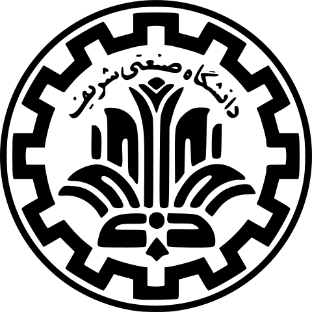
بسم الله الرحمن الرحیم



دانشگاه صنعتی شریف

دانشکده مهندسی کامپیوتر

درس: مقدمه بیوانفورماتیک  
استاد درس: دکتر شریفی، دکتر کوهی

پروژه پایانی: تجربه اولیه در تحلیل داده‌های بیوانفورماتیک

(بررسی داده های سرطان خون)

دانشجو:

محمدحسین موثقی‌نیا

شماره دانشجویی:

400200919

بهمن 1400

**فهرست**

[**1. مقدمه** 3](#_Toc94704167)

[**1-1 تنظیمات و موارد اولیه** 3](#_Toc94704168)

[**2. کنترل کیفیت داده‌ها** 4](#_Toc94704169)

[**1-2. نرمال‌سازی و نمودار جعبه‌ای** 5](#_Toc94704170)

[**3-2. بررسی همبستگی بین نمونه‌ها** 13](#_Toc94704171)

[**1-3-2. بررسی همبستگی بین تمامی نمونه‌ها** 14](#_Toc94704172)

[**2-3-2. بررسی همبستگی بین نمونه‌های سالم** 15](#_Toc94704173)

[**3. بررسی تمایز در بیان ژن‌ها** 17](#_Toc94704174)

[**4. آنالیز Gene ontology و pathway ها** 24](#_Toc94704175)

# **1. مقدمه**

سرطان خون انواع مختلفی دارد، یکی از انواع آن لوسمی حاد میلوئیدی[[1]](#footnote-1) است. در این نوع سرطان، سلول های مغز استخوان یا میلوسیت ها تحت تاثیر فاکتور هایی قرار می گیرند که باعث تولید میلوبلاست (نوعی از گلبول های سفید) و گلبول های قرمز و پلاک های غیر طبیعی (جهش یافته) می شود و تعداد زیادی سلول بیمار تولید می شود و در نتیجه آن فرآیند طبیعی عملکرد سلول های خونی از بین رفته و بدن دچار مشکلات جدی می شود. از جمله نتایج آن ضعف سیستم ایمنی بدن، کم خونی و اختلال انعقاد خون را می توان نام برد[[2]](#footnote-2).

در این تحقیق به بررسی دادگان مربوط ریزآرایه های سلول های بیمار به این گونه سرطان در مقایسه با افراد سالم می پردازیم. در بخش های ابتدایی دادگان را از نظر کیفیت مورد بررسی و اصلاح قرار می دهیم و در ادامه به بررسی ژن های موثر در اینگونه بیماری و بررسی pathway ها و gene ontology مربوط به این ژن هایی که در بیماران افزایش یا کاهش بیان معنی داری داشته اند می پردازیم.

## **1-1 دادگان و ابزارها و روش های مورد استفاده**

به منظور این بررسی از سایت GEO، دادگان شماره سری GSE48558 استفاده شده است. به عنوان ابزار بررسی و تحلیل داده ها از زبان برنامه نویسی R و محیط برنامه نویسی R-Studio استفاده شده است و پکیج های GEOquery ، ggplot2 ، pheatmap ، limma ، gplots مورد استفاده قرار گرفته است. از بین داده های سری مورد نظر، گروهی که source name آن ها AML Patient بوده به عنوان گروه test و گروهی که phenotype آن ها normal بوده است به عنوان گروه normal انتخاب شده اند و دیگر دسته ها مورد بررسی قرار نگرفته است. به منظور بررسی ژن های افزایش و کاهش یافته از دیتابیس های Enrichr استفاده شده است.

## **2-1 تنظیمات و موارد اولیه**

به منظور تحليل داده‌ها ابتدا مي بايست، داده‌ها را دانلود و در دايركتوري مناسب قرار داده و نمونه هاي نرمال و تست را مشخص نمود. براي اين منظور از طريق قطعه كد زير، محل فعلي دايركتوري را به عنوان مرجع مشخص مي كنيم و سپس براساس آن آدرس دهي هاي بعدي را انجام مي دهيم:

curD <- dirname(rstudioapi::getActiveDocumentContext()$path)

setwd(sub(paste0("/",sub("(.+)/","",curD)),"",curD))

سپس مي توان شماره سري داده‌ها و پلتفرم آن‌ها را به صورت مجزا تعيين نمود، البته الزامي به اين كار نيست و مي توان داخل كد دستوري قرار داد، پس از آن مي بايست داده‌ها را در دايركتوري مورد دلخواه خود دانلود نمود:

series <- "GSE48558"

platform <- "GPL6244"

gset <- getGEO(series, GSEMatrix = TRUE, AnnotGPL = TRUE, destdir = 'data/')

براي اين منظور از تابعي در كتابخانه GEOquery به منظور دانلود استفاده مي شود.

پس از آن درصورتي كه داده چندين پلتفرم داشته باشد، صرفا پلتفرم خاص تعيين شده توسط سوال را مي خواهيم. براي اين منظور مي بايست يك فيلتر روي داده صورت پذيرد:

if (length(gset) > 1) idx <- grep(platform, attr(gset, "names")) else idx <- 1

gset <- gset[[idx]]

البته درصورتي كه از داده length گرفته شود و صرفا يك پلتفرم موجود باشد، كافيست همان جايگزين شود و ديگر به عنوان ليستي از پلتفرم‌ها نباشد.

در نهايت مي بايست گروه هاي نرمال و بيمار و غيره را مشخص كنيم و گروه هاي به جز بيمار و نرمال را از داده‌ها حذف كنيم:

gsms <- paste0("1111111111111XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX0XXX0XXXXX",

"XXXXXXXXXXXXXXXXXX0X0XXX0X0000X0XX00XX00X0X0X0X0X0",

"XXX0XXX0XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX0000000110111",

"00000000000000000000")

sml <- strsplit(gsms, split="")[[1]]

### filter by X

sel <- which(sml != "X")

sml <- sml[sel]

gset <- gset[ ,sel]

gs <- factor(sml)

groups <- make.names(c("normal", "test"))

levels(gs) <- groups

gset$group <- gs

از طريق قطعه كد بالا مي توان داده‌ها را دسته بندي كرده و يك ستون جديد به داده‌ها افزود و گروه بندي مورد نظر را در آن گنجاند. (البته گروه هاي غيراز سالم و بيمار، از داده‌ها حذف مي شوند.)

# **2. کنترل کیفیت داده‌ها**

این قسمت شامل موارد زیر می‌باشد که با توجه به تعریف صورت سوال پروژه در قسمت‌های مجزایی بررسی خواهند شد:

* نرمال‌سازی دادها در صورت نیاز، به منظور بررسی صحیح داده‌ها، چرا که در صورت عدم نرمال‌سازی ممکن است در صورت‌اندازه گیری نمونه‌ها با کیت‌های مختلف، تاثیرات محیطی و ... دو نمونه که در واقعیت شباهت زیادی به هم داشته‌اند به دلایل نام برده تفاوت فاحشی با هم پیدا کنند.
* کاهش ابعاد به منظور بررسی پیوستگی و شباهت داد‌های مورد بررسی
* بررسی همبستگی بین نمونه‌ها به جهت اطمینان از مرتبط بودن نمونه‌های جمع آوری شده، می‌باشد.

البته بخش‌های بالا صرفا به منظور بررسی کیفیت داده نمی‌باشد و اطلاعات گسترده دیگری نیز در اختیار قرار می‌دهد که در هر بخش بیشتر بحث خواهد شد.

## **1-2. نرمال‌سازی و نمودار جعبه‌ای**

به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها، یکی از راه‌ها رسم نمودار جعبه‌ای نمونه هاست. درصورتی که نمودار‌های جعبه‌ای حاصل به صورت منظمی در کنار هم و تقریبا مشابه یک دیگر از نظر چارک‌های اول، دوم و سوم باشند؛ می‌توان نتیجه گیری کرد که داده‌ها با هم هماهنگ و نرمال هستند. درغیر این صورت می‌بایست نرمال‌سازی با یکی از روش‌های مناسب، صورت پذیرد. یکی از روش‌های متداول و ساده نرمال‌سازی، نرمال‌سازی گسسته[[3]](#footnote-3) می‌باشد، که به این صورت عمل می‌کند در هر دور اجرای آن ماکسیمم هر سری از داده‌ها را میانگین می‌گیرد و جایگزین تمامی آن‌ها می‌کند و در دور بعدی آن‌ها را در نظر نمی‌گیرد. به این ترتیب داده‌ها در یک طیف یکسان دسته‌بندی می‌شوند. البته روش‌های دیگری که تفاوت داده‌ها را بتواند بهتر پوشش دهد نیز وجود دارد.

داده‌های موجود در این پروژه در صورت رسم نمودار جعبه‌ای نرمال هستند. (شکل 1) به منظور این کار می‌بایست، ابتدا ماتریس بیان ژن‌ها را از داده‌ها به دست آوریم، برای این منظور از طریق قطعه کد زیر این کار را انجام می‌دهیم:

ex <- exprs(gset)

درصورت نیاز به نرمال‌سازی، می‌توان از قطعه کد زیر استفاده نمود:

ex <- normalizeQuantiles(ex)

exprs(gset) <- ex

تابع exprs یک تابع دو طرفه بوده و می‌تواند مقادیر را علاوه بر خروجی گرفتن، مقداردهی نیز انجام دهد. تابع normalizeQuantiles نیز همان نرمال‌سازی گسسته را برای داده‌های بیان ژن انجام می‌دهد.

که البته در داده‌های موجود، با توجه به شکل 1 نیازی به نرمال‌سازی نیست، درصورت اجرای نرمال‌سازی بالا و رسم دوباره نمودار جعبه ای، نمودار حاصل، شکل 2 خواهد بود که کاملا مشخص است که تغییر قابل توجه‌ای رخ نداده است. بنابراین داده‌ها به صورت پیشفرض نرمال بوده‌اند.

سپس به منظور رسم نمودار جعبه‌ای بر اساس ژن‌های بیان شده از طریق قطعه کد زیر اقدام می‌کنیم:

boxplot(ex)

به منظور ساخت بهتر نمودار جعبه‌اي و ايجاد قابليت تفكيك بين نمونه هاي سالم و بيمار، با استفاده از قطعه كد زير مي توان اين تفاوت را ايجاد نمود:

dev.new(width=3+ncol(gset)/6, height=5)

ord <- order(gs)

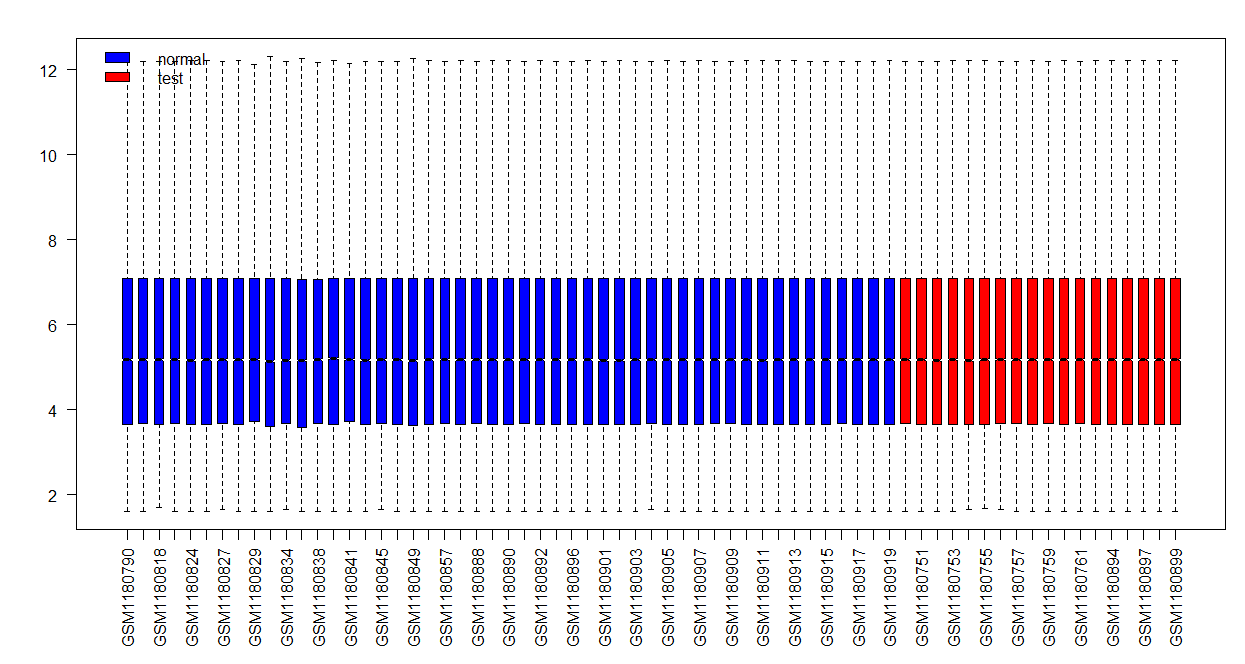
palette(c("blue", "red"))

par(mar=c(7,4,2,1))

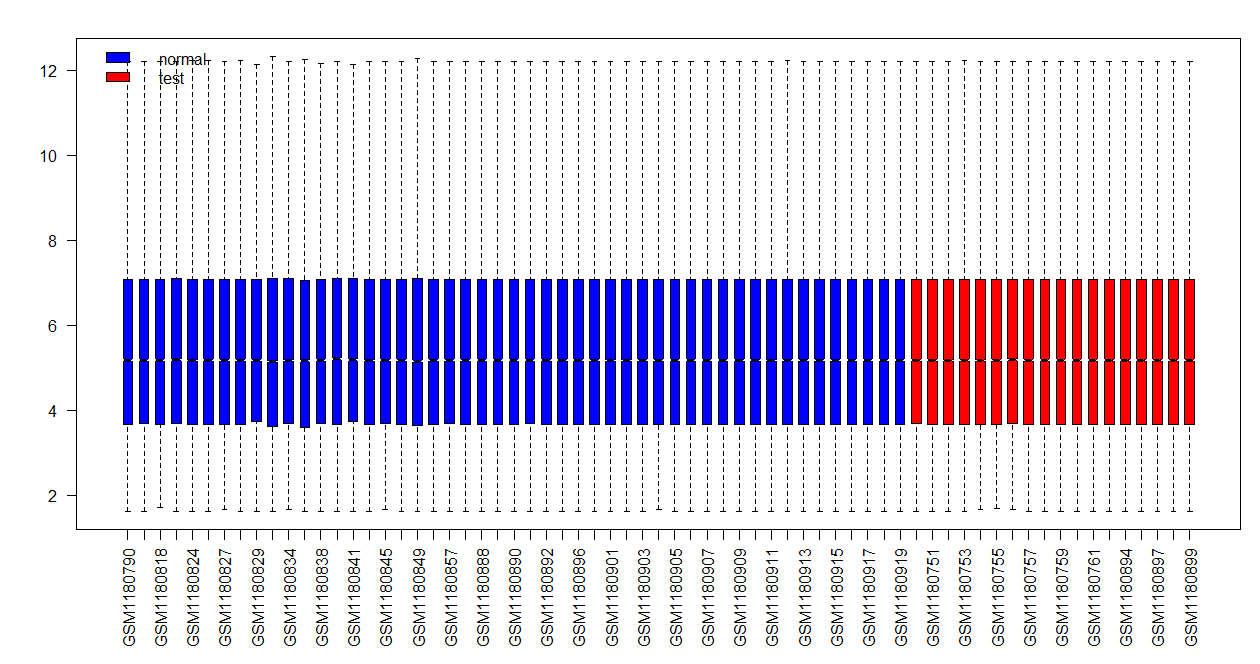
boxplot(ex[,ord], boxwex=0.6, notch=T, outline=FALSE, las=2, col=gs[ord])

legend("topleft", groups, fill=palette(), bty="n")

در كد بالا، ابتدا ابعاد نمودار خروجي مبتني بر نمونه‌ها مشخص مي‌شود، سپس ترتيب نمايش نمونه‌ها بر اساس نرمال به بيمار مرتب مي‌شود و پس از آن رنگ‌بندي نمودار براي جداسازي نرمال از بيار و در نهايت رسم نمودار و تعيين راهنما براي آن (مشخص كردن اين كه هر رنگ مرتبط به كدام نمونه است.)



**شکل 1**- نمودار جعبه‌ای نمونه‌های سالم و بیمار. نمونه‌های بیمار با رنگ قرمز و نمونه‌های سالم با رنگ آبی مشخص شده‌اند. نمودار جعبه‌ای نشان دهنده نرمال بودن داده‌ها و عدم نیاز آن‌ها به نرمال‌سازی است. (به دلیل هماهنگی کامل داده‌ها با هم از نظر چارک اول، میانه و چارک سوم و همچنین ماکسیمم و مینیمم ها.



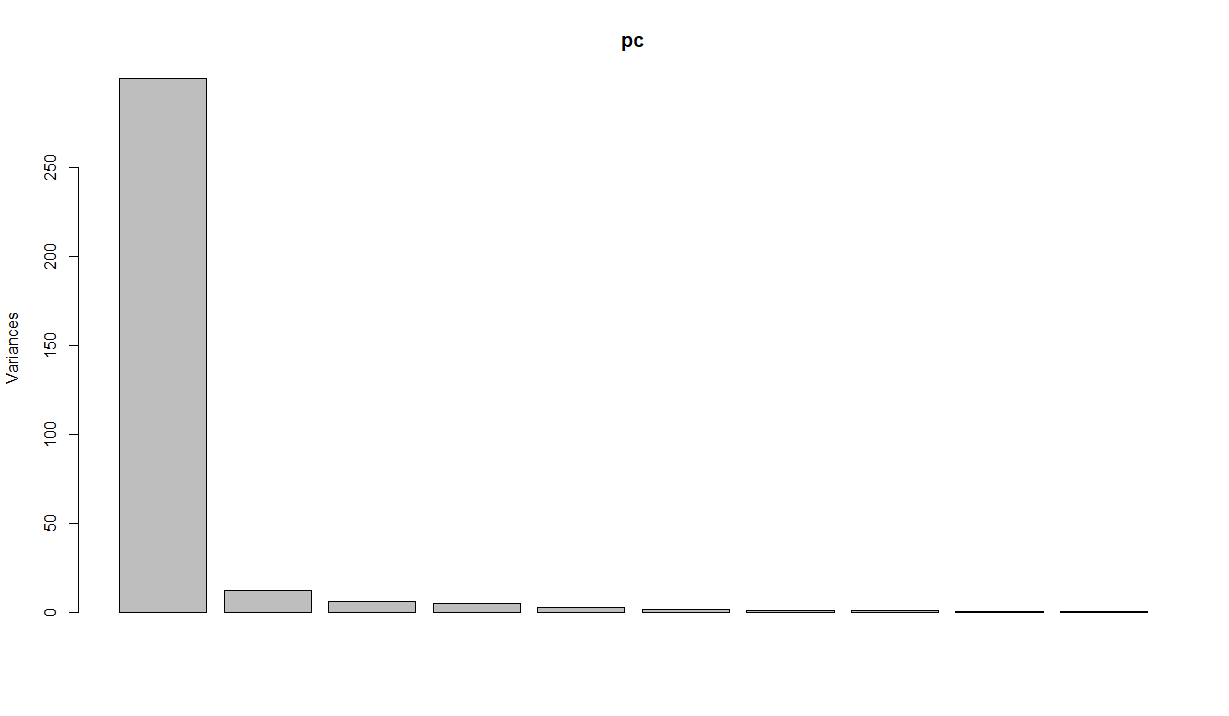
**شکل 2**- نمودار جعبه‌ای نمونه‌های سالم و بیمار. نمونه‌های بیمار با رنگ قرمز و نمونه‌های سالم با رنگ آبی مشخص شده‌اند. نمودار جعبه‌ای پس از اعمال نرمال‌سازی گسسته نشان دهنده این است که داده‌ها قبل از آن نیز نرمال بودنه‌اند چرا که در مقایسه با شکل1 تغییر محسوسی مشاهده نمی‌شود. از طرف دیگر شکل1 خود کاملا مشخص است که نرمال می‌باشد.

**2-2. کاهش ابعاد داده**

به منظور کاهش ابعاد روش‌های مختلفی وجود دارد، یکی از این روش‌ها PCA[[4]](#footnote-4) می‌باشد. در این روش، چندین جهت مختلف برای محور‌های بررسی داده در نظر گرفته می‌شود و در هر کدام از این روش‌ها مقدار تفکیک بین داده‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای این منظور می‌توان از قطعه کد زیر برای بیان ژن‌ها استفاده کرد:

pc <- prcomp(ex)

داخل متغیر pc تمامی جهت‌هایی که می‌تواند داده را تفکیک کند به ترتیب میزان تمایز مرتب شده‌اند و در صورت رسم نمودار آن (شکل3) می‌توان تفاوت‌های میزان تفکیک در هر کدام از این مولفه‌ها را مشاهده کرد. همانگونه که در شکل3 مشخص است میزان تمایز در مولفه اول از همه بیشتر و به ترتیب کاهش می‌یابد.



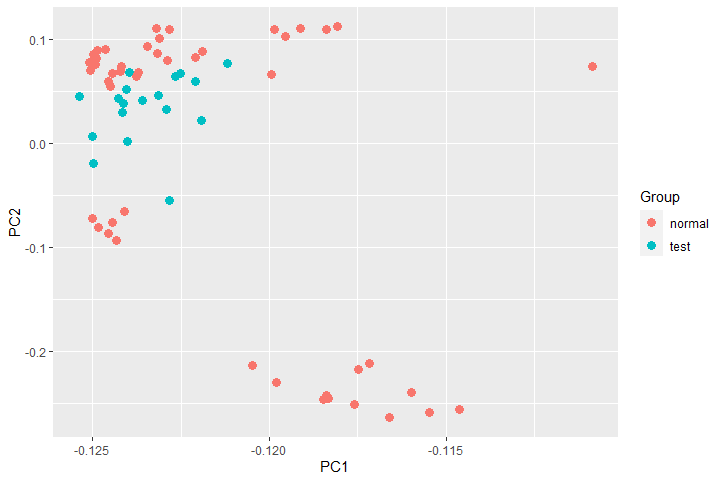
**شکل 3**- بررسی هرکدام از مولفه‌های خروجی تابع prcomp نشان دهنده میزان واریانس (تمایز) ایجاد شده میان ژن‌ها در هرکدام از این مولفه هاست. به ترتیب میزان تمایز از اولین به آخرین مولفه مرتب شده‌است. بنابراین بهترین گزینه برای رسم نمودار کاهش ابعاد مولفه اول و دوم می‌باشد. البته درصورت نیاز به رسم نمودار سه بعدی می‌توان از مولفه سوم نیز کمک گرفت.

درصورت رسم نمودار دو بعدی براساس مولفه اول و دوم که بیشترین تفکیک را ایجاد می‌کنند، مشاهده می‌شود که یک توزیع افقی گسترده برای ژن‌ها وجود دارد.(شکل4) مولفه اول در شکل4 نشان دهده میزان بیان ژن‌های مختلف در نمونه می‌باشد. همانگونه که درصورت رسم PCA برای نمونه‌ها مطابق شکل5، در این نمودار نیز این نمونه‌ها قابل جداسازی از یکدیگر نیستند و این نشان دهنده وجود مشکل در روش تحیلی می‌باشد که باید اصلاح شود. به نوعی این خروجی ارزش زیادی ندارد چرا که هدف یافتن تفاوت بیان هاست، برای رفع این مشکل با تغییر ابعاد داده‌ها تاثیر عدم بیان یا بیان بالای ژن‌ها را از بین برد. برای این منظور بیان ژن‌ها از میانگین بیان خودشان کسر می‌شوند (به عبارت دیگر میانگین بیان تمامی ژن‌ها صفر شوند.) تا اثر بیان دائمی یک ژن یا عدم بیان آن از بین برود و فقط تفاوت‌ها ارزشمند شود و مولفه‌های PCA موارد بهتری را نمایش دهند. برای این منظور از طریق کد زیر این تغییر ابعاد انجام می‌شود:

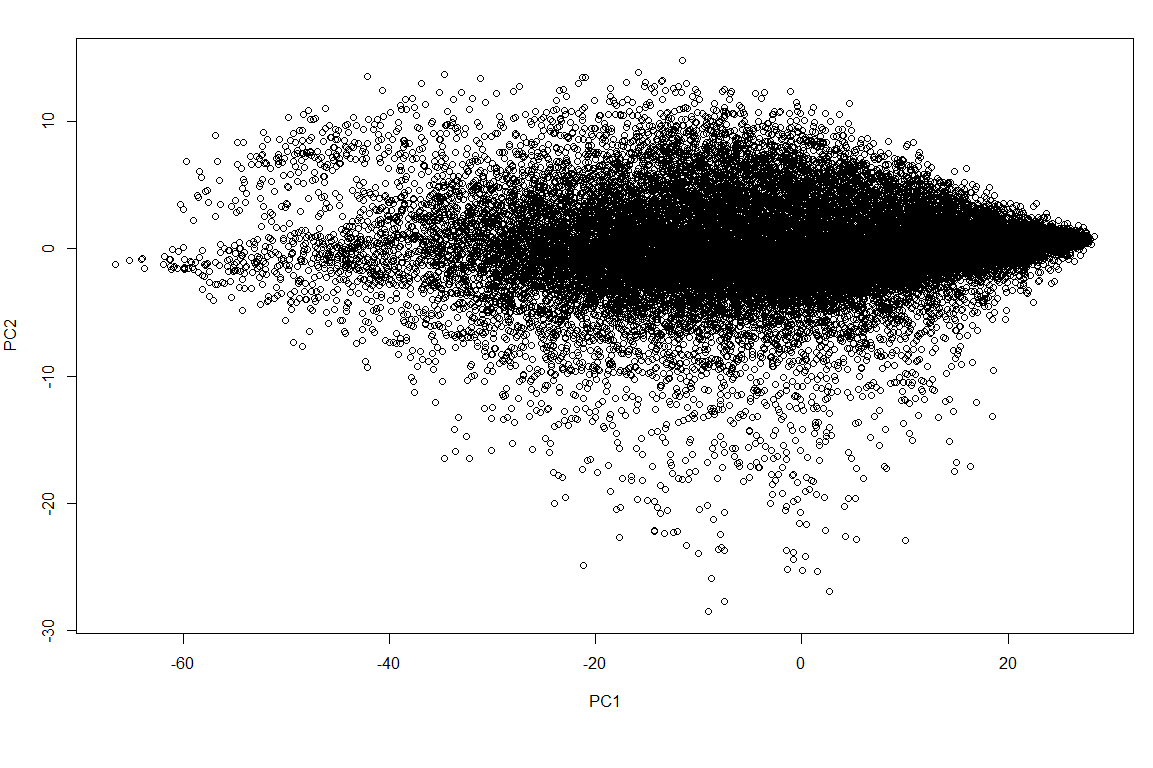
ex.scale <- t(scale(t(ex), scale = F))

به دلیل این که تابع scale ستون‌ها را تغییر ابعاد می‌دهد، می‌بایست ماتریس بیان را ترانهاده کرده و سپس تغییر ابعاد اعمال شود و سپس دوباره به حالت ترانهاده اولیه برگردد. به منظور این که تابع scale به صورت پیشفرض داده‌ها را تقسیم بر انحراف معیار نیز می‌کند، می‌بایست این عملیات را از طریق False کردن متغیر scale در تابع، لغو نمود.

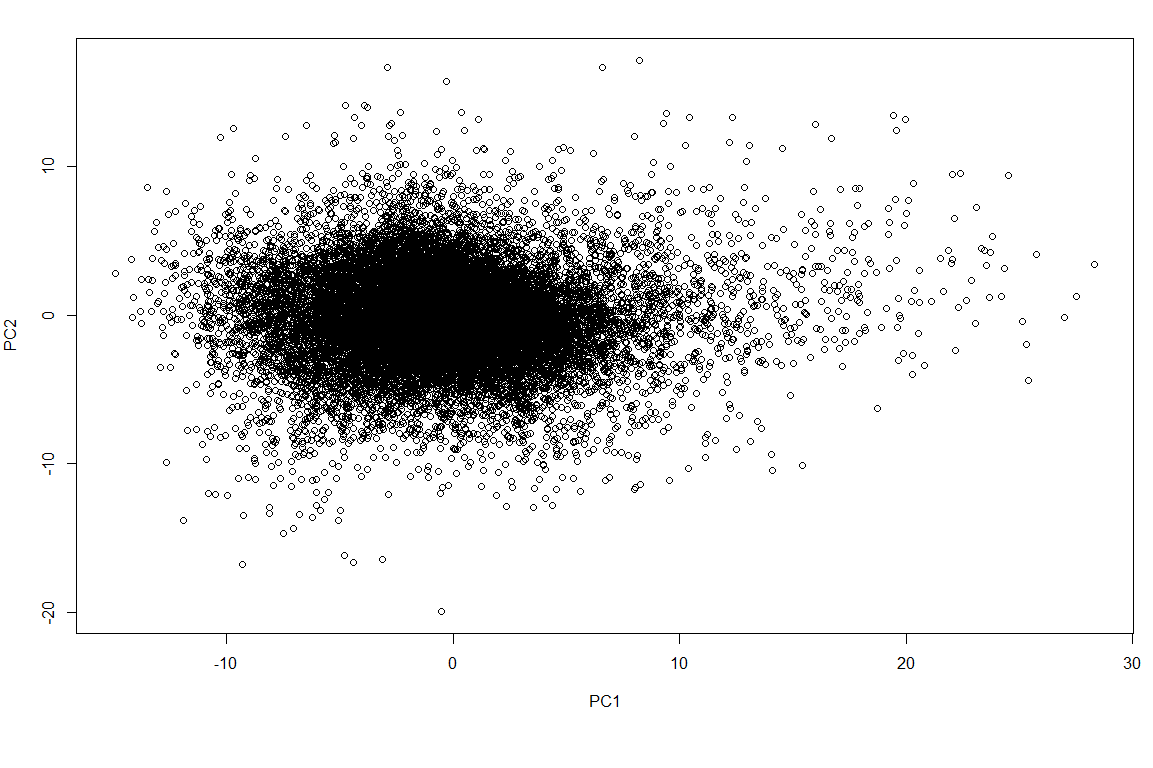
درصورتی که براساس مقادیر جدید، مولفه‌های مختلف روش PCA مورد بررسی قرار داده شود، شکل6 حاصل می‌شود که تمایز‌ها در مولفه‌های مختلف معقول‌تر شده‌اند و از طرفی در صورت رسم نمونه‌ها مطابق شکل7 ، می‌توان نتایج را مشاهده نمود که دیگر مولفه اول به سمت بیان کامل یا عدم بیان کامل گرایش ندارد و داده‌ها به صورت متفاوتی قرار گرفته‌اند. به منظور بررسی نمونه‌ها نیز می‌توان نمودار را مطابق روش قبلی برای نمونه‌ها رسم کرد (شکل8) به این ترتیب می‌توان مشاهده کرد که نمونه‌های مختلف تقریبا در کلاستر‌های مختلفی قابل جداسازی از یکدیگر هستند و مولفه اول و دوم روش PCA پس از اعمال تغییر ابعاد داده ها، به خوبی توانسته است تمایز میان آن‌ها را نمایش دهد. البته بعضی از نمونه‌های سرطانی شباهت زیادی به نمونه‌های سالم دارند ولی با این حال اکثر آن‌ها قابل تمایز هستند.



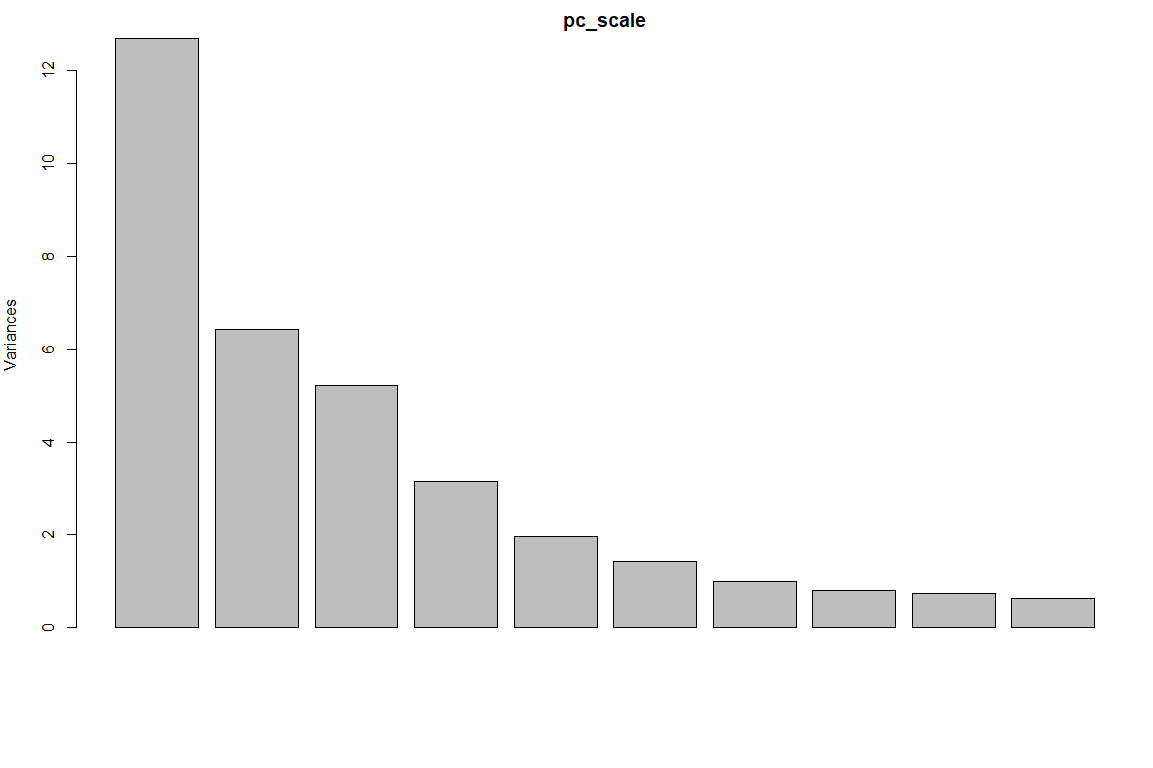
**شکل 5** - تفاوت نمونه‌ها مبتنی بر مولفه‌های اول و دوم به دست آمده از روش PCA، پیش از اعمال تغییر ابعاد.



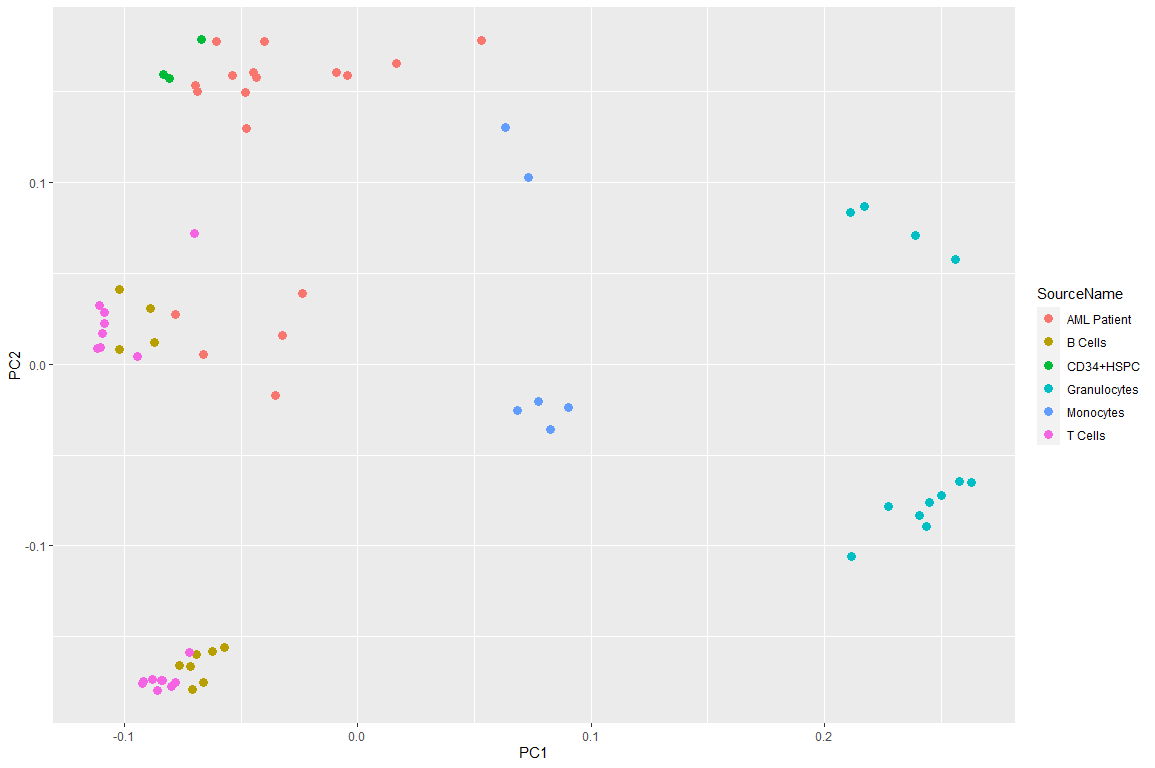
**شکل 4**- رسم داده‌ها مبتنی بر مولفه اول و دوم روش PCA. همانطور که در نمودار مشخص است تفاوت‌های موجود در مولفه اول به نوعی صرفا نشان می‌دهد که بعضی از ژن‌ها خیلی کم بیان شده‌اند یا اصلا بیان نشده‌اند و در مقابل بعضی دیگر بسیار زیاد بیان شده‌اند. این به نوعی داده‌ای ناکارآمد محسوب می‌شود.



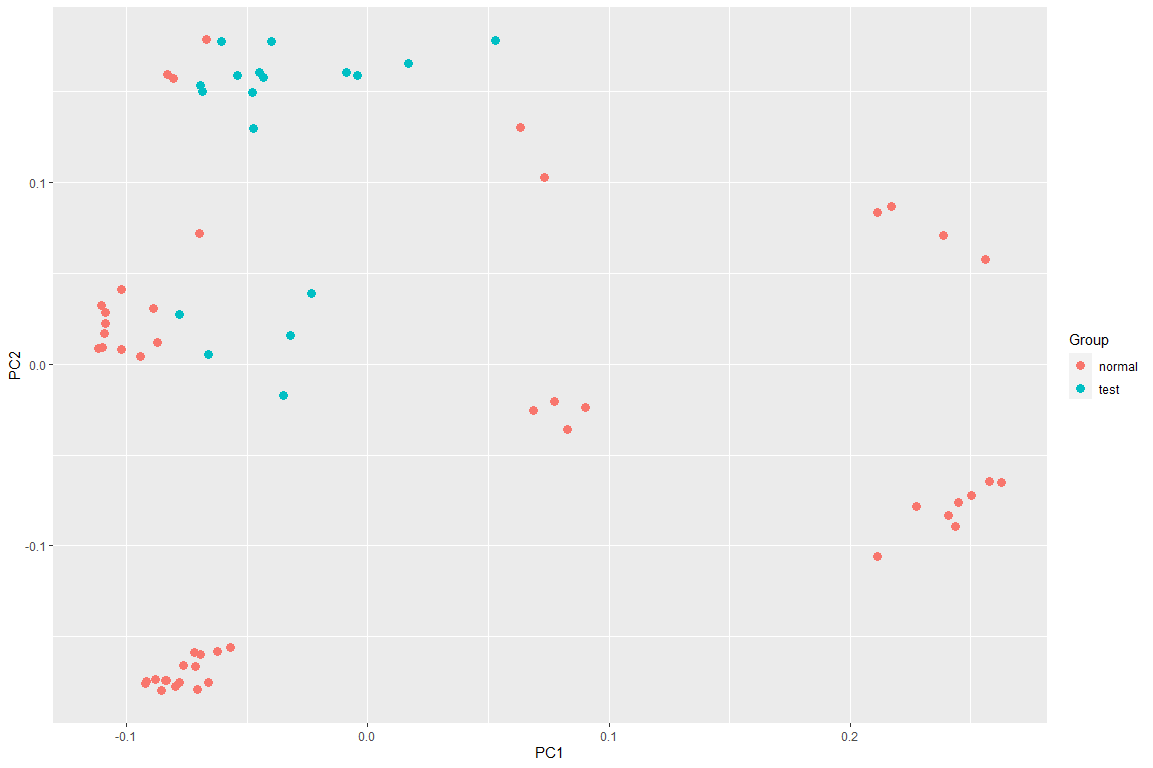
**شکل 7**- تفاوت بیان ژن‌های مختلف نمونه‌ها مبتنی بر مولفه اول و دوم روش PCA پس از تغییر ابعاد داده. همانگونه که در شکل مشهود است، با تغییر ابعاد داده و از بین بردن تاثیر بیان ژن‌ها و یا عدم بیان آن‌ها در اکثر نمونه ها، می‌توان به خروجی بهتری مبتنی بر تفاوت بیان ژن‌ها دست یافت.



**شکل 6**- مولفه‌های مختلف به دست آمده مبتنی بر روش PCA پس از اعمال تغییر ابعاد. همانگونه که مشخص است دیگر تفاوت فاحش میان مولفه اول و دیگر مولفه‌ها نیست و با اعمال تغییر ابعاد، امکان این فراهم شد تا تاثیر بسیار بزرگی که ژن‌هایی که در تمامی نمونه‌ها بیان شده بودند و همچنین ژن‌هایی که اصلا بیان نشده بودند از بین برود و این روش بتواند تمایز بهتری متناسب با تفاوت بیان ژن‌ها ارائه بکند.



**شکل 9**- تفاوت نمونه‌ها مبتنی بر مولفه‌های اول و دوم به دست آمده از روش PCA، پس از اعمال تغییر ابعاد نمایش داده شده بر اساس دسته های source name.



**شکل 8**- تفاوت نمونه‌ها مبتنی بر مولفه‌های اول و دوم به دست آمده از روش PCA، پس از اعمال تغییر ابعاد نمایش داده شده بر اساس دسته های سالم(normal) و بیمار(test).

همانگونه که در شکل9 مشخص است نمونه های هر دسته از سلول ها تقریبا پراکندگی نزدیک به هم دارند و این نشان دهنده شباهت بین هرکدام از گونه هاست و تاییدی بر کیفیت مناسب نمونه ها می باشد، چرا که درصورتی که این پراکندگی زیاد می بود، نمی توانست به شکل مناسبی در ادامه به منظور بررسی تمایز ژن های بیان شده در نمونه های سالم و سرطانی مورد استفاده قرار گیرد.

به منظور رسم نمودار‌های 3 و 6 قطعه کد زیر مورد استفاده قرار می‌گیرد:

plot(pc)

به منظور رسم نمودار‌های 4 و 7 قطعه کد زیر مورد استفاده قرار می‌گیرد:

plot(pc$x[,1:2])

در قطعه کد بالا، x نشان دهنده ژن‌ها می‌باشد که بر اساس 2 مولفه اول برای رسم ارسال شده‌است.

به منظور رسم نمودار‌های 5 و 8 و 9 از کتابخانه ggplot2 استفاده شده‌است و قطعه کد زیر مورد استفاده قرار گرفته‌است (البته برای نمودار 9 به منظور نمایش نام هر نمونه، به جای گروه از source name نمونه ها استفاده شده است.):

pcr <- data.frame(pc$r[,1:3], Group = gset$group)

ggplot(pcr, aes(PC1, PC2, color=Group)) + geom\_point(size=3)

در قطعه کد بالا، مبتنی بر rotation در pc که همان نمونه‌های مختلف هستند، یک دیتافریم به همراه گروه‌های آن‌ها ساخته شده‌است و سپس به ggplot داده شده تا مبتنی بر مولفه اول و دوم و همچنین رنگ‌بندی براساس گروه ها، نمودار را رسم نماید.

## **3-2. بررسی همبستگی بین نمونه‌ها**

بررسی همبستگی دو به دو نمونه‌ها با یکدیگر با هدف یافتن میزان ارتباط بین نمونه‌های مختلف با یکدیگر می‌باشد. برای این منظور می‌توان از Heatmap استفاده نمود. با توجه به تغییر ابعاد انجام شده در بخش قبل، مبتنی بر خروجی‌های آن اقدام به رسم Heatmap می‌شود. ابتدا ماتریس همبستگی دو به دو برای نمونه‌ها مشخص می‌شود. سپس Heatmap براساس این همبستگی رسم می‌شود.

### **1-3-2. بررسی همبستگی بین تمامی نمونه‌ها**

مطابق کد پایین، ابتدا همبستگی نمونه‌ها محاسبه شده و سپس با استفاده از کتاب‌خانه pheatmap اقدام به رسم Heatmap مبتنی بر همبستگی نمونه‌ها می‌شود. رنگ‌بندی نمودار به صورت آبی و قرمز بوده و نامگذاری براساس source\_name نمونه هاست. نتیجه این نمودار در شکل9 قابل مشاهده است.

ex.scale.cor <- cor(ex.scale)

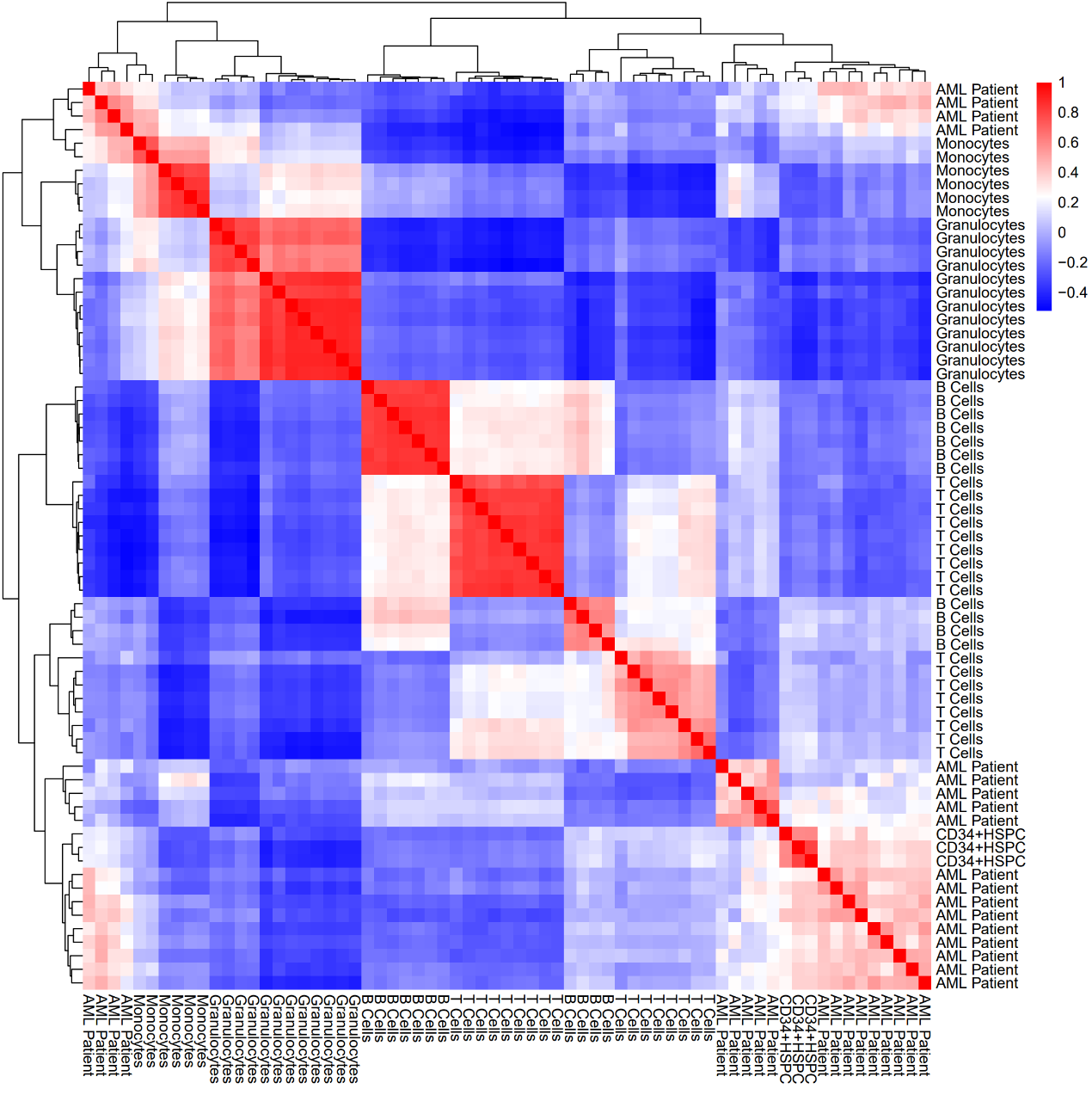
pheatmap(ex.scale.cor,

labels\_row = gset$source\_name\_ch1,

labels\_col = gset$source\_name\_ch1,

color = bluered(255), border\_color = NA)

به منظور نمایش بهتر خروجی، Heatmap خروجی در فایل heatmap-all.pdf در دایرکتوری results ذخیره شده‌است. همانگونه که در شکل9 مشخص است میزان همبستگی در نمونه‌های AML Patient و نمونه‌های سالم، به صورت کلی چهار نمونه AML Patient و 6 نمونه Monocytes و 12 نمونه Granulocytes از دیگر نمونه‌ها مجزا هستند و همبستگی کمتری به دیگر اعضا دارد، از طرفی در بین این گروه ارتباط AML Patient با یک دیگر نسبتا بالاست و همچنین ارتباط بعضی از Monocytes‌ها با یکدیگر بسیار بالاست و همچنین از بین Granulocytes‌ها بعضی ارتباط بالایی با یکدیگر دارند. در مقابل در دسته پایین، ارتباط T Cell‌ ها با خودشان و B Cell‌ ها با خودشان بسیار زیاد است و همچنین ارتباط AML Patient ‌ها با خودشان و همچنین CD34+HSPC ها. به صورت کلی این ارتباطات بالا و در نقطه مقابل عدم ارتباط با دیگر سلول ها، نشان دهنده نمونه برداری مناسب و هماهنگ بودن نمونه‌ها با یکدیگر است که این موضوع به نوعی جزئی از کنترل کیفیت داده‌ها محسوب می‌شود.



**شکل 10**- بررسی میزان همبستگی تمامی نمونه‌ها با یکدیگر از طریق Heatmap.

### **2-3-2. بررسی همبستگی بین نمونه‌های سالم**

به منظور بررسی همبستگی صرفا بین نمونه های سالم می بایست، از ماتریس بیان، تمامی نمونه های AML Patient را حذف نمود. برای این منظور از طریق قطعه کد زیر اقدام می شود:

df <- data.frame(ex.scale.cor)

a <- t(df)

colnames(a) <- gset$source\_name\_ch1

a <- t(a)

colnames(a) <- gset$source\_name\_ch1

cols <- gset$source\_name\_ch1

cols <- cols[cols != "AML Patient"]

b <- subset(a, select=cols)

b <- t(b)

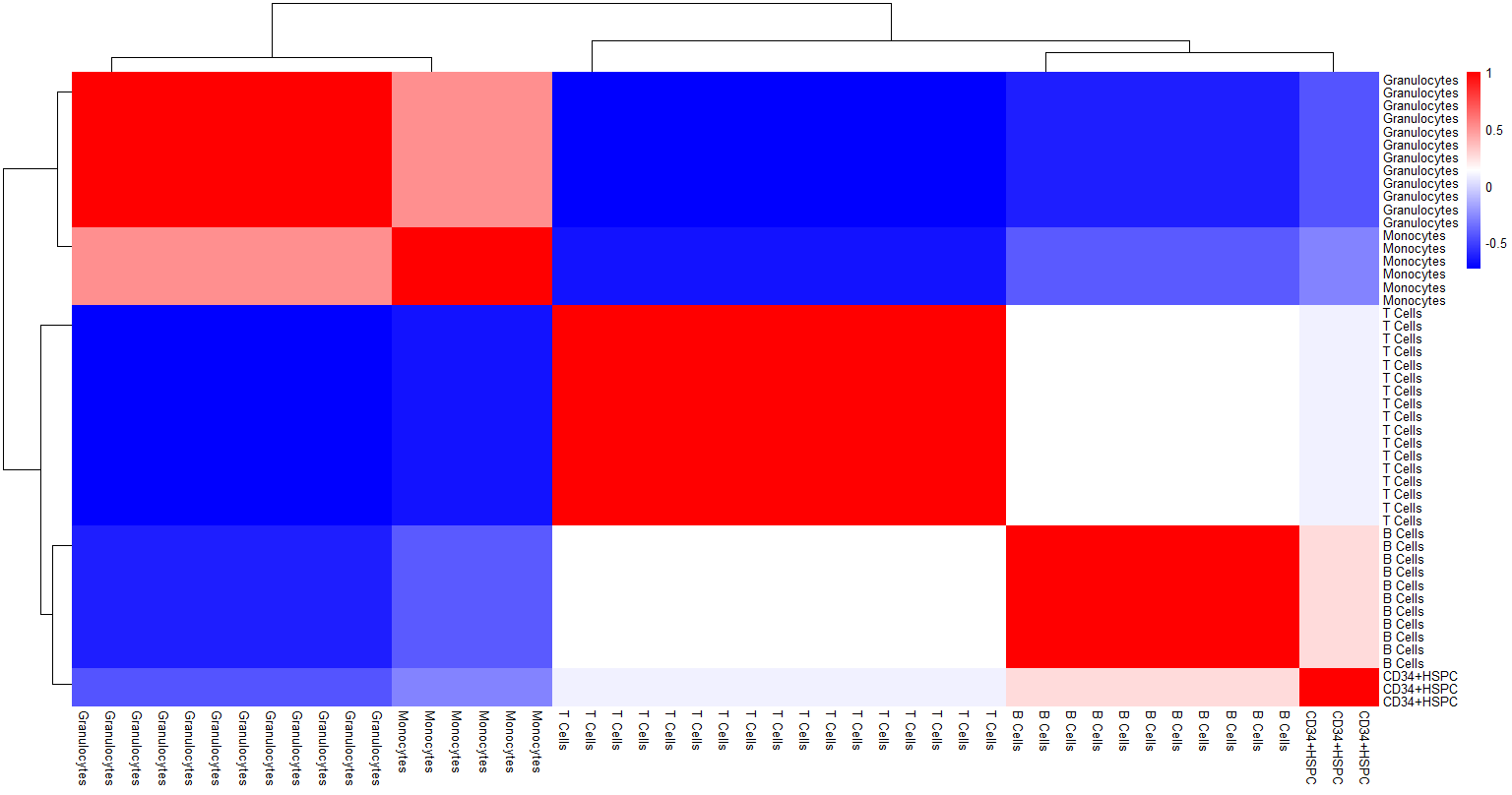
cols <- gset$source\_name\_ch1

cols <- cols[cols != "AML Patient"]

b <- subset(b, select=cols)

b <- t(b)

از طریق قطعه کد بالا با دوبار ترانهاده کردن ماتریس بیان، تمامی نمونه های AML Patient حذف شده و صرفا نمونه های نرمال در ماتریس b ذخیره می شوند. سپس کافیست همانگونه که در حالت کلی نمودار heatmap رسم شد، در این جا نیز برای نمونه های موجود در ماتریس b، همبستگی محاسبه شده و سپس نمودار رسم شود. نمودار خروجی در شکل11 قابل مشاهده است. قطعه کد اجرای محاسبه همبستگی و رسم نمودار در ادامه آمده است.



**شکل 11** - بررسی میزان همبستگی نمونه های سالم با یکدیگر از طریق Heatmap.

b.cor <- cor(b)

pheatmap(b.cor, color = bluered(255), border\_color = NA)

به منظور بررسی بهتر شکل11 نمودار به صورت دقیق تری در فایل heatmap-normal.pdf موجود می‌باشد. همانگونه که در شکل11 مشخص است، میزان همبستگی بین نمونه های Granulocytes و نمونه های Monocytes بسیار زیاد است و همچنین میزان همبستگی نمونه های B Cells و CD34+HSPC نیز بسیار زیاد است. همچنین بین گونه های T Cells و B Cells با گونه های Granulocytes و Monocytes همبستگی منفی جدی ای وجود دارد که در نمودار هم کاملا مشخص است، البته این هبستگی منفی به میزان همبستگی مثبت گونه ها با یکدیگر و با خودشان نیست.

نکته قابل توجه در شکل11 که به کنترل کیفیت داده ها مربوط می شود، این است که میزان ارتباط بین نمونه های مختلف هر سلول با یکدیگر بسیار بالاست و این نشان دهنده کیفیت بسیار خوب داده هاست که گونه ها از هم مجزا نیستند.

# **3. بررسی تمایز در بیان ژن‌ها**

به منظور یافتن سلول‌های سالمی که همبستگی بیشتری با سلول‌های بیمار دارند، می‌بایست ماتریس نام سطر‌ها و ستون‌های ماتریس بیان را به نام‌های کلی سلول‌ها (Source Name آن ها) تغییر داد و سپس از ستون‌ها تمامی AML Patient‌ها را حذف نمود و همچنین از سطر‌ها به جز AML Patient تمامی دیگر سلول‌ها را حذف نمود. در این حالت در سطر‌ها فقط AML Patient باقی می‌ماند و در ستون‌ها دیگر سلول‌ها و از این طریق با ماکسیمم گیری سطر‌ها می‌توان بیشترین همبستگی‌ها را معین نمود و مرتب کرد. با توجه به توضیحات بالا، کد مد نظر برای اجرای این عملیات به شرح زیر است:

df <- data.frame(ex.scale.cor)

a <- t(df)

colnames(a) <- gset$source\_name\_ch1

a <- t(a)

colnames(a) <- gset$source\_name\_ch1

cols <- gset$source\_name\_ch1

cols <- cols[cols != "AML Patient"]

b <- subset(a, select=cols)

b <- t(b)

cols <- gset$source\_name\_ch1

cols <- cols[cols == "AML Patient"]

b <- subset(b, select=cols)

b <- t(b)

bB <- b

maxCor <- data.frame(Genes = unique(colnames(bB)[max.col(bB,ties.method="first")]),

CorWithAML = unique(rowMax(bB)))

for (x in 1:4) {

cols <- colnames(bB)

cols <- cols[cols != maxCor[[1]][x]]

bB <- subset(bB, select=cols)

maxCor <- rbind(maxCor, c(gene = unique(colnames(bB)[max.col(bB,ties.method="first")]),

cor = unique(rowMax(bB))))

}

پس از اجرای کد بالا، خروجی یک جدول خواهد بود که بر اساس نام سلول‌ها و میزان همبستگی آن‌ها با AML Patient مرتب‌سازی شده‌است. خروجی جدول1 قابل مشاهده است.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | نوع سلول | میزان همبستگی با AML Patient (عدد بین -1 تا 1) |
| 1 | Monocytes | 0.31974 |
| 2 | CD34+HSPC | 0.19717 |
| 3 | B Cells | 0.02744 |
| 4 | Granulocytes | 0.02437- |
| 5 | T Cells | 0.06474- |

**جدول 1**- مرتب‌سازی میزان همبستگی هرکدام از سلول‌ها با AML Patient. میزان همبستگی بین -1 تا 1 می‌باشد و هرچه به 1 نزدیک تر باشد نشان دهنده همبستگی بیشتر است.

به منظور بررسی میزان تمایز بیان ژن‌ها ابتدا می‌بایست داده‌ها را مشخص کنیم که از کدام گروه هستند و سپس یک مدل خطی به آن‌ها فیت کنیم. این مدل خطی با استفاده از پکیج limma می‌باشد و بسیاری از تفاوت‌ها بین نمونه‌ها را مشخص می‌کند. پس از آن باید مشخص شود که تصمیم بر این است که تفاوت میان کدام گروه‌ها به دست آید و در نهایت یک مدل بیز با prior برابر با 0.01 به آن نسبت می‌دهد. براساس خروجی‌های این مدل، جدول میزان تمایز بیان ژن‌ها براساس آماره B که مبتنی بر مدل‌های فیت شده از طریق پکیج limma به دست می‌آید مرتب‌سازی می‌کند. همچنین برای بررسی عدم اتفاق افتادن خطا‌های نوع اول و دوم، از روش بنجامینی هاچبرگ[[5]](#footnote-5) استفاده می‌شود. جدول خروجی با توجه به داده‌های اولیه ای که وجود دارد شامل ستون‌های متعددی است که انواع کد‌های ژن و توضیحات آن را شامل می‌شود. به منظور ساده سازی جدول، صرفا بعضی از این پارامتر‌ها نگهداری می‌شود تا جدول ساده شود و سپس آن‌ها در یک فایل ذخیره سازی می‌شوند.

پس از این می‌بایست ژن‌هایی که در نمونه اولیه نسبت به نمونه دوم بیان بالایی داشته و همچنین به صورت عکس در نمونه دوم نسبت به نمونه اول بیان بالایی داشته‌است را به دست آورد. برای این منظور با توجه به حد تفاوت معنی دار 0.05 که برای adj.P.Val در نظر گرفته می‌شود، علاوه بر این می‌بایست محدودیت دیگری روی logFC گذاشته شود تا این تفاوت را پوشش دهد یعنی بالاتر بودن بیان ویا پایین تر بودن بیان در نقطه مقابل، که برای این حد نیز عدد 1 و در نقطه مقابل عدد -1 در نظر گرفته شده‌است. مقدار logFC نسبت لگاریتمی سرطانی به سالم می باشد که در صورتی که بیشتر از 1 باشد به این معنی است که بیان آن ژن در نمونه سرطانی بیشتر بوده است و در نقطه مقابل در صورتی که کم تر از -1 باشد به این معنی است که در نمونه سرطانی بیان کم تری داشته است و به ترتیب هر کدام از این موارد در دسته افزایش و کاهش بیان قرار می گیرند. به صورت کلی برای ژن‌هایی که در نمونه AML Patient بیان بیشتری دارند اصطلاح up را به کار می‌بریم و برای ژن‌هایی که کاهش بیان دارند down را به کار می‌بریم. این دو گونه ژن، عامل‌های اصلی ایجاد بیماری خواهند بود که در قسمت‌های بعد مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

با توجه به جدول1، با سه مدل مختلف عملیات بالا انجام شده‌است تا خروجی‌های مختلف را مقایسه کنیم. ابتدا بین کلیه مدل‌های test یعنی AML Patient و تمامی مدل‌های سالم بررسی صورت گرفته‌است و ژن‌هایی که بیان بالا یا پایینی داشته اند، به دست آمده‌ است. سپس به ترتیب بین AML Patient و Monocytes و سپس بین AML Patient و CD34+HSPC مقایسه صورت گرفته‌است و در هر دسته ژن های دارای افزایش بیان و کاهش بیان مشخص شده اند.

برای مقایسه کلی بین سلول‌های بیمار و سالم:

##### based on all test-normal #####

design <- model.matrix(~group + 0, gset)

colnames(design) <- levels(gs)

## fitting linear model to data

fit <- lmFit(gset, design)

cont.matrix <- makeContrasts(test-normal, levels=design)

fit2 <- contrasts.fit(fit, cont.matrix)

fit2 <- eBayes(fit2, 0.01)

## adjust by: false-discovery-rate or Benjamini-Hochberg

## sort by adj.P.Val

tT <- topTable(fit2, adjust="fdr", sort.by="B", number=Inf)

tT <- subset(tT, select=c("Gene.symbol","Gene.ID","adj.P.Val","logFC", "B"))

write.table(tT, "result/dea/dea\_test-normal\_B.txt", row.names=F, sep="\t", quote=F)

### Top Gene Expression mining

aml.up <- subset(tT, logFC > 1 & adj.P.Val < 0.05)

aml.up.genes <- unique(as.character(strsplit2(unique(aml.up$Gene.symbol), "///")))

write.table(aml.up.genes, "result/dea/dea\_test-normal\_Up.txt",

quote=F, row.names=F, col.names=F)

aml.down <- subset(tT, logFC < -1 & adj.P.Val < 0.05)

aml.down.genes <- unique(as.character(strsplit2(unique(aml.down$Gene.symbol), "///")))

write.table(aml.down.genes, "result/dea/dea\_test-normal\_Down.txt",

quote=F, row.names=F, col.names=F)

برای مقایسه بین نمونه‌های بیمار و به صورت مجزا با هر نوع سلول، که برای دو نوع Monocytes و CD34+HSPC که میزان همبستگی بیشتری با نمونه‌های بیمار داشتند، صورت گرفته‌است:

##### based on top correlated cells #####

design <- model.matrix(~source\_name\_ch1 + 0, gset)

sfl <- factor(sname.gs)

colnames(design) <- levels(sfl)

## fitting linear model to data

fit <- lmFit(gset, design)

###### AMLPatient-Monocytes ######

cont.matrix <- makeContrasts(AMLPatient-Monocytes, levels=design)

fit2 <- contrasts.fit(fit, cont.matrix)

fit2 <- eBayes(fit2, 0.01)

## adjust by: false-discovery-rate or Benjamini-Hochberg

## sort by adj.P.Val

tT <- topTable(fit2, adjust="fdr", sort.by="B", number=Inf)

tT <- subset(tT, select=c("Gene.symbol", "Gene.ID","adj.P.Val","logFC", "B"))

write.table(tT, "result/dea/dea\_AMLPatient-Monocytes\_B.txt",

row.names=F, sep="\t", quote=F)

### Top Gene Expression mining

aml.up <- subset(tT, logFC > 1 & adj.P.Val < 0.05)

aml.up.genes <- unique(as.character(strsplit2(unique(aml.up$Gene.symbol), "///")))

write.table(aml.up.genes, "result/dea/dea\_AMLPatient-Monocytes\_Up.txt",

quote=F, row.names=F, col.names=F)

aml.down <- subset(tT, logFC < -1 & adj.P.Val < 0.05)

aml.down.genes <- unique(as.character(strsplit2(unique(aml.down$Gene.symbol), "///")))

write.table(aml.down.genes, "result/dea/dea\_AMLPatient-Monocytes\_Down.txt",

quote=F, row.names=F, col.names=F)

###### AMLPatient-CD34+HSPC ######

cont.matrix <- makeContrasts(AMLPatient-CD34pHSPC, levels=design)

fit2 <- contrasts.fit(fit, cont.matrix)

fit2 <- eBayes(fit2, 0.01)

## adjust by: false-discovery-rate or Benjamini-hochberg

## sort by adj.P.Val

tT <- topTable(fit2, adjust="fdr", sort.by="B", number=Inf)

tT <- subset(tT, select=c("Gene.symbol", "Gene.ID","adj.P.Val","logFC", "B"))

write.table(tT, "result/dea/dea\_AMLPatient-CD34pHSPC\_B.txt",

row.names=F, sep="\t", quote=F)

### Top Gene Expression mining

aml.up <- subset(tT, logFC > 1 & adj.P.Val < 0.05)

aml.up.genes <- unique(as.character(strsplit2(unique(aml.up$Gene.symbol), "///")))

write.table(aml.up.genes, "result/dea/dea\_AMLPatient-CD34pHSPC\_Up.txt",

quote=F, row.names=F, col.names=F)

aml.down <- subset(tT, logFC < -1 & adj.P.Val < 0.05)

aml.down.genes <- unique(as.character(strsplit2(unique(aml.down$Gene.symbol), "///")))

write.table(aml.down.genes, "result/dea/dea\_AMLPatient-CD34pHSPC\_Down.txt",

quote=F, row.names=F, col.names=F)

هرکدام از ژن هایی که افزایش یا کاهش بیان داشته اند در فایل های مجزا در دایرکتوری result/dea/ ذخیره شده است؛ همچنین به صورت یکپارچه ژن های هر دسته در فایل DifferentialExpressionAnalysis.xlsx قابل مشاهده است.

# **4. آنالیز Gene ontology و pathway ها**

به منظور ب

### **1-4. بررسی pathway ها**

### **3-1-4. بررسی pathway ها**

1. AML: Acute myeloid leukemia [↑](#footnote-ref-1)
2. https://en.wikipedia.org/wiki/Acute\_myeloid\_leukemia [↑](#footnote-ref-2)
3. Q[uantile Normalization](https://www.biostars.org/p/296992/) [↑](#footnote-ref-3)
4. PCA: Principal Component Analysis [↑](#footnote-ref-4)
5. Benjamini-hochberg [↑](#footnote-ref-5)