PEC 2

Ànnia Castillo Niell

PEC 2

TAULA DE CONTINGUTS

INTRODUCCIÓ

Aquest és el document generat per la PEC2. Està vinculat al repositori de github https://github.com/acniell/PEC2.git. Es mostren tots els bloc de codi que s'han fet servir, tot i que no tots tindran sortida en el document. Els gràfics no són la generació directa dels chunks de codi per evitar sobrecarregar el document i la RAM, són imatges adjuntes de menor resolució i es troben a l'apartat d'apèndix. Per millorar la visualització en cas que es vulgui veure'ls amb més claredat, caldria correr el codi per a generar la imatge.

INFORME DE L'ANÀLISI

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

Les bactèries multiresistents són un dels gran problemes del sistema sanitari, i que està en augment en l'actualitat, cosa que justifica la investigació pel desenvolupament d'antibiòtics per poder continuar tractant les infeccions. Una de les primeres bactèries que es van identificar va ser Staphylococcus aureus, un coc gram positiu, que amb el desenvolupament de les penicil·lines, ràpidament es va fer resistent a aquestes . El que presenten fenotip de resistència s'anomenen MRSA (methicillin resistant staphylococcus aureus) i es va aïllar el 1960 a nivell hospitalari. I tot i que no està present en totes les comunitats, cada vegada és més comú el MRSA comunitari (1980-1990 ja es detecta a Austràlia i EEUU). Per tant, s'han hagut d'anar desenvolupant antibiòtics per poder anar tractant les diferents bactèries multiresistents que van sorgint, i dos dels antibiòtics considerats fins ara de primera línia contra MRSA són el linezolid i la vancomicina (actualment també s'ha comercialitzat la ceftarolina que també és efectiva contra aquest i està disponible als hospitals ICS).

L'estudi original d'on hem extret les dades està disponible a https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE38531, i es van analitzar ratolins infectats i no infectats per MRSA (específicament MRSA USA-300), i no tracts i tractats (amb vanco o line). En aquests es va mirar la producció de toxines bacterianes i citocines, així com les diferències en l'expressió gènica dels diferents grups per intentar identificar quin antibiòtic és més efectiu en el tractament de la infecció per MRSA.

En el nostre cas, volem comparar l'efecte de no tractar vs tractar, i dins d'aquest segon grup el tractament amb line o vanco. L'efecte del tractament el mirarem segons l'expressió gènica que presenta cada grup i quines diferents vies implicades i hi ha, per així poder inferir si un dels dos antibiòtic és més efectiu que l'altre. Utilitzarem només 24 mostres de les recollides a l'estudi mencionat anteriorment i es crearan 3 comparacions:

- Ratolins infectats vs. no infectats sense tractament.
- Ratolins infectats vs. no infectats tractats amb linezolid.

- Ratolins infectats vs. no infectats tractats amb vancomicina.

MÈTODES

Com s'ha mencionat anteriorment, les dades utilitzades són les pertanyents a l'estudi GSE38531 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE38531), de les quals s'ha aplicat un procés de selecció aleatòria per obtenir 24 mostres. L'anàlisi per tant s'ha aplicat a aquest subgrup de 24 mostres.

S'ha realitzat un procés d'anàlisi de qualitat, normalització i filtratge de les dades per poder realitzar les diferents comparacions entre grups. De les mostres, s'han seleccionat els gens amb més variabilitat (el 10% amb més variabilitat) que han estat un total de 4511. Per la comparació de grups, s'ha construit la matriu de disseny i així crear els grups de comparació mencionats anteriorment. Per a cada contrast s'han analitzat els gens diferencialment expressats i s'han seleccionat els que es consideren significatius amb els criteris de p valor ajustat<0.05 i logFC>1.

Per poder interpretar els resultats obtinguts, s'ha aplicat un procés d'anotació utilitzant Gene Ontology i associant els resultats especialment als identificadors d'ENTREZ i descriptors.

Finalment s'ha realitzar l'anàlisi de significació biològica per identificar les vies biològiques implicades en aquests gens diferencialment expressats i s'han comparat els resultats entre els diferents grups.

RESULTATS

Després de l'anàlisi realitzat hem trobat que: amb el subgrup de mostres analitzades, no hi ha expressió diferencial de gens entre els grups de no infectat i infectat que **NO** han rebut tractament. **Sí** que hem trobat diferències en els grups que han estat tractats amb vancomicina i linezolid. D'aquests grups, el que crida més l'atenció és que d'aquests gens diferencialment expressats, tenen tendència a estar infra expressats i són molt similars les troballes entre la vancomicina i el linezolid (tot i que no idèntiques).

Això suggereix que l'efecte biològic d'aquests antibiòtics en els ratolins és similar, cosa que lògicament també és coherent ja que són dos fàrmacs efectius contra la infecció per MRSA.

Les vies que es veuen sobretot implicades són aquelles relacionades amb el sistema immunitari: regulació de la resposta innata, adhesió cel·lular, activació cel·lular i leucocitària, differenciació leucocitària... i són comunes tant a la vancomicina com el linezolid.

DISCUSSIÓ

Amb els resultats obtinguts hi ha vàries coses que criden l'atenció:

- En primer lloc, crida l'atenció que no hi hagi expressión diferencial de gens en ratolins infectats i no infectats. El sentit comú diu que davant una infecció hi ha d'haver certes vies de resposta immunitària destinades a defensar l'organisme que haurien d'estar molt més activades en els ratolins infectats, ja que és el nostre sistema de defensa. Per tant, no trobar diferències en aquest grup de comparació és motl estrany. Podria ser que hi hagués un error ens càlculs realitzats o bé que el resultat trobat no sigui extrapolable perquè hem realitzat l'anàlisi amb un subgrup de mostres i no el dataset sencer.

- En segon lloc s'ha evidenciat que el fet de rebre tractament antibiòtic modula de forma clara la resposta immunitària a l'hoste. Tot i així, destaca però la GRAN similitud dels resultats obtinguts amb linezolid i vancomicina.
  El linezolid és una oxazolidinona i la vancomicina és un glucopèptid, dues famílies diferents d'antibiòtics i que són efectives contra la infecció per MRSA però per vies diferents. Per tant, també sorprèn molt que presentant mecanismes d'acció diferents tinguin un resultat tan similar. El resultat final però d'aquestes vies està clar i és a disminuir la càrrega bacteriana a l'hoste.

- Per últim, destacar que el que veiem és una diminució en l'activació d'aquestes vies, no una sobreactivació. Tot i que el primer que es pot reflexionar és que hauria de ser a l'inversa, ja que l'organisme ha de lluitar contra la infecció, en la sèpsia està descrit que la resposta immune pot ser excessiva, passant a ser perjudicial. Podria ser que precisament l'administració d'antibiòtic equilibrés les respostes immunes, evitant una sobreinflamació en l'hoste, i per tant traduint-se a infraexpressió gènica.

REFERÈNCIES

- Guies mèdiques de Surviving sepsis campaign. Maneig òptim del codi sèptic en els humans: https://www.sccm.org/clinical-resources/guidelines/guidelines/surviving-sepsis-guidelines-2021
- Història de MRSA: https://www.health.state.mn.us/diseases/staph/mrsa/basics.html
- III update d'infeccions multiresistents (MRSA) organitzat per SOCMIC el 11 de desmebre del 2014 a l'Hospital Dr. Josep Trueta de Girona: presentació power point de la sessió cedida per Dra. Lopez de Arbina.
- Documentació de l'assignatura anàlisi de dades òmiques UOC. Semestre hivern 2024-2025.

APÈNDIX

PREPARACIÓ DE LES DADES

Carreguem l'arxiu de allTargets per fer la selecció.

```
allTargets <- read.table("allTargets.txt", header = TRUE, se
```

Apliquem el codi cedit:

```
filter_microarray <- function(allTargets, seed =123) {
  set.seed(seed)
  filtered <- subset(allTargets, time != "hour 2")

  # Dividir el dataset por grupos únicos de 'infection' + 'a
  filtered$group <- interaction(filtered$infection, filtered

  # Seleccionar 4 muestras al azar de cada grupo
  selected <- do.call(rbind, lapply(split(filtered, filtered
    if (nrow(group_data) > 4) {
      group_data[sample(1:nrow(group_data), 4), ]
    } else {
      group_data
    }
  }))
```

```
  # Obtener los índices originales como nombres de las filas
  original_indices <- match(selected$sample, allTargets$samp

  # Modificar los rownames usando 'sample' y los índices ori
  rownames(selected) <- paste0(selected$sample, ".", origina

  # Eliminar la columna 'group' y devolver el resultado
  selected$group <- NULL
  return(selected)
}
```

Fem la selecció aleatòria i la guardem en un nou fitxer per si el necessitem a posteriori. En aquest cas farem servir el número de DNI per l'aleatorització.

```
# Aplicar la función (cambiar 123 por vuestro ID de la UOC u
resultat_mostra <- filter_microarray(allTargets, seed=415774
print(resultat_mostra)

### Aprofitarem i ajustarem ara els noms, perquè no s'havia

resultat_mostra$infection <- gsub("S\\. aureus USA300", "aur
resultat_mostra$time <- gsub("hour ", "", resultat_mostra$ti
resultat_mostra$agent <- gsub("linezolid", "line", gsub("van
resultat_mostra$nom <- paste0(
  sub("GSM944", "", resultat_mostra$sample), "_",
  resultat_mostra$infection, "_",
  resultat_mostra$time, "_",
  resultat_mostra$agent
)

write.table(resultat_mostra, file = file.path(dataDir, "most
            sep = "\t", row.names = FALSE)
```

Ja tenim una selecció de 24 mostres aleatòries del dataset amb les que treballar.

Ara tenim dues opcions: o descarreguem de la pàgina de GEO el supplementary File amb els arxius CEL a dins i seleccionem els que havien sortit amb la selecció aleatòria o bé treballem amb el fitxer

"series matrix" disponible a la pàgina de GEO. Mostrem primer com es faria amb la segona opció, però treballarem amb la primera (descàrrega a l'entorn local del fitxers CEL).

TREBALLAR AMB GSE38531_SERIES_MATRIX.TXT

```
BiocManager::install("GEOquery")
library(GEOquery)
GSE38531<-getGEO("GSE38531", GSEMatrix = TRUE, parseCharacte
```

Ara accedirem als diferents blocs d'informació per veure que estigui tot correcte a primera vista:

```
ES<- GSE38531[[1]]
matriu_expressio<-exprs(ES)
head(matriu_expressio)
fenodata<-pData(ES)
head(fenodata)
```

Ara volem agafar només la informació les mostres que hem seleccionat amb l'aleatorització.

```
mostres <- read.table(file.path(dataDir, "mostra_seleccionad
                      header = TRUE, sep = "\t", stringsAsFa
noms_mostra<-mostres$nom #llista dels que volem.
```

```
sampleNames(ES)->noms_ES
coincidencies<-intersect(noms_mostra, noms_ES)
coincidencies #veiem que efectivament hi ha 24 elements a la
ES2<-ES[,coincidencies]
ES2
```

Ja tenim creat el nostre expressionSet amb la mostra que hem seleccionat aleatòriament.

```
#ens el guardem per si el necessitem més tard naive
write.csv(exprs(ES2), file = file.path(dataDir, "ES2.csv"))
```

DESCÀRREGA DELS FITXERS CEL A L'ENTORN LOCAL

A la pàgina web de GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE38531) veiem que hi ha un arxiu anomenat Supplementary File on tenim tots els arxius CEL. Una vegada descarregats, eliminem els que no ens interessen després de fer la selecció aleatòria, ens quedem els que sí, i els hi ajustem el nom:

En aquest cas farem servir la llibreria oligo (els passos estan basats en el document cedit per la UOC "Statistical Analysis of Microarray data" https://aspteaching.github.io/Omics_Data_Analysis-Case_Study_1-Microarrays/Case_Study_1-Microarrays_Analysis.html).

```
library(oligo) #pels elements CEL
library(Biobase)
arxius_CEL <- list.celfiles("/Users/annia/Library/CloudStora
phenoData<-AnnotatedDataFrame(data = mostres)
rawData<-read.celfiles(arxius_CEL, phenoData=phenoData) #cre
```

Ja hem llegit els arxius CEL i hem associat la informació de l'element mostres, que té la selecció aleatòria que hem fet anteriorment.

ANÀLISI EXPLORATÒRIA I CONTROL DE QUALITAT

Prèviament a la normalització, anem a veure la qualitat de les nostres dades i que no hi hagi cap outlier que hàgim de gestionar. Això ho fem amb el paquet arrayQualityMetrics. Els documents generats amb aquesta funció, es poden trobar al repositori github.

```
BiocManager::install("arrayQualityMetrics")
library(arrayQualityMetrics)
```

```
arrayQualityMetrics(rawData, force=FALSE)
```

El document generat ens aporta un informe on podem identificar a través de boxplot i PCA si tenim outliers. En el document mencionat anteriorment de la UOC recomanen revisar els outliers que s'identifiquin com a tal en > o = 3 proves diferents dins la realització d'un estudi de qualitat de les dades. En el nostre cas veiem que es detecta un outlier en dues proves, pel que de moment el mantindrem dins del nostre dataset.

Seguirem per normalitzar les dades que hem generat anteriorment amb RMA tal com es proposa:

```
ESet <- rma(rawData)
rawData
```

Una vegada creat el nostre expressionSet, assegurarem que el nom de les mostres sigui el de la columna sample del fitxer mostres i farem una consulta ràpida dels elements per veure que estiguin bé:

```
mostres$nom
sampleNames(ESet)<-mostres$nom
sampleNames(ESet)
pData(ESet)
head(ESet)
```

DESCRIPCIÓ I DISTRIBUCIÓ DE LES DADES

Una vegada realitzada la normalització, i ens hem assegurat que les dades estan correctament creades, anem a fer una exploració bàsica de les dades que tenim:

```
matriu2<-exprs(ESet)
dim(matriu2)
```

```
## [1] 45101    24
```

```
str(matriu2)
```

```
##  num [1:45101, 1:24] 7.38 10.14 11.05 6.9 8.37 ...
##  - attr(*, "dimnames")=List of 2
##   ..$ : chr [1:45101] "1415670_at" "1415671_at" "1415672_
##   ..$ : chr [1:24] "850_aureus_24_line" "857_aureus_24_li
```

```
head(matriu2)
```

```
##              850_aureus_24_line 857_aureus_24_line 843_au
## 1415670_at             7.377539           7.661332
## 1415671_at            10.140773          10.267031
## 1415672_at            11.054640          10.602395
## 1415673_at             6.896972           6.942270
## 1415674_a_at           8.368597           8.377307
## 1415675_at             7.882178           7.772171
##              864_aureus_24_line 861_uninfected_0_line 840
## 1415670_at             7.438351              7.423553
## 1415671_at            10.389609             10.391099
## 1415672_at            11.401611             10.406412
## 1415673_at             7.019661              6.552072
## 1415674_a_at           8.294469              8.784424
## 1415675_at             7.772919              8.287480
##              847_uninfected_0_line 854_uninfected_0_line
## 1415670_at                6.664764              7.503319
## 1415671_at               10.618936             10.625470
## 1415672_at               10.951508             11.548634
## 1415673_at                6.391413              6.987974
## 1415674_a_at              8.287116              8.294712
## 1415675_at                7.419386              7.957054
##              849_aureus_24_untreated 842_aureus_24_untrea
## 1415670_at                  7.636685                7.512
## 1415671_at                 10.301996               10.271
## 1415672_at                 11.211378               11.166
## 1415673_at                  7.049801                7.066
## 1415674_a_at                8.434156                8.435
## 1415675_at                  7.991979                7.891
##              835_aureus_24_untreated 863_aureus_24_untrea
## 1415670_at                  7.294563                7.203
## 1415671_at                 10.550219               10.534
## 1415672_at                 10.985514               11.249
## 1415673_at                  6.866069                6.526
## 1415674_a_at                8.463667                8.491
```

```
## 1415675_at                  7.876645                7.895
##              845_uninfected_0_untreated 859_uninfected_0_
## 1415670_at                    7.110719
## 1415671_at                   10.678616
## 1415672_at                   11.045148
## 1415673_at                    6.740297
## 1415674_a_at                  8.400129
## 1415675_at                    7.850291
##              852_uninfected_0_untreated 838_uninfected_0_
## 1415670_at                    7.372845
## 1415671_at                   10.214536
## 1415672_at                   11.112127
## 1415673_at                    7.173377
## 1415674_a_at                  8.407017
## 1415675_at                    7.859973
##              844_aureus_24_vanco 851_aureus_24_vanco 858_
## 1415670_at              7.274382            7.092627
## 1415671_at             10.548459           10.481792
## 1415672_at             11.126907           10.772960
## 1415673_at              6.287330            6.773963
## 1415674_a_at            8.477683            8.212788
## 1415675_at              7.743458            7.761416
##              865_aureus_24_vanco 848_uninfected_0_vanco 8
## 1415670_at              7.441754               7.317117
## 1415671_at             10.506133              10.325506
## 1415672_at             11.613814              11.296011
## 1415673_at              7.022686               7.009234
## 1415674_a_at            8.257270               8.349285
## 1415675_at              7.927027               7.955926
##              862_uninfected_0_vanco 855_uninfected_0_vanc
## 1415670_at                7.124336               7.08962
## 1415671_at               10.386109              10.60282
## 1415672_at               10.925898              11.24381
## 1415673_at                6.588123               6.89883
## 1415674_a_at              8.534151               8.49530
```

```
summary(matriu2)
```

```
##  850_aureus_24_line 857_aureus_24_line 843_aureus_24_line
##  Min.   : 2.416     Min.   : 2.468     Min.   : 2.447
##  1st Qu.: 4.391     1st Qu.: 4.411     1st Qu.: 4.435
##  Median : 5.593     Median : 5.593     Median : 5.627
```

```
##  Mean   : 5.866     Mean   : 5.864     Mean   : 5.869
##  3rd Qu.: 6.951     3rd Qu.: 6.917     3rd Qu.: 6.931
##  Max.   :15.103     Max.   :15.147     Max.   :15.111
##  861_uninfected_0_line 840_uninfected_0_line 847_uninfect
##  Min.   : 2.443        Min.   : 2.428        Min.   : 2.4
##  1st Qu.: 4.362        1st Qu.: 4.405        1st Qu.: 4.5
##  Median : 5.546        Median : 5.587        Median : 5.6
##  Mean   : 5.861        Mean   : 5.859        Mean   : 5.8
##  3rd Qu.: 6.910        3rd Qu.: 6.900        3rd Qu.: 6.8
##  Max.   :15.084        Max.   :15.079        Max.   :15.1
##  854_uninfected_0_line 849_aureus_24_untreated 842_aureus
##  Min.   : 2.436        Min.   : 2.421          Min.   : 2
##  1st Qu.: 4.386        1st Qu.: 4.347          1st Qu.: 4
##  Median : 5.593        Median : 5.561          Median : 5
##  Mean   : 5.870        Mean   : 5.870          Mean   : 5
##  3rd Qu.: 6.978        3rd Qu.: 7.004          3rd Qu.: 7
##  Max.   :15.073        Max.   :15.091          Max.   :15
##  835_aureus_24_untreated 863_aureus_24_untreated 845_unin
##  Min.   : 2.480          Min.   : 2.493          Min.   :
##  1st Qu.: 4.410          1st Qu.: 4.409          1st Qu.:
##  Median : 5.601          Median : 5.599          Median :
##  Mean   : 5.861          Mean   : 5.861          Mean   :
##  3rd Qu.: 6.887          3rd Qu.: 6.892          3rd Qu.:
##  Max.   :15.106          Max.   :15.105          Max.   :
##  859_uninfected_0_untreated 852_uninfected_0_untreated
##  Min.   : 2.423             Min.   : 2.405
##  1st Qu.: 4.382             1st Qu.: 4.378
##  Median : 5.595             Median : 5.579
##  Mean   : 5.865             Mean   : 5.870
##  3rd Qu.: 6.958             3rd Qu.: 6.975
##  Max.   :15.068             Max.   :15.100
##  838_uninfected_0_untreated 844_aureus_24_vanco 851_aureu
##  Min.   : 2.434             Min.   : 2.459      Min.   :
##  1st Qu.: 4.311             1st Qu.: 4.409      1st Qu.:
##  Median : 5.525             Median : 5.591      Median :
##  Mean   : 5.871             Mean   : 5.855      Mean   :
##  3rd Qu.: 7.056             3rd Qu.: 6.880      3rd Qu.:
##  Max.   :15.115             Max.   :15.089      Max.   :1
##  858_aureus_24_vanco 865_aureus_24_vanco 848_uninfected_0
##  Min.   : 2.421      Min.   : 2.466      Min.   : 2.476
##  1st Qu.: 4.360      1st Qu.: 4.367      1st Qu.: 4.412
##  Median : 5.571      Median : 5.569      Median : 5.613
##  Mean   : 5.862      Mean   : 5.857      Mean   : 5.866
##  3rd Qu.: 6.987      3rd Qu.: 6.968      3rd Qu.: 6.941
##  Max.   :15.079      Max.   :15.078      Max.   :15.095
```

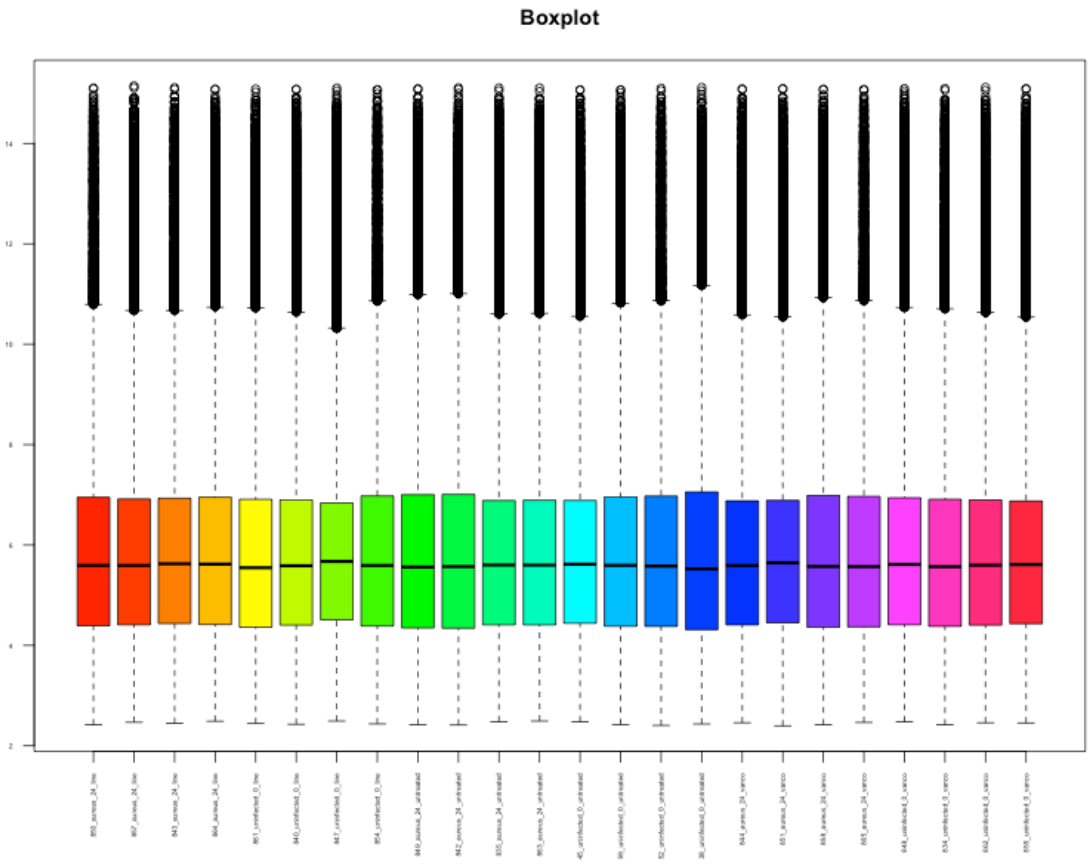
```
##  834_uninfected_0_vanco 862_uninfected_0_vanco 855_uninfe
##  Min.   : 2.416         Min.   : 2.458         Min.   : 2
##  1st Qu.: 4.379         1st Qu.: 4.403         1st Qu.: 4
##  Median : 5.567         Median : 5.598         Median : 5
##  Mean   : 5.863         Mean   : 5.860         Mean   : 5
##  3rd Qu.: 6.911         3rd Qu.: 6.897         3rd Qu.: 6
```

```
sum(is.na(matriu2))
```

```
## [1] 0
```

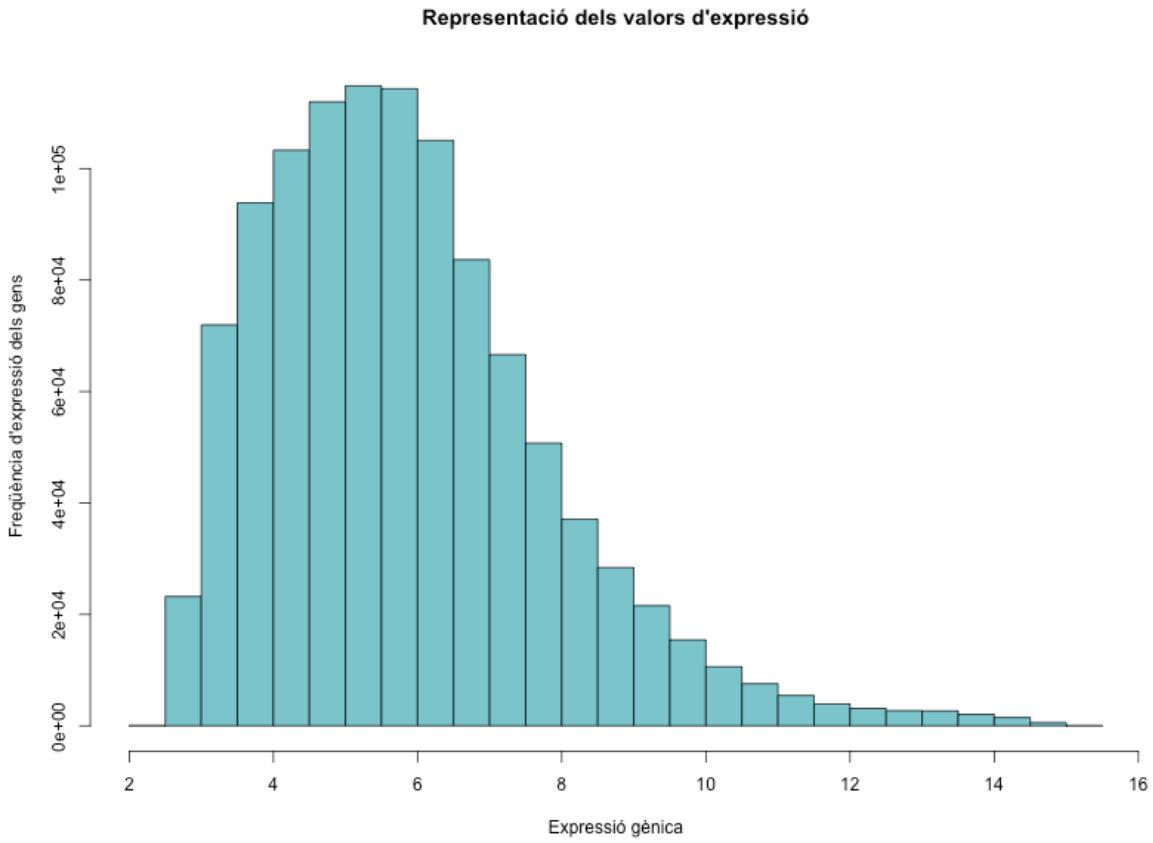
Tot seguit farem una representació gràfica per veure com es distribueixen de forma visual:

```
output_file <- file.path(resultsDir, "boxplot.png")
png(file = output_file, width = 1000, height = 800)
boxplot(matriu2, main="Boxplot", col = rainbow(ncol(matriu2)
dev.off()
```



Veiem que globalment les medianes estan alineades i les distribucions són similars. No s'observa cap mostra que sobresurti més que la resta.

```
output_file <- file.path(resultsDir, "histograma_expressio.p
png(file = output_file, width = 800, height = 600)
hist(as.numeric(as.matrix(matriu2)),
     main="Representació dels valors d'expressió",
     xlab="Expressió gènica",
     ylab="Freqüència d'expressió dels gens",
     col="cadetblue3", breaks=35)
dev.off()
```

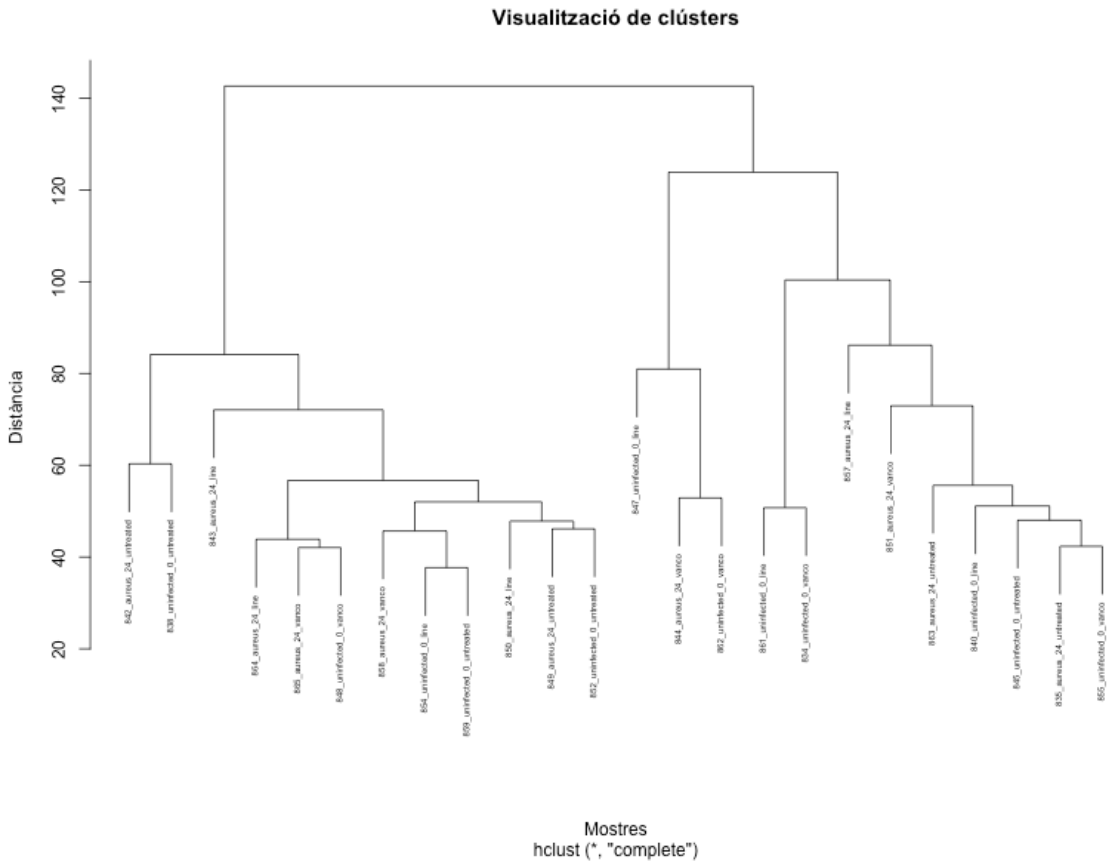


Amb aquest histograma veiem clarament una cua a la dreta, cosa que pot suggerir que les dades hagin passat per una transformació tipus logarítmica.

Continuem amb un dendograma per veure com s'agrupen les mostres.

```
output_file <- file.path(resultsDir, "dendograma.png")
png(file = output_file, width = 800, height = 600)
distancia <- dist(t(matriu2))
clustering <- hclust(distancia)
```

```
plot(clustering,
     main="Visualització de clústers",
     xlab="Mostres", ylab="Distància",
     cex=0.5)
dev.off()
```



No veiem que hi hagi una diferenciació clara entre tractament rebut (res, linezolid o vancomicina) però a simple vista podria ser que hi hagia més mostres de les 24 a l'esquerra i de 0h a la dreta. Tot i així, no m'impressiona que hi hagi un efecte batch que no hàgim detectat.

Procedim a fer una anàlisi de components principals:

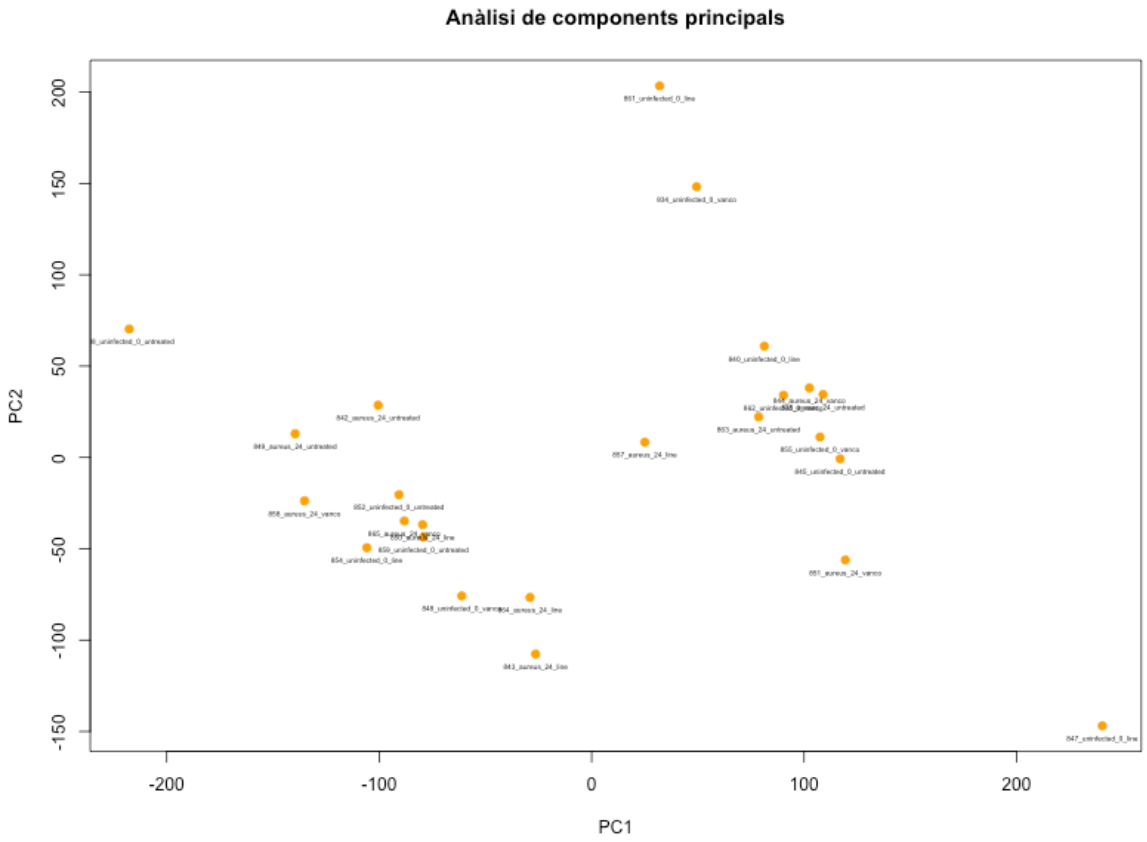
```
pca <- prcomp(t(matriu2), scale.=TRUE)
summary(pca)
```

```
## Importance of components:
##                             PC1     PC2     PC3      PC4
## Standard deviation     111.3073 76.1261 57.1432 50.18384
## Proportion of Variance   0.2747  0.1285  0.0724  0.05584
## Cumulative Proportion    0.2747  0.4032  0.4756  0.53144
##                            PC7      PC8      PC9     PC10
```

```
## Standard deviation     38.2284 36.62065 35.79419 35.59101
## Proportion of Variance  0.0324  0.02973  0.02841  0.02809
## Cumulative Proportion   0.6426  0.67236  0.70077  0.72886
##                            PC13    PC14     PC15     PC16
## Standard deviation     32.48063 31.7124 31.60874 30.70697
## Proportion of Variance  0.02339  0.0223  0.02215  0.02091
## Cumulative Proportion   0.80378  0.8261  0.84824  0.86914
##                            PC19     PC20     PC21     PC2
## Standard deviation     30.05388 29.45554 28.18123 27.5331
## Proportion of Variance  0.02003  0.01924  0.01761  0.0168
```

Amb aquests resultats inicials veiem que la primera component ens explica el 27,47% i la segona 18,25%.

```
output_file <- file.path(resultsDir, "plotPCA.png")
png(file = output_file, width = 800, height = 600)
plot(pca$x[,1], pca$x[,2],
     xlab="PC1",
     ylab="PC2",
     main="Anàlisi de components principals",
     pch=19, col="orange")

text(pca$x[,1], pca$x[,2], labels=colnames(matriu2), pos=1,
dev.off()
```



Veiem que algunes mostres sí que es veuen aïllades de la resta pel que hi pot haver diferències en l'expresisó gènica.

FILTRATGE DE DADES

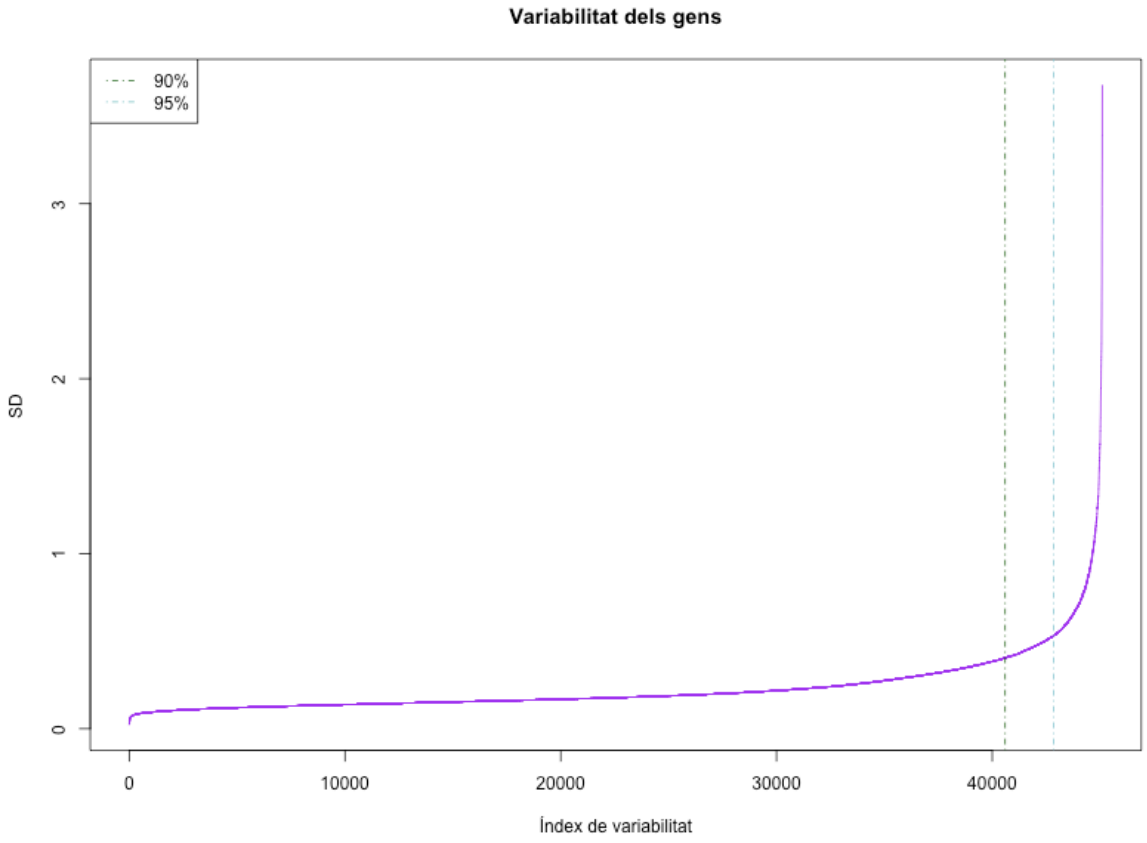
Per veure primer quins sóns els gens amb més variabilitat, mirarem les seves distribucions i les representarem per visualitzar-ho millor.

```
desv_std<-apply(matriu2, 1, sd)
sorted_desv_std<-sort(desv_std)
head(sorted_desv_std)
```

```
## 1428361_x_at 1416624_a_at 1416642_a_at 1451675_a_at 14394
##   0.02222959   0.02269365   0.02534559   0.02560192   0.0
```

```
output_file <- file.path(resultsDir, "plotSD.png")
png(file = output_file, width = 800, height = 600)
plot(1:length(sorted_desv_std), sorted_desv_std,
     main="Variabilitat dels gens",
     xlab="Índex de variabilitat",
     ylab="SD",
```

```
     type="l", col="purple", lwd=1)

# Afegir línies verticals als percentils 90% i 95%
abline(v=length(sorted_desv_std)*c(0.9, 0.95), col=c("darkgr

# Llegenda
legend("topleft", legend=c("90%", "95%"),
       col=c("darkgreen", "cadetblue3"), lwd=1, lty=4)
dev.off()
```



Una vegada hem vist això anirem a buscar, tal com se suggereix, el 10% més variable.

```
limit90<- quantile(desv_std, 0.9)
pool10 <- matriu2[desv_std >= limit90, ]
dim(pool10)
```

```
## [1] 4511   24
```

Finalment, ens quedem doncs com a mostra amb 4511 gens de 24 mostres.

MATRIUS DE DISSENY I CONTRASTS

Ja tenim anteiorment generada una taula amb la fenodata que necessitem, anem a refrescar-la:

```
str(mostres)
```

```
## 'data.frame':    24 obs. of  5 variables:
##  $ sample   : chr  "GSM944850" "GSM944857" "GSM944843" "G
##  $ infection: chr  "aureus" "aureus" "aureus" "aureus" ..
##  $ time     : int  24 24 24 24 0 0 0 0 24 24 ...
##  $ agent    : chr  "line" "line" "line" "line" ...
##  $ nom      : chr  "850_aureus_24_line" "857_aureus_24_li
```

```
mostres$infection <- factor(mostres$infection, levels=c("uni
mostres$agent <- factor(mostres$agent, levels=c("untreated",
#trec les variable sque no necessitaré per les comparacions.
mostres <- mostres[, !(colnames(mostres) %in% c("time", "nom
#str(mostres)
```

En les comparacions que ens demanen, en cap moment es parla de línia temporal, pel que de moment, agafarem les mostres que tenim, però obviarem la línia temporal (és a dir les hores). Agruparem les mostres independentment de si és 0h o 24h; així aconseguirem dos grans grups: infectats i no infectats. I tot seguit els tres subgrups de tractament: n**o tractament, vancomicina o linezolid**.

```
disseny <- model.matrix(~ 0 + infection * agent, data = most
colnames(disseny) <- gsub(":", "_", colnames(disseny))
disseny
```

```
##    infectionuninfected infectionaureus agentline agentvan
## 1                    0               1         1
## 2                    0               1         1
## 3                    0               1         1
```

```
## 4                       0                 1          1
## 5                       1                 0          1
## 6                       1                 0          1
## 7                       1                 0          1
## 8                       1                 0          1
## 9                       0                 1          0
## 10                      0                 1          0
## 11                      0                 1          0
## 12                      0                 1          0
## 13                      1                 0          0
## 14                      1                 0          0
## 15                      1                 0          0
## 16                      1                 0          0
## 17                      0                 1          0
## 18                      0                 1          0
## 19                      0                 1          0
## 20                      0                 1          0
## 21                      1                 0          0
## 22                      1                 0          0
## 23                      1                 0          0
## 24                      1                 0          0
##    infectionaureus_agentline infectionaureus_agentvanco
## 1                          1                          0
## 2                          1                          0
## 3                          1                          0
## 4                          1                          0
## 5                          0                          0
## 6                          0                          0
## 7                          0                          0
## 8                          0                          0
## 9                          0                          0
## 10                         0                          0
## 11                         0                          0
## 12                         0                          0
## 13                         0                          0
## 14                         0                          0
## 15                         0                          0
## 16                         0                          0
## 17                         0                          1
## 18                         0                          1
## 19                         0                          1
## 20                         0                          1
## 21                         0                          0
## 22                         0                          0
## 23                         0                          0
```

```
## 24                          0                          0
## attr(,"assign")
## [1] 1 1 2 2 3 3
## attr(,"contrasts")
## attr(,"contrasts")$infection
## [1] "contr.treatment"
##
## attr(,"contrasts")$agent
```

```
colnames(disseny)
```

```
## [1] "infectionuninfected"        "infectionaureus"
## [3] "agentline"                  "agentvanco"
## [5] "infectionaureus_agentline"  "infectionaureus_agentva
```

I tal com ens han proposat, dissenyarem els tres contrastos:

- Infectats vs no infectats, en el grup *sense tractament* (seria grup base).

- Infectats vs no infectats, en el grup de tractament amb *linezolid.*

- Infectats vs no infectats, en el grup de tractament amb *vancomcina.*

Això ho farem amb el paquet limma.

```
library(limma)
contrasts <- makeContrasts(
  Infectats_vs_Noinfectats_Untreated = infectionaureus - inf
  Infectats_vs_Noinfectats_Linezolid = infectionaureus_agent
  Infectats_vs_Noinfectats_Vancomycin = infectionaureus_agen
  levels = disseny
)

print(contrasts)
```

```
##                             Contrasts
## Levels                       Infectats_vs_Noinfectats_Unt
##   infectionuninfected
```

```
##   infectionaureus
##   agentline
##   agentvanco
##   infectionaureus_agentline
##   infectionaureus_agentvanco
##                              Contrasts
## Levels                        Infectats_vs_Noinfectats_Lin
##   infectionuninfected
##   infectionaureus
##   agentline
##   agentvanco
##   infectionaureus_agentline
##   infectionaureus_agentvanco
##                              Contrasts
## Levels                        Infectats_vs_Noinfectats_Van
##   infectionuninfected
##   infectionaureus
##   agentline
##   agentvanco
##   infectionaureus_agentline
```

Finalment queda fer l'estimació del model, ja que volem detectar quins gens tenen expressió diferencial a través de la comparació de cada gen en les dues situacions experimentals (infectat vs no infectat amb un mateix tractament en comú (no tractament, line o vanco).

Els resultats generats els guardarem per si ens fessin falta més endavant.

```
fit <- lmFit(pool10, design = disseny)
fit2 <- contrasts.fit(fit, contrasts)
fit2 <- eBayes(fit2)

# Obtenir els resultats per a cada comparació
resultats_untreated <- topTable(fit2, coef="Infectats_vs_Noi
head(resultats_untreated)
```

```
##                   logFC  AveExpr         t    P.Value adj
## 1420357_s_at -1.3255585 5.107748 -2.695146 0.01285520 0.9
## 1454685_at   -0.7207441 7.339178 -2.425748 0.02344250 0.9
```

```
## 1427883_a_at  1.1634450 5.447073  2.355059 0.02733148 0.9
## 1427820_at   -1.2187198 8.183081 -2.286833 0.03163894 0.9
## 1436998_at   -0.9657128 5.586410 -2.146802 0.04247593 0.9
```

```
resultats_line<- topTable(fit2, coef="Infectats_vs_Noinfecta
head(resultats_line)
```

```
##                  logFC  AveExpr         t      P.Value
## 1450678_at   -13.11502 12.12619 -22.16088 3.972424e-17 9.
## 1434376_at   -13.23014 12.32611 -21.96531 4.836924e-17 9.
## 1448752_at   -13.72267 13.49913 -21.53819 7.477793e-17 9.
## 1418625_s_at -13.72472 12.98242 -21.25842 9.989881e-17 9.
## 1460218_at   -12.86859 12.33489 -20.92354 1.419425e-16 9.
## 1449574_a_at -12.10868 11.08532 -20.89386 1.464659e-16 9.
```

```
resultats_vanco<- topTable(fit2, coef="Infectats_vs_Noinfect
head(resultats_vanco)
```

```
##                  logFC   AveExpr         t      P.Value
## 1450678_at   -12.93818 12.126189 -21.86206 5.370289e-17 8
## 1450753_at   -11.44555  9.446085 -21.42778 8.379830e-17 8
## 1452954_at   -13.27552 12.959169 -21.40992 8.536051e-17 8
## 1448752_at   -13.49689 13.499127 -21.18382 1.079822e-16 8
## 1434376_at   -12.73214 12.326108 -21.13851 1.132219e-16 8
## 1418625_s_at -13.63340 12.982418 -21.11696 1.158059e-16 8
```

```
write.csv(resultats_untreated, file.path(resultsDir, "result
write.csv(resultats_line, file.path(resultsDir, "resultats_i
write.csv(resultats_vanco, file.path(resultsDir, "resultats_
```

A les taules resultants, sobretot ens interessa fixar-nos en:

- La columa de logFC, on veurem l'efecte dels gens. Quan és negatiu podem interpretar que està infra expressat, i el contrari quan és positiu.

- La columna de p valor i p valor ajustat que ens ajudaran a veure quin gens tenen canvis significatius.

ANOTACIÓ

A les taules generades, veiem que la primera columna és le gen però si no sabem res més, ens aporta poca informació realment ja que no en podem interpretar res amb aquell nom. Per tant, ara procedirem a fer el pas que s'anomena anotació. Ho farem en base a l'exemple de https://aspteaching.github.io/Omics_Data_Analysis-Case_Study_1-Microarrays/Case_Study_1-Microarrays_Analysis.html#environment-preparation, tal i com hem anat mencionant.

Haurem de mirar a la pàgina de GEO la plataforma utilitzada per així saber quin array s'ha utilitzat i saber quina base de dades hem de fer servir pel procés d'anotació (això també es podria fer a través de R, si li demanem que ens retori l'objecte rawData veiem a ens diu en un dels apartats que Annotation: pd.mouse430.2). En aquest cas és [Mouse430_2] Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array.

```
library(annotate)
library(mouse4302.db)

annotatedTopTable <- function(topTab, anotPackage) {
  topTab <- cbind(PROBEID=rownames(topTab), topTab) #les eti
  myProbes <- rownames(topTab)
  thePackage <- eval(parse(text = anotPackage))
  geneAnots <- select(thePackage, myProbes, c("SYMBOL", "ENT
  annotatedTopTab <- merge(x=geneAnots, y=topTab, by.x="PROB
  return(annotatedTopTab)
}
```

```
annotated_untreated <- annotatedTopTable(resultats_untreated
                                         anotPackage="mouse4
head(annotated_untreated)
```

```
##        PROBEID  SYMBOL  ENTREZID
## 1   1415677_at   Dhrs1     52585
## 2   1415682_at    Xpo7     65246
## 3   1415703_at   Huwe1     59026
## 4   1415708_at    Tug1    544752
## 5 1415716_a_at   Rps27     57294
## 6 1415716_a_at Rps27rt 100043813
##                                  GENENAME
## 1                            dehydrogenas
## 2
## 3 HECT, UBA and WWE domain
## 4                  taurine upreg
## 5                        ribosoma
## 6      ribosomal protein S
##        logFC   AveExpr          t   P.Value adj.P.Val
## 1  0.3080049  8.054020  0.9584020 0.3477295 0.9494925 -4.
## 2 -0.3225181 10.269323 -0.6964638 0.4930492 0.9494925 -4.
## 3 -0.2629589  8.223032 -0.8202812 0.4203937 0.9494925 -4.
## 4 -0.1906593  9.328072 -0.5861006 0.5634599 0.9494925 -4.
## 5 -0.0949502 12.795259 -0.2619349 0.7956803 0.9523177 -4.
## 6 -0.0949502 12.795259 -0.2619349 0.7956803 0.9523177 -4.
```

```
annotated_line <- annotatedTopTable(resultats_line,
                                    anotPackage="mouse4302.d
head(annotated_line)
```

```
##        PROBEID  SYMBOL  ENTREZID
## 1   1415677_at   Dhrs1     52585
## 2   1415682_at    Xpo7     65246
## 3   1415703_at   Huwe1     59026
## 4   1415708_at    Tug1    544752
## 5 1415716_a_at   Rps27     57294
## 6 1415716_a_at Rps27rt 100043813
##                                  GENENAME
## 1                            dehydrogenas
## 2
## 3 HECT, UBA and WWE domain
## 4                  taurine upreg
## 5                        ribosoma
## 6      ribosomal protein S
##        logFC   AveExpr         t      P.Value    adj.P.Va
## 1  -9.179144  8.054020 -15.26716 1.324135e-13 1.949263e-1
## 2 -10.061860 10.269323 -11.61419 3.726509e-11 1.417393e-1
## 3  -7.270085  8.223032 -12.12217 1.578354e-11 7.063449e-1
## 4  -8.685557  9.328072 -14.27177 5.484386e-13 5.380307e-1
## 5 -11.736561 12.795259 -17.30630 9.026950e-15 3.607011e-1
## 6 -11.736561 12.795259 -17.30630 9.026950e-15 3.607011e-1
```

```
annotated_vanco <- annotatedTopTable(resultats_vanco,
                                     anotPackage="mouse4302.
```

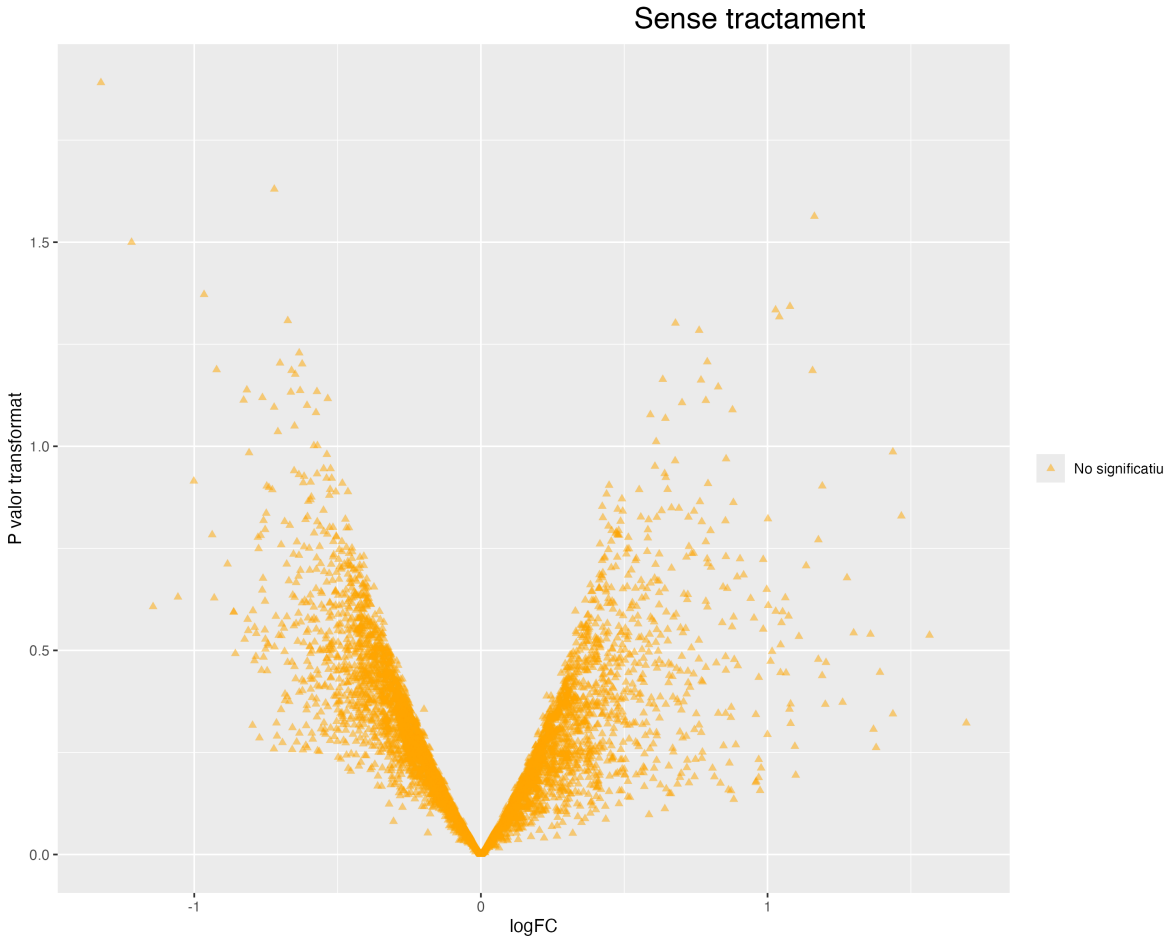
```
head(annotated_vanco)
```

```
##        PROBEID  SYMBOL  ENTREZID                          
## 1   1415677_at   Dhrs1     52585             dehydrogenas
## 2   1415682_at    Xpo7     65246                          
## 3   1415703_at   Huwe1     59026 HECT, UBA and WWE domain
## 4   1415708_at    Tug1    544752            taurine upreg
## 5 1415716_a_at   Rps27     57294                 ribosoma
## 6 1415716_a_at Rps27rt 100043813      ribosomal protein S
##        logFC   AveExpr         t      P.Value    adj.P.Va
## 1  -8.645923  8.054020 -14.38028 4.679231e-13 5.013780e-1
## 2  -9.503992 10.269323 -10.97025 1.152033e-10 3.466860e-1
## 3  -7.381677  8.223032 -12.30824 1.159891e-11 5.462172e-1
## 4  -8.725414  9.328072 -14.33726 4.982675e-13 5.252946e-1
## 5 -12.448652 12.795259 -18.35632 2.513045e-15 2.380574e-1
## 6 -12.448652 12.795259 -18.35632 2.513045e-15 2.380574e-1
```

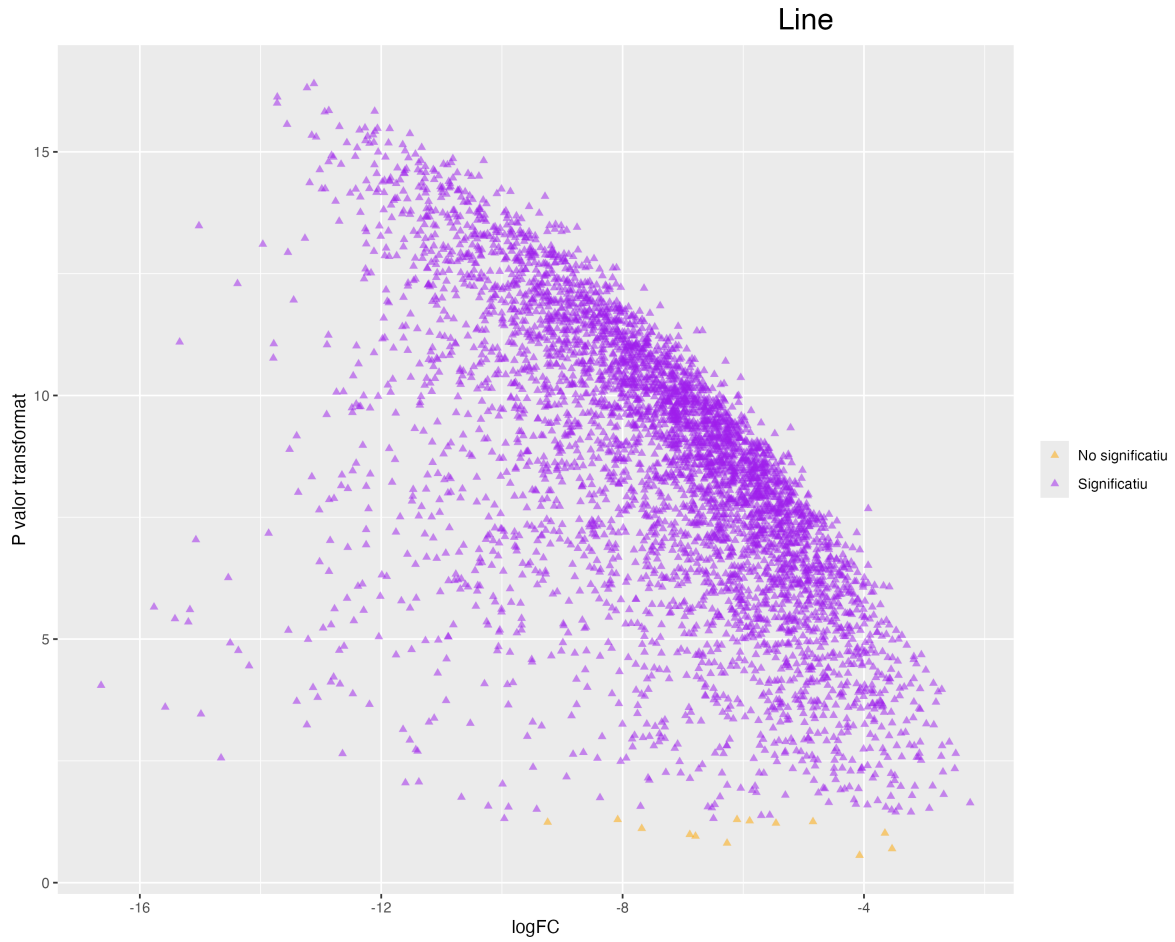
A continuació farem una representació gràfica dels nostres resultats. En aquest cas farem servir com a límits un p valor <0.05 i logFC>1. Com bé es menciona en l'assignatura, no existeix un límit establert per fer aquest punt de tall, sinó que es basa en sentit comú i plausibilitat biològica. És per aquest motiu que farem servir aquest valor i logFC.

```
library(ggplot2)
#per crear el gràfic, com que ho haurem de fer 3 vegades, ho

create_volcano <- function(resultats, titol) {
  resultats$Significant <- with(resultats,
    ifelse(adj.P.Val < 0.05 & abs(logFC) > 1, "Significatiu"
  ) #amb això analitzem cada element i determinem si és o no

  ggplot(resultats, aes(x = logFC, y = -log10(P.Value), colo
    geom_point(alpha = 0.5, size = 1.5, shape=17) +
    scale_color_manual(values = c("orange", "purple")) +
    labs(
      title = titol,
      x = "logFC",
      y = "P valor transformat"
    ) +
    theme(
```

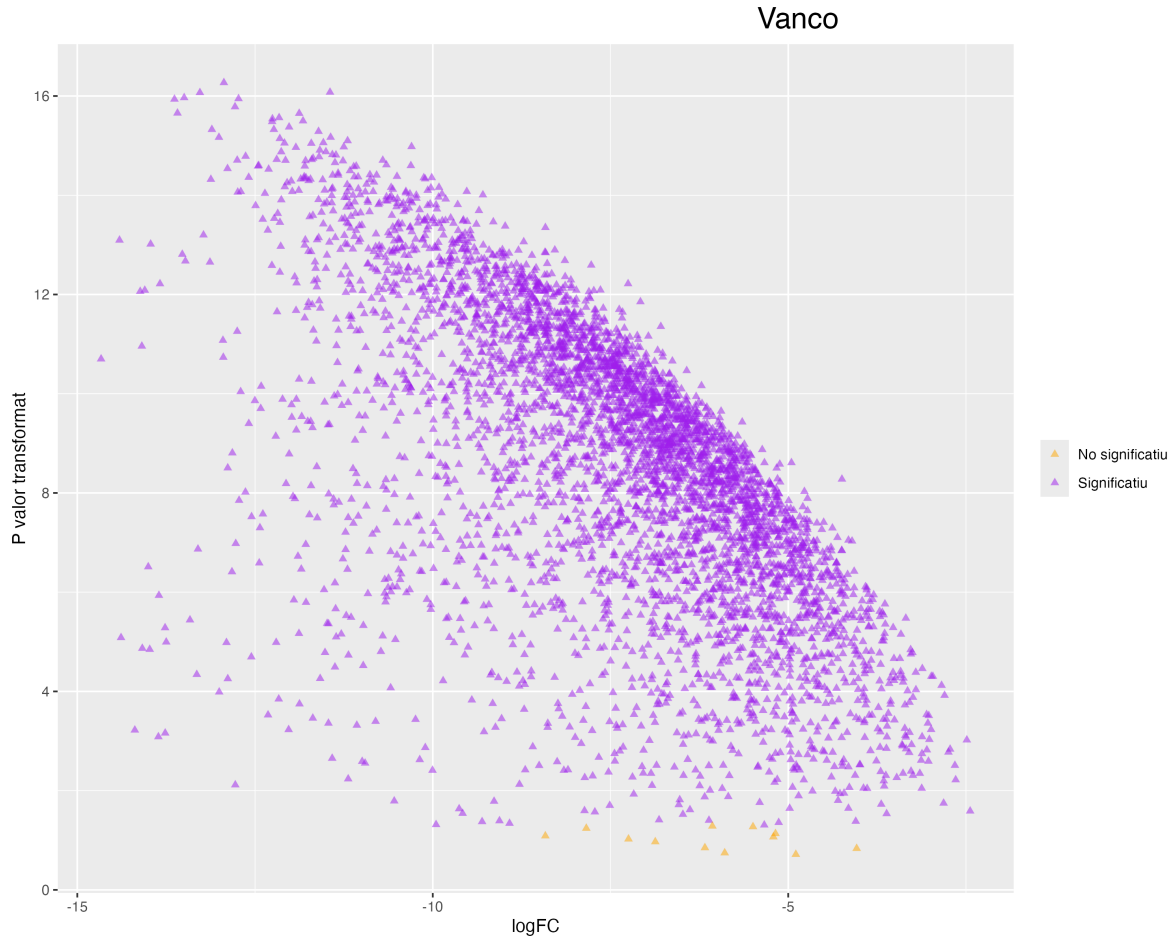
```
      plot.title = element_text(hjust = 0.8, size = 18),
      legend.title = element_blank()
    )
}

save_volcano <- function(plot, filename) {
  ggsave(
    filename = file.path(resultsDir, filename),
    plot = plot,
    width = 10, height = 8, dpi = 300
  )
}

# Crear Volcano Plots per a cada comparació
volcano_untreated <- create_volcano(resultats_untreated, "Se
volcano_line <- create_volcano(resultats_line, "Line")
volcano_vanco <- create_volcano(resultats_vanco, "Vanco")

save_volcano(volcano_untreated, "volcano_untreated.png")
save_volcano(volcano_line, "volcano_line.png")
save_volcano(volcano_vanco, "volcano_vanco.png")
```



Al primer gràfic veiem que tots els punts són NO SIGNIFICATIUS. Per tant no hi ha hagut diferències singifcatives en l'expressió gènica entre els infectats i no infectats que no han rebut tractament.



En segon lloc tenim el gràfic del tractament amb linezolid: veiem a l'eix que les X que la gran majoria dels punts estan a per sota el 0 (són valors negatius). Com dèiem abans, això es tradueix amb gens que estan infra expressats en aquest cas. A l'eix Y veiem el p valor transformat. Tot i que hi ha una cua de valors que queda per sota el valor 5, la gran majoria queda per sobre, i es considerarien estadísticament significatius.



Per últim, la situació de la vancomicina és similar a la del linezolid, tot i que té un volum una mica més elevat de punts que no serien significatius.

A continuació compararem els gens diferencialment expressats entre les diferents situacions clíniques: els no tractat, i el que sí, amb linezolid i vancomicina respectivament. En aquest cas, agafem els gens que tinguin un p-valor associat <0.05. Crearem 3 objectes per emmagatzemar el llistat de gens que compleixin el criteri.

```
seleccio <- decideTests(
  fit2,
  method = "separate",
  adjust.method = "fdr",
  p.value = 0.05,
  lfc = 1
)

print(summary(seleccio))
```

```
##        Infectats_vs_Noinfectats_Untreated Infectats_vs_No
## Down                                    0
## NotSig                               4511
## Up                                      0
##        Infectats_vs_Noinfectats_Vancomycin
## Down                                  4499
## NotSig                                  12
## Up                                       0
```

```
# Filtrar només els gens diferencialment expressats
sum.seleccio.rows <- apply(abs(seleccio), 1, sum)
seleccio.selected <- seleccio[sum.seleccio.rows != 0, ]
```

Ja tenim la taula resum comparant-nos els dos estats (infectat vs no infectat) de cada grup i com es comporten els gens implicats. Agafem per exemple el primer grup Infectats_vs_Noinfectats_Untreated: com veiem, igual que al gràfic anterior, no tenim cap gen que s'expressi de forma diferencial (tots són no signifcatius). En canvi en els grups d'antibiòtic, sorprenentment veiem que hi ha el mateix nombre de gens que estan diferencialment expressats (negativament en aquest cas), i és més, dels gens que hem seleccionat en tot el procés analític, únicament 13 (12 en el cas de la vancomicina) no són significatius.

ANÀLISI DE SIGNIFICACIÓ BIOLÒGICA

A continuació fem l'anàlisi de significació biològica i ho farem a través de GO Gene Ontology. Primer agafarem els identificadors dels gens significatius, en aquest cas els ENTREZID.

```
# Selecionem els ENTREZ ID
ID_untreated <- annotated_untreated$ENTREZID[annotated_untre
ID_line <- annotated_line$ENTREZID[annotated_line$adj.P.Val
head(ID_line)
```

```
## [1] "52585"    "65246"    "59026"    "544752"    "5729
```

```
ID_vanco <- annotated_vanco$ENTREZID[annotated_vanco$adj.P.V
head(ID_vanco)
```

```
## [1] "52585"    "65246"    "59026"    "544752"    "5729
```

No fem l'anàlisi del grup sense tractament perquè ja hem vist que no té gens significatius.

```
library(clusterProfiler)
library(org.Mm.eg.db)

go_enrich_line <- enrichGO(
  gene = ID_line, #els gens significatius dels que han rebut
  OrgDb = org.Mm.eg.db,
  ont = "BP", #a triar entre BP, MF, CC.
  pAdjustMethod = "BH",
  pvalueCutoff = 0.05,
  readable = TRUE
)

go_enrich_vanco <- enrichGO(
  gene = ID_vanco, #els gens significatius dels que han rebu
  OrgDb = org.Mm.eg.db,
  ont = "BP",
  pAdjustMethod = "BH",
  pvalueCutoff = 0.05,
  readable = TRUE
)
```

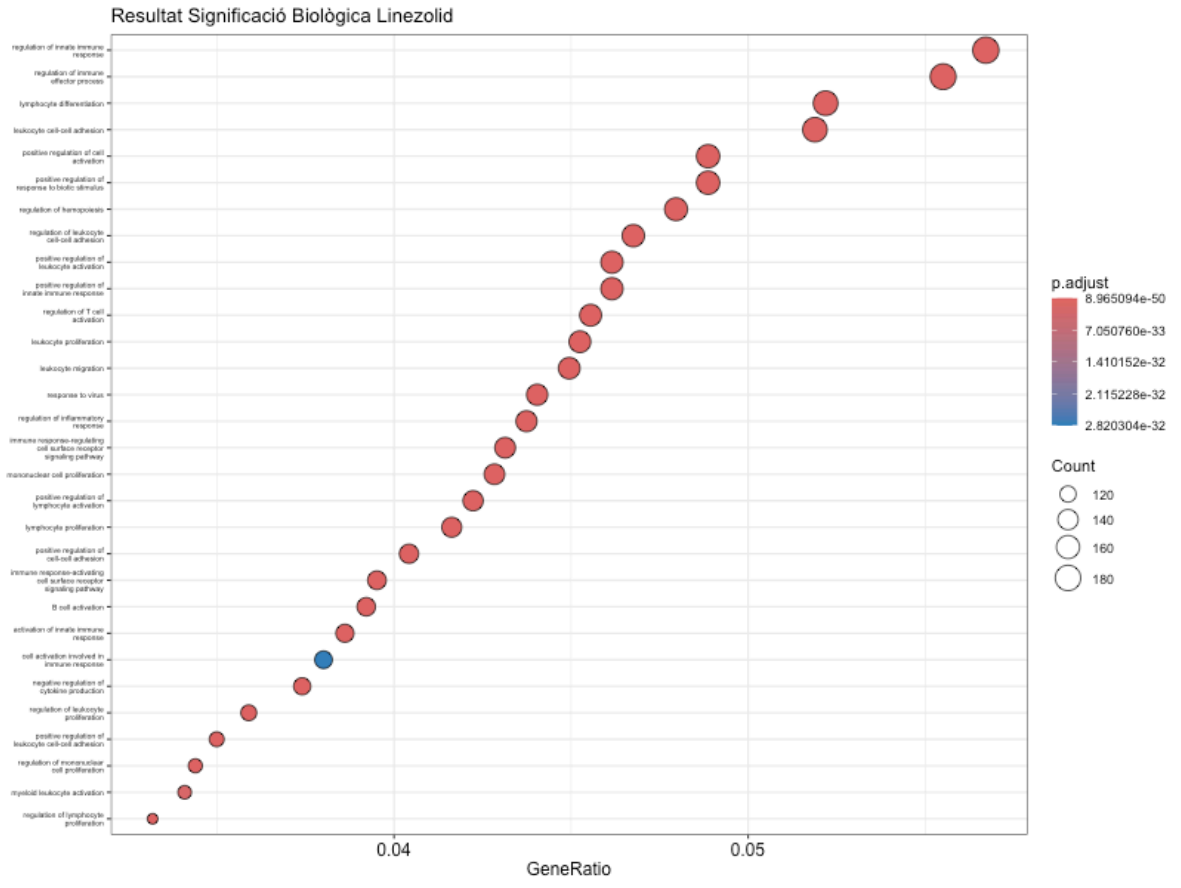
Fet l'anàlisi, en fem la representació gràfica amb un dotplot per visualitzar-ho. Crida MOLT l'atenció, que si més no els primers gens diferencialment expressats, són pràcticament idèntics en ambdós grups.

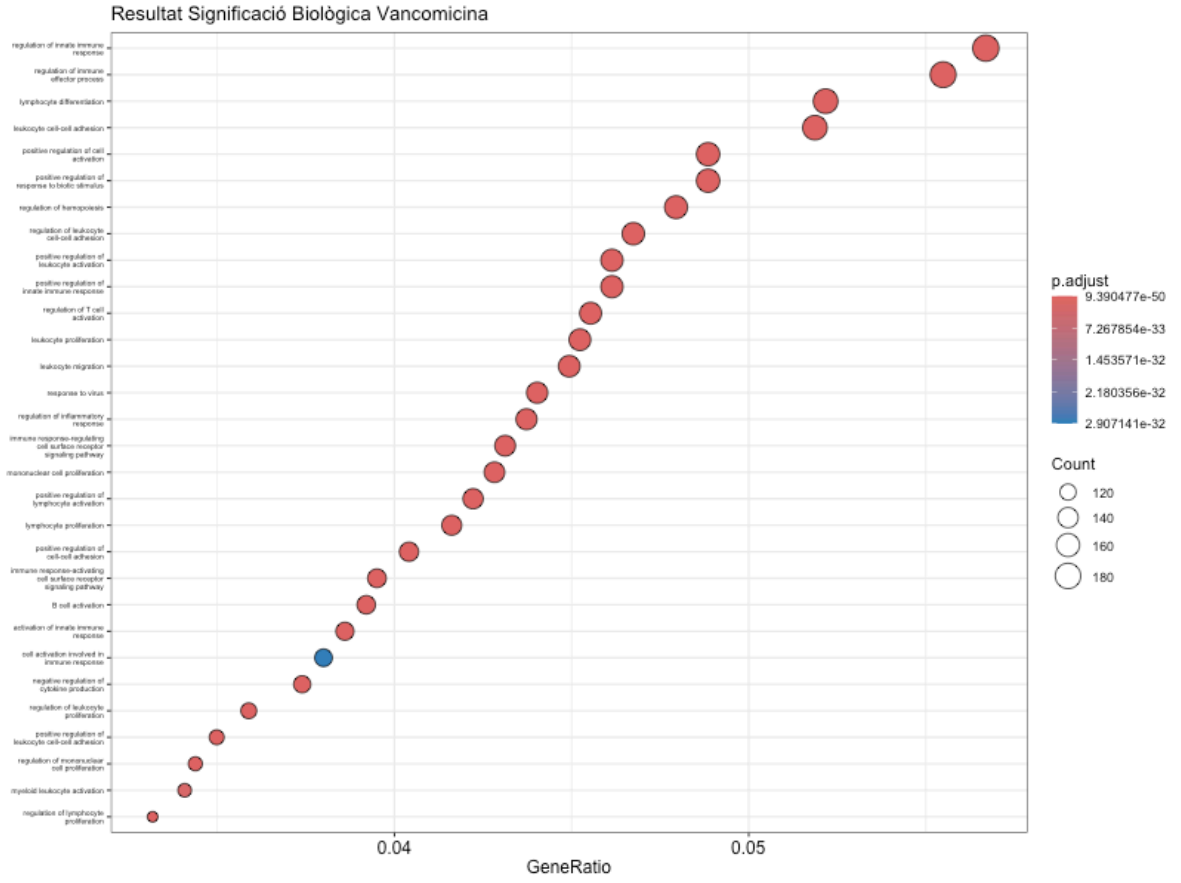
Alguna diferència hi ha (es comprova en el següent bloc de codi) entre els dos resultats, però sobretot el que veiem és que les vies que s'activen són les de resposta immune. Això és molt coherent ja que

estem treballant amb una infecció per MRSA i els seus tractaments de primera línia (vancomicina i linezolid).

Són dos antibiòtics molt diferents, és a dir, no pertanyen a la mateixa família d'antibiòtics; la vancomicina és un glicopèptid i el linezolid una oxazolidinona. Tot i així, la resposta que generen a l'hoste és similar: actiavació de les vies immunes i de la proliferació cel·lular. En resum, tot encarat en lluitar contra una infecció.

```
output_file <- file.path(resultsDir, "dotplot_line.png")
png(file = output_file, width = 800, height = 600)
library(ggplot2)
dotplot(go_enrich_line, showCategory = 30, title = "Resultat

output_file <- file.path(resultsDir, "dotplot_vanco.png")
png(file = output_file, width = 800, height = 600)
dotplot(go_enrich_vanco, showCategory = 30, title = "Resulta
dev.off()
```






```
llista_vanco<- as.data.frame(go_enrich_vanco)
llista_line<- as.data.frame(go_enrich_line)
```

El bloc de codi anterior, es permet veure en una llista les diferents vies identificades en el procés d'anàlisi biològica. Majoritàriament són vies relacionades amb el sistema immunològic.

```
if (identical(llista_vanco, llista_line)) {
  print("Les dues llistes són idèntiques.")
} else {
  print("Les dues llistes NO són idèntiques.")
}
```

```
## [1] "Les dues llistes NO són idèntiques."
```