

# Genetische Statistik

## Präsenzübung 9: GX-Analysen

Dr. Janne Pott ([janne.pott@uni-leipzig.de](mailto:janne.pott@uni-leipzig.de))

January 18, 2022

# Fragen

Gibt es Fragen zu

- Vorlesung?
- Übung?
- Seminar?

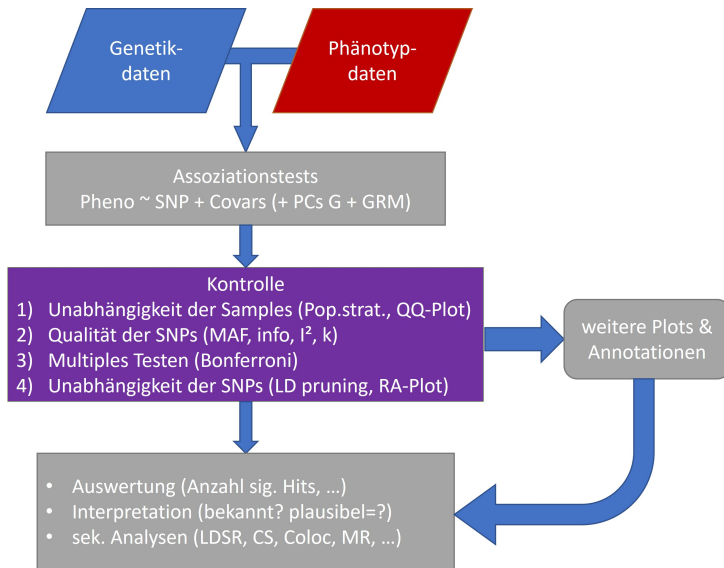
# Plan heute

- Blatt 6 - A1: Genexpressionsanalysen
- Blatt 6 - A2: Pathway-Analysen
- Blatt 6 - A3: Hierarchische Testkorrektur
- Blatt 6 - A4: Interpretation von Plots

# Abschnitt 1

## Genexpressionsanalysen

# Wiederholung GWAS-Workflow



# Aufgabe 1

- a) **eQTL** vs. **TWAS**
- b) **cis** vs. **trans** eQTLs
- c) Warum adjustiert man auf Lymphozyten und Monozyten?
- d) Wie adjustiert man auf technische bzw. biologische Confounder?
- e) Skizzieren Sie den Ablauf einer eQTL-Analyse!

# Aufgabe 1 - Lösung a) & b)

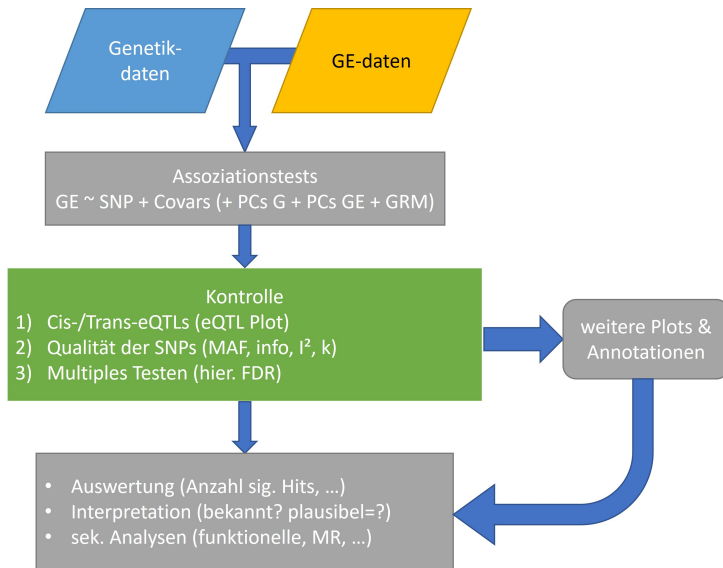
- **eQTL**:= Expression Quantitative Trait Locus  $\Rightarrow GX \sim G$
- **TWAS**: Transkriptionsweite Assoziationsstudie  $\Rightarrow \text{Phänotyp} \sim GX$
- Ziel eQTL:
  - Funktionelle Relevanz, Validierung
  - Identifizierung neuer genetischer Risikofaktoren
  - Aufklärung grundlegender biologischer Zusammenhänge
- Ziel TWAS:
  - Identifizierung von Gen - Phänotyp - Beziehungen
  - Pathwayanalysen
- **Cis**: SNP „in Nähe“ der Expressionssonde (1 MB Fenster)
- **Trans**: SNP „weit weg“ von Expressionssonde (mehr als 1 MB, auch andere Chromosomen)

# Aufgabe 1 - Lösung c) & d)

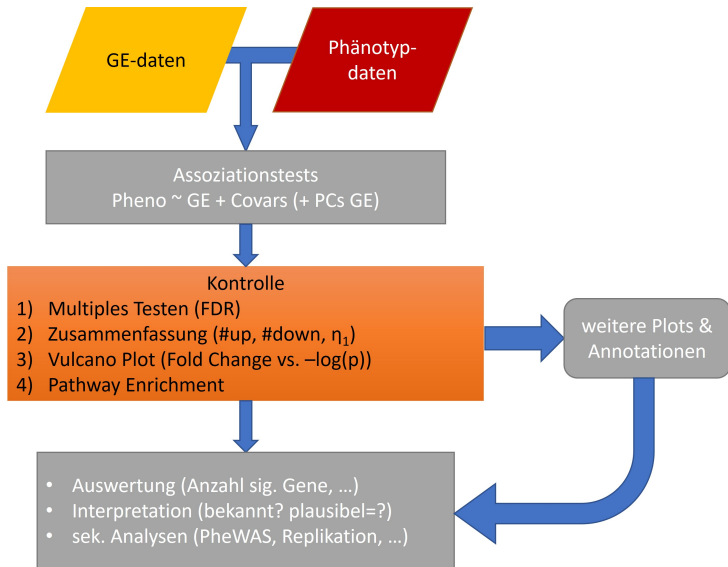
- **Technische Confounder:** z.B. Batcheffekte, Hintergrundrauschen, sollte in der Präprozessierung der GX-Arrays bereits korrigiert werden.
- **Biologische Confounder:** können meist als Modellparameter berücksichtigt werden:
  - **Blutwerte:** nötig bei Blutgewebe da verschiedene Blutkörperfraktionen mit unterschiedliche GE
  - Alter, Geschlecht, Medikamente: bekannter Einfluss (bsp. Sexualhormone sind Transkriptionsfaktoren)
  - Weitere, unbekannte Confounder: PCA der GE



# Aufgabe 1 - Lösung e)



# Aufgabe 1 - Zusatz



# Abschnitt 2

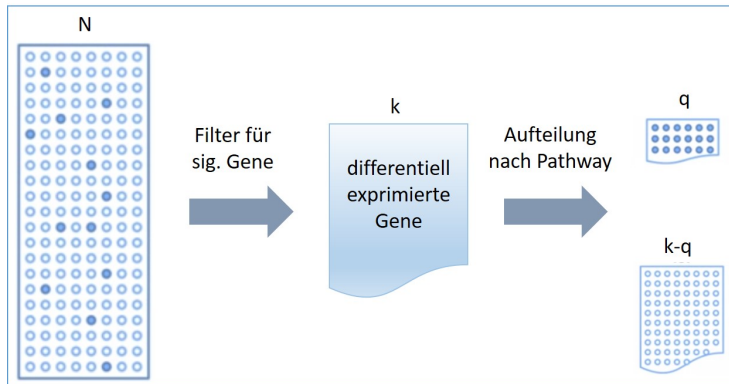
## Pathwayanalysen

## Aufgabe 2

Frage:  $GX \sim \text{Medikament?}$ ,  $N = 15,397$  GEs ( $k = 1,042$  sig. assoziiert,  $m = 2,587$  im Lipidpathway)

Wie viele signifikante Gene müssten im Lipidstoffwechsel liegen, um von einer signifikanten Anreicherung ausgehen zu können? Gehen Sie dazu von einer hypergeometrischen Verteilung aus.

# Hintergrund (1)



**Abbildung 1:** Schema einer Überrepräsentationsanalyse.

## Hintergrund (2)

**Idee:** Urne mit  $N - m$  schwarzen und  $m$  weißen Kugeln, aus der  $k$  mal ohne zurücklegen gezogen wird. Wie hoch ist die Wahrscheinlichkeit, dass  $q$  Kugeln weiß sind?

- $N = 15,397$  = Größe der Grundmenge (alle Gene),
- $k$  = Größe der Stichprobe,  $k \leq N$  (differenziell exprimierte Gene), und
- $m$  = Größe einer spezifischen Teilmenge von  $N$ ,  $m \leq N$  (Gene eines Pathway),

so gilt für die Wahrscheinlichkeit, dass die Stichprobe  $k$  Elemente von der spezifischen Teilmenge enthält

$$P(q) = \frac{\binom{m}{q} \binom{N-m}{k-q}}{\binom{N}{k}}$$

## Aufgabe 2 - Lösung

- $N = 15,397$ ,  $m = 2,587$ ,  $k = 1,042$ ,  
 $m/N = 16.8\% \rightarrow 16.8\% \cdot k = 175$ ,
- Bei  $q = 175$  Treffern ist die Ratio gleich (= Erwartung, keine Anreicherung).
- Suche nach  $q > 175$ , sodass  $P(q > x) > 0.95$  (Anreicherung, mehr Treffer als zufällig erwartet).

```
qhyper(0.95, 2587, 15397-2587, 1042)
```

```
## [1] 194
```

- $P(x \leq 194) = 0.95 \rightarrow$  ab  $q \geq 195$  signifikante Anreicherung

## Abschnitt 3

# Hierarchische Testkorrektur



## Aufgabe 3

Hierarchische Korrektur mittels Bonferroni für folgende Daten:

Gen 1 -		Gen 2 -		Gen 3 -	
SNP	p-Wert	SNP	p-Wert	SNP	p-Wert
rs1001	0.05	rs2001	0.1	rs1004	0.0124
rs1002	0.04	rs2002	0.2	rs1005	0.2
rs1003	0.005	rs2003	0.04	rs1006	0.0025
rs1004	0.4	rs2004	0.0001	rs2001	0.5
rs1005	0.3	rs2005	0.004	rs2002	0.00001
rs1006	0.8	rs2006	0.02	rs2003	0.054
-	-	rs2007	0.00005	-	-

- **Multiples Testproblem:** Alphafehler-Kumulierung (globale Erhöhung des Fehler 1. Art, mehr falsch positive).
- Hierarchisches FDR:
  - 1) Adjustierung Genebene:  $n_i$  Tests pro Transkript
  - 2) min. adj. p-Wert pro Transkript bestimmen
  - 3) Adjustierung global:  $n$  Gene
  - 4) Bestimmung der Anzahl  $k$  der sig. assoziierten Transkripte mittels Step 3
  - 5) Bestimmung des globalen Sig.niveaus  $\alpha_1 = 0.05 \cdot k/n$
  - 6) Anwendung von  $\alpha_1$  auf die adjustierten p-Werte von Step 1

## Aufgabe 3 - Lösung (1)

```
head(myTab)
```

```
##      gene      SNP  pVal
## 1: Gen1 rs1001 0.050
## 2: Gen1 rs1002 0.040
## 3: Gen1 rs1003 0.005
## 4: Gen1 rs1004 0.400
## 5: Gen1 rs1005 0.300
## 6: Gen1 rs1006 0.800
```

```
myTab[, .N, by=gene]
```

```
##      gene N
## 1: Gen1  6
## 2: Gen2  7
## 3: Gen3  6
```

## Aufgabe 3 - Lösung (2)

```
# step 1: Bonferroni innerhalb der Gene
```

```
myTab[,p_adj1 := pVal*6]
```

```
myTab[gene == "Gen2",p_adj1 := pVal*7]
```

```
# step 2: check min p_adj
```

```
myTab2 = myTab[,.SD[p_adj1==min(p_adj1)],by=.(gene)]
```

```
myTab2
```

```
##      gene      SNP  pVal  p_adj1
```

```
## 1: Gen1 rs1003 5e-03 0.03000
```

```
## 2: Gen2 rs2006 5e-05 0.00035
```

```
## 3: Gen3 rs2002 1e-05 0.00006
```

## Aufgabe 3 - Lösung (3)

*# step 3: Bonferroni über die Gen*

```
n = dim(myTab2)[1]
myTab2[,p_adj2 := p_adj1*n]
myTab2[p_adj2<=0.05]
```

```
##      gene      SNP   pVal   p_adj1   p_adj2
## 1: Gen2 rs2006 5e-05 0.00035 0.00105
## 2: Gen3 rs2002 1e-05 0.00006 0.00018
```

*# step 4 & 5: k und alpha1 bestimmen*

```
(k = dim(myTab2[p_adj2<=0.05])[1])
```

```
## [1] 2
```

```
(a1 = 0.05 * (k/n))
```

```
## [1] 0.03333333
```

## Aufgabe 3 - Lösung (4)

```
# step 6: a1 auf level 1 anwenden (nur bei genen, die in level  
matched = match(myTab$gene,myTab2$gene)  
myTab[,p_adj2 :=myTab2[matched,p_adj2]]  
myTab[p_adj1 <= a1 & p_adj2<=0.05,]
```

```
##      gene      SNP      pVal  p_adj1  p_adj2  
## 1: Gen2 rs2004 0.00010 0.00070 0.00105  
## 2: Gen2 rs2005 0.00400 0.02800 0.00105  
## 3: Gen2 rs2006 0.00005 0.00035 0.00105  
## 4: Gen3 rs1006 0.00250 0.01500 0.00018  
## 5: Gen3 rs2002 0.00001 0.00006 0.00018
```

Es sind insgesamt 5 SNPs mit den zwei Genen assoziiert!

## Abschnitt 4

### Plots der Vorlesung

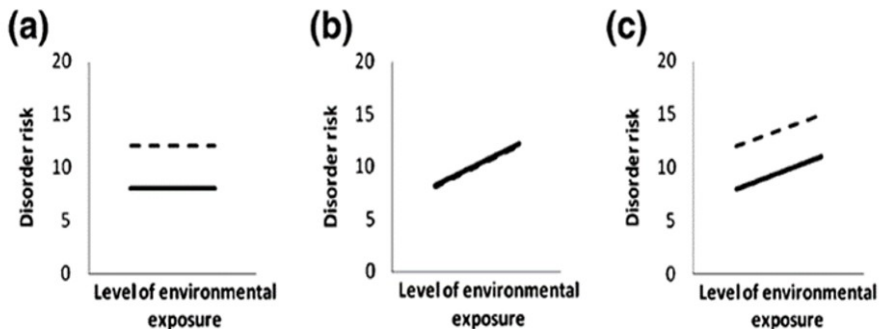
# Aufgabe 4

Bitte betrachten Sie die Plots und beantworten Sie folgende Fragen:

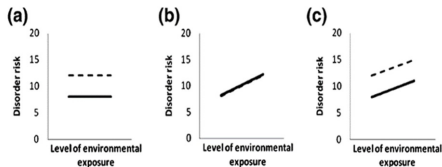
- a) Wie heißt der Plot?
- b) Aus welchen Daten wird er erzeugt?
- c) Wie ist dieser Plot zu interpretieren?



# Plot 1

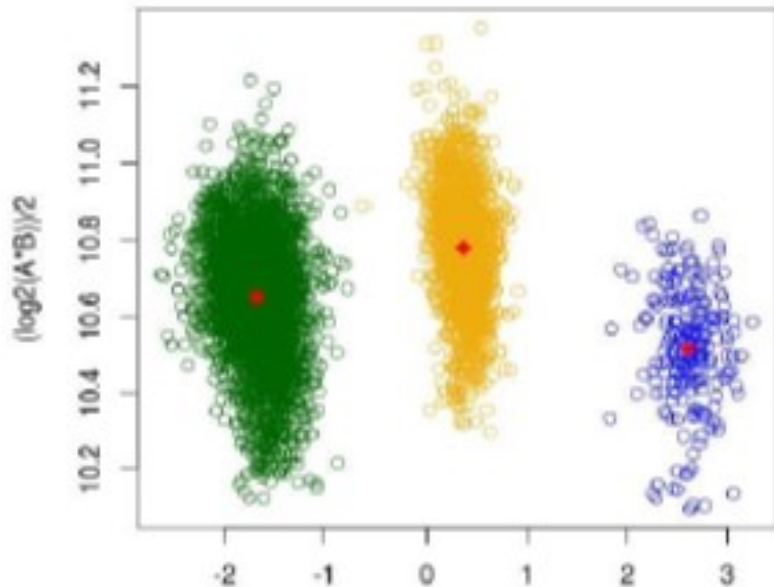


# Plot 1: Genetik-Umwelt-Interaktionsplot

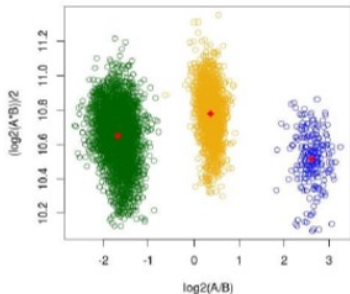


- Darstellung des Haupt- bzw. Interaktionseffekts der Genetik und Umwelt auf das Risiko einer Erkrankung. Durchgezogenen Linie: Allel A; gestrichelte Linie: Allel B
- Panel a: Haupteffekt durch die Genetik, Allel B erhöht das Risiko, kein Umwelteinfluss
- Panel b: Haupteffekt durch die Umwelt, Genetik spielt keine Rolle
- Panel c: Additiver Effekt von Umwelt und Genetik, keine Interaktion
- Für Interaktion müssten sich die Linien überkreuzen bzw. nicht mehr parallel verlaufen.

## Plot 2

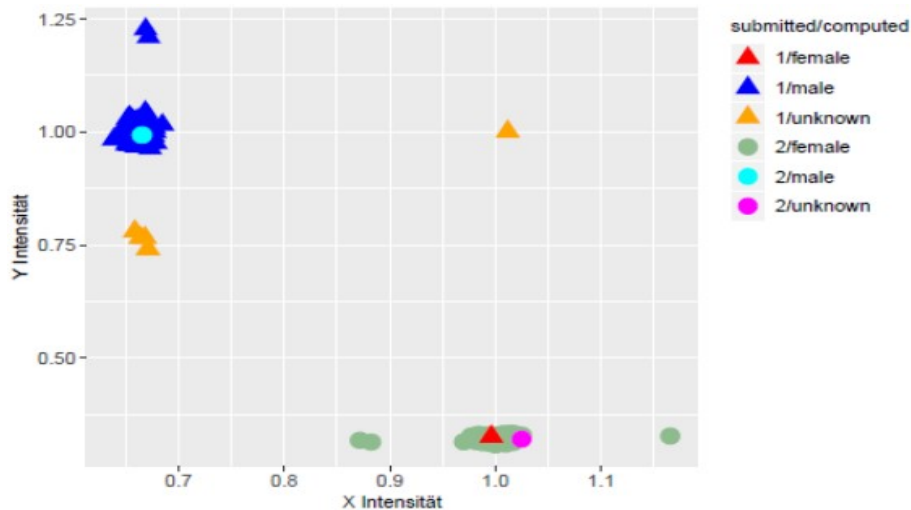


## Plot 2: SNP-Clusterplot

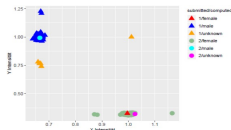


- Clusterplot eines SNPs, Aufgetragen sind die transformierten Intensitäten der zwei Allele. Grün: Cluster von Genotyp BB; Gelb: Cluster AB; Blau: Cluster AA; rot: Mittelpunkte der Cluster
- keine / kaum graue Punkte zu sehen → wenige Missings, gute Callrate
- kein sehr kleines Cluster → MAF nicht zu klein
- AB Cluster etwa bei 0 bzgl. der X-Achse und über den BB bzw. AA Cluster bzgl. der Y-Achse; alle drei Cluster deutlich von einander getrennt → Clusterkriterien erfüllt

# Plot 3

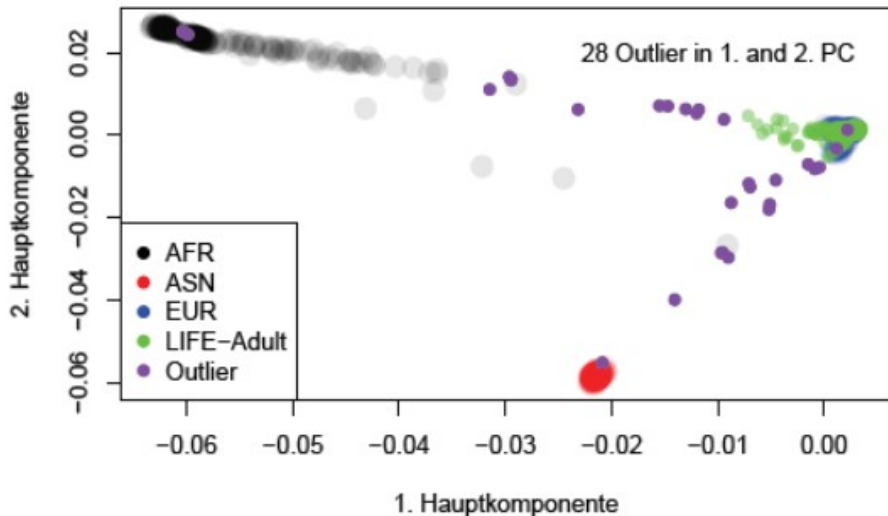


## Plot 3: X-Y-Intensity Plot

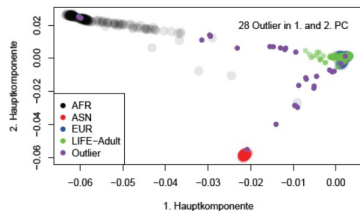


- Intensitätsplot aller gonosomalen SNPs (Mittelwert pro X bzw. Y pro Sample). Farbcodierung vergleicht Geschlecht aus der Datenbank mit dem in dem Calling berechneten Geschlecht.
- Zwei Mismatches (cyan und rot): hier stimmt das Datenbankgeschlecht nicht zu dem Berechneten → beide für alle Analysen filtern.
- Zwei Frauen mit relativ niedriger X-Intensität, eine Frau mit höherer X-Intensität, und zwei Männer mit höheren Y-Intensitäten → für gonosomale Analysen filtern.
- Ein Mann, dessen Geschlecht nicht berechnet werden konnte, der aber auch hohe X-Intensitäten hat (XXY-Mann) → für gonosomale Analysen filtern.
- Die übrigen *unkown* Samples können bleiben, da diese vermutlich nur etwas schlechtere SNP-Quali haben.

## Plot 4



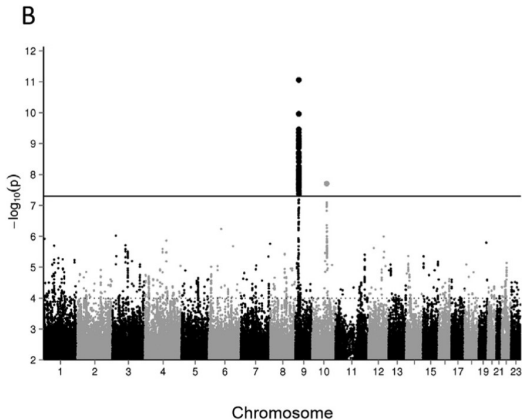
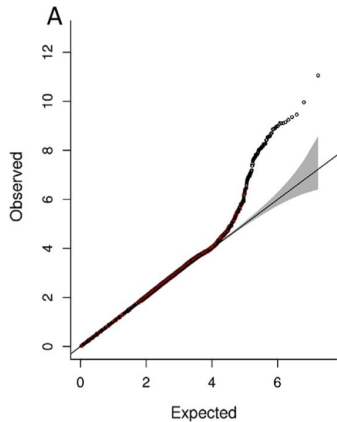
## Plot 4: PC-Plot



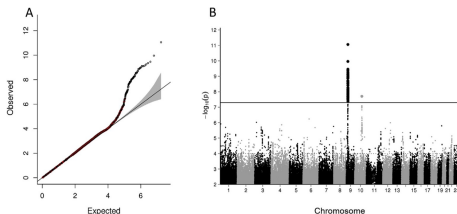
- Hauptkomponentenanalyse der Genetikdaten, aufgetragen sind die ersten zwei Eigenvektoren. Diese trennen die ethnische Herkunft der Samples auf. Schwarz: afrikanisches Cluster; rot: asiatisches Cluster; blau: euopäisches Cluster; grün: unbekannte Ethnie (vermutlich Europäer); lila: unbekannte Ethnie entlang des Dreiecks
- Hauptkomponenten werden verwendet um auf Stratifikationsbias in genomweiten Studien zu adjustieren. Stratifikationsbias: falsche Schätzer genetischer Effekte aufgrund einer gemeinsamen Analyse von Personen unterschiedlicher genetischer Herkunft bei gleichzeitigem Vorliegen nichtgenetisch bedingter Unterschiede zwischen den Personengruppen.



# Plot 5

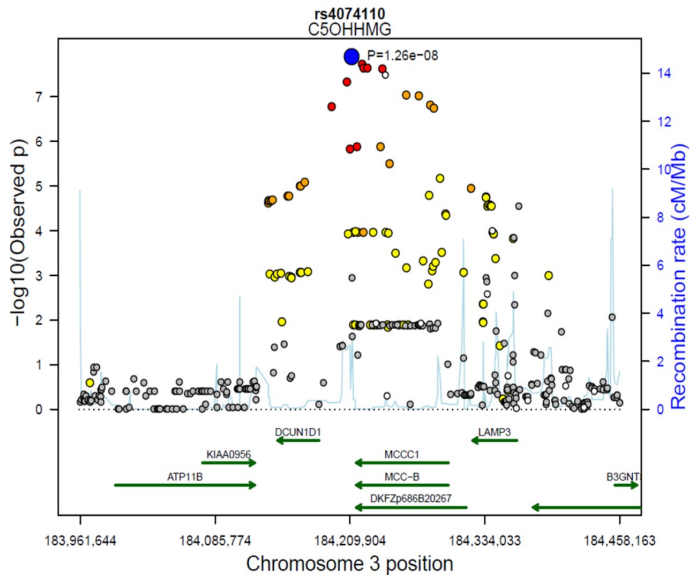


## Plot 5: QQ- und Manhattan-Plot

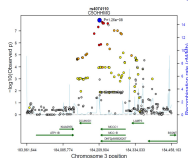


- QQ-Plot: Vergleich der erwarteten Verteilung der Teststatistiken mit der Beobachteten.
- Keine Inflation der Teststatistiken zu sehen (d.h. Beobachtungen liegen auf der Ursprungsgeraden für nicht signifikante Beobachtungen)
- Manhattan-Plot: Auftragung aller SNPs und ihrer  $-\log_{10}$ -transformierten p-Werte. Durchgezogene Linie entspricht der genomweiten Signifikanz ( $p = 5 \cdot 10^{-8}$ )
- Es gibt zwei genomweit signifikante Hits (Chr. 9 & 10)

# Plot 6



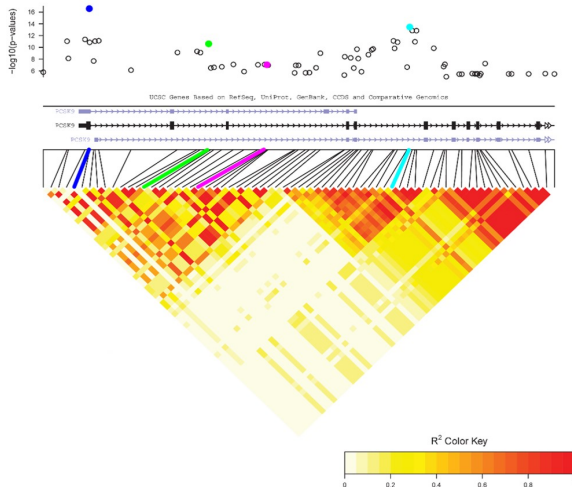
## Plot 6: Regional-Association-Plot



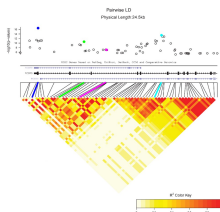
- Entspricht einem Zoom in einen Manhattanplot
- Zusätzliche Informationen: Rekombinationsrate (hellblaue Peaks entsprechen Rekombinationshotspots); Gene (inkl. Ableserichtung); LD bezüglich des Top-Hits (Färbung der Punkte)
- Es fehlt eine LD-Legende! Vermutlich rot: hohes LD ( $r^2 > 0.8$ ), orange: mittleres LD ( $0.5 < r^2 < 0.8$ ), gelb: niedriges LD ( $0.2 < r^2 < 0.5$ ), grau : kein LD ( $r^2 < 0.2$ ).
- Vermutlich nur ein genomweit signifikantes Signal, die anderen stark assoziierten Varianten sind über LD gekoppelt (nicht unabhängig).
- Man kann nicht das kausale Gen ablesen, da man nicht weiß, ob es sich um eine Missense-Mutation in einem Gen oder Mutation im Enhancer Bereich vor einem Gen handelt.

# Plot 7

Pairwise LD  
Physical Length: 24.5kb

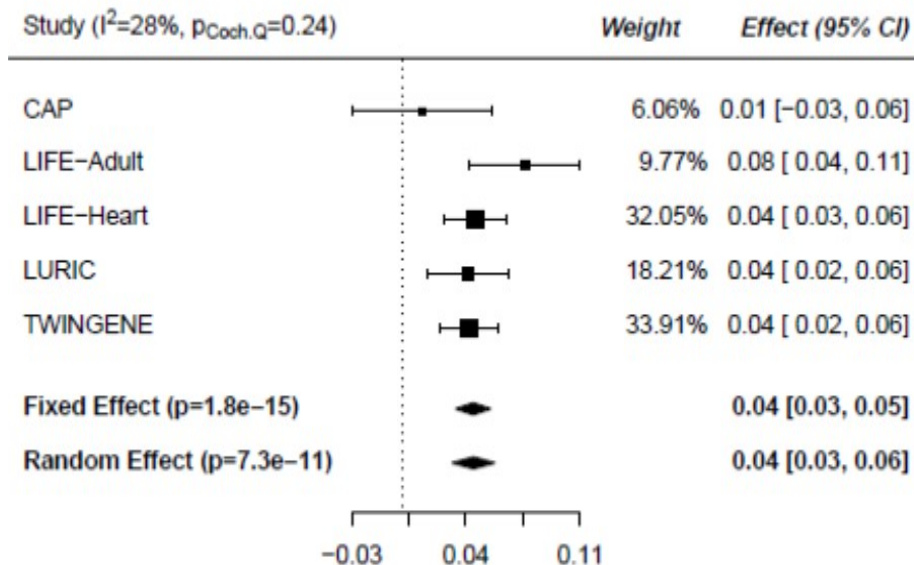


# Plot 7: LD-Heatmap

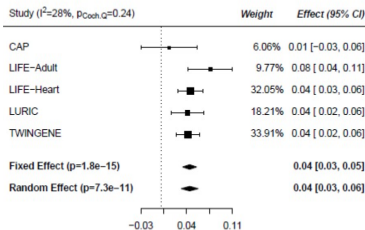


- Alle paarweisen LD  $r^2$  einer Region sind im Dreieck aufgetragen. Die Striche zeigen die Position in einem Gen an (dunkle Kästen: Exons), darüber ist ein Manhattanplot aufgetragen.
- Man erkennt drei Haploblöcke. Im ersten sind drei signifikante SNPs (blau, grün, magenta), die die restlichen SNPs im Block taggen. Im zweiten Block gibt es nur einen signifikanten Hit (cyan), im letzten Block keinen.
- Der erste Block ist etwas uneinheitlich. Dies kann daran liegen, dass es sich hier um mehrere Varianten mit niedriger MAF handelt.

## Plot 8



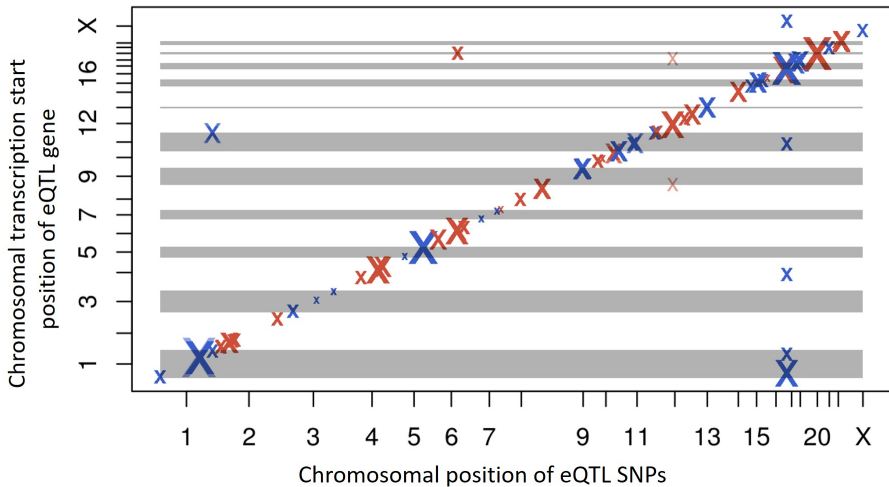
## Plot 8: Forest-Plot



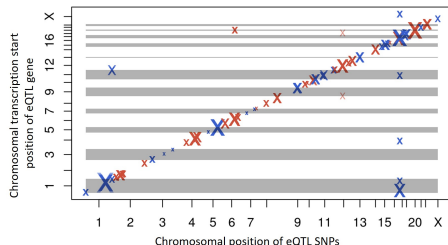
- Meta-Analyse eines SNPs in 5 Studien.
- Größe der Schätz-Quadrate spiegelt Fallzahl der Studien wider, Fehlerbalken das 95%-Konfidenzintervall.
- Es wurden sowohl fixed als auch random effects model gerechnet, wobei sich die Schätzer nicht, nur der Standardfehler etwas unterscheidet (niedrige Heterogenität, alle Effekte gehen in die gleiche Richtung).
- Sowohl der FEM- als auch der REM-Schätzer sind genomweit signifikant.



## Plot 9

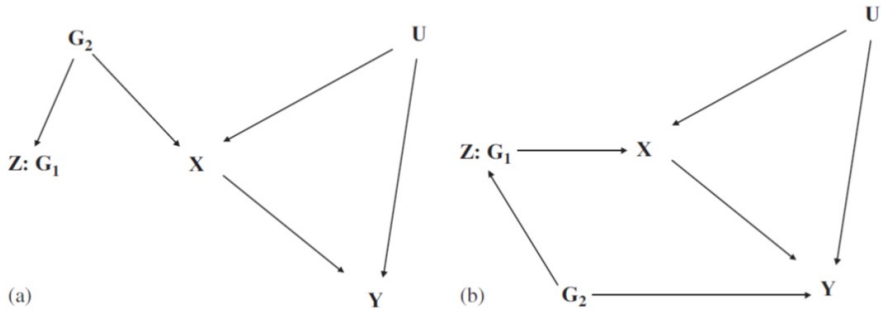


## Plot 9: eQTL-Plot

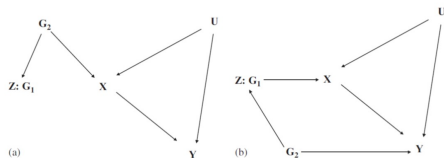


- Position der SNPs gegen die Position der Sonden aufgetragen, wobei nur signifikante eQTLs mit einem Kreuz gekennzeichnet wurden (Farbe alternierend bzgl. SNP Position, graue Streifen bzgl. Sonden Position). Je größer das Kreuz, desto stärker die Assoziation.
- Entlang der Ursprungsgeraden liegen cis-eQTLs.
- Auf Chromosom 1, 6, 12, und 16 gibt es trans-eQTLs, die mit Sonden auf Chr. 11, 19, 8 und 18, und 1, 4, 11, und X assoziieren.

# Plot 10



## Plot 10: MR-DAGs



- Gerichtete Azyklische Graphen für eine Mendelische Randomisierung.
- Panel a:  $G_1$  ist ein valides Instrument, da es keinen anderen Weg zu  $Y$  gibt als über  $X$ .
- Panel b:  $G_1$  ist ein invalides Instrument, da es in hohen LD zu  $G_2$  steht und  $G_2$  direkt  $Y$  beeinflusst.

# Abschnitt 5

## Zusammenfassung