Expresión diferencial con datos RNA-seq

Guillermo Ayala Gallego

2024-04-09

Table of contents

Introducción

Paquetes

```
pacman::p_load(SummarizedExperiment,edgeR,ggplot2)
```

edgeR utilizando modelo lineal generalizado

Modelo

- Y_{ij} el conteo aleatorio (número de lecturas alineadas) para el gen i en la muestra j.
- Denotamos por $m_j = \sum_{i=1}^{N} y_{.j}$ la profundidad de secuenciación o total de lecturas de la muestra j.
- Utilizamos como función de enlace el logarítmo natural.
- Consideramos la profundidad de secuenciación como offset (un modelo de tasas sobre la profundidad de secuenciación).

- El modelo para la media es
$$\ln \mu_{ij} = \mathbf{x}_j^T \, _i + \ln m_j.$$
- En el modelo las variables predictoras son comunes a todos los genes.
- Asumimos que la componente aleatoria sigue una distribución binomial negativa (con el parámetro de dispersión conocido)
- Entonces
$$var(Y_{ijk}) = \mu_{ij} + \phi_i \mu_{ij}^2,$$
siendo ϕ_i el parámetro de dispersión que hemos de asumir conocido o, de otro modo, tenemos que estimarlo previamente.

- En McCarthy, Chen, and Smyth (2012) muestran cómo estimar por máxima verosimitud el vector de coeficientes $_i$.
- Utilizan una modificación de los mínimos cuadrados iterativamente reponderados (IRWLS).
- El parámetro de dispersión se estima maximizando la logverosimilitud penalizada definida como
$$APL_i(\phi_i) = \ell(\phi_i; \mathbf{y}_i, \hat{}_i) - \frac{1}{2} \ln |\mathbb{I}_i|$$
siendo:
  - $\mathbf{y}_i$ los conteos para el gen i,
  - $\hat{}_i$ el vector de coeficientes,
  - $\ell()$ es la función de logverosimilitud
  - $|\mathbb{I}_i|$ el determinante de la matriz de información de Fisher para el i-ésimo gen.

TCGA-COAD

```
pacman::p_load(edgeR,SummarizedExperiment)
load(paste0(dirTamiData,"tcga_coad.rda"))
```

- Nos centramos en las variables fenotípicas `age_at_diagnosis` y `tissue_or_organ_of_origin`.

```
summary(colData(tcga_coad)[,"age_at_diagnosis"])
```

```
   Min. 1st Qu.  Median    Mean 3rd Qu.    Max.    NA's
  11391   20604   24896   24146   28204   32872       4
```

```
table(colData(tcga_coad)[,"tissue_or_organ_of_origin"])
```

```
      Ascending colon                     Cecum               Colon, NOS
                   72                        70                        59
    Descending colon Hepatic flexure of colon    Rectosigmoid junction
                   15                        12                         3
       Sigmoid colon Splenic flexure of colon         Transverse colon
                   76                         6                        13
```

- Hemos de eliminar aquellas muestras que tienen las variables predictoras con datos faltantes ya que las funciones que siguen no los admiten.

```
torm1 = which(is.na(colData(tcga_coad)$"age_at_diagnosis"))
torm2 = which(is.na(colData(tcga_coad)$ "tissue_or_organ_of_origin"))
toremove = union(torm1,torm2)
tcga_coad = tcga_coad[,-toremove]
```

- Construimos el objeto `DGEList` sin indicar ninguna variable `group` ni ninguna matriz de modelo y eliminamos genes con conteos bajos.

```
dge = DGEList(counts=assay(tcga_coad))
to_keep = rowSums(cpm(dge) > 0.5) > 20
dge =  dge[to_keep,keep.lib.sizes=FALSE]
```

- Construimos la matriz de modelo con las dos variables predictoras, una de caracter categórico y la otra numérica.
- Cambiamos los nombres de las columnas de la matriz de modelo.

```
design0 = model.matrix(~  0 +
                         colData(tcga_coad)$"tissue_or_organ_of_origin"[to_keep]
                       + colData(tcga_coad)$"age_at_diagnosis"[to_keep])
y = levels(colData(tcga_coad)$"tissue_or_organ_of_origin")
y = sapply(y,function(x) gsub(" ","_",x)) ## Eliminamos espacios
y = sapply(y,function(x) gsub(",","_",x)) ## Eliminamos las comas
colnames(design0) = c(y,"age_at_diagnosis")
```

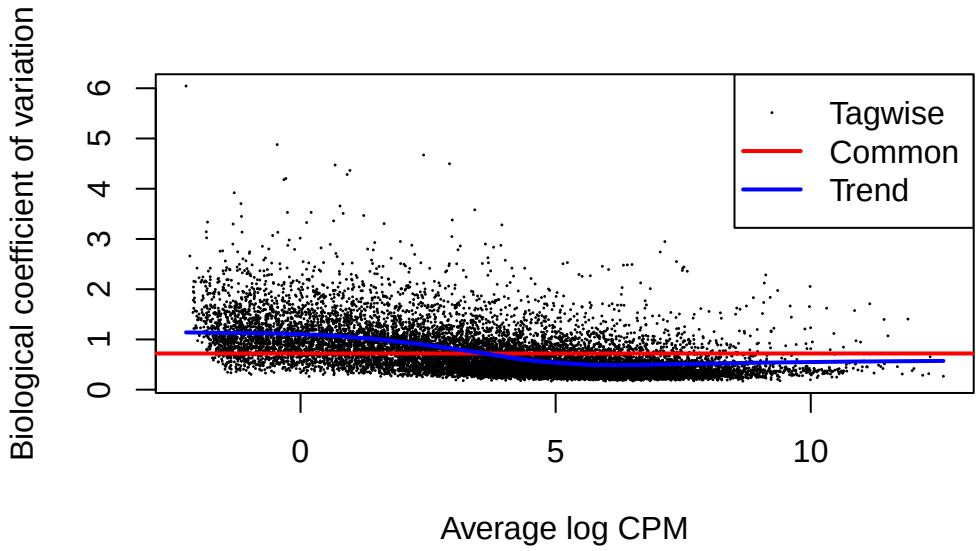
- Estimamos las dispersiones por tres métodos distintos:
  - Asumiendo una dispersión común,
  - una por gen y

– con una relación media-varianza.

```
dge = estimateDisp(dge,design=design0)
```

Si solo queremos una de las tres opciones podemos usar las funciones `estimateGLMCommonDisp()`, `estimateGLMTagwiseDisp()` y `estimateGLMTrendedDisp()`.

```
plotBCV(dge)
```




```
fit = glmFit(dge, design=design0)
```

- Veamos si influye la variable `age_at_diagnosis`.
- Si observamos la matriz de modelo `design0` corresponde con la columna 10 de la matriz de modelo.
- Se realiza un test del cociente de verosimilitudes.

```
lrt1 = glmLRT(fit,coef="age_at_diagnosis")
lrt1 =  glmLRT(fit,coef=10) ## Equivalente a la línea anterior
topTags(lrt1)
```

```
Coefficient:  age_at_diagnosis
                logFC      logCPM       LR       PValue          FDR
UGT2B10 -0.0002335397  0.07018047 68.64932 1.176251e-16 1.753945e-12
KCNH3   -0.0001438677 -0.73269543 67.44089 2.170993e-16 1.753945e-12
```

```
CPS1    -0.0002306034  4.32352487 60.85641 6.139324e-15 3.306640e-11
SULT1E1 -0.0002374397  0.83203192 57.37333 3.604616e-14 1.456085e-10
GPR64   -0.0001654538  0.52261384 55.61329 8.822524e-14 2.851087e-10
UPK1A   -0.0002044708 -0.94768507 53.99073 2.014376e-13 5.424715e-10
KRT81   -0.0001417146 -0.31911518 50.55783 1.157049e-12 2.670799e-09
DLX5    -0.0001507914 -0.47209136 45.87384 1.261190e-11 2.547288e-08
EPHX3   -0.0001195753 -0.07584401 45.21348 1.766851e-11 2.897626e-08
CACNA1I -0.0001300370 -0.65221580 45.18437 1.793308e-11 2.897626e-08
```

- Podemos evaluar toda la variable `tissue_or_organ_of_origin`.

```
lrt2 = glmLRT(fit,coef=1:9)
topTags(lrt2)
```

```
Coefficient:  Ascending_colon Cecum Colon__NOS Descending_colon Hepatic_flexure_of_colon Rect
          logFC.Ascending_colon logFC.Cecum logFC.Colon__NOS
RBM44                -23.03403   -22.79346        -23.20739
LPAL2                -22.83425   -22.63042        -22.87998
C6orf52              -22.69677   -22.74012        -22.53655
SLC5A10              -22.59678   -22.67309        -22.35748
APOBEC3H             -22.53489   -22.57474        -22.19753
LINC00574            -22.53141   -22.30988        -21.93773
ATOH7                -22.50255   -22.51006        -22.89692
GRAPL                -22.47544   -21.90377        -21.80912
C6orf201             -22.45426   -22.61184        -22.56993
RPL23AP64            -22.43706   -22.48745        -22.71604
          logFC.Descending_colon logFC.Hepatic_flexure_of_colon
RBM44                  -22.81666                      -22.98087
LPAL2                  -22.60164                      -22.63563
C6orf52                -23.72080                      -22.34341
SLC5A10                -22.81269                      -22.55916
APOBEC3H               -22.89885                      -22.24700
LINC00574              -22.53327                      -21.59098
ATOH7                  -22.36426                      -21.88149
GRAPL                  -22.20629                      -22.98721
C6orf201               -22.39796                      -22.18401
RPL23AP64              -22.31727                      -22.72084
          logFC.Rectosigmoid_junction logFC.Sigmoid_colon
RBM44                        -23.39152           -22.83901
LPAL2                        -23.04283           -22.15825
C6orf52                      -22.72652           -22.77770
SLC5A10                      -22.73793           -22.61990
```

```
APOBEC3H                    -23.32153           -22.97932
LINC00574                   -22.95598           -22.59596
ATOH7                       -22.15867           -21.84132
GRAPL                       -23.39572           -22.33813
C6orf201                    -23.12831           -22.58081
RPL23AP64                   -22.02019           -22.25008
          logFC.Splenic_flexure_of_colon logFC.Transverse_colon    logCPM
RBM44                          -23.79191              -19.16905 -1.002324
LPAL2                          -21.86348              -22.40498 -1.565987
C6orf52                        -23.11693              -22.67335 -1.343997
SLC5A10                        -22.40977              -22.32619 -1.460341
APOBEC3H                       -23.29649              -22.81347 -1.370931
LINC00574                      -22.88247              -22.21847 -1.774904
ATOH7                          -23.02326              -22.96452 -1.657356
GRAPL                          -22.30881              -21.52397 -1.620106
C6orf201                       -22.25201              -21.85007 -1.707904
RPL23AP64                      -22.98331              -21.64723 -1.707398
                 LR PValue FDR
RBM44     3115.908      0   0
LPAL2     1931.307      0   0
C6orf52   1762.968      0   0
SLC5A10   4317.670      0   0
APOBEC3H  1790.031      0   0
LINC00574 1759.550      0   0
ATOH7     2369.495      0   0
GRAPL     1708.911      0   0
C6orf201  2875.556      0   0
RPL23AP64 2940.747      0   0
```

- Y elegir los contraste que queramos.
- Mostramos una comparación entre dos grupos.

```
AD = makeContrasts(contrast1 = Ascending_colon - Descending_colon,
                   levels=design0)
lrt3 = glmLRT(fit,contrast = AD)
topTags(lrt3)
```

```
Coefficient:  1*Ascending_colon -1*Descending_colon
           logFC     logCPM       LR       PValue          FDR
ACTL8  -3.626585  1.9449815 41.05906 1.476981e-10 1.765755e-06
DBH    -2.980882 -0.6717054 40.29327 2.185611e-10 1.765755e-06
IGFN1  -3.772058  0.1735114 38.82410 4.637663e-10 2.497845e-06
```

```
PCCA   -1.854167  6.0403726 37.84606 7.655289e-10 3.092354e-06
INHA   -3.544573 -1.2757898 34.69282 3.860522e-09 1.247566e-05
FLT3   -2.515272 -0.6541790 34.27551 4.783649e-09 1.288237e-05
MUM1L1 -2.947467 -0.5294079 29.86079 4.642074e-08 1.071523e-04
MYO3B  -2.250829 -1.0459367 28.57745 9.002435e-08 1.818267e-04
KRT14   8.581216  2.8419848 26.64655 2.442861e-07 4.385750e-04
PPP4R4 -2.363616 -1.4762586 24.69543 6.714311e-07 1.084898e-03
```

Bibliografía

McCarthy, Davis J., Yunshun Chen, and Gordon K. Smyth. 2012. "Differential Expression Analysis of Multifactor RNA-Seq Experiments with Respect to Biological Variation." *Nucleic Acids Research* 40 (10): 4288–97. https://doi.org/10.1093/nar/gks042.