bioconductoR
Дифференциальная экспрессия генов по данным RNA-seq. Геномные интервалы

Артем Артемов

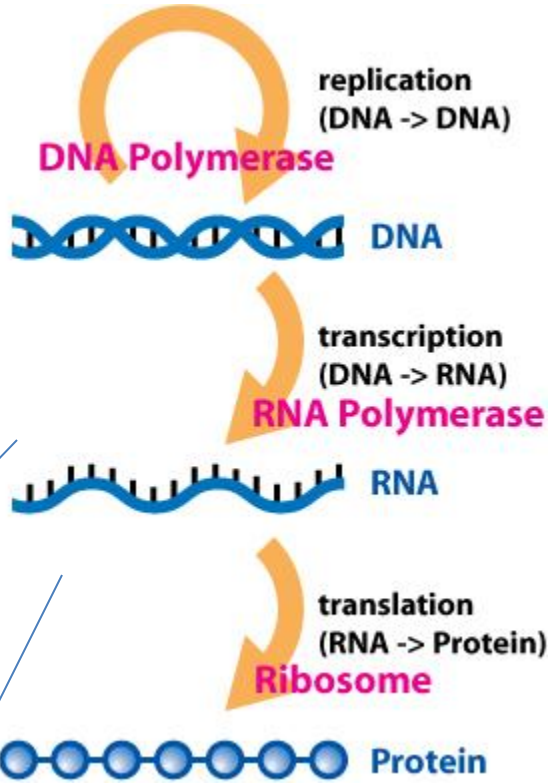
23.04.2014

Outline

- Биологическая задача
  - ДНК – РНК – белок
  - Next Generation Sequencing
  - RNA-seq
- Набор пакетов bioconductoR
- Статистическая модель
  - Редкие события и распределение Пуассона
  - Проблема овердисперсии и отрицательное биномиальное распределение
  - Пакет DESeq (и edgeR)
- Работа с геномными интервалами в bioconductoR

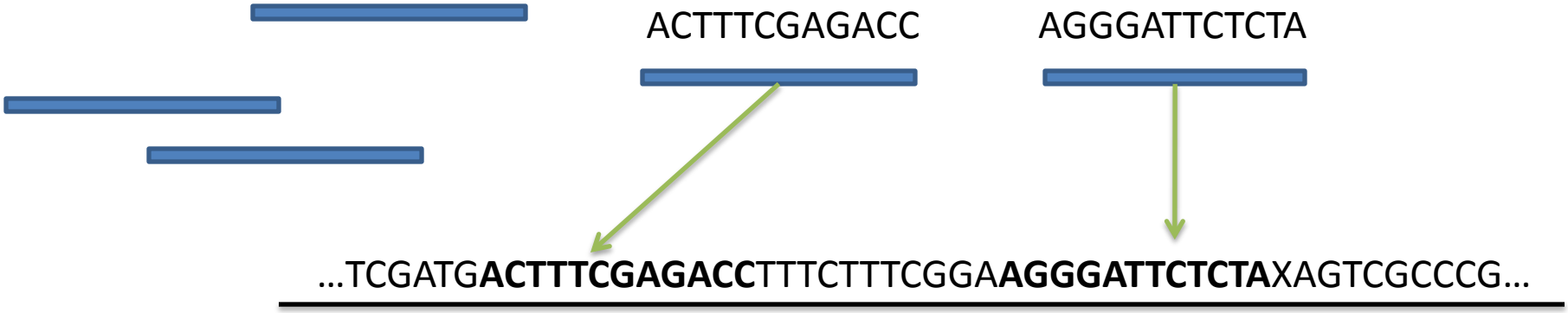
Немного биологии

- «Центральная догма молекулярной биологии»
- Оцениваем уровень экспрессии каждого гена по количеству соответствующей РНК
- Существенное дополнение для эукариот – сплайсинг. Интроны вырезаются, экзоны сшиваются между собой



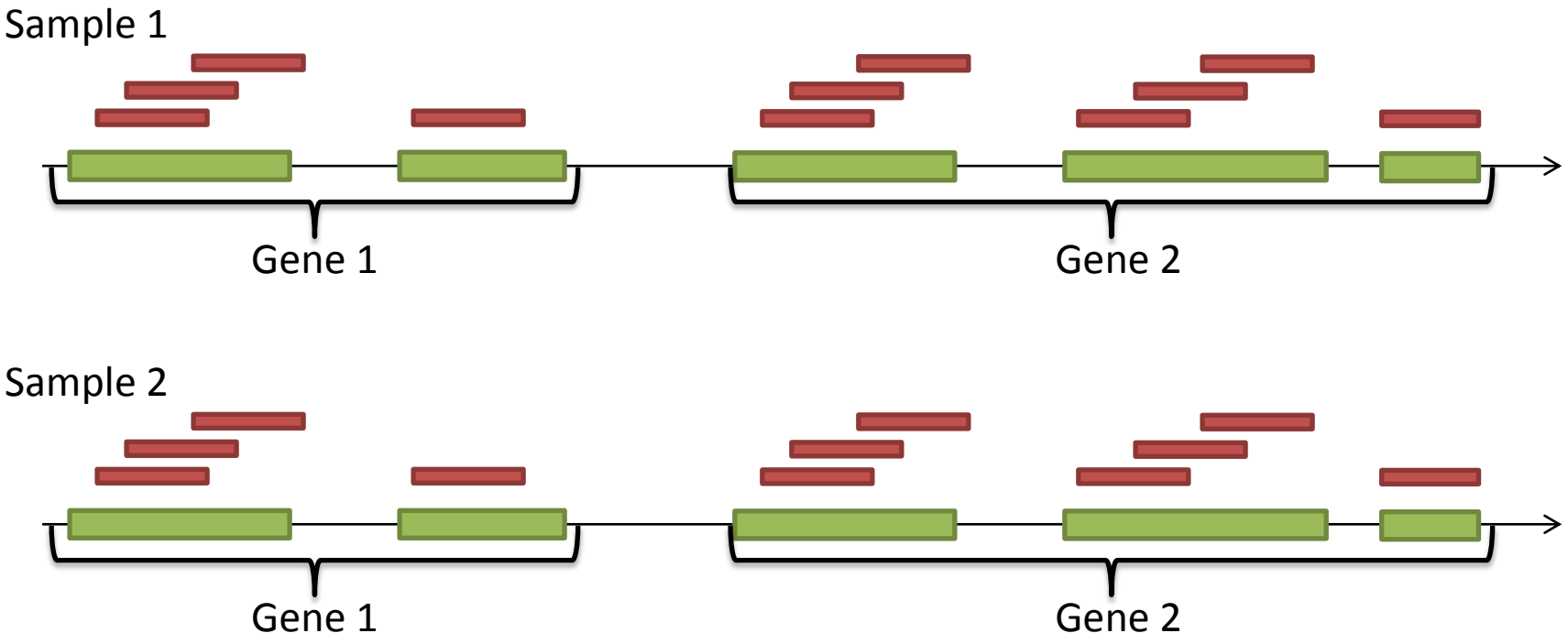
Секвенирование и маппирование

- Упрощенно: берем всю РНК, режем на кусочки, прочитываем (=секвенируем) какую-то часть этих кусочков
- Выравнивание (маппирование) = Alignment (mapping). Смотрим на последовательность каждого кусочка (рид=read, 75-100 букв) и на последовательность генома, находим в геноме (почти) идентичную последовательность



Примечание: секвенируются на самом деле ДНК, полученные из РНК

Экспрессия генов

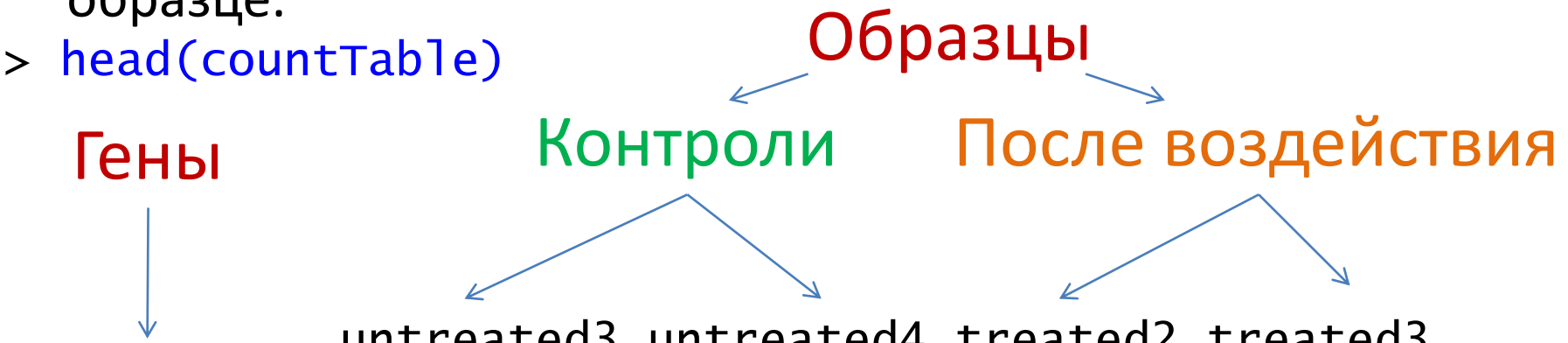


- Вспоминаем про разметку генома на гены. Будем рассматривать случай, когда знаем координаты генов и экзонов в них.

Входные данные

- Таблица с количеством ридов на каждый ген в каждом образце.

```
> head(countTable)
```



	untreated3	untreated4	treated2	treated3
FBgn0000003	0	0	0	1
FBgn0000008	76	70	88	70
FBgn0000014	0	0	0	0
FBgn0000015	1	2	0	0
FBgn0000017	3564	3150	3072	3334
FBgn0000018	245	310	299	308

…

Про установку пакетов

- Обычно пакеты устанавливаются из центрального репозитория:

```
install.packages("название")
```

- bioconductoR – самостоятельный репозиторий

```
source("http://www.bioconductor.org/biocLite.R")
# то же, что и загрузка скрипта, только из интернета
biocLite("DESeq")        # загрузка пакета

library(DESeq)
```

Поправка на количество прочитанных ридов

- Очевидная причина отличий – разное суммарное количество ридов в каждом образце
- Самый простой выход – поделить количество ридов для каждого гена на общее количесиво ридов в образце
- RPM: reads per million mapped reads
- RPKM: reads per kilobase per million mapped reads

$$RPM = \frac{10^6 k_{ij}}{N_j}; \qquad RPKM = \frac{10^9 k_{ij}}{N_j L}$$

kij – количество ридов в образце j для гена i, ***Nj*** – общее кол-во ридов в образце j, **L** – длина гена

Поправка на количество прочитанных ридов

- Хотим корректировать (делить количество ридов на ген на поправочный коэффициент для данного образца s_j) так, чтобы новые значения были тех же порядков, что и старые
- Например, так:
  s_j=(среднее по образцу)/(среднее по всей таблице)
- Проблема: изменение экспрессии высокоэкспрессирующихся генов слишком сильно влияет на общую сумму.
- Выход: оценим поправку каждого образца для каждого гена по отдельности (пусть неточно), затем найдём медианную поправку.

$r_{ij}=k_{ij}/СР\_ГЕОМ_{по\_рядам}(k_{ij})$; $s_j=\text{median}(r_{ij})$

Поправка на количество прочитанных ридов

Пример 1

	s1	s2
ген1	10	20
ген2	15	30
ген3	100	200
	: 2/3	**: 4/3**

Пример 2

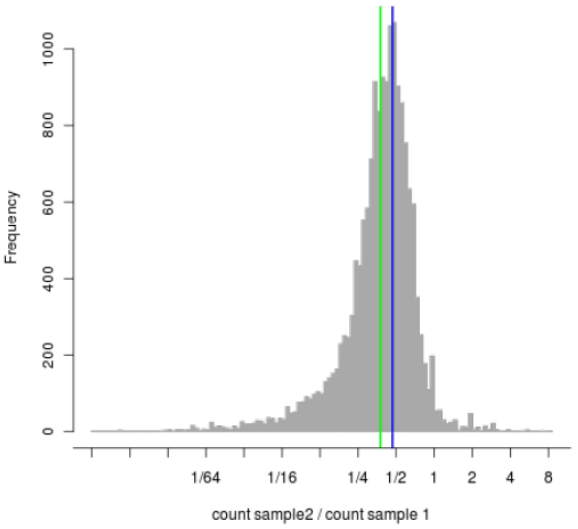
	s1	s2
ген1	10	10
ген2	10	10
ген3	100	220
	: 2/3	**: 4/3**

эти гены будут дифф. экспр (хотя не меняют экспрессию)

эти гены меняются экспрессию, но не будут детектированы

sj=(среднее по образцу)/ /(среднее по всей таблице)

Выход: оценим поправку каждого образца для каждого гена по отдельности (пусть неточно), затем найдём медианную поправку.
rij=kij/СР_ГЕОМпо_рядам(kij); sj=median(rij)



Поправка на количество прочитанных ридов

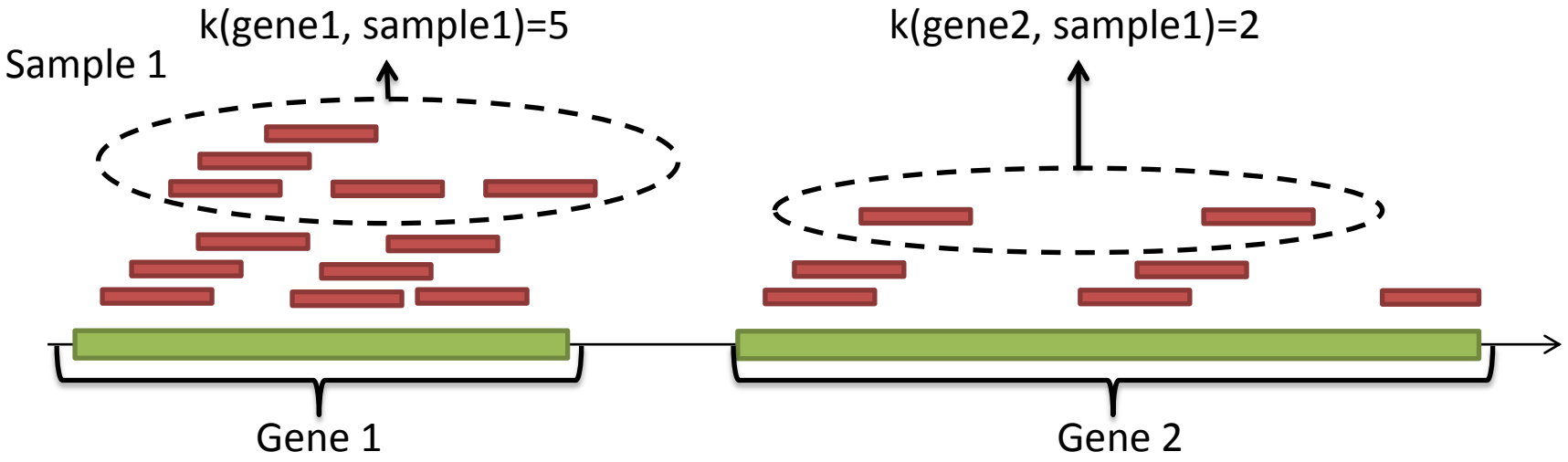
```
> condition = factor( c( "untreated", "untreated",
   "treated", "treated" ) )
> cds = newCountDataSet( countTable, condition )

> cds = estimateSizeFactors( cds )
> sizeFactors( cds )
untreated3 untreated4   treated2   treated3
0.8730966  1.0106112  1.0224517  1.1145888

> countsNorm= counts( cds, normalized=TRUE )
              untreated3 untreated4   treated2     treated3
FBgn0000003    0.000000    0.00000    0.00000    0.8971919
FBgn0000008   87.046493   69.26502   86.06763   62.8034302
FBgn0000014    0.000000    0.00000    0.00000    0.0000000
FBgn0000015    1.145349    1.97900    0.00000    0.0000000
FBgn0000017 4082.022370 3116.92579 3004.54278 2991.2376629
FBgn0000018  280.610404  306.74508  292.43434  276.3350930
```

Модель

- Секвенируем, поймем, куда в геноме попадает каждый рид, посчитаем, сколько ридов попадает в каждый ген
- Каждый ген → много фрагментов РНК. Мы прочитываем только часть из них



- Предполагаем, что количество ридов k(gene i, sample i) пропорционально реальному количеству фрагментов РНК данного гена в данном образце.

Модель

- Посмотрим на один *ген i*
- На него упало k ридов, остальные риды (N-k) упали на другие гены, или вообще в межгенные области
- Аналогия: мешок с зелеными и синими шарами. Вытащили из него **N** случайных шаров, какая вероятность, что из них **k** зеленых, если доля зеленых шаров в мешке p

Биномиальное распределение?

- Прочли фрагментов РНК гораздо меньше, чем было в смеси (= вытащили шаров меньше, чем было в мешке).
- Вероятность того, что среди N вытащенных шаров зелеными окажутся k (если вероятность вытащить зеленый шар p)

$$P(k) = C_N^k p^k \left(1-p\right)^{(N-k)}$$

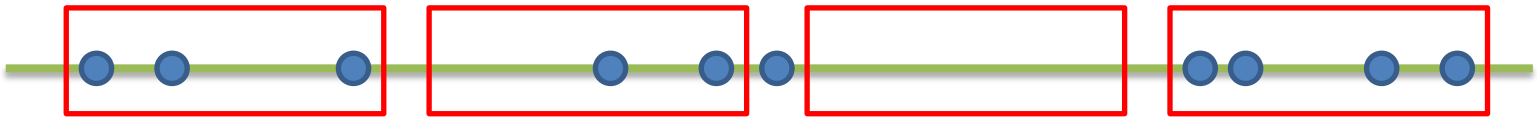
- Но, N>>k (много больше), например:

  k в интервале от 10 до 100 тысяч

  N в интервале от 9 миллионов до 100 миллионов

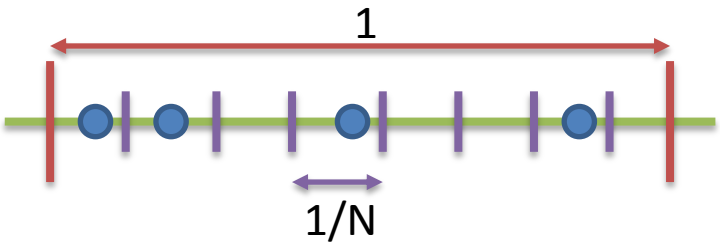
Распределение Пуассона

- Распределение количества редких событий в единицу времени (расстояния, объема) при ожидаемой интенсивности λ
  - сколько автобусов проехало мимо за единицу времени, если вы ожидаете увидеть λ автобусов
  - сколько человек проголосовало за единицу времени
  - сколько изюминок в булочке в единице объема



В среднем, в интервал попадает 3 точки, но могут быть и 2, и 0, и 4

Распределение Пуассона – вывод



- Предел Биномиального распределения
- Разобьем наш интервал (длины 1) на N одинаковых интервалов (длины 1/N), настолько маленькие, что события в них происходят настолько редко, что либо не происходят, либо происходят единожды
- Вероятность того, что событие произойдёт в маленьком интервале p= λ/N
- Какова вероятность, что событие произойдёт k раз в большом интервале

$$P(k) = C_N^k p^k (1-p)^{(N-k)} = C_N^k \left(\frac{\lambda}{N}\right)^k \left(1-\frac{\lambda}{N}\right)^{(N-k)} \xrightarrow{N\to\infty} \frac{\lambda^k}{k!e^\lambda}$$

$$C_N^k = \frac{n!}{k!(n-k)!}; \quad n! \sim \sqrt{2\pi n}\left(\frac{n}{e}\right)^n$$ ← (Формула Стирлинга)

Распределение Пуассона

- При таких соотношениях k и N **Пуассон** – очень хорошая аппроксимация **биномиального** распр.
- Эксперимент: построим функцию вероятностей для этих двух распределений

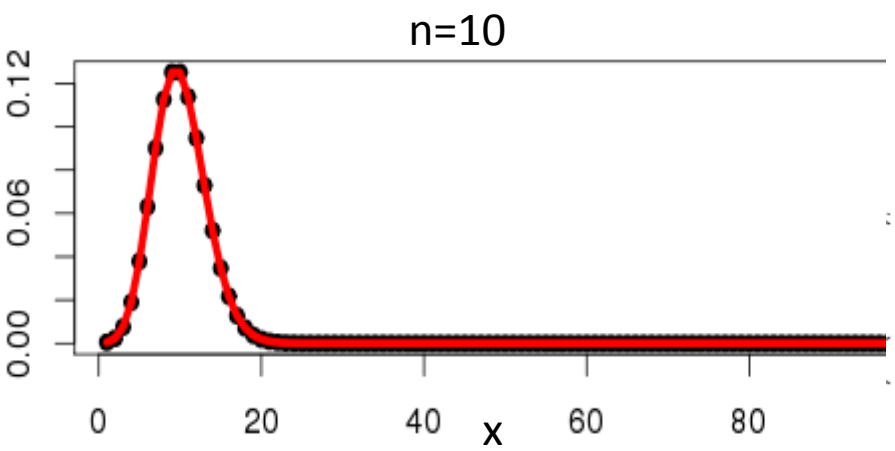
x=1:100 ИЛИ x=90000:110000

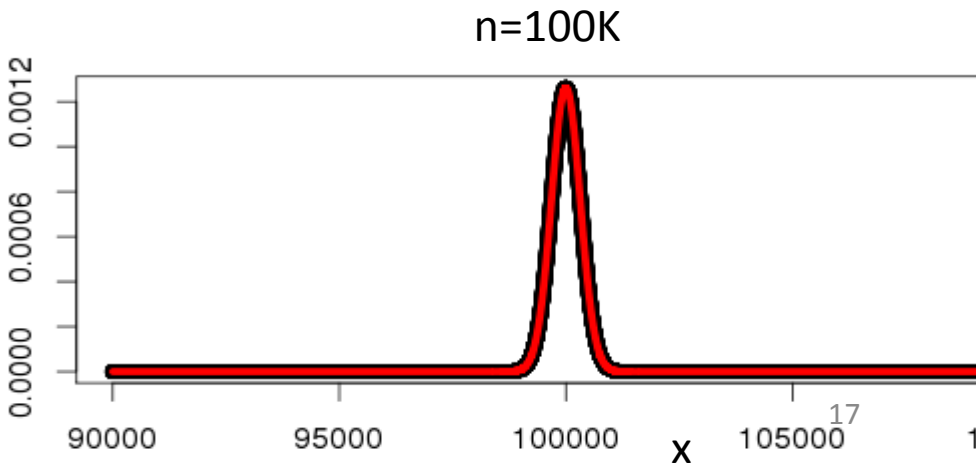
N=9e9 #всего прочли 9 миллионов ридов

n=10 ИЛИ n=1e5 #10 или 100К ридов на ген

plot(x, **dbinom**(x, size=N, prob=n/N), pch=19)

lines(x, **dpois**(x, n), lwd=5 , col="red")





Дифференциальная экспрессия

- Подумаем, как бы мы могли искать дифференциально экспрессирующиеся гены, основываясь на распределении Пуассона
- Для каждого гена i построим модель

$$k_{ij} \sim Pois(\mu_{ij}) \Rightarrow E(k_{ij}) = \mu_{ij}; \quad D(k_{ij}) = \mu_{ij}$$

$$\mu_{ij} = \mu_{i,\rho(j)} s_j$$

Средняя экспрессия данного гена= средняя экспрессия для данного состояния (ρ = больной, контроль и т.д.) * поправочный коэффициент (разное количество ридов в образцах)

Дифференциальная экспрессия

- При нулевой гипотезе: $\mu_{i,\rho_1} = \mu_{i,\rho_2}$
- Итого, наши действия: оценим среднюю экспрессию каждого гена. Она же (если верить в распределение Пуассона) – дисперсия
- Можем проверить, отличаются ли μ_{i,ρ_1} и μ_{i,ρ_2}

Овердисперсия

- Технические реплики – один и тот же биологический образец обработали и отсеквенировали два раза
- Биологические реплики – взяли два разных образца, обработали и отсеквенировали
- Дисперсии в распределении Пуассона достаточно, чтобы объяснить отличия между техническими репликами
- Биологические реплики отличаются сильнее (отличаются не только сколько мы ридов на каждый ген прочли, но и сколько таких фрагментов РНК изначально было) – овердисперсия
- Но в распределении Пуассона Дисперсия=Среднее
- Выход: взять другое распределение имеющее 2 параметра, такое, что Пуассон – его частный случай

Отрицательное биномиальное распределение

- Отрицательное биномиальное (negative binomial) распределение
- зафиксируем количество неудач r. Как распределено кол-во успехов Y
- Y ~ NB (r, p) $\mathbb{P}(Y = k) = \binom{k+r-1}{k} p^r q^k,\ k = 0, 1, 2, \ldots$
- Два параметра вместо одного, можем их подобрать так, чтобы распределение имело нужные среднее μi и дисперсию μi+δi
- Распределение Пуассона – частный случай

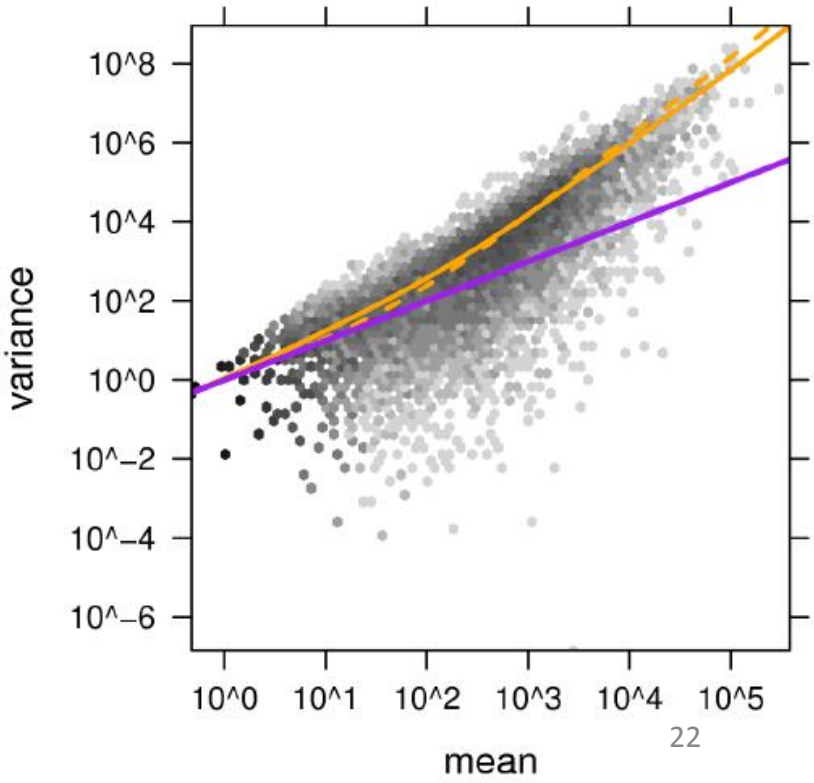
$$\mathrm{Poisson}(\lambda) = \lim_{r \to \infty} \mathrm{NB}\left(r,\ \frac{\lambda}{\lambda + r}\right).$$

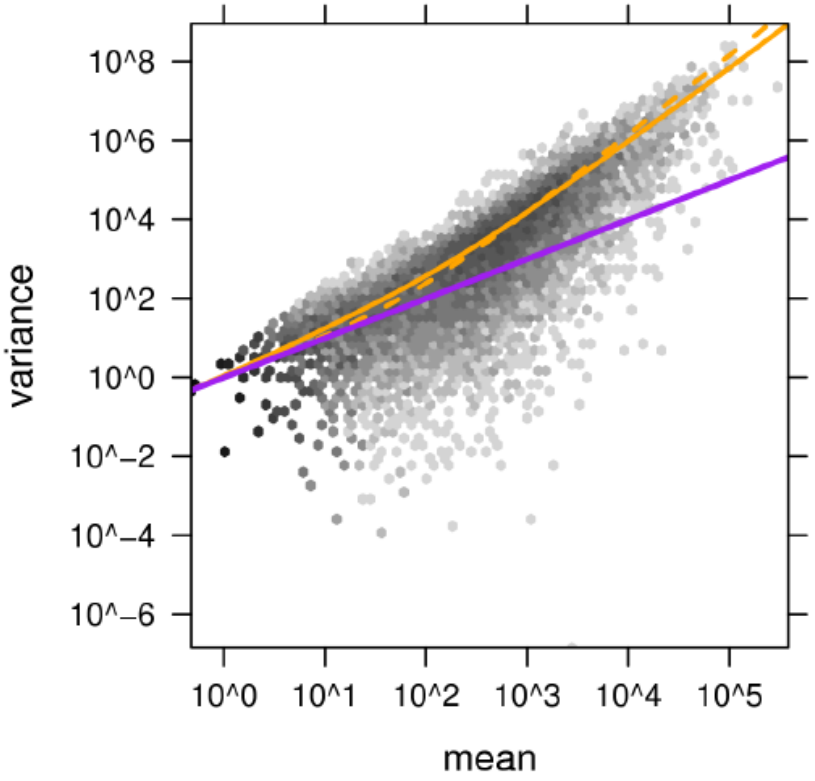
Как оценить дисперсию для каждого гена?

- Проблема: раньше дисперсию для каждого гена легко было оценить по среднему значению. Как теперь?
  Фиолетовая кривая – Пуассоновская модель: *var=mean*

- В идеале: много биологических реплик, для каждого гена и каждого состояния – много чисел, оценим дисперсию
- Обычно реплик мало (2-3). Предположение: дисперсия всё равно как-то зависит от среднего (но не обязательно линейно)
- DESeq: построим по всем генам **локальную регрессию** *дисперсии* от *среднего*

(Anders et al., 2010)





Отрицательное биномиальное (negative binomial) распределение
зафиксируем количество неудач r.
Как распределено кол-во успехов
NB (mean = μ_i, var = $\mu_i+\delta_i$)
k_{ij} ~ NB (mean = μ_i, var = $\mu_i+\delta_i$)

Variance calculated from comparing two replicates

Poisson	$v = \mu$	———
Poisson + constant CV	$v = \mu + \alpha \mu^2$	- - - -
Poisson + local regression	$v = \mu + f(\mu^2)$	———

(Anders et al., 2010)

EMBL

DESeq

```
#оценим дисперсию
cds = estimateDispersions( cds )
#собственно, тест
res = nbinomTest( cds, "untreated", "treated" )
```

Результат

Упорядочим по возр. p-value

```
> head(res[ order(res$padj) , ])
          id  baseMean baseMeanA  baseMeanB foldChange log2FoldChange
FBgn0039155  463.4369  884.9640   41.90977  0.0473576      -4.400260
FBgn0025111 1340.2282  311.1697 2369.28680  7.6141316       2.928680
FBgn0003360 2544.2512 4513.9457  574.55683  0.1272848      -2.973868
FBgn0029167 2551.3113 4210.9571  891.66551  0.2117489      -2.239574
FBgn0039827  188.5927  357.3299   19.85557  0.0555665      -4.169641
FBgn0035085  447.2485  761.1898  133.30718  0.1751300      -2.513502
          pval           padj
1.641210e-124 1.887556e-120
3.496915e-107 2.010901e-103
1.552884e-99   5.953239e-96
4.346335e-78   1.249680e-74
1.189136e-65   2.735251e-62
3.145997e-56   6.030352e-53
```

Средние по группам

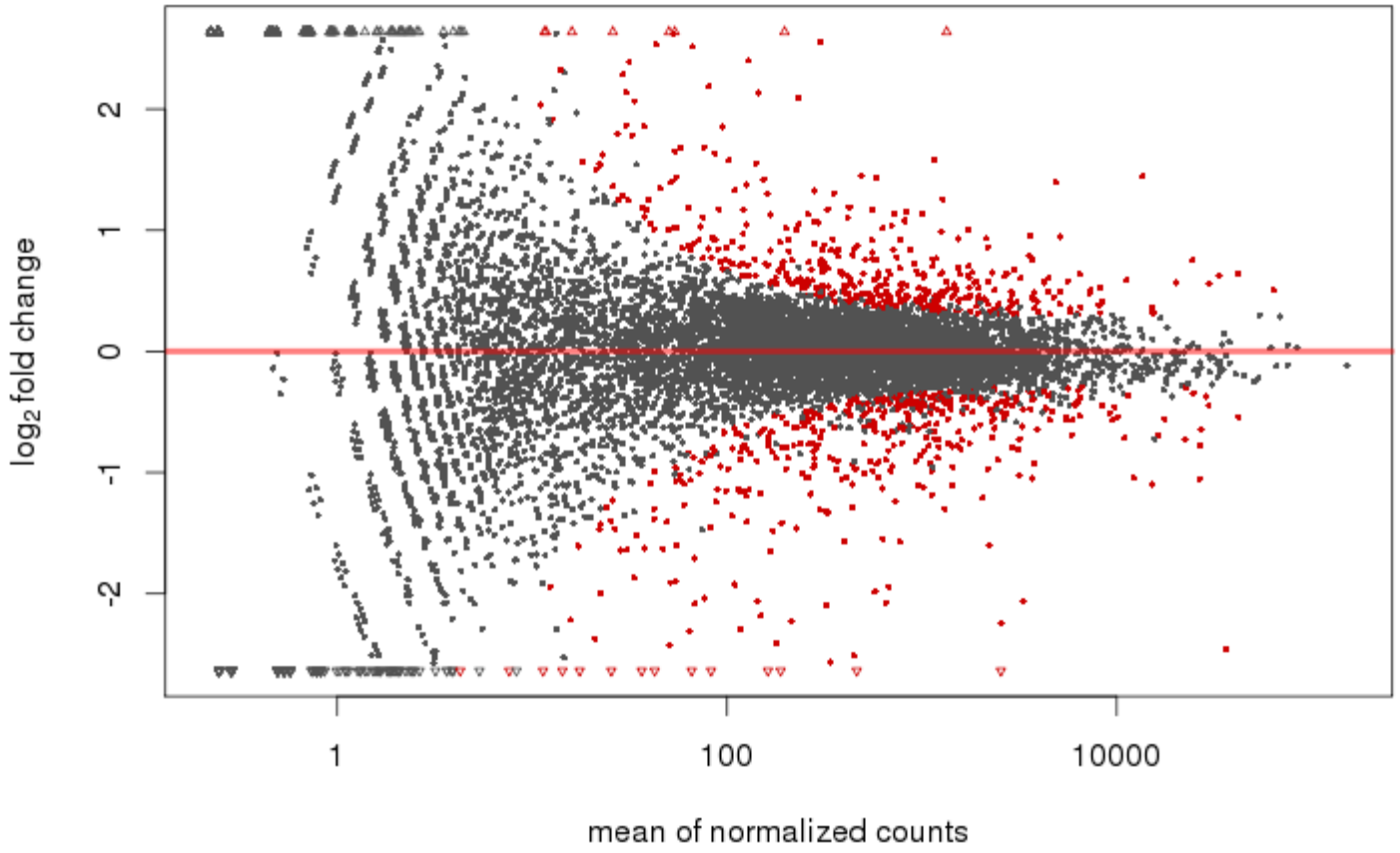
Fold change: отношение средних (и его логарифм)

P-value

P-value, скорректированное на множественное тестирование

Нарисуем

```
> plotMA(res)
```



Парный тест и несколько факторов

counts

	s1	s2	s3	s4	s5	s6
gene1						
gene2						
gene3						
…						

design

	condition	patient
s1	normal	1
s2	tumor	1
s3	normal	2
s4	tumor	2
s5	normal	3
s6	tumor	3

- Линейная модель (для каждого гена)
- Содержательный случай – парные образцы (например, образцы здоровой и пораженной ткани из одного человека)

```
> cdsFull = newCountDataSet( counts, design )
> cdsFull = estimateSizeFactors( cdsFull )
> cdsFull = estimateDispersions(cdsFull)
> fit1 = fitNbinomGLMs( cdsFull, count ~ condition + patient )
> fit0 = fitNbinomGLMs( cdsFull, count ~ patient )
> pvals=nbinomGLMTest (  fit1, fit0 ) #получаем вектор p-values
> pvals.adj=p.adjust(pvals, method="BH")
```

Работа с отрезками в R

- Пожалуй, самое частое, что приходится делать в геномике. Ген, экзон, сайт связывания транскрипционного фактора, CpG-остров – суть отрезки в геноме, имеют координаты (хромосома – начало – конец)
- В общем случае, задача пересечения двух систем отрезков алгоритмически нетривиальна (если отрезки в одной из систем могут пересекаться). Структура данных «интервальное дерево»
- Задача: найдём такие участки генома, куда попадают в достаточном количестве риды РНК, такие, что эти участки не пересекаются с генами.

Хранилище для отрезков

- IRanges
  - координаты начала, конца и любые другие поля
- GenomicRanges
  - Хранит дополнительно название хромосомы (seqnames) и направление, или «цепь» (strand, + / -)

Загрузка разметки генов

- Загрузим таблицу с координатами экзонов всех известных генов Дрозофилы

```
biocLite("biomaRt")
library(biomaRt)        #http://www.ensembl.org/biomart/martview
#какую базу данных использовать
ensembl <- useMart("metazoa_mart_16",
    dataset="dmelanogaster_eg_gene")
#какие поля вытащить
fields <- c("chromosome_name","strand","ensembl_gene_id",
    "ensembl_exon_id","start_position",
    "end_position","exon_chrom_start","exon_chrom_end")
genes <- getBM( fields, mart=ensembl, filters="chromosome_name",
    values=c("4"))
```

Загрузка разметки генов

```
> head( genes )
  chromosome_name strand ensembl_gene_id ensembl_exon_id
1               4      1     FBgn0040037   FBgn0040037:1
2               4      1     FBgn0040037   FBgn0040037:2
3               4      1     FBgn0040037   FBgn0040037:3
4               4      1     FBgn0040037   FBgn0040037:4
5               4     -1     FBgn0052011   FBgn0052011:6
6               4     -1     FBgn0052011   FBgn0052011:5
  start_position end_position exon_chrom_start exon_chrom_end
1          24053        25665            24053          24477
2          24053        25665            24979          25153
3          24053        25665            25218          25450
4          24053        25665            25501          25665
5          26455        32391            29356          32391
6          26455        32391            28966          29301
```

Создадим из этой таблицы набор отрезков (GenomicRanges)

Создадим GenomicRanges

```
annot <- GRanges(
  seqnames = Rle("chr4"),#хромосома
  ranges=IRanges(
     start=genes$exon_chrom_start,
     end=genes$exon_chrom_end
  ),            #объект IRanges
  strand = Rle(genes$strand),
  exon=genes$ensembl_exon_id,
  gene=genes$ensembl_gene_id
  #все остальные поля
)
```

Загрузка bam-файла с выравниваниями ридов на геном

```
> biocLite("Rsamtools")
> library("Rsamtools")
> aln_all <- readGappedAlignments(“...../untreated1_chr4.bam")
> head(aln_all)
GappedAlignments with 6 alignments and 0 metadata columns:
  seqnames strand       cigar    qwidth     start
<Rle>  <Rle> <character> <integer> <integer>
[1]     chr4      -         75M        75       892
[2]     chr4      -         75M        75       919
[3]     chr4      +         75M        75       924

end     width      ngap
<integer> <integer> <integer>
[1]       966        75         0
[2]       993        75         0
[3]       998        75         0
---
  seqlengths:
  chr2L    chr2R    chr3L ...     chrM     chrX  chrYHet
23011544 21146708 24543557 ...    19517 22422827   34703
```

Посчитаем покрытие – способ 1

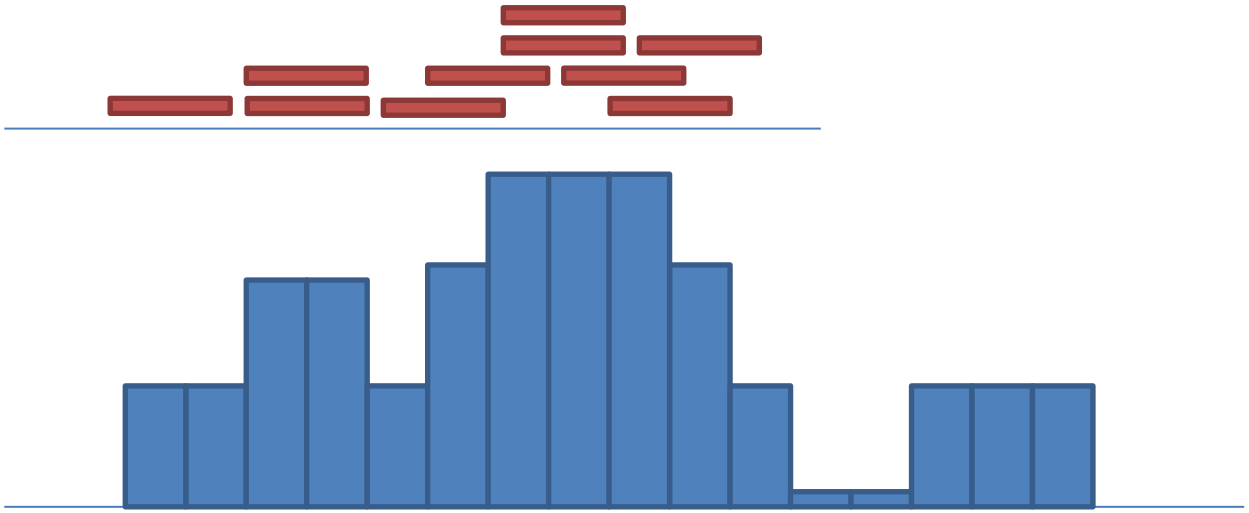
- Посчитаем для каждого отрезка – экзона, сколько отрезков – ридов с ним пересекаются

```
> overlaps=countOverlaps( annot, aln_all )
> head(overlaps)
[1]   0   0   0   0 774  98
```

- Дальше сложим получившиеся значения для всех экзонов каждого гена. tapply

```
> tapply(overlaps, list( annot$gene ), FUN=sum )
FBgn0002521 FBgn0004607 FBgn0004859 FBgn0010217
        410           7         373       12513
```

Rle и покрытие



- Run length encoding:

2 раза по 1, 2 раза по 2, 1 раз по 1, 1 раз по 2, 3 раза по 3, ...

```
> Rle(c(1,1,2,2,1,2,3,3,3,2,1,0,0,1,1,1))
numeric-Rle of length 16 with 9 runs
Lengths: 2 2 1 1 3 1 1 2 3
Values : 1 2 1 2 3 2 1 0 1
```

Покрытие

```
> coverage(aln_all)
SimpleRleList of length 8
$chr2L
integer-Rle of length 23011544 with 1 run
Lengths: 23011544
Values :       0
.............................
$chr4
integer-Rle of length 1351857 with 122061 runs
Lengths:  891   27    5   12   13   45    5 ...    1    3  106   75 1600   75 1659
Values :    0    1    2    3    4    5    4 ...   10    6    0    1    0    1    0
> cvr=coverage(aln_all)
> cvr_chr4=cvr$chr4
```

Список, каждый элемент соответствует хромосоме и является Rle

aggregate для отрезков

```
# Беда в том, что работает только с IRanges (не GRanges). Придётся пройтись
    циклом по хромосомам
> cvr_chr4=cvr$chr4
> annot_chr4_IR=annot[seqnames(annot)=='chr4',]@ranges
# annot_chr4_IR – уже IRanges
> annot_chr4_IR
IRanges of length 1069
         start     end width
[1]      24053   24477   425
[2]      24979   25153   175
[3]      25218   25450   233
[4]      25501   25665   165
> aggregate(cvr_chr4, annot_chr4, FUN=mean)
[1] 1.764706e-01 0.000000e+00 3.763076e+01
```

Дополнительный вопрос: как таким способом посчитать количество ридов на экзон?

Получили среднее покрытие экзонов

Заметьте, что среднее покрытие и количество упавших на экзон ридов – разные вещи:

00123333210000000

3 рида,

покрытие ~ 3*длина рида / длина экзона

Внимание: S4-объекты

- С большинством объектом в R можно работать как со списками:

```
x$p.value
names(x)
```

- bioconductoR использует S4 объекты. Аналогичные конструкции:

```
x@field
slotNames(x)
```

Что ещё почитать – RNA-seq

Курс лекций про анализ данных NGS на ФББ МГУ (+видео)

http://bioinf.fbb.msu.ru/wiki/index.php/NgsCourse

DESeq

- http://www.bioconductor.org/help/course-materials/2011/RNASeqChIPSeq/Lectures/RNASeq-DifferentialExpression-SimonAnders.pdf
- “Dealing with aligned data: mapping, expression estimation, normalisation, DE” Mar Gonzàlez-Porta
- http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/vignettes/DESeq/inst/doc/DESeq.pdf
- Anders and Huber, 2010. Differential expression analysis for sequence count data http://genomebiology.com/content/11/10/R106

edgeR

- http://bioconductor.org/packages/2.12/bioc/vignettes/edgeR/inst/doc/edgeRUsersGuide.pdf
- Robinson et al., 2010 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2796818/

Comparisons

- http://davetang.org/muse/2011/01/05/deseq-vs-edger-vs-bayseq/

Что ещё почитать – GenomicRanges

- http://www.biostat.jhsph.edu/~khansen/IRangesLecture.pdf

- http://bioconductor.org/

Shot noise и распределение Пуассона

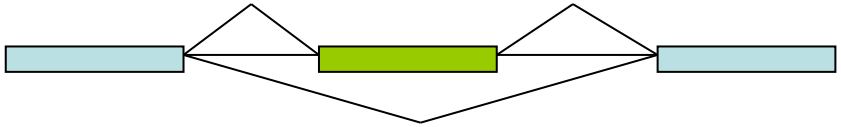
- Пусть в одном образце увидели 5 фрагментов на данный ген, насколько удивительно в другом образце увидеть 6 фрагментов

С какими данными приходится работать

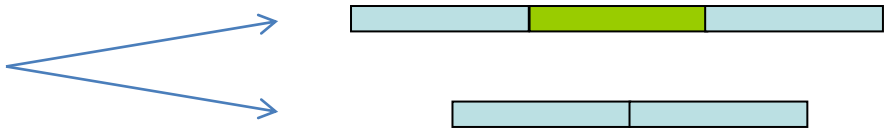
- bam
- bed
- bedGraph, wig, bigWig

Differential splicing

Pre-mRNA

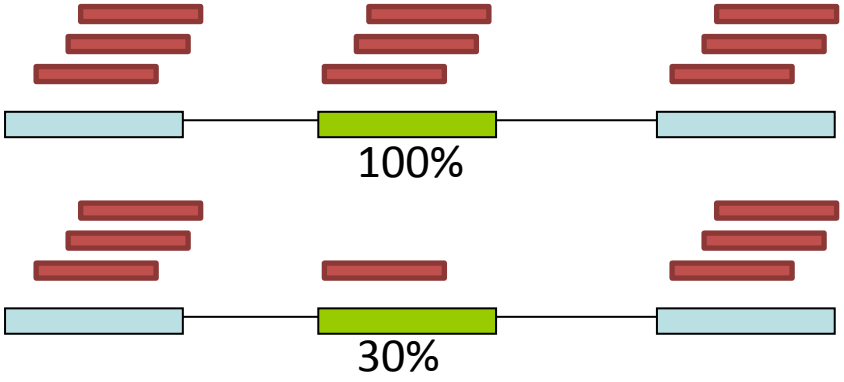


Mature mRNA



How to estimate exon inclusion?

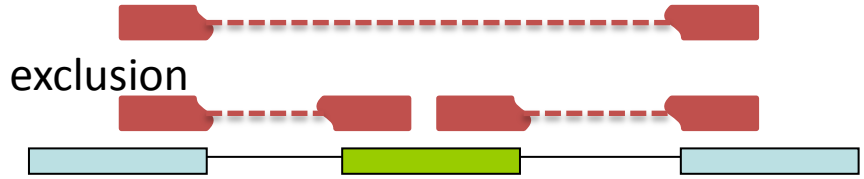
1.Relative coverage:
coverage(alt.exon)/coverage(const .exon)



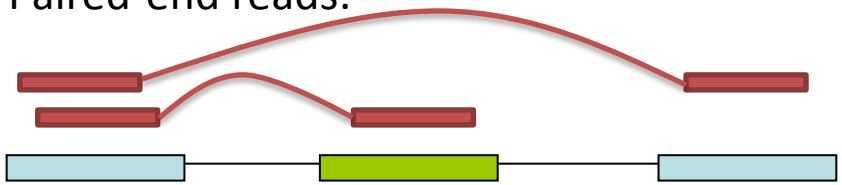
2.Reads covering exon-exon junctions: separate mapping of left and right fragments of reads

inclusion

exclusion



2A. Paired-end reads:



Map reads: **bioscope/bowtie** → P-values of differential splicing: **cuffdiff**