MUNI | RECETOX

Analýza genomických a proteomických dat

cDNA mikročipy - Kontrola kvality a normalizace

Jaro 2022
9. a 16. březen 2022
Eva Budinská (budinska@recetox.muni.cz)

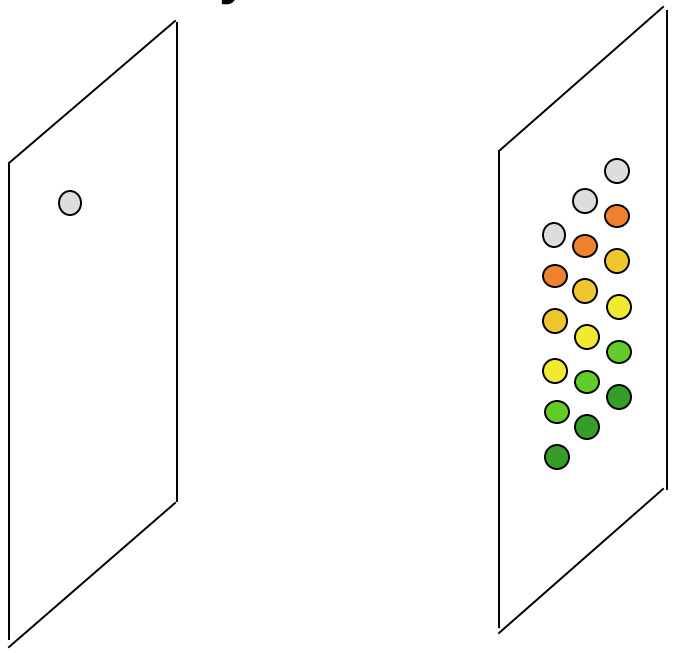
MUNI | RECETOX

cDNA mikročipy – kontrola kvality

Úrovně kontroly kvality

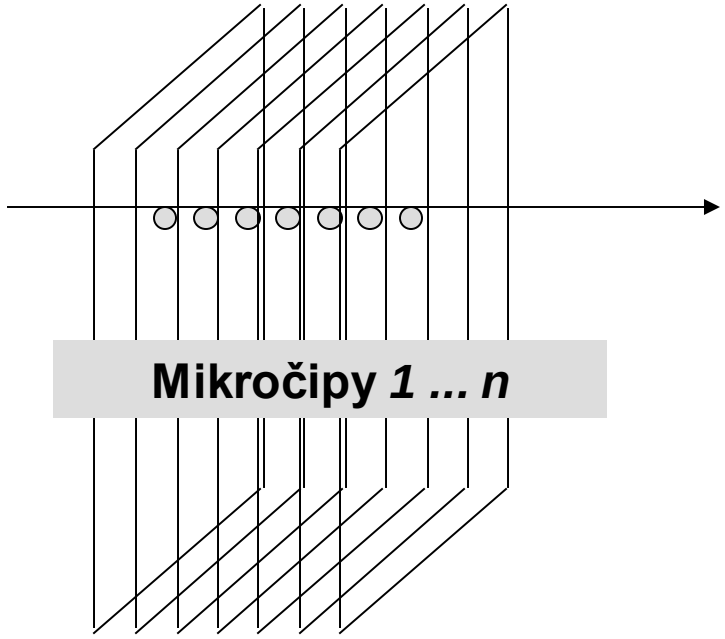
Úroveň mikročipu
(základní datová matice)

Kvalita sondy **Kvalita mikročipu**



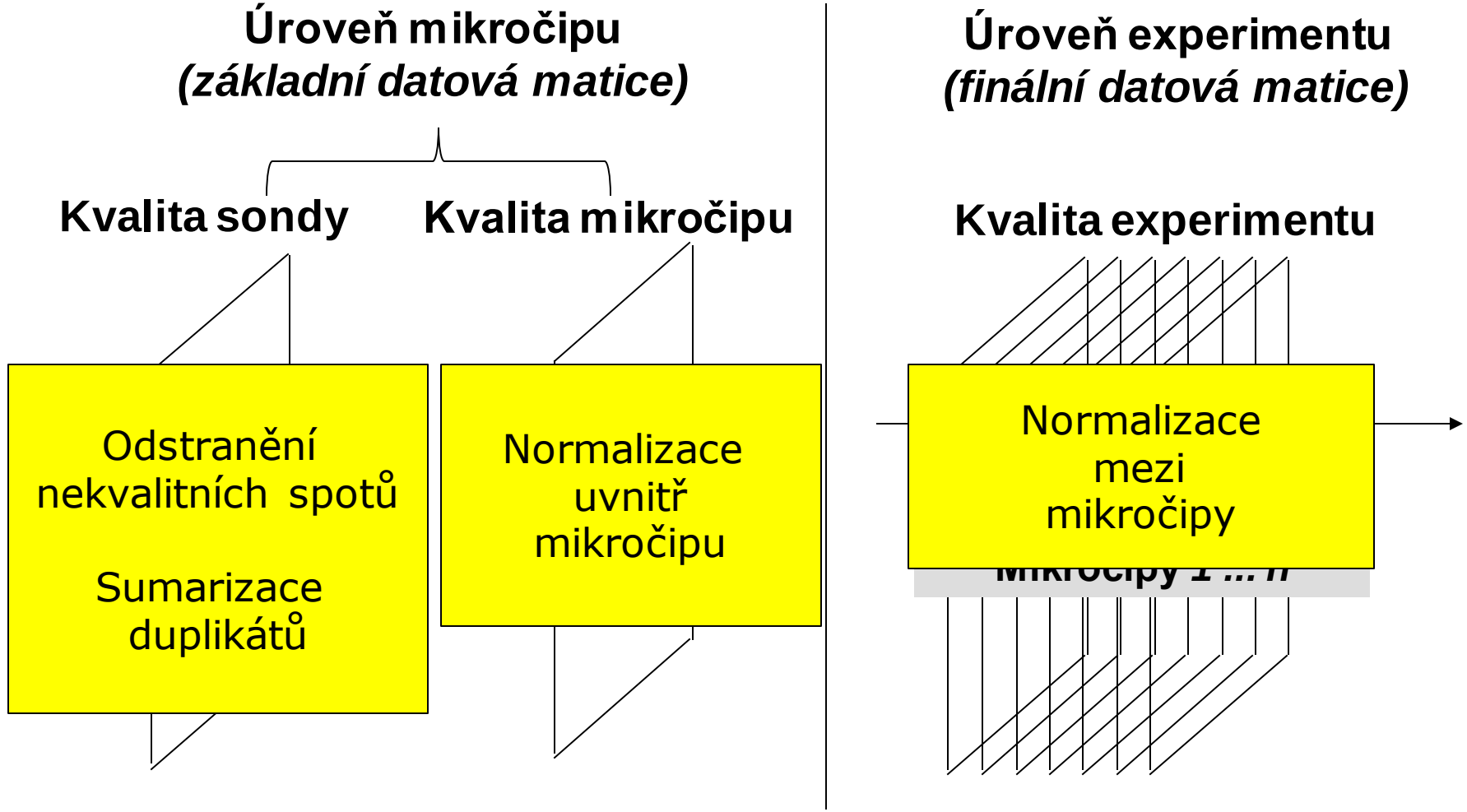
Úroveň experimentu
(finální datová matice)

Kvalita experimentu



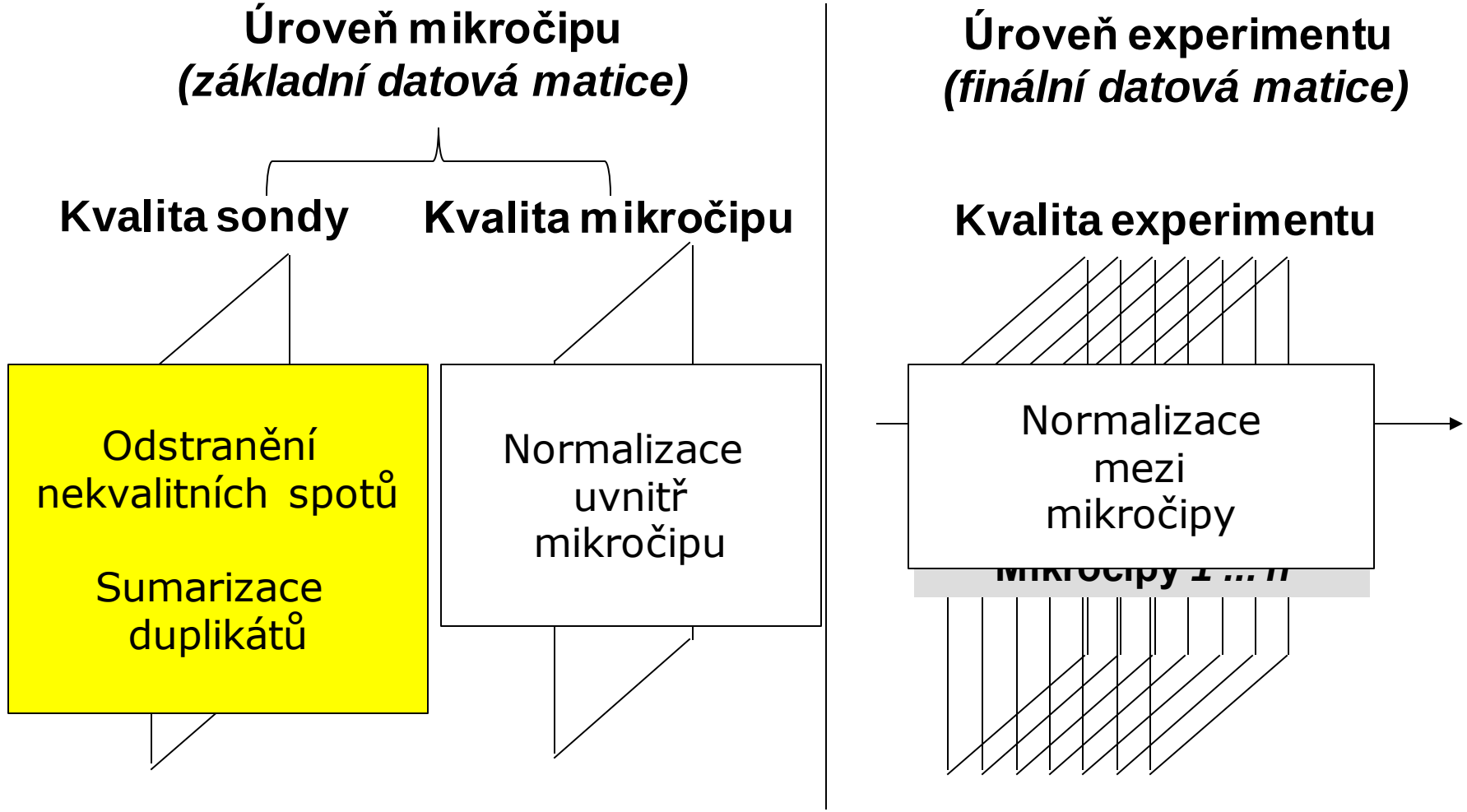
Úroveň sondy: Kvalita jednoho spotu na mikročipu
Úroveň mikročipu: Kvalita celého mikročipu
Úroveň experimentu: Kvalita měření transkriptu všech mikročipů v experimentu

Úrovně úpravy datových souborů



Úroveň sondy: Kvalita jednoho spotu na mikročipu
Úroveň mikročipu: Kvalita celého mikročipu
Úroveň experimentu: Kvalita měření transkriptu všech mikročipů v experimentu

Úrovně úpravy datových souborů



Úroveň sondy: Kvalita jednoho spotu na mikročipu
Úroveň mikročipu: Kvalita celého mikročipu
Úroveň experimentu: Kvalita měření transkriptu všech mikročipů v experimentu

Kontrola dat v rámci mikročipového sklíčka

- **Replikáty sond**
  - Sumární statistiky replikátů spotů (nekvalitní spoty už vyloučené)

clone	Replicate			mean	median	SD	No. of non-flagged replicates
	1	2	3				
A_23_P347643	-0.186	-0.265	-0.313	-0.254	-0.265	0.052	3
A_23_P60243	0.523	flagged	flagged	0.523	0.523	0	1
A_23_P116057	0.039	-0.978	flagged	-0.495	-0.495	0.5	2
A_23_P203743	-0.614	0.537	1.589	0.504	0.537	0.899	3

Buď odstranit sondy s příliš velkou variabilitou mezi replikáty…

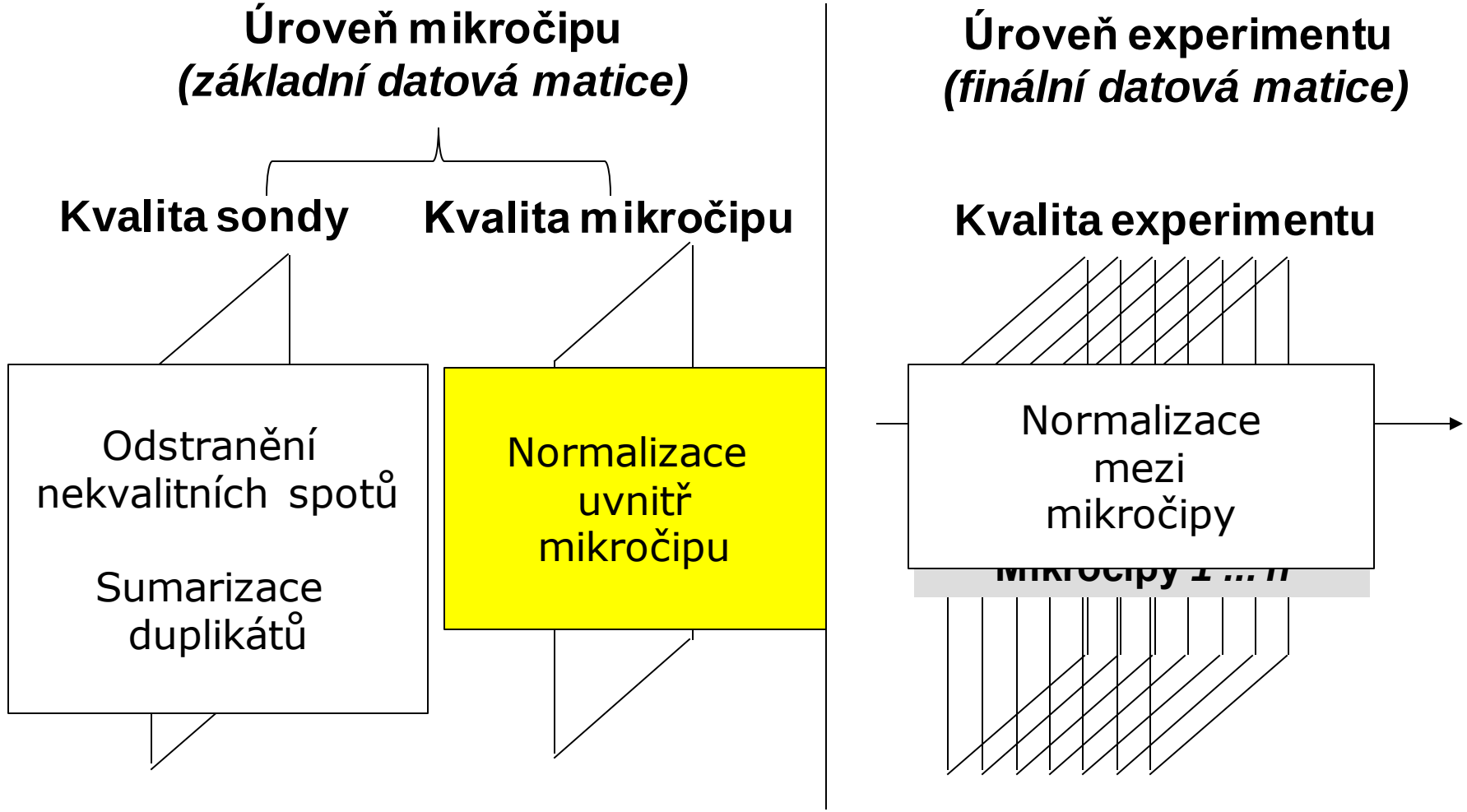
– …nebo si uschovat informaci o počtu validních replikátů (a vyhodit klony jen s jedním replikátem)

Kvalita mikročipového sklíčka

– Procento nekvalitních spotů nesmí být příliš velké (<25 %)

- **Systematické odchylky odstraníme procesem NORMALIZACE**

Úrovně úpravy datových souborů



Úroveň sondy: Kvalita jednoho spotu na mikročipu
Úroveň mikročipu: Kvalita celého mikročipu
Úroveň experimentu: Kvalita měření transkriptu všech mikročipů v experimentu

Systematické odchylky uvnitř mikročipu

- **Nerovnoměrná hybridizace** (prostorové odchylky)
  - Příčina: nerovnoměrně umytý čip, nerovnoměrně distribuovaný vzorek, print-tip efekt (defektní jehla)

- **Signál pozadí** (background)
  - Může být velmi silný, buď špatně umytý čip, nebo špatná segmentace (část popředí je kvantifikovaná jako pozadí)

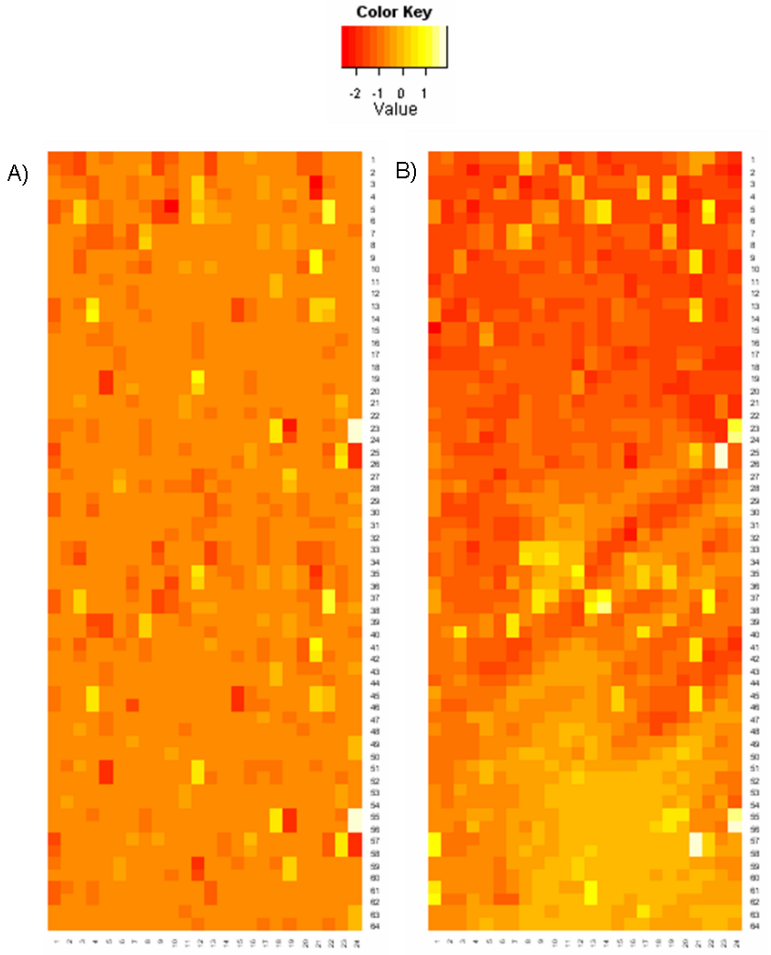
- **Efekt barviva (rozdíly intenzit mezi kanály)**
  - Příčina: odlišná schopnost inkorporace molekul barviva (Cy3, Cy5)

    odlišná reakce na excitaci (slabší intenzita UV, …)

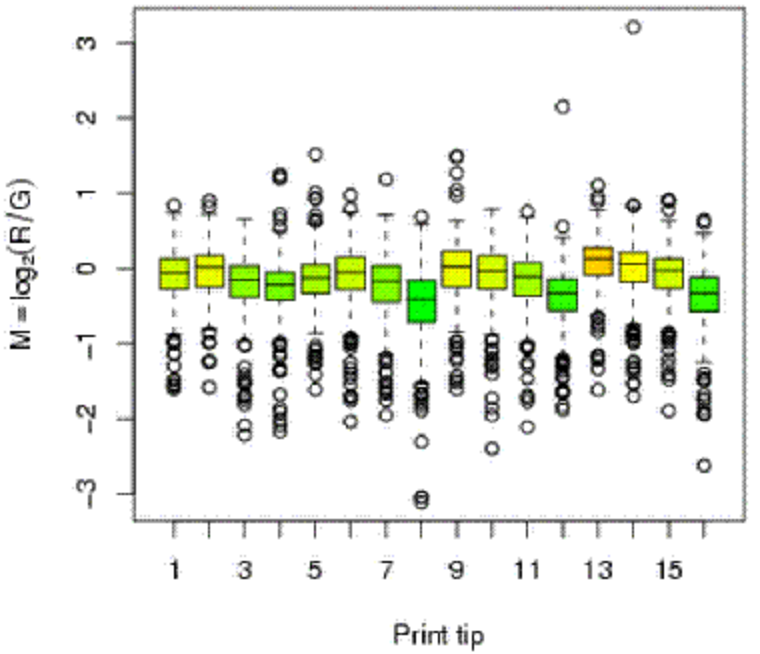
ODHALUJEME GRAFICKOU REPREZENTACÍ DAT

Diagnostika nerovnoměrné hybridizace

Virtuální rekonstrukce mikročipu, vykreslení **heatmapy log2 poměru Cy5/Cy3 intenzit** na základě jejich pozice na sklíčku



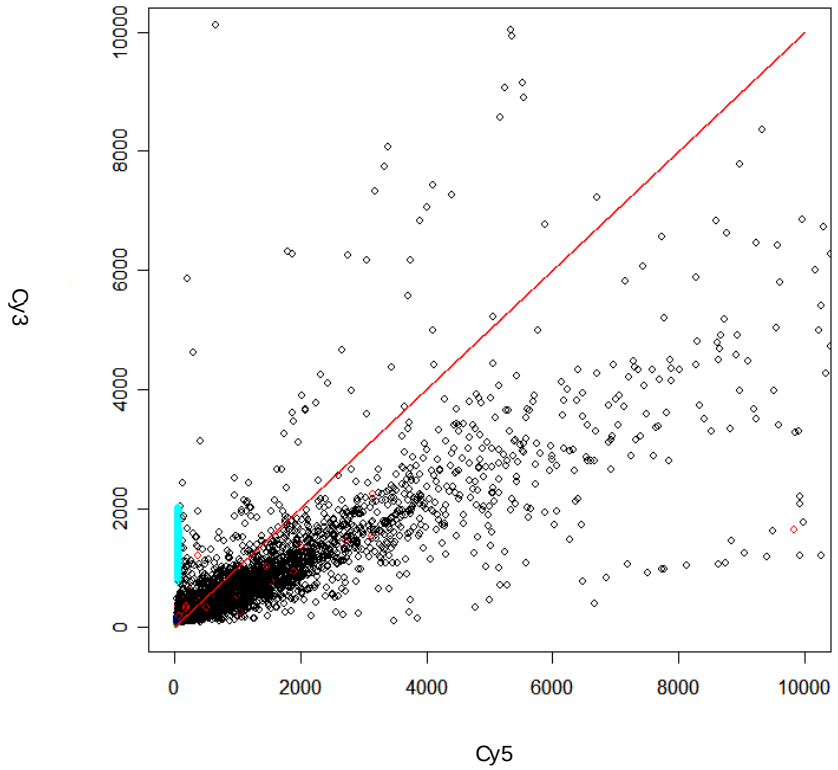
Krabicové grafy jednotlivých oblastí (nejčastěji print-tip)



Diagnostika efektu barviva

- **Často je efekt barviva větší u sond s nízkou expresí**

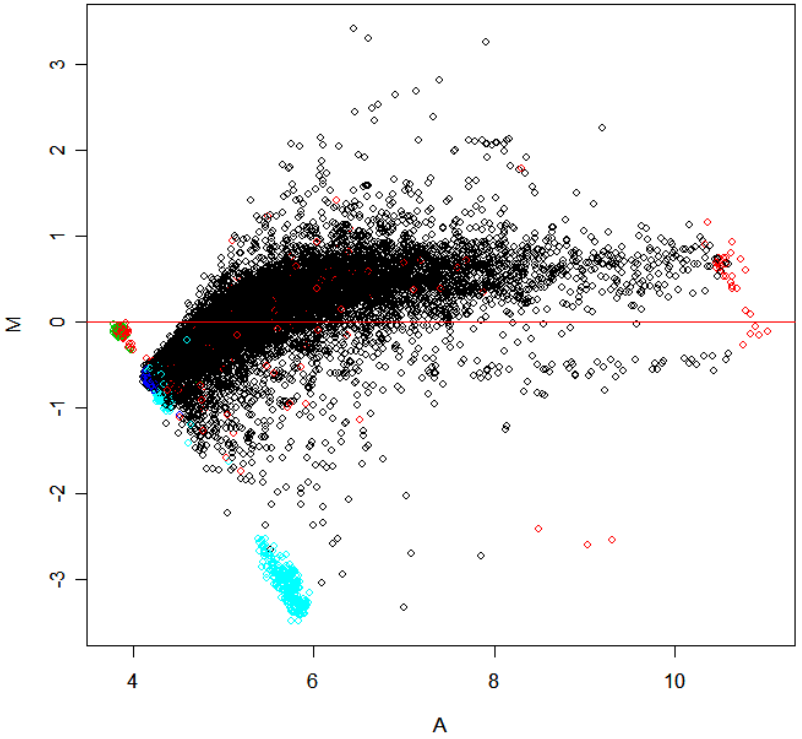
Graf intensit kanálů



Cy3 = B0 + B1*Cy5
(Cy3-B0)/B1=Cy5'

Neukáže nelineární trendy

MA graf



M = log (R/G)

A = 1/2 (log(R)+log(G))

Ukáže nelineární trendy!

MUNI | RECETOX

Cvičení!

- Budeme pracovat v programu R-Studio
- Ukážeme si jak instalovat balíky pro specifické analýzy genomických a proteomických dat
- Na příkladových datech uděláme diagnostiku kvality sklíčka

Bioconductor

- Bioconductor je projekt v R speciálně určený pro analýzu molekulárních dat
- Obsahuje nejenom speciální balíky, ale i typy objektů, smyslem je standardizace a minimalizace chyb!

- Jak instalovat:
- https://www.bioconductor.org/install/

- Do R příkazového řádku zadáme:
- if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE)) install.packages("BiocManager") BiocManager::install(version = "3.12")
- Instalace základních balíků:
- if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE)) install.packages("BiocManager") BiocManager::install()

Bioconductor – instalace balíků

Pro instalaci specifického balíku použijeme kód:

```
BiocManager::install(c("nazevbaliku1", "nazevbaliku2"))
```

POZOR NA uvozovky, musí být ", ne “

Balík `marray`

- Balík `marray` poskytuje sadu funkcí pro analýzu cDNA čipů

```
BiocManager::install("marray")
```

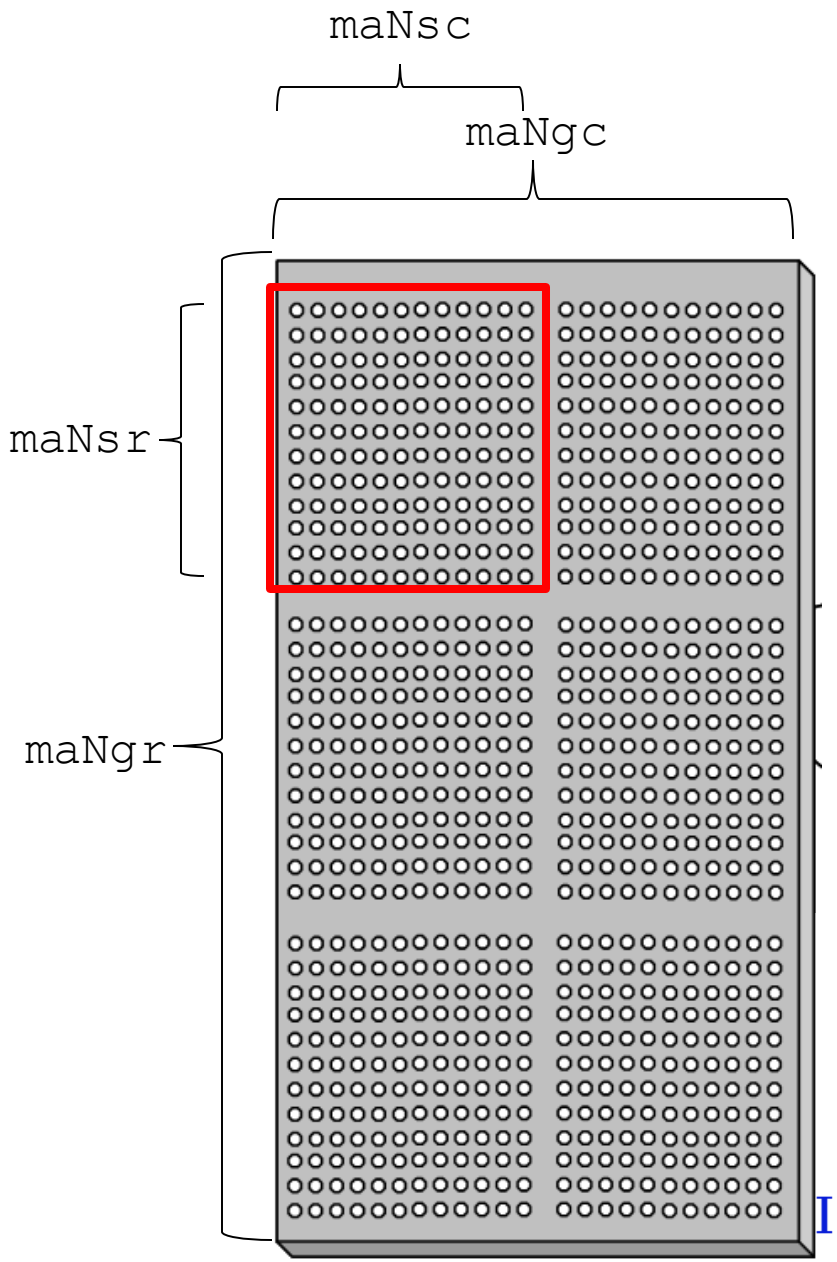
- Základní strukturou, s kterou pracuje a která obsahuje základní data všech matic experimentu je třída `marrayRaw`

```
new('marrayRaw',
   maRf = ...., # matice intensit spotů červeného kanálu
   maGf = ...., # matice intensit spotů zeleného kanálu
   maRb = ...., # matice intensit pozadí červeného kanálu
   maGb = ...., # matice intensit pozadí zeleného kanálu
   maLayout = ...., # objekt třídy marrayLayout, popis mikročipu
   maGnames = ...., # objekt třídy marrayInfo, popis sond
   maTargets = ...., # objekt třídy marrayInfo, popis vzorků
   maNotes = ...., # text - poznámky )
```

Další objekty balíku `marray`

- **marrayLayout** - popisuje mikročip, umístění spotů a jejich sondy

```
new('marrayLayout',
    maNgr = ... , #počet řádků matic
    maNgc = ..., #počet sloupců matic
    maNsr = ..., #počet řádků v matici
    maNsc = ..., #počet sloupců v matici
    maNspots = ..., # maNgr x maNgc x maNsr x
    maNsc
    maSub = ..., # vektor TRUE/FALSE, které
    spoty se používají
    maPlate = ..., # faktor – print tip
    maControls = ..., # faktor – status sondy
    (kontrolná nebo ne?)
    maNotes = ..., # Object of class
    character)
```



Další objekty balíku `marray`

- **marrayInfo** - popisuje vzorky nebo sondy

```
new('marrayInfo',
  maLabels = ...., # vektor jmen/názvů
maInfo = ...., # datová tabulka s dalšími charakteristikami
  maNotes = ...., # text s poznámkami
  )
```

V Rstudiu si otevřeme soubor `cDNA-kontrolaKvality-priklad1.R`

cDNA mikročipy – normalizace

Normalizace uvnitř mikročipu I.

- Cíl: Upravit hodnoty signálu tak, abychom odstranili systematické odchylky uvnitř mikročipu
- Princip: ***Centrování a*/nebo *škálování*** hodnot exprese *M*

$$M_{norm} = \frac{M - l}{s},$$

kde l a s jsou normalizační hodnoty střední hodnoty (l) a škály (s)

Normalizace uvnitř mikročipu I - metody

- Typy normalizace:

  1) Logaritmická transformace – většinou používaná z důvodu transformace dat na normální rozdělení

$$M_{norm} = \log2(M)$$

Normalizace uvnitř mikročipu I - metody

- Typy normalizace:

  1) Logaritmická transformace – většinou používaná z důvodu transformace dat na normální rozdělení

$$M_{norm} = \log2(M)$$

  2) Korekce na pozadí

  - odstraňuje efekt pozadí
  - odlišné přístupy:

    1) odpočítá se odhadnutý signál pozadí – založené na předpokladu aditivity signálu

    Pozorovaný signál (OS) = Signál pozadí (BS) + Signál sondy (TS)

    TS = OS - BS

    - buď pro každý spot zvlášť, nebo globálně

$$M_{norm} = M - l$$

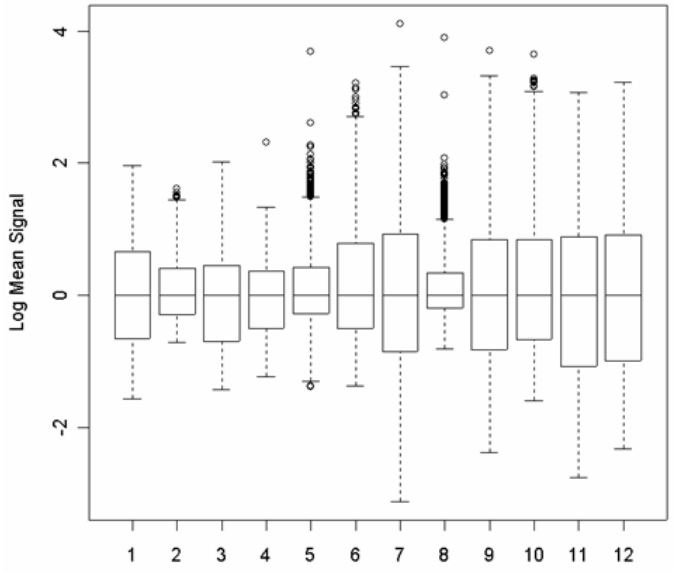
střední hodnota odhadnutého signálu pozadí

    2) bez korekce!

Normalizace uvnitř mikročipu I - metody

3) Normalizace prostorového efektu a rozdílů intenzit mezi kanály

- **Centrování mediánem**
  - odečítá medián signálu od intenzit signálu všech spotů
  - nejjednodušší, ale není schopný zkorigovat nelinearitu



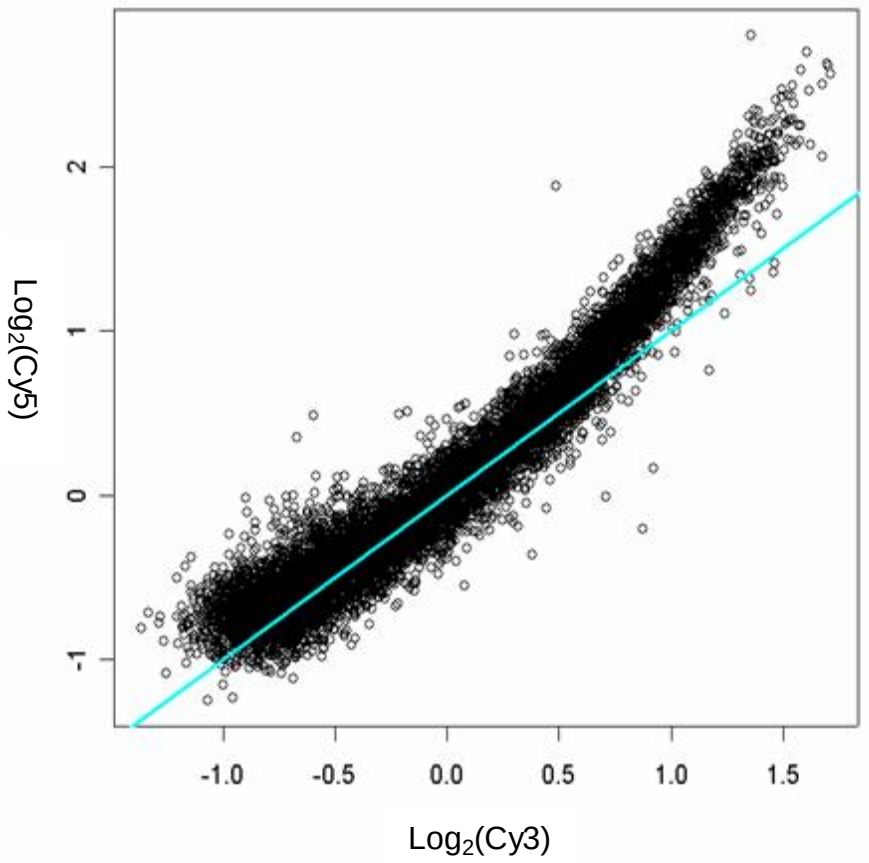
$$M_{norm} = M - l,$$

I je medián intenzit signálu všech spotů

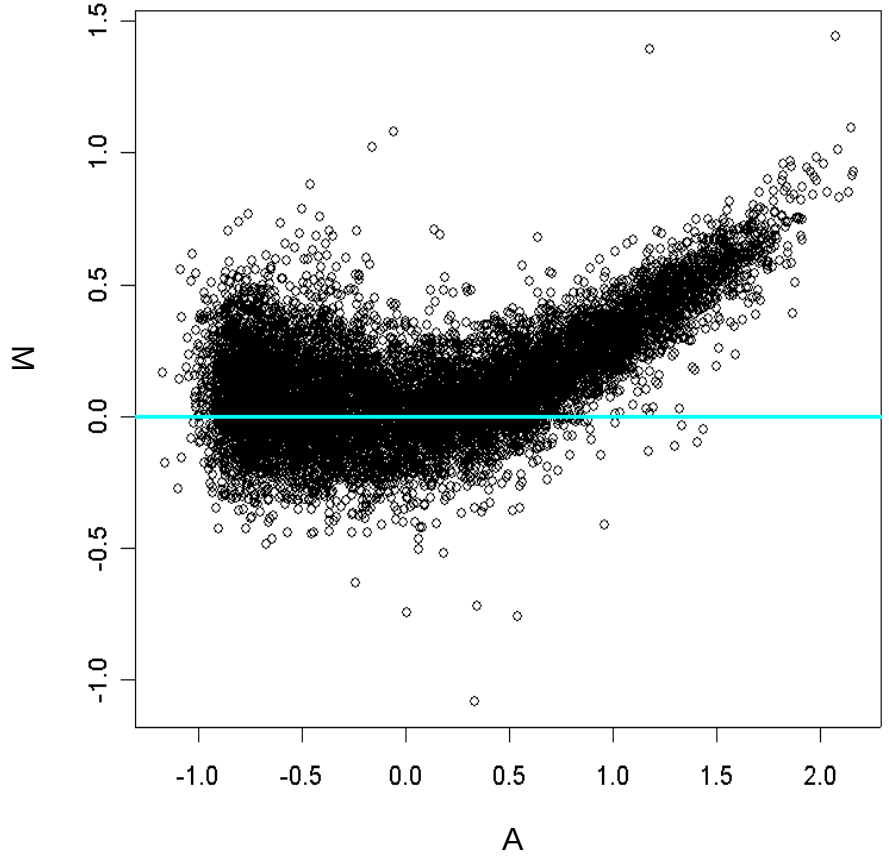
Problémy s mediánovým centrováním

Jedná se o globální metodu, není schopna vyrovnat lokální efekty, problémy odlišných intenzit, print-tip efekty atd.

Graf intensit kanálů



MA graf



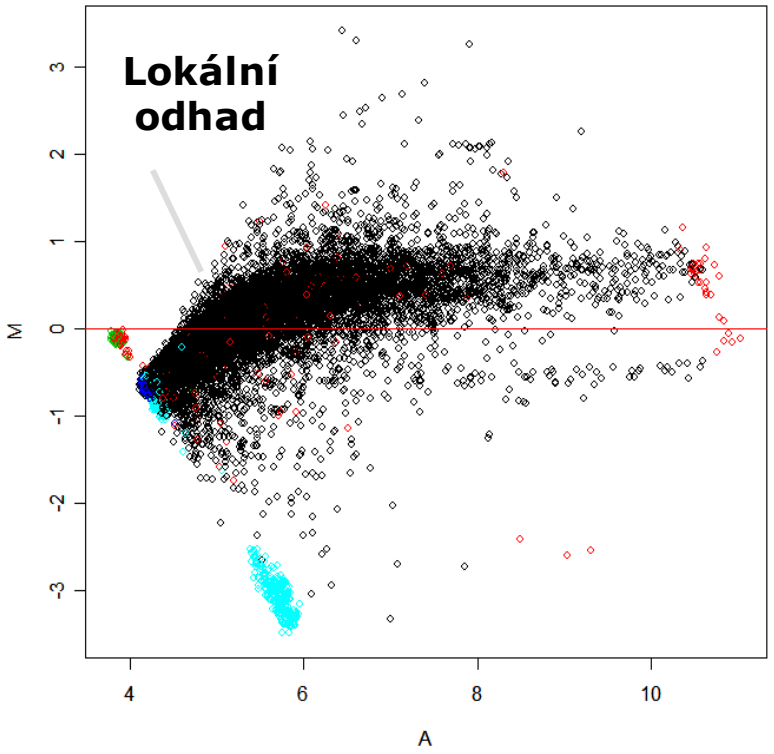
S nelinearitou si umí poradit **lokálně regresní metody (lo(w)ess)**

Lowess normalizace I

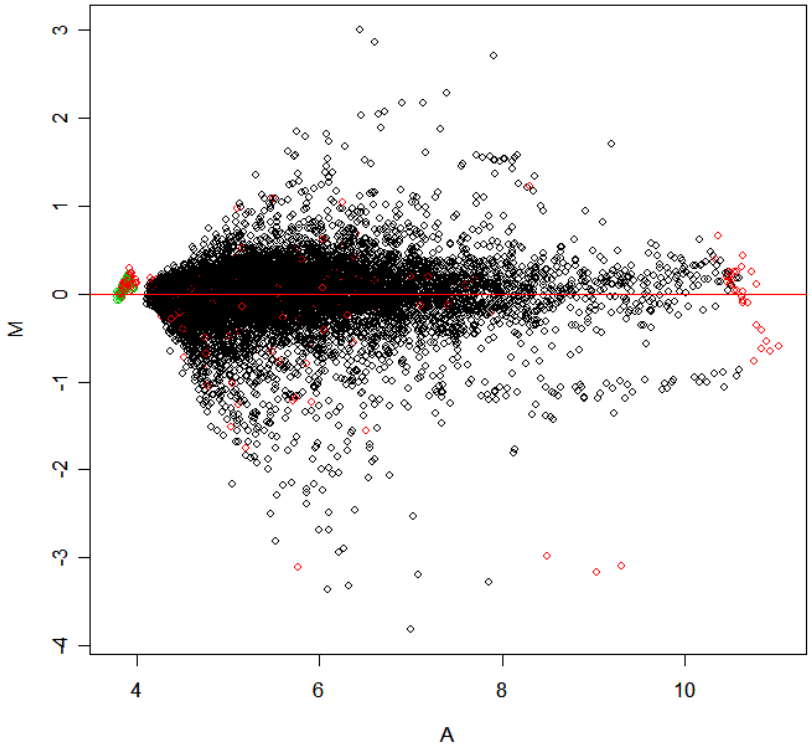
Princip:
1. Odhad křivky pomocí neparametrické lokálního (váženého) vyhlazování (lo(w)ess - locally (weighted) scatterplot smoothing)
2. Odečtení odhadnuté křivky od naměřených hodnot

Výhoda : není nutné znát funkci křivky, je odhadnuta z dat!

Před lowess normalizací



Po lowess normalizaci



Lowess normalizace II

Princip lowess

•V každém kroku se určí lokální množina dat, na které se **odhadne křivka s pomocí polynomiálu a metody nejmenších čtverců**

• Parametr λ určuje stupeň polynomiálu ($\lambda=0$ průměr, $\lambda= 1$ lineární regrese, $\lambda=2$ kvadratická regrese)

• Množina dat na které se pracuje se určuje pomocí algoritmu nejbližšího souseda

• Vyhlazovací parametr α určuje velikost této množiny ($n\alpha$ bodů v okolí odhadovaného bodu)

• α nabývá hodnot mezi $(\lambda + 1)/n$ a 1

Normalizace uvnitř mikročipu II.

- Křivky odhadujeme:
  - na základě signálů **všech sond na mikročipu**
  - Předpoklad: exprese většiny genů, které sondy představují, není změněná mezi porovnávanými skupinami! (závisí od mikročipu a od testované hypotézy)

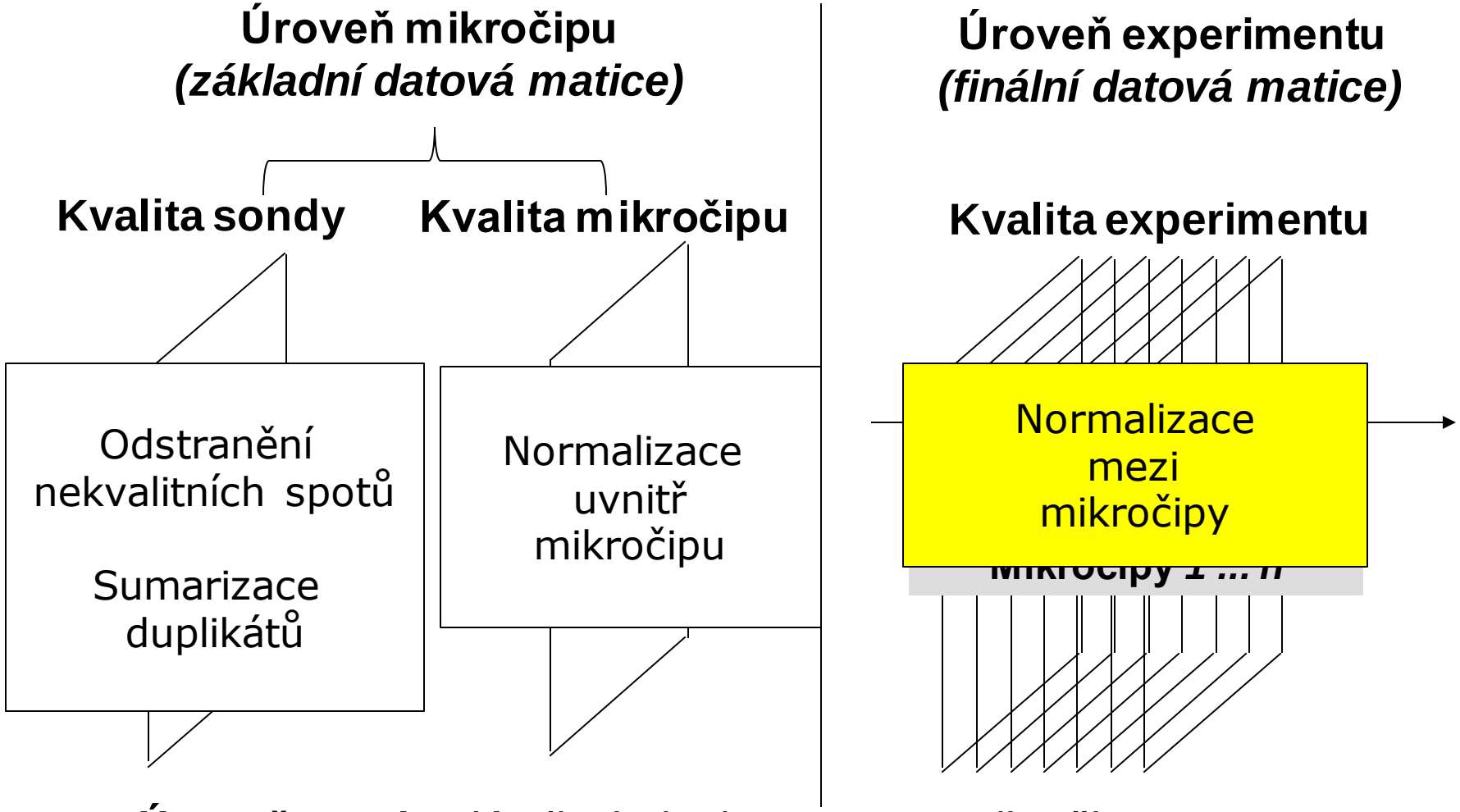
  - na základě signálu **skupiny sond:**

    i) skupina sond by měla mít přibližně stejnou expresi ve všech vzorcích (abychom neodstranili reálné biologické rozdíly)

    ii) množina by měla být dostatečně velká, aby zachytila variabilitu sklíčka

    Např. housekeeping geny

Úrovně úpravy datových souborů



Úroveň sondy: Kvalita jednoho spotu na mikročipu
Úroveň mikročipu: Kvalita celého mikročipu
Úroveň experimentu: Kvalita měření transkriptu všech mikročipů v experimentu

Normalizace mezi mikročipy

- Když jsou všechny datové matice mikročipů znormalizované, tak vytváříme **finální datovou matici**, kterou použijeme pro následnou analýzu

  řádky ~ vzorky, sloupce ~ geny

- Jednotlivé soubory musíme normalizovat navzájem, abychom odstranili efekty mezi sklíčky, způsobené rozdílnou hybridizací, rozdílným množstvím vzorku (mRNA), rozdílným efektem skenování, chybami v segmentaci... apod.

- Princip – sjednocení rozložení (průměr, směrodatná odchylka, případně kvantily)

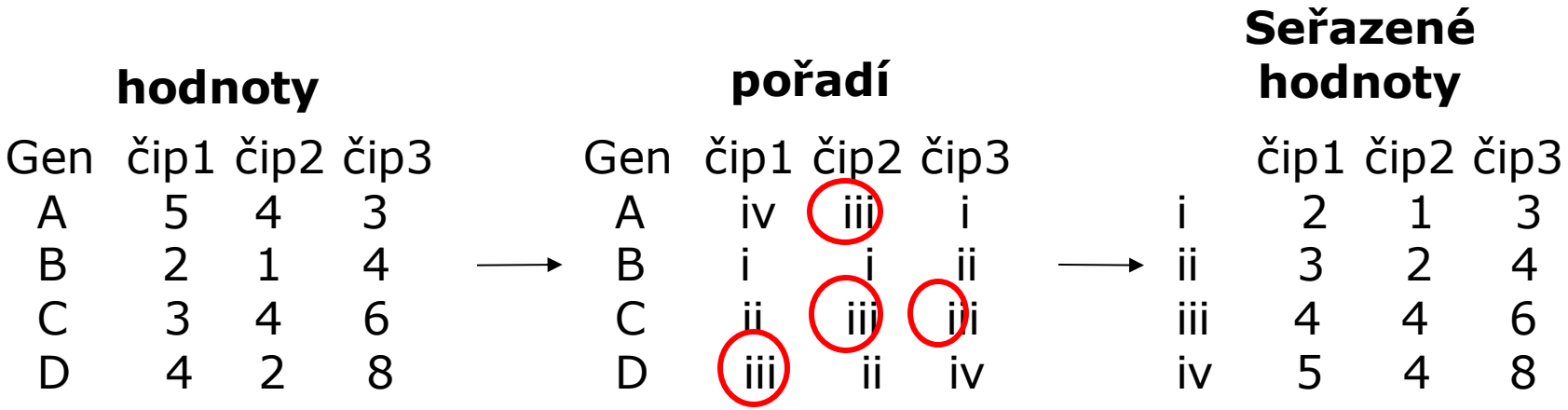
Metody normalizace mezi mikročipy

- **Globální centrování**
  - Nastaví průměr a škálu všech sklíček na jednu hodnotu (medián, průměr, ořezaný průměr... všech čipů nebo hodnoty referenčního čipu)
  - Nevýhoda: předpokládá, že rozdíly jsou jen posunové, lineární
- **Škálování**
  - Tato metoda sjednocuje variabilitu jednotlivých mikročipů, například podělením hodnot mediánovou absolutní odchylkou jejich intenzit. Obvykle se kombinuje s centrováním.
- **Loess**
  - Probíhá cyklickým způsobem – vždy mezi páry mikročipů až do konvergence. Také je možné vybrat množinu sond na kterých se udělá odhad loess křivky
- **Kvantilová normalizace**

Kvantilová normalizace

Je založena na **pořadí** pozorování, je tedy **neparametrická**. Buď na skupině všech sond, nebo jen na skupině vybraných sond.

Princip: U každého mikročipu se geny seřadí dle hodnoty exprese a tyto hodnoty se potom nahradí průměrnou hodnotou kvantilu, který představuje v celém čipu



Kvantilová normalizace

Je založena na **pořadí** pozorování, je tedy **neparametrická**. Buď na skupině všech sond, nebo jen na skupině vybraných sond.

Princip: U každého mikročipu se geny seřadí dle hodnoty exprese a tyto hodnoty se potom nahradí průměrnou hodnotou kvantilu, který představuje v celém čipu

hodnoty

Gen	čip1	čip2	čip3
A	5	4	3
B	2	1	4
C	3	4	6
D	4	2	8

→

pořadí

Gen	čip1	čip2	čip3
A	iv	iii	i
B	i	i	ii
C	ii	iii	iii
D	iii	ii	iv

→

Seřazené hodnoty

	čip1	čip2	čip3
i	2	1	3
ii	3	2	4
iii	4	4	6
iv	5	4	8

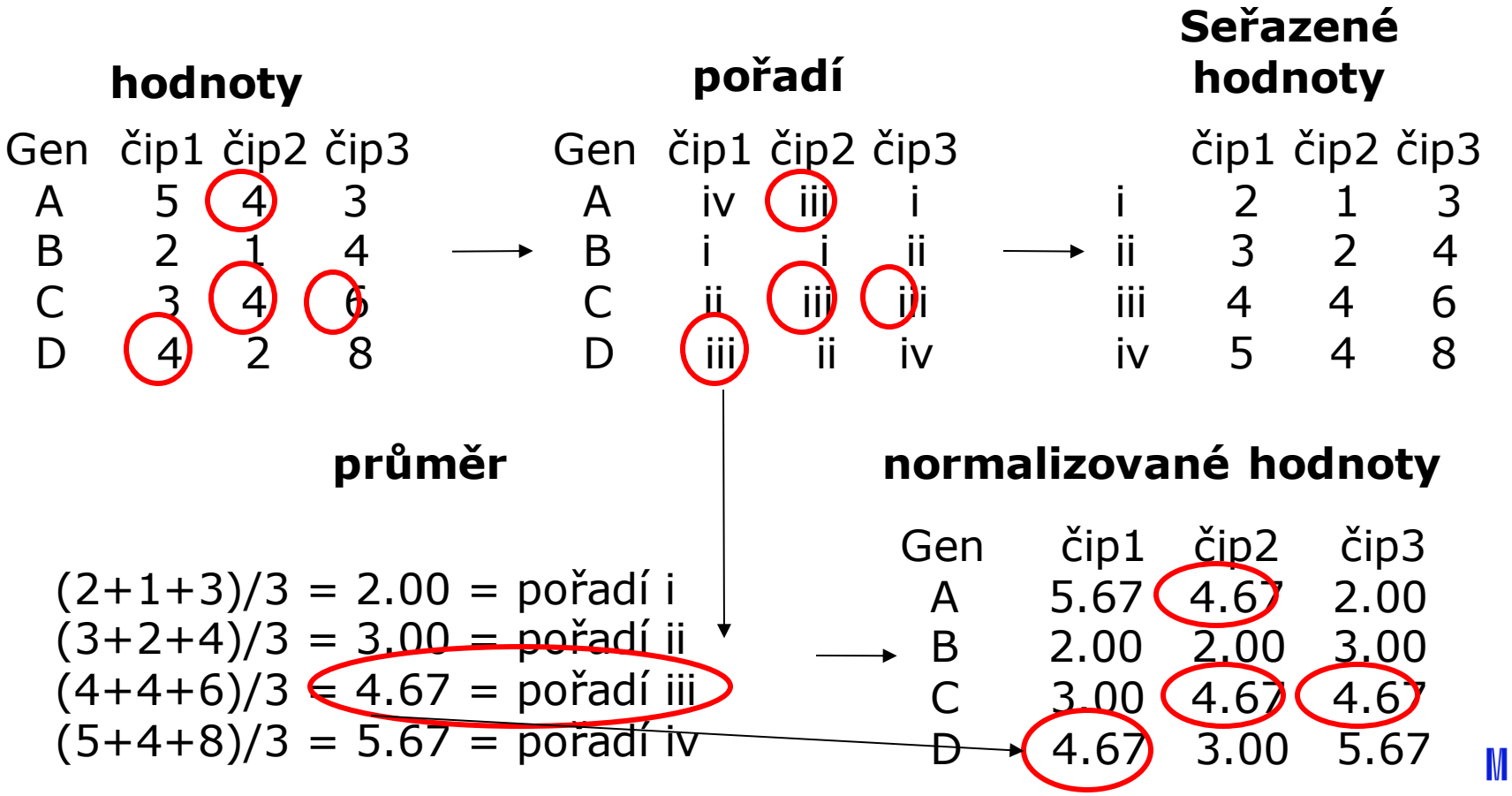
průměr

(2+1+3)/3 = 2.00 = pořadí i
(3+2+4)/3 = 3.00 = pořadí ii
(4+4+6)/3 = 4.67 = pořadí iii
(5+4+8)/3 = 5.67 = pořadí iv

Kvantilová normalizace

Je založena na **pořadí** pozorování, je tedy **neparametrická**. Buď na skupině všech sond, nebo jen na skupině vybraných sond.

Princip: U každého mikročipu se geny seřadí dle hodnoty exprese a tyto hodnoty se potom nahradí průměrnou hodnotou kvantilu, který představuje v celém čipu



MUNI | RECETOX

Shrnutí

- Základní data nejsou mRNA koncentrace

- Musíme zkontrolovat kvalitu dat na různých úrovních
  - Úroveň sondy
  - Úroveň sklíčka (všechny sondy na sklíčku)
  - Úroveň genu (gen mezi sklíčky)

- Data vždy transformujeme *logaritmem*, abychom zabezpečili normální rozložení hodnot

- Data normalizujeme abychom odstranili systematické (technické) chyby

Procvičování na doma

- Podívame se do našeho adresáře s cDNA příkladem a otevřeme cDNA.R v programu Rstudio.

- Postupujeme dle instrukcí, na konci je dobrovolný úkol.