplikované, protože genové množiny se překrývají
- Bonferroniho korekce vždy funguje

Topologie

Bez topologie

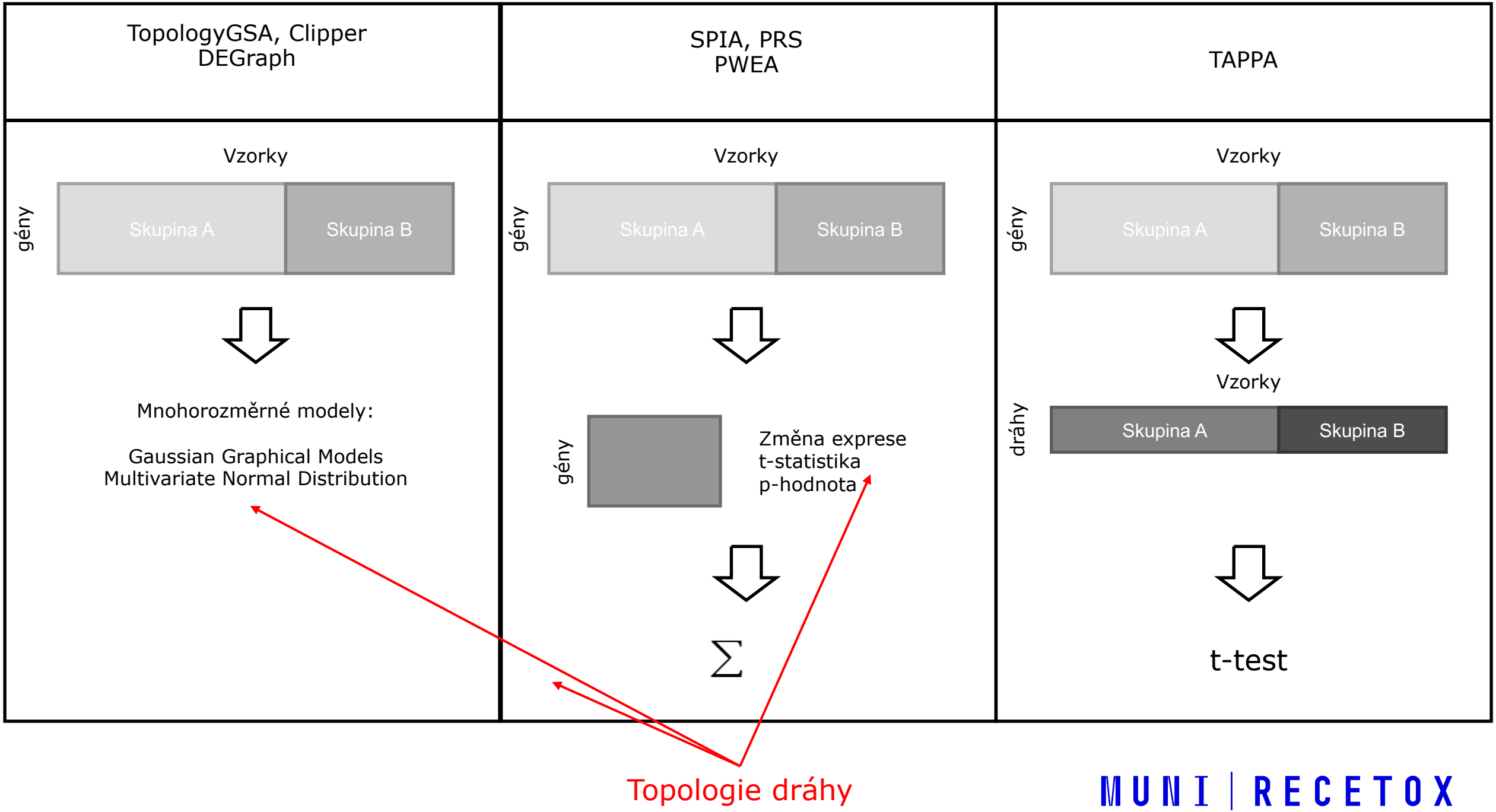


S topologií



Topologie využívaná různě

- Cíl:
  - změna průměrné exprese, korelace, topologie
- Jednotka zájmu:
  - dráha, modul, cesta, geny
- Topologie známá dopředu a nebo odhadovaná z dat
- Celková síť a nebo individuální dráhy


TopologyGSA, Clipper
DEGraph
SPIA, PRS
PWEA
TAPPA
Vzorky
gény
Skupina A
Skupina B
Mnohorozměrné modely:
Gaussian Graphical Models
Multivariate Normal Distribution
Vzorky
gény
Skupina A
Skupina B
gény
Změna exprese
t-statistika
p-hodnota
Σ
Vzorky
gény
Skupina A
Skupina B
dráhy
Vzorky
Skupina A
Skupina B
t-test
Topologie dráhy

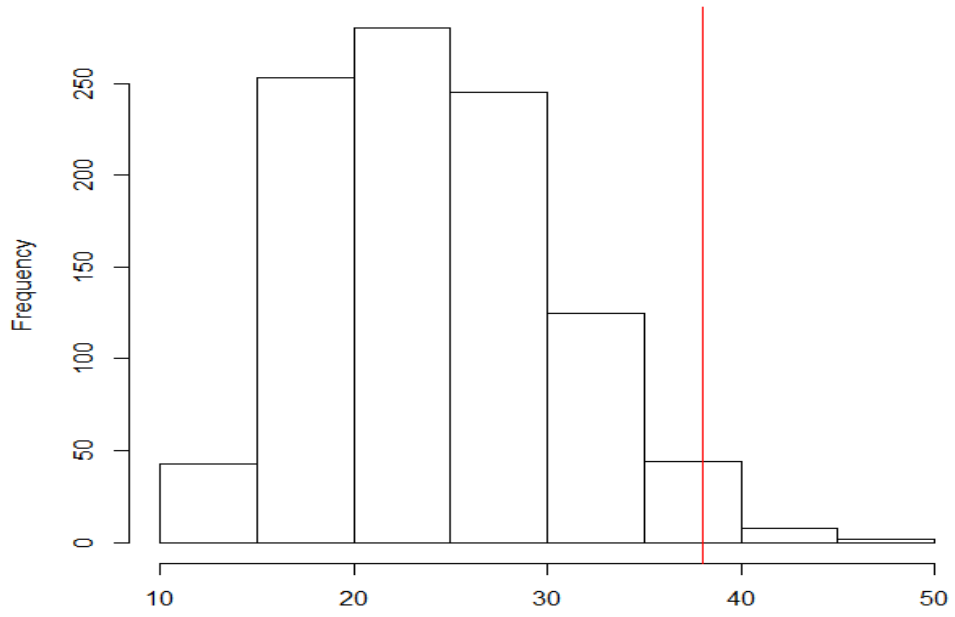
Příklad – uzavřená metoda dělící hranice

- 96 genů v dráze, z toho 8 má p-hodnoty < 5%
- Je exprese dráhy změněná?

- Využití topologické informace:
  - Definujeme statistiku
  - s = $\sum_{i=1}^{n} w_i d_i$
  - n – počet genů v dráze
  - i – index pro gen
  - w_i – počet interakcí genu *i*
  - d_i – 1 – pokud je gen *i* odlišně exprimovaný, 0 jinak

Příklad – uzavřená metoda dělící hranice

- Z 8 odlišně exprimovaných genů:
  - 2 interagují s 10 geny v dráze
  - 3 interagují s 5 geny v dráze
  - 3 interagují s jedním genem v dráze
- s = 2*10 + 3*5 + 3*1 = 38
- Opakovaně v dráze náhodně vybíráme 8 genů a získáme rozdělení statistik, které porovnáme s první statistikou.



- $p = \sum_{i=1}^{N} (s_{náhodne} \geq s_{pozorované})/N$
- N=počet náhodných výberov
- p=0.028, významné

- Z 8 odlišně exprimovaných genů:
  - 2 interagují s 10 geny v dráze
  - 3 interagují s 5 geny v dráze
  - 3 interagují s jedním genem v dráze
- s = 2*10 + 3*5 + 3*1 = 38
- Opakovaně v dráze náhodně vybíráme 8 genů a získáme rozdělení statistik, které porovnáme s první statistikou.

PLOS ONE

PUBLISH ABOUT BROWSE

OPEN ACCESS PEER-REVIEWED

RESEARCH ARTICLE

A critical comparison of topology-based pathway analysis methods

Ivana Ihnatova, Vlad Popovici, Eva Budinska

Published: January 25, 2018 • https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191154

https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0191154

MUNI | RECETOX

Pozor na korelace mezi geny!

- Všechny testy, které jsme probírali předpokládají, že geny uvnitř skupin jsou nezávislé
  - To je ale velmi nepravděpodobné!
- Pokud jsou geny korelované, tak p-hodnoty jednotlivých testů (např. Fisherův test) budou nesprávné
  - Vyřešíme permutačními metodami
    - Popřehazujeme skupiny **vzorků**
    - Zopakujeme analýzu
    - Porovnáme hodnoty s pozorovanými daty

Pozor na průniky mezi dráhami

- 250 KEGG drah pro H. Sapiens
  - najčastěji zastoupené geny

PIK3CD	PIK3CG	PIK3R2	PIK3CA	MAPK3	MAPK1
70	70	70	71	78	79

Další studijní materiály a SW

- Hana Imrichová*: Možnosti propojení výsledku genomických experimentů s gene ontology online databázemi pro tvorbu metabolických sítí*, Masarykova Univerzita,2010,Bakalárska práca
- Ihnatova et al. A critical comparison of topology-based pathway analysis methods, PLoS One, 2018
- R balíky: PGSEA, GSA,ToPASeq, gage, DOSE, phenoTest, limma, GOstats
- MSigDB – web http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp
- Gorilla: http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/
- DAVID: https://david.ncifcrf.gov/