Sprawozdanie z przedmiotu Bioinformatyka

Grupowanie danych z ekspresji oraz analiza funkcjonalna uzyskanych grup.

Część 1 i 2 21.02.2017, 28.02.2017

> Szymon Kocot Wojciech Opoczyński Łukasz Witek Alexandra Zając

1. Przebieg ćwiczenia:

Lab 1

a. Wczytano przykładowe dane pochodzące z eksperymentu Eisen - przebiegi czasowe ekspresji dla drożdży.

Za pomocą polecenia 'whos' wyświetlono informacje na temat wczytanych danych:

Name	Size	Bytes	Class	Attributes
genes	6400×1	806522	cell	
times	1x7	56	double	
yeastvalues	6400×7	358400	double	

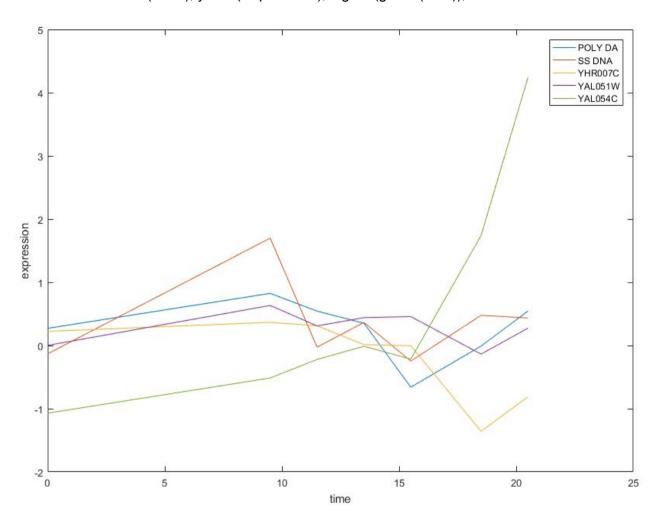
- Zmienna 'yeastvalues' zawiera liczbowe wartości oznaczające poziom ekspresji badanych genów
- Zmienna 'genes' zawiera listę wszystkich genów drożdży przebadanych na mikromacierzy
- Zmienna 'times' zawiera wartości czasowe, w których mierzono poziom ekspresji genów
- b. Filtracja danych. Usunięcie pustych pól oraz zapamiętanie zmiennej genes do dalszych operacji.

```
emptyspots = strcmp('EMPTY', genes);
genes(emptyspots) = [];
yeastvalues(emptyspots, :) = [];
chipgenes = genes;
```

c. Usunięcie brakujących wartości NaN, wykorzystując funkcję knnimpute, która zastępuje brakujące wartości najbliższą wartością pobraną z sąsiedniej kolumny. Jeżeli odpowiednia wartość z kolumny najbliższego sąsiedztwa jest NaN, używana jest następna najbliższa kolumna.

yeastvalues = knnimpute(yeastvalues);

d. Wyświetlono wykres zawierający przebieg ekspresji 6-10 genów z mikromacierzy, korzystając z funkcji legend, aby nazwać przebiegi.
 figure; plot(times, yeastvalues(6:10, :));
 xlabel('time'); ylabel('expression'); legend(genes(6:10));



Na wykresie można zaobserwować oscylowanie genów 6:9 dookoła wartości '0', oznaczającej niewielki poziom ekspresji lub nawet jej brak. Gen YAL054C jako jedyny z wymienionych ulega znaczącej ekspresji w 15 sekundzie. Poziom tej ekspresji narasta aż do zakończenia eksperymentu osiągając wartość bliską '4'.

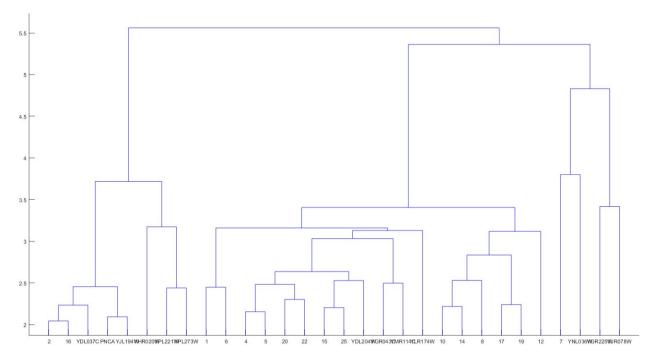
- e. Usunięto geny o niskiej wartości absolutnej ekspresji (nie wykazujących żadnej aktywności w trakcie całego eksperymentu) z wykorzystaniem funkcji genelowvalfilter, parametru absval=log2(3). Otrzymywany jest wektor logiczny zawierający wartości logiczne "1" dla wierszy macierzy reprezentujące geny, które wykazały się ekspresją, również macierz danych oraz listę nazw genów niezawierającą usuniętych wartości. [mask, yeastvalues, genes] = genelowvalfilter(yeastvalues, genes, 'AbsValue', log2(3)); Pozostało 834 genów, 5480 zostało odfiltrowanych.
- f. Usunięto geny których przebiegi profili ekspresji mają niską entopię dla wartości percentyla równego 15%, poniżej którego dane są usuwane.
 [mask2, yeastvalues, genes] = geneentropyfilter(yeastvalues, genes, 'Percentile', 15);
 Pozostało 621 genów, 213 zostało odfiltrowanych.

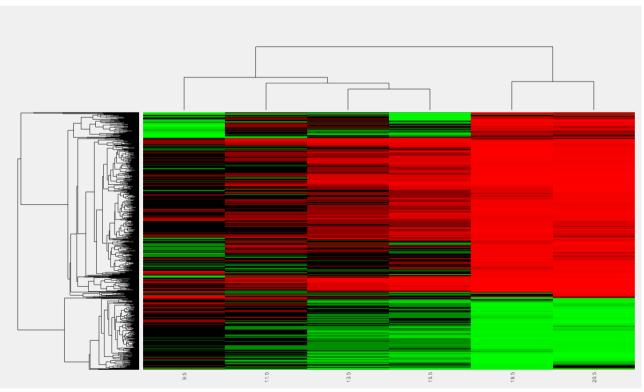
Analiza nienadzorowana

dla 10 klastrów

a. Klastrowanie hierarchiczne.

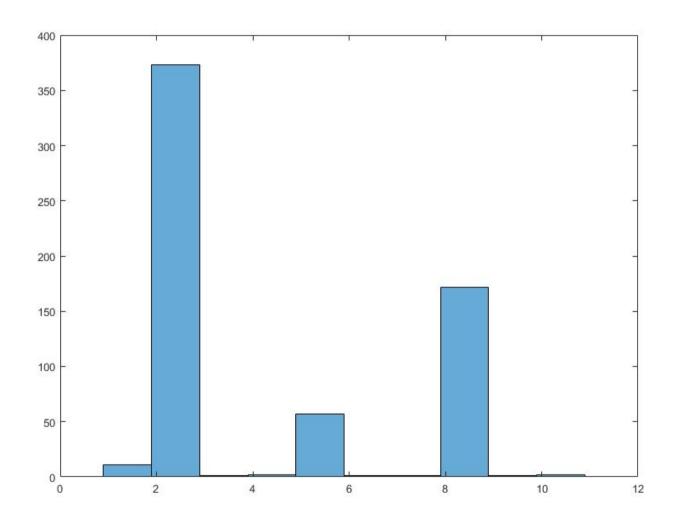
```
clusterTree = linkage(yeastvalues, 'average');
clusters = cluster(clusterTree, 10);
figure; set(gcf,'color','w');
dendrogram(clusterTree, 'labels', genes); set(gcf,'color','w');
cg = clustergram(yeastvalues(:,2:end), 'RowLabels', genes, 'ColumnLabels', times(2:end),
'Linkage', 'average'); set(gcf,'color','w');
```





Zaprezentowane grafiki odzwierciedlają wynik klasteryzacji genów metodą klastrowania hierarchicznego. Na dendrogramie można zaobserwować wszystkie badane geny pogrupowane na zasadzie podobieństwa profili ekspresji. Im bliżej siebie są położone, tym większe między nimi podobieństwo. Duża odległość (oraz dłuższa gałąź łącząca) oznacza znaczącą różnicę w uleganiu ekspresji pomiędzy danymi genami. Na wykresie heatmapy można zaobserwować granicę dzielącą grupy genów na dwie części: zieloną oznaczającą wzrost ekspresji genu w danym momencie oraz czerwoną oznaczającą brak ekspresji genu. Ponownie, geny położone najbliżej siebie wykazują znaczne podobieństwo w profilach ekspresji, stąd widoczna granica pomiędzy grupą 'zieloną' i 'czerwoną'.

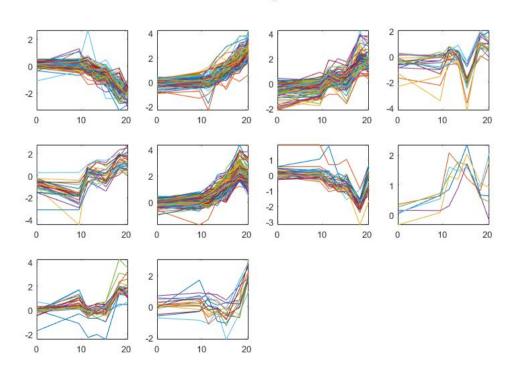
Histogram
figure; histogram(clusters, 10); set(gcf,'color','w');



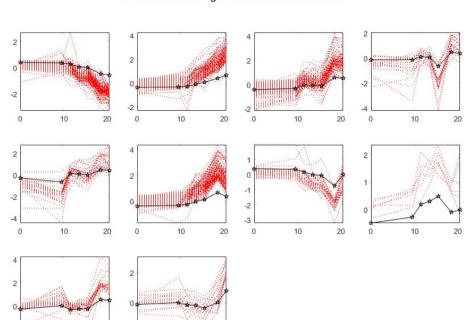
Histogram przedstawia ilość genów objętych danym klastrem. Geny objęte jednym klastrem wykazują większe podobieństwo między sobą, niż do genów z pozostałych klastrów. Najwięcej genów (373) zostało objętych klastrem drugim. Większe ilości genów występują jeszcze w klastrach: ósmym - 172 geny, piątym - 57 genów.

b. Analiza k-średnich. [cidx, ctrs] = kmeans(yeastvalues, 10, 'Distance', 'correlation', 'Replicates', 5); figure hist(cidx, 10) figure; set(gcf,'color','w'); for c = 1:10subplot(3, 4, c); plot(times, yeastvalues((cidx == c), :)'); axis('tight'); end suptitle('K-Means Clustering of Profiles'); figure; set(gcf,'color','w'); for c = 1:10subplot(3, 4, c); plot(times, yeastvalues((cidx == c), :)', 'r:', times, ctrs(c, :)', 'kp-'); axis('tight'); end suptitle('K-Means Clustering of Profiles with Centroids'); figure; set(gcf,'color','w'); for c = 1:10subplot(3, 4, c); plot(times, ctrs(c, :)'); axis('tight'); end suptitle('K-Means Centroids');

K-Means Clustering of Profiles

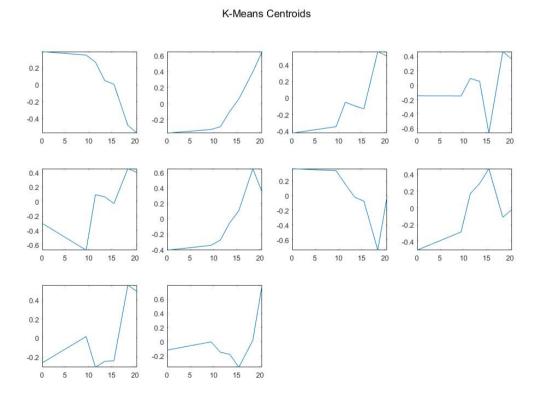


Wykres przedstawia profile ekspresji wszystkich genów objętych danym klastrem. Najmniej genów znajduje się w klastrze nr 6 (6 genów), najwięcej w klastrze nr 5 (150 genów). Można zauważyć, iż geny pogrupowane są na zasadzie podobieństwa ekspresji w czasie (w pewnym momentach ekspresja wzrasta, w innych maleje). Dzięki temu podobieństwu geny są pogrupowane w taki, a nie inny sposób.



K-Means Clustering of Profiles with Centroids

Wykres przedstawia profile ekspresji genów w klastrach wraz z ich centroidami, czyli profilami charakterystycznymi - takimi, do których zostają przyrównane pozostałe profile ekspresji.



Na danym wykresie można zauważyć dokładny kształt centroidów dla każdego klastra, czyli pewnych średnich profili ekspresji, dla każdego klastra, wokół których gromadziły się pozostałe profile ekspresji genów.

Metoda k-średnich jest metodą należacą do grupy algorytmów analizy skupień tj. analizy polegającej na szukaniu i wyodrębnianiu grup obiektów podobnych (skupień). Reprezentuje ona grupę algorytmów niehierarchicznych. Główną różnicą pomiędzy niehierarchicznymi i hierarchicznymi algorytmami jest konieczność wcześniejszego podania ilości skupień.

Przy pomocy metody k-średnich zostanie utworzonych k różnych możliwie odmiennych skupień. Algorytm ten polega na przenoszeniu obiektów ze skupienia do skupienia tak długo aż zostaną zoptymalizowane zmienności wewnątrz skupień oraz pomiędzy skupieniami. Oczywistym jest, iż podobieństwo w skupieniu powinno być jak największe, zaś osobne skupienia powinny się maksymalnie od siebie różnić.

Lab 2.

- 1. Ze strony konsorcjum Gene Ontology pobrano plik 'go-basic.obo' zawierający bazę danych ontologii genowych.
- 2. Wczytano bazę ontologii do środowiska Matlab za pomocą funkcji:

```
GO = geneont('File', 'go-basic.obo')
```

3. Za pomocą funkcji 'get' otrzymano między innymi informacje o aktualności bazy oraz o ilości terminów GO aktualnie zarejestrowanych w bazie:

```
data_version: 'releases/2017-02-27'
Terms: [46473x1 geneont.term]
```

4. Pobrano z internetu plik zawierający bazę adnotacji terminów GO dla organizmu Saccharomyces cerevisiae. Zawartość pliku wczytano za pomocą funkcji:

```
yeastAnnot = goannotread('gene association.sgd')
```

5. Do osobnych zmiennych wczytano listę genów, listę terminów powiązanych z tymi genami oraz typ ontologii:

```
yeastGenes = { yeastAnnot.DB_Object_Symbol}
yeastGO = [yeastAnnot.GOid]
yeastAspect = {yeastAnnot.Aspect}
```

Odfiltrowano tylko terminy GO pochodzące z grafu 'Proces Biologiczny':

```
mask = strcmp({yeastAnnot.Aspect}, 'P')
```

Wykorzystano otrzymany indeks logiczny do usunięcia odpowiednich wierszy z listy genów oraz z listy terminów GO:

```
yeastGenes_BP = yeastGenes(mask);
yeastGO_BP = yeastGO(mask);
```

Otrzymano 40213 genów adnotowanych terminami należącymi do procesu biologicznego.

 Wczytano dane, uzyskane na poprzednim laboratorium. Dla każdego klastra przeprowadzono analizę częstości występowania terminów GO (osobno dla metody klastrowania hierarchicznego oraz K-means):

Do znalezienia odpowiednich wartości użyto funkcji:

```
[GOTerms, clusterGOTermsNo, chipGOTermsNo] = getClusterGOTerms(GO, yeastGenes_BP, yeastGO_BP, genes, chipgenes, clusterNo, clusters)
```

Za jej pomocą uzyskano:

GOTerms - listę terminów GO genów tworzących dany klaster clusterGOTermsNo - liczbę wystąpień danego terminu GO w analizowanym klastrze chipGOTermsNo - liczbę wystąpień danego terminu GO w całym zbiorze genów analizowanych na mikromacierzy

Przykładowo, dla metody k-means, użyto następującego algorytmu, zapisującego w kolejnych komórkach wartości uzyskane podczas badania danego klastra:

```
for clusterNo = 1:10
```

[GOTerms_k{clusterNo} clusterGOTermsNo_k{clusterNo}] = getClusterGOTerms(GO, yeastGenes_BP, yeastGO_BP, genes, chipgenes, clusterNo, cidx);

end

Następnie przeprowadzono analizę statystyczną umożliwiającą wybór istotnych dla eksperymentu genów, za pomocą funkcji 'hygecdf', z pomocą której otrzymano p-wartości dla każdego genu w klastrach.

Przykładowo, algorytm obliczania p-wartości dla genów klastrowanych metodą k-means prezentuje się następująco:

```
for i = 1:10

x_k = clusterGOTermsNo_k{i};
M_k = size(chipgenes);
M_k = M_k(1);
K_k = chipGOTermsNo_k{i};
N_k = length(clusters(clusters == i));
```

```
pVal k\{i\} = 1 - hygecdf(x k-1,M k,K k,N k);
```

end

gdzie x, M, K, N są parametrami funkcji hipergeometrycznej, koniecznymi do wyznaczenia wszystkich p-wartości

7. Za pomocą wybranego terminu GO (5975), odczytano informacje na jego temat funkcją GO(5975).terms:

```
GO(5975).terms
id: 5975
name: 'carbohydrate metabolic process'
ontology: 'biological process'
definition: '"The chemical reactions and pathways involving carbohydrates, any of a gr...'
comment: ''
synonym: {'synonym' '"carbohydrate metabolism" EXACT []'}
is_a: [2x1 double]
part_of: [0x1 double]
obsolete: 0
```

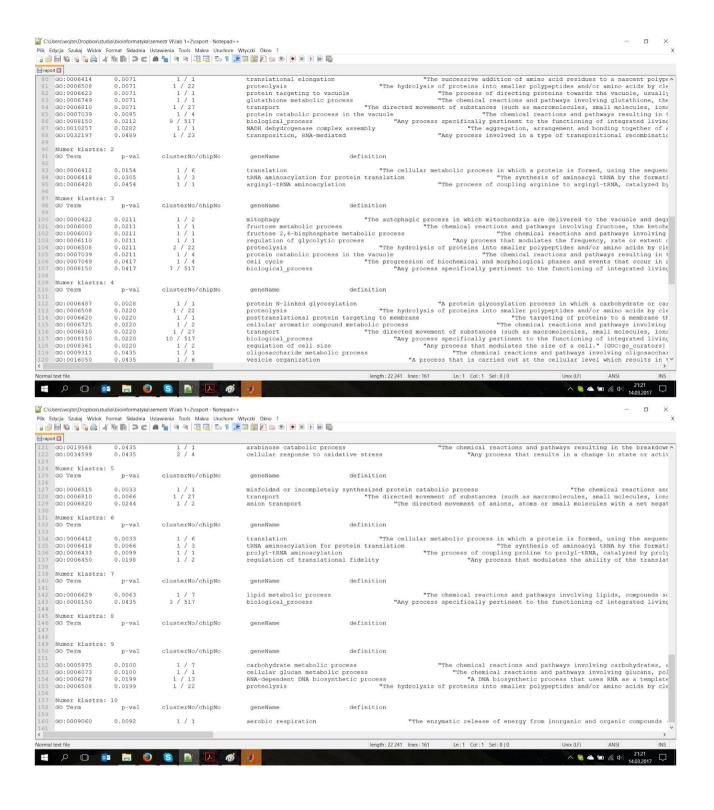
gdzie:

definition - wyjaśnienie do jakiego szlaku należy i jakie procesy uwzględnia dany termin name - nazwa procesu jaki obejmuje termin synonym - inna nazwa procesu w jaki jest zaangażowany termin is_a - inne terminy GO określające pochodzenie wybranego terminu (44238, 71704)

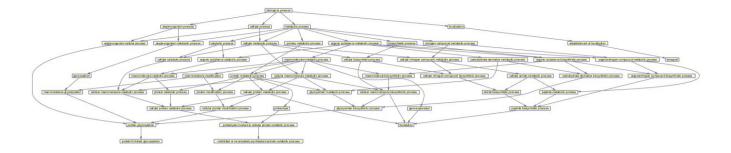
part of - inne terminy GO określone wybranym terminem

Wywołano funkcję 'getancestors(GO, 5975)', za pomocą której otrzymano następujące terminy: 5975, 8150, 8152, 44238, 71704. W porównaniu do metody 'is_a' wskazuje ona dodatkowo na samą siebie (5975), każdy proces biologiczny (8150) oraz każdy proces metaboliczny (8152). Zawiera zatem szerszą przynależność terminu, aniżeli metoda 'is_a'. Metoda 'part_of' w tym przypadku nie daje żadnego rezultatu.

8. Wygenerowano raport, zawierający informacje o istotnych statystycznie genach podzielonych na metody klastrowania i klastry. Zawiera informacje dotyczące nazwy procesu, opisu, numeru klastra oraz p-wartość. Raport został posortowany według wzrastających p-wartości:



9. Dla metody klastrowania k-means znaleziono pięć najbardziej istotnych statystycznie terminów, za pomocą których wygenerowano podgraf ontologii:



Terminami o najniższej p-wartości okazały się:

```
1)
    id: 6487
    name: 'protein N-linked glycosylation'
    ontology: 'biological process'
definition: '"A protein glycosylation process in which a carbohydrate or carbohydrate ...'
    comment: ''
    synonym: {3x2 cell}
        is_a: 6486
    part_of: [0x1 double]
    obsolete: 0
```

Rodzic: GO: 6486, Name: protein glycosylation

```
id: 6515
name: 'misfolded or incompletely synthesized protein catabolic process'
ontology: 'biological process'
definition: '"The chemical reactions and pathways resulting in the breakdown of misfol...'
comment: '
synonym: {4x2 cell}
is_a: 51603
part_of: [0x1 double]
obsolete: 0
```

Rodzic: GO: 51603, Name: proteolysis involved in cellular protein catabolic process

```
id: 6412
    name: 'translation'
    ontology: 'biological process'
definition: '"The cellular metabolic process in which a protein is formed, using the s...'
    comment: ''
    synonym: {9x2 cell}
        is_a: [3x1 double]
        part_of: 10467
    obsolete: 0
```

Rodzice: GO: 34645, Name: cellular macromolecule biosynthetic process GO: 43043, Name: peptide biosynthetic process

```
4)
            id: 6508
          name: 'proteolysis'
     ontology: 'biological process'
   definition: '"The hydrolysis of proteins into smaller polypeptides and/or amino acids ...'
      comment: 'This term was intentionally placed under 'protein metabolic process ; GO:...'
       synonym: {2x2 cell}
          is a: 19538
      part_of: [0x1 double]
     obsolete: 0
   Rodzic: GO: 19538, Name: protein metabolic process
5)
            id: 6810
          name: 'transport'
     ontology: 'biological process'
    definition: "The directed movement of substances (such as macromolecules, small molec...'
       comment: ''
       synonym: {6x2 cell}
          is_a: 51234
       part_of: [0x1 double]
      obsolete: 0
```

Rodzic: GO: 51234, Name: establishment of localization

Otrzymane wyniki pozwalają oszacować, które z procesów komórkowych okazały się istotnymi podczas przeprowadzania eksperymentu na mikromacierzy. Są to procesy dotyczące tworzenia się pewnych białek (translation), ich modyfikacji (protein glycosylation), transportu (transport) oraz degradacji (proteolysis).

- 10. Porównując wyniki z różnych metod klastrowania z wynikami otrzymanymi przez Eisen,widzimy, że te drugie warunkują się większym statystycznym znaczeniem. Możemy to stwierdzić na podstawie wartości P-value.
- 11. Na końcową listę otrzymanych terminów GO mają wpływ czynniki takie jak regulacja genów kodujących białka rybosomalne, wiemy również, że geny syntezy białek mitochondrialnych uległy ekspresji w połączeniu z pewną liczbą genów biorących udział w oddychaniu co na pewno ma wpływ na otrzymaną listę. Ponadto, istnieje wiele przykładów koekspresji genów, które mają wspólną funkcję, ale nie należą do ogromnego białkowego kompleksu kodującego enzymy glikolityczne. Czynniki te działają głównie na poziomie funkcji komórkowej.