Seurat tutorial

Anne Brussaard

2025-05-26

Deelvraag: Kan ik door het volgen van een tutorial met Seurat data preprocessing en visualisatie uitvoeren op de uitgreikte data? Om deze deelvraag te beantwoorden zal het volgende flowschema aangehouden worden.

1. De data wordt geladen
2. Er wordt een Seurat object gemaakt
3. De filterstappen worden uitgevoerd
4. Clusters worden visueel gemaakt

De commands worden uitgevoerd in het environment project_brie2. project_brie2 geeft de mogelijkheid om te werken met seurat-4.4.0. Dit script wordt vervolgens gemaakt via de terminal waarin R wordt geopend met het command rmarkdown::render()

Eerst worden de packages geladen. Seurat voor analyse, dplyr voor filteren en selecteren en patchwork voor maken van plots.

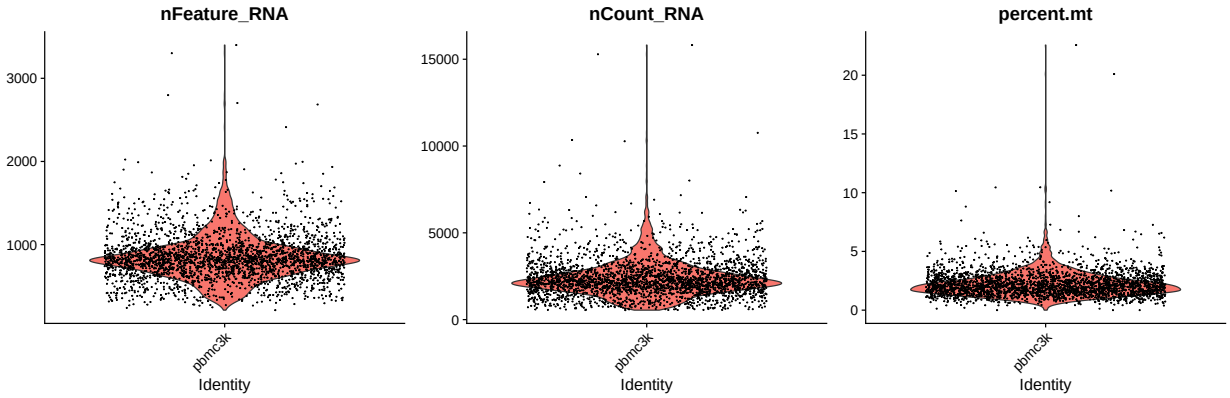
Stap 1: De data wordt ingeladen de data is gedownload van vignettes/pbmc3k_tutorial. Het is een data set van PMBC cellen waarbij 2700 losse cellen zijn gesequenced met Illumina Next Seq 500. Deze data wordt ingeladen.

Stap 2.1: Er wordt een Seurat object gemaakt. De data wordt vervolgens met behulp van de packages seurat opgeslagen als object e zodat dit gebruikt kan worden voor preprocessing en data analyse.

Stap 2.2: De 0 values worden weg gefilterd en een compactere versie van het object wordt opgeslagen. Deze worden namelijk niet gebruikt en nemen wel veel geheugen in beslag.

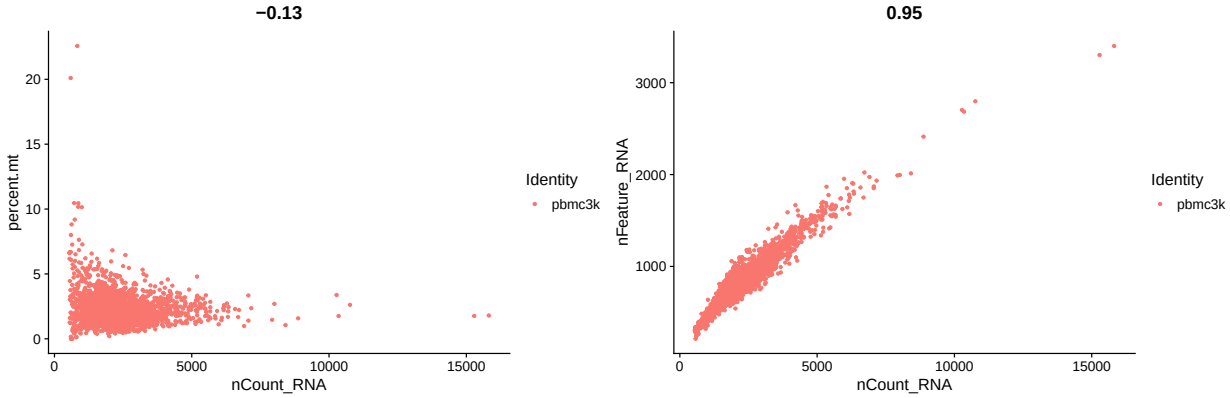
Stap 3.1: Kwaliteits check uitvoeren en cellen selecteren voor analyse. Om de betrouwbaarheid van de analyse te waarborgen wordt eerst gekeken naar welke cellen meegenomen worden voor analyse. Daarvoor wordt eerst het percentage mitochondriale RNA toegevoegd aan het seurat object die los is aangeleverd vanuit de tutorial.

Stap 3.2:Om de kwaliteit van de data te beoordelen wordt deze gevisualiseerd in een violin plot van nFeature_RNA (unieke genen per cel), nCount_RNA (totaal aantal moleculen), en percent.mt (mitochondriale expressie). Een laag aantal unieke genen of moleculen kan namelijk wijzen op lege of slechte kwaliteit van de cellen. En te hoog kan wijzen op dubbele metingen. Het mitochondriaal percentage wordt gebruikt om te kijken naar dode of slechte kwaliteit van cellen, een te hoog percentage wijst hier namelijk op. In deze data ligt de mitochondriale expressie voor de meeste cellen bij 5%. De cellen die daar boven liggen worden dus als minder betrouwbaar gezien.



In deze violin plot wordt dit weergeven en is te zien hoe de data verdeeld is. Optimaal is om zo veel mogelijk van deze data mee te nemen.

Stap 3.3:Visualisatie in Feautre Scatter. Om de relatie tussen de nCount en percent.mt of nFeature aan te geven wordt de pearson correlatie geanalyseerd. deze is voor nCount en nFeature 0.95 wat aangeeft dat het een sterke correlatie heeft. Voor nCount en percent.mt is deze -0.13 wat wijst op geen directe correlatie. De correlatie tussen nFeature en percentage.mt wordt hierin niet meegenomen omdat een hoog percentage MT kan samengaan met een zowel hoog of laag nFeature terwijl slechte kwaliteit vaak een hoge MT en een lage nCount heeft. Daarom is de correlatie van nFeature met percentage MT minder informatief over de kwaliteit.



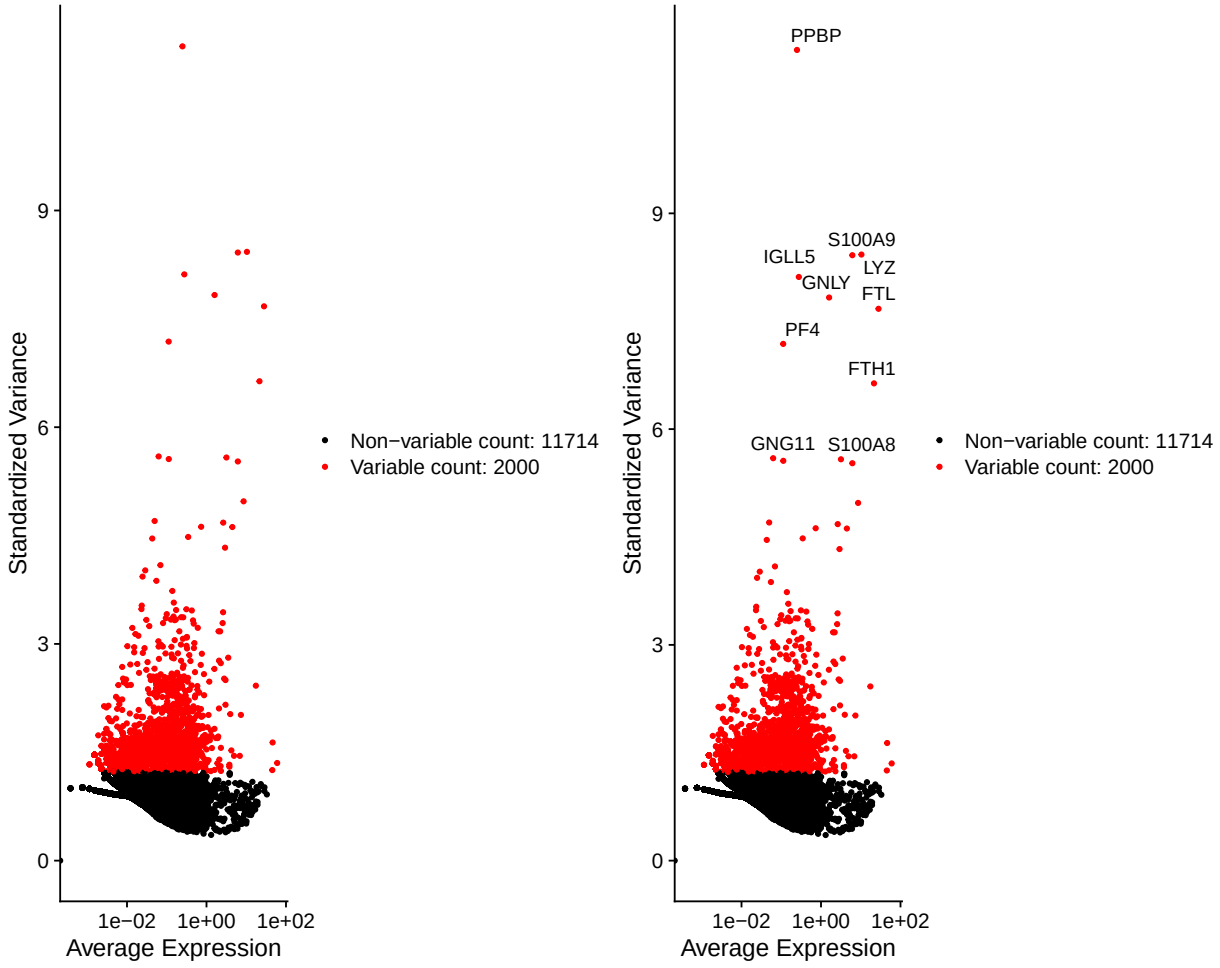
Stap 3.4.Filtering Voor de filtering is bij de tutorial is gekozen voor >200 gene expression (lage of lege droplets hebben vaak weinig genen), <2500 cellen met veel genen (dubbel getelde droplets hebben vaak hoge genen), <5 mitochondriale expression (hogere MT expressie komt vaak door lage kwaliteit van de cel)

Stap 3.5.Normalisatie van data volgens standaard normalisatie. Er is een veel gebruikte schaling methode gebruikt waarbij de feature expressie van iedere cel genormaliseerd wordt voor de normale expressie. Zodat bij analyse gerekend wordt met het zelfde aantal RNA moleculen voor iedere cel. Dit wordt gedaan door daarna te schalen met factor 10000 en log te transformeren. De log transformatie is nodig om te zorgen dan genen met hoge counts vergelijkbaar is met genen met lage counts. Ook helpt het bij het normaal verdelen van de data voor PCA analyse.

Stap 3.6.Feature selection. De genen die veel verschil in expressie hebben per cel worden geselecteerd. Uit eerder onderzoek is namelijk gebleken dat focus op deze genen helpt bij downstream analyse van biologisch signaal in single cell datasets. Er zijn hier 2000 features voor een data set om de analyse werkbaar te houden voor de server.

Stap 3.6. De 10 meest variabele genen worden geselecteerd.

Stap 3.7. De 10 meest variable genen worden geplot. Hierin worden zijn de zwarte stippen die niet variabel zijn en niet meegenomen worden bij verdere analyse. De rode stippen zijn de variabele genen en de top tien meest variabele genen zijn aangegeven met een label.



- Deze stap had eerst moeten worden uitgevoerd maar omdat de tutorial dienst als verkennen/verdiepen van de tool heb ik voor nu dit laten staan. Normaal gesproken moet inderdaad eerst de normalisatie uitgevoerd worden en daarna het selecteren van de meest variabelen cellen zodat deze op een eerlijke manier worden verkegen.

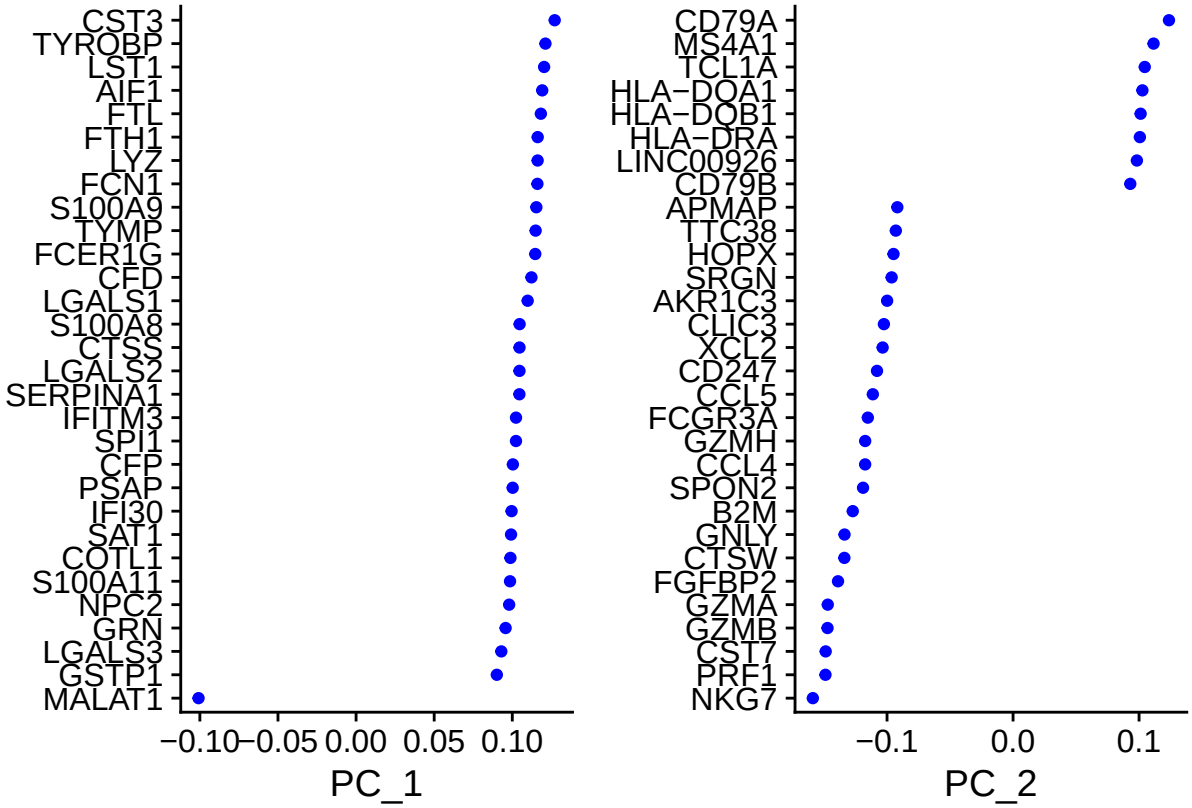
Stap 3.8. De data wordt geschaalt volgens standaard proceduren voor PCA analyse. Hierbij wordt de expressie van alle genen gelijk zodat de hoeveelheid expressie geen invloed heeft in de verdere analyse.

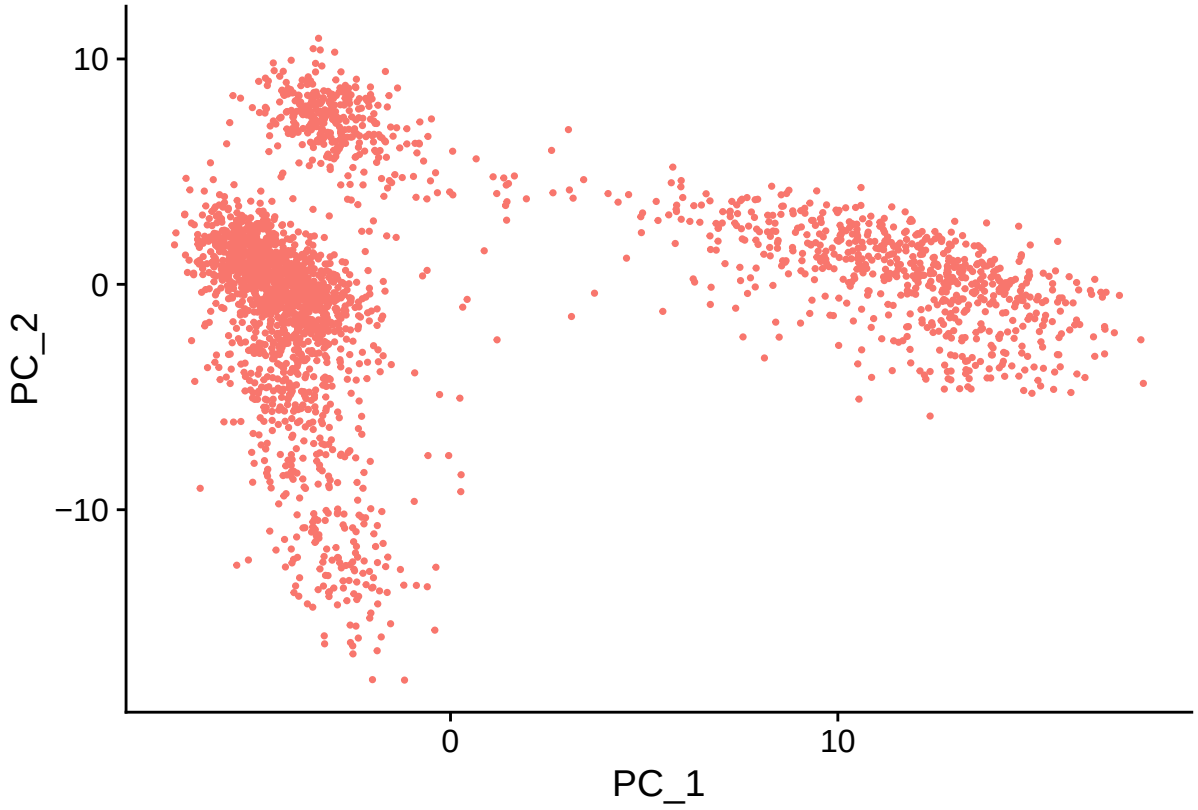
Stap 3.9. De PCA analyse wordt uitgevoerd en gevisualiseerd. Dit wordt gedaan om de data te analyseren op genexpressie patronen. Daarna kan dan bepaald worden hoeveel van deze patronen worden

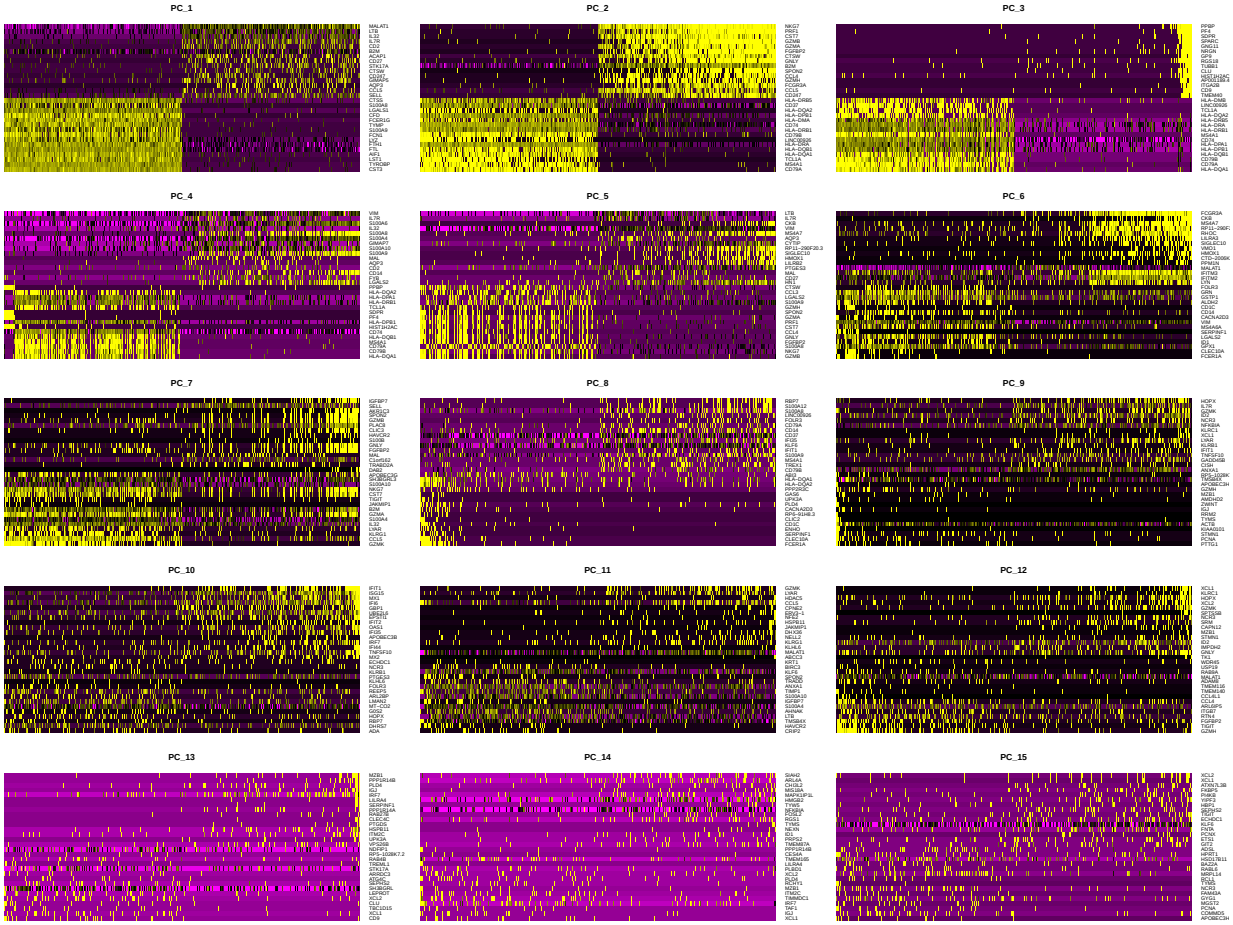
```
## PC_ 1
## Positive:  CST3, TYROBP, LST1, AIF1, FTL, FTH1, LYZ, FCN1, S100A9, TYMP
##     FCER1G, CFD, LGALS1, S100A8, CTSS, LGALS2, SERPINA1, IFITM3, SPI1, CFP
##     PSAP, IFI30, SAT1, COTL1, S100A11, NPC2, GRN, LGALS3, GSTP1, PYCARD
```

```
## Negative:  MALAT1, LTB, IL32, IL7R, CD2, B2M, ACAP1, CD27, STK17A, CTSW
##     CD247, GIMAP5, AQP3, CCL5, SELL, TRAF3IP3, GZMA, MAL, CST7, ITM2A
##     MYC, GIMAP7, HOPX, BEX2, LDLRAP1, GZMK, ETS1, ZAP70, TNFAIP8, RIC3
## PC_ 2
## Positive:  CD79A, MS4A1, TCL1A, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, LINC00926, CD79B, HLA-DRB1, CD74
##     HLA-DMA, HLA-DPB1, HLA-DQA2, CD37, HLA-DRB5, HLA-DMB, HLA-DPA1, FCRLA, HVCN1, LTB
##     BLNK, P2RX5, IGLL5, IRF8, SWAP70, ARHGAP24, FCGR2B, SMIM14, PPP1R14A, C16orf74
## Negative:  NKG7, PRF1, CST7, GZMB, GZMA, FGFBP2, CTSW, GNLY, B2M, SPON2
##     CCL4, GZMH, FCGR3A, CCL5, CD247, XCL2, CLIC3, AKR1C3, SRGN, HOPX
##     TTC38, APMAP, CTSC, S100A4, IGFBP7, ANXA1, ID2, IL32, XCL1, RHOC
## PC_ 3
## Positive:  HLA-DQA1, CD79A, CD79B, HLA-DQB1, HLA-DPB1, HLA-DPA1, CD74, MS4A1, HLA-DRB1, HLA-DRA
##     HLA-DRB5, HLA-DQA2, TCL1A, LINC00926, HLA-DMB, HLA-DMA, CD37, HVCN1, FCRLA, IRF8
##     PLAC8, BLNK, MALAT1, SMIM14, PLD4, P2RX5, IGLL5, LAT2, SWAP70, FCGR2B
## Negative:  PPBP, PF4, SDPR, SPARC, GNG11, NRGN, GP9, RGS18, TUBB1, CLU
##     HIST1H2AC, AP001189.4, ITGA2B, CD9, TMEM40, PTCRA, CA2, ACRBP, MMD, TREML1
##     NGFRAP1, F13A1, SEPT5, RUFY1, TSC22D1, MPP1, CMTM5, RP11-367G6.3, MYL9, GP1BA
## PC_ 4
## Positive:  HLA-DQA1, CD79B, CD79A, MS4A1, HLA-DQB1, CD74, HIST1H2AC, HLA-DPB1, PF4, SDPR
##     TCL1A, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DQA2, PPBP, HLA-DRA, LINC00926, GNG11, SPARC, HLA-DRB5
##     GP9, AP001189.4, CA2, PTCRA, CD9, NRGN, RGS18, CLU, TUBB1, GZMB
## Negative:  VIM, IL7R, S100A6, IL32, S100A8, S100A4, GIMAP7, S100A10, S100A9, MAL
##     AQP3, CD2, CD14, FYB, LGALS2, GIMAP4, ANXA1, CD27, FCN1, RBP7
##     LYZ, S100A11, GIMAP5, MS4A6A, S100A12, FOLR3, TRABD2A, AIF1, IL8, IFI6
## PC_ 5
## Positive:  GZMB, NKG7, S100A8, FGFBP2, GNLY, CCL4, CST7, PRF1, GZMA, SPON2
##     GZMH, S100A9, LGALS2, CCL3, CTSW, XCL2, CD14, CLIC3, S100A12, RBP7
##     CCL5, MS4A6A, GSTP1, FOLR3, IGFBP7, TYROBP, TTC38, AKR1C3, XCL1, HOPX
## Negative:  LTB, IL7R, CKB, VIM, MS4A7, AQP3, CYTIP, RP11-290F20.3, SIGLEC10, HMOX1
##     LILRB2, PTGES3, MAL, CD27, HN1, CD2, GDI2, CORO1B, ANXA5, TUBA1B
##     FAM110A, ATP1A1, TRADD, PPA1, CCDC109B, ABRACL, CTD-2006K23.1, WARS, VMO1, FYB

## PC_ 1
## Positive:  CST3, TYROBP, LST1, AIF1, FTL
## Negative:  MALAT1, LTB, IL32, IL7R, CD2
## PC_ 2
## Positive:  CD79A, MS4A1, TCL1A, HLA-DQA1, HLA-DQB1
## Negative:  NKG7, PRF1, CST7, GZMB, GZMA
## PC_ 3
## Positive:  HLA-DQA1, CD79A, CD79B, HLA-DQB1, HLA-DPB1
## Negative:  PPBP, PF4, SDPR, SPARC, GNG11
## PC_ 4
## Positive:  HLA-DQA1, CD79B, CD79A, MS4A1, HLA-DQB1
## Negative:  VIM, IL7R, S100A6, IL32, S100A8
## PC_ 5
## Positive:  GZMB, NKG7, S100A8, FGFBP2, GNLY
## Negative:  LTB, IL7R, CKB, VIM, MS4A7
```

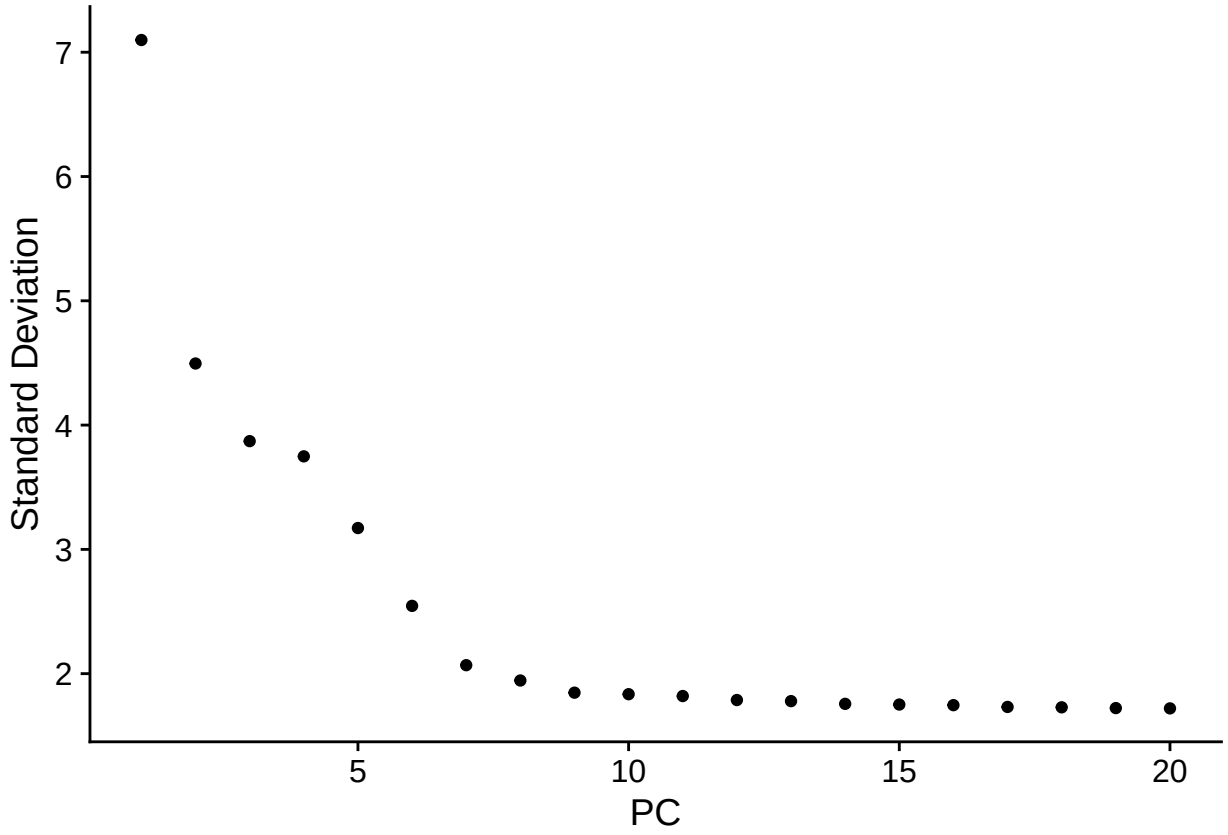

CST3
TYROBP
LST1
AIF1
FTL
FTH1
LYZ
FCN1
S100A9
TYMP
FCER1G
CFD
LGALS1
S100A8
CTSS
LGALS2
SERPINA1
IFITM3
SPI1
CFP
PSAP
IFI30
SAT1
COTL1
S100A11
NPC2
GRN
LGALS3
GSTP1
MALAT1
−0.10
−0.05
0.00
0.05
0.10
PC_1
CD79A
MS4A1
TCL1A
HLA−DQA1
HLA−DQB1
HLA−DRA
LINC00926
CD79B
APMAP
TTC38
HOPX
SRGN
AKR1C3
CLIC3
XCL2
CD247
CCL5
FCGR3A
GZMH
CCL4
SPON2
B2M
GNLY
CTSW
FGFBP2
GZMA
GZMB
CST7
PRF1
NKG7
−0.1
0.0
0.1
PC_2


10
0
−10
PC_2
0
10
PC_1



De uitgevoerde PCA analyse wordt op verschillende manieren gevisuliseerd.

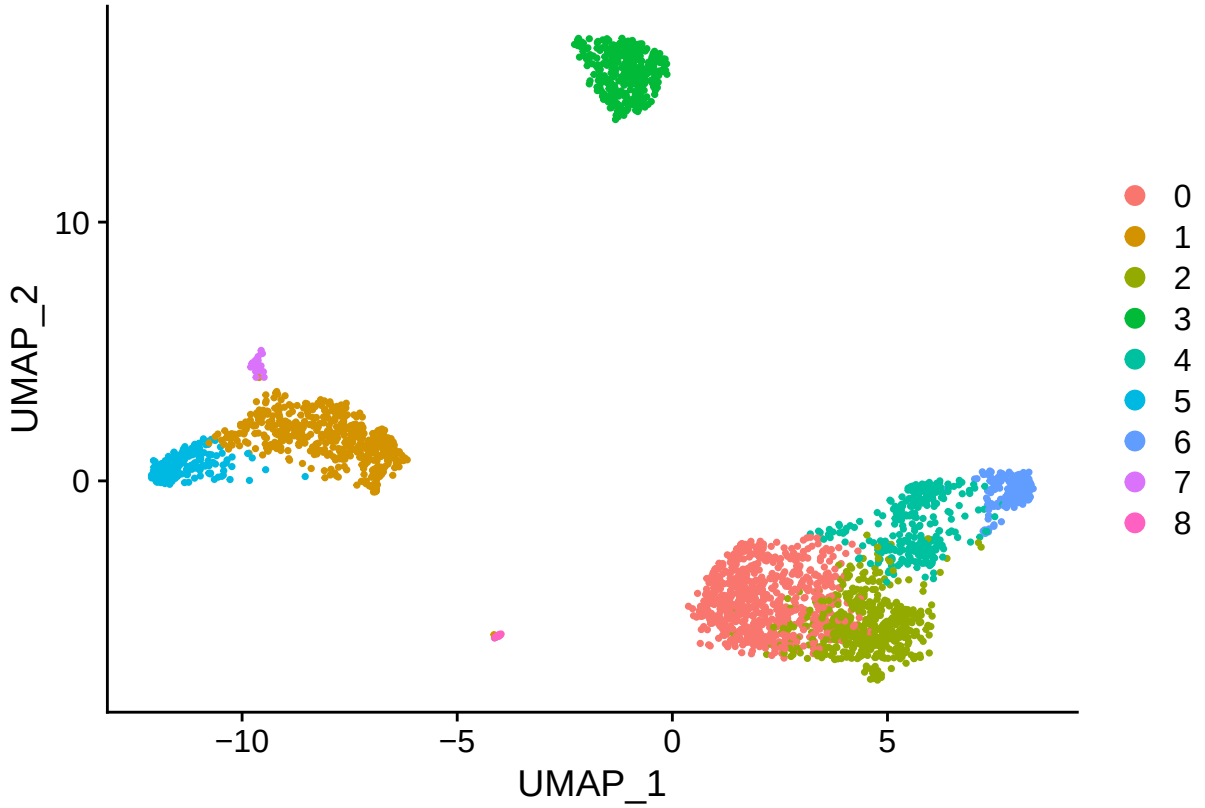
Stap 3.10.De dimentie van het dataset wordt bepaald. Hierin worden de PC's weergeven Vanuit deze afbeelding wordt bepaald welke soorten expressie patronen er zijn binnen het data set. De elbowplot wordt vervolgens gebruikt om te bepalen welke PC's er worden meegenomen in verdere analyse.



Op basis van deze ElbowPlot zijn de eerste 10 PCs geselecteerd omdat de “elbow” stopt rond PC9-10, wat wijst op een signaal in de eerste 10 PCs.

Stap 3.11. De cellen worden geclusterd op basis van de eerste 10 PCs.

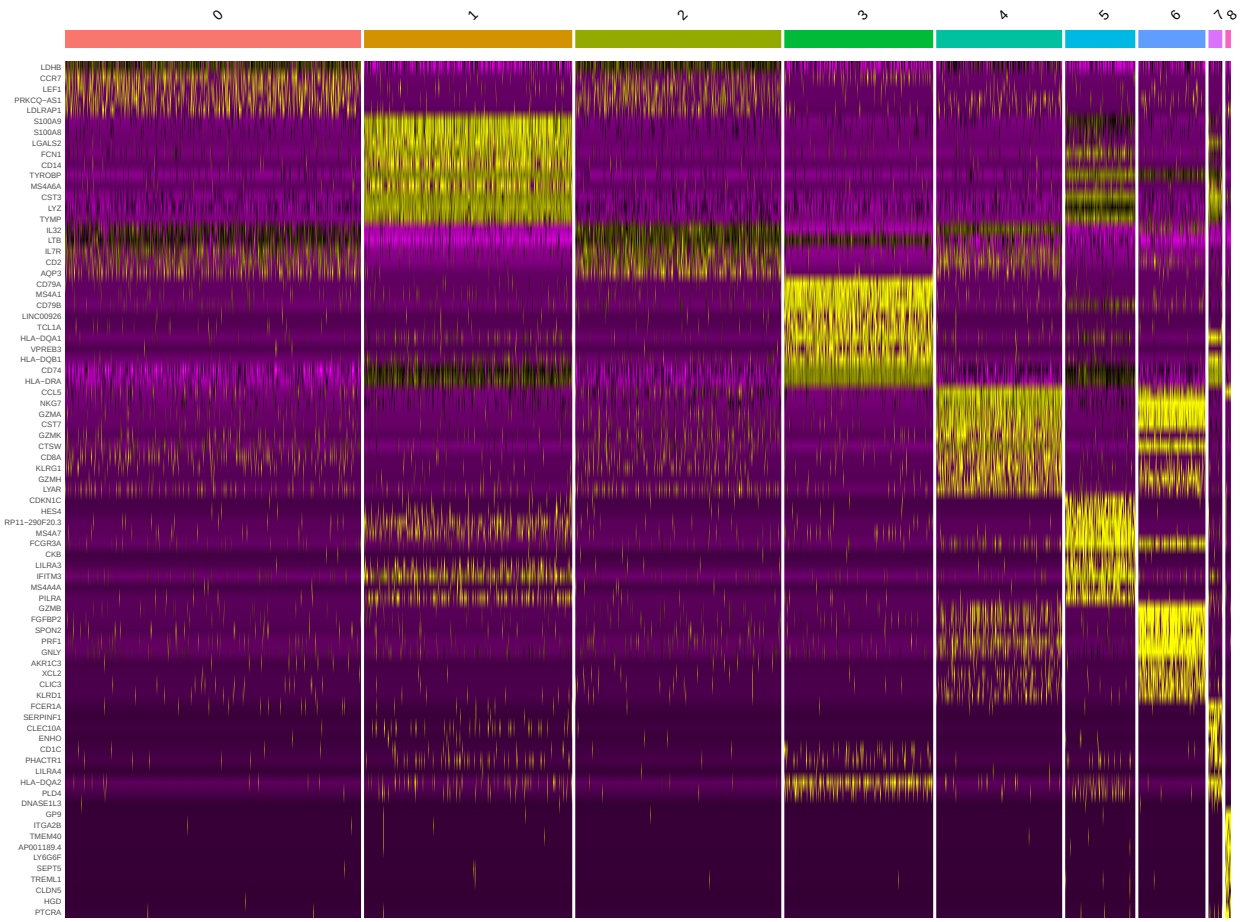
Stap 4.1 De UMAP maken. De gevormde clusters worden weergeven aan de hand van 10 PCs. In deze UMAP wordt weergeven welke clusters er zijn en hoe deze zijn verdeeld.



Stap 5.1 Cluster biomarkers vinden Alle markers van alle clusters worden gevonden en alleen de positieve worden gerapporteerd. Dit is belangrijk om te bepalen wat voor cellen er in de clusters zitten, en kan gebruikt worden om te bepalen welke clusters biologisch relevant zijn voor verder onderzoek.

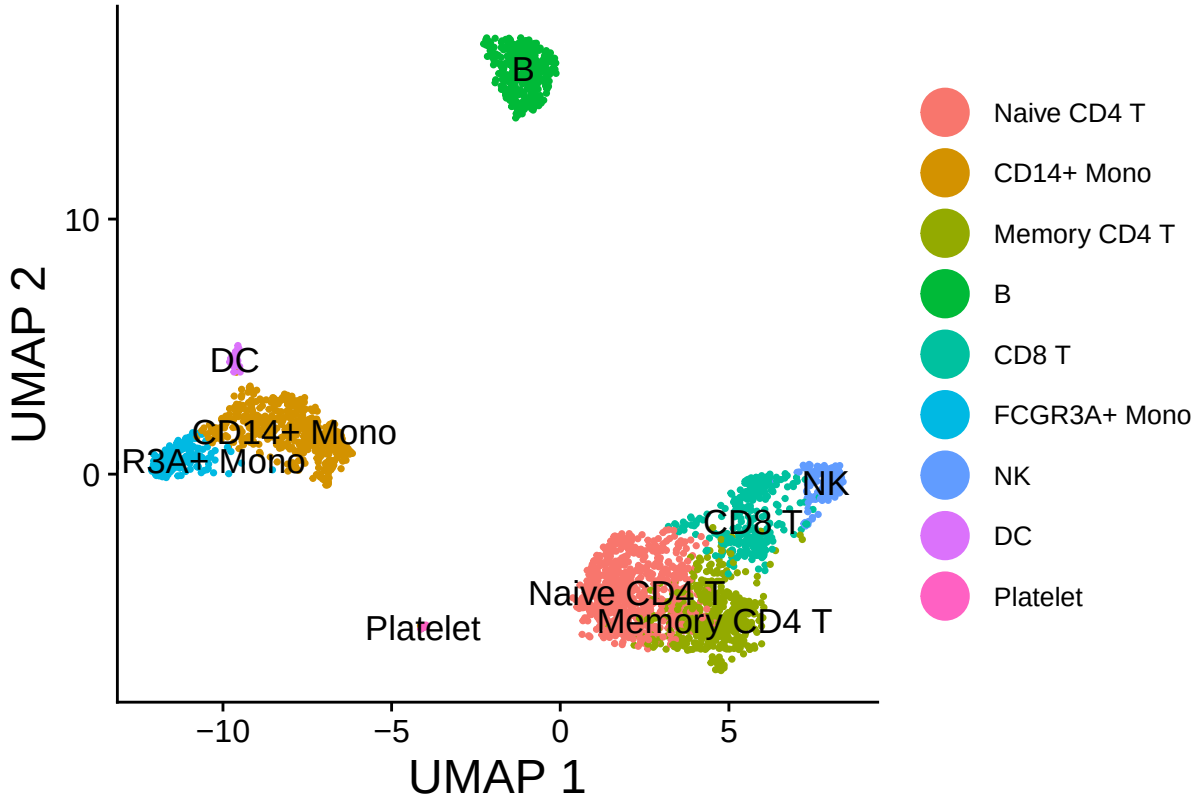
```
## # A tibble: 939 x 7
## # Groups:   cluster [9]
##        p_val avg_log2FC pct.1 pct.2 p_val_adj cluster gene
##        <dbl>      <dbl> <dbl> <dbl>     <dbl> <fct>   <chr>
##  1 3.75e-112       1.09 0.912 0.592 5.14e-108 0       LDHB
##  2 9.57e- 88       1.36 0.447 0.108 1.31e- 83 0       CCR7
##  3 1.35e- 51       1.08 0.342 0.103 1.86e- 47 0       LEF1
##  4 6.27e- 43       1.02 0.33  0.112 8.60e- 39 0       PRKCQ-AS1
##  5 6.26e- 30       1.10 0.247 0.085 8.59e- 26 0       LDLRAP1
##  6 0               5.57 0.996 0.215 0         1       S100A9
##  7 0               5.48 0.975 0.121 0         1       S100A8
##  8 0               3.81 0.909 0.059 0         1       LGALS2
##  9 0               3.40 0.952 0.15  0         1       FCN1
## 10 1.03e-295       2.82 0.667 0.027 1.42e-291 1       CD14
## # i 929 more rows
```

Stap 5.2 Een heatmap wordt gemaakt voor de top 20 markers. Er wordt aangegeven in welke clusters de genen voorkomen.



Stap 5.3. De cell type worden aan de clusters gekoppeld.

Stap 5.4. Er wordt een UMAP gemaakt waarin wordt aangegeven welk cluster welk celtype is.



Conclusie: Het is gelukt om door het volgen van de tutorial de preprocessing en visulalisatie van de aangereikte data uit te voeren.