Biomeetria

7. praktikum – dispersioonanalüüs (ANOVA)

Kasutame jälle andmestikku fishcatch.dat:

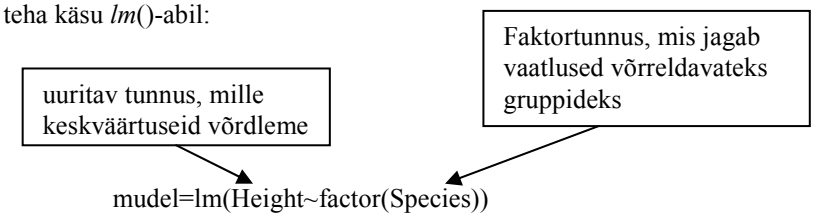
andmed=read.table("http://www.ms.ut.ee/mart/biomeetria2009/fishcatch.dat", header=TRUE)

Dispersioonanalüüs

Soovime teada, kas kõigi kalaliikide kõrguste keskväärtused (tunnus *Height*, mõõdetud kui % kala pikkusest) on võrdsed või mitte, ehk tahame kontrollida järgmiseid hüpoteese:

H_0: E $\text{Height}_{\text{latikas}}$ = E $\text{Height}_{\text{siig}}$ = E $\text{Height}_{\text{särg}}$ = ... = E $\text{Height}_{\text{ahven}}$
H_1: leiduvad vähemalt kaks kalaliiki, mille kõrguste keskväärtused pole võrdsed.

Dispersioonanalüüsi saab teha käsu *lm*()-abil:



Tulemuste vaatamine
1. Vaikimisi trükitakse välja kalaliikide keskmiste kõrguste erinevused latikate keskmisest kõrgusest:

```
> mudel

Call:
lm(formula = Height ~ factor(Species))

Coefficients:
     (Intercept)  factor(Species)2  factor(Species)3  factor(Species)4
         39.5257          -10.3257          -12.7907           -0.2166
factor(Species)5  factor(Species)6  factor(Species)7
        -22.6400          -23.6845          -13.2686
```

Latikate (*Species*=1) keskmine kõrgus on 39,5 (mõõdetuna kui % nende pikkusest)

Ahvenate (Species=7) keskmine kõrgus on 13,3 võrra väiksem kui latikate oma

2. Näeme, et valimite keskmised erinevad teineteisest. Kas populatsioonide keskväärtused ka erinevad üksteisest?

```
> drop1(mudel,test="F")
Single term deletions

Model:
Height ~ factor(Species)
               Df Sum of Sq     RSS     AIC F value     Pr(F)
<none>                       393.5   158.1
factor(Species)  6   10494.1 10887.6   674.0  675.64 < 2.2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 `***' 0.001 `**' 0.01 `*' 0.05 `.' 0.1 ` ' 1
```

Olulisustõenäosus on väiksem kui 0,05, järelikult leidub vähemalt kaks kalaliiki, mille kõrguste keskväärtused pole võrdsed

3. Dispersioonanalüüsi mudelit võib uurida ka *summary*()-käsu abil, mille tulemusena trükitakse välja erinevused võrdlustasemega (latikate kaaluga):

```
> summary(mudel)

Call:
lm(formula = Height ~ factor(Species))

Residuals:
     Min       1Q   Median       3Q      Max
-4.95714 -1.13500  0.01429  1.08260  4.97429

Coefficients:
                  Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)        39.5257     0.2720  145.34   <2e-16 ***
factor(Species)2 -10.3257     0.7109  -14.52   <2e-16 ***
factor(Species)3 -12.7907     0.4510  -28.36   <2e-16 ***
factor(Species)4  -0.2166     0.5561   -0.39    0.697
factor(Species)5 -22.6400     0.5088  -44.50   <2e-16 ***
factor(Species)6 -23.6845     0.4756  -49.80   <2e-16 ***
factor(Species)7 -13.2686     0.3467  -38.27   <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 `***' 0.001 `**' 0.01 `*' 0.05 `.' 0.1 ` ' 1

Residual standard error: 1.609 on 152 degrees of freedom
Multiple R-Squared: 0.9639,     Adjusted R-squared: 0.9624
F-statistic: 675.6 on 6 and 152 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

Ahvenad on meie valimis keskmiselt latikatest 13,3 võrra väiksema kõrgusega

Näitab kui täpselt me oleme hinnanud latikate ja ahvenate erinevust – keskväärtuste erinevusele antud hinnangu standardhälve.

T-testi abil kontrollitakse, kas latikate ja ahvenate kõrguste keskväärtused on teineteisest erinevad. Antud juhul võib keskväärtuste erinevuse tõestatuks lugeda.

Võimalik on muuta ka võrdlustaset ehk gruppi, kellega teisi võrreldakse. Näiteks soovime võrrelda teiste kalade kõrguseid siigade (Species=2) kõrgustega:

```
> summary(lm(Height~relevel(factor(Species),ref="2")))

Residuals:
     Min       1Q   Median       3Q      Max
-4.95714 -1.13500  0.01429  1.08260  4.97429

Coefficients:
                                    Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)                          29.2000     0.6568  44.455  < 2e-16 ***
relevel(factor(Species), ref = "2")1  10.3257     0.7109  14.524  < 2e-16 ***
relevel(factor(Species), ref = "2")3  -2.4650     0.7489  -3.291  0.00124 **
relevel(factor(Species), ref = "2")4  10.1091     0.8166  12.380  < 2e-16 ***
relevel(factor(Species), ref = "2")5 -12.3143     0.7851 -15.685  < 2e-16 ***
relevel(factor(Species), ref = "2")6 -13.3588     0.7640 -17.485  < 2e-16 ***
relevel(factor(Species), ref = "2")7  -2.9429     0.6911  -4.258  3.6e-05 ***
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Residual standard error: 1.609 on 152 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.9639,     Adjusted R-squared: 0.9624
F-statistic: 675.6 on 6 and 152 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

Ahvenad on meie valimis keskmiselt siigadest 3 ühiku võrra väiksema kõrgusega

Eelduste kontroll

1. Kas dispersioonmudeli jäägid on normaaljaotusega?

Mudeli jääke (kalade kõrguste erinevust oma grupi ehk oma kalaliigi keskmisest) saab vaadata *resid*()-käsu abil:

```
resid(mudel)
```

Seda, kas tegemist võiks olla normaaljaotusega, võime näiteks kontrollida kas tõenäosuspaberi või Shapiro-Wilki testi abil:

```
qqnorm(resid(mudel))
qqline(resid(mudel))

ajut=resid(mudel)
shapiro.test(ajut)
```

2. Kas uuritava tunnuse hajuvus kõigis gruppides on ligikaudu samasuur?

Seda saab kontrollida näiteks vaadates, milline on uuritava tunnuse hajuvus kalaliigiti:

```
tapply(Height, Species, sd)
```

või

```
tapply(resid(mudel), Species, sd)
```

Mis on vahet nende käskude tulemustel, miks?

Uuritava tunnuse hajuvust grupiti ehk kalaliigiti saab võrrelda ka graafiliselt:

```
boxplot(resid(mudel)~Species)
```

On võimalik ka teostada statistilist testi, mis kontrollib, kas uuritava tunnuse hajuvus grupiti on sama:

```
> bartlett.test(resid(mudel)~factor(Species))

Bartlett test for homogeneity of variances

data:  resid(mudel) by factor(Species)
Bartlett's K-squared = 11.9809, df = 6, p-value = 0.0624
```

Saame tulemuseks, et olulisustõenäosus on suurem 0,05-st (kuigi napilt) ja järelikult võime jääda oletuse juurde, et uuritava tunnuse hajuvus grupiti ei muutu.

NB! Bartlett test eeldab, et uuritav tunnus oleks normaaljaotusega!

Dispersioonanalüüsi tabel ja arvutuslikud seosed

Kala kõrguse prognoosimisel tehtavate vigade ruutude summa, juhul kui me kala liiki ei tea ja prognoosimisel kasutada ei saa, on

```
> sum((Height-mean(Height))**2)
[1] 10887.56
```

Kui kasutame ka kala liiki kala kõrguse prognoosimisel, siis kahaneb prognoosivigade ruutude summa 393,5-ks – võid seda väidet kontrollida ka käsuga *sum(resid(mudel)**2)*, aga anova-käsk annab ka vastuse:

```
> anova(mudel)
Analysis of Variance Table

Response: Height
                 Df  Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
factor(Species)   6 10494.1  1749.0  675.64 < 2.2e-16 ***
Residuals       152   393.5     2.6
```

Ehk, teisisõnu, oleme tänu liigi lisamisele prognoosivigade ruutude summat vähendanud 10887,56-393,5=10494,1 võrra. Jagatis 10494,1/10887,56=0,9638615 (prognoosi täpsuse suhteline paranemine) on sama mis determinatsioonikordaja:

```
> summary(mudel)
[...]
Residual standard error: 1.609 on 152 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.9639,     Adjusted R-squared: 0.9624
F-statistic: 675.6 on 6 and 152 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

Loeme sisse *Escherichia coli* andmestiku

```
mydata=read.table("http://www.ms.ut.ee/BDA/m52orfs.txt", header=TRUE)
head(mydata)
attach(mydata)
```

Andmestiku lühikirjeldus on kättesaadav järgmiselt aadressilt:
http://www.ms.ut.ee/BDA/datadesc.pdf

Peamised meid hetkel huvitavad tunnused:
first_codon – geeni esimene koodon
cai – Geeni Koodonikohastumusindeks CAI - see on üsna hästi korrelatsioonis antud valgu ekspressioonitasemega (valgu suhtelise esinemissagedusega) rakkudes
orientation – geeni suund kromosoomil

Regression indikaatortunnustega = ANOVA
Proovime korra läbi, et indikaatortunnust kasutav regressioonanalüüs annab sama tulemuse, mis dispersioonanalüüs. Esmalt teeme siiski ühe teisenduse – mõistlik on kasutada logaritmitud cai väärtuseid, sestap transformeerime esmalt selle tunnuse:

```
lcai=log(cai)
```

Seejärel tekitame indikaatortunnuse
ind=0, kui orientation on "<";
ind=1, kui orientation on ">":

```
ind=1*(orientation==">")
```

Keskmine lcai on veidi erinev eripidi kirjapandud geennide jaoks:

```
by(lcai, orientation, mean)
```

Hindame regressioonmudeli kasutades indikaatortunnust:

```
m1=lm(lcai~ind)
summary(m1)
```

Kas suudad leida mõlema grupi keskmised kasutades vaid summary-käsu poolt antud informatsiooni?

Enamasti ei pea sa indikaatortunnust ise tekitama. Võrdle eelmise käsu poolt tagastatud tulemusi järgmise, dispersioonanalüüsi tulemustega:

```
summary(lm(lcai~factor(orientation)))
```

Antud juhul (2 gruppi) oleks sama vastuseni olnud võimalik jõuda ka t-testi abil:

```
t.test(lcai~orientation, var.equal=TRUE)
```

Harjutus
Vaata järgmist väljundit (teil pole ligipääsu antud tunnustele/andmetele, seega piirduge praegu vaid esitatud analüüsi väljundiga:

```
> summary(lm(Expression~factor(Treatment)))

Call:
lm(formula = Expression ~ factor(Treatment))

Residuals:
     Min       1Q   Median       3Q      Max
-282.241  -63.892   -4.897   64.105  341.040

Coefficients:
                   Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)         5499.83      13.70  401.37   <2e-16 ***
factor(Treatment)B -1479.14      19.38  -76.33   <2e-16 ***
factor(Treatment)C  -490.43      19.38  -25.31   <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 96.89 on 147 degrees of freedom
Multiple R-Squared: 0.9763,     Adjusted R-squared: 0.9759
F-statistic:  3023 on 2 and 147 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

Kasutades esitatud väljatrükki, vastake järgmisele küsimusele:

Milline on

keskmine ekspressioonitase grupi A jaoks: ……

keskmine ekspressioonitase grupi B jaoks: ……

keskmine ekspressioonitase grupi C jaoks: ……

Ülesanne
Uuri, kas *Escherichia coli* puhul on keskmine ekspressioonitase erinev erinevate alguskoodonite puhul. Kasuta selleks ühefaktorilist dispersioonanalüüsi:

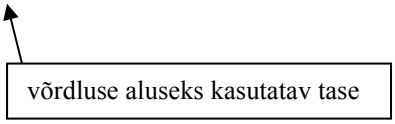
```
model=lm(lcai~factor(first_codon))
summary(model)
```

Milline on sinu otsus? Proovi ka käsku:

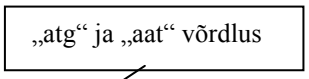
```
drop1(model, test="F")
```

R kasutab vaikimisi alati esimest faktori taset võrdlustasemena:

```
> levels(factor(first_codon))
[1] "aat" "atg" "att" "ctg" "gtg" "ttg"
```



Võrdluse aluseks valitavat taset (referentstaset) saab muuta. Valime alguskoodoni "atg" (kõige sagedamini esinev alguskoodon) võrdlustasemeks:




```
> model=lm(lcai~relevel(factor(first_codon),ref="atg"))
> summary(model)

Residuals:
     Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.33919 -0.18122 -0.01407  0.16331  1.02472

Coefficients:
                                             Estimate Std. Error  t value Pr(>|t|)
(Intercept)                                 -1.131818   0.004803 -235.651  < 2e-16 ***
relevel(factor(first_codon), ref = "atg")aat -0.017910   0.285967   -0.063    0.950
relevel(factor(first_codon), ref = "atg")att  0.134050   0.285967    0.469    0.639
relevel(factor(first_codon), ref = "atg")ctg -0.505684   0.285967   -1.768    0.077 .
relevel(factor(first_codon), ref = "atg")gtg -0.094878   0.012507   -7.586 4.03e-14 ***
relevel(factor(first_codon), ref = "atg")ttg -0.122599   0.025533   -4.802 1.63e-06 ***
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Residual standard error: 0.2859 on 4284 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.01809,    Adjusted R-squared: 0.01694
F-statistic: 15.79 on 5 and 4284 DF,  p-value: 1.960e-15
```

Proovi, mis juhtub, kui kasutad võrdluse aluseks taset "gtg"!

Veel näiteid. Teeme uue grupeeriva tunnuse (näitab, kas geen kodeerib väga aluselist/ aluselist/ happelist väga happelist valku):

```
pIGroup=rep(NA, length(pI))
pIGroup[pI<5.6]="A"
pIGroup[pI>=5.6 & pI<7]="B"
pIGroup[pI>=7 & pI<9]="C"
pIGroup[pI>=9]="D"

table(pIGroup)

summary(lm(lcai~factor(pIGroup)))
```

Katsetame Tukey mitmese võrdluse meetodit (antud kujul eeldab ligikaudu samasuuruseid gruppe):

```
TukeyHSD(aov(lm(lcai~factor(pIGroup))))
plot(TukeyHSD(aov(lm(lcai~factor(pIGroup)))))
```

Võrdle TukeyHSD –käsuga saadud erinevusi (eelkõige gruppide C ja D vaheline erinevus) nendega, mille saad, kui teed dispersioonanalüüsi ja võtad võrdluse aluseks grupi C. Kas hinnang gruppide C ja D keskväärtuste arinevusele tuleb sama? Kas olulisustõenäosus tuleb sama? Kui näed erinevusi, siis põhjenda, millest on erinevus tingitud! Kui kasutaksid Bonferroni korrektsiooni (korrutaksid olulisustõenäosuse läbi kõigi võrdluste arvuga), siis millist olulisustõenäosust näeksid?

Kuna praegu on tegemist selgelt mittetasakaalulise andmestikuga, oleks targem mitmesed võrdlused läbi viia kasutades lisamooduli *multcomp* funktsioone. Selleks esmalt lisame R-le lisamooduli *multcomp* (kasuta menüüd *Packages -> Install Package(s)...*). Peale lisamooduli installeerimist võtame ta kasutusele:

```
library(multcomp)
```

ja kasutame teda (lisandunud on funktsioon glht):

```
fpig= factor(pIGroup)
m1=aov(lm(cai~fpig))
a=glht(m1, linfct=mcp(fpig="Tukey"))
summary(a)
confint(a)
plot(confint(a))
```