

Jupyter Notebook für die Analyse von Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip-Daten in R

Die ChIP Analysis Methylation Pipeline (ChAMP)

Nachdem der Lab-Part der Methylierungsanalyse abgeschlossen ist, erhalten wir als Bioinformatiker*innen Datensätze zusammengesetzt aus einem Samplesheet und mehreren .idat Files, die Fluoreszenzsignale enthalten. Um diese Fluoreszenzsignale (binäres Dateiformat) auslesen und mit dem Samplesheet verknüpfen zu können, greifen wir auf bereits existierende Software zurück. In diesem Fall analysieren wir unsere Daten mit der ChIP Analysis Methylation Pipeline (ChAMP). Diese Pipeline basiert auf R und kombiniert bekannte Software für verschiedene Parts der Methylierungsanalyse (minfi, combat, bumphunter), um eine umfassende Pipeline zur Verfügung zu stellen.

ChAMP unterscheidet bei fast allen Funktionen zwischen drei Typen von Methylierungsarrays, da Illumina über die Jahre verschiedene Arrayversionen veröffentlicht hat. Die älteren Versionen sind 450k- und EPICv1-Arrays, die sich hauptsächlich in der Menge der enthaltenen CpGs unterscheiden. Dieses Notebook ist darauf ausgelegt, die Analyse von EPICv2-Arrays (die aktuellste Version) zu zeigen.

Die hier durchgeführten Schritte umfassen:

1. Einlesen und Filtern der Daten
2. Normalisierung der Methylierungslevel
3. Überprüfung auf und Entfernen von Batch-Effekten
4. Vergleich der Methylierung zwischen Zellproben

Import aller nötigen R Pakete

```
In [1]: # import all needed R packages
library(ChAMP)
library(ChAMPdata)
library(ggplot2)
library(stringr)
library(ggpubr)
```

```
Lade nötiges Paket: minfi  
Lade nötiges Paket: BiocGenerics  
Lade nötiges Paket: generics  
  
Attache Paket: 'generics'  
  
Die folgenden Objekte sind maskiert von 'package:base':  
as.difftime, as.factor, as.ordered, intersect, is.element, setdiff,  
setequal, union  
  
  
Attache Paket: 'BiocGenerics'  
  
Die folgenden Objekte sind maskiert von 'package:stats':  
IQR, mad, sd, var, xtabs  
  
Die folgenden Objekte sind maskiert von 'package:base':  
anyDuplicated, aperm, append, as.data.frame, basename, cbind,  
colnames, dirname, do.call, duplicated, eval, evalq, Filter, Find,  
get, grep, grepl, is.unsorted, lapply, Map, mapply, match, mget,  
order, paste, pmax, pmax.int, pmin, pmin.int, Position, rank,  
rbind, Reduce, rownames, sapply, saveRDS, table, tapply, unique,  
unsplit, which.max, which.min  
  
  
Lade nötiges Paket: GenomicRanges  
Lade nötiges Paket: stats4  
Lade nötiges Paket: S4Vectors  
  
Attache Paket: 'S4Vectors'  
  
Das folgende Objekt ist maskiert 'package:utils':  
findMatches  
  
Die folgenden Objekte sind maskiert von 'package:base':  
expand.grid, I, unname  
  
Lade nötiges Paket: IRanges
```

```
Lade nötiges Paket: GenomeInfoDb  
Lade nötiges Paket: SummarizedExperiment  
Lade nötiges Paket: MatrixGenerics  
Lade nötiges Paket: matrixStats
```

```
Attache Paket: 'MatrixGenerics'
```

```
Die folgenden Objekte sind maskiert von 'package:matrixStats':
```

```
colAlls, colAnyNAs, colAnys, colAvgsPerRowSet, colCollapse,  
colCounts, colCummaxs, colCummins, colCumprods, colCumsums,  
colDiffs, colIQRDiffs, colIQRs, colLogSumExps, colMadDiffs,  
colMads, colMaxs, colMeans2, colMedians, colMins, colOrderStats,  
colProds, colQuantiles, colRanges, colRanks, colSdDiffs, colSds,  
colSums2, colTabulates, colVarDiffs, colVars, colWeightedMads,  
colWeightedMeans, colWeightedMedians, colWeightedSds,  
colWeightedVars, rowAlls, rowAnyNAs, rowAnys, rowAvgsPerColSet,  
rowCollapse, rowCounts, rowCummaxs, rowCummins, rowCumprods,  
rowCumsums, rowDiffs, rowIQRDiffs, rowIQRs, rowLogSumExps,  
rowMadDiffs, rowMads, rowMaxs, rowMeans2, rowMedians, rowMins,  
rowOrderStats, rowProds, rowQuantiles, rowRanges, rowRanks,  
rowSdDiffs, rowSds, rowSums2, rowTabulates, rowVarDiffs, rowVars,  
rowWeightedMads, rowWeightedMeans, rowWeightedMedians,  
rowWeightedSds, rowWeightedVars
```

```
Lade nötiges Paket: Biobase
```

```
Welcome to Bioconductor
```

```
Vignettes contain introductory material; view with  
'browseVignettes()'. To cite Bioconductor, see  
'citation("Biobase")', and for packages 'citation("pkgname")'.
```

```
Attache Paket: 'Biobase'
```

```
Das folgende Objekt ist maskiert 'package:MatrixGenerics':
```

```
rowMedians
```

```
Die folgenden Objekte sind maskiert von 'package:matrixStats':
```

```
anyMissing, rowMedians
```

```
Lade nötiges Paket: Biostrings
```

```
Lade nötiges Paket: XVector

Attache Paket: 'Biostrings'

Das folgende Objekt ist maskiert 'package:base':

  strsplit

Lade nötiges Paket: bumphunter

Lade nötiges Paket: foreach

Lade nötiges Paket: iterators

Lade nötiges Paket: parallel

Lade nötiges Paket: locfit

locfit 1.5-9.12           2025-03-05

Setting options('download.file.method.GE0query'='auto')

Setting options('GE0query.inmemory.gpl'=FALSE)

Lade nötiges Paket: ChAMPdata

Lade nötiges Paket: DMRcate


Lade nötiges Paket: Illumina450ProbeVariants.db

Lade nötiges Paket: IlluminaHumanMethylationEPICmanifest

Lade nötiges Paket: DT

Lade nötiges Paket: RPMM

Lade nötiges Paket: cluster

Keine Methoden in Paket 'RSQLite' gefunden für Anforderung: 'dbListFields' bei
im Laden von 'lumi'

Warning message:
"vorhergehender Import 'plyr::mutate' durch 'plotly::mutate' während des Lade
ns von 'ChAMP' ersetzt"
Warning message:
"vorhergehender Import 'plyr::rename' durch 'plotly::rename' während des Lade
ns von 'ChAMP' ersetzt"
Warning message:
"vorhergehender Import 'plyr::arrange' durch 'plotly::arrange' während des La
dens von 'ChAMP' ersetzt"
```

```

Warning message:
"vorhergehender Import 'plyr::summarise' durch 'plotly::summarise' während des Ladens von 'ChAMP' ersetzt"

Warning message:
"vorhergehender Import 'plotly::subplot' durch 'Hmisc::subplot' während des Ladens von 'ChAMP' ersetzt"
Warning message:
"vorhergehender Import 'plyr::summarize' durch 'Hmisc::summarize' während des Ladens von 'ChAMP' ersetzt"
Warning message:
"vorhergehender Import 'plyr::is.discrete' durch 'Hmisc::is.discrete' während des Ladens von 'ChAMP' ersetzt"
Warning message:
"vorhergehender Import 'plotly::last_plot' durch 'ggplot2::last_plot' während des Ladens von 'ChAMP' ersetzt"
Warning message:
"vorhergehender Import 'globaltest::model.matrix' durch 'stats::model.matrix' während des Ladens von 'ChAMP' ersetzt"
Warning message:
"vorhergehender Import 'globaltest::p.adjust' durch 'stats::p.adjust' während des Ladens von 'ChAMP' ersetzt"
>> Package version 2.29.1 loaded <<

```



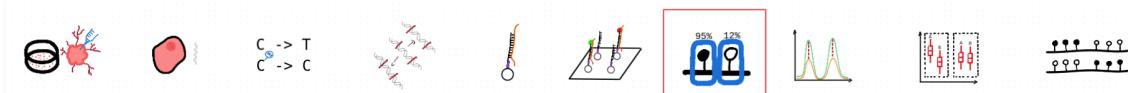
If you have any question or suggestion about ChAMP, please email to champ450k@gmail.com.

Thank you for citating ChAMP:

Yuan Tian, Tiffany J Morris, Amy P Webster, Zhen Yang, Stephan Beck, Andrew Feber, Andrew E Teschendorff; ChAMP: updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips, Bioinformatics, btx513, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx513> REQUIRE ChAMPdata >= 2.23.1

```
In [2]: # set the location of the experiment directory
# the .idat fluorescence files and the samplesheet.csv have to be located in
epicv2_dir <- "../../example_datasets/epicv2/data"
```

Setzen des Datenverzeichnisses, Laden und Filtern der Daten



Alle Daten müssen für die Verarbeitung mit ChAMP in einem Verzeichnis abgelegt werden. Das Verzeichnis enthält sowohl alle .idat Dateien (jeweils grün und rot pro Probe), als auch das Samplesheet. ChAMP sucht initial eine .csv Datei, die als Samplesheet gelesen wird (bei mehr als einer .csv Dateien treten Probleme auf), liest daraus Sentrix_ID und

Sentrix_Position, und sucht anhand dieser Informationen die .idat Dateien benannt in der Form `Sentrix_ID*Sentrix_position*_Grn.idat` und `*Sentrix_ID*\Sentrix_position_Red.idat`.

Die Fluoreszenzsignale werden daraufhin ausgelesen und daraus je nach benötigtem Methylierungswert (**methValue**) Beta oder M Werte berechnet. Zusätzlich wird eine Reihe von Filtern angewendet, die folgende Sonden aus den Datensätzen entfernen:

1. Sonden, die nicht signifikant methyliert oder demethyliert sind (die sich nicht signifikant vom Hintergrundsignal unterscheiden)
2. Sonden, die nicht die Methylierung von CpGs überprüfen
3. Sonden, die in der Nähe von single nucleotide polymorphisms (SNPs) liegen
4. Sonden, die auf mehrere genomische Regionen mappen
5. Sonden, die auf dem X- und Y-Chromosom liegen
6. Sonden, in denen der Anteil der Proben mit weniger als 3 Beads über **beadCutoff** liegt

Zusätzlich werden Proben entfernt, in denen mindestens **SampleCutoff** Sonden durch vorherige Filterungsschritte entfernt wurden. Alle **fett** gedruckten Begriffe sind Argumente der unten stehenden `champ.load` Funktion

Der Stdout und Stderr enthält von ChAMP sehr viele nützliche Informationen zu Datensatz und Filterprozess. So kann man beispielsweise sehen, wie viele Sonden in den verschiedenen Filterungsschritten entfernt wurden und, ob Proben entfernt wurden (abhängig von **SampleCutoff**).

```
In [3]: # champ.load searches for a samplesheet file and all .idat files listed in s
myLoad <- champ.load(directory = epicv2_dir,
                      method="ChAMP", # replaces old loading method using mir
                      methValue="B", # wether to calculate beta- or M-values
                      autoimpute=TRUE, # if values are missing uses the 3 mos
                      filterDetP=TRUE, # filter single probes, whose methylat
                      ProbeCutoff=0, # remove all probes with higher missing-
                      SampleCutoff=0.1, # remove a full sample if the failed
                      detPcut=0.01, # significance p-value cutoff for filterD
                      filterBeads=TRUE, # filter out probes if the fraction o
                      beadCutoff=0.05, # acceptable fraction of samples with
                      filterNoCG=TRUE, # wether to remove non-cg probes
                      filterSNPs=TRUE, # wether to remove probes that fallnear
                      population=NULL, # can be assigned to specific populati
                      filterMultiHit=TRUE, # wether to remove probes that ali
                      filterXY=TRUE, # wether to remove probes on x and y chr
                      force=FALSE, # minfi specific parameter
                      arraytype="EPICv2") # microarray type (can be one of "4
```

```
[=====]
```

```
[<<< ChAMP.LOAD START >>>]
```

```
-----  
[ Loading Data with ChAMP Method ]
```

```
-----  
Note that ChAMP method will NOT return rgSet or mset, they object defined by  
minfi. Which means, if you use ChAMP method to load data, you can not use SWA  
N or FunctionNormliazation method in champ.norm() (you can use BMIQ or PBC st  
ill). But All other function should not be influenced.
```

```
[=====]
```

```
[<<< ChAMP.IMPORT START >>>]
```

```
-----  
[ Section 1: Read PD Files Start ]
```

```
CSV Directory: ../../../../../../example_datasets/epicv2/data/Demo_EPIC-8v2-0_A1_Sam  
pleSheet_16.csv
```

```
Find CSV Success
```

```
Reading CSV File
```

```
Replace Sentrix_Position into Array
```

```
Replace Sentrix_ID into Slide
```

```
[ Section 1: Read PD file Done ]
```

```
[ Section 2: Read IDAT files Start ]
```

```
Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110001/206891110001_R01  
C01_Grn.idat ---- (1/16)
```

```
Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110001/206891110001_R03  
C01_Grn.idat ---- (2/16)
```

```
Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110001/206891110001_R07  
C01_Grn.idat ---- (3/16)
```

```
Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110001/206891110001_R08  
C01_Grn.idat ---- (4/16)
```

```
Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110002/206891110002_R02
```

```
C01_Grn.idat ---- (5/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110002/206891110002_R04
C01_Grn.idat ---- (6/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110002/206891110002_R06
C01_Grn.idat ---- (7/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110002/206891110002_R08
C01_Grn.idat ---- (8/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110004/206891110004_R01
C01_Grn.idat ---- (9/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110004/206891110004_R03
C01_Grn.idat ---- (10/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110004/206891110004_R07
C01_Grn.idat ---- (11/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110004/206891110004_R08
C01_Grn.idat ---- (12/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110005/206891110005_R02
C01_Grn.idat ---- (13/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110005/206891110005_R04
C01_Grn.idat ---- (14/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110005/206891110005_R06
C01_Grn.idat ---- (15/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110005/206891110005_R08
C01_Grn.idat ---- (16/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110001/206891110001_R01
C01_Red.idat ---- (1/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110001/206891110001_R03
C01_Red.idat ---- (2/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110001/206891110001_R07
C01_Red.idat ---- (3/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110001/206891110001_R08
C01_Red.idat ---- (4/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110002/206891110002_R02
C01_Red.idat ---- (5/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110002/206891110002_R04
C01_Red.idat ---- (6/16)

    Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110002/206891110002_R06
C01_Red.idat ---- (7/16)
```

```
Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110002/206891110002_R08  
C01_Red.idat ---- (8/16)

Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110004/206891110004_R01  
C01_Red.idat ---- (9/16)

Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110004/206891110004_R03  
C01_Red.idat ---- (10/16)

Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110004/206891110004_R07  
C01_Red.idat ---- (11/16)

Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110004/206891110004_R08  
C01_Red.idat ---- (12/16)

Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110005/206891110005_R02  
C01_Red.idat ---- (13/16)

Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110005/206891110005_R04  
C01_Red.idat ---- (14/16)

Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110005/206891110005_R06  
C01_Red.idat ---- (15/16)

Loading:../../../../example_datasets/epicv2/data/206891110005/206891110005_R08  
C01_Red.idat ---- (16/16)
```

Extract Mean value for Green and Red Channel Success

Your Red Green Channel contains 1105209 probes.

[Section 2: Read IDAT Files Done]

[Section 3: Use Annotation Start]

Reading EPICv2 Annotation >>

!!! Important, since version 2.29.1, ChAMP set default `EPIC` arraytype as EPIC version 2.

You can set 'EPIC' or 'EPICv2' to use version 2 EPIC annotation

If you want to use the old version (v1), please specify arraytype parameter as `EPICv1`.

For 450K array, still use `450K`

Fetching NEGATIVE ControlProbe.

Totally, there are 411 control probes in Annotation.

Your data set contains 411 control probes.

```
Generating Meth and UnMeth Matrix
```

```
Extracting Meth Matrix...
```

```
Totally there are 937055 Meth probes in EPICv2 Annotation.
```

```
Your data set contains 937055 Meth probes.
```

```
Extracting UnMeth Matrix...
```

```
Totally there are 937055 UnMeth probes in EPICv2 Annotation.
```

```
Your data set contains 937055 UnMeth probes.
```

```
Generating beta Matrix
```

```
Generating M Matrix
```

```
Generating intensity Matrix
```

```
Calculating Detect P value
```

```
Counting Beads
```

```
[ Section 3: Use Annotation Done ]
```

```
[<<<< ChAMP.IMPORT END >>>>]
```

```
[=====]
```

```
[You may want to process champ.filter() next.]
```

```
[=====]
```

```
[<<<< ChAMP.FILTER START >>>>]
```

```
-----
```

In New version ChAMP, champ.filter() function has been set to do filtering on the result of champ.import(). You can use champ.import() + champ.filter() to do Data Loading, or set "method" parameter in champ.load() as "ChAMP" to get the same effect.

This function is provided for user need to do filtering on some beta (or M) matrix, which contained most filtering system in champ.load except beadcount. User need to input beta matrix, pd file themselves. If you want to do filtering on detP matrix and Bead Count, you also need to input a detected P matrix and Bead Count information.

Note that if you want to filter more data matrix, say beta, M, intensity... p

```
lease make sure they have exactly the same rownames and colnames.
```

```
[ Section 1: Check Input Start ]
```

```
You have inputed beta,intensity for Analysis.
```

```
pd file provided, checking if it's in accord with Data Matrix...
```

```
pd file check success.
```

```
Parameter filterDetP is TRUE, checking if detP in accord with Data Matrix...
```

```
detP check success.
```

```
Parameter filterBeads is TRUE, checking if beadcount in accord with Data Matrix...
```

```
beadcount check success.
```

```
parameter autoimpute is TRUE. Checking if the conditions are fulfilled...
```

```
!!! ProbeCutoff is 0, which means you have no needs to do imputation. autoimpute has been reset FALSE.
```

```
Checking Finished :filterDetP,filterBeads,filterMultiHit,filterSNPs,filterNoCG,filterXY would be done on beta,intensity.
```

```
You also provided :detP,beadcount .
```

```
[ Section 1: Check Input Done ]
```

```
[ Section 2: Filtering Start >>
```

```
Filtering Detect P value Start
```

```
The fraction of failed positions per sample
```

```
You may need to delete samples with high proportion of failed probes:
```

Failed CpG Fraction.

HeLa	0.008623827
Jurkat	0.008777500
Raji	0.010284348
NA12873	0.007755148
NA12873_2_R	0.005907871
Raji_2_R	0.008498968
HeLa_2_R	0.009623768
Jurkat_2_R	0.013604324
HeLa_3_R	0.008403989
Jurkat_3_R	0.007717797
Raji_3_R	0.012234074
NA12873_3_R	0.009718746
NA12873_4_R	0.006075417
Raji_4_R	0.008782836
HeLa_4_R	0.010018622
Jurkat_4_R	0.014514623

Filtering probes with a detection p-value above 0.01.

Removing 30127 probes.

If a large number of probes have been removed, ChAMP suggests you to identify potentially bad samples

Filtering BeadCount Start

Filtering probes with a beadcount <3 in at least 5% of samples.

Removing 20547 probes

Filtering NoCG Start

Only Keep CpGs, removing 3445 probes from the analysis.

Filtering SNPs Start

!!! Important, since version 2.29.1, ChAMP set default `EPIC` arraytype as EPIC version 2.

You can set 'EPIC' or 'EPICv2' to use version 2 EPIC annotation

If you want to use the old version (v1), please specify arraytype parameter as `EPICv1`.

For 450K array, still use `450K`

Using general mask options

Removing 30398 probes from the analysis.

Filtering MultiHit Start

Filtering probes that align to multiple locations as identified in Nordlund et al

Removing 0 probes from the analysis.

Filtering XY Start

Filtering probes located on X,Y chromosome, removing 19986 probes from the analysis.

Updating PD file

Fixing Outliers Start

Replacing all value smaller/equal to 0 with smallest positive value.

Replacing all value greater/equal to 1 with largest value below 1..

[Section 2: Filtering Done]

All filterings are Done, now you have 832552 probes and 16 samples.

[<<<< ChAMP.FILTER END >>>>]

[=====]

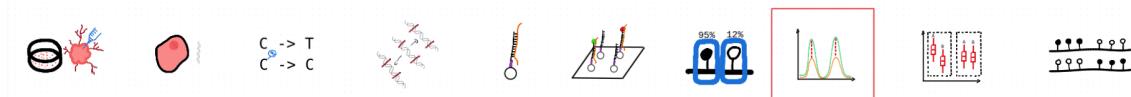
[You may want to process champ.QC() next.]

[<<<< ChAMP.LOAD END >>>>]

[=====]

[You may want to process champ.QC() next.]

Qualitätskontrolle des Datensatzes vor der Normalisierung



Das Objekt *MyLoad* enthält, je nach *methValue* Beta- oder M-Werte für alle Sonden und Proben, die nach der Filterung übrig sind. Nach dem Filterungsprozess sollten die Daten visualisiert werden, um eine erste Qualitätskontrolle durchführen zu können.

`champ.QC` erstellt uns aus dem Datensatz einen MDS-Plot, einen Density-Plot von Beta- oder M-Werten und ein Dendrogramm der Proben.

MDS-Plot: Ähnlich einer Principal component analysis (PCA) dient der MDS-Plot dazu, die Daten pro Probe in einen niedrigdimensionalen Raum zu projizieren. Für jede Probe bleiben zwei Werte übrig, die die Unterschiede zwischen den Proben bestmöglich beschreiben. Im Idealfall sollten Replikate sehr stark Clustern und die Samplegroups sollten in den meisten Fällen gut separiert sein.

Density-Plot: Da die DNA, die wir auf die Microarrays geben aus einer Population von Zellen (keiner Einzelzelle) stammt, zeigt uns die Fluoreszenz die durchschnittliche Methylierung einer Menge von Zellen. Der Density-Plot zeigt die Dichteverteilung der Beta-Werte (Methylierung) pro Probe. Die hier dargestellten Kurven sollten eine Badewannen-Form haben: Zwei klare Peaks, der eine um 0, der andere um 1. Zwischen den beiden Peaks sollte die Kurve relativ flach sein. Diese Form ist zu erwarten, da wir annehmen, dass

die Methylierung der meisten CpGs in einer Probe über mehrere Zellen gleich sein sollte - entweder methyliert oder unmethyliert.

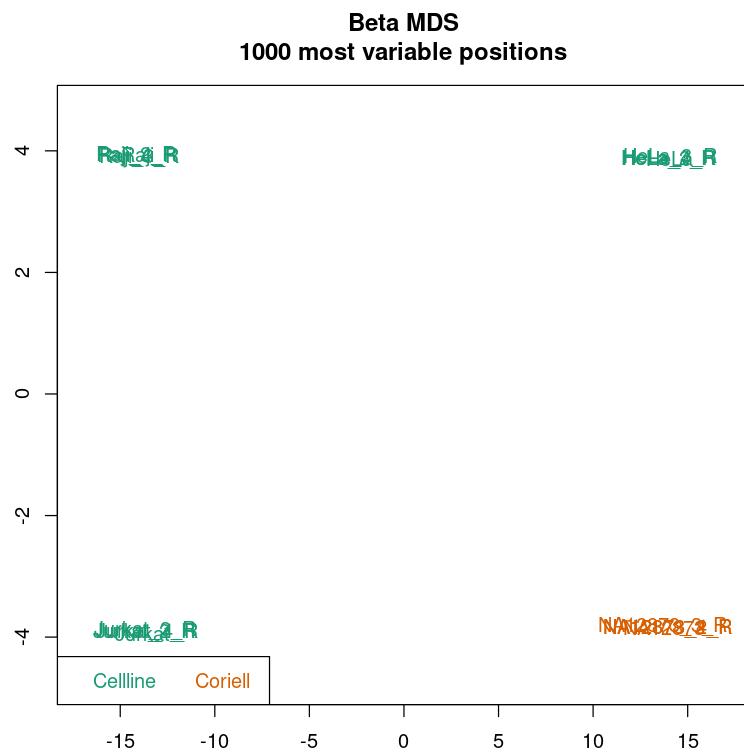
Dendrogramm: Das Dendrogramm hat eine ähnliche Funktion, wie der MDS-Plot. Hier werden alle Proben ihrer Ähnlichkeit entsprechend aufgetrennt. Die Länge des Weges zwischen zwei Proben spiegelt die Ähnlichkeit der Proben wieder. Hier ist zu erwarten, dass eine klare Separation der Proben zwischen den Samplegroups und Replikaten stattfindet.

In allen Plots kann schon jetzt überprüft werden, ob die Samplegroups sich in Dendrogramm und MDS-Plot gut separieren. Das muss nicht immer der Fall sein, abhängig von den zu erwartenden Unterschieden in der Methylierung zwischen Samplegroups.

Wenn die Auf trennung der Proben in Samplegroups unerwartet schwach ist, kann dies darauf hindeuten, dass zwischen den Proben nur kleine Unterschiede in der Methylierung vorliegen. Wenn die Auf trennung der Replikate unerwartet groß sein sollte, kann dies darauf hindeuten, dass es im experimentellen Ablauf zu Batch-Effekten kam (mehr Info hierzu im Kapitel **Erkennen und Entfernen von Batch Effekten**). Um das genauer zu betrachten, könnt ihr pheno anpassen, um Auf trennungen nach anderen Spalten eures Samplesheets zu betrachten.

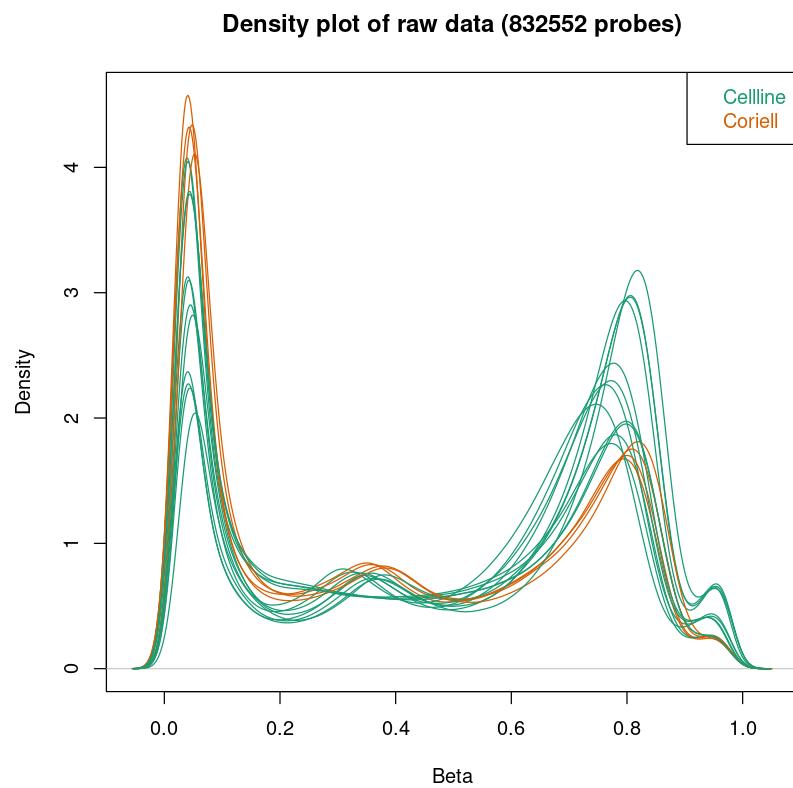
```
In [4]: champ.QC(beta = myLoad$beta, # beta values stored in champ.load output  
           pheno=myLoad$pd$Sample_Group, # what samplesheet column is your phe  
           resultsDir=".~/CHAMP_QCimages/") # the plots will be saved in the di
```

```
[=====]  
[<<<< ChAMP.QC START >>>>]  
-----  
champ.QC Results will be saved in ./CHAMP_QCimages/  
[QC plots will be proceed with 832552 probes and 16 samples.]  
  
<< Prepare Data Over. >>  
<< plot mdsPlot Done. >>
```



```
<< Plot densityPlot Done. >>
```

< Dendrogram Plot Feature Selection Method >: No Selection, directly use all CpGs to calculate distance matrix.

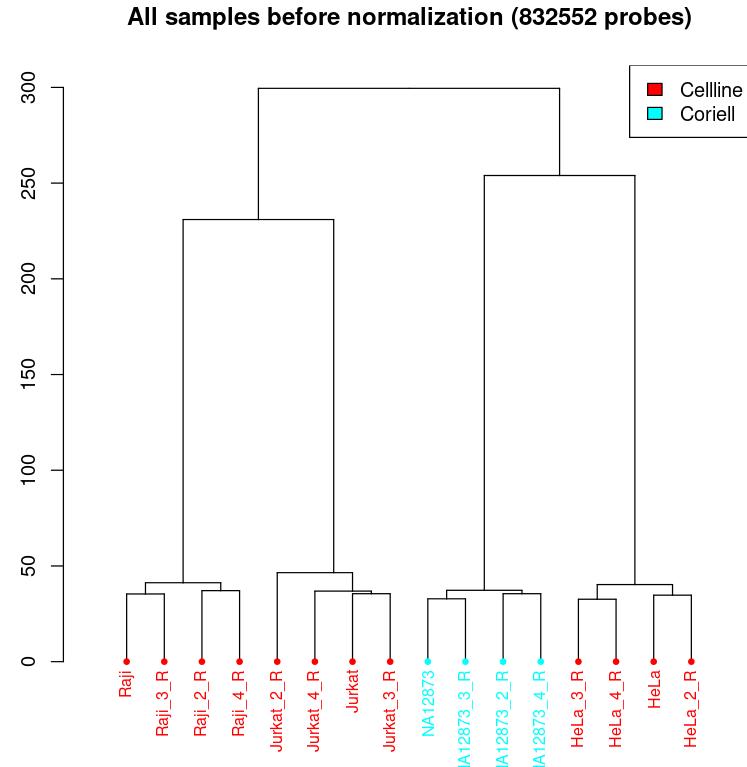


```
<< Plot dendrogram Done. >>

[<<<< ChAMP.QC END >>>>>]

[=====]

[You may want to process champ.norm() next.]
```



Normalisierung mit anschließender Evaluation

Nachdem wir die Daten im oberen Abschnitt eingelesen und gefiltert haben, werden diese normalisiert, um die Vergleichbarkeit der Daten zu verbessern, ohne sie zu verfälschen. Dafür vergleichen wir den Effekt der Normalisierung durch PBC und BMIQ (unterschiedliche Normalisierungsmethoden). ChAMP bietet zusätzlich funktionale Normalisierung und SWAN, diese beruhen allerdings auf rgset und mset, weshalb wir sie an dieser Stelle nicht nutzen können.

Nach jeder Normalisierung nutzen wir erneut `champ.QC`, um eine Qualitätskontrolle durchzuführen. Am Ende entscheiden wir uns für die Normalisierung mit der besten Separation und der besten Badewanne.

```
In [5]: # start with PBC normalization
myNormPBC <- champ.norm(beta = myLoad$beta, arraytype = "EPICv2", method =
champ.QC(beta = myNormPBC, pheno = myLoad$pd$Sample_Group, resultsDir = "./C
```

```
[=====]
```

```
[>>>> ChAMP.NORM START <<<<<]
```

```
-----  
champ.norm Results will be saved in ./CHAMP_Normalization/
```

```
[ SWAN method call for BOTH rgSet and mset input, FunctionalNormalization cal  
l for rgset only , while PBC and BMIQ only needs beta value. Please set param  
eter correctly. ]
```

```
<< Normalizing data with PBC Method >>
```

```
[1] "Done for sample 1"  
[1] "Done for sample 2"  
[1] "Done for sample 3"  
[1] "Done for sample 4"  
[1] "Done for sample 5"  
[1] "Done for sample 6"  
[1] "Done for sample 7"  
[1] "Done for sample 8"  
[1] "Done for sample 9"  
[1] "Done for sample 10"  
[1] "Done for sample 11"  
[1] "Done for sample 12"  
[1] "Done for sample 13"  
[1] "Done for sample 14"  
[1] "Done for sample 15"  
[1] "Done for sample 16"
```

```
[>>>> ChAMP.NORM END <<<<<]
```

```
[=====]
```

```
[You may want to process champ.SVD() next.]
```

```
[=====]
```

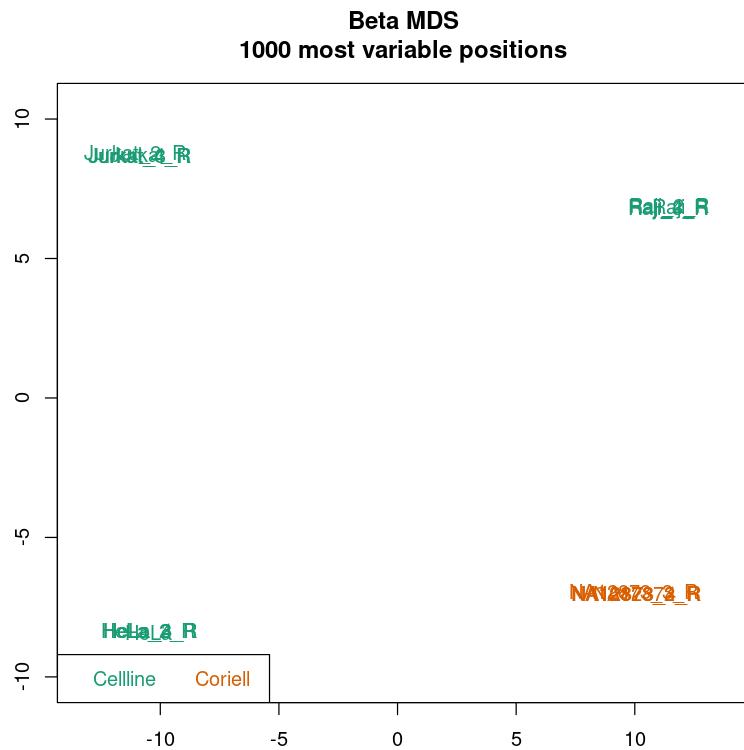
```
[<<<< ChAMP.QC START >>>>>]
```

```
-----  
champ.QC Results will be saved in ./CHAMP_QCimages/PBC/
```

```
[QC plots will be proceed with 832552 probes and 16 samples.]
```

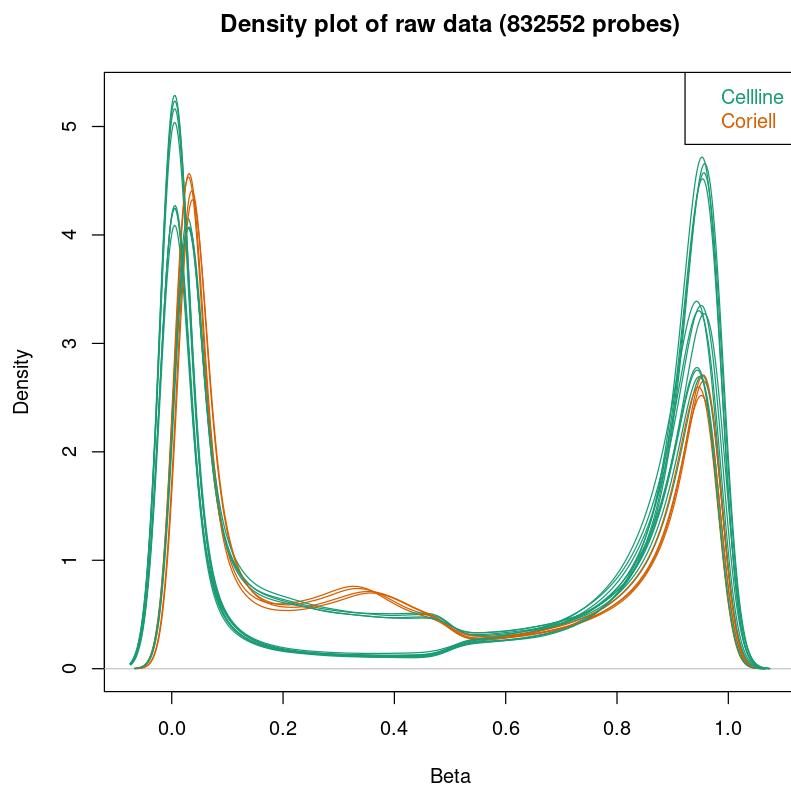
```
<< Prepare Data Over. >>
```

```
<< plot mdsPlot Done. >>
```



```
<< Plot densityPlot Done. >>
```

```
< Dendrogram Plot Feature Selection Method >: No Selection, directly use all
CpGs to calculate distance matrix.
```



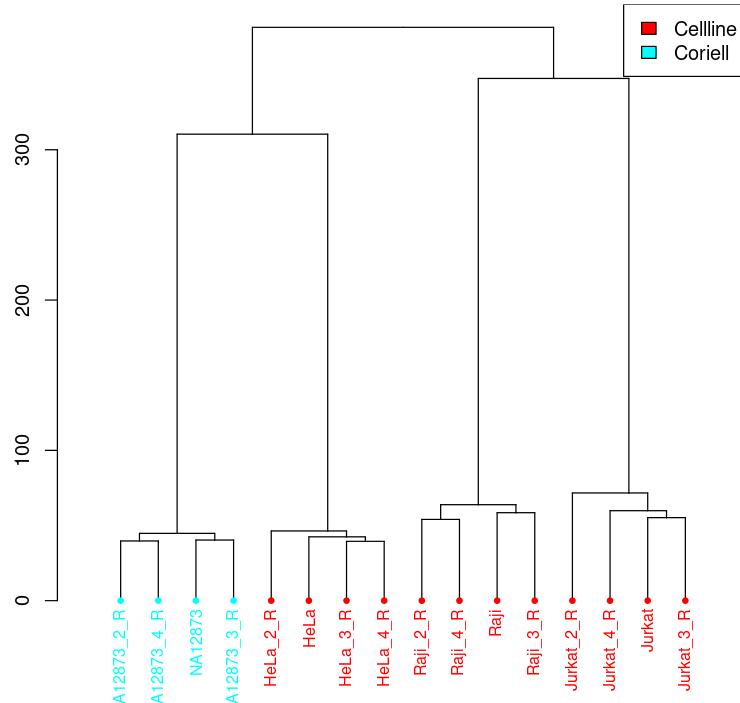
```
<< Plot dendrogram Done. >>
```

```
[<<<<< ChAMP.QC END >>>>>]
```

```
[=====]
```

```
[You may want to process champ.norm() next.]
```

All samples before normalization (832552 probes)

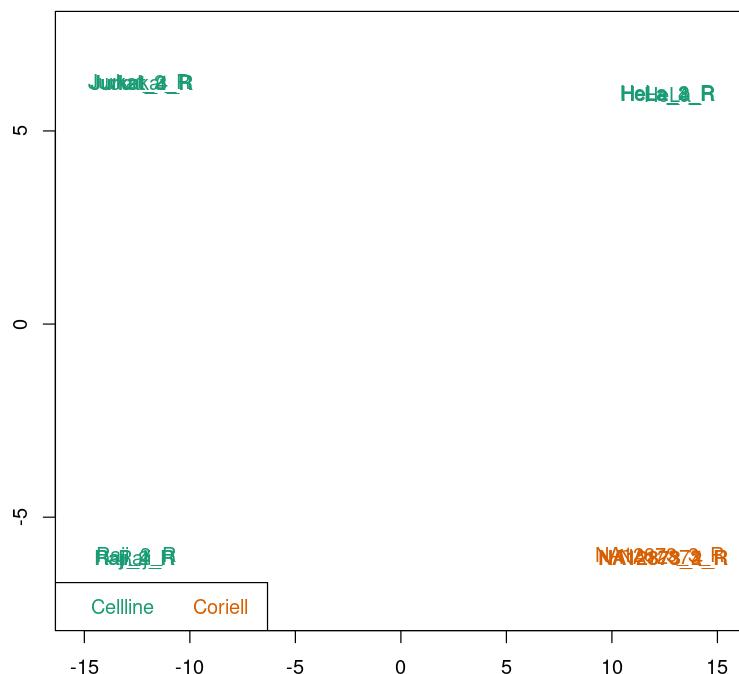


```
In [6]: # BMIQ normalization
```

```
myNormBMIQ <- champ.norm(beta = myLoad$beta, arraytype = "EPICv2", method =  
champ.QC(beta = myNormBMIQ, pheno=myLoad$pd$Sample_Group, resultsDir=".~/CHAN
```

```
[=====]  
[>>>> ChAMP.NORM START <<<<<]  
-----  
champ.norm Results will be saved in ./CHAMP_Normalization/  
[ SWAN method call for BOTH rgSet and mset input, FunctionalNormalization cal  
l for rgset only , while PBC and BMIQ only needs beta value. Please set param  
eter correctly. ]  
  
<< Normalizing data with BMIQ Method >>  
Note that,BMIQ function may fail for bad quality samples (Samples did not eve  
n show beta distribution).  
3 cores will be used to do parallel BMIQ computing.  
[>>>> ChAMP.NORM END <<<<<]  
[=====]  
[You may want to process champ.SVD() next.]  
  
[=====]  
[<<<< ChAMP.QC START >>>>>]  
-----  
champ.QC Results will be saved in ./CHAMP_QCimages/BMIQ/  
[QC plots will be proceed with 832552 probes and 16 samples.]  
  
<< Prepare Data Over. >>  
<< plot mdsPlot Done. >>
```

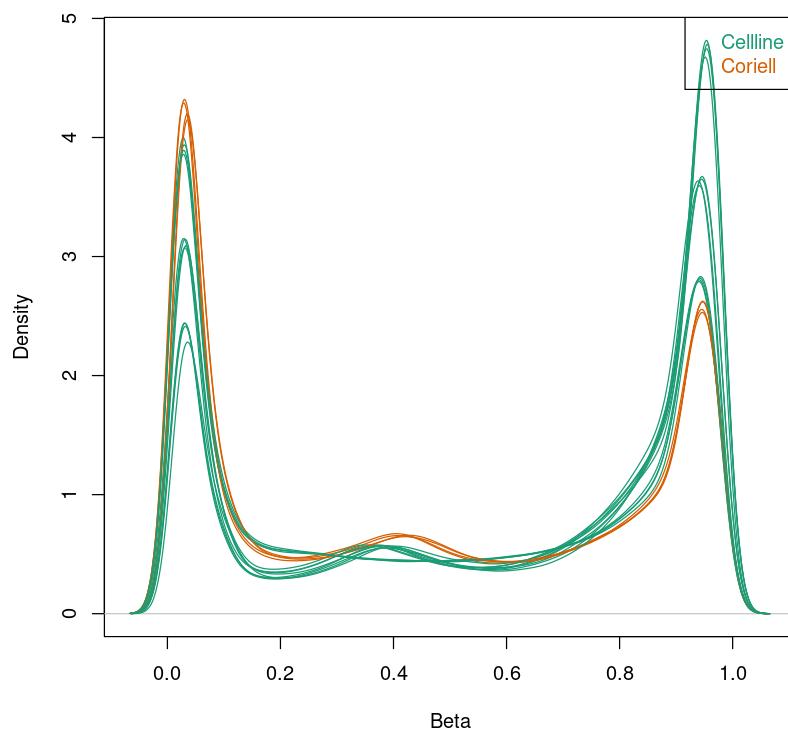
Beta MDS
1000 most variable positions



<< Plot densityPlot Done. >>

< Dendrogram Plot Feature Selection Method >: No Selection, directly use all CpGs to calculate distance matrix.

Density plot of raw data (832552 probes)



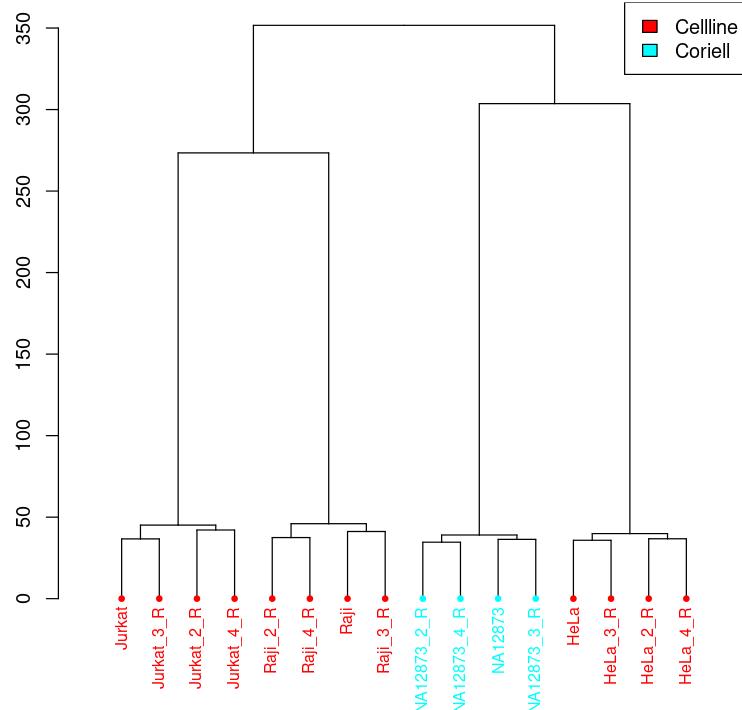
```
<< Plot dendrogram Done. >>
```

```
[<<<<< ChAMP.QC END >>>>>]
```

```
[=====]
```

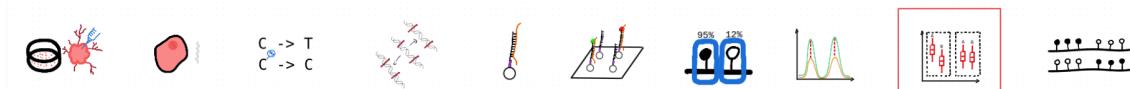
```
[You may want to process champ.norm() next.]
```

All samples before normalization (832552 probes)



```
In [7]: # save best looking normalization result  
myNorm <- myNormBMIQ
```

Erkennen und Entfernen von Batch Effekten



Es kann vorkommen, dass Daten selbst nach der Normalisierung noch nicht perfekt aussehen. "Nicht perfekt" bezieht sich hierbei auf erkennbare Unterschiede zwischen Proben, zwischen denen keine Unterschiede zu erwarten sind. Das können beispielsweise Replikate desselben Gewebes sein, die sich im MDS-Plot auftrennen.

In solchen Fällen kann die Ursache bei Batch-Effekten liegen. Als Batch-Effekt bezeichnet man (nicht zwingend erklärbare) Unterschiede in der durchschnittlichen Fluoreszenz

zwischen verschiedenen Beadchips, Positionen auf dem Beadchip oder beispielsweise Tagen, an denen Experimente durchgeführt wurden.

Um diese Effekte zu finden, wird das Samplesheet und alle darin stehenden Gruppierungsspalten genutzt, um nach Unterschieden zwischen Gruppen zu suchen. Zu diesen Gruppen gehören Sample_Group, Sentrix_ID, Sentrix_Position und Pool_ID (falls ausgefüllt).

`champ.SVD` erstellt einen SVD Plot, in dem erkennbar ist, wie stark verschiedene Gruppierungsparameter mit Varianz zwischen den Proben (wiedergespiegelt durch die ersten drei Hauptkomponenten PC-1, PC-2 und PC-3) assoziiert sind. Alle bunten Blöcke sind dabei statistisch signifikant ($p < 0.05$) und sollten berücksichtigt werden mit Ausnahme der Blöcke für Samplegroup.

Nach Feststellung von Batch-Effekten kann `champ.runCombat` genutzt werden, um die gefundenen Batch-Effekte zu entfernen.

Zur Auswertung dient ein weiterer SVD-Plot.

```
In [8]: champ.SVD(beta=myNorm, pd=myLoad$pd)
```

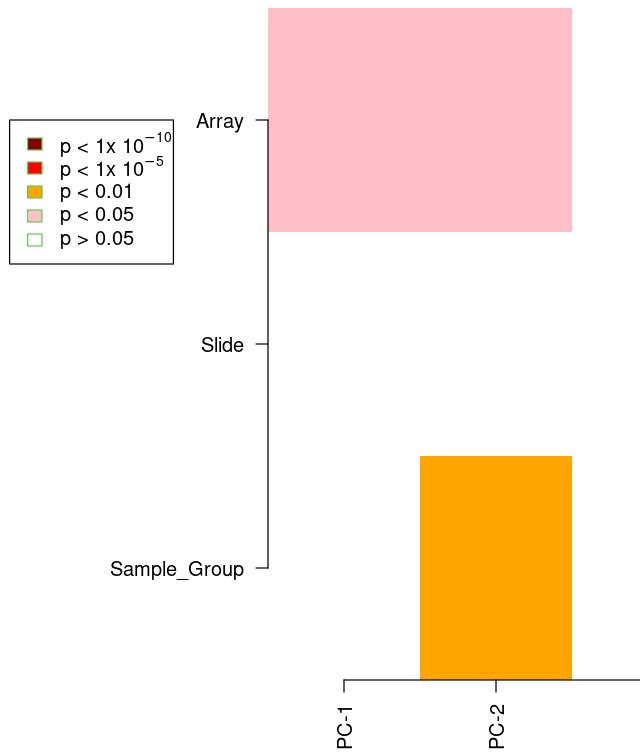
```
[=====]  
[<<<< ChAMP.SVD START >>>>]  
-----  
champ.SVD Results will be saved in ./CHAMP_SVDimages/ .  
[SVD analysis will be proceed with 832552 probes and 16 samples.]  
  
[ champ.SVD() will only check the dimensions between data and pd, instead if  
checking if Sample_Names are correctly matched (because some user may have no  
Sample_Names in their pd file),thus please make sure your pd file is in accor  
d with your data sets (beta) and (rgSet).]  
  
<< Following Factors in your pd(sample_sheet.csv) will be analysed: >>  
<Sample_Group>(character):Cellline, Coriell  
<Slide>(character):206891110001, 206891110002, 206891110004, 206891110005  
<Array>(character):R01C01, R03C01, R07C01, R08C01, R02C01, R04C01, R06C01  
[champ.SVD have automatically select ALL factors contain at least two differe  
nt values from your pd(sample_sheet.csv), if you don't want to analysis some  
of them, please remove them manually from your pd variable then retry champ.S  
VD().]  
  
<< Following Factors in your pd(sample_sheet.csv) will not be analysis: >>  
<Sample_Name>  
<Sample_Well>  
<Sample_Plate>  
<Pool_ID>  
[Factors are ignored because they only indicate Name or Project, or they cont  
ain ONLY ONE value across all Samples.]  
  
<< PhenoTypes.lv generated successfully. >>  
<< Calculate SVD matrix successfully. >>  
<< Plot SVD matrix successfully. >>  
[<<<< ChAMP.SVD END >>>>]  
[=====]
```

[If the batch effect is not significant, you may want to process champ.DMP() or champ.DMR() or champ.BlockFinder() next, otherwise, you may want to run champ.runCombat() to eliminate batch effect, then rerun champ.SVD() to check corrected result.]

A matrix: 3 × 3 of type dbl

Sample_Group	Slide	Array
0.331975467	0.9624982	0.02799695
0.003609347	0.8974416	0.02607784
0.331975467	0.9541195	0.07487659

Singular Value Decomposition Analysis (SVD)



```
In [9]: myCombat <- champ.runCombat(beta=myNorm, pd=myLoad$pd, batchname=c("Array"))
```

```
[=====]  
[<< CHAMP.RUNCOMBAT START >>]  
-----  
<< Preparing files for ComBat >>  
[Combat correction will be proceed with 832552 probes and 16 samples.]  
  
<< Following Factors in your pd(sample_sheet.csv) could be applied to Combat:  
>>  
<Sample_Name>(character)  
<Slide>(character)  
<Array>(character)  
[champ.runCombat have automatically select ALL factors contain at least two different values from your pd(sample_sheet.csv).]  
  
<< Following Factors in your pd(sample_sheet.csv) can not be corrected: >>  
<Sample_Well>  
<Sample_Plate>  
<Sample_Group>  
<Pool_ID>  
[Factors are ignored because they are conflict with variablename, or they contain ONLY ONE value across all Samples, or some phenotype contains less than 2 Samples.]  
As your assigned in batchname parameter: Array will be corrected by Combat function.  
  
<< Start Correcting Array >>  
~Sample_Group  
<environment: 0x5aef08666828>  
Generate mod success. Started to run ComBat, which is quite slow...  
Found 4 genes with uniform expression within a single batch (all zeros); these will not be adjusted for batch.
```

```
Found 7 batches
```

```
Adjusting for 1 covariate(s) or covariate level(s)
```

```
Standardizing Data across genes
```

```
Fitting L/S model and finding priors
```

```
Finding parametric adjustments
```

```
Adjusting the Data
```

```
champ.runCombat success. Corrected dataset will be returned.
```

```
In [10]: champ.SVD(beta=myCombat, pd=myLoad$pd)
```

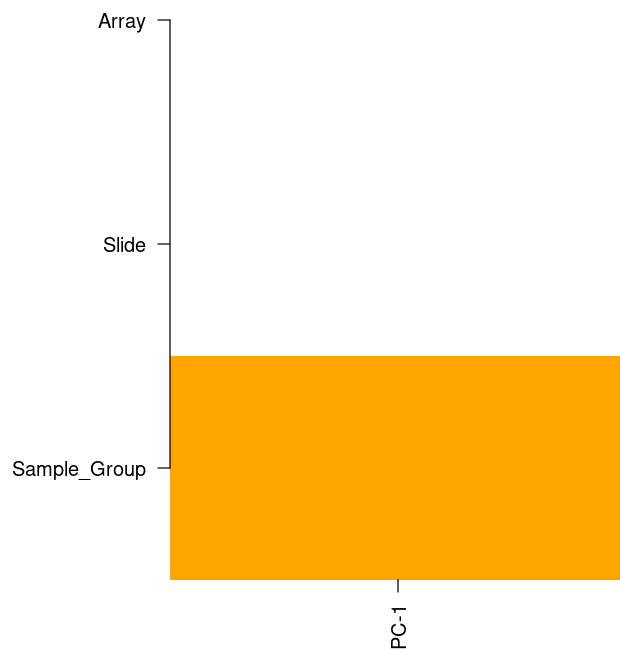
```
[=====]  
[<<<< ChAMP.SVD START >>>>]  
-----  
champ.SVD Results will be saved in ./CHAMP_SVDimages/ .  
[SVD analysis will be proceed with 832552 probes and 16 samples.]  
  
[ champ.SVD() will only check the dimensions between data and pd, instead if  
checking if Sample_Names are correctly matched (because some user may have no  
Sample_Names in their pd file),thus please make sure your pd file is in accor  
d with your data sets (beta) and (rgSet).]  
  
<< Following Factors in your pd(sample_sheet.csv) will be analysed: >>  
<Sample_Group>(character):Cellline, Coriell  
<Slide>(character):206891110001, 206891110002, 206891110004, 206891110005  
<Array>(character):R01C01, R03C01, R07C01, R08C01, R02C01, R04C01, R06C01  
[champ.SVD have automatically select ALL factors contain at least two differe  
nt values from your pd(sample_sheet.csv), if you don't want to analysis some  
of them, please remove them manually from your pd variable then retry champ.S  
VD().]  
  
<< Following Factors in your pd(sample_sheet.csv) will not be analysis: >>  
<Sample_Name>  
<Sample_Well>  
<Sample_Plate>  
<Pool_ID>  
[Factors are ignored because they only indicate Name or Project, or they cont  
ain ONLY ONE value across all Samples.]  
  
<< PhenoTypes.lv generated successfully. >>  
<< Calculate SVD matrix successfully. >>  
<< Plot SVD matrix successfully. >>  
[<<<< ChAMP.SVD END >>>>]  
[=====]
```

[If the batch effect is not significant, you may want to process champ.DMP() or champ.DMR() or champ.BlockFinder() next, otherwise, you may want to run champ.runCombat() to eliminate batch effect, then rerun champ.SVD() to check corrected result.]

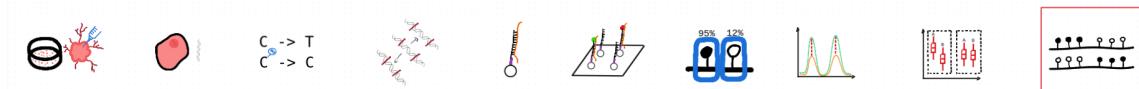
A matrix: 1×3 of type dbl

Sample_Group	Slide	Array
0.003609347	0.9074465	0.4049149

Singular Value Decomposition Analysis (SVD)



Bestimmung und Visualisierung von differentiell methylierten Sonden (DMPs)



Nach erfolgreichem Laden der Daten, anschließendem Normalisieren und dem entfernen von Batch-Effekten kann jetzt final die Methylierung zwischen Gruppen von Interesse verglichen werden.

Dafür nutzen wir `champ.DMP`, was die Methylierung jeder Sonde zwischen zwei Gruppen (hier Samplegroups) vergleicht und testet, ob der Unterschied der Methylierung der Sonde zwischen den Gruppen statistisch signifikant ist. Dabei kann jeweils nur ein Vergleich

zwischen zwei Gruppen stattfinden. Gibt es mehr als zwei Samplegroups, werden alle paarweisen Vergleiche berechnet.

Die Visualisierung erfolgt hier nicht über Plots, die im Notebook sichtbar sind, sondern über eine interaktive HTML Darstellung, die **über die angezeigte URL** erreichbar ist.

Die daraufhin angezeigte Seite beinhaltet verschiedene Elemente:

- **Eingabemaske (linker Rand)**: Hier müssen Nutzer einen **P-Cutoff** und einen **FoldChange** auswählen und auf **Submit** klicken, um DMPs anzeigen zu lassen. Über **Gene Symbol** kann man ein Gen auswählen, was daraufhin im Reiter **Gene** angezeigt wird. Über **CpG ID Symbol** kann man eine Sonde auswählen, die daraufhin im Reiter **CpG** einzeln angezeigt wird.
- **DMPtable**: Informationen zu den ausgewählten DMPs
- **Heatmap**: DMPs, die die SampleGroups am stärksten separieren
- **Feature&Cgi**: Positionen von DMPs in der DNA bzw. in CpG-Inseln
- **Gene**: Methylierung der DMPs eines Gens und Infos zu dem gewählten Gen
- **CpG**: Gene mit den meisten DMPs und einzelne CpGs

```
In [11]: DMPs <- champ.DMP(beta = myNorm, pheno=myLoad$pd$Sample_Group, adjPVal = 0.05  
DMP.GUI(DMP=DMPs[[1]], beta=myNorm, pheno=myLoad$pd$Sample_Group)
```

```
[=====]
```

```
[<<<< ChAMP.DMP START >>>>]
```

```
-----  
!!! Important !!! New Modification has been made on champ.DMP():
```

```
(1): In this version champ.DMP() if your pheno parameter contains more than two groups of phenotypes, champ.DMP() would do pairwise differential methylation analysis between each pair of them. But you can also specify compare.group to only do comparison between any two of them.
```

```
(2): champ.DMP() now support numeric as pheno, and will do linear regression on them. So covariates like age could be inputted in this function. You need to make sure your inputted "pheno" parameter is "numeric" type.
```

```
-----  
[ Section 1: Check Input Pheno Start ]
```

```
You pheno is character type.
```

```
Your pheno information contains following groups. >>
```

```
<Cellline>:12 samples.
```

```
<Coriell>:4 samples.
```

```
[The power of statistics analysis on groups contain very few samples may not strong.]
```

```
pheno contains only 2 phenotypes
```

```
compare.group parameter is NULL, two pheno types will be added into Compare List.
```

```
Cellline_to_Coriell compare group : Cellline, Coriell
```

```
[ Section 1: Check Input Pheno Done ]
```

```
-----  
[ Section 2: Find Differential Methylated CpGs Start ]
```

```
-----  
Start to Compare : Cellline, Coriell
```

Contrast Matrix

Contrasts	
Levels	pCoriell-pCellline
pCellline	-1
pCoriell	1

You have found 163189 significant MVPs with a BH adjusted P-value below 0.05.

Calculate DMP for Cellline and Coriell done.

[Section 2: Find Numeric Vector Related CpGs Done]

[Section 3: Match Annotation Start]

[Section 3: Match Annotation Done]

[<<<<< ChAMP.DMP END >>>>]

[=====]

[You may want to process DMP.GUI() or champ.GSEA() next.]

Lade nötiges Paket: shiny

Attache Paket: 'shiny'

Die folgenden Objekte sind maskiert von 'package:DT':

dataTableOutput, renderDataTable

Listening on http://127.0.0.1:4132

Bestimmung und Visualisierung von differentiell methylierten Regionen (DMRs)

Nach der Evaluation von DMPs können diese zu DMRs zusammengefasst werden. Eine DMR ist eine Region, in der sich besonders viele DMPs befinden.

Die Visualisierung ist ähnlich der von DMPs in verschiedene Elemente aufgeteilt:

- **Eingabemaske (linker Rand)**: Hier müssen Nutzer einen **P-Cutoff** und eine Mindestanzahl an enthaltenen DMPs angeben werden, um das Set der gefundenen DMRs vorzufiltern. Über den **DMR-Index** kann eine einzelne DMR anhand ihrer **ID** in **DMRtable** ausgewählt werden. Die gewählte DMR wird dann im **DMRPlot** visualisiert
- **DMRtable**: Zeigt die ausgewählten DMRs und viele Zusatzinformationen an
- **CpGtable**: Durchsuchbare DMP Tabelle in der die Zuordnung der DMPs zu den DMRs einsehbar ist. Sehr praktisch, um DMRs zu suchen, die ein bestimmtes Gen enthalten, da **gene** nur in CpGtable enthalten ist
- **DMRPlot**: Anzeige einer bestimmten DMR nach Selektion über die **Eingabemaske**
- **Summary**: Zeigt die Gene an, für die die meisten CpGs in einer oder mehrerer DMRs liegen, sowie der DMP-Status dieser CpGs. Zusätzlich sind die größten Methylierungsunterschiede zwischen CpGs in DMRs der **Sample_Groups** dargestellt

```
In [12]: DMRs <- champ.DMR(beta=myNorm, pheno=myLoad$pd$Sample_Group, method="Bumphunter")
          DMR.GUI(DMR=DMRs, arraytype="EPICv2")
```

```
[=====]
```

```
[<<<< ChAMP.DMR START >>>>]
```

```
-----  
!!! important !!! We just upgrade champ.DMR() function, since now champ.DMP() could works on multiple phenotypes, but ProbeLasso can only works on one DMP result, so if your pheno parameter contains more than 2 phenotypes, and you want to use ProbeLasso function, you MUST specify compare.group=c("A","B"). Bumphunter and DMRcate should not be influenced.
```

```
[ Section 1: Check Input Pheno Start ]
```

```
You pheno is character type.
```

```
Your pheno information contains following groups. >>
```

```
<Cellline>:12 samples.
```

```
<Coriell>:4 samples.
```

```
[ Section 1: Check Input Pheno Done ]
```

```
[ Section 2: Run DMR Algorithm Start ]
```

```
<< Find DMR with Bumphunter Method >>
```

```
3 cores will be used to do parallel Bumphunter computing.
```

```
According to your data set, champ.DMR() detected 11309 clusters contains MORE THAN 7 probes within 300 maxGap. These clusters will be used to find DMR.
```

```
[bumphunterEngine] Parallelizing using 3 workers/cores (backend: doParallelMC, version: 1.0.17).
```

```
[bumphunterEngine] Computing coefficients.
```

```
[bumphunterEngine] Smoothing coefficients.
```

```
Lade nötiges Paket: rngtools
```

```
[bumphunterEngine] Performing 250 bootstraps.
```

```
[bumphunterEngine] Computing marginal bootstrap p-values.
```

```
[bumphunterEngine] Smoothing bootstrap coefficients.
```

```
[bumphunterEngine] cutoff: 3.209
```

```
[bumphunterEngine] Finding regions.

[bumphunterEngine] Found 4408 bumps.

[bumphunterEngine] Computing regions for each bootstrap.

[bumphunterEngine] Estimating p-values and FWER.

<< Calculate DMR success. >>

Bumphunter detected 927 DMRs with P value <= 0.05.

[ Section 2: Run DMR Algorithm Done ]

[<<<<< ChAMP.DMR END >>>>>]

[=====]

[You may want to process DMR.GUI() or champ.GSEA() next.]

!!! important !!! Since we just upgraded champ.DMP() function, which is now c
an support multiple phenotypes. Here in DMR.GUI() function, if you want to us
e "runDMP" parameter, and your pheno contains more than two groups of phenoty
pes, you MUST specify compare.group parameter as compare.group=c("A","B") to
get DMP value between group A and group B.

[ Section 1: Calculate DMP Start ]

You pheno is character type.

Your pheno information contains following groups. >>

<Cellline>:12 samples.

<Coriell>:4 samples.

Your pheno contains EXACTLY two phenotypes, which is good, compare.group is
not needed.

Calculating DMP

[=====]

[<<<<< ChAMP.DMP START >>>>]

-----

!!! Important !!! New Modification has been made on champ.DMP():
```

(1): In this version champ.DMP() if your pheno parameter contains more than two groups of phenotypes, champ.DMP() would do pairwise differential methylation analysis between each pair of them. But you can also specify compare.group to only do comparison between any two of them.

(2): champ.DMP() now support numeric as pheno, and will do linear regression on them. So covariates like age could be inputted in this function. You need to make sure your inputted "pheno" parameter is "numeric" type.

[Section 1: Check Input Pheno Start]

You pheno is character type.

Your pheno information contains following groups. >>

<Cellline>:12 samples.

<Coriell>:4 samples.

[The power of statistics analysis on groups contain very few samples may not strong.]

pheno contains only 2 phenotypes

compare.group parameter is NULL, two pheno types will be added into Compare List.

Cellline_to_Coriell compare group : Cellline, Coriell

[Section 1: Check Input Pheno Done]

[Section 2: Find Differential Methylated CpGs Start]

Start to Compare : Cellline, Coriell

Contrast Matrix

	Contrasts
Levels	pCoriell-pCellline
pCellline	-1
pCoriell	1

You have found 832552 significant MVPs with a BH adjusted P-value below 1.

Calculate DMP for Cellline and Coriell done.

[Section 2: Find Numeric Vector Related CpGs Done]

[Section 3: Match Annotation Start]

[Section 3: Match Annotation Done]

[<<<<< ChAMP.DMP END >>>>>]

[=====]

[You may want to process DMP.GUI() or champ.GSEA() next.]

[Section 1: Calculate DMP Done]

[Section 2: Mapping DMR to annotation Start]

Generating Annotation File

Generating Annotation File Success

[Section 2: Mapping DMR to annotation Done]

Listening on http://127.0.0.1:4132