

Bioinformatyka 2 - kurs mały

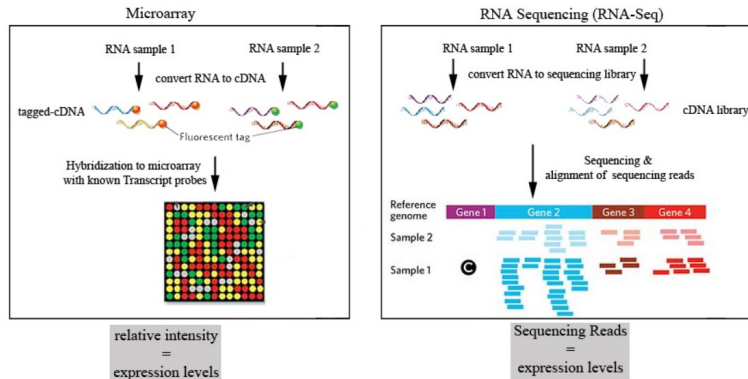
Adrian Kania¹

¹Zakład Biofizyki Obliczeniowej i Bioinformatyki

2022/2023

Jak zmierzyć poziom ekspresji genów w komórce?

- Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (real time PCR),
- Hybrydyzacja northern (RNA blot),
- Sekwencjonowanie (Sanger, Maxam-Gilbert),
- Mikromacierze,
- Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS/RNA-Seq).



Zastosowanie mikromacierzy

Wybrane zastosowania mikromacierzy

- Wyznaczanie profili ekspresji genów (w różnych tkankach, stanach chorobowych...).
- Badanie polimorfizmu/detekcja SNP.
- Badanie oddziaływania DNA-białko.
- Badanie nowych leków.
- Identyfikacja procesów komórkowych w które zaangażowane są geny.

Czy ktoś jeszcze korzysta z mikromacierzy?

[Advanced](#) [Create alert](#) [Create RSS](#)[Save](#)[Email](#)[Send to](#)

MY NCBI FILTERS

157,115 results

RESULTS BY YEAR



kilka tysięcy



Analysis of Microarray and RNA-seq Expression Profiling Data.

1

Hung JH, Weng Z.

Cite

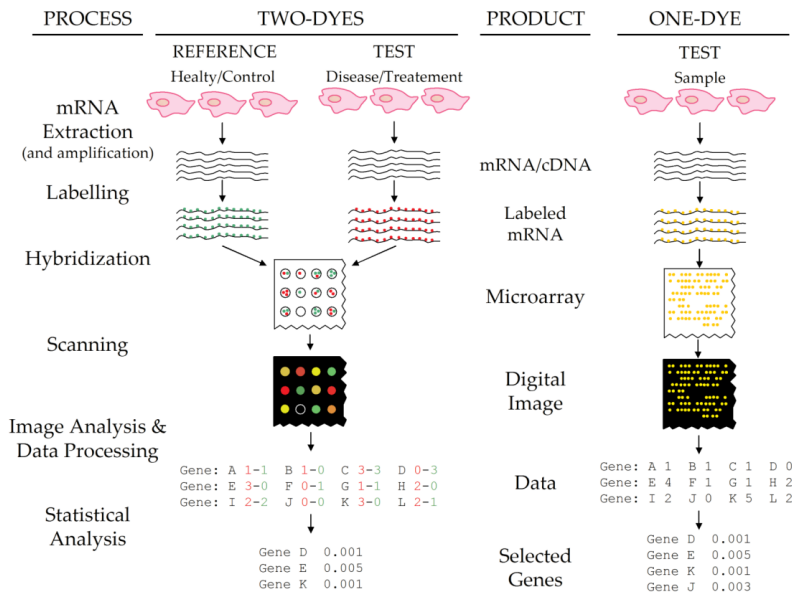
Cold Spring Harb Protoc. 2017 Mar 1;2017(3). doi: 10.1101/pdb.top093104.

PMID: 27574194

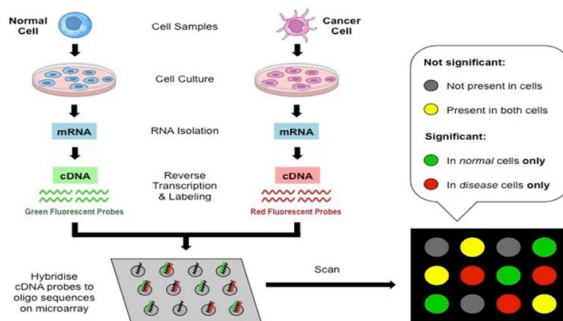
Share

Expression profiling is accomplished by assaying mRNA levels with **microarrays** or next-generation sequencing technologies (RNA-seq). This introduction describes normalization and **analysis** of data generated from **microarray** or RNA-seq experiments....

Eksperyment mikromacierzowy



Eksperyment mikromacierzowy



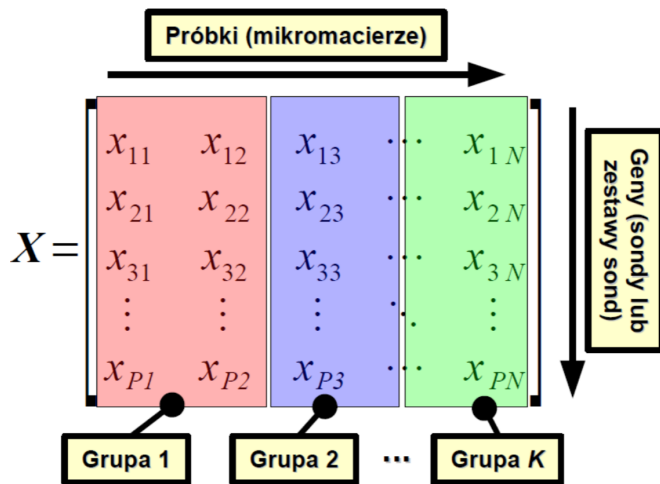
Wyznaczamy stosunek intensywności czerwonej i zielonej fluorescencji (czyli $x_i = R_i/G_i$) dla każdego genu.

- Jeżeli $x_i = 1$, to oznacza to, że poziom i -tego genu był taki sam w próbce kontrolnej i badanej.
- Jeżeli $x_i > 1$, to oznacza to, że poziom i -tego genu był wyższy w próbce badanej w porównaniu do próby kontrolnej.
- Jeżeli $x_i < 1$, to oznacza to, że poziom i -tego genu był niższy w próbce badanej w porównaniu do próby kontrolnej.

Eksperyment mikromacierzowy

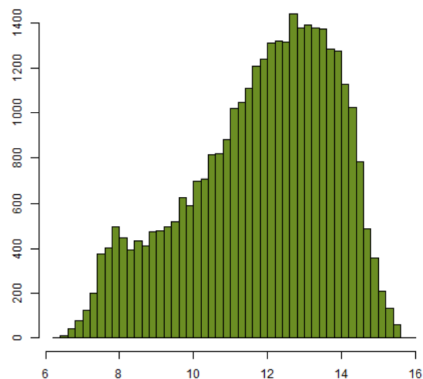
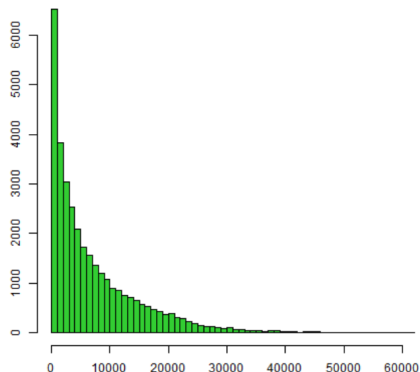
Niech N oznacza liczbę eksperymentów mikromacierzowych. Każda mikromacierz dostarcza informacje ilościowe o ekspresji P genów. Formalnie możemy więc rozważane dane przedstawić w postaci zbiorczej macierzy

$$X = [x_1, x_2, \dots, x_N] \in \mathbb{R}^{P \times N}.$$



Transformacja logarytmiczna

Stosujemy transformację $x_i = \log(x)$ aby wykres intensywności przybrał bardziej symetryczną (Gaussowską) postać.



Normalizacja

Po co stosujemy normalizację?

- różna ilość materiału w kolejnych eksperymentach
- różna wydajność: ekstrakcji RNA, odwrotnej transkrypcji, znakowania, fotodetekcji

Rodzaje normalizacji


- globalna - wszystkie geny biorą udział w normalizacji
- lokalna - używamy niewielkiej puli genów (np. housekeeping genes)

Gdzie można znaleźć dane z eksperymentów mikromacierzowych?

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

GEO DataSets GEO DataSets Search Advanced Help

COVID-19 Information 

[Public health information \(CDC\)](#) | [Research information \(NIH\)](#) | [SARS-CoV-2 data \(NCBI\)](#) | [Prevention and treatment information \(HHS\)](#) | [Español](#)

GEO DataSets

This database stores curated gene expression DataSets, as well as original Series and Platform records in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository. Enter search terms to locate experiments of interest. DataSet records contain additional resources including cluster tools and differential expression queries.

Getting Started

- [GEO Documentation](#)
- [GEO FAQ](#)
- [About GEO DataSets](#)
- [Construct a Query](#)
- [Download Options](#)

GEO Tools

- [Submit to GEO](#)
- [Advanced Search](#)
- [DataSet Browser](#)
- [Programmatic Access](#)
- [GEO2R](#)

More Resources

- [GEO Home](#)
- [GEO Profiles](#)
- [SRA](#)

Specyfika danych z mikromacierzy

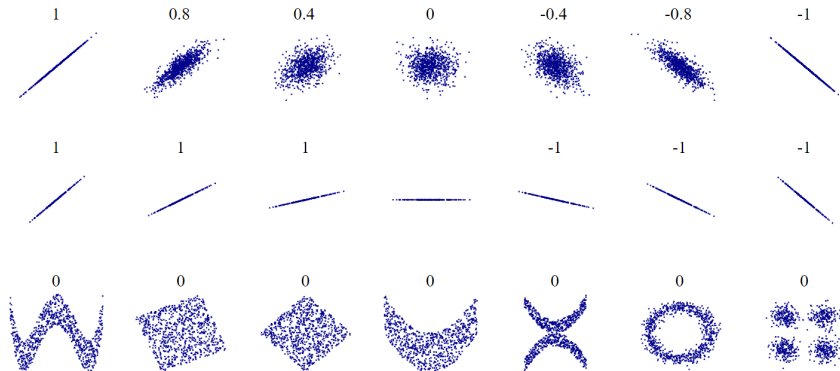
Przy analizie danych mikromacierzowych należy zwrócić szczególną uwagę na następujące zagadnienia:

- Zasadniczy problem: $P \gg N$ (liczba genów znacznie większa niż liczba mikromacierzy).
- Duży zakres zmienności ekspresji genów (1% genów odpowiada za połowę masy mRNA w komórce).
- Możliwość braku danych - spowodowana m.in. lokalnymi defektami mikromacierzy.
- Duża podatność na zakłócenia i błędy w obróbce laboratoryjnej.

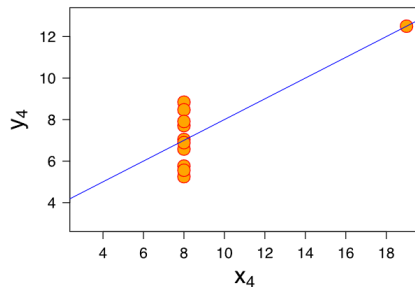
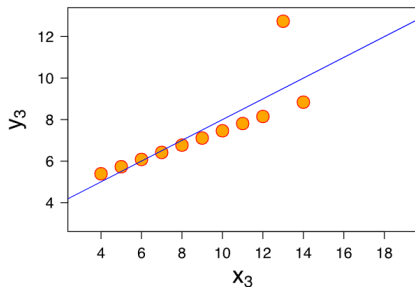
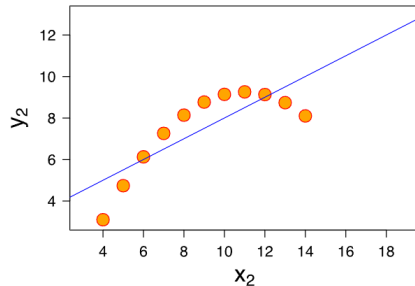
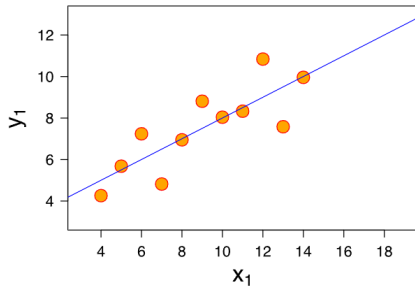
Analiza korelacji

Jednym z celów przeprowadzenia analizy macierzowej może być wytypowanie genów o podobnym profilu ekspresji w kolejnych grupach (ta sama monotoniczność). Do oceny zależności liniowej między dwoma zmiennymi (tutaj: profilami genów) służy współczynnik korelacji. Najczęstsze stosowane to:

- współczynnik korelacji r Pearsona,
- współczynnik korelacji rang Spearmana.



Kwartet Anscombe'a



Problem testowania wielu hipotez

Założmy, że badamy poziom ekspresji 9000 genów aby sprawdzić skuteczność działania nowego leku. Mamy do dyspozycji grupę kontrolną i grupę badaną oraz wykonujemy test statystyczny dla każdego genu. Niech

- H_0 : gen nie uległ zróżnicowanej ekspresji
- H_1 : różnica w ekspresji genu jest znacząca

Przyjmijmy $p_{value} = 0.01$ (jest 1% szansy na zaobserwowanie zróżnicowanej ekspresji przez przypadek). W przypadku badania 9000 genów, nawet gdyby lek nie miał żadnego wpływu, to spodziewamy się że dla 90 genów ich p_{value} będzie mniejsze niż 0.01.

Problem testowania wielu hipotez

Przyjmijmy $p_{value} = 0.01$ (jest 1% szansy na zaobserwowanie zróżnicowanej ekspresji przez przypadek). W przypadku badania 9000 genów, nawet gdyby lek nie miał żadnego wpływu, to spodziewamy się że dla 90 genów ich p_{value} będzie mniejsze niż 0.01.

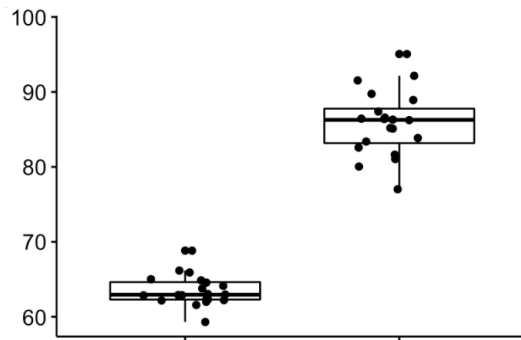
Poprawka Bonferroniego

- wyznaczamy wartości p_i dla każdego genu, $i = 1, 2, \dots, n$.
- wyznaczamy $p'_i = \min(np_i, 1)$
- wybieramy te geny, dla których $p'_i < \alpha$, gdzie α - założony poziom istotności.

Testy statystyczne

- Testy parametryczne (dla danych z rozkładem normalnym) - t test dla dwóch prób
- Testy nieparametryczne (mają mniej założeń) - test Wilcoxona dla par obserwacji, test Manna-Whitneya.
- Metoda Bootstrap - pozwala ominąć założenie o rozkładzie normalnym.
- eBayes - gdy mamy mało powtórzeń i nie można wyliczyć wariancji.
- Test Anova - gdy mamy więcej niż dwa warunki

t-test



Etapy:

- Dla każdej grupy i dla każdego genu wyznaczamy średnią i odchylenie standardowe.
- Wyznaczamy parametr t .

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}}$$

- Odczytujemy wartość parametru p z tablic (o rozkładzie t-studenta).

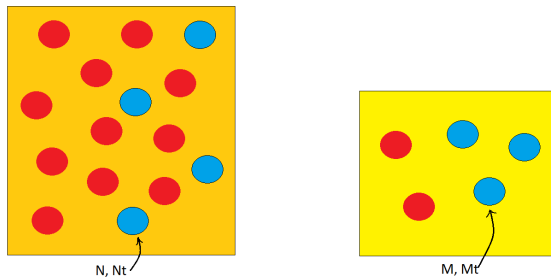
Co dalej z wytypowanym zbiorem genów?

Analiza funkcjonalna - nadanie interpretacji biologicznej uzyskanym wynikom. W kontekście mikromacierzy takim wynikiem jest zbiór genów różnicujących. Przydatne w tym celu mogą być klasyczne bazy danych jak GenBank czy DDBJ czy te bardziej specjalistyczne (Gene Ontology, KEGG PATHWAY) zawierające informacje o wzajemnych powiązaniach między obiektami.



Badanie nadreprezentacji grupy genów

Pytanie: Czy w wytypowanym przez nas zbiorze genów występuje większa grupa powiązana np z tym samym procesem biologicznym?



Porównujemy oczekiwane prawdopodobieństwo wystąpienia interesującej nas grupy genów z obserwowanym.

$$P(x = M_t) = \frac{\binom{N_t}{M_t} \binom{N - N_t}{M - M_t}}{\binom{N}{M}}$$