# PAC2 Desenvolupament del treball - Fase 1

Vasyl Druchkiv

Estudiant del Màster de Bioestadística i Bioinformàtica

15 d'Abril 2019

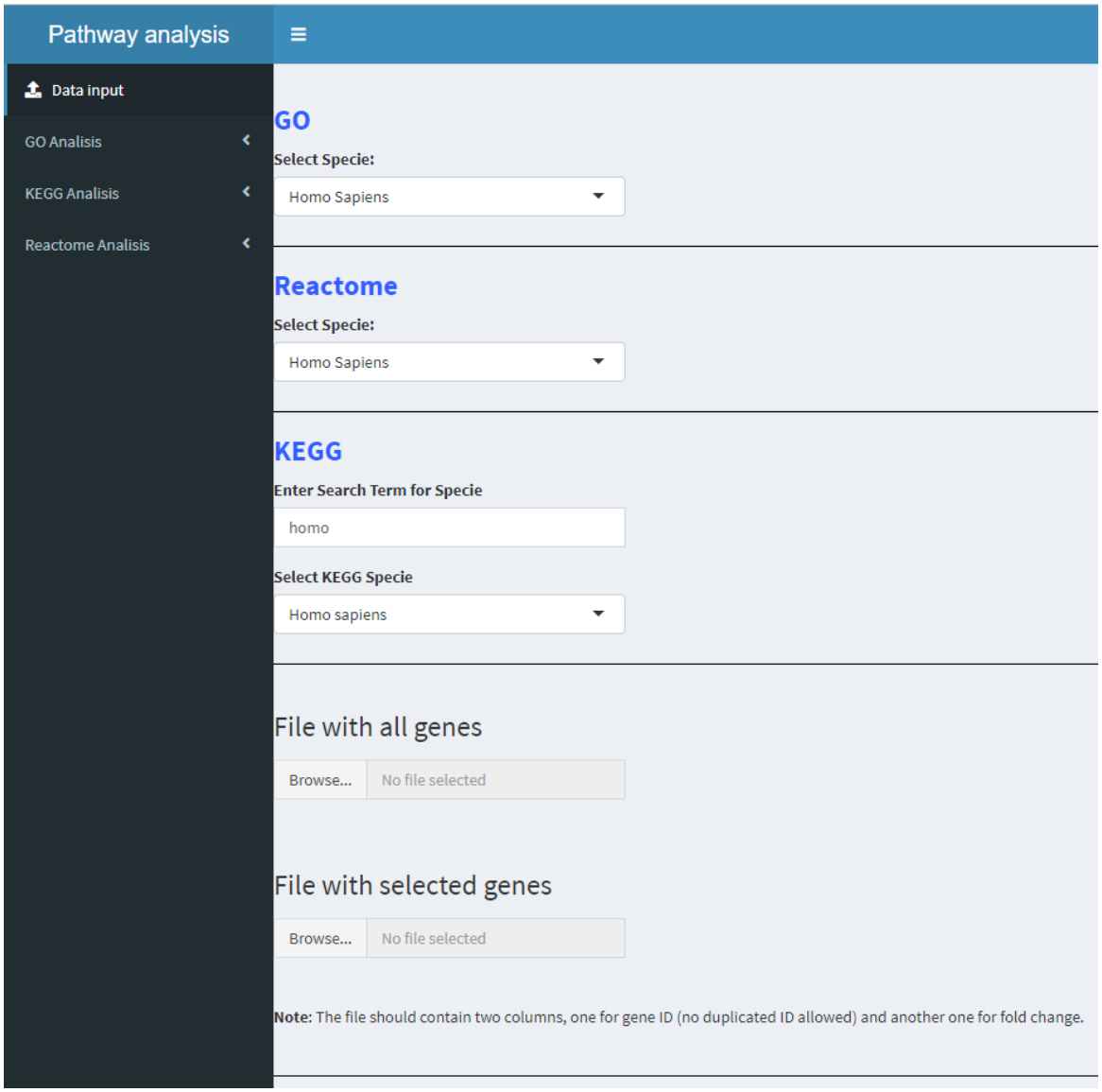
## Índice

---

# 1 Descripció de l'avenç del projecte

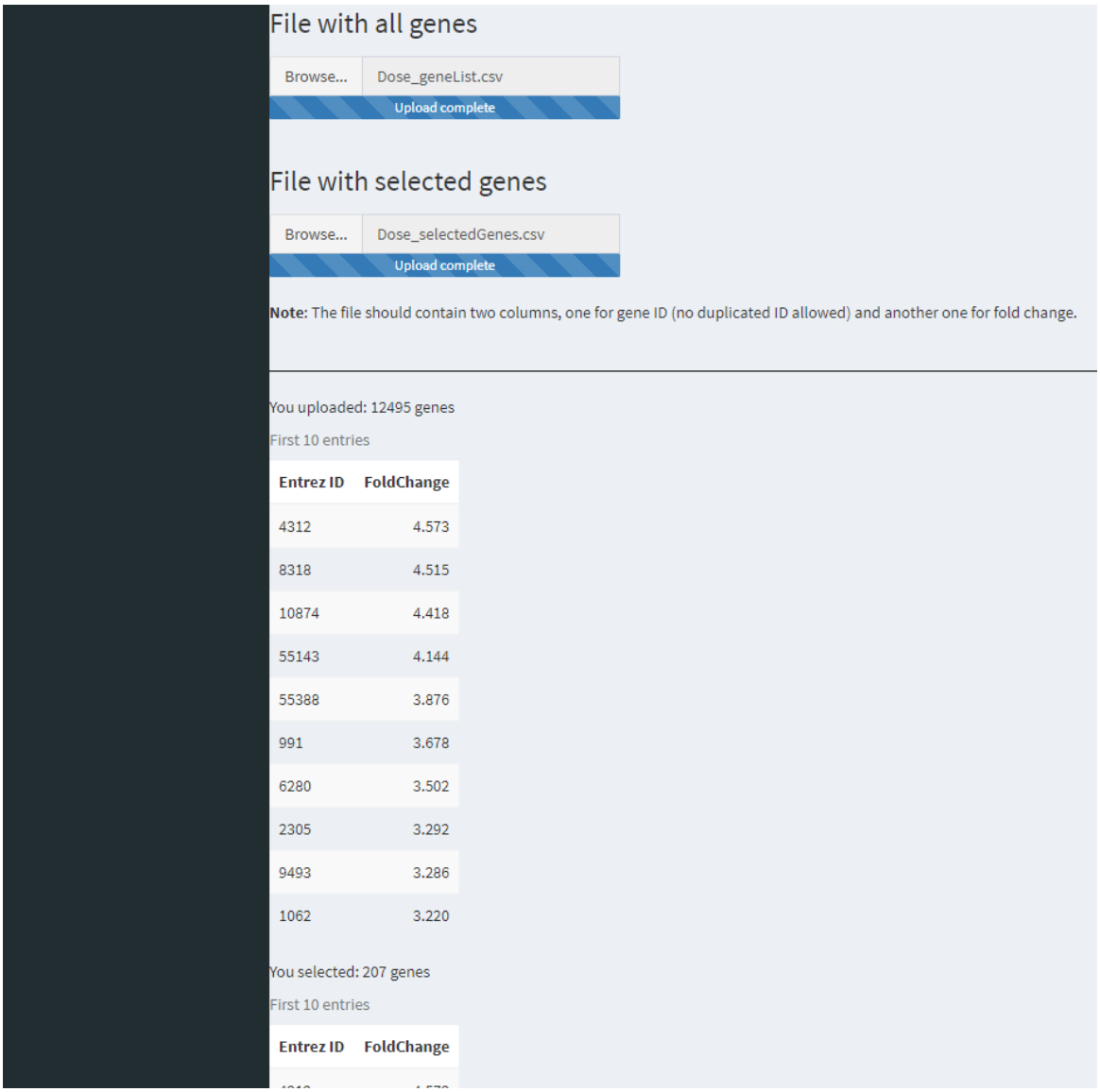
A data d'avui he desenvolpupat l'aplicació d'anàlisis de les rutes. L'aplicació és completament funcional localment i ofereix l'anàlisi a partir de les bases de dades GO, KEGG i Reactome. A l'apartat **Input data** l'usuari primer ha d'indicar l'espècie per a totes tres bases de dades. Per les bases de dades de Reactome l'usuari pot elegir entre Homo Sapiens, Rat, Mouse, Celegans, Yeast, Zebrafish, Fly. Per a l'anàlisi GO, a més de les anteriors, hi ha disponibles aquestes espècies addicionals: Arabidopsis, Bovine, Chicken, Canine, Pig, Rhesus, E coli strain K12, Xenopus, Anopheles, Chimp, Malaria, E coli strain Sakai. Hi ha més espècies disponibles per a l'anàlisis KEGG, perquè la funció de culsterProfiler enrichKEGG() descarrega les últimes anotacions directament de la base de dades KEGG. Es poden trobar totes les espècies aquí. També l'usuari pot buscar l'espècie introduint els termes de cerca. Finalment l'usuari puja l'arxiu amb els gens i els LogRatios provinents de l'estudi de microarrays o NGS.

Figure 1: Pàgina d'entrada




L'usuari té la possibilitat d'introduir l'arxiu amb tots els gens i els gens seleccionats. Un cop introduïdes les dades es mostra un petit resum del contingut dels arxius.

Figure 2: El resum de les dades selecció del *cut off* per a l'anàlisi ORA




L'aplicació està dividida doncs en 4 parts substancials:

1. Entrada de les dades;
2. Anàlisi GO;
3. Anàlisi KEGG;
4. Anàlisi Reactome.

L'aplicació ofereix dos mètodes d'anàlisi: d'una banda es pot fer ORA (Over-Representation Analysis) i d'altra banda l'anàlisi GSEA (Gene Set Enrichment Analisis). Recordem que l'ORA consisteix a seleccionar els gens diferencialment expressats i basant-se en GO, KEGG o Reactome comprovar si una de les agrupacions de gens suggerides per aquestes bases de dades està sobre o sotraexpressada en els gens seleccionats. Per dur a terme l'ORA l'usuari té l'opció de definir un *cut-off* de Log-Ratio per formar el conjunt dels gens que s'hi utilitzarà (*gene set*). ORA és una bona eina per veure els efectes grans però els efectes petits se li escapen. Els

efectes petits derivats dels gens individuals poden acumular-se en un efecte conjunt substancial el qual ORA no serà capaç de detectar. És aquí on GSEA mostra la seva utilitat.

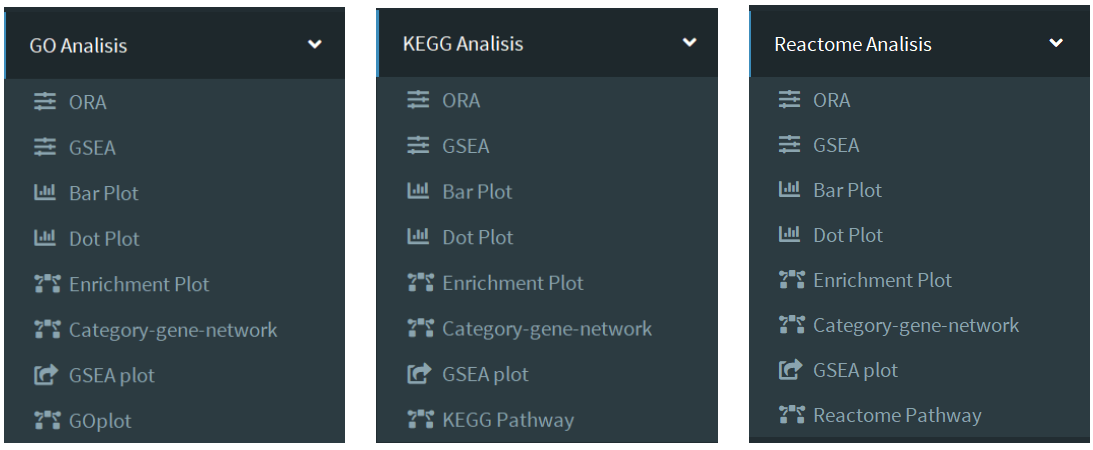
Els apartats d'anàlisi (GO, KEGG i Reactome) ofereixen tan representacions comunes com representacions específiques.

Els anàlisis i representacions en comú són:

- Taula dels resultats ORA;
- Taula dels resultats GSEA;
- Gràfic de barres del resultat ORA;
- Gràfic de punts del resultat ORA;
- El mapa d'enriquement (Enrichment Map);
- La xarxa dels gens en categories (Category-gene-network);
- El gràfic de GSEA.

Les anàlisis específics són:

- GO → Gràfic GO
- KEGG → Rutes de la base de dades KEGG
- Reactome → Rutes de la base de dades Reactome




(a) GO (b) KEGG (c) Reactome

Figure 3: Els elements de les seccions d'anàlisi

| Base de dades | Mètode | Paquet Bioconductor | Funció | Observació |
|---|---|---|---|---|
| GO | ORA | clusterProfiler | enrichGO() | Només 7 espècies disponibles |
| GO | GSEA | clusterProfiler | gseGO() | Permutació de gens |
| GO | Bar-Plot | enrichplot | barplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| GO | Enrichment Map | enrichplot | emapplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| GO | Gene-Concept Network | enrichplot | cnetplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| GO | GO directed acyclic graph | enrichplot | goplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| KEGG | ORA | clusterProfiler | enrichKEGG() | Totes les espècies de KEGG |
| KEGG | GSEA | clusterProfiler | gseKEGG() | Permutació de gens |
| KEGG | Bar-Plot | enrichplot | barplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| KEGG | Enrichment Map | enrichplot | emapplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| KEGG | Gene-Concept Network | enrichplot | cnetplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| KEGG | Pathway | pathview | pathview() | Cal modificar la funció per guardar els gràfics en el directori temporal |
| Reactome | ORA | ReactomePA | enrichPathway() | Totes les espècies de KEGG |
| Reactome | GSEA | ReactomePA | gsePathway() | Permutació de gens |
| Reactome | Bar-Plot | enrichplot | barplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| Reactome | Enrichment Map | enrichplot | emapplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| Reactome | Gene-Concept Network | enrichplot | cnetplot() | Necessita l'objecte del class enrichResult |
| Reactome | Pathway | ReactomePA | viewPathway() | |

Table 1: Resum de les anàlisis disponibles i recursos de Bioconductor R

El llistat de tots els paquets i funcions utilitzats en l'aplicació es troba a apèndix A.

# 2 Grau de compliment dels objectius

Recordem el calendari definit al pla de treball.

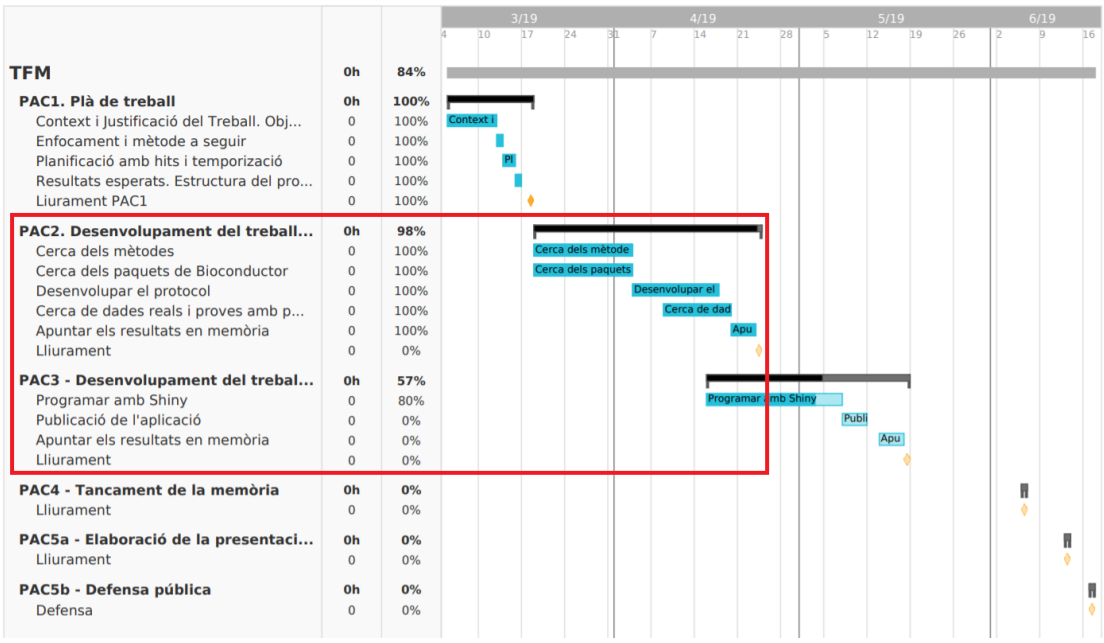



Figure 4: Diagrama de Gantt

Les tasques per a aquesta PAC eren:

1. **Cerca dels mètodes**

   Els mètodes interessants per a dur a terme l'anàlisi de les rutes són:

   - ORA [Boyle et al., 2004]

- Mètodes GSA
  - Permutació de les mostres: GSEA [Subramanian et al., 2005], SAFE[Dinu et al., 2007] com els més representatius;
  - Permutació dels gens: PAGE [Kim and Volsky, 2005], T-Profiler[Newton et al., 2007] com els més representatius.
- GAGE (Generally Applicable Gene set Enrichment for pathway analysis) [Luo et al., 2009]

Per fer l'aplicació més estructurada i menys complicada he elegit al final els dos mètodes: ORA [Boyle et al., 2004] i GSEA [Subramanian et al., 2005]. L'anàlisi GAGE seria un bon *Add-on* però per falta de temps per completar el TFM al final he decidit deixar-ho.

2. **Cerca dels paquets de Bioconductor**

   El paquet clusterProfiler de Bioconductor integra els mètodes per dur a terme l'anàlisi de les rutes basant-se en les bases de dades GO, KEGG i Reactome. Els dos mètodes principals són ORA (Overrepresentation analysis) i GSEA (Gene set enrichment Analysis). També inclou les possibilitats de visualització dels resultats suficients per considerar l'anàlisi de les rutes complet. Notem però que el test de permutació a l'anàlisi GSEA implementat per clusterPrifiler es basa en la permutació dels gens i no de les mostres com originalment és proposat per [Subramanian et al., 2005].

3. **Desenvolupar el protocol**

   Crec que l'aplicació és molt intuitiva i deixa entreveure l'esquema següent:

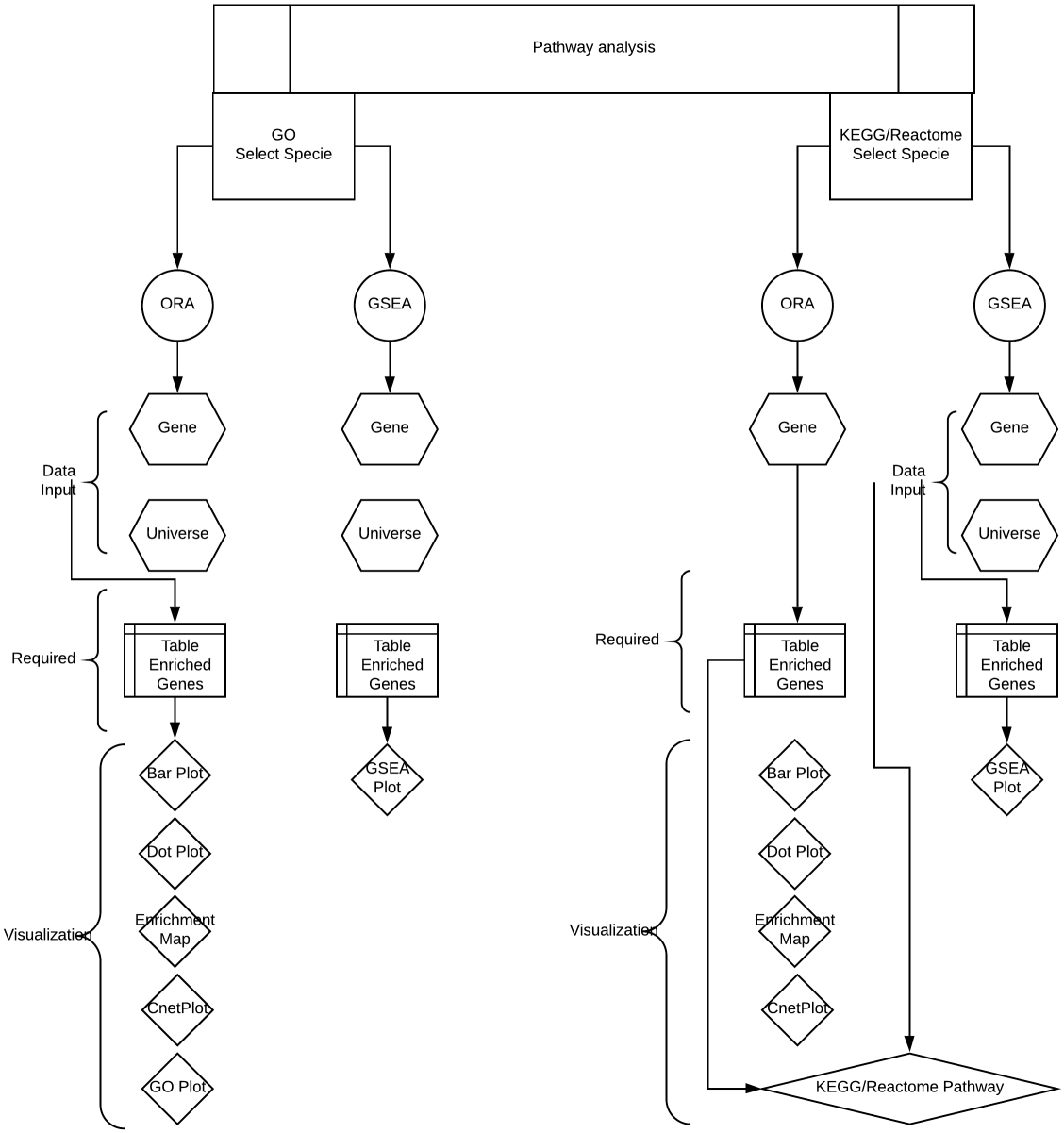



Figure 5: Lucidchart per a l'aplicació

D'aquí podem definir per exemple el protocol:

(a) Decidir quin anàlisi vol fer: GO, KEGG o Reactome

(b) Seleccionar l'espècie de referència

(c) Decidir quin mètode vol implementar: ORA o GSEA i respectivament pujar les dades necessàries.

→ Per a anàlisi GO tots dos arxius són necessaris: Gens Seleccionats (Gene) i Tots els gens (Universe).

→ Per a l'anàlisi KEGG o Reactome les dades necessàries varien: Pel mètode ORA l'arxiu amb els gens seleccionats és suficient. Dos arxius són necessaris pel mètode GSEA.

(d) En el cas que volguem fer l'anàlisis ORA seleccionar a l'apartat corresponent (GO, KEGG o Reactome) la pestanya ORA i definir els criteris.

→ Els gràfics: Bar Plot, Dot Plot Enrichment Map, Cnet Plot, GO Plot (en cas d'anàlisi GO) i els gràfics de les rutes (KEGG/Reactome) es calculen automàticament

(e) En el cas que volguem fer l'anàlisi GSEA seleccionar a l'apartat corresponent (GO, KEGG o Reactome) la pestanya GSEA i definir els criteris.

→ El gràfic GSEA es genera automàticament. Es pot elegir la ruta mitjançant un menú desplegable.

4. **Cerca de dades i proves amb el protocol**

   Aquesta tasca ha resultat ser més difícil. Estic però satisfet que amb l'ajuda del professor he pogut trobar les dades i amb algunes d'elles ja fer les proves. Els detalls els explico en l'apartat Validació dels resultats.

5. **Programar amb shiny**

   Estic satisfet amb el grau del complement amb aquesta tasca. L'aplicació és ja funcional. D'altra banda noto que ara hi ha molt de codi repetitiu. Encara no he trobat la possibilitat de simplificar-lo. Estic buscant però les solucions.

# 3 L'anàlisi comuna de GO, KEGG i Reactome

## 3.1 ORA

### 3.1.1 GO

Per realitzar l'anàlisi ORA per a termes GO s'utilitza la funció enrichGO del paquet clusterPrifiler.

```
enrichGO(gene, OrgDb, keyType = "ENTREZID", ont = "MF", pvalueCutoff = 0.05,
pAdjustMethod = "BH", universe, qvalueCutoff = 0.2, minGSSize = 10, maxGSSize = 500,
readable = FALSE, pool = FALSE)
```

He implementat els valors per defecte amb la possibilitat per a l'usuari d'elegir entre:

- Ontologies GO
  - Molecular function, Biological proces, Cellular Components;
- Nivell de significació basant-se en els valors de P ajustats
  - 0.1, 0.05, 0.01, 0.001;
- Mètode d'ajustament
  - Holm; Hochberg; Hommel; Bonferroni; BH; BY; FDR; None.

L'execució de la funció és un procès temporalment costós. Per aquest motiu he afegit el botó d'acció, en lloc de deixar la funció reactiva. D'aquesta manera l'usuari ha de fer una decisió conscient de repetir l'anàlisi amb altres valors.

Prement el botó apareix la taula i el botó nou mitjançant el qual l'usuari pot descarregar els resultats en format .csv. He formatejat la taula amb els paquets knitr, kableExtra, formattable i dplyr. Amb els dos

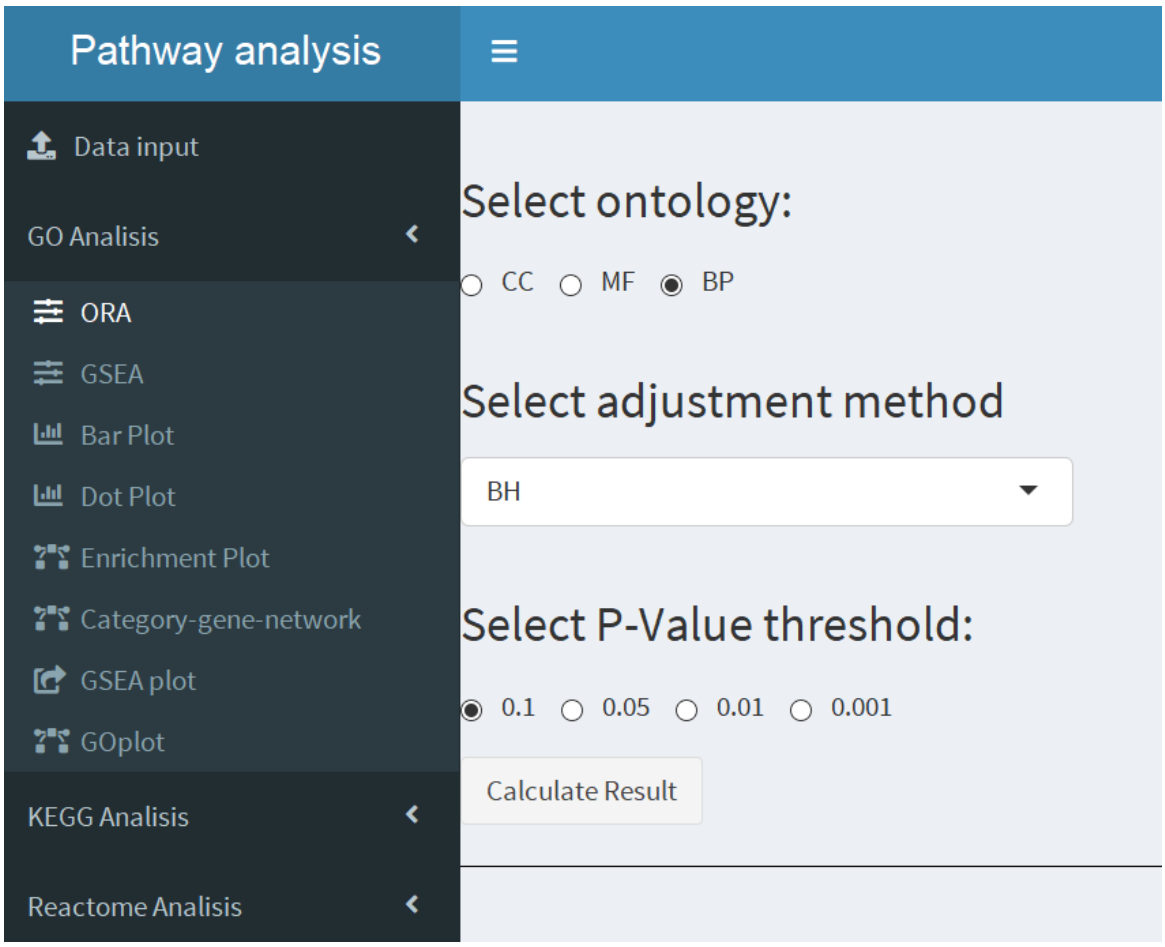



Figure 6: Especificació d'ORA dels termes GO

últims he afegit les barres de color pel nombre dels gens diferencialment expressats del terme específic de GO i la gradació de color del verd fins al vermell pels valors dels més petits fins els més grans.

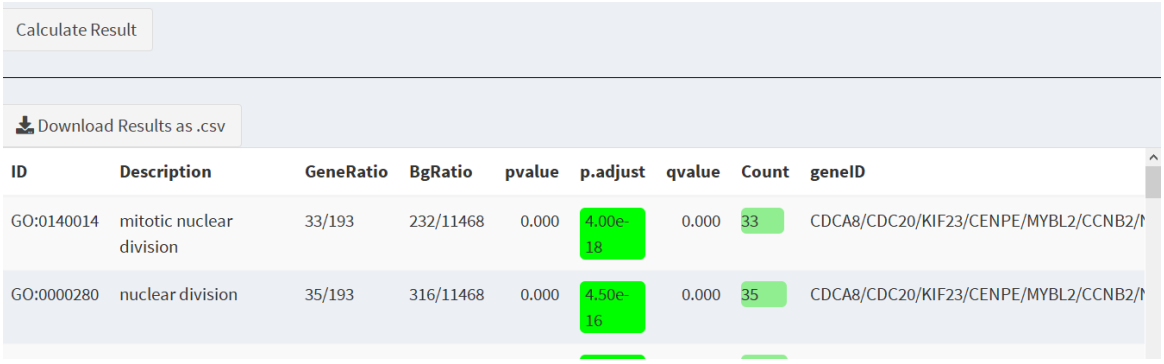



Figure 7: El resultat d'anàlisi ORA. GO.

Els camps més interessants de la taula són:

- Description. El nom del terme GO;
- GeneRatio. El quocient: $\frac{\text{Nombre dels gens diferencialment expressats que pertanyen al conjunt de gens}}{\text{Nombre total dels gens diferencialment expressats}} = \frac{M}{N}$;
- BgRatio. El quocient: $\frac{\text{Nombre dels gens del conjunt d'interès en tota la mostra}}{\text{Nombre total dels gens en la mostra}} = \frac{k}{n}$;

- pvalue. Valor de p basat en la distribució hipergeomètrica: $p = 1 - \sum_{i=0}^{k-1} \frac{\binom{M}{i}\binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$
- p.adjust. El valor de P ajustat.

### 3.1.2 KEGG

Per l'ORA de base de dades KEGG he utilitzat la funció enrichKEGG() del paquet clusterProfiler.

enrichKEGG(gene, organism = "hsa", keyType = "kegg", pvalueCutoff = 0.05, pAdjustMethod = "BH", universe, minGSSize = 10, maxGSSize = 500, qvalueCutoff = 0.2, use_internal_**data** = FALSE)

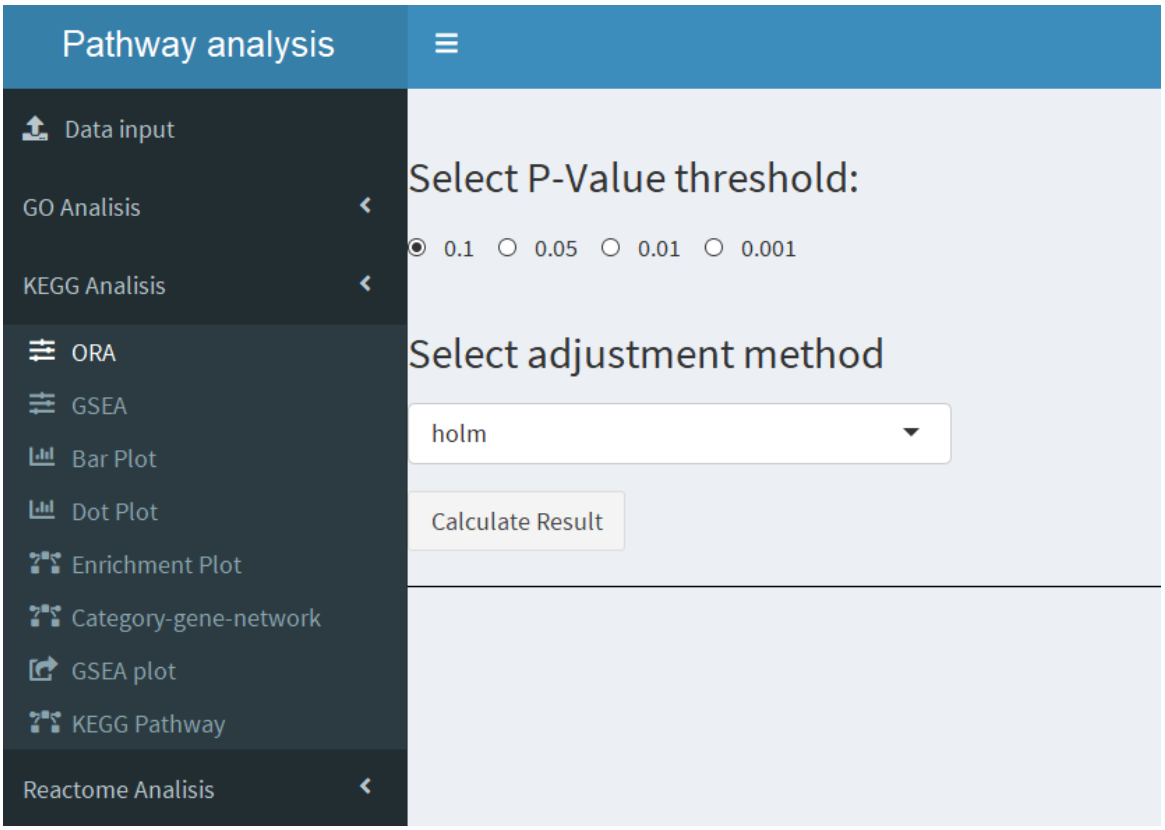
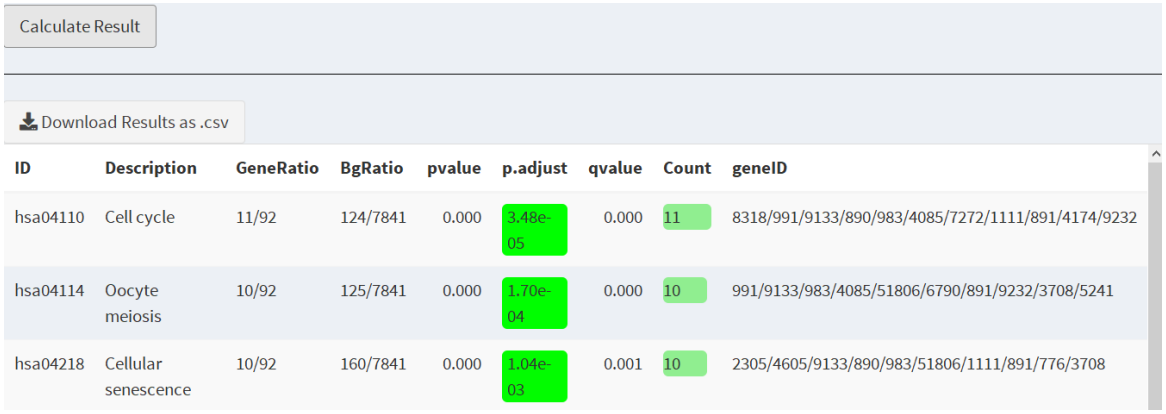



Figure 8: Configuració d'anàlisi KEGG

Una vegada introduïts els paràmetres i premut el botó **Calculate** apareix el botó **Download .csv** i la taula previsualitzada. Els camps de la taula són els mateixos com en l'anàlisi dels termes GO.



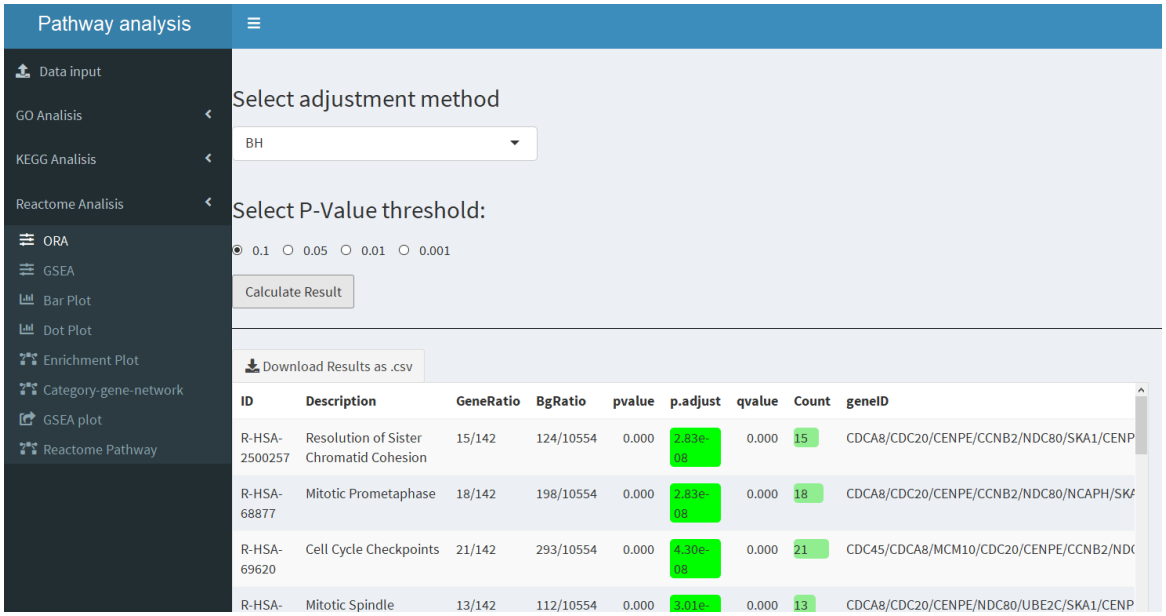

| ID | Description | GeneRatio | BgRatio | pvalue | p.adjust | qvalue | Count | geneID |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| hsa04110 | Cell cycle | 11/92 | 124/7841 | 0.000 | 3.48e-05 | 0.000 | 11 | 8318/991/9133/890/983/4085/7272/1111/891/4174/9232 |
| hsa04114 | Oocyte meiosis | 10/92 | 125/7841 | 0.000 | 1.70e-04 | 0.000 | 10 | 991/9133/983/4085/51806/6790/891/9232/3708/5241 |
| hsa04218 | Cellular senescence | 10/92 | 160/7841 | 0.000 | 1.04e-03 | 0.001 | 10 | 2305/4605/9133/890/983/51806/1111/891/776/3708 |

Figure 9: El resultat de l'anàlisi ORA. KEGG.

### 3.1.3 Reactome

En el cas de Reactome el procediment és similar. La funció usada és enrichPathway() del paquet ReactomePA:

```
enrichPathway(gene, organism = "human", pvalueCutoff = 0.05,
pAdjustMethod = "BH", qvalueCutoff = 0.2, universe, minGSSize = 10,
maxGSSize = 500, readable = FALSE)
```




| ID | Description | GeneRatio | BgRatio | pvalue | p.adjust | qvalue | Count | geneID |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R-HSA-2500257 | Resolution of Sister Chromatid Cohesion | 15/142 | 124/10554 | 0.000 | 2.83e-08 | 0.000 | 15 | CDCA8/CDC20/CENPE/CCNB2/NDC80/SKA1/CENP |
| R-HSA-68877 | Mitotic Prometaphase | 18/142 | 198/10554 | 0.000 | 2.83e-08 | 0.000 | 18 | CDCA8/CDC20/CENPE/CCNB2/NDC80/NCAPH/SKA |
| R-HSA-69620 | Cell Cycle Checkpoints | 21/142 | 293/10554 | 0.000 | 4.30e-08 | 0.000 | 21 | CDC45/CDCA8/MCM10/CDC20/CENPE/CCNB2/NDC |
| R-HSA- | Mitotic Spindle | 13/142 | 112/10554 | 0.000 | 3.01e- | 0.000 | 13 | CDCA8/CDC20/CENPE/NDC80/UBE2C/SKA1/CENP |

Figure 10: El resultat d'anàlisi ORA. Reactome.

## 3.2 GSEA

### 3.2.1 GO

El mètode GSEA per a termes GO es calcula amb la funció gseGO() del paquet clusterProfiler.

```
gseGO(geneList, ont = "BP", OrgDb, keyType = "ENTREZID",
```

exponent = 1, nPerm = 1000, minGSSize = 10, maxGSSize = 500,
pvalueCutoff = 0.05, pAdjustMethod = "BH", verbose = TRUE,
seed = FALSE, **by** = "fgsea")

L'usuari pot elegir l'ontologia GO, el *cut-off* del valor P i el mètode d'ajustament.

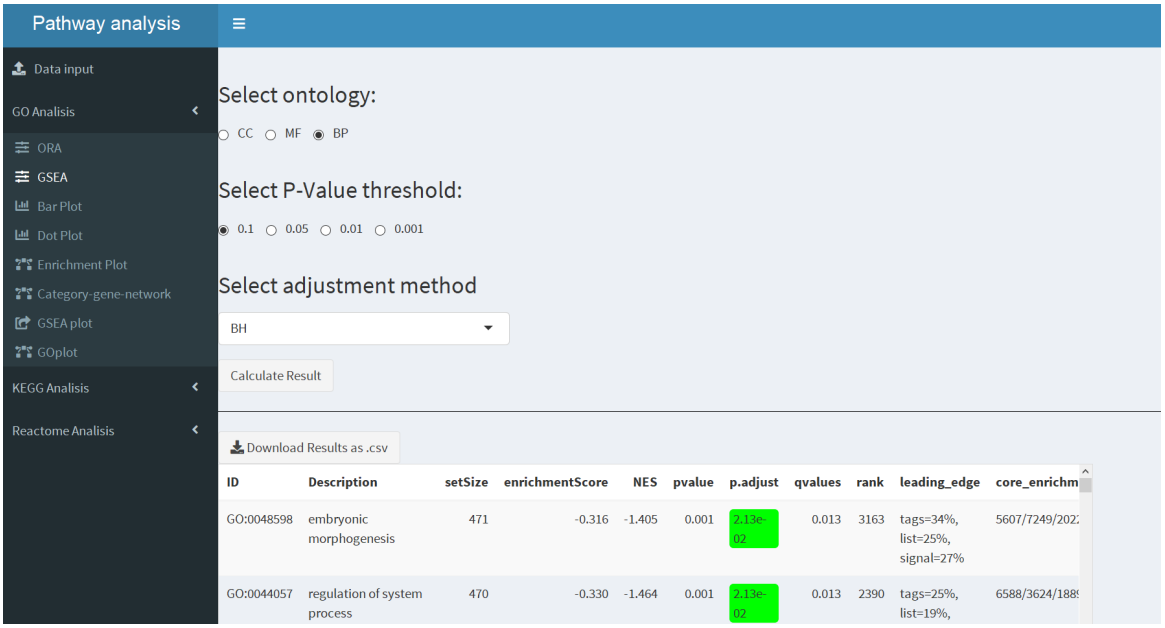



Figure 11: El resultat de l'anàlisi GSEA. GO.

Per entendre l'anàlisi:

- enrichmentScore. Enrichment score per al conjunt dels gens. Amb altres paraules: el grau amb el qual el conjunt dels gens està sobreexpressat a dalt o a baix del llistat ordenat dels gens en les dades d'expressió.
- NES. Normalized enrichment score. La puntuació per al conjunt de gens després de ser normalitzat tenint en compte tots els conjunts de gens analitzats (la seva mida i la seva correlació amb les dades d'expressió). Aquesta puntuació ajuda a comparar els resultats entre els conjunts de gens.
- pvalue.El valor de p nominal.
- p.adjust. El valor de p ajustat.
- leading_edge
  - Tags. El percentatge de les ocurrències de gens del conjunt específic abans (per als ES positius) o després (per als ES negatius) del cim en la puntuació corrent d'enriquiment. Aquest valor indica el percentatge dels gens que contribueixen a la puntuació d'enriquement.
  - List. El percentatge dels gens en el llistat ordenat de tots els gens abans o després del pic en la puntuació corrent d'enriquiment. Aquest valor ens indica on exactament el pic es produeix.
  - Signal. La fortalesa del senyal d'enriquiment que combina els dos valors anteriors.

- rank. La posició del pic en la llista ordenada dels gens. Els conjunts dels gens més interessants assoleixen el seu màxim o bé al principi o al final de la llista ordenada. Vol dir que tenen aquest valor o bé molt baix o bé molt alt.

### 3.2.2 KEGG

De la mateixa manera es calcula GSEA amb la funció gseKEGG() del paquet clusterProfiler:

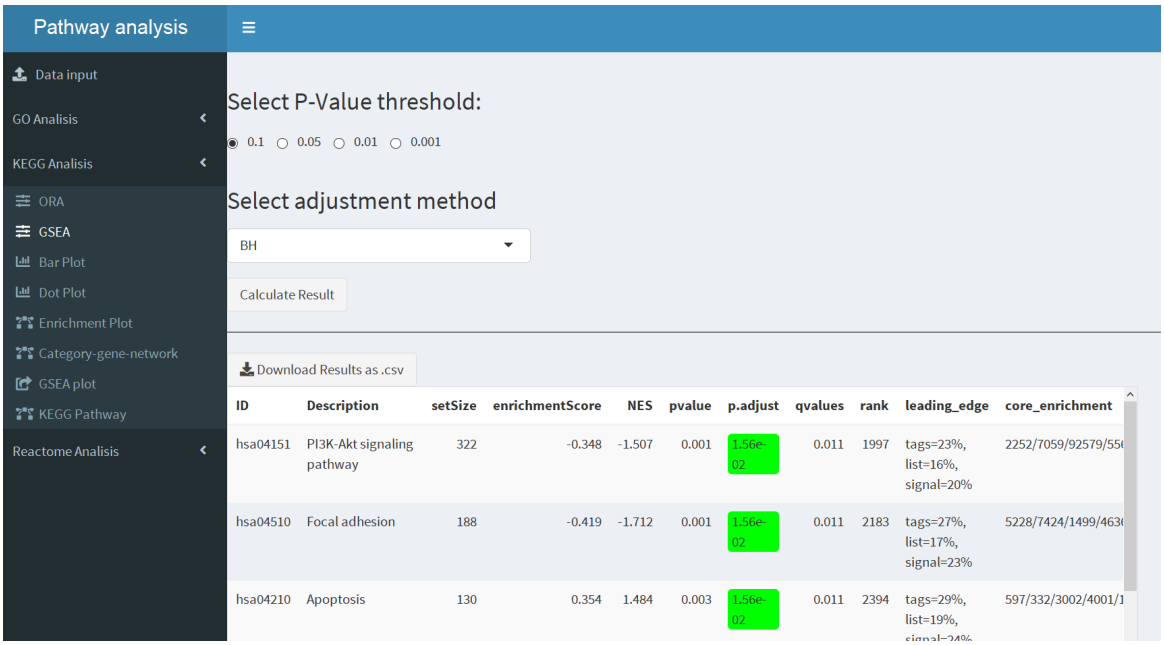



Figure 12: El resultat de l'anàlisi GSEA. KEGG.

### 3.2.3 Reactome

Per completar l'anàlisi l'usuari pot calcular GSEA per a base de dades Reactome. Com als altres casos utilitzo el paquet clusterProfiler i específicament la funció gsePathway()

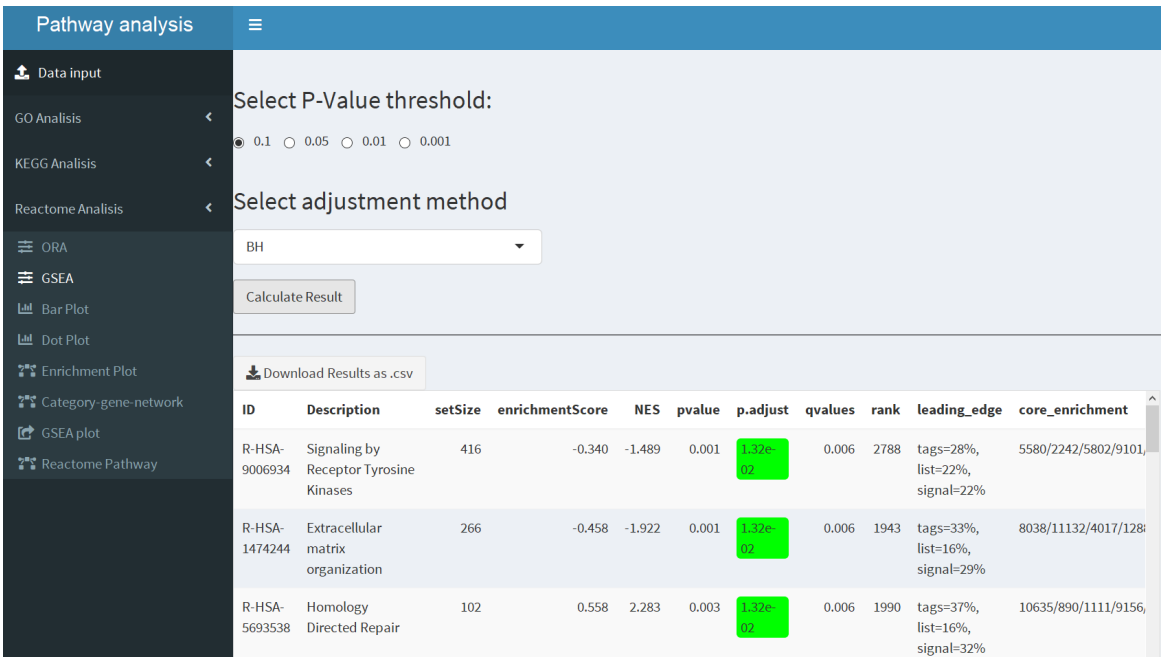



Figure 13: El resultat d'anàlisi GSEA. Reactome.

## 3.3 Bar-Plots

Els resultats de enrichGO, enrichKEGG i enrichPathway es poden visualitzar amb el gràfic de barres. L'usuari pot elegir el nombre de les categories visualitzades entre 2 i 30. Es dona l'opció per descarregar el gràfic en format .png.

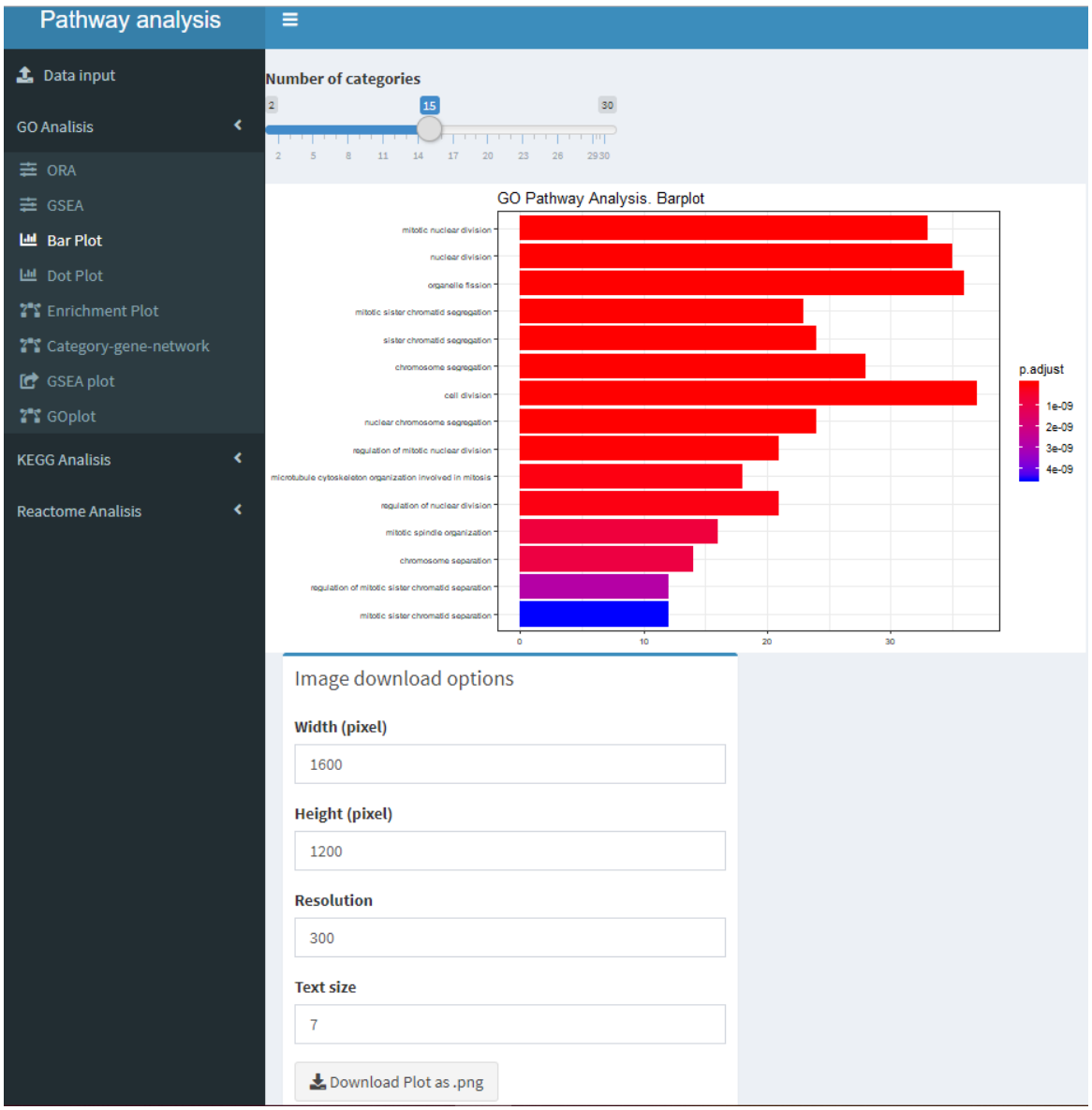



Figure 14: Bar-Plot. GO.

## 3.4 Dot-Plots

El *dot plot* visualitza addicionalment el *gen ratio*. També aquí l'usuari pot seleccionar el nombre de categories.

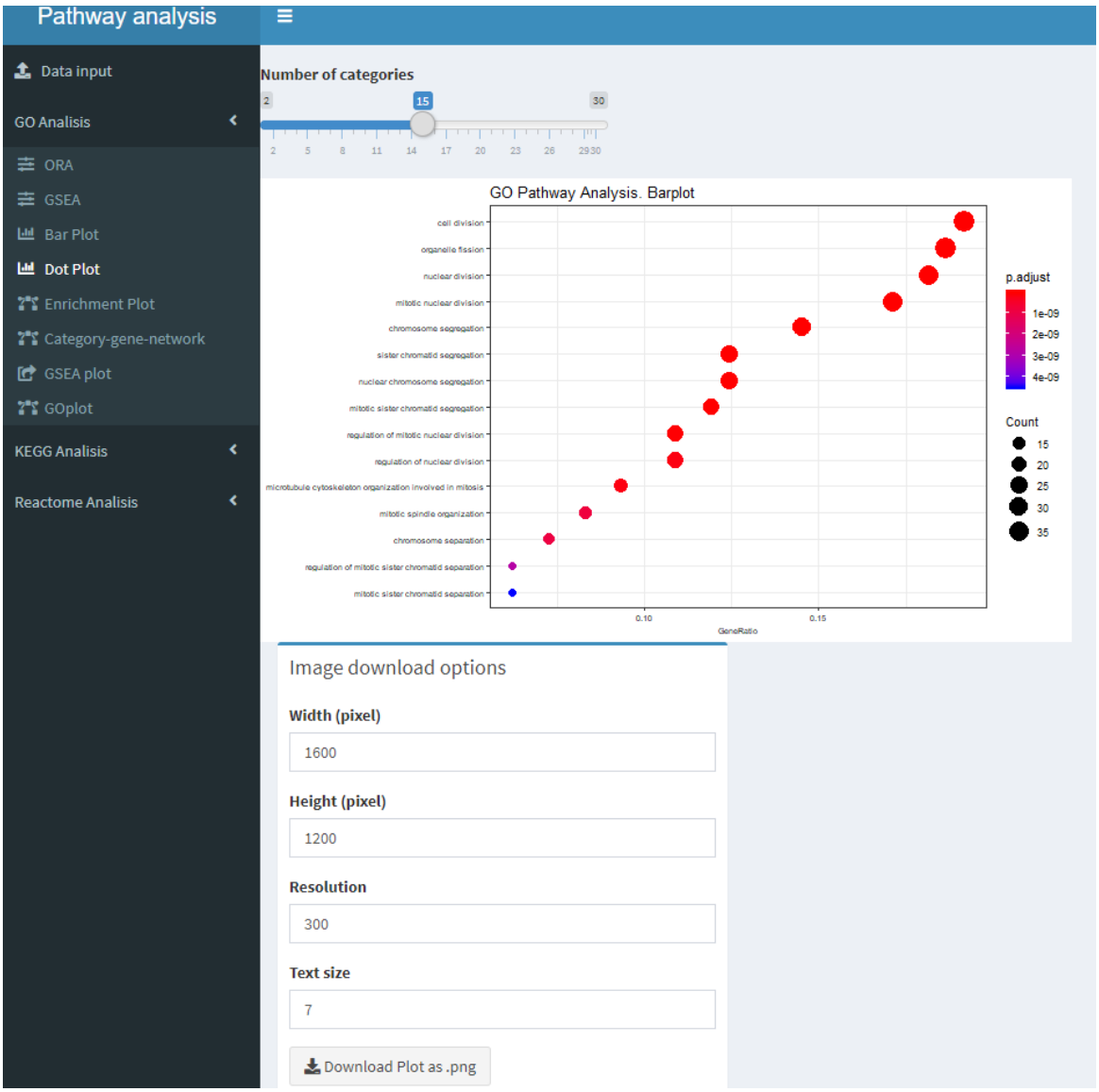



Figure 15: Bar-Plot. GO.

## 3.5 Enrichment Plots

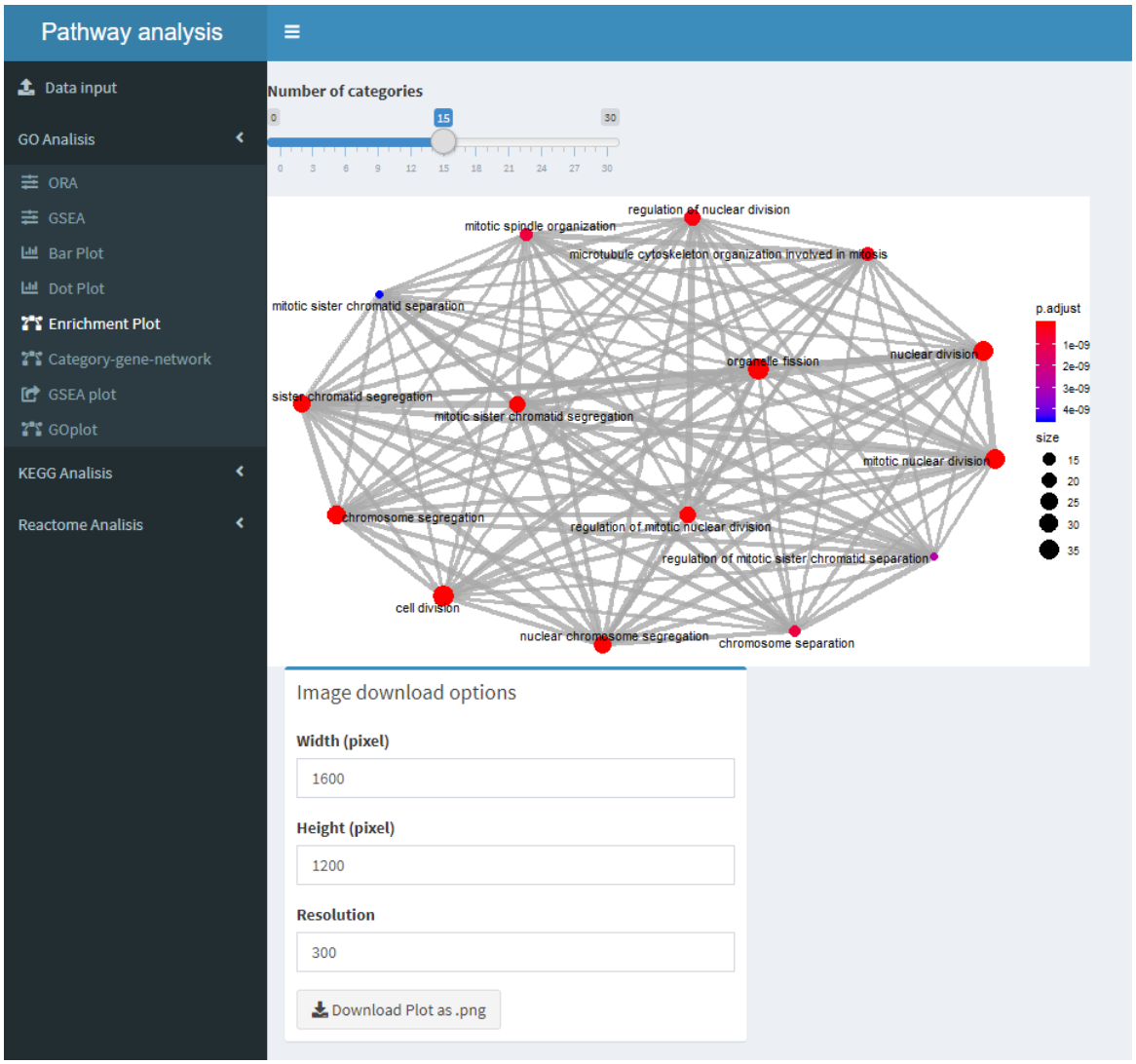



Figure 16: Bar-Plot. GO.

## 3.6 Category-Gene-Network Plot

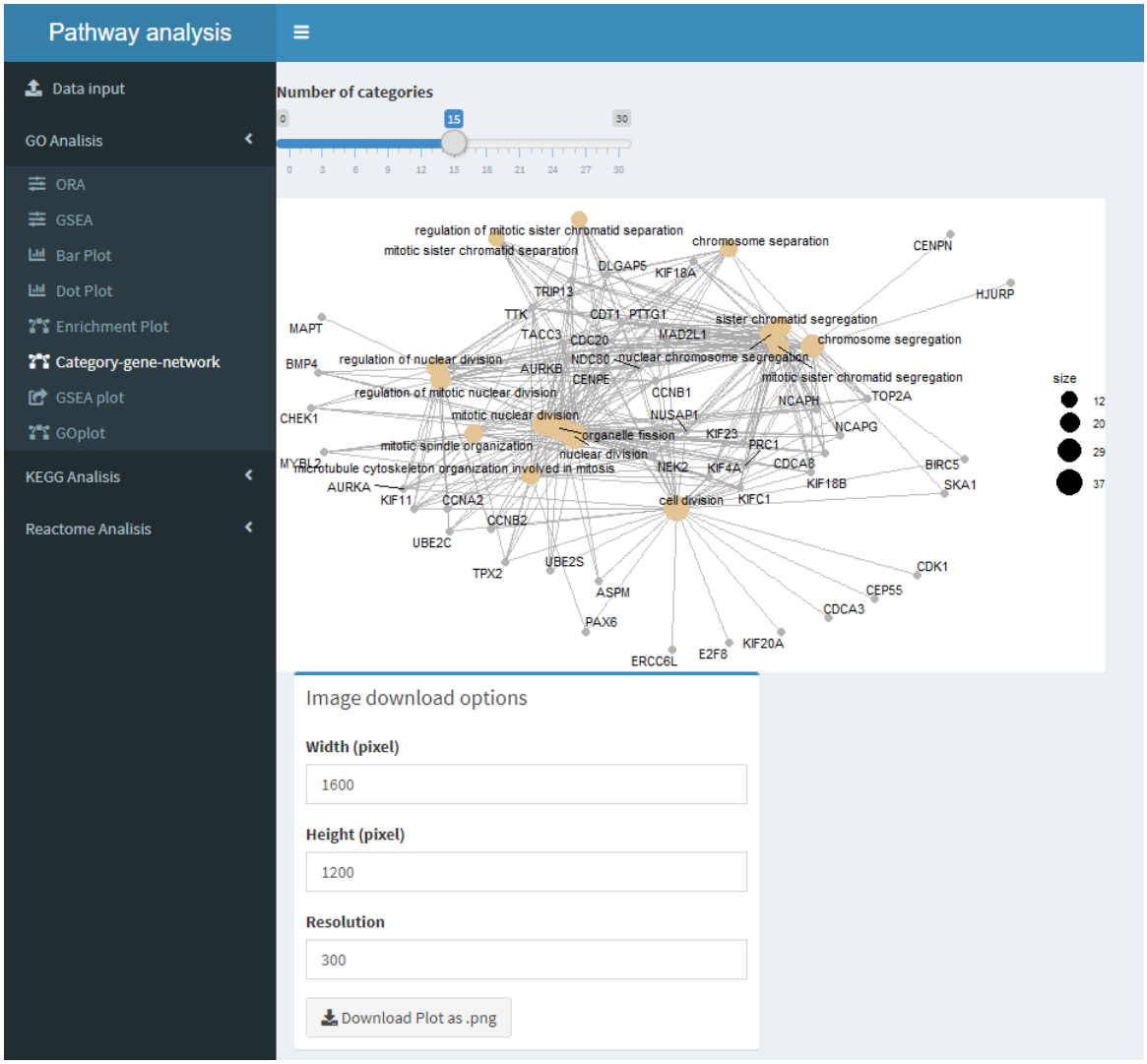



Figure 17: Category-Gene-Network Plot. GO.

## 3.7 GSEA Plot

L'usuari pot visualitzar una de les categories disponibles via *dropdown list*. El llistat inclou totes les rutes generades durant l'anàlisi GSEA en els apartats *Go Analysis→GSEA*; *KEGG→GSEA*

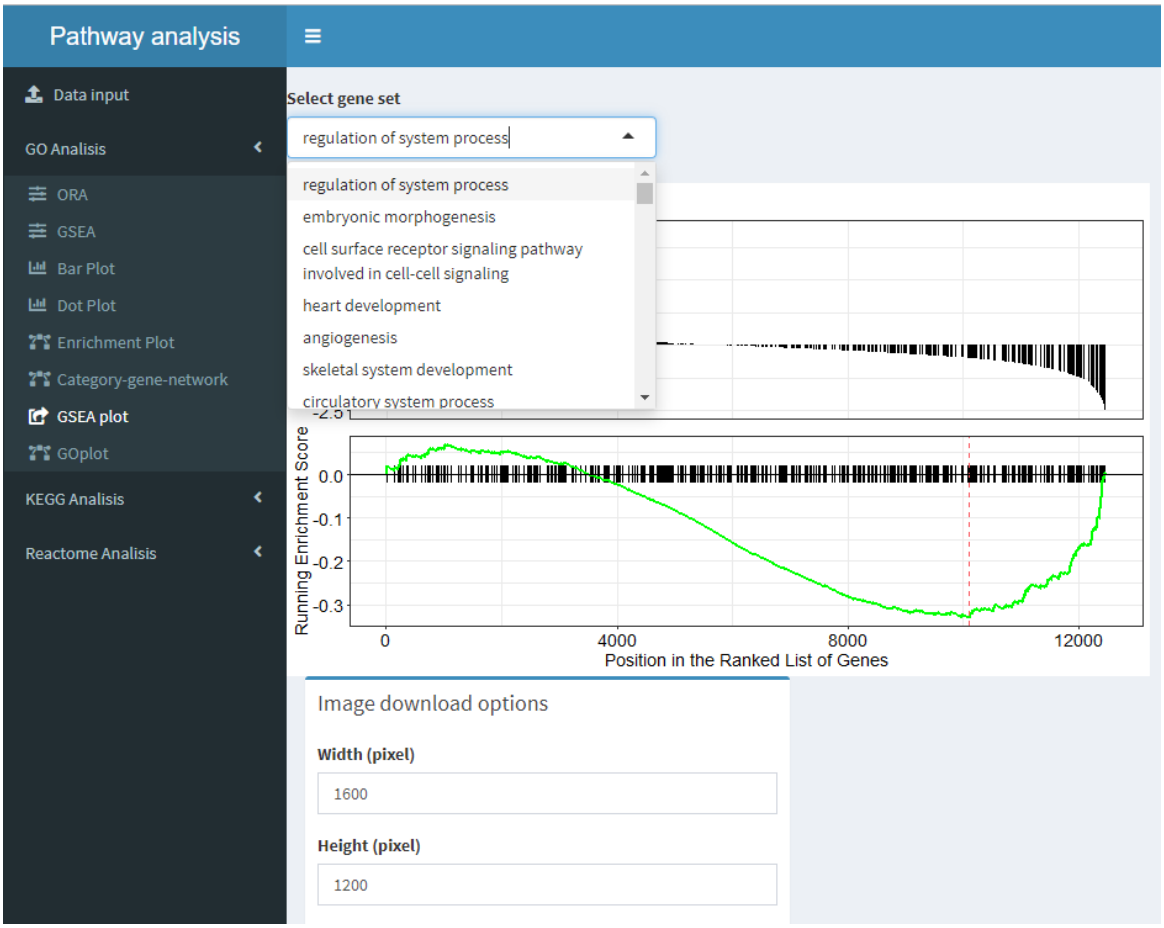



Figure 18: GSEA Plot. GO.

# 4 L'anàlisi específic de GO, KEGG i Reactome

## 4.1 GO Plot

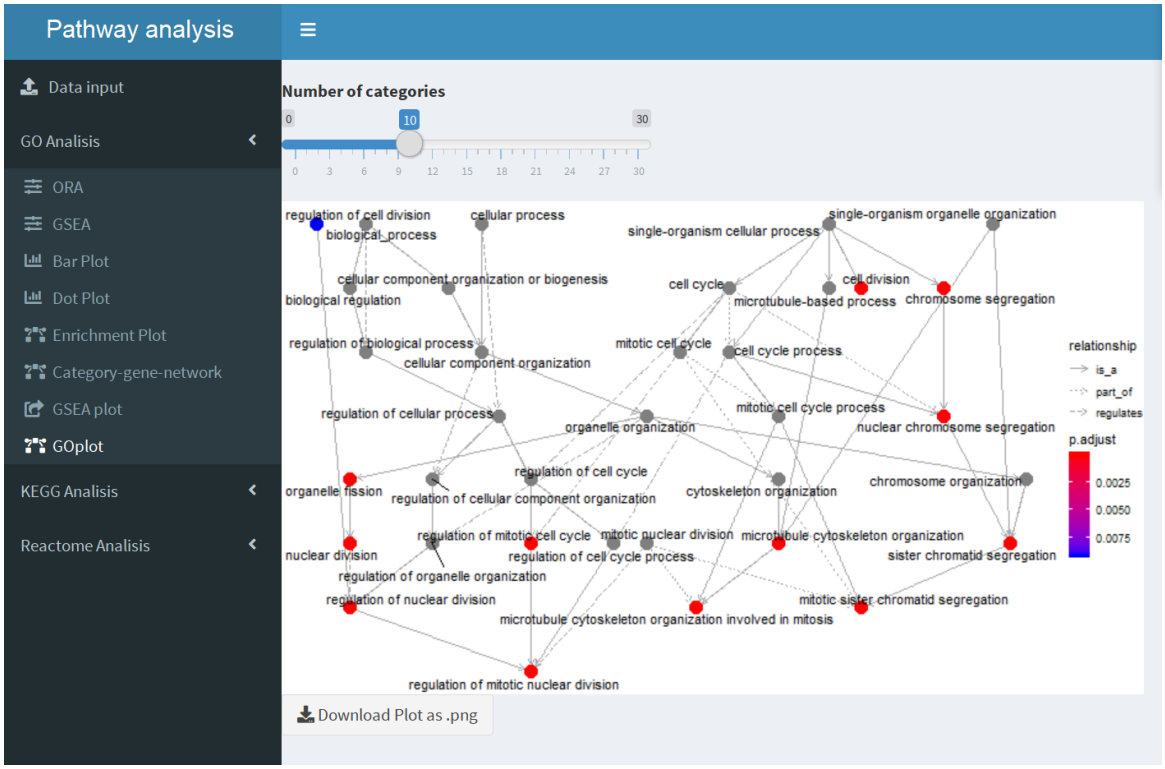



Figure 19: GO Plot

## 4.2 KEGG Pathway

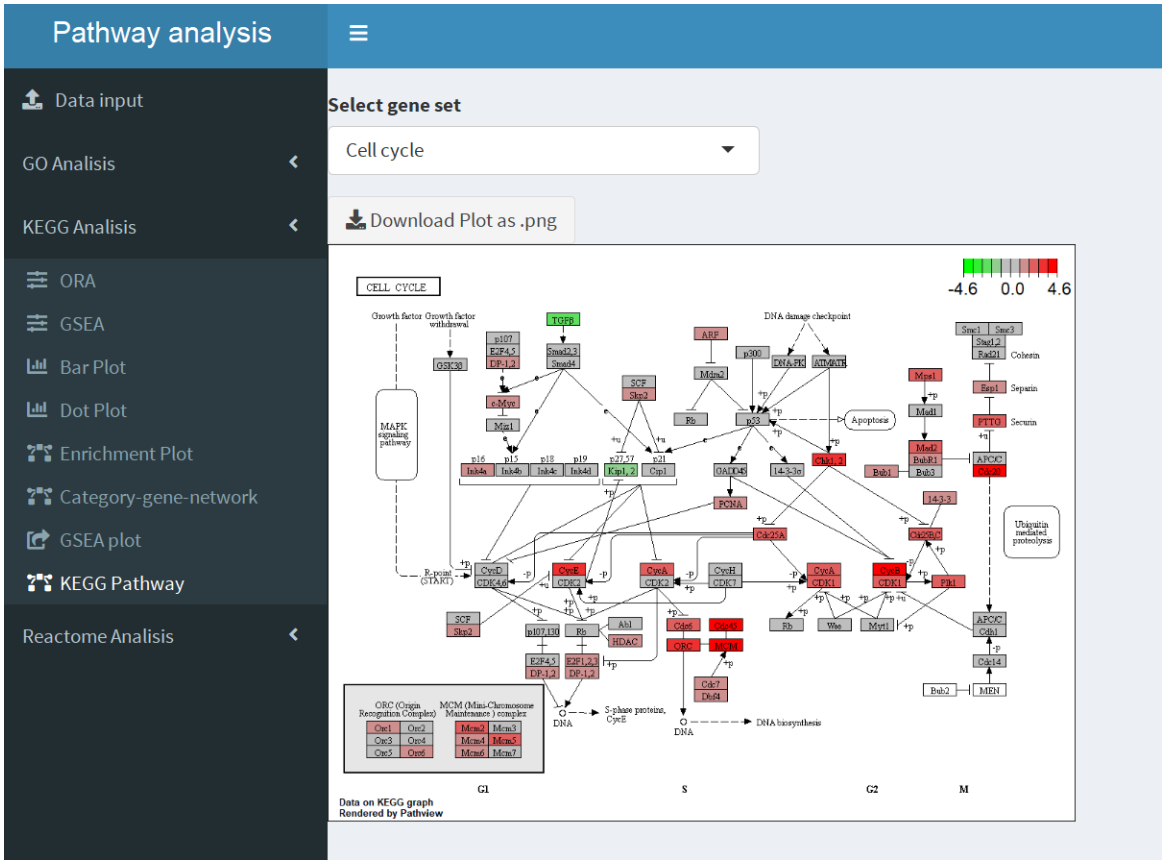



Figure 20: KEGG pathway

## 4.3 Reactome Pathway

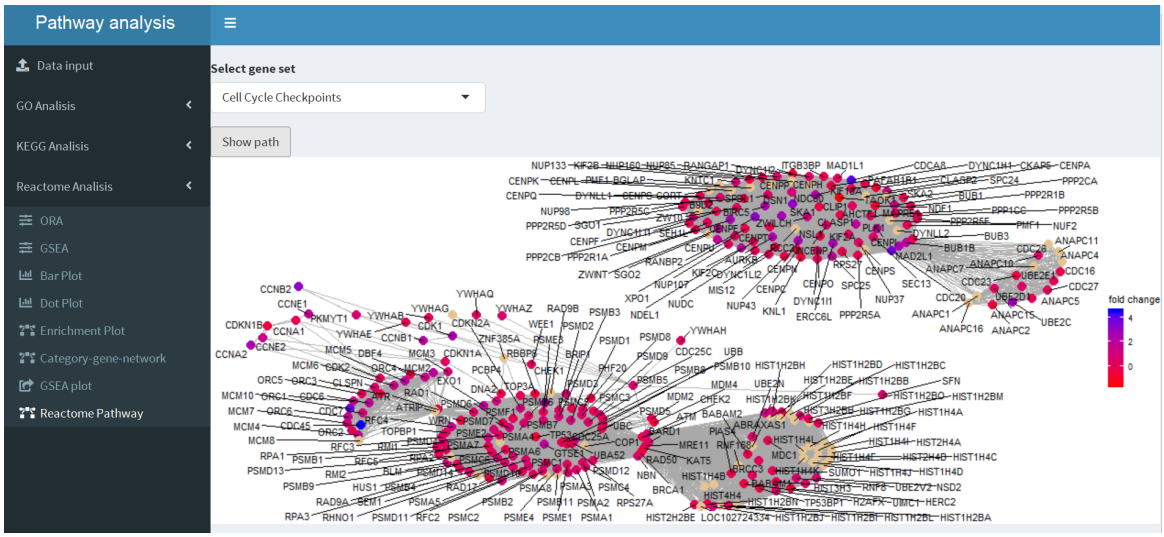



Figure 21: Reactome pathway

# 5 Validació dels resultats

L'anàlisi de les rutes representa l'últim pas de l'anàlisi d'expressions. Per dur a terme l'anàlisi de rutes és necessari tenir unes dades que ja estiguin processades prèviament (normalització, càlcul de les LogRatios, ajustament dels gens repetits a l'array, selecció dels gens diferencialment expressats, etc.). Les dades de GEO (Gene Expression Omnibus) estan però disponibles com a màxim en format normalitzat. Caldria doncs fer una anàlisi per arribar a un llistat de gens diferencialment expressats amb les logRatios per tots els gens de la mostra. Fer això no seria cap problema i de fet ho he fet per altres estudis. El problema és que arribo a resultats diferents dels resultats dels estudis d'on provenen les dades (i no parlo de l'anàlisi de les rutes sinó ja del càlcul de les logRatios). Per tant les dades que entraria a l'aplicació serien diferents de les dades de l'estudi i lògicament amb aquesta comprovació no comprovo el que realment m'interessa. Podria, doncs, dedicar-me a trobar el motiu pel qual els resultats són diferents, però fer totes aquestes comprovacions prèvies no té a veure amb l'objecte del meu treball de màster, l'anàlisi de les rutes. Per tant he procedit a contactar el meu profesor per si tindria (o coneixeria) dades preprocessades fins a un llistat de gens amb logRatios i amb el set de gens diferencialment expressats, per tal que les pugui utilitzar en la meva aplicació. El meu professor m'ha redirigit, entre altres enllaços molt útils, al seu repositori en github.com.

| Estudi | GEO ID | Espècie | Tipo d'experiment | Font |
|---|---|---|---|---|
| [Schmidt et al., 2008] | GSE11121 | Homo sapiens | Microarrays | Paquet DOSE de Bioconductor |
| [Li et al., 2017] | GSE100924 | Mus musculus | Microarrays | Github Sanchez Pla |
| [Farmer et al., 2005] | GSE1561 | Homo sapiens | Microarrays | Github Sanchez Pla |
| [Hengel et al., 2003] | DAVID Demo List 1 | Homo sapiens | Microarrays | DAVID |

Les dades de [Schmidt et al., 2008], que s'utilitzen en els vignettes de clusterProfiler i ReactomePA, ja les he mostrat en gran part a dalt quan explicava el contingut de l'aplicació. Els resultats obtinguts amb l'aplicació són iguals als resultats en els vignettes mencionats. Procediré doncs amb l'exemple basat en les dades de [Li et al., 2017] .

## 5.1 Exemple d'anàlisi 1. GEO: GSE100924

Les dades d'estudi [Li et al., 2017] són ja preprocessades per Ricardo Gonzalo Sanz i Sanchez Pla i estan disponibles a github. De la carpeta *results* he agafat la taula *topAnnotated_KOvsWT_COLD.csv*. Sanz i Pla utilitzen el paquet ReactomePA per a l'anàlisi d'enriquiment. Repeteixo doncs el seu anàlisi utilitzant l'aplicació.

1. Ellegeixo l'espècie *Mus musculus* per a GO, KEGG i Reactome.

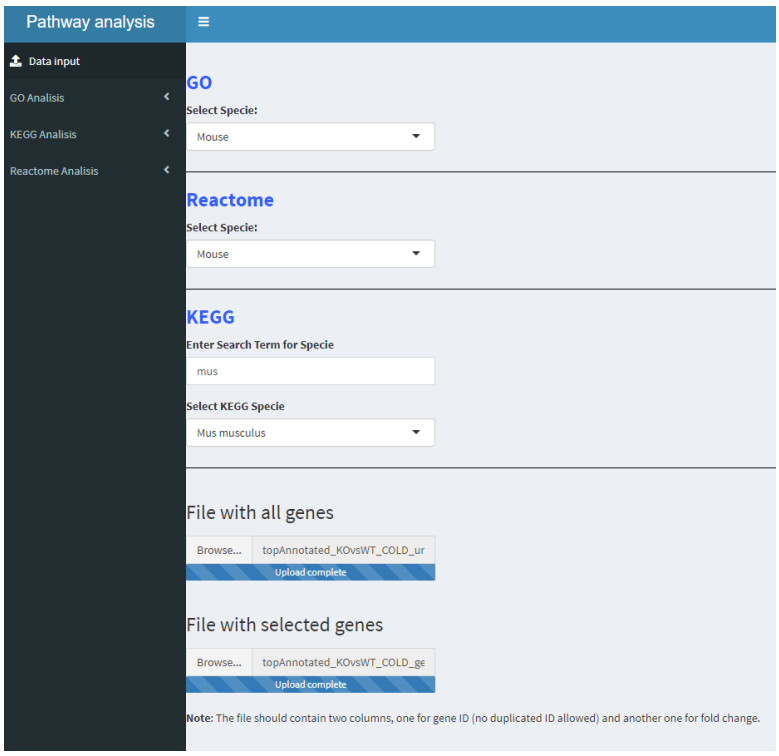



Figure 22: Selecció d'espècie

L'output a baix indica que s'ha pujat el total de 5995 gens. Per a l'arxiu dels gens seleccionats l'aplicació diu que s'han pujat 769 gens.

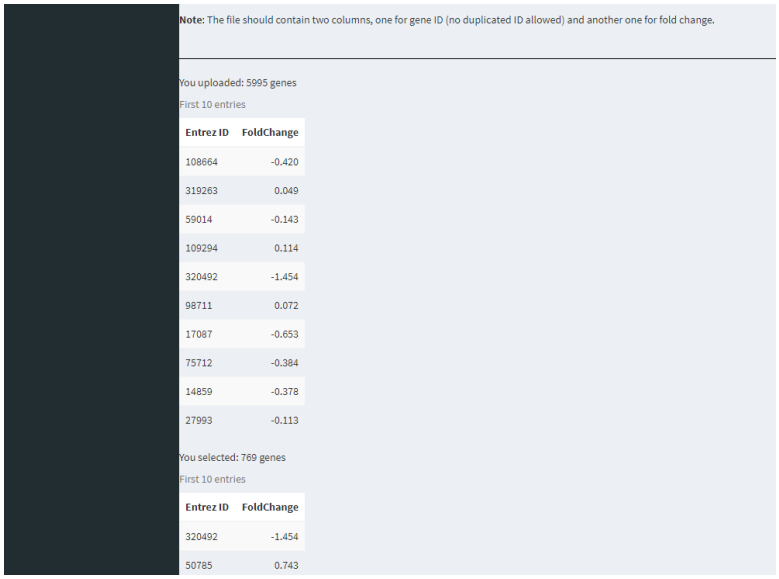



Figure 23: Selecció d'espècie

2. Clico en l'apartat *Reactome Analysis→ORA*. Selecciono com a mètode d'ajustament *BH* i el cut-off del valor de P ajustat 0.05. Clico a *Calculate results*

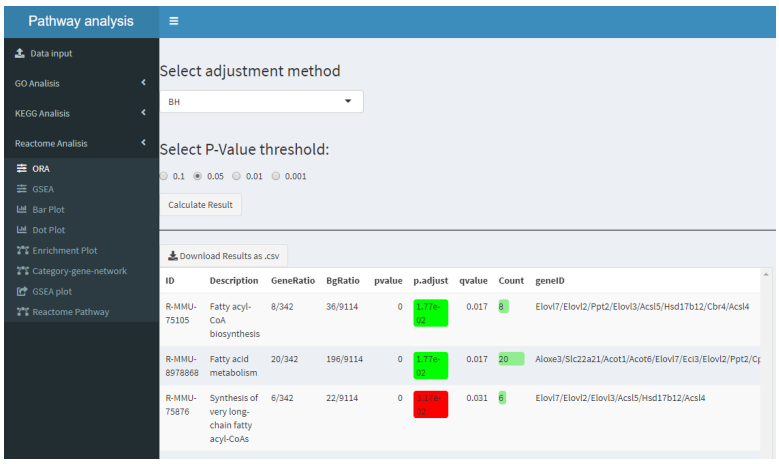



Figure 24: Resultat d'anàlisi ORA de Reactome

Observem que els gens mostrats són els mateixos esmentats per Sanz i Pla.

3. Visualització del resultat ORA

   - Selecciono *Reactome Analysis→Bar Plot*

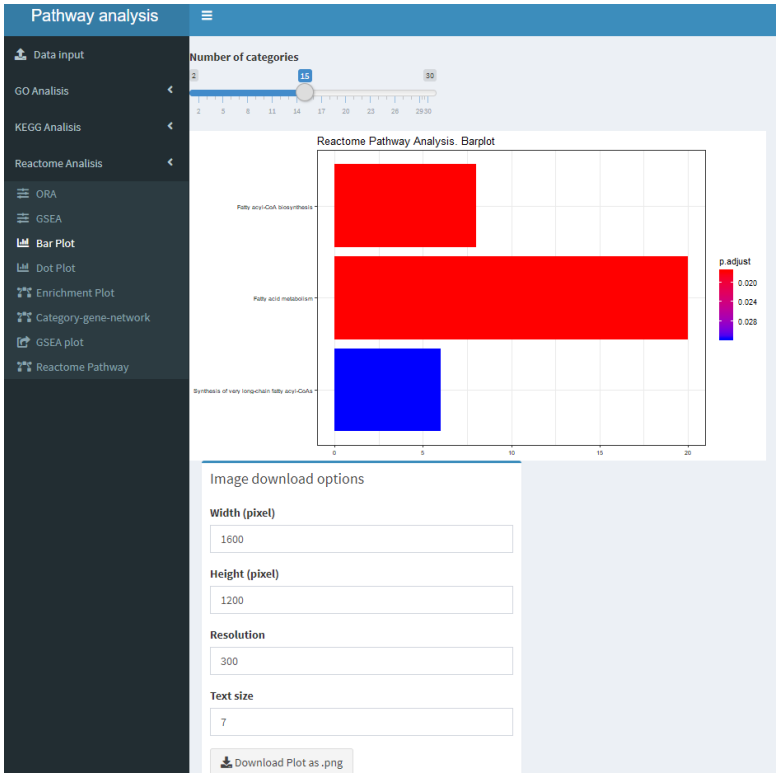



Figure 25: Gràfic de barres

   - Selecciono *Reactome Analysis→Dot Plot*

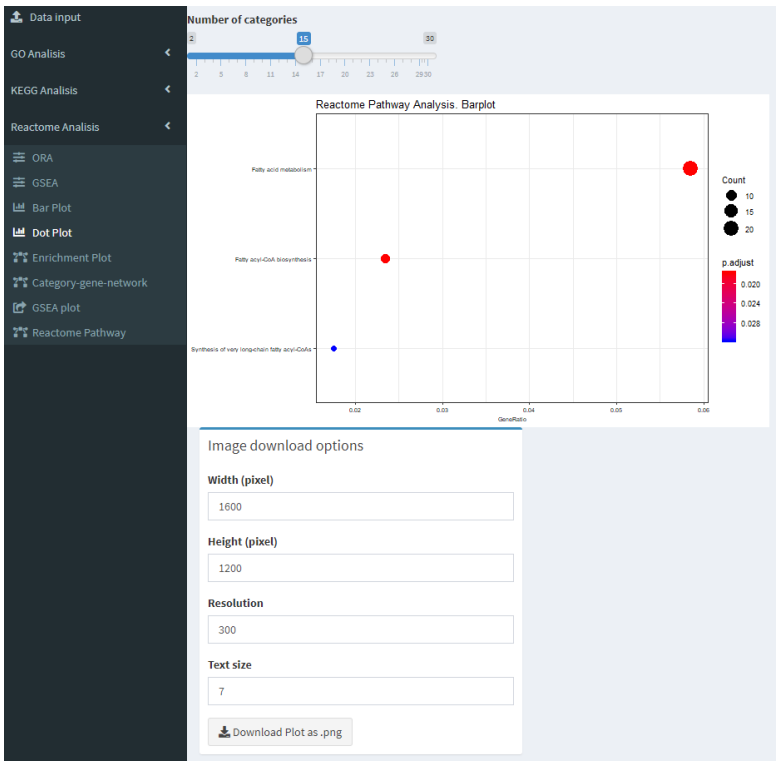



Figure 26: Gràfic de punts

- Selecciono *Reactome Analysis→Enrichment Map Plot*

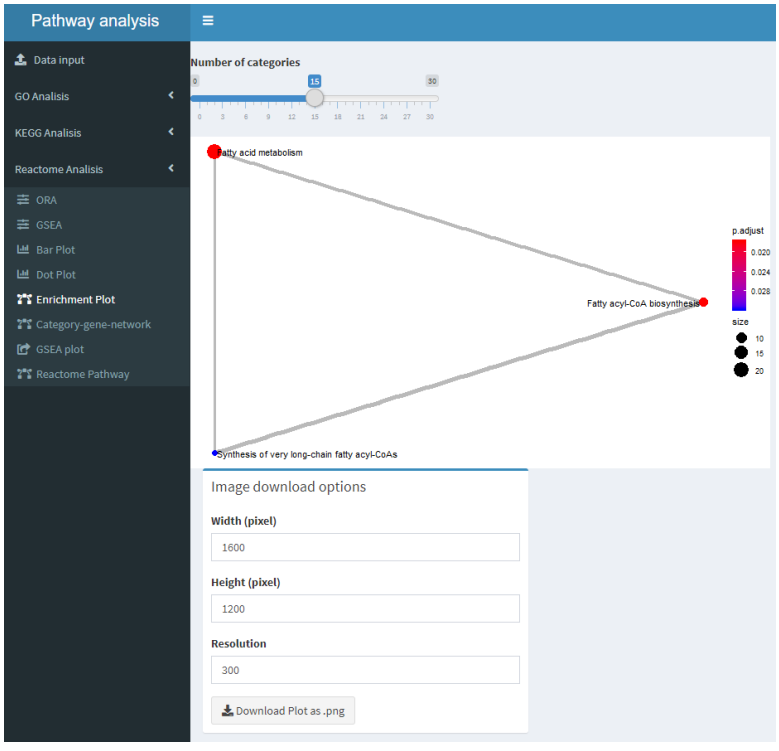



Figure 27: Mapa d'enriquement

- Selecciono *Reactome Analysis→Category Gene Network*

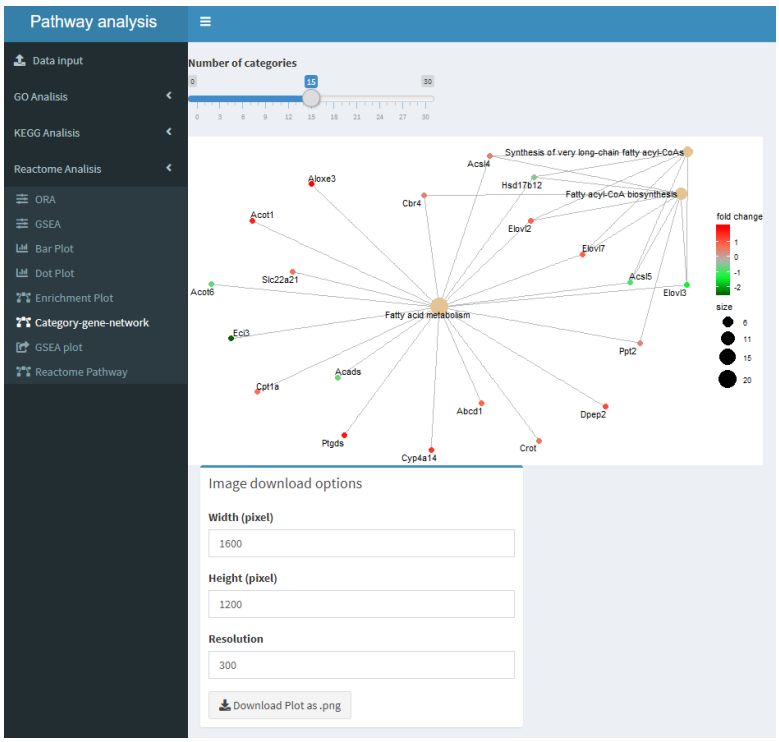



Figure 28: Red de les categories i gens

- Selecciono *Reactome Analysis→Reactome Pathway*

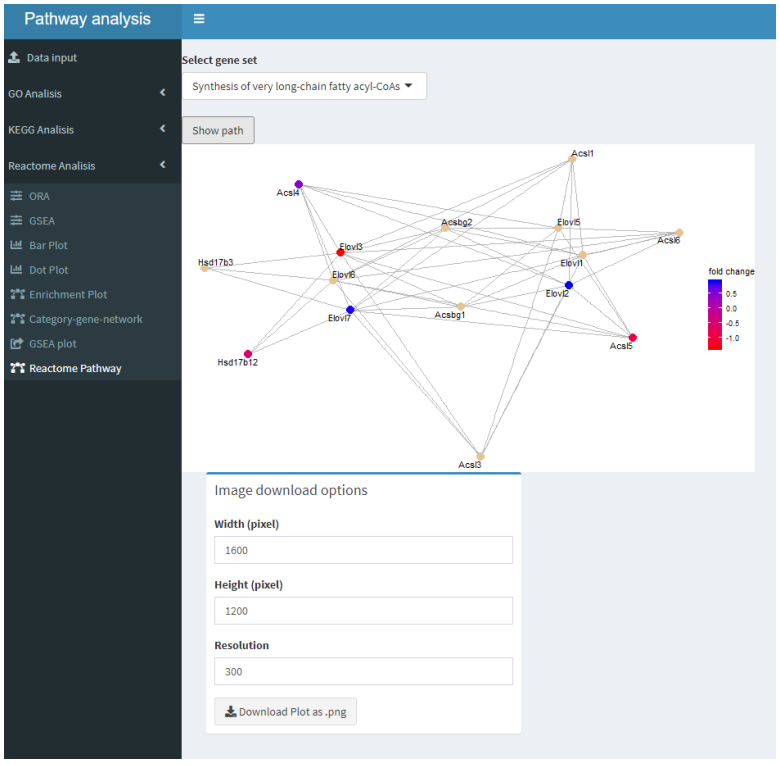



Figure 29: Rutes Reactome

Addicionalment a l'anàlisi ORA podem fer, mitjançant l'aplicació, l'anàlisi GSEA per les rutes de Reactome. Per fer-ho:

1. Clico en l'apartat *Reactome Analysis→GSEA*. Selecciono com a mètode d'ajustament *BH* i el cut-off del

valor de P ajustat 0.05. Clico a *Calculate results*

Amb el valor de P de 0.05 l'anàlisi no troba cap ruta enriquida.

2. Augmento el Cut-Off del valor de P a 0.1

   Amb el Cut-Off més alt l'aplicació retorna un llistat de gens.

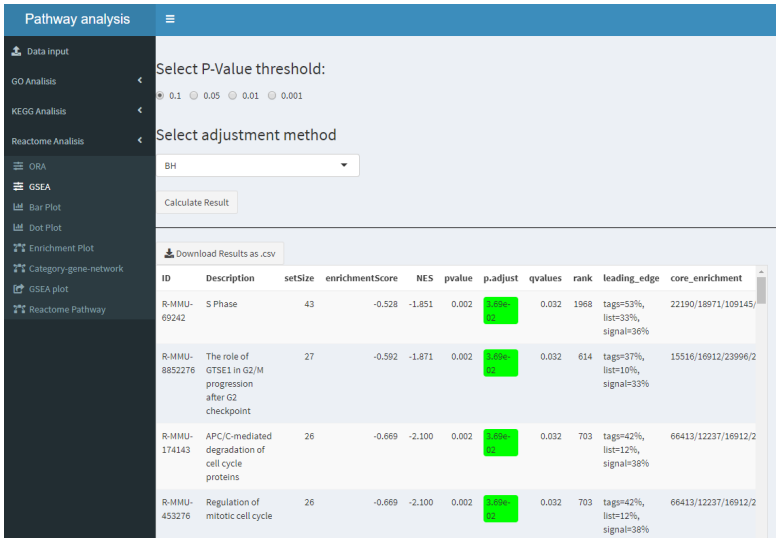



Figure 30: Anàlisi GSEA

3. Per obtenir els gràfics GSEA anem a *Reactome Analysis→GSEA plot*

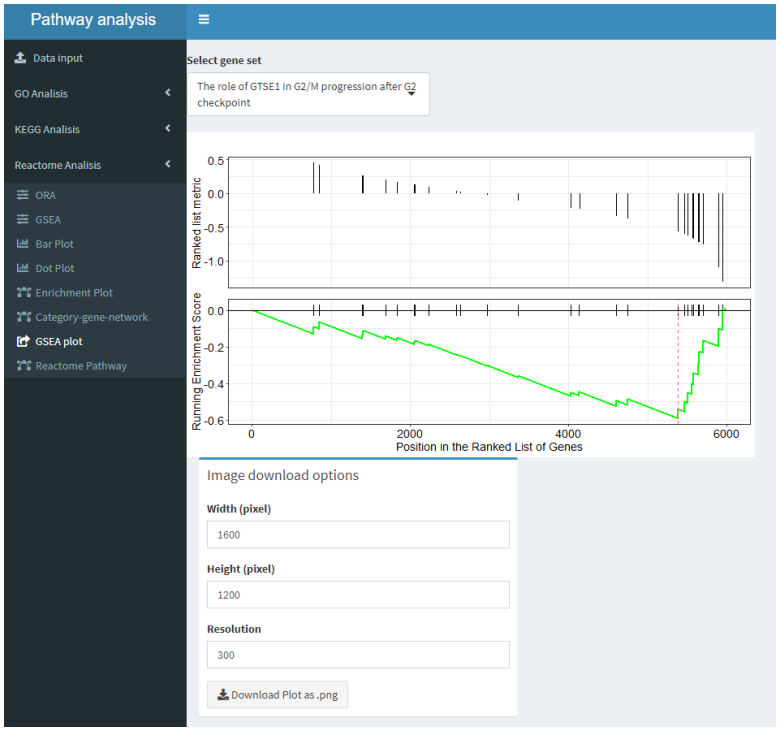



Figure 31: Gràfic GSEA

També podem fer l'anàlisi de KEGG. El resultat de KEGG és similar a l'anàlisi de Reactome. L'aplicació permet però generar les rutes KEGG. Per obtenir-les:

1. Clico en l'apartat *KEGG Analysis→ORA*. Selecciono com a mètode d'ajustament *BH* i el cut-off del valor de P ajustat 0.05. Clico a *Calculate results*

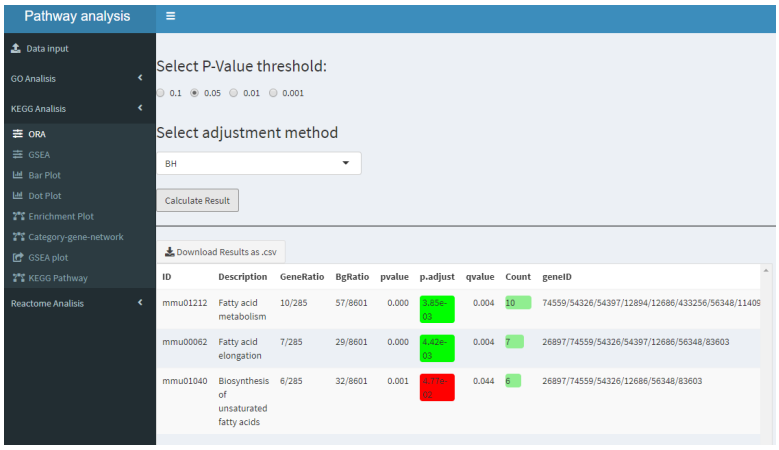



Figure 32: Anàlisi ORA de KEGG

2. Anem a *KEGG→KEGG Pathway*

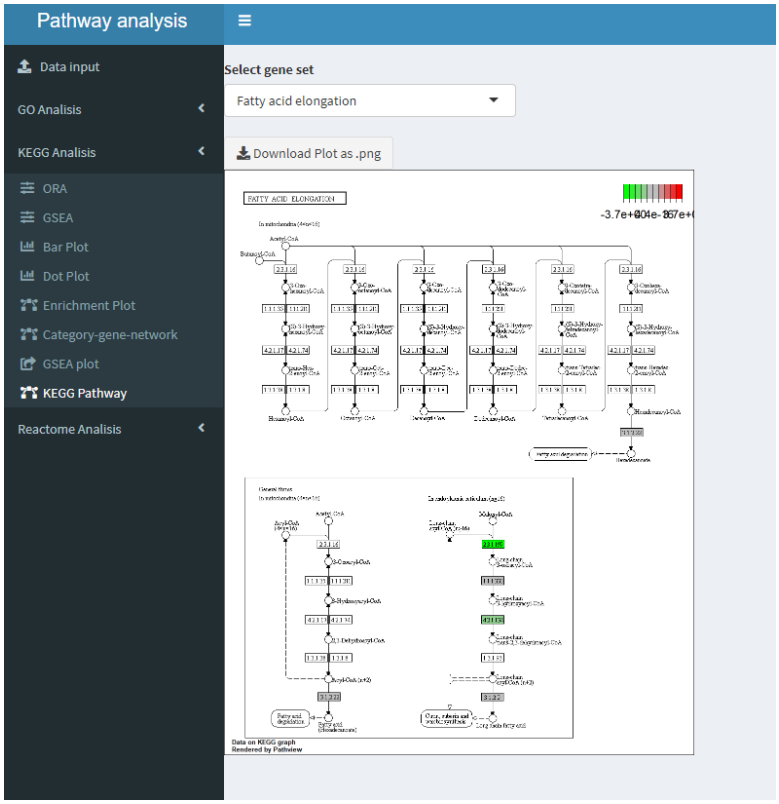



Figure 33: Gràfic de les rutes KEGG

L'anàlisi GO no retorna cap terme GO amb el nivell de significació de 0.05. Pujant el nivell de significació fins 0.1 retorna un llistat dels termes enriquits per als components cel·lulars.

Clico en l'apartat *GO Analysis→ORA*. Selecciono com a mètode d'ajustament *BH* i el cut-off del valor de P ajustat 0.1. Selecciono també *CC*. Clico a *Calculate results*

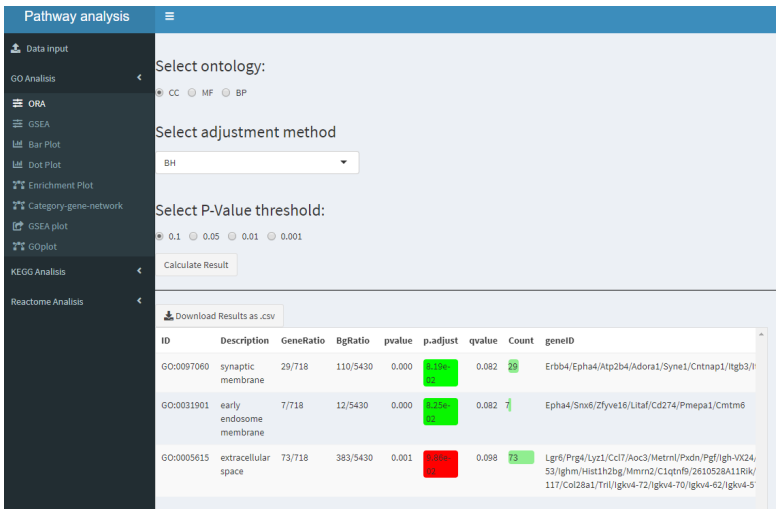



Figure 34: L'anàlisi ORA de GO

# 6 Activitats no previstes

Treballant en el projecte he notat la necessitat de fer tot el procès més segur. El moment clau era quan no he pogut trobar l'USB on he guardat el meu projecte. Ho tenia en un USB perquè hi treballava ded de molts ordinadors diferents: de casa, de la feina, en un portàtil quan era de viatge. Per tan he decidit guardar tot el projecte en github.com. He creat un repositori al qual puc accedir des d'ordinadors diferents.

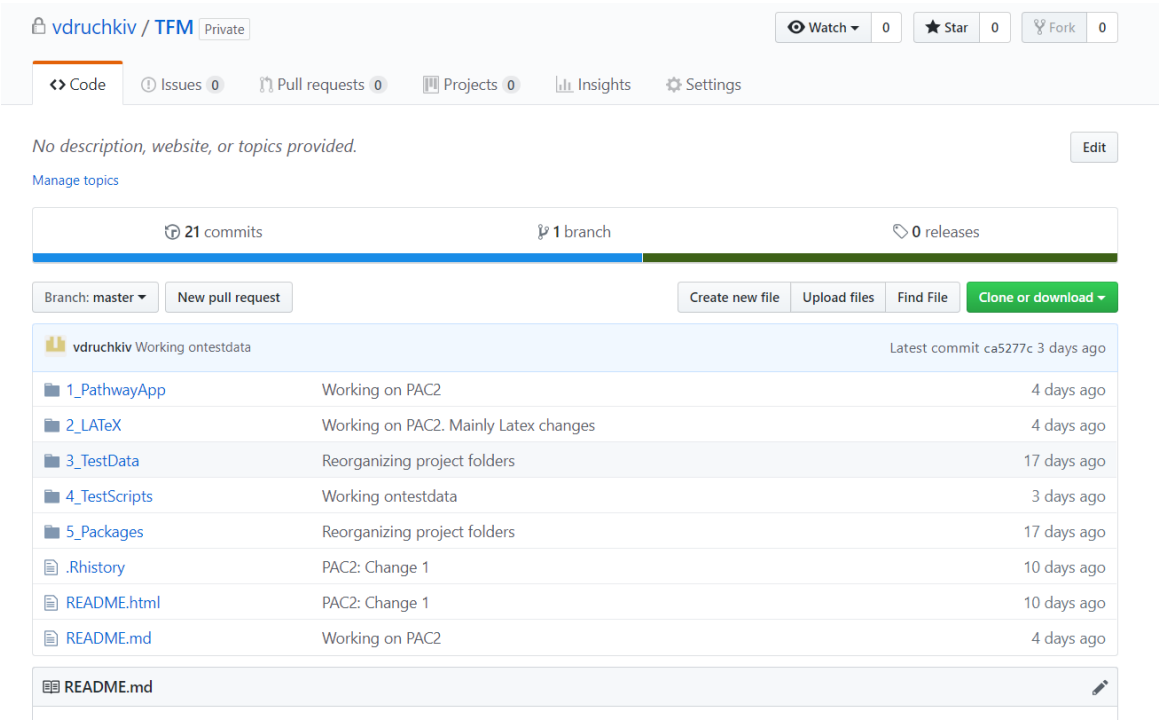



Figure 35: Github repositori del TFM

Utilitzant el GitBash es pot documentar els canvis (commit) i pujar (push) o baixar (pull) els arxius. Així el treball en el projecte és més segur i pràctic.

# Biblilografia


[Boyle et al., 2004] Boyle, E. I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J. M., and Sherlock, G. (2004). Go:: Termfinder—open source software for accessing gene ontology information and finding significantly enriched gene ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics*, 20(18):3710–3715.

[Dinu et al., 2007] Dinu, I., Potter, J. D., Mueller, T., Liu, Q., Adewale, A. J., Jhangri, G. S., Einecke, G., Famulski, K. S., Halloran, P., and Yasui, Y. (2007). Improving gene set analysis of microarray data by sam-gs. *BMC bioinformatics*, 8(1):242.

[Farmer et al., 2005] Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., MacGrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., et al. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Breast Cancer Research*, 7(2):P2–11.

[Hengel et al., 2003] Hengel, R. L., Thaker, V., Pavlick, M. V., Metcalf, J. A., Dennis, G., Yang, J., Lempicki, R. A., Sereti, I., and Lane, H. C. (2003). Cutting edge: L-selectin (cd62l) expression distinguishes small resting memory cd4+ t cells that preferentially respond to recall antigen. *The Journal of Immunology*, 170(1):28–32.

[Kim and Volsky, 2005] Kim, S.-Y. and Volsky, D. J. (2005). Page: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC bioinformatics*, 6(1):144.

[Li et al., 2017] Li, S., Mi, L., Yu, L., Yu, Q., Liu, T., Wang, G.-X., Zhao, X.-Y., Wu, J., and Lin, J. D. (2017). Zbtb7b engages the long noncoding rna blnc1 to drive brown and beige fat development and thermogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34):E7111–E7120.

[Luo et al., 2009] Luo, W., Friedman, M. S., Shedden, K., Hankenson, K. D., and Woolf, P. J. (2009). Gage: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC bioinformatics*, 10(1):161.

[Newton et al., 2007] Newton, M. A., Quintana, F. A., Den Boon, J. A., Sengupta, S., Ahlquist, P., et al. (2007). Random-set methods identify distinct aspects of the enrichment signal in gene-set analysis. *The Annals of Applied Statistics*, 1(1):85–106.

[Schmidt et al., 2008] Schmidt, M., Böhm, D., Von Törne, C., Steiner, E., Puhl, A., Pilch, H., Lehr, H.-A., Hengstler, J. G., Kölbl, H., and Gehrmann, M. (2008). The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer research*, 68(13):5405–5413.

[Subramanian et al., 2005] Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43):15545–15550.

# Apèndix

## A Els paquets i funcions utilitzats en el app

| Package | Funcion |
|---|---|
| c("package:clusterProfiler", "package:ReactomePA") | cnetplot |
| c("package:clusterProfiler", "package:ReactomePA") | dotplot |
| c("package:clusterProfiler", "package:ReactomePA") | emapplot |
| c("package:clusterProfiler", "package:ReactomePA") | gseaplot |
| c("package:dplyr", "package:stats") | filter |
| c("package:kableExtra", "package:knitr") | kable |
| c("package:shinydashboard", "package:graphics") | box |
| character(0) | enrichrekegg |
| character(0) | enrichresgo |
| character(0) | enrichresgo_gsea |
| character(0) | enrichreskegg |
| character(0) | enrichreskegg_gsea |
| character(0) | enrichresRA |
| character(0) | enrichresRA_gsea |
| character(0) | geneList |
| character(0) | genes |
| character(0) | kegg_organism1 |
| character(0) | kegg_organism2 |
| character(0) | PathPlotRA |
| character(0) | pathview |
| package:base | abs |
| package:base | as.character |
| package:base | as.numeric |
| package:base | c |
| package:base | file.copy |
| package:base | formatC |
| package:base | length |
| package:base | library |
| package:base | list |
| package:base | max |
| package:base | names |
| package:base | ncol |
| package:base | nrow |
| package:base | paste0 |
| package:base | print |
| package:base | return |
| package:base | sort |
| package:base | tempdir |
| package:base | tempfile |
| package:clusterProfiler | enrichGO |
| package:clusterProfiler | enrichKEGG |
| package:clusterProfiler | goplot |

| | |
|---|---|
| package:clusterProfiler | gseGO |
| package:clusterProfiler | gseKEGG |
| package:clusterProfiler | search_kegg_organism |
| package:dplyr | everything |
| package:dplyr | mutate |
| package:dplyr | select |
| package:formattable | color_bar |
| package:formattable | color_tile |
| package:graphics | barplot |
| package:grDevices | dev.off |
| package:grDevices | png |
| package:kableExtra | kable_styling |
| package:kableExtra | scroll_box |
| package:png | readPNG |
| package:ReactomePA | enrichPathway |
| package:ReactomePA | gsePathway |
| package:ReactomePA | viewPathway |
| package:shiny | actionButton |
| package:shiny | downloadButton |
| package:shiny | downloadHandler |
| package:shiny | eventReactive |
| package:shiny | fileInput |
| package:shiny | fluidRow |
| package:shiny | h3 |
| package:shiny | hr |
| package:shiny | HTML |
| package:shiny | htmlOutput |
| package:shiny | icon |
| package:shiny | imageOutput |
| package:shiny | numericInput |
| package:shiny | radioButtons |
| package:shiny | reactive |
| package:shiny | renderImage |
| package:shiny | renderText |
| package:shiny | renderUI |
| package:shiny | req |
| package:shiny | selectInput |
| package:shiny | shinyApp |
| package:shiny | sliderInput |
| package:shiny | strong |
| package:shiny | tableOutput |
| package:shiny | textInput |
| package:shiny | textOutput |
| package:shiny | uiOutput |
| package:shinycssloaders | withSpinner |
| package:shinydashboard | dashboardBody |
| package:shinydashboard | dashboardHeader |
| package:shinydashboard | dashboardPage |
| package:shinydashboard | dashboardSidebar |

| | |
|---|---|
| package:shinydashboard | menuItem |
| package:shinydashboard | sidebarMenu |
| package:shinydashboard | tabItem |
| package:shinydashboard | tabItems |
| package:utils | head |
| package:utils | read.csv |
| package:utils | write.csv |