蛋白质和 DNA 结合位点定位

成员与分工

- 张子栋
  - 代码实现 (Java & R部分)
  - 实验报告撰写
  - 模型建立
- 梁国相
  - 代码校对
  - 数据可视化

多重检验问题

5% 水平的假设检验, 在 100 次假设检验中, 至少出现一次错误(错误地拒绝原假设)的概率为

$$1-(1-0.05)^{100}\approx 0.994$$

当一个数据集有多词假设检验时, 需要做多重假设检验校正.

控制错误的方法

$Bonferroni\ Correction$

改变显著性水平 $\alpha=\frac{\alpha}{m}$ 得到新的显著性水平, $reject\ H_i\ if\ p_i\leq\alpha$

> 例如, 如果检验 1000 次, 就将阈值($\frac{\alpha}{m}$) 设定为 $\frac{5\%}{1000}$, 即使检验 1000 次, 出现错误的概率还是保持在 $N\times 1000=5\%$
> 该方法虽然简单, 但是检验过于严格, 导致最后找不到显著表达的的蛋白(假阴性)

False Discovery Rate (FDR)

对于 m 次假设检验 $H_1,H_2,\cdots,H_m$, 得到 P 值: $P_1,P_2,\cdots,P_m$, 将 P 值从小到大进行排序: $P_{(1)},P_{(2)},\cdots,P_{(m)}$
对于给定的 $\overline{\alpha}$, 找到满足条件 $P(k)\leq\frac{k}{m}\overline{\alpha}$ 的最大 k 值
然后拒绝 $H_i,i=1,2,\cdots,k$ 这些原假设

> 相对 Bonferroni 来说, FDR 用比较温和的方法对 p 值进行了校正. 其试图在假阳性和假阴性间达到平衡, 将假/真阳性比例控制到一定范围之内, 例如, 如果检验 1000 次, 我们设定的阈值为 $0.05(5\%)$, 那么无论我们得到多少个差异蛋白, 这些差异蛋白出现假阳性的概率保持在 5% 之内, 这就叫 $FDR<5\%$.

使用 R 中的 `p.adjust()`

`p.adjust(p, method = p.adjust.methods, n = length(p))`

- `p` 是多重假设检验的多个 `p` 值
- `p.adjust.methods` 有: 'holm''hochberg''hommel''bonferroni''BH''BY''fdr''none'

实验思路

- 原假设: 读取位点 `reads` 随机落在基因组上.
- 分布特征: $B(n,p),\ n\to\infty,\ p\to 0$
  - 近似为泊松分布
  - $P(x)=\frac{e^{-\lambda}\lambda^x}{x!}$
- 计算 P 值
  - P 值越小, 越表明测序 `reads` 落在该 DNA 区间不是随机的, 从而说明蛋白质结合具有偏好性.
- 注意事项
  - 蛋白质跟 DNA 结合位点具有一定范围, 可能不是单个位点
  - DNA `reads` 具有偏好性不天然等价于结合位点
    - 数据除了随机误差, 还可能具有系统偏好性

定位峰

分析数据和曲线特征, 寻找局部最大值

1. 阈值筛选峰: 人为设定, 分位数, 拒绝域临界点
2. 局部极大值筛选峰(原始值找顶点, 如以最大值顶点为中心左右各扩展 75 bp)

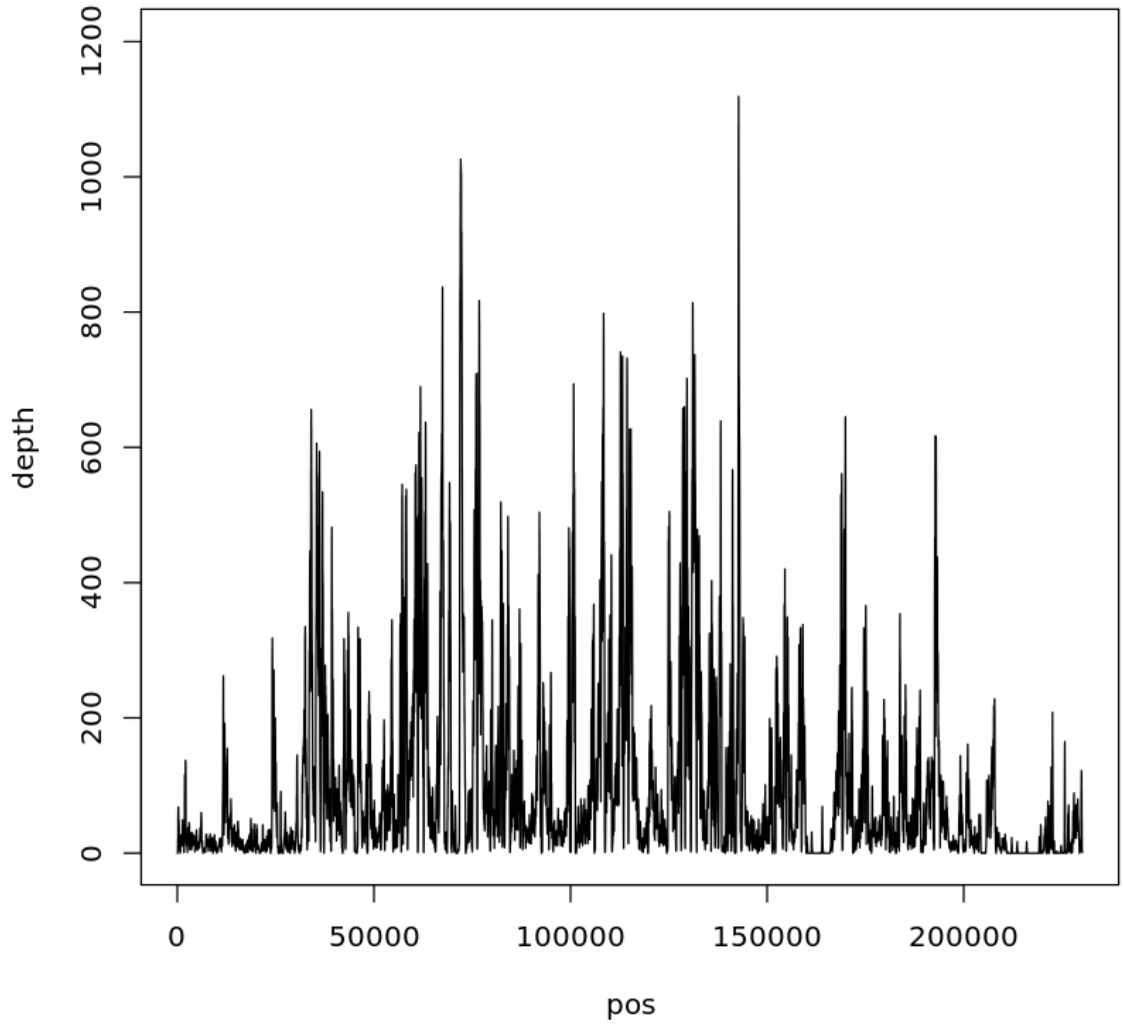
寻找显著峰的方法

1. 使用局部(或全局)泊松分布计算峰中各碱基的测序深度出现的概率, 并计算局部(或全局)平均测序深度 λ (泊松分布均值)对应的概率值作为总体均值(总体理论概率), 然后将峰作为一个样本跟总体均值相比较
2. 根据测序深度作为观察值做一个样本均数假设检验
3. 根据泊松分布直接计算超过这个峰均值的所有观测值之和, 通过这个累计概率是否小于 0.05 判断是否为显著峰

实验过程

读取数据与可视化

```r
# read data
data <- read.table('GSM1016879_WT_ChrI_K4me3.txt', header = F)
depth <- data[, 4]
pos <- data[, 2]
# visualize
plot(c(1, length(data[, 2])), c(1, 1200), type = "n", xlab = "pos", ylab = "depth")
lines(pos, depth)
```



获取峰

使用 Java 计算大于均值的极大值, 存入集合 peak 内

```java
    /**
     * get peak
     *
     * @param allReads all reads
     * @param mean     mean of depth
     * @return peak
     */
    public List<Read> getPeak(List<Read> allReads, int mean) {
        List<Read> peak = new ArrayList<>();
        Read nowRead = null;
        for (int i = 1; i < allReads.size() - 1; i++) {
            nowRead = allReads.get(i);
            if (nowRead.getDepth() >= mean &&
                    nowRead.getDepth() > allReads.get(i - 1).getDepth() &&
                    nowRead.getDepth() > allReads.get(i + 1).getDepth()
            ) {
                peak.add(nowRead);
```

```
            }
        }
        return peak;
    }
```

扩展 $\pm 75bp$

```
    /**
     * expand peak +- 75 bp
     *
     * @param peak peak by max depth
     * @return expanded peaks
     */
    public List<Read> expand(List<Read> allReads, Read peak) {
        List<Read> expandPeak = new ArrayList<>();
        if (peak.getPos() < RATIO) {
            for (int j = 0; j < peak.getPos() + RATIO + 1; j++) {
                expandPeak.add(allReads.get(j));
            }
            return expandPeak;
        } else if (peak.getPos() > 75 && peak.getPos() < READS_NUM - RATIO)
{
            for (int j = peak.getPos() - RATIO; j < peak.getPos() + RATIO +
1; j++) {
                expandPeak.add(allReads.get(j));
            }
            return expandPeak;
        } else {
            for (int j = peak.getPos() - RATIO; j < READS_NUM + 1; j++) {
                expandPeak.add(allReads.get(j));
            }
            return expandPeak;
        }
    }
```

- 导出数据到 R

```
# 读入带筛选峰
peak <- read.table("poisson.txt", header = T)
# 读入扩展区间
peakSection <- read.table("peakSection.txt", header = F)
peakSection <- as.matrix(peakSection)
pValue <- c()
# 计算局部 t 检验 P 值
for (i in 1:5553) {
  localP <- c()
  sectionWholeP <- c()
  localP <- c(localP, dpois(peakSection[i,], mean(peakSection[i,])))
  sectionWholeP <- dpois(round(mean(peakSection[i,])),
mean(peakSection[i,]))
  pValue <- c(pValue, t.test(x = localP, mu = sectionWholeP)$p.value)
}
# 使用 fdr 校正 p 值
pValue <- p.adjust(pValue, method = "fdr")
# length(pValue)
# length(pValue[pValue < 2.2e-16])
```

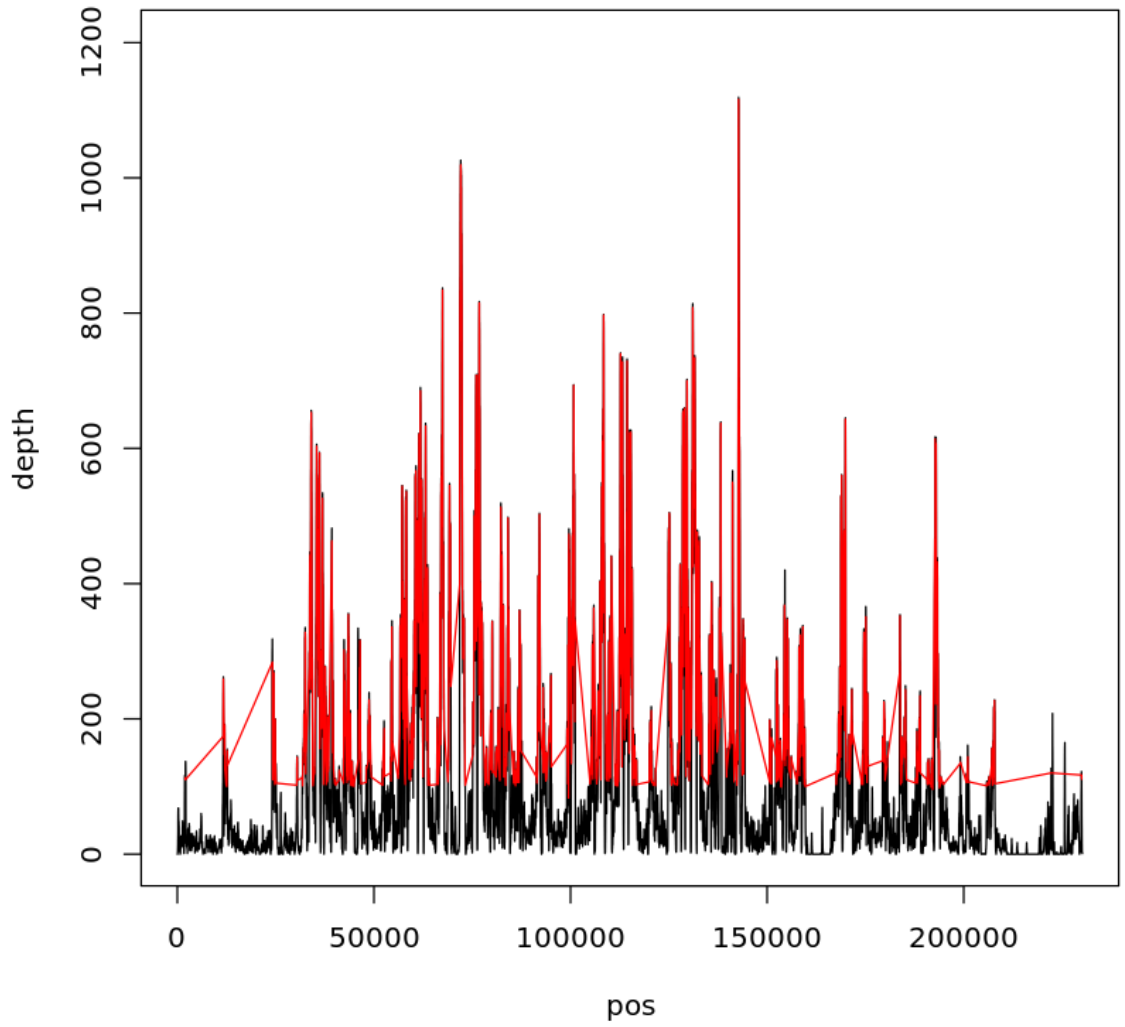
```r
# 筛选出峰值
sortedPeak <- peak[which(pValue < 2.2e-16),]
# 传入参数便于可视化
newdepth <- sortedPeak[, 2]
newpos <- sortedPeak[, 1]

# read data
data <- read.table('GSM1016879_WT_ChrI_K4me3.txt', header = F)
depth <- data[, 4]
pos <- data[, 2]
# visualize
plot(c(1, length(data[, 2])), c(1, 1200), type = "n", xlab = "pos", ylab = "depth")
lines(pos, depth)

# 峰值位置可视化
lines(newpos, newdepth, col = "red")
```

5553

5540



由可视化结果及峰值数量可以看出, 筛选结果不理想.
换用曲线拟合方式找.

曲线拟合

```r
data <- read.table('GSM1016879_WT_ChrI_K4me3.txt', header = F)
# 简化数据
read <- cbind(data[, 2], data[, 4])

lambda <- mean(read[, 2])

# 高于平均值
above <- which(read[, 2] > lambda)

# 曲线拟合
line <- smooth.spline(read)

# 求导
diff <- diff(line$y)
ddiff <- diff(diff)
# 一阶导数零点 (接近 0)
Derivative <- which(diff > -0.003 & diff < 0.003)
```

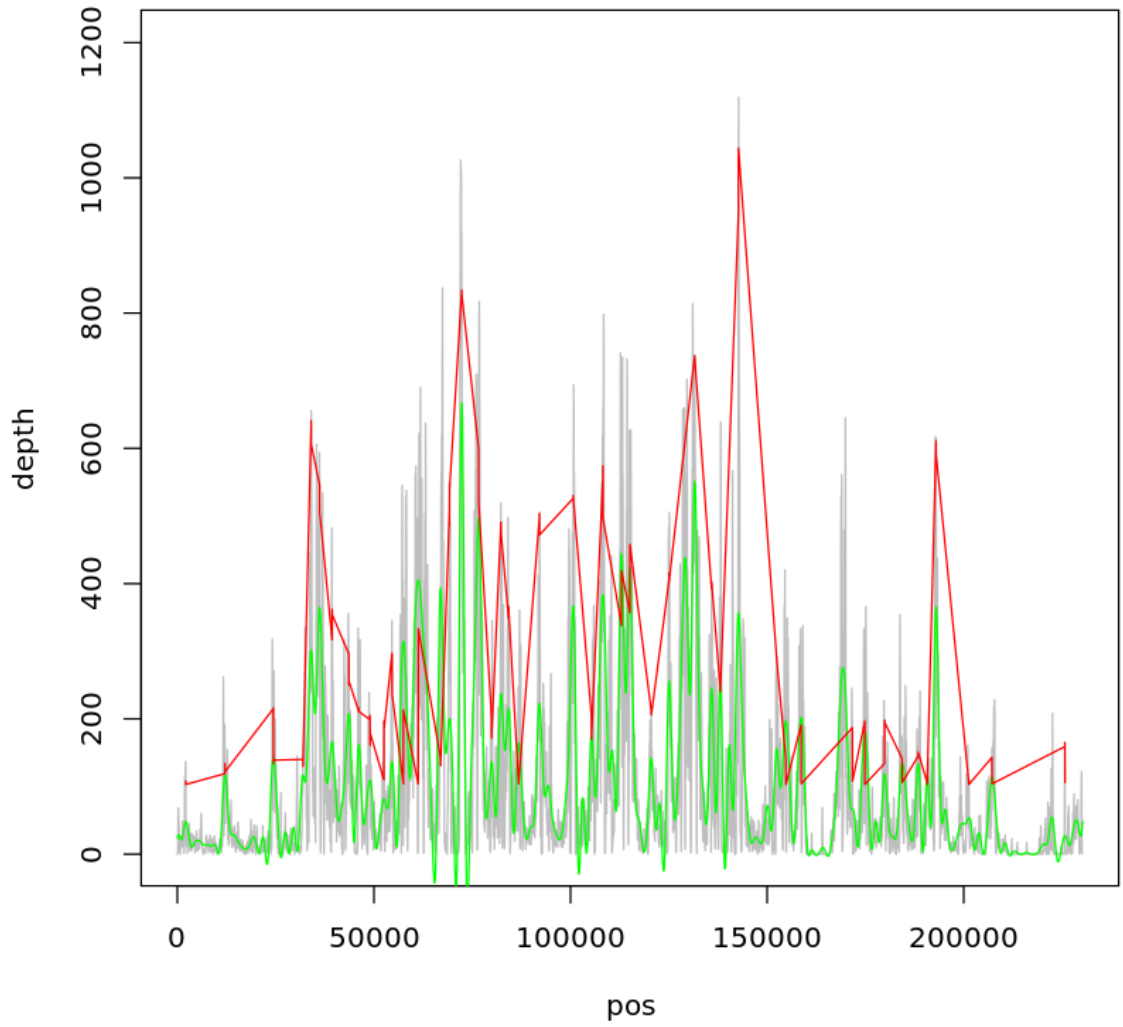
```r
# 二阶导数小于零
DDerivative <- which(ddiff < 0)
# 求交集
Derivative <- intersect(Derivative, DDerivative)

pos <- data[, 2]
depth <- data[, 4]
peak <- intersect(Derivative, above)
peak <- read[peak,]
# 数据可视化
plot(c(1, length(data[, 2])), c(1, 1200), type = 'n', xlab = 'pos', ylab =
'depth')
lines(data$V2, data$V4, col = 'grey')
lines(line$x, line$y, col = 'green')
lines(peak[,1], peak[,2], col = 'red')

# 使用 t 检验筛除峰
length(peak[,1])
wholeP <- dpois(x = round(lambda), lambda = lambda)
p <- dpois(x = peak[, 2], lambda = lambda)
test <- t.test(p, mu = wholeP)
peak <- peak[-which(test$p.value < 2.2e-16),]
```

1235

1234



试验结论

- 蛋白质与 DNA 结合有显著偏好性, 读取位点不是随机落在基因组上的。