«Анализ транскриптомных данных»

Лекция #14.

Определение типов клеток

Серёжа Исаев

аспирант MedUni Vienna

Содержание курса

1. Bulk RNA-Seq:
    a. экспериментальные подходы,
    b. выравнивания и псевдовыравнивания,
    c. анализ дифференциальной экспрессии,
    d. функциональный анализ;

1. Single-cell RNA-Seq:
    a. экспериментальные подходы,
    b. отличия от процессинга bulk RNA-Seq,
    c. методы снижения размерности,
    d. кластера и траектории,
    e. мультимодальные омики одиночных клеток.

Что такое тип клетки?

В целом сейчас нет однозначного ответа на этот вопрос

Мы знаем, что есть какие-то состояния клетки — некоторые состояния уже не могут выйти в другое, кроме как в апоптоз (эритроцит не может стать неэритроцитом)

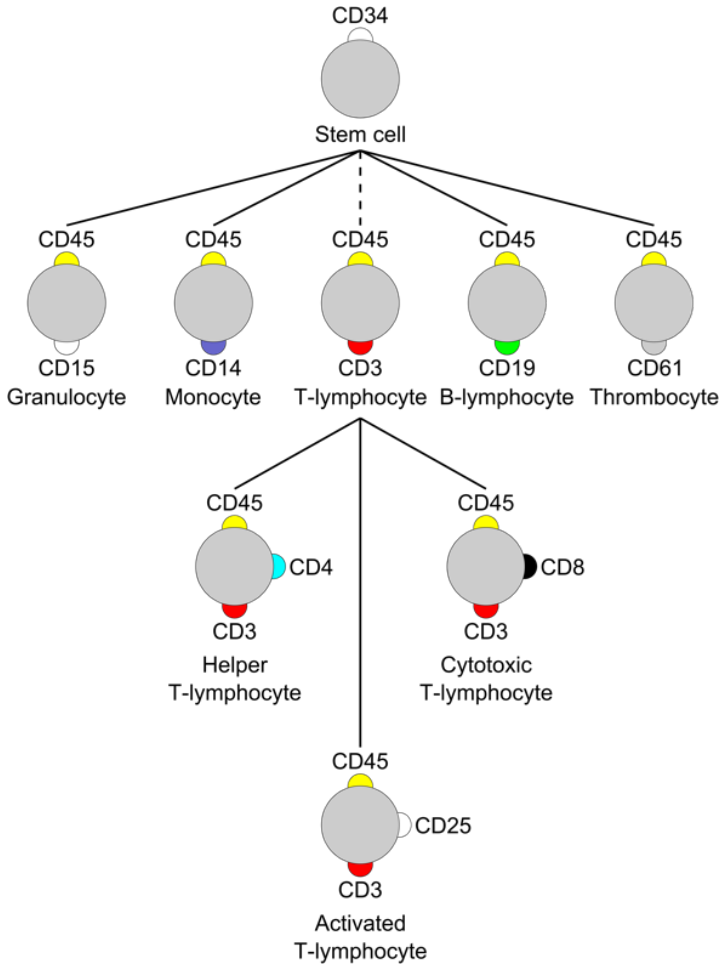
Бывают случаи, когда у нас есть более-менее стабильное состояние клетки (M1 и M2 макрофаги), однако при должном желании мы можем запустить превращение одного типа клетки в другой

В целом тип клетки — это некоторая транскрипционно (почти) гомогенная популяция (гетерогенность обуславливается разными клеточными состояниями) с определённой функцией в организме

Тимы иммунных клеток

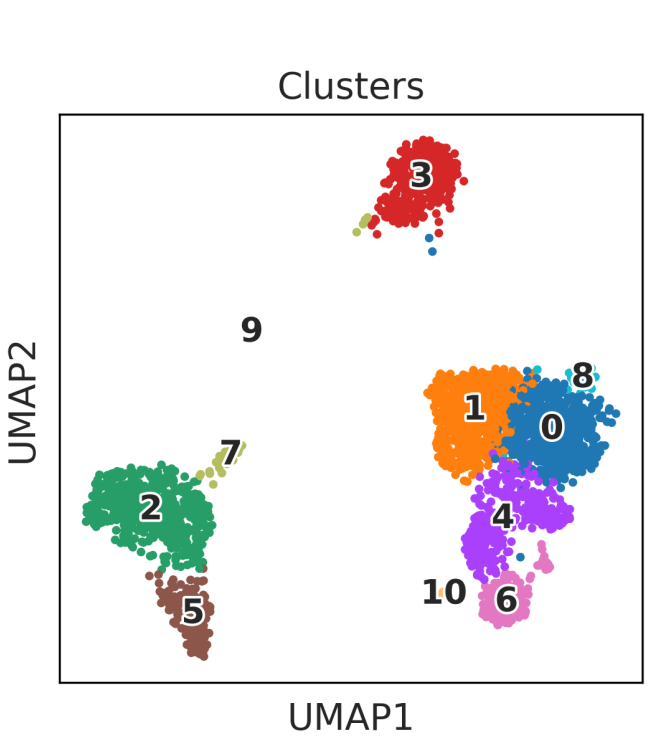
Для описания гетерогенности иммунных клеток уже не одно десятилетие используется набор поверхностных белков, представленных на клетках

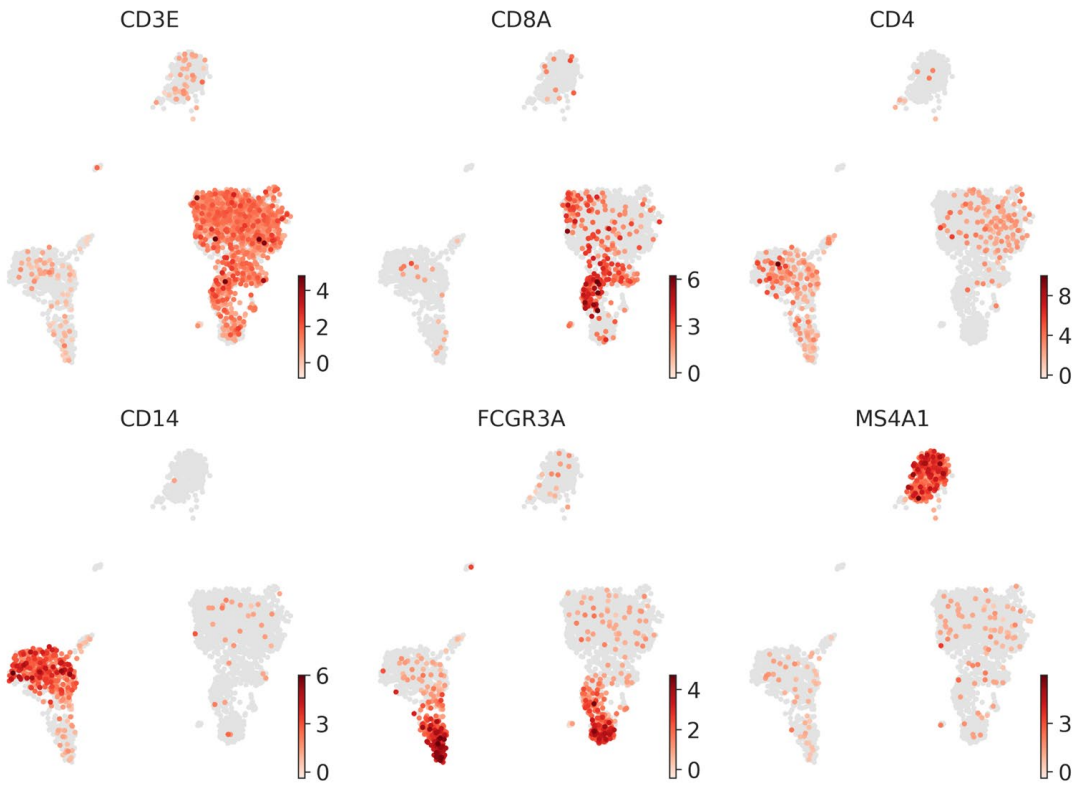
Однако поверхностные белки != РНК в клетке, поэтому необходимо быть очень аккуратным в выводах



Мануальные подходы к аннотации

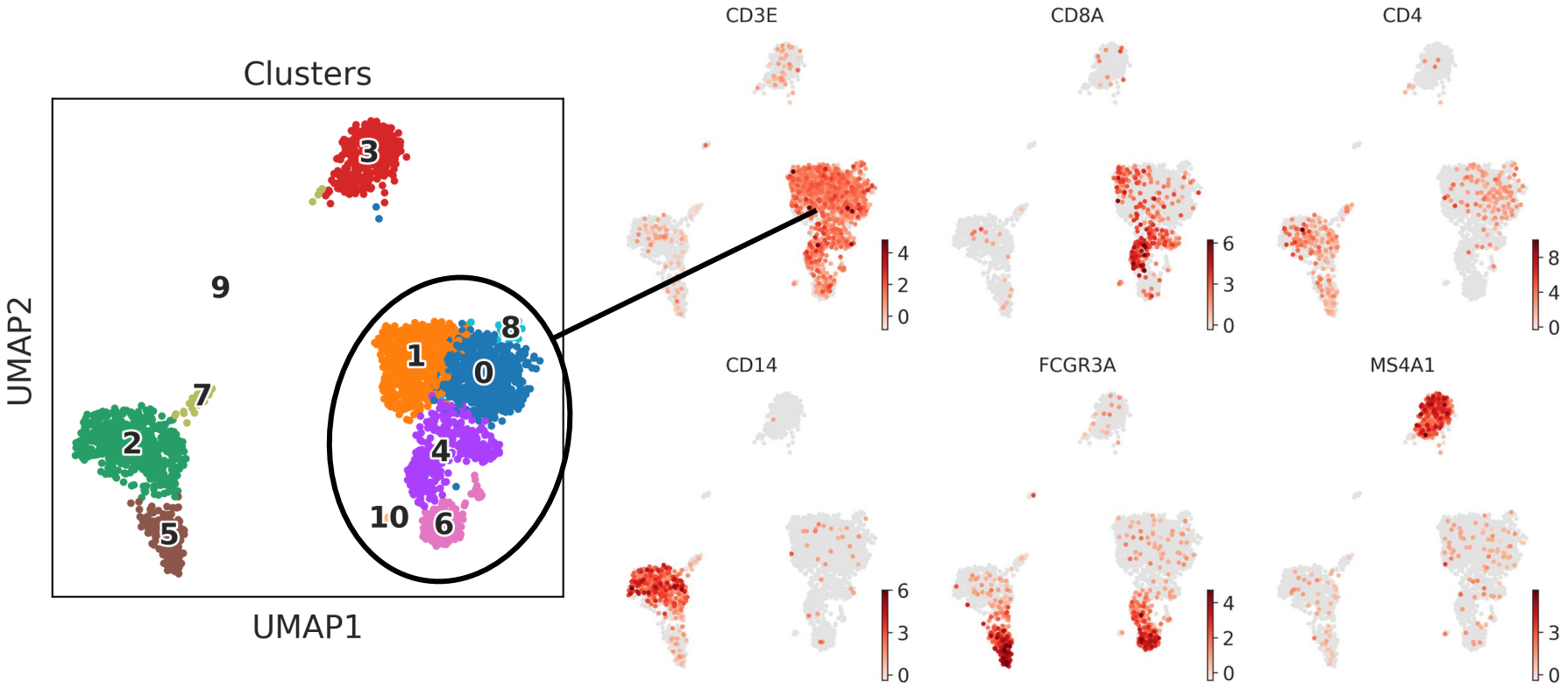
Мы можем оценить, в каком кластере экспрессируются какие из известных нам маркерных генов





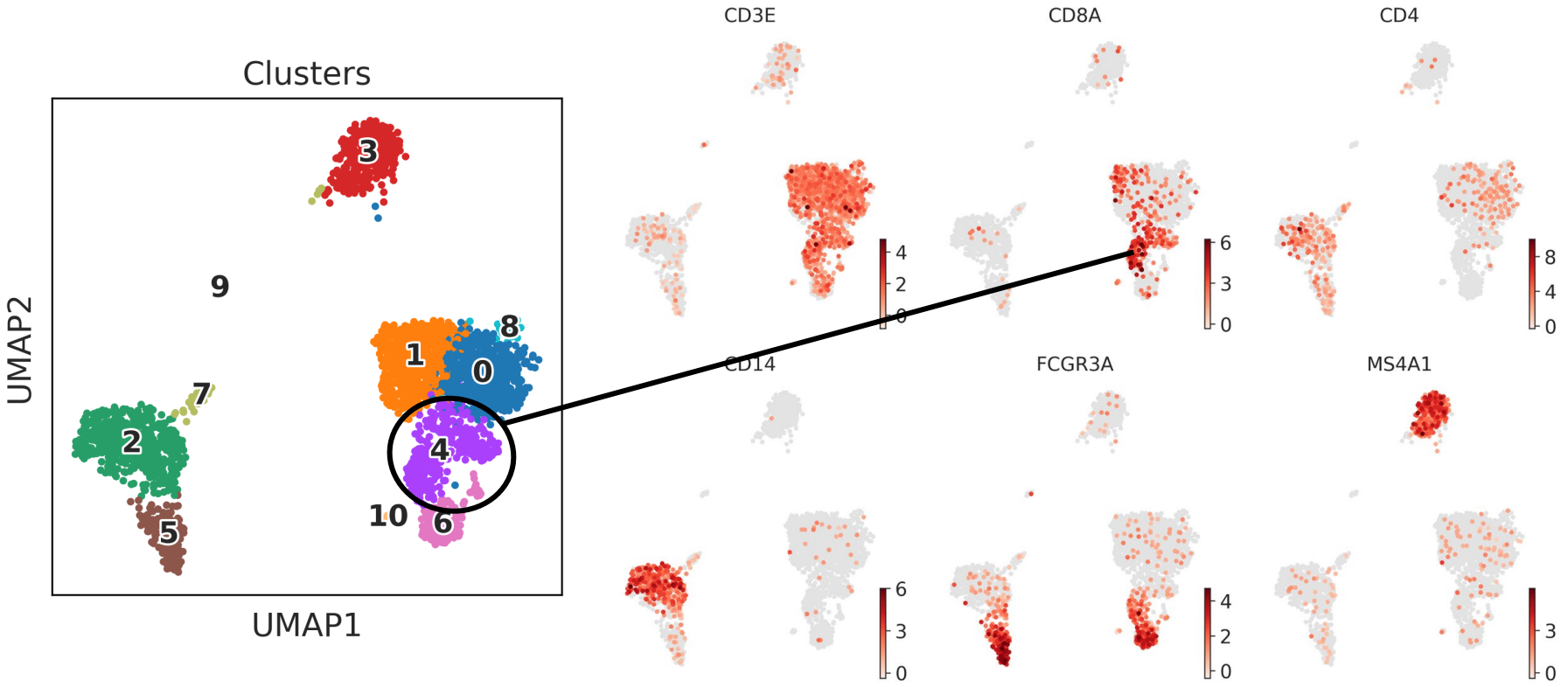
Мануальные подходы к аннотации

Мы можем оценить, в каком кластере экспрессируются какие из известных нам маркерных генов



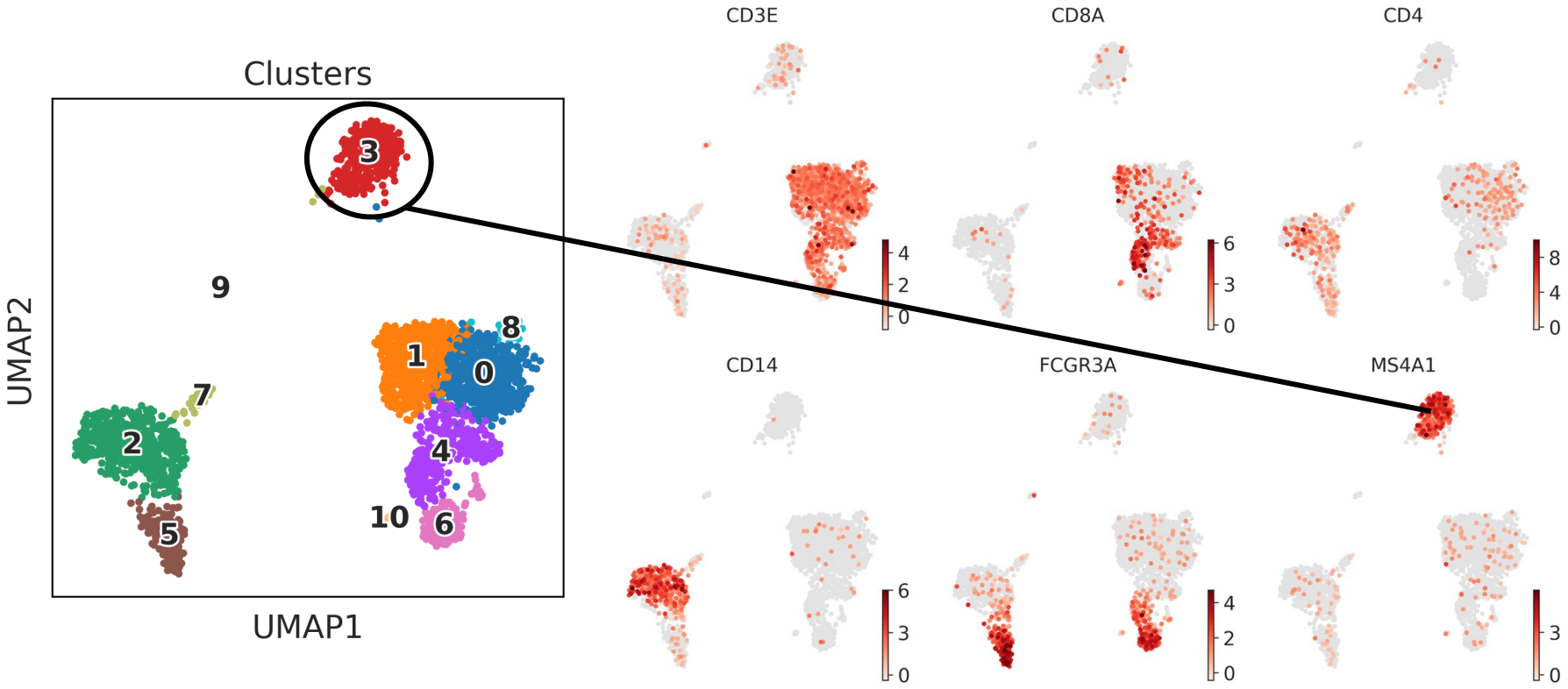
Мануальные подходы к аннотации

Мы можем оценить, в каком кластере экспрессируются какие из известных нам маркерных генов



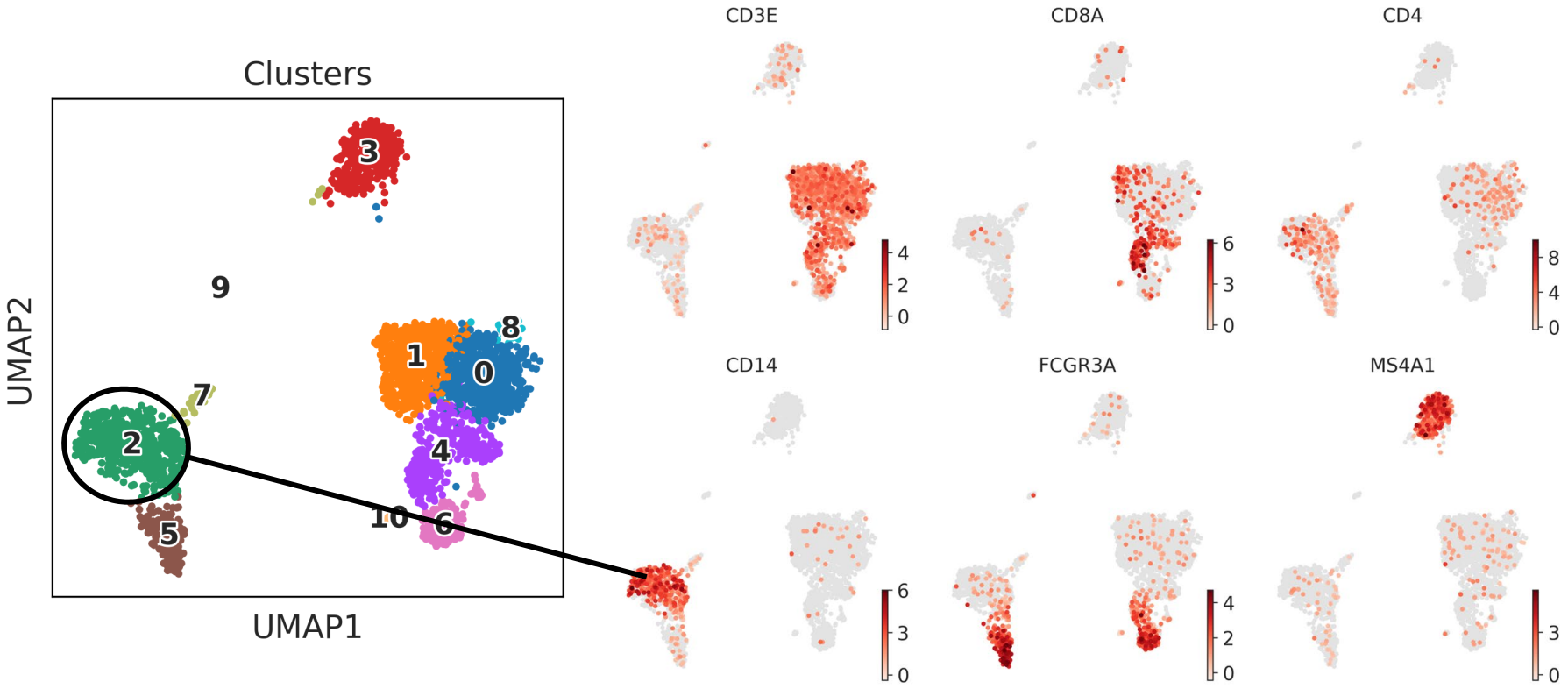
Мануальные подходы к аннотации

Мы можем оценить, в каком кластере экспрессируются какие из известных нам маркерных генов



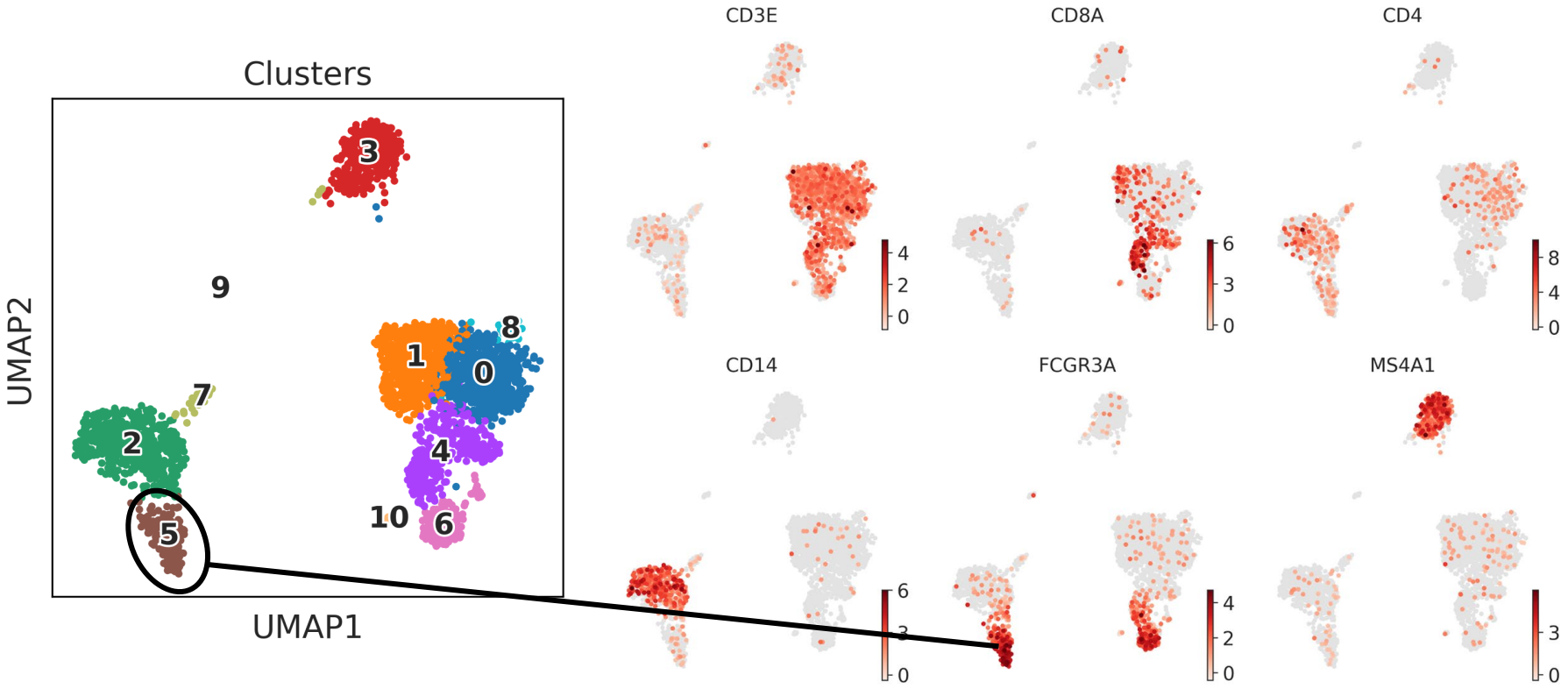
Мануальные подходы к аннотации

Мы можем оценить, в каком кластере экспрессируются какие из известных нам маркерных генов



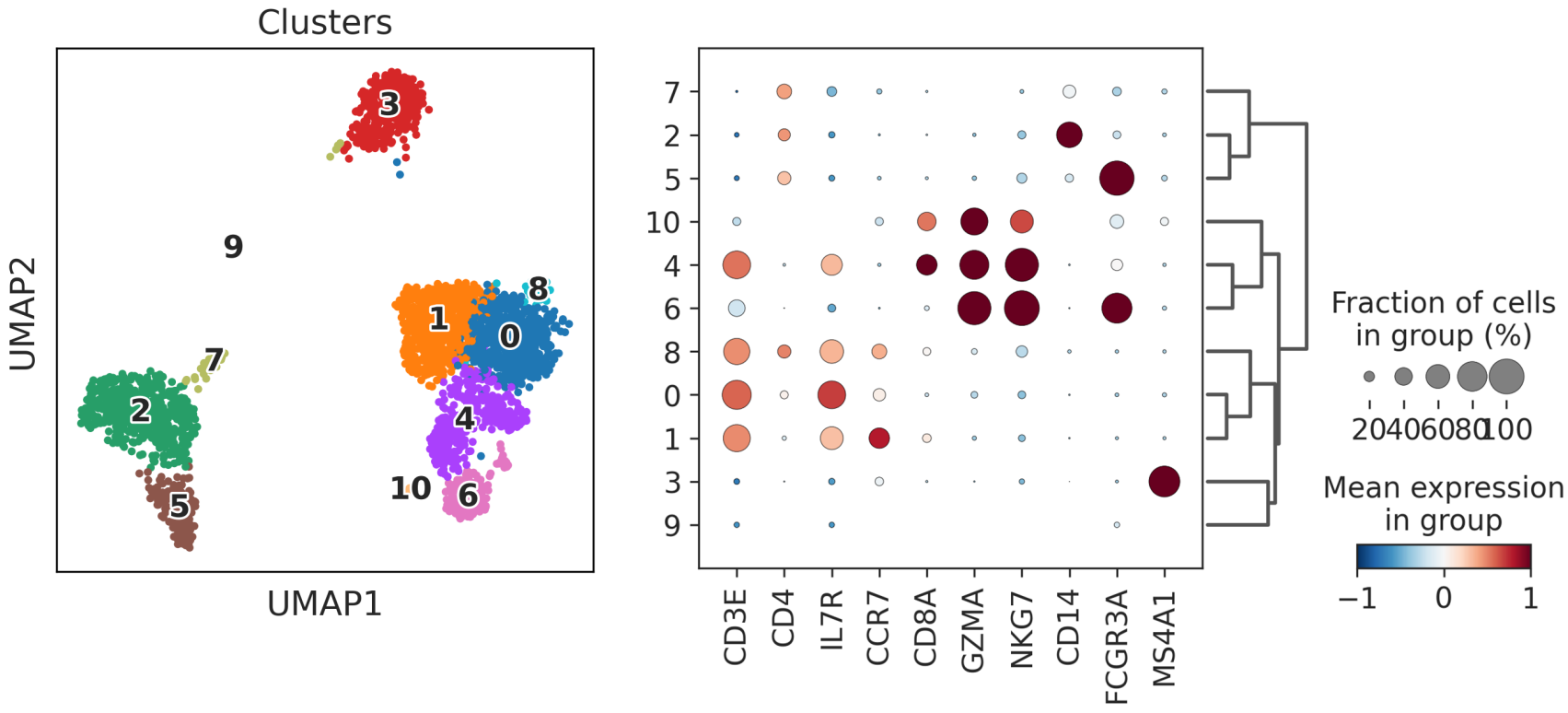
Мануальные подходы к аннотации

Мы можем оценить, в каком кластере экспрессируются какие из известных нам маркерных генов



Мануальные подходы к аннотации

Удобным и информативным в свете этого всего будет график, который называют отражает среднюю экспрессию в группе и % клеток с этой экспрессией



Поиск маркеров

Когда закончились идеи насчёт маркерных генов, которые можно было бы оценить, можно зайти с другого конца — определить маркерные гены для каждого из кластеров *de novo*, а потом предугадать, что это был за кластер, опираясь на список генов

Есть два концептуальных подхода к поиску маркеров:

1. поиск дифференциально экспрессированных генов,
2. поиск генов, экспрессия которых является лучшим предиктором для отличия этого типа клетки от другого (AUC ROC)

AUC ROC

1 = целевой кластер
0 = другой кластер

	group	expr
0	0	0.000000
1	0	0.000000
2	0	0.000000
3	1	0.000000
4	0	0.000000
...	...	...
2695	1	0.819593
2696	0	0.000000
2697	0	0.000000
2698	0	0.000000
2699	0	0.000000

Сортированные по возрастанию экспрессии

	group	expr
0	0	0.000000
1723	0	0.000000
1724	0	0.000000
1725	0	0.000000
1726	0	0.000000
...	...	...
443	1	2.078248
2598	1	2.121581
98	1	2.218295
2506	1	2.251932
1326	1	2.505317

ROC

Затём вы идёте по возрастающей экспрессии и ставите порог классификатора по этому значению экспрессии

Выше? Это клетка из вашего кластера

Ниже? Это клетка не из вашего кластера

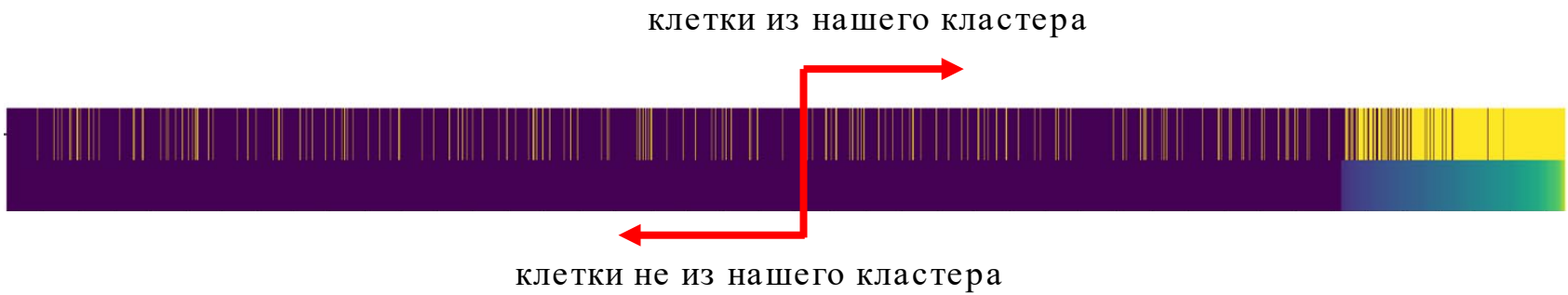
Какое количество True Positive (TP)? False negative (FN)? TPR = TP / (TP + FN)
Какое количество False Positive (FP)? True Negative (TN)? FPR = FP / (FP + TN)

ROC

Затём вы идёте по возрастающей экспрессии и ставите порог классификатора по этому значению экспрессии

Выше? Это клетка из вашего кластера

Ниже? Это клетка не из вашего кластера



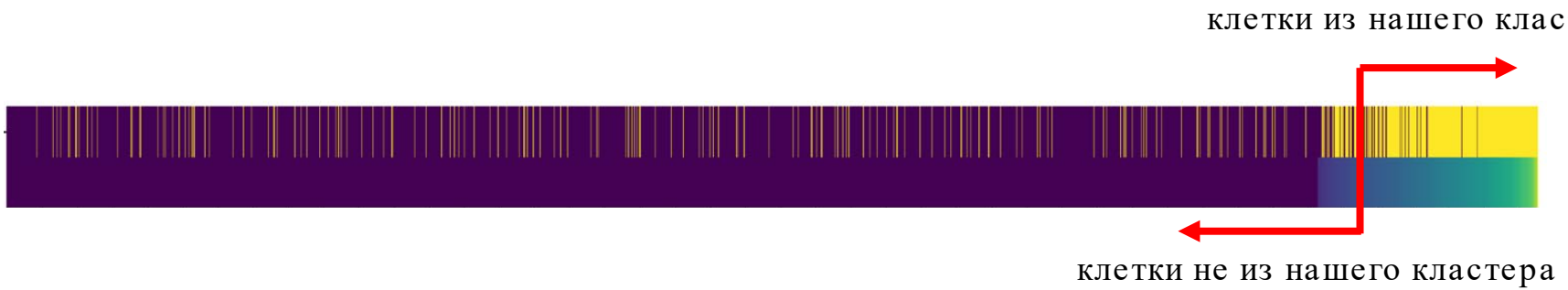
Какое количество True Positive (TP)? False negative (FN)? TPR = TP / (TP + FN)
Какое количество False Positive (FP)? True Negative (TN)? FPR = FP / (FP + TN)

ROC

Затём вы идёте по возрастающей экспрессии и ставите порог классификатора по этому значению экспрессии

Выше? Это клетка из вашего кластера

Ниже? Это клетка не из вашего кластера

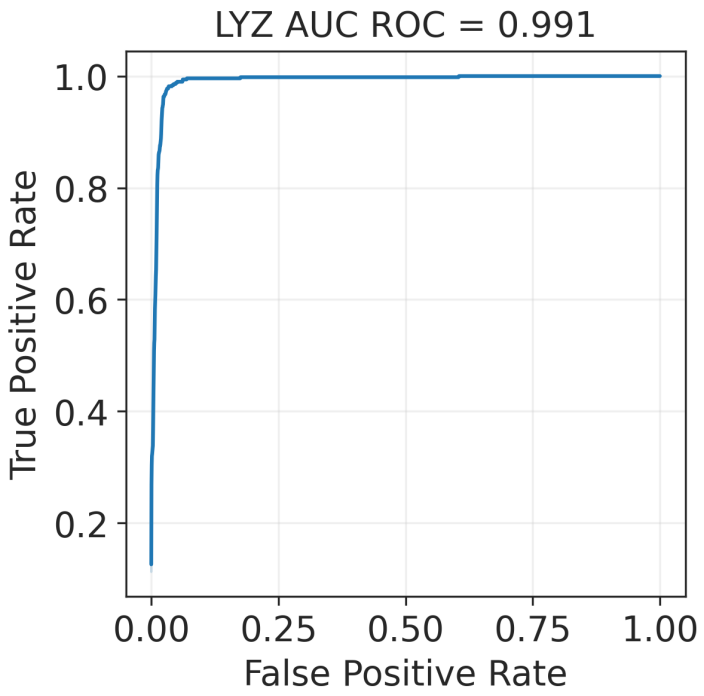


Какое количество True Positive (TP)? False negative (FN)? TPR = TP / (TP + FN)
Какое количество False Positive (FP)? True Negative (TN)? FPR = FP / (FP + TN)

AUC ROC

А теперь отрисуем все значения TPR и FPR на одном графике в виде кривой и найдём площадь под этой кривой

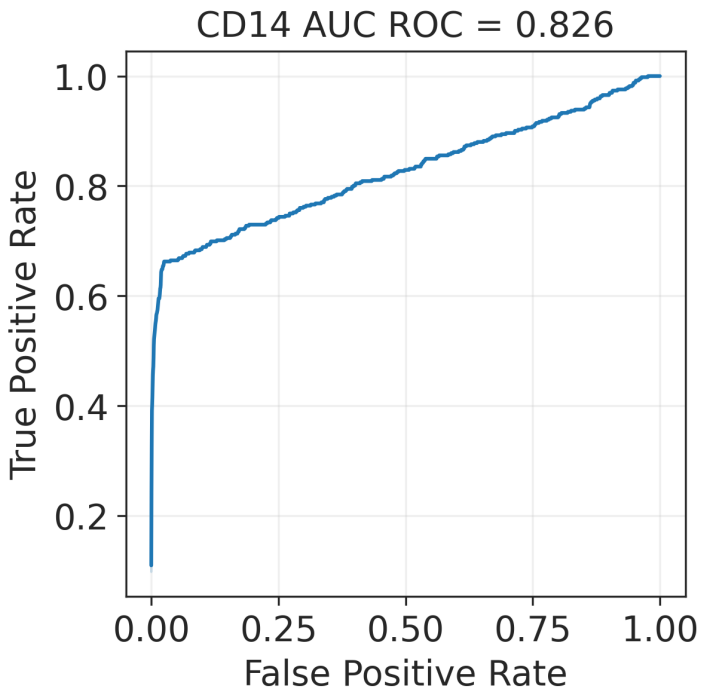
Мы можем повторить это для каждого гена и выбрать в итоге гены с наибольшим значением AUC — это и будут маркерные гены



AUC ROC

А теперь отрисуем все значения TPR и FPR на одном графике в виде кривой и найдём площадь под этой кривой

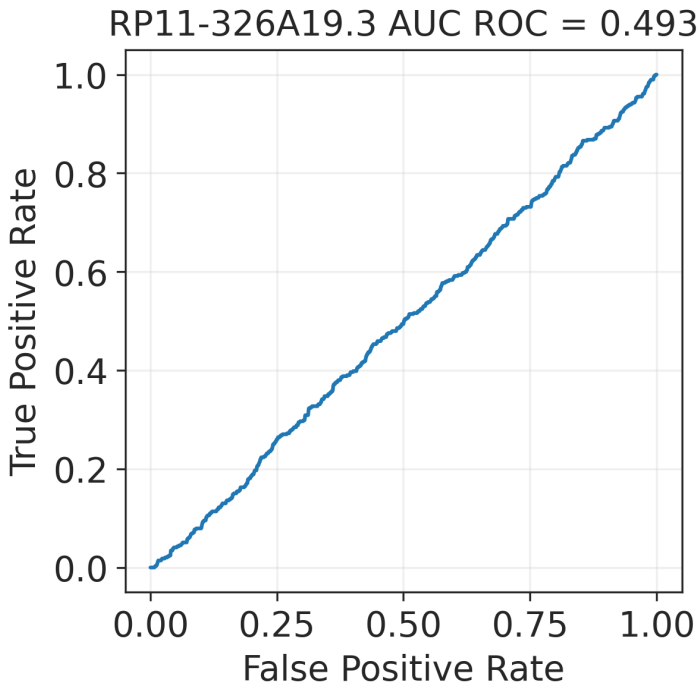
Мы можем повторить это для каждого гена и выбрать в итоге гены с наибольшим значением AUC — это и будут маркерные гены



AUC ROC

А теперь отрисуем все значения TPR и FPR на одном графике в виде кривой и найдём площадь под этой кривой

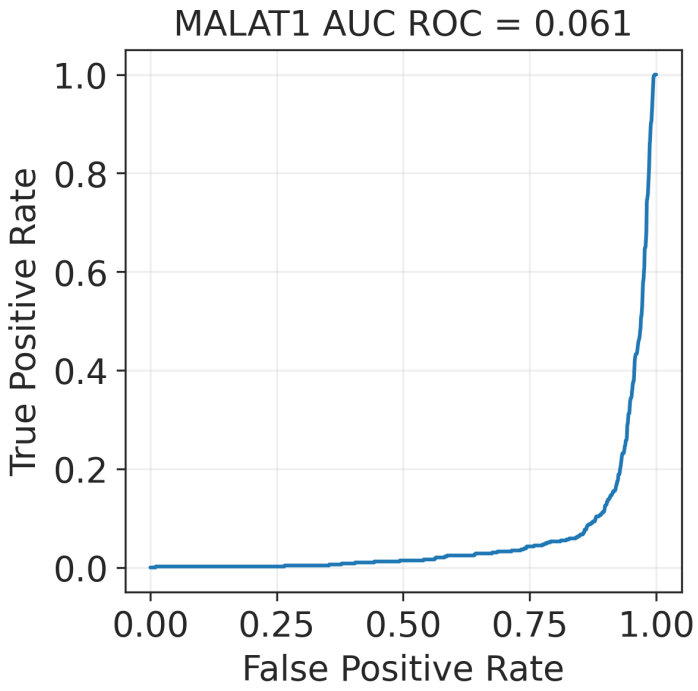
Мы можем повторить это для каждого гена и выбрать в итоге гены с наибольшим значением AUC — это и будут маркерные гены



AUC ROC

А теперь отрисуем все значения TPR и FPR на одном графике в виде кривой и найдём площадь под этой кривой

Мы можем повторить это для каждого гена и выбрать в итоге гены с наибольшим значением AUC — это и будут маркерные гены



Дифференциальная экспрессия

Также маркерные гены можно искать при помощи дифференциальной экспрессии, однако подходы здесь обычно значительно проще, чем в bulk RNA-Seq из-за очень больших размеров выборок

Можно использовать:

1. T-test с неравными дисперсиями (с натяжкой, но даст представление о маркерах) на log1pCP10k — очень быстрый
2. **Тест Манна -Уитни на log1pCP10k** — медленнее, но подходит лучше. В основном используют его
3. NB-модели на каунтах — вычислительно сложные, требуют много ресурсов, не очень ясно, зачем

Проблема множества батчей

Часто мы имеем дело с датасетами, которые состоят из нескольких батчей

Как в таком случае считать дифференциальную экспрессию?

1. На каждом батче индивидуально (например, при помощи Манна-Уитни), а потом усредняем logFC и аккумулируем p-value
2. Делаем псевдо-балки из каждого батча (если их больше, чем три-четыре), после чего используем edgeR / DESeq2 для поиска дифференциальной экспрессии между батчами

Тест Манна -Уитни и AUC

Тест Манна -Уитни

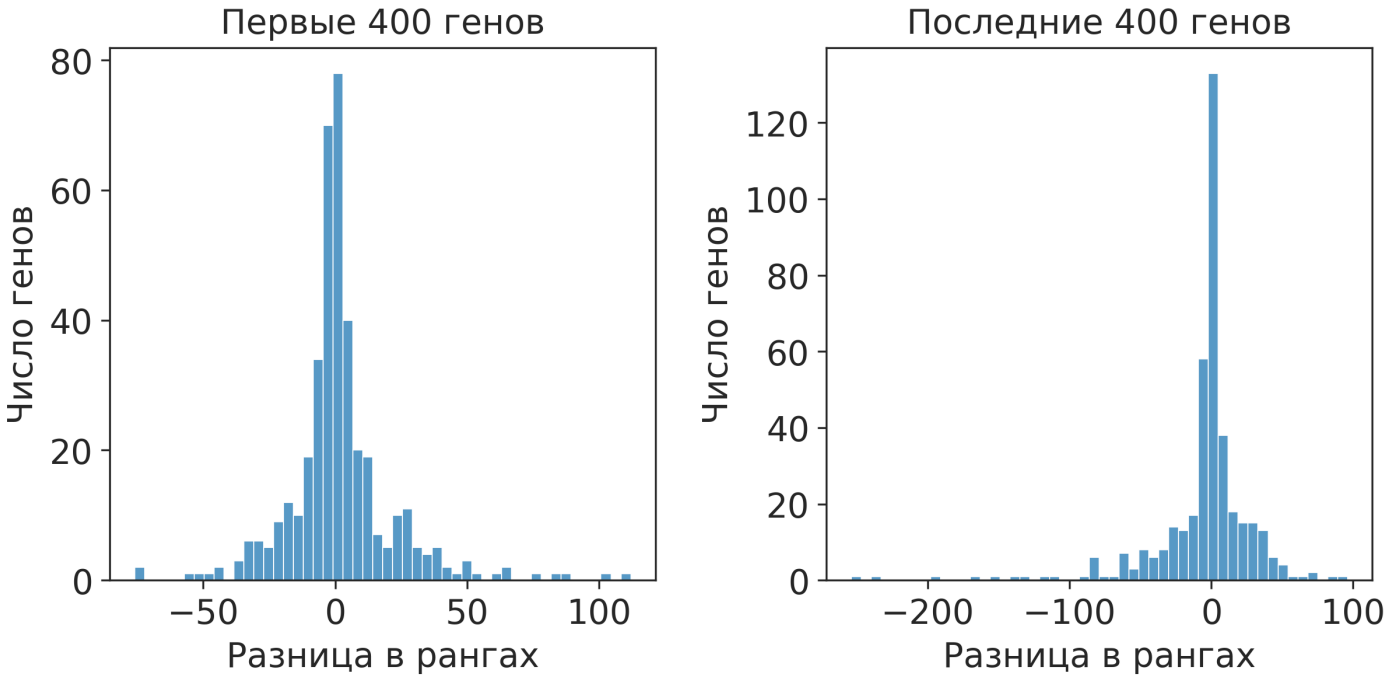
	names	scores	logfoldchanges	pvals	pvals_adj
0	LYZ	34.076332	5.554640	1.653918e-254	5.414596e-250
1	S100A9	34.022038	6.539301	1.052143e-253	1.722253e-249
2	S100A8	33.251110	6.832742	1.967234e-242	2.146777e-238
3	TYROBP	32.434139	4.540583	9.065962e-231	7.420036e-227
4	FTL	31.846174	3.446953	1.487022e-222	9.736426e-219
...	...	...	...	...	...
32733	RPSA	-25.772381	-1.679404	1.809493e-146	1.974639e-143
32734	RPL23A	-25.978748	-1.195210	8.610019e-149	1.006696e-145
32735	RPS27	-26.104221	-1.198215	3.264942e-150	4.453654e-147
32736	RPS27A	-27.741587	-1.906760	2.201332e-169	3.431771e-166
32737	MALAT1	-30.530386	-1.625752	1.029974e-204	3.065389e-201

AUC

	AUC
LYZ	0.990816
S100A9	0.990045
S100A8	0.978425
TYROBP	0.966149
FTL	0.958402
...	...
RPSA	0.128895
RPL23A	0.126083
RPS27	0.124240
RPS27A	0.100790
MALAT1	0.060538

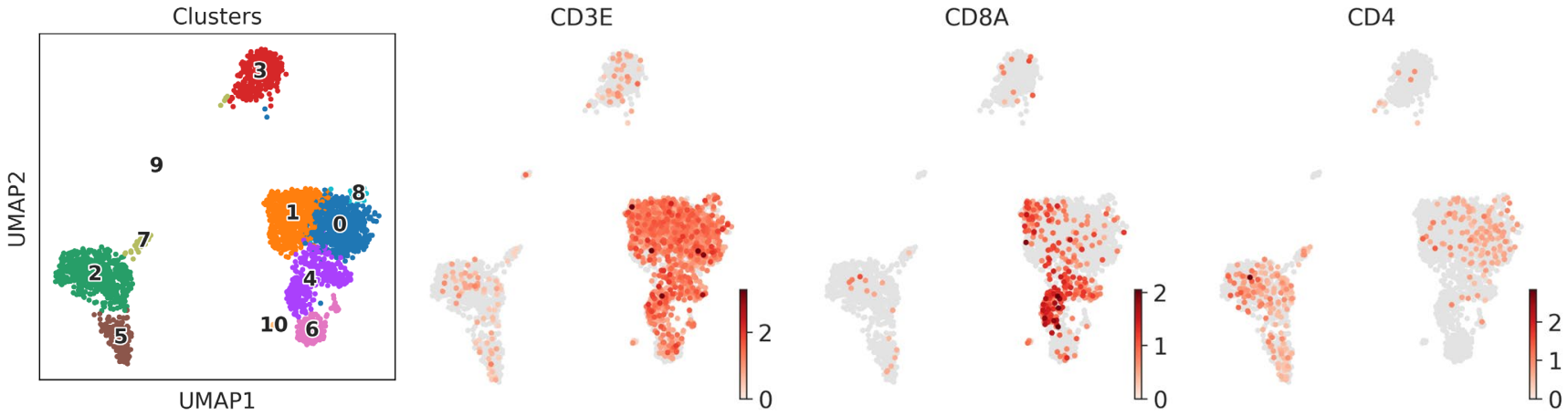
В пределе статистика Манна-Уитни сходится к AUC, поэтому в принципе можно пользоваться только одним из этих тестов (Манн-Уитни даёт к тому же значение p-value, однако AUC удобнее интерпретировать)

Тест Манна -Уитни и AUC



В пределе статистика Манна-Уитни сходится к AUC, поэтому в принципе можно пользоваться только одним из этих тестов (Манн-Уитни даёт к тому же значение p-value, однако AUC удобнее интерпретировать)

Проблемы с маркерными генами



Кластер 4 — это определённо CD8+ Т-клетки (скорее всего, памяти). Соответственно, дифференциальная экспрессия должна выдать нам маркеры этого типа клеток

Проблемы с маркерными генами

	names	scores	logfoldchanges	pvals	pvals_adj
0	CCL5	26.200100	4.760021	2.650470e-151	8.677110e-147
1	NKG7	23.580784	4.148077	6.069330e-123	9.934887e-119
2	B2M	20.350811	0.793257	4.566622e-92	4.983403e-88
3	GZMA	19.658840	3.405880	4.857022e-86	3.975230e-82
4	CST7	19.377089	3.492904	1.204750e-83	7.888220e-80
5	IL32	19.057325	2.118002	5.712215e-81	3.116775e-77
6	CTSW	18.355267	2.710095	2.996152e-75	1.401258e-71
7	HLA-C	17.823990	0.956840	4.603284e-71	1.883779e-67
8	HLA-A	16.113411	0.911328	2.053779e-58	7.470736e-55
9	GZMK	16.089947	4.630021	3.000959e-58	9.824540e-55

	names	scores	logfoldchanges	pvals	pvals_adj
10	CD3D	15.700964	1.724816	1.489616e-55	4.433367e-52
11	PTPRCAP	13.961631	1.369620	2.672486e-44	6.730142e-41
12	LYAR	13.860597	2.838753	1.097574e-43	2.566599e-40
13	GZMM	13.172859	2.242082	1.257444e-39	2.744414e-36
14	CD8A	12.877013	3.518669	6.063743e-38	1.240718e-34
15	HCST	12.408269	1.327444	2.356944e-35	4.538920e-32
16	MALAT1	12.320384	0.677299	7.035862e-35	1.279667e-31
17	KLRG1	12.160748	3.459849	5.029613e-34	8.666288e-31
18	HLA-B	11.554396	0.636137	7.013920e-31	1.148108e-27
19	PRF1	10.618041	2.075951	2.456628e-26	3.351046e-23

Однако ген CD3D на 10-ом месте, CD8A — на 14-ом, а гена CD3E вообще нет. Почему? Потому что у нас в датасете есть ещё Т-клетки, в том числе и CD8 Т-клетки

=> **ВСЕГДА** надо представлять, какие типы клеток ожидаются

Автоматическое определение типов клеток

Методы можно разделить на несколько групп:

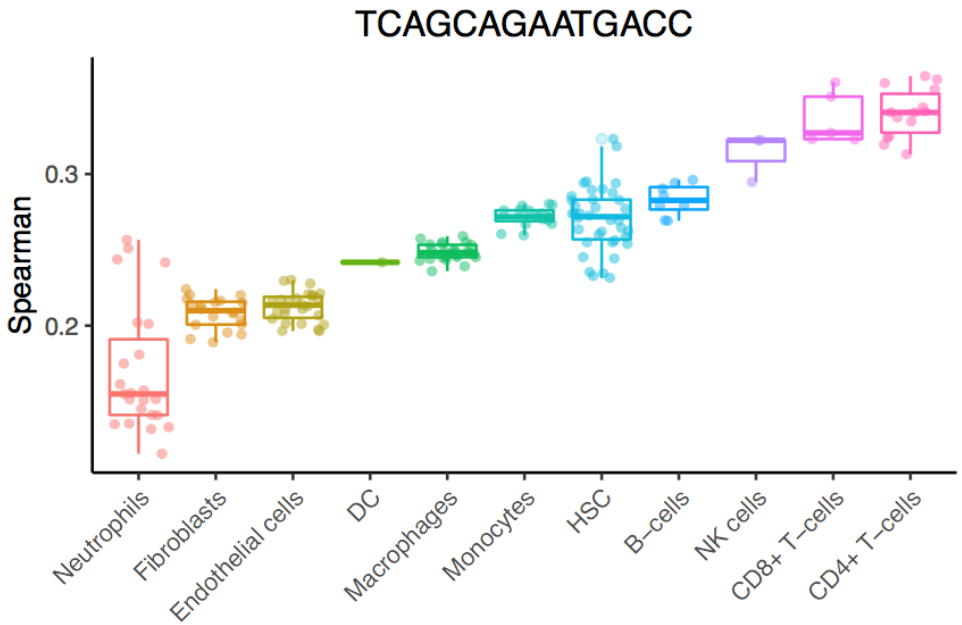
1. методы, определяющие максимально похожие bulk-датасеты с клеточными линиями (SingleR),
2. методы, использующие маркерные гены,
3. label transferring

SingleR

Помогает автоматически предсказать, что за типы клеток перед нами, если совсем нет идей

Много референсных датасетов, но недостаточно для глубокого типирования

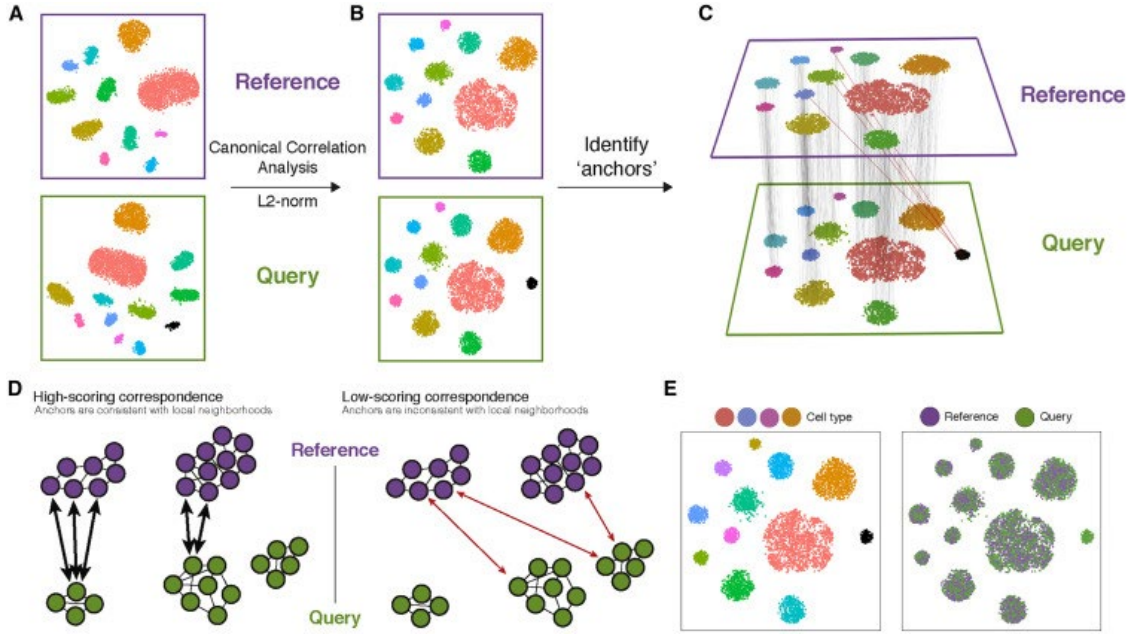
Предположения о типе клеток основывается на корреляции с известными датасетами (bulk!)



Label transfer

Принцип основывается на том, что есть уже достаточно большое количество хорошо проаннотированных датасетов

Принцип достаточно прост: “проинтегрируем” (в первом приближении) датасет с референсным и по окружению неизвестных клеток поймём, какого они типа

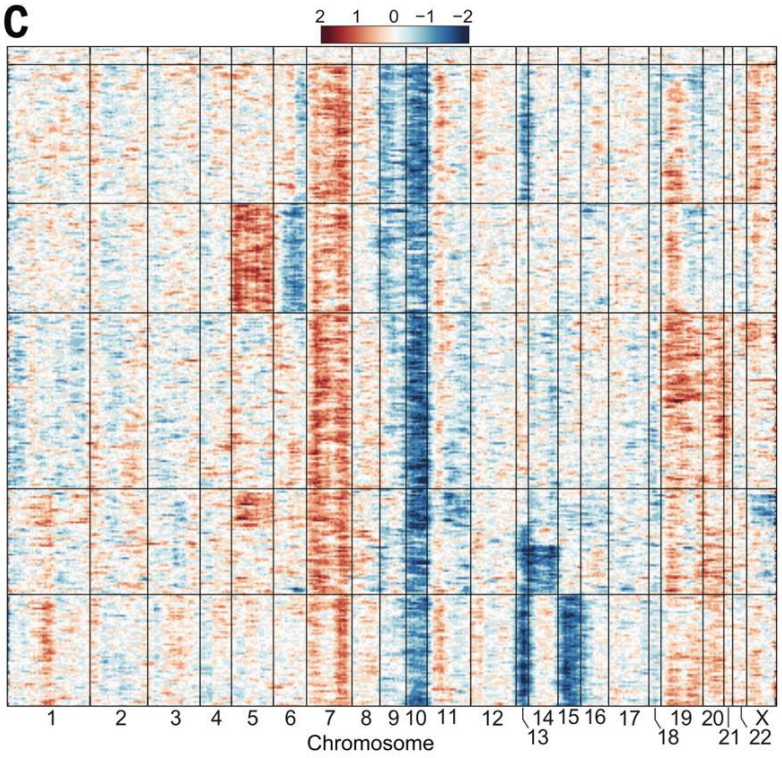


Label transfer

Существует достаточно много инструментов для того, чтобы автоматически определять типы клеток по референсу:

1. conos (~ conos / pagoda2 ecosystem),
2. scANVI (~ scVI ecosystem),
3. Azimuth / Seurat (~ Seurat ecosystem),
4. Symphony (~ Seurat / Harmony ecosystem, не адаптирован для Python)

Определение раковых клеток: InferCNV



Часто бывает сложно отделить нормальные клетки от опухолевых

Мы знаем, что в нормальных клетках практически всегда происходят серьёзные хромосомные перестройки — можно воспользоваться этим и идентифицировать раковые кластеры благодаря им