

شناسایی زیرگروه‌های استئوسارکوم با پیش آگهی متمایز و درمان طبقه‌بندی شده با استفاده از آنالیزهای مولتی اومیکس

چکیده

استئوسارکوم (OS) یک تومور بدخیم اولیه استخوان است که بیشتر کودکان، نوجوانان و جوانان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در اینجا، ما به طور جامع داده‌های ژنومی، اپی ژنومیک و ترنسکریپتومیکس ۱۲۱ بیمار OS را آنالیز می‌کنیم. جهش‌های سوماتیک در گروه متنوع هستند و تنها TP53 به طور قابل توجهی جهش یافته است. از طریق خوشه‌بندی یکپارچه بدون نظارت داده‌های مولتی اومیکس، ما OS را به چهار زیرگروه با ویژگی‌های مولکولی متمایز و پیش‌آگهی بالینی طبقه‌بندی می‌کنیم: (۱) سیستم ایمنی فعال شده (S-IA)، (۲) سیستم ایمنی سرکوب شده (S-IS)، (۳) کمبود نوترکیبی همولوگ غالب (S-HRD)، و (۴) MYC رانده (S-MD). تقویت MYC با تومورهای مهارتی HR با امضای فسفوریلاسیون اکسیداتیو بالا که منجر به مقاومت در برابر شیمی درمانی نئوآدجوانت می‌شود شناسایی می‌شود. اهداف درمانی بالقوه برای هر زیرگروه، از جمله شیمی درمانی مبتنی بر پلاتین، مهارکننده‌های ایست بازرسی ایمنی، ضد VEGFR، ضد MYC و استراتژی‌های کشنده مصنوعی مبتنی بر PARPi شناسایی می‌شوند. خصوصیات یکپارچه جامع ما منبع ارزشمندی را فراهم می‌کند که درک ما از این بیماری را عمیق تر می‌کند و ممکن است راهبردهای بالینی آینده را برای درمان دقیق OS راهنمایی کند.

مقدمه

سرطان استخوان و مفاصل سومین علت مرگ ناشی از سرطان در میان کودکان، نوجوانان و جوانان است. به عنوان شایع ترین نئوپلازی استخوان، استئوسارکوم



نجمه شجاعی^۱

۱- کارشناسی علوم آزمایشگاهی، دانشگاه کرمان، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس زن

جراحی و گلوبول‌های سفید همسان با توالی‌یابی کل اگزوم (WES) مشخص شدند. ترنسکریپتوم ۹۶ بیمار با تعیین توالی RNA (RNA-seq) مشخص شد. متیلاسیون DNA و پروفایل‌های تعداد کپی از ۱۱۴ بیمار با استفاده از آرایه BeadChip EPIC Illumina Infinium (850 K) تولید شد. علاوه بر این، تغییرات تعداد کپی در ۵۰ بیمار توسط ریزآرایه Affymetrix OncoScan تایید شد. سن تشخیص اولیه بین ۶ تا ۶۷ سال بود و ۶۳ بیمار (۵۲.۱٪) کودکان یا نوجوانان بودند (زیر ۱۸ سال). از این تعداد ۵۸ نفر (۴۷.۹٪) زن و ۶۳ نفر (۵۲.۱٪) مرد بودند. میانگین پیگیری ۳۴.۹ ماه بود و میزان بقای کلی مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۱۲۱ شرکت‌کننده، ۶۱ بیمار (۵۰.۴٪) حوادث متاستاتیک دوردست داشتند، ۳۵ بیمار (۲۸.۹٪) عود موضعی داشتند و ۴۳ بیمار (۳۵.۵٪) در آخرین پیگیری فوت کرده بودند. تأثیر سن، جنس، موقعیت تومور، مرحله Enneking و نوع پاتولوژیک بر پیش‌آگهی بالینی مورد آنالیز قرار گرفت.

چشم انداز جهشی بیماران OS

در مجموع ۱۰۷ تومور و ۱۰۵ نمونه گلوبول سفید همسان از ۱۰۲ بیمار OS تحت WES قرار گرفتند. به طور کلی، ما طیف متنوعی از ژن‌های سرطانی جهش یافته در OS را تعریف کردیم. مقایسه تومور با گلوبول‌های سفید ۶۳۸۱ ژن جهش یافته را شناسایی کرد. تعداد متوسط وریته‌های غیرخاموش در هر نمونه ۳۳ بود که نسبتاً کمتر از پان-سرطان ایجاد شده در TCGA بود. بار جهشی تومور میانه SGH-OS 1.4 (TMB) در هر مگاباز (Mb) بود و تفاوت معنی داری در TMB کلی بین OS نوجوانان، بزرگسالان جوان و سالمندان وجود نداشت. در میان مسیرهای سیگنال دهی مرتبط با سرطان با اهداف درمانی بالقوه، مسیرهای RAS، NOTCH، Hippo، PI3K و WNT، MYC عمدتاً تحت تأثیر قرار گرفتند. علاوه بر این، گروه SGH-OS فرکانس نسبتاً کمتری جهش در TP53، RB1، ATRX، MDM2 و CCNE1 را نسبت به مواردی که قبلاً گزارش شده بود نشان داد، در حالی که میزان شیوع جهش‌های CHD3، GNAS، CIC و H3F3A در گروه ما کمی بالاتر بود. به طور خاص، TP53 (۱۲ تومور، ۱۱.۲٪) به عنوان یک ژن به طور قابل توجهی جهش یافته (SMG) تعیین شده

(OS) که تقریباً ۳۵ درصد از تومورهای بدخیم استخوان اولیه را تشکیل می‌دهد. شیمی درمانی نئوادجوانت و پیشرفت در تکنیک‌های جراحی منجر به بهبود چشمگیر در میزان بقای کلی تا نزدیک به ۷۰٪ شده است. با این حال، پیشرفت بیشتر در بقای ۵ ساله به طور قابل ملاحظه‌ای در طول چهار دهه گذشته بدون تغییر بوده است و رویکردهای درمانی فوری مورد نیاز است.

مطالعات پیشگامانه قبلی در دهه گذشته درک ما را از اساس مولکولی OS گسترش داده است. همانطور که قبلاً گزارش شده بود، اغلب ژن‌های جهش یافته در OS TP53 و RB1 بودند. مناطق متعددی از تغییرات تعداد کپی سوماتیک کشف شده است، از جمله امپیلی فای MYC، CCNE، AKT، و همچنین حذف TP53، RB1 و PTEN. با این حال، آن مطالعات عمدتاً بر روی تک یا دو تکنیک اومیکس متمرکز بودند که دانش محدودی از زیربنای بیولوژیکی یکپارچه این بیماری ارائه می‌کردند. بنابراین داده‌های اومیکس متنوع یکپارچه در ارتباط با اطلاعات بالینی به فوریت مورد نیاز است.

در اینجا، ما گروه بزرگی از ۱۲۱ بیمار OS را از بیمارستان عمومی شانگهای (هم‌گروهی SGH-OS) با استفاده از توالی‌یابی DNA، آنالیز تعداد کپی DNA مبتنی بر آرایه، پروفایل متیلاسیون DNA و توالی‌یابی mRNA ارائه می‌کنیم. از طریق یکپارچه سازی داده‌های مولتی اومیکس، ما یک چشم انداز ژنومیک، اپی ژنومیک و ترنسکریپتومیکس جامع از OS به دست آوردیم و چهار زیرگروه مولکولی متمایز با عوامل انکوژنیک متنوع را کشف کردیم. ما تنوع پیامدهای بالینی و مداخله هدفمند هر زیرگروه را بررسی کردیم. مطالعه ما بینشی در مورد بیولوژی این بیماری و راه‌های بالقوه برای رویکردهای پزشکی دقیق آینده در OS ارائه می‌دهد.

نتایج

ویژگی‌های بالینی و مولکولی گروه SGH-OS

گروه SGH-OS حاوی داده‌های مولکولی و بالینی کل ۱۲۱ بیمار اولیه OS با مرحله انکینگ IIB و III است. همه نمونه‌ها مجدداً توسط دو متخصص پاتولوژیک به صورت جداگانه بر اساس سیستم طبقه بندی سازمان جهانی بهداشت (۲۰۲۰) بررسی و تأیید شدند. به طور خاص، ۱۰۲ بیمار با گونه‌های تومور برداشته شده با

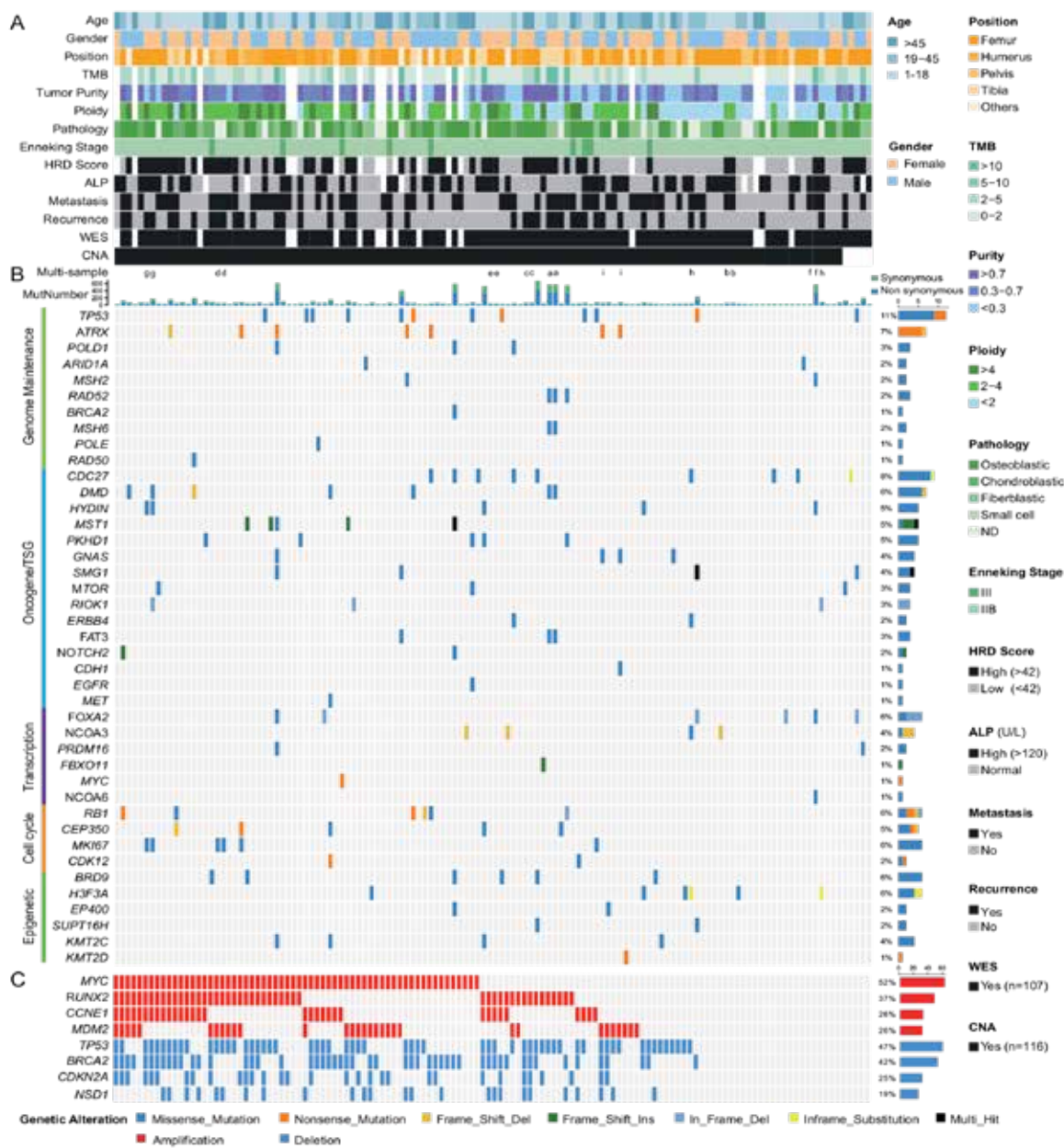
فای تکرارشونده شامل MYC (8q24.13، 52٪)، RUNX2 (6p21.1، 37٪)، PDGFRA (4q12، 35٪)، CCNE1 (19q12، 26٪) و MDM2 (12q15، 26٪) (شکل ۲B). حذف های مکرر شامل سرکوب کننده های کلیدی تومور TP53 (17p13.1، 47٪)، RB1 (13q14.13، 42٪)، NSD1 و CDKN2A/CDKN2B (9p21.3، 25٪) (5q35.2، 19٪) (شکل ۲C). علاوه بر این، CNAها در ۵۰ بیمار با استفاده از یک آرایه OncoScan با وضوح بالا با همان نمونه DNA به موازات آرایه EPIC 850 K اعتبارسنجی شدند و الگوهای مشابهی از SCNA با استفاده از این دو رویکرد مختلف نمایش داده شدند. برای تعیین پیامدهای CNAها بر فراوانی mRNA، ما اثرات cis و trans بین CNA و فراوانی mRNA را بررسی کردیم (شکل ۲D). در مجموع ۱۷۲۴۲ جفت CNA-mRNA با ۲۵۲۲ جفت در cis آنالیز قرار گرفت که همبستگی معنی داری را نشان می دهد ($FDR < 0.01$)، میانه اسپیرمن ($r = 0.40$) (شکل ۲E). آنالیز غنی سازی نشان داد که این ژن ها عمدتاً در تنظیم چرخه سلولی، همانندسازی DNA، تنظیم ترجمه و اصلاح هیستون غنی شده اند (شکل ۲F)، که نشان می دهد این فرآیندهای بیولوژیکی ممکن است تا حد زیادی توسط CNAهای نابجا تنظیم شوند. ما همچنین برجسته ترین CNAها را با اثرات ترانس بر روی کروموزوم های 1q، 8q، 11p، 19q و 2p ذکر کردیم. در میان آنها، 8q، حاوی انکوژن MYC، منطقه عمدتاً تقویت شده بود، که نشان داد تقویت MYC هم اثرات سیس و هم اثرات ترانس تنظیمی بر روی اهداف خود در طول سرطان زایی OS داشت.

حذف تنظیم کننده چرخه سلولی CDKN2A/CDKN2B با پیش آگهی بالینی ضعیف در بیماران همگروه ما همراه بود. از آنجایی که کاهش سطح CDKN2A/CDKN2B منجر به افزایش فعالیت CDK4/cyclin D می شود، این بیماران ممکن است از مهارکننده های CDK4 بهره مند شوند. اوج حذف قابل توجه دیگری در 5q35.2 حاوی NSD1 شایسته کاوش بیشتر است. به عنوان یک دی متیل ترانسفراز NSD1، H3K36، که در ۲۲ مورد از ۱۱۶ مورد از بین رفت، به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور که به طور مکرر در انواع سرطان ها جهش یافته و با هیپومتیلاسیون جهانی DNA مرتبط است، دخیل

توسط الگوریتم های MutSigCV (مقدار $q < 0.01$)، که با مطالعات قبلی سازگار بود، شناسایی شد. ویژگی های بالینی و مشخصات جهش ژن های مربوط به حفظ ژنوم، ژن انکوژن/سرکوبگر تومور (Oncogene/TSG)، چرخه سلولی، تنظیم اپی ژنتیکی و رونویسی در شکل ۱A، B نشان داده شده است. ما ژن های جهش یافته را در SGH-OS با ۳ مجموعه داده ژنی محرک سرطان مقایسه کردیم. این ۲۲ ژن جهش یافته سوماتیک را ایجاد کرد که ممکن است محرک های بالقوه انکوژن در OS باشند. علاوه بر این، ما چندین جهش دیگر از RARA (1.9٪) و KMT2B (2.8٪) در بیماران OS چینی کشف کردیم. ما بیشتر جهش های مولفه گروه SGH-OS را آنالیز کردیم. تفاوت معنی داری در بار کلی جهش مولفه بین OS نوجوانان، بزرگسالان جوان و سالمندان وجود نداشت. آنالیز غنی سازی عملکردی نشان داد که ژن های جهش یافته ژرمین عمدتاً در مسیرهای KEGG مرتبط با متابولیسم غنی شده اند. برای پرداختن به فرآیندهای جهش بالقوه محرک OS، ما فاکتورسازی ماتریس غیرمنفی (NMF) را اعمال کردیم و چهار امضای غالب مشابه امضای COSMIC 1، ۳، ۴ و ۱۵ را شناسایی کردیم. در میان آنها، نقص در ترمیم شکستگی دو رشته ای DNA (DNA-DSB) با نوترکیبی همولوگ (HR) نه تنها سلول های سرطانی را قادر می سازد تا تغییرات ژنومی را که به فنوتیپ تهاجمی آنها کمک می کند جمع آوری کنند، بلکه ممکن است به عنوان یک هدف دارویی امکان درمان های شخصی عمل کند.

شناسایی پیامدهای بالینی برای بیماران OS با آنالیز CNA

در مجموع ۱۱۶ نمونه OS از ۱۱۴ بیمار برای آنالیز تغییر تعداد کپی سوماتیک (SCNA) بر اساس آرایه Illumina Infinium EPIC BeadChip (850 K) استفاده شد (شکل ۲A). آنالیز GISTIC 2.0 از CNAهای مکرر ۳۹ منطقه به طور قابل توجهی آمپلی فای شده و ۵۳ منطقه حذف شده را نشان داد (مقدار $q < 0.25$). افزایش تعداد کپی مکرر با پیامدهای بیولوژیکی بالقوه در کروموزوم های 1q، 4q، 6p، 8q، 12q، 14q و 19q بود و تلفات در کروموزوم های 5p، 9p، 13q و 17p بود. آمپلی



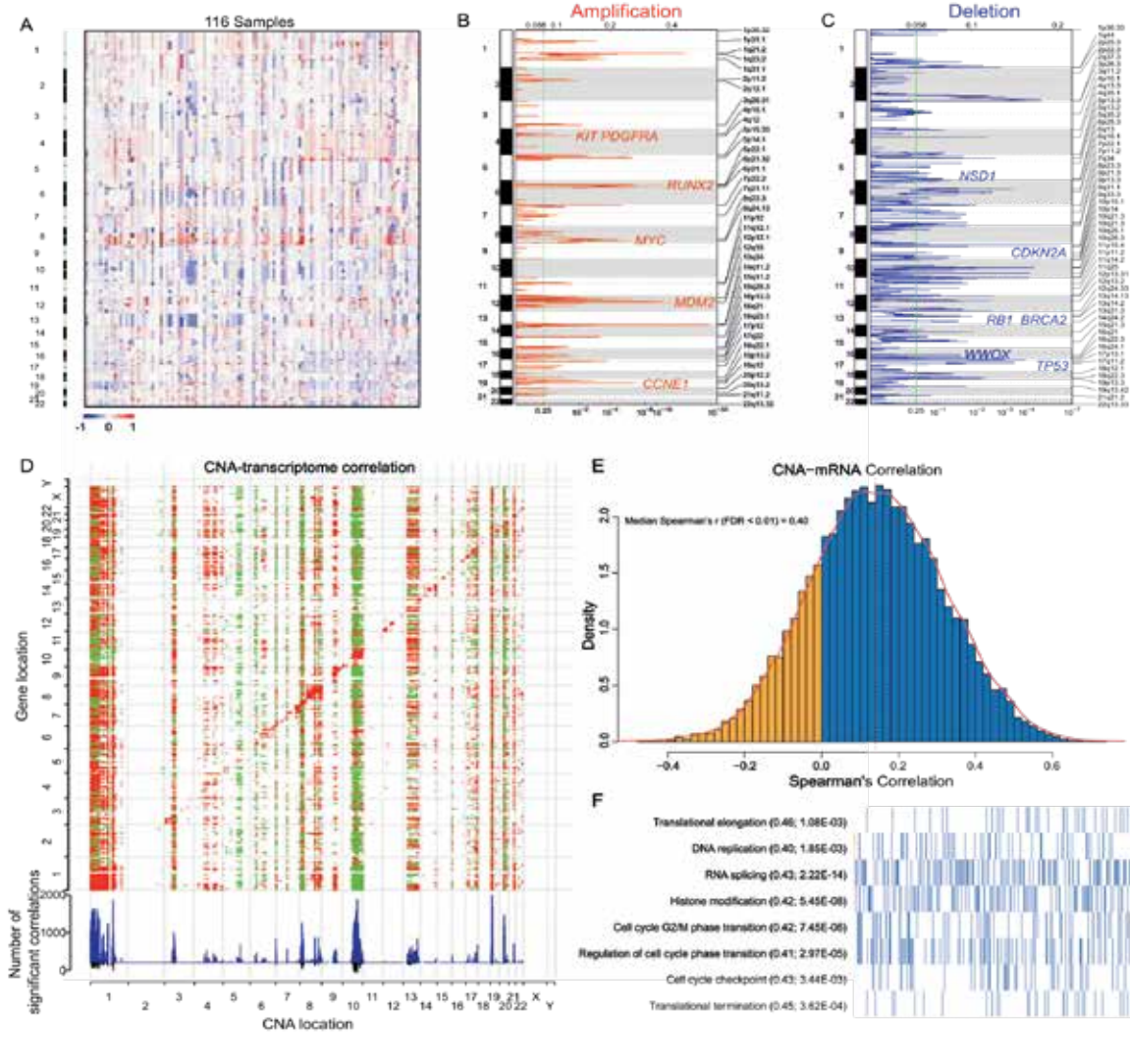
شکل ۱: چشم انداز ژنومی OS:

مشخصات ژنتیکی بیماران گروه SGH. هر ستون مربوط به یک نمونه است (۱۲۸ نمونه با ۹ تکرار نمایش داده می‌شود).

الف) اطلاعات بالینی سن، جنس، موقعیت، متاستاز، عود، طبقه بندی پاتولوژیک، ALP (بالا: بیش از ۱۲۰ U/ml) و مراحل انکینگ بالینی. اطلاعات ژنتیکی شامل TMB، امتیاز HRD (زیاد: ۴۲)، پلوئیدی و خلوص تومور بود.

ب) ژن‌های جهش یافته سوماتیک که با حفظ ژنوم، ژن انکوژن/سرکوبگر تومور (Oncogene/TSG)، چرخه سلولی، تنظیم اپی ژنتیک و رونویسی مرتبط بودند.

ج) ژن‌های مرتبط با سرطان در پیک‌های قابل توجه CNA شناسایی شده توسط GISTIC 2.0 با مقدار $q < 0.25$ قرار دارند. تعداد و درصد جهش‌ها و CNA برای هر یک از ژن‌ها در سمت راست نشان داده شده است.



تصویر ۲. دگرگونی تعداد کپی پروایل OS

(الف) هیئت مپ از CNAهای ۱۱۶ نمونه تومور OS. قرمز و آبی به ترتیب نشان دهنده افزایش و از دست دادن تعداد کپی هستند. محور ۱۱۶ x نمونه تومور را نشان می‌دهد.

(ب) ایمپلی فای کانونی تکرارشونده در سطح ژنوم با مقادیر q FDR 2.0 GISTIC در پایین. قله‌ها با انکوژن‌های محرک کاندید با رنگ قرمز تفسیر شدند.

(ج) حذف‌های کانونی مکرر در سراسر ژنوم با مقادیر q FDR 2.0 GISTIC در پایین. سرکوبگرهای تومور راننده کاندید در پیک‌های حذف با رنگ آبی برجسته گذاری شده اند.

(د) ارتباط CNAها با بیان mRNA با اثرات سیس و ترانس. همبستگی مثبت (قرمز) و منفی (سبز) (به "روش‌ها" $FDR < 0.01$ ، همبستگی Spearman) بین CNA و mRNA در پانل بالا نشان داده شده است. محور X و محور Y بر اساس مکان کروموزومی مرتب می‌شوند. نوارهای آبی در پانل پایین تعداد همبستگی‌های معنی‌دار خاص را نشان می‌دهند، در حالی که نوارهای سیاه تعداد همبستگی‌های معنی‌دار رایج را نشان می‌دهند.

(ه) توزیع همبستگی اسپیرمن بین CNA و mRNA. CNA و mRNA برای اکثر جفت‌های (۷۸.۹% CNA-mRNA) همبستگی مثبت داشتند. ضریب همبستگی میانگین اسپیرمن 0.40 ($FDR < 0.01$) بود.

(و) توابع غنی شده قابل توجهی از ژن‌ها با همبستگی قابل توجه بین CNA و mRNA. ضریب همبستگی میانه در پرانتز نشان داده شده است و به دنبال آن مقدار P تنظیم شده توسط FDR نشان داده شده است. ژن‌ها در هر آیتم (نوارهای روی محور X) با ضرایب همبستگی از کم به زیاد طبقه‌بندی شدند که آبی و زرد به ترتیب نشان‌دهنده همبستگی مثبت و منفی بودند.

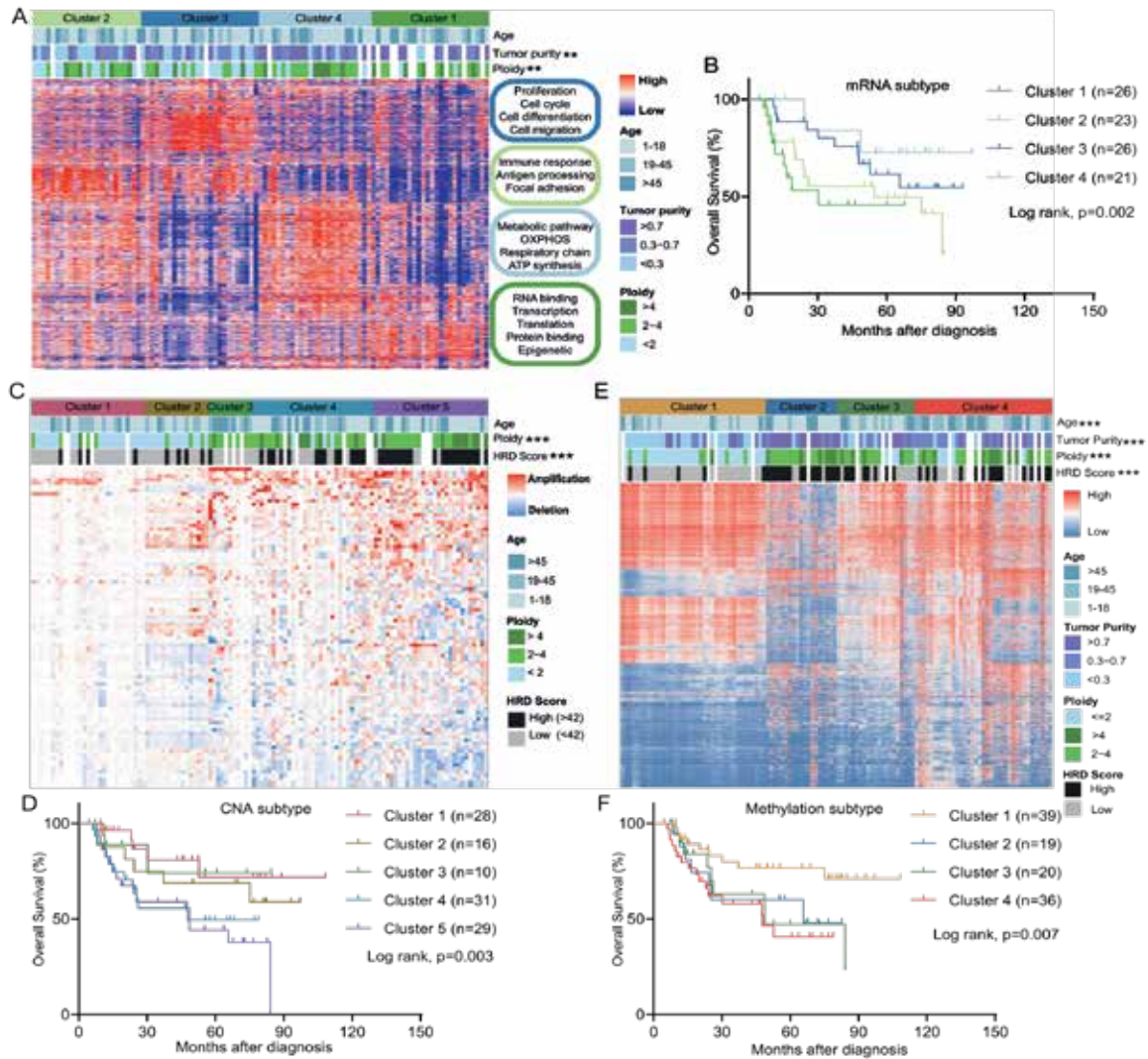
گرفت (شکل ۳D). کلاستر ۱ تقریباً فاقد CNA های قابل توجه بود، که دارای خلوص تومور و آنپلوئیدی کمتری بود که مربوط به فعال شدن سیستم ایمنی و پیش آگهی بالینی مطلوب بود. مشابه CNA Cluster 2، عمدتاً از تومورهای با خلوص پایین تشکیل شده است که با 1q31.1 فراوانتر، 3q36.1 (BCHE)، 5p14.1 (PRDM9)، 11p12 (API5) و 21q11.2 (RBM11، LIPI) تقویت و پیش آگهی بالینی نسبتاً بدتر داشت. CNA خوشه ۳ تقویت کروموزوم ۱۲ (شامل جایگاههای MDM2 و CDK4) را به شیوه‌ای که تا حد زیادی با حذف CDKN2A همراه بود نشان داد. از آنجایی که حذف CDKN2A/CDK4/CDK6 را فعال می‌کند و منجر به فسفوریلاسیون RB بالاتر و پیشرفت چرخه سلولی می‌شود، مهارکننده‌های CDK4/6 ممکن است یک گزینه درمانی برای بیماران CNA خوشه ۳ باشند. CNA خوشه ۴ و خوشه ۵ بیشترین بار CNA و بدترین پیش آگهی بالینی را به نمایش گذاشتند که شامل حذف TP53 و BRCA2 بود. این نشان دهنده نقص نگهداری DNA در بیمارانی است که ممکن است به عوامل آسیب‌رسان به DNA پاسخ دهند. خوشه‌بندی بدون نظارت OS با استفاده از ۸۰۰۰ متغیرترین جایگاه CpG که در حداقل ۵ درصد تومورها هیپرمتیله شده بودند، ۴ خوشه را شناسایی کرد. خلوص تومور، پلوئیدی و امتیاز HRD در زیرگروه‌های مختلف متیلاسیون DNA به طور قابل توجهی متفاوت بود (آزمون کروسکال-والیس، $p < 0.001$) (شکل ۳E). بقای کلی بین هر خوشه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (شکل ۳F). مورد علاقه خاص بیماران خوشه ۱ متیلاسیون بود، با بیماران جوان بیشتری که بهترین پیش آگهی بالینی را داشتند، در حالی که بیماران مسن مبتلا به OS در خوشه ۴ متیلاسیون غنی تر بودند، با بقای ضعیف. ارتباط بین متیلاسیون DNA و بیان ژن مورد بررسی قرار گرفت. این ژن‌ها بیان mRNA را کاهش دادند که با هیپرمتیلاسیون پروموتور همبستگی منفی داشت. آنالیز مولتی اومیکس یکپارچه، زیرگروه‌های OS مرتبط بالینی را طبقه بندی می‌کند. کسب علائم سرطان مستلزم تغییرات مولکولی نه تنها در سطح رونوشت

است. ما سطح بیان NSD1 را در یک ریزآرایه بافتی فردی حاوی ۴۹ مورد OS و بیماران حذف NSD1 در گروه SGH-OS با ایمونوهیستوشیمی شناسایی کردیم. نتایج تایید کرد که سطح بیان NSD1 در OS با اصلاح H3K36me2 همبستگی مثبت داشت. علاوه بر این، سطح بیان سیگنال‌های NSD1 و H3K36me2 در بیماران حذف NSD1 غیرقابل تشخیص بود. بنابراین، ما استدلال کردیم که تغییرات اپی ژنتیکی ناشی از حذف NSD1 ممکن است در انکوژن OS دخیل باشد.

گروه‌بندی بیماران با ابعاد مولکولی مختلف

ما زیرتایپ مولکولی را با استفاده از هر مجموعه داده اومیکس جداگانه بررسی کردیم. خوشه‌بندی اجماع نظارت‌نشده بر اساس ۱۰ درصد ژن‌های کدگذاری با بیشترین متغیر بیان شده برای شناسایی زیرشاخه‌های رونویسی OS استفاده شد. بر اساس نقطه "آرنج" در تغییر نسبی در ناحیه زیر منحنی تابع توزیع اجماع (CDF)، ما ۱۰۱ تومور را در ۴ خوشه مجزا طبقه بندی کردیم. این چهار خوشه شامل موارد زیر بود: (۱) خوشه mRNA 1 با بیان بیش از حد ژن‌های مربوط به رونویسی و ترجمه مشخص شد. (۲) خوشه mRNA 2 با بالاترین سطح پاسخ ایمنی تطبیقی و بیان ژن مربوط به مسیر سیگنالینگ ایمنی تحت سلطه بود. (۳) خوشه mRNA 3 فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ TGF- β و مسیرهای پایین دست PI3K/AKT و MAPK را نشان می‌دهد. و (۴) خوشه mRNA 4 حاوی امضای ژن‌های دخیل در انتقال انرژی میتوکندری و فعالیت سنتاز ATP بود (شکل ۳A). اهداف نامزد شناسایی شده در هر خوشه، کاربردهای بالقوه درمان‌های دقیق مبتنی بر بیومارکرها را نشان می‌دهد. علاوه بر این، خوشه‌های رونویسی به طور قابل توجهی در پیش آگهی بالینی متفاوت بودند (رتبه ورود، $p = 0.002$) (شکل ۳B).

CNAها نه تنها به عنوان "محرک" برای افزایش رشد سلول‌های تومور عمل می‌کنند، بلکه ویژگی‌های بیولوژیکی ذاتی تومورها را نیز منعکس می‌کنند. تجزیه و تحلیل خوشه‌بندی سلسله مراتبی بدون نظارت CNAها پنج خوشه با امتیازات پلوئیدی و HRD متنوع به دست آورد (شکل ۳C)، و ارزش پیش آگهی بالقوه استراتژی‌های زیرگروه CNA مورد بررسی قرار



شکل ۳: ویژگی های تک پلت فرم و پیش آگهی بالینی مربوطه.

الف) خوشه بندی رونویسی بر اساس ۱۰ درصد ژن های متغیر برتر (۱۸۲۰) در ۱۰۱ نمونه. هر ستون نشان دهنده یک نمونه و ردیفها زن ها را نشان می دهد. منحنی های Kaplan-Meier برای بقای کلی بر اساس خوشه های رونویسی (آزمون log-rank).

ج) خوشه بندی اعداد کپی بر اساس SCNA های شناسایی شده توسط GISTIC 2.0 در ۱۱۶ نمونه. هر ستون یک نمونه را نشان می دهد و ردیفها پیک های CNA را نشان می دهند. منحنی های Kaplan-Meier برای بقای کلی بر اساس خوشه های CNA (تست log-rank).

ه) خوشه بندی متیلاسیون DNA بر اساس ۸۰۰۰ سایت برتر CpG متیله شده در ۱۱۶ نمونه. هر ستون نشان دهنده یک نمونه و سطرها نشان دهنده سایت های CpG است. (و) منحنی های Kaplan-Meier برای بقای کلی بر اساس خوشه های متیلاسیون DNA (تست log-rank). ستاره ها سطوح معنی داری را تعریف می کنند (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

بالتری نسبت به iCluster1 داشت. GSEA فعال شدن مسیرهای مرتبط با متابولیسم چربی و اسیدهای چرب را در iCluster1 در مقایسه با iCluster2 نشان داد. این با تقویت کانونی جایگاه 7q21.12 در iCluster1 مطابقت دارد که گیرنده روئنده اسید چرب CD36 را کد می‌کند. علاوه بر این، مسیرهای مرتبط با چرخه سلولی، از جمله اهداف E2F و ایست بازرسی G2/M، در iCluster1 کاهش یافت.

iCluster 3-4 به احتمال زیاد توسط سیگنال دهی پرولیفراتیو شامل چرخه سلولی، MYC، mTOR و مسیرهای Hedgehog هدایت می‌شد که نشان دهنده پتانسیل تکثیر بالای این دو زیرگروه است. iCluster3 (n = 23) با بالاترین خلوص تومور و بی ثباتی ژنومی مشخص شد. تومورهای این زیرگروه شامل بیشتر تومورهای خوشه ۲ متیلاسیون DNA و خوشه ۵ CNA با کمترین پاسخ ایمنی بودند. این زیرگروه همچنین با حذف NSD1 و بیان بیش از حد ژن‌های پرولیفراتیو مانند CHAF1B و CCL28، HUNK، ZFH34، GRHL3 همراه بود.

iCluster 4 (n = 21) به عنوان بدخیم ترین زیرگروه با میزان بقای ۵ ساله کمتر از ۴۰٪ شناسایی شد. متیلاسیون خوشه ۴ به شدت در این زیرگروه غنی شد. ویژگی‌های برجسته این زیرگروه تقویت MYC، فعال سازی مسیر سیگنالینگ mTOR و پاسخ‌های ایمنی پایین بود. GSEA فعال شدن اهداف MYC را در iCluster4 در مقایسه با سایرین نشان داد.

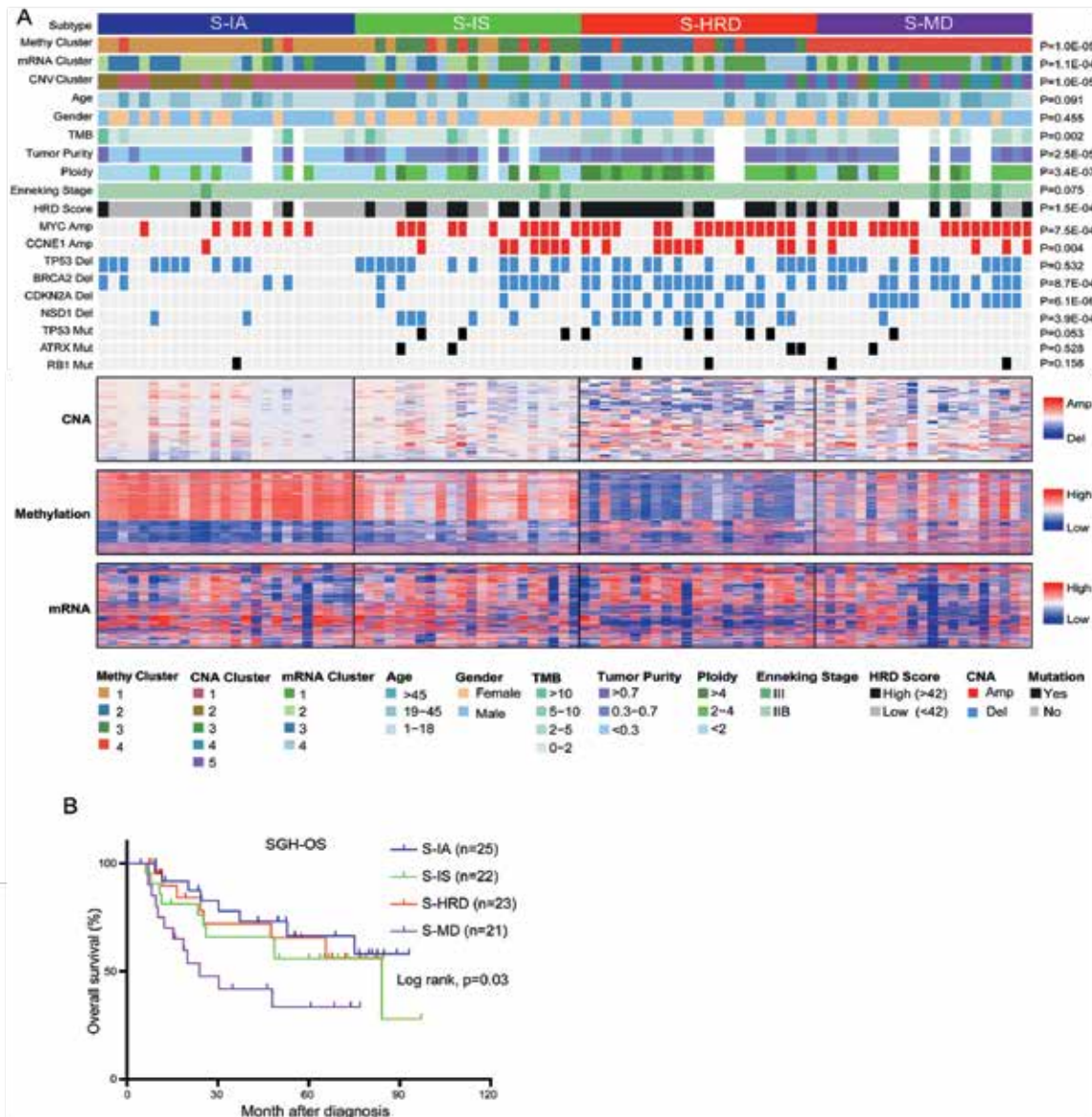
ما ارتباط بالینی زیرگروه بندی یکپارچه را بیشتر آزمایش کردیم و نتایج نشان داد که چهار زیرگروه به طور قابل توجهی در پیش آگهی بالینی متفاوت هستند (رتبه ورود، $p = 0.03$ ، شکل ۴B). پس از طبقه بندی بیماران بر اساس مرحله Enneking، زیرگروه‌های یکپارچه هنوز هم به شدت با پیش آگهی بیمار در بیماران مرحله IIB Enneking همبستگی داشتند و از قدرت پیش آگهی برتر ویژگی‌های مولکولی در زیرگروه‌های مولکولی یکپارچه ما حمایت می‌کردند.

بلکه در سطوح متعدد دیگر از جمله ژنوم و اپی ژنوم است. برای تعیین داده‌های مولتی اومیکس در زیرتایپ کردن OS، iCluster، یک الگوریتم رگرسیون چند متغیره مشترک، برای تطبیق و خوشه‌بندی این داده‌های متفاوت از چندین پلتفرم به طور همزمان استفاده شد. این خوشه بندی یکپارچه بدون نظارت در نهایت چهار زیرگروه مجزا را در ۹۱ بیمار تعریف کرد (شکل ۴A).

اکثر خوشه‌های پلتفرم واحد ترجیحاً در یکی از چهار iCluster یکپارچه با $p < 0.01$ متمرکز شده‌اند و این اطمینان را ایجاد می‌کند که استراتژی‌های زیرتایپ یکپارچه ویژگی‌های اصلی هر پلتفرم را به تصویر می‌کشند (شکل ۴A). مطابق با شکل ۴A، GSEA یک نمونه بیشتر ویژگی‌های مولکولی متمایز را در میان چهار زیرگروه نشان داد. جهش‌های سوماتیکی خاص و تغییرات تعداد کپی نیز مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس ویژگی‌های مولکولی شرح داده شده در زیر، ما این چهار خوشه را به عنوان زیرگروه فعال شده با ایمنی (S-IA، iCluster1)، زیرگروه سرکوب شده با سیستم ایمنی (S-IS، iCluster2)، زیرگروه غالب HRD (S-HRD، iCluster3) و نوع فرعی هدایت شده (S-MD، iCluster4) تعیین کردیم.

iCluster1 (n = 25) با کمترین خلوص تومور، فعالیت‌های تکثیر و پاسخ‌های ایمنی بالا مشخص شد (شکل ۴A) متیلاسیون DNA خوشه ۱ و CNA خوشه ۲-۱ با پیش آگهی مطلوب عمدتاً در این زیرگروه غنی شدند. زیرگروه iCluster1 فرکانس‌های پایین MYC، تقویت CCNE1 و حذف CDKN2A را نشان داد. تومورهای iCluster1 همچنین تغییرات خاصی در بیان mRNA داشتند، از جمله بیان بیش از حد BANK1، یک تنظیم کننده مهم که به عنوان یک سرکوب کننده تومور درگیر در هر دو ایمنی هومورال با واسطه سلول B و ایمنی سلولی عمل می‌کند. علاوه بر این، سطح بیان فاکتور رونویسی استخوان‌ساز هسته RUNX2 در میان زیرگروه‌های مختلف به طور معنی‌داری متفاوت بود، با کمترین بیان در S-IA، که نشان می‌دهد OS فعال شده با ایمنی فعالیت استخوان‌زایی نسبتاً پایین‌تری دارد.

iCluster2 (n = 22) خلوص تومور و آنیوپلوئیدی نسبتاً



شکل ۴: زیرگروه‌های یکپارچه با ویژگی‌های مولکولی متمایز و پیش‌آگهی بالینی متنوع.

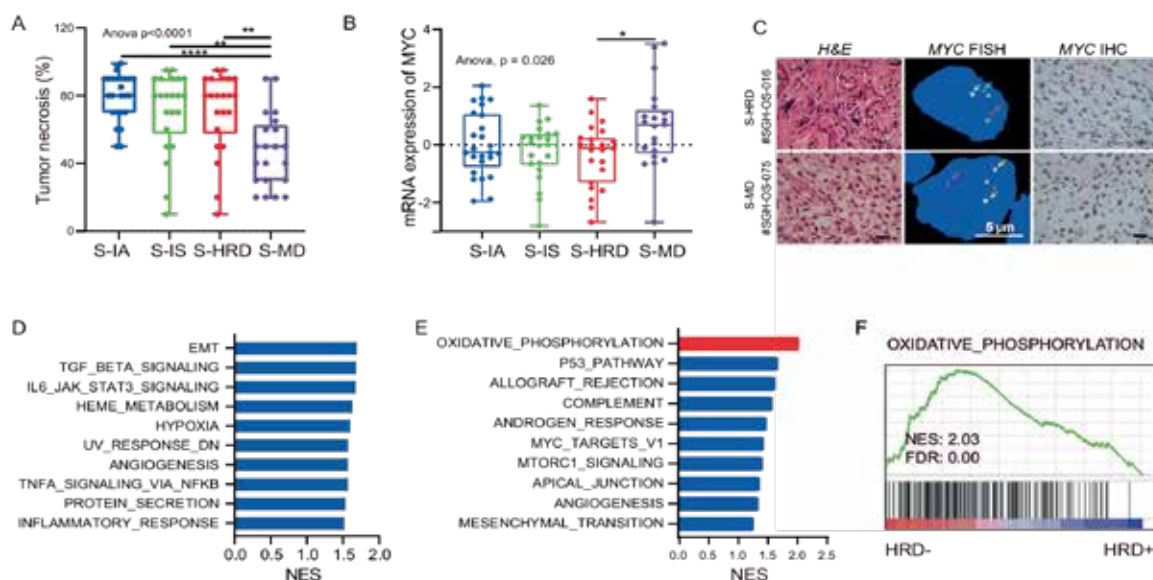
الف) خوشه بندی یکپارچه از ۹۱ بیمار. بالا، چپ به راست: زیرگروه فعال شده با سیستم ایمنی (S-IA iCluster1)، نوع فرعی سرکوب شده سیستم ایمنی (S-IS iCluster2)، نوع فرعی غالب (S-HRD iCluster3) و زیرگروه مبتنی بر MYC (S-MD iCluster4). نتایج خوشه‌بندی تک پلت فرم: خوشه متیلاسیون DNA، خوشه mRNA و خوشه CNA. ویژگی‌های بالینی اولیه: سن، جنسیت و مرحله انکینگ. تغییرات ژنتیکی: خلوص تومور، پلوئیدی، امتیاز HRD، جهش‌های سوماتیک و CNA. پایین، نقشه‌های حرارتی سازماندهی شده توسط خوشه بندی یکپارچه برای تعداد کپی، متیلاسیون DNA و بیان mRNA. منحنی‌های Kaplan-Meier B برای بقای کلی بر اساس زیرگروه‌های یکپارچه (آزمون log-rank).

نسبتاً ضعیف می‌شود، ما پروفایل‌های رونویسی را بین تومورها با یا بدون تقویت MYC مقایسه کردیم. این نشان داد که مسیرهای انتقال اپیتلیال-مزانشیمی، JAK/STAT3 و TGF- β در OS تقویت شده با MYC تنظیم مثبتی داشتند (شکل 5D). این یافته‌ها بیشتر از نقش حیاتی تقویت MYC در فنوتیپ بدخیم OS پشتیبانی می‌کنند.

با تقسیم بیماران OS تقویت کننده MYC به دو گروه بر اساس امتیاز HRD، مشاهده کردیم که پیش آگهی بالینی تقویت MYC با مهارت HR به طور قابل توجهی بدتر از کمبود HR بود. GSEA نشان داد که OS تقویت شده با MYC با مهارت HR در مقایسه با کمبود منابع انسانی، فعال سازی OXPPOS قابل توجهی را نشان می‌دهد (شکل 5E، F). این یافته‌ها نشان داد که OXPPOS مرتبط با میتوکندری با پیش آگهی نامطلوب همراه بود، که ممکن است با مقاومت شیمیایی CDDP مرتبط باشد.

امپلی فای MYC با مهارت HR با فعال سازی OXPPOS و پیش آگهی ضعیف همراه بود

ما تشخیص دادیم که بیماران در زیرگروه S-MD کمترین میزان نکروز تومور مربوط به بدترین پیش آگهی بالینی را نشان می‌دهند (شکل 5A). مهمتر از همه، سطح بیان MYC در S-MD به طور قابل توجهی بالاتر از S-HRD بود (آزمون $t, p < 0.05$ ، شکل 5B). این یافته‌ها بیشتر تأیید شد، که نشان می‌دهد که MYC عمدتاً در هسته سلول‌های تومور در مقایسه با سلول‌های استرومایی بیان می‌شود (شکل 5C). تفاوت بین بیان MYC می‌تواند تا حدی به بیان بیش از حد Hunk در S-HRD نسبت داده شود که برای بیان MYC مهار می‌شود. ما حدس زدیم که رفتار بیولوژیکی بدخیم ناشی از بیان بیش از حد MYC علت اصلی پیش آگهی ضعیف S-MD است. با توجه به اینکه تقویت MYC یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های ژنتیکی در OS است که منجر به پیش آگهی



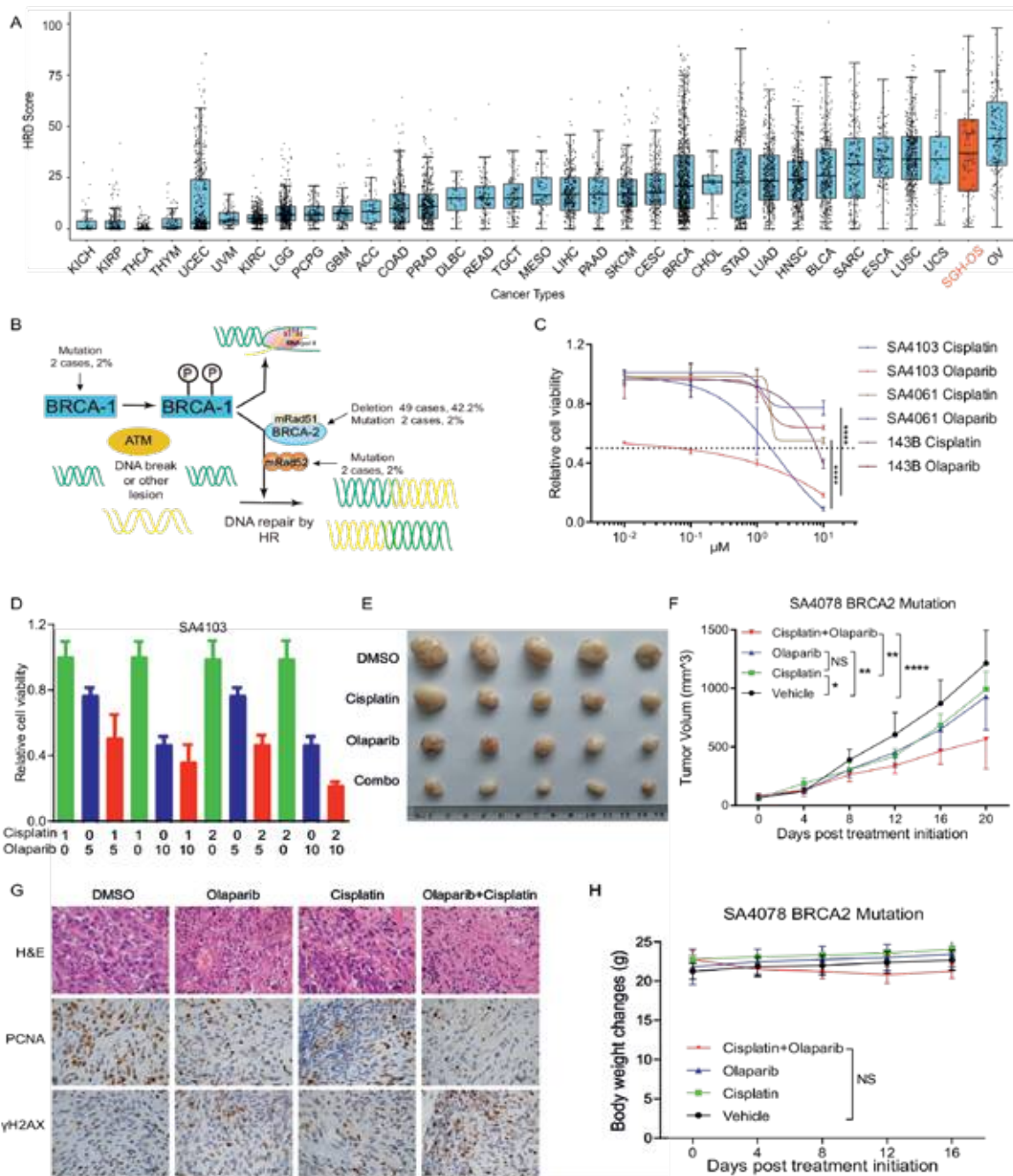
شکل 5: امپلی فای MYC با مهارت HR با فعال سازی OXPPOS و پیش آگهی ضعیف همراه بود.

(الف) مقایسه میزان نکروز تومور در میان زیرگروه‌های یکپارچه آنالیز آماری با استفاده از آنالیز واریانس با آزمون مقایسه چندگانه توکی انجام شد.

(ب) سطح بیان ژن MYC در هر زیرگروه. آزمون Student t در آنالیز تفاوت معنادار بین S-HRD و S-MD به کار گرفته شد.

(ج) بازآرایی MYC توسط FISH و سطح بیان پروتئین MYC با IHC اندازه‌گیری شد. ۳ بار به طور مستقل تکرار می‌شود. D GSEA بین OS تقویت شده با MYC و OS تقویت نشده

MYC. E, F GSEA بین مهارت منابع انسانی تقویت شده با MYC و OS کمبود منابع انسانی تقویت شده با MYC.



شکل ۷: کشندگی مصنوعی اولاپاریب به همراه سیس پلاتین در OS HRD مثبت در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی.

الف) توزیع نمرات HRD در داخل و بین ۳۴ نوع سرطان. گروه SGH-OS دارای برچسب (نارنجی، $n=107$ است). ب) مدل شماتیک منابع انسانی و تغییرات ژنومی در عناصر کلیدی. منحنی‌های پاسخ دوز C و مقادیر IC50 سلولی HRD مثبت (SA4103) منفی (SA4061) و رده‌های سلولی معمولی OS پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض سیس پلاتین و مهارکننده PARP اولاپاریب. $p < 0.0001$ ***. داده‌ها به صورت میانگین \pm SD نشان داده می‌شوند. $n=3$ آزمایش مستقل. مقادیر P از آزمون t دو طرفه به دست می‌آید. D کشندگی مصنوعی اولاپاریب به علاوه سیس پلاتین در رده سلولی SA4103. داده‌ها به صورت میانگین \pm SD نشان داده می‌شوند. $n=3$ آزمایش مستقل. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس با آزمون مقایسه چندگانه توکی انجام شد. نمونه ناخالص تومور (E) و منحنی‌های رشد تومور (F) در مدل پیوند زونوگرافت بیمار با اولاپاریب و سیس پلاتین به صورت جداگانه یا ترکیبی درمان شده‌اند. ($n=5$ موش در هر گروه). داده‌ها به عنوان میانگین \pm SD نشان داده می‌شوند. مقادیر P از ANOVA دو طرفه مشتق شده اند. $p < 0.05$; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. H&E و آنالیز ایمنووهیستوشیمی تکثیر (PCNA) و آسیب (γH2AX) DNA در زونوگرافت. نوار مقیاس نشان دهنده ۵۰ μM است. $n=5$ آزمایش مستقل. H تغییرات وزن بدن زونوگرافت تحت درمان با اولاپاریب و سیس پلاتین به صورت جداگانه یا ترکیبی. داده‌ها به عنوان میانگین \pm SD نشان داده می‌شوند. مقادیر P از ANOVA دو طرفه به دست می‌آیند.

چشم انداز ایمنی OS

با پیشرفت سریع در ژنومیک، درمان OS، به ویژه برای بیماران عود کننده و متاستاتیک، از شیمی درمانی معمولی به سمت استراتژی های مبتنی بر ایمنی تغییر یافته است. بر این اساس، ما ریزمحیط ایمنی در OS را مشخص کردیم.

پاسخ های ایمنی در iCluster 1-2 بیشتر از iCluster 3-4 بود. iCluster 1-2 در مسیرهای سیگنالینگ اینترفرون آلفا، اینترفرون گاما، التهاب، IL-17، CTLA-4 و سایر مسیرهای مرتبط با پاسخ ایمنی بالا بود. برای بررسی بیشتر ریزمحیط ایمنی OS، ما سطوح بیان ژن ۷۲ مارکر سطح ایمنی را بررسی کردیم که جمعیت های مختلف سلول های ایمنی را در هر زیرگروه شامل می شوند. مطابق با شکل تکمیلی ۶B، iCluster 1-2 بیان بالاتری از مارکرهای ایمنی مربوط به واکنش های ایمنی را نسبت به iCluster 3-4 نشان داد (شکل ۶A). مطابق با این یافته ها، نمرات ایمنی و استروما در iCluster 1-2 نسبتاً بالاتر بود (شکل ۶B).

ما در مرحله بعد درصد نسبی ۲۲ نوع سلول ایمنی نفوذگر تومور (TIIC) را با استفاده از الگوریتم شناسایی نوع سلولی با تخمین زیرمجموعه های نسبی رونوشت های RNA (CIBERSORT) همانطور که قبلاً گزارش شده بود، تخمین زدیم. تفاوت های قابل توجهی در سلول های CD4+ T، ماکروفاژهای نوع ۲، سلول های CD4 T ساده و سلول های CD4 T حافظه در حال استراحت بین iCluster 1-2 و iCluster 3-4 مشاهده شد (آزمون Kruskal-Wallis، $p < 0.05$). ایمونوهیستوشیمی همچنین تأیید کرد که نشانگرهای مرتبط با ایمنی، از جمله CD4، CD8، IDO1، FOXP3 و PD-L1، در سطوح نسبتاً بالاتری در iCluster 1-2 بیان شده اند (شکل ۶C). علاوه بر این، ما به کاهش قابل توجه سلول های گاما دلتا T و افزایش مونوسیت ها در iCluster 1 در مقایسه با iCluster 2 اشاره کردیم (تست مجموع رتبه $p < 0.05$ Wilcoxon) که نشان دهنده تغییر حالت ایمنی از فعال سازی به سرکوب است.

گیرنده سلول (TCR) T، که توسط متغیرترین ناحیه تعیین کننده مکملیت (CDR3) 3 منعکس می شود، نقشی حیاتی در شناسایی آنتی ژن دارد. برای بررسی کلون های سلول T واکنش دهنده به تومور، مجموعه

سلول های T نفوذگر تومور استنباط شده توسط TRUST47 را مشخص کردیم. به طور قابل توجهی، اگرچه iCluster 1-2 هر دو پاسخ های ایمنی قوی تری را نشان دادند، ما به طور غیرمنتظره دریافتیم که تعداد تماس های CDR3 در iCluster 1 به طور قابل توجهی بیشتر از iCluster 2 بود (تست مجموع رتبه Wilcoxon، $p < 0.05$ ، شکل ۶D). در مجموع، این نتایج نشان داد که تومورها در iCluster 1 با سیستم ایمنی فعال می شوند (S-IA)، در حالی که تومورهای iCluster 2 سرکوب کننده ایمنی یا خسته (S-IS) بودند.

برای توصیف بیشتر حالت های ایمنی داخل توموری، ما زیرگروه های ایمنی را که قبلاً برای هر بیمار OS تعریف شده بود، استنباط کردیم. دسته های ایمنی تا حد زیادی در iCluster های مختلف متفاوت بود (شکل ۶E). iCluster 1 سرشار از زیرگروه ایمنی C3 (التهاب) بود که با سطح پایین تکثیر سلولی و بهترین پیش آگهی تعریف می شد. C2 (IFN- γ) غالب، با نرخ تکثیر سلولی بالا و بالاترین M1، بیشتر در iCluster 2 غنی شد. علاوه بر این، iCluster 2 دارای C3 (التهابی) کمتر و C6 بیشتر (غلبه TGF- β) بود که با هم منجر به نتایج بدتر از iCluster 1 شد. iCluster 3 و iCluster 4 در درجه اول تحت سلطه C4 (تخلیه لنفوسیت) بودند، که بیشتر نشان می دهد که این دو زیرگروه به تومورهای سرد تعلق دارند، و این یافته ها با پیش آگهی بالینی هر زیرگروه مطابقت داشت (شکل ۶B و ۶E).

گروه بندی استراتژی های درمانی هدفمند

وضعیت HRD بهبود قابل توجهی را نسبت به متغیرهای بالینی در شناسایی تومورها با افزایش احتمال پاسخ به درمان نئوادجوانت مبتنی بر پلاتین ارائه می دهد. با مقایسه امتیاز HRD OS با داده های پان سرطان منتشر شده در گروه TCGA49، متوجه شدیم که امتیاز HRD OS تنها بعد از سرطان تخمدان در رتبه دوم قرار دارد (شکل ۷A)، که نشان می دهد درمان هدف گیری PARP ممکن است یک استراتژی امیدوارکننده در OS باشد. علاوه بر این، همانطور که در بالا توضیح داده شد، نزدیک به ۸۰٪ از بیماران در HRD iCluster 3 مثبت بودند. این بیماران ممکن است به شیمی درمانی نئوادجوانت مبتنی بر پلاتین حساس تر باشند، که می تواند دلیل اصلی

جای جهش‌های سوماتیک ممکن است مکانیسم غالب در انکوژنز و توسعه OS باشند. از بین آنها، تقویت MYC برجسته‌ترین CNA کانونی تغییر یافته بود. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که به نظر می‌رسد انکوژن MYC با ایجاد محیطی از امتیاز ایمنی برای خود تومورها، نقشی در ایمنی‌زایی بازی می‌کند، و درمان هدفمند MYC باعث ایجاد ایمنی‌زایی سلول تومور در تحریک ایمنی می‌زبان می‌شود. این ممکن است دلیل مهمی برای شکست آزمایش‌های بالینی ایمونوتراپی قبلی برای OS باشد. سایر CNAهای مهم درگیر در چندین ژن بالقوه قابل عمل، مانند MDM2، PDGFRA، CCNE1، CDK4 و CDKN2A/B، برای تعیین پتانسیل درمانی خود نیاز به کاوش بیشتری دارند.

هر دو خوشه بندی پلت فرم خاص و ادغام شده برای شناسایی زیرگروه‌های مولکولی OS انجام شد. ما ادغام اطلاعات مولتی اومیکس را برای دستیابی به زیر تایپ جامع تر اتخاذ کردیم. با کمال تعجب، ما ۴ زیرگروه قوی مرتبط با پیش آگهی بالینی متنوع و ویژگی‌های مولکولی متمایز را کشف کردیم. نکته قابل توجه، نه تنها ویژگی‌های ژنومی با پیش آگهی بالینی مطابقت داشت، بلکه تطابق قوی در انتساب‌های زیرگروه بین خوشه‌بندی بر اساس پلتفرم‌های فردی و iCluster وجود داشت. ما همچنین اهداف درمانی بالقوه را نشان دادیم که در پاتوژنز OS نقش دارند و استراتژی‌های درمانی مربوطه را ارائه کردیم.

iCluster 1-2 با مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با ایمنی بالا مشخص شد. قابل ذکر است که مسیر سیگنالینگ VEGFA در این دو زیر گروه فعال شد. چالش اصلی در درمان ایمنی استفاده از مهارکننده‌های ایمن بازرسی (ICIs) برای تومورهای غیر ملتهب و غلبه بر مقاومت دارویی ناشی از ریزمحیط سرکوب‌کننده سیستم ایمنی بود. VEGF با سرکوب مستقیم سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APCs) و همچنین سلول‌های مؤثر ایمنی یا با افزایش اثرات سلول‌های T تنظیمی (Treg) و ماکروفاژهای مرتبط با تومور (TAMs) منجر به سرکوب سیستم ایمنی می‌شود. این سلول‌های ایمنی سرکوب‌کننده همچنین می‌توانند باعث رگزایی شوند و چرخه معیوبی از اختلال در فعال‌سازی ایمنی ایجاد کنند. ترکیبی از ICIs و درمان ضد VEGF وارد کلینیک

تفاوت در پیش آگهی بالینی بین iCluster3 و iCluster4 باشد. CNAهای ژنومی و جهش‌های سوماتیک درگیر در مسیر HR برچسب‌گذاری شده‌اند (شکل VB). از آنجایی که مهارکننده‌های PARP گزینه‌های ارزشمندی برای بیماران مبتلا به سرطان تخمدان راجعه در مراحل مختلف هستند. دو کشت سلولی اولیه OS از PDX ها، SA4103 (امتیاز: BRCA2: 73، HRD: 38) و SA4061 (امتیاز: 38، HRD)، با سیس پلاتین یا اولاپاریب به مدت ۷۲ ساعت تحت درمان قرار گرفتند. تکثیر سلولی با استفاده از یک سنجش زنده ماندن سلولی شب تاب سلول Titer-Glo برآورد شد. نتایج نشان داد که سیس پلاتین یا اولاپاریب پاسخ ضد تکثیری قوی تری را در رده سلولی OS HRD مثبت SA4103 نسبت به رده سلولی OS HRD (شکل SA4061 یا رده سلولی OS 143B ایجاد کردند (شکل VC). متعاقباً، ما اثرات ترکیبی سیس پلاتین با اولاپاریب را در مهار زنده ماندن سلول‌های OS HRD مثبت آزمایش کردیم و یک اثر مهارتی هم افزایی (شاخص ترکیبی < ۱) بین سیس پلاتین و اولاپاریب را شناسایی کردیم (شکل VD).

بحث

در سال‌های اخیر، آنالیز ژنومی OS، دانش ما را در مورد این بدخیمی پیچیده ژنتیکی گسترش داده است. با این حال، هیچ پیشرفتی در بهبود بقای کلی OS ایجاد نشده است. یکی از موانع اصلی ناهمگونی OS است، به این معنی که یک درمان واحد نمی‌تواند برای همه بیماران موفق باشد. در این مطالعه، ما یک آنالیز یکپارچه از جهش‌های سوماتیک، تغییرات تعداد کپی، متیلاسیون DNA و نمایه‌های بیان mRNA 121 بیمار OS را مشخص کردیم و این مجموعه داده چند پلتفرمی جامع‌ترین اطلس ناهنجاری‌های ژنومی، اپی ژنومیک و رونویسی OS را تا به امروز ارائه کرد. ما نشان دادیم که طیف جهش OS عمدتاً ناشی از تعمیر DNA معیوب است. شواهد رو به رشد نشان می‌دهد که وضعیت HRD همچنان یک پیش‌بینی‌کننده قوی برای سود بالینی از مهارکننده‌های PARP است، که چشم‌انداز کاربرد PARPi را برای OS بیشتر گسترش می‌دهد. مطابق با نتایج قبلی، ما تأیید کردیم که CNAها به

برای کشنده ترین زیرگروه، iCluster4 با تقویت MYC و بیان بیش از حد مشخص شد. امیلی فای MYC با انواع مختلف تومورهای جامد مانند نوروبلاستوما و مدولوبلاستوما همراه بوده است، در حالی که بیان بیش از حد MYC یکی از مشخصه های تهاجمی ترین زیرگروه مدولوبلاستوما بود. مطالعه ما نقش مهم MYC را در iCluster4 در طول پیشرفت OS برجسته می کند. عوامل ضد MYC مستقیم یا غیرمستقیم ممکن است راه حل بهینه برای این زیرگروه باشد، از جمله مهارکننده های BET، مهارکننده های mTOR و مهارکننده های کیناز AURORA.

به طور خلاصه، ما یک چشم انداز ژنومیک، اپی ژنومیک و ترنسکریپتوم ارائه می دهیم و چهار زیرگروه مولکولی متمایز از OS را با رویکردهای تحلیلی یکپارچه کشف می کنیم. یافته های ما بینش های مهمی در مورد بیولوژی OS ارائه می دهد و به طور بالقوه می تواند توسعه گزینه های درمانی این بیماری کشنده را تسهیل کند.

منبع:

<https://www.nature.com/articles/s41467-022-34689-5>

شده است، که نشان دهنده مزایای بالقوه این استراتژی ترکیبی دارو برای بیماران iCluster 1-2 است.

ارتشاح ایمنی بالاتر در داخل تومور معمولاً با پیش آگهی بالینی بهتر همراه است، با این حال، ما پیش آگهی بالینی متفاوتی بین iCluster1 و iCluster2 پیدا کردیم. از طریق تشریح کلون های TCR داخل توموری و وضعیت ایمنی، iCluster1 (فعال شده با سیستم ایمنی) بیشتر از iCluster2 (سرکوب شده توسط سیستم ایمنی) متمایز شد. این نشان می دهد که بیماران iCluster2 ممکن است از ICI یا استراتژی های ترکیبی ICI و درمان ani-VEGF بیشترین بهره را ببرند.

برعکس، iCluster 3-4 دارای امضای ایمنی پایین اما فعالیت های تکثیری بالاتری بود. از این میان، iCluster3 عمدتاً از بیماران HRD مثبت (۸۴.۲٪، امتیاز $HRD > 42$)، با بالاترین خلوص تومور و بی ثباتی ژنومی تشکیل شده است. این نشان می دهد که بیماران در iCluster3 ممکن است ترجیحاً برای شیمی درمانی آسیب رسان به DNA در نظر گرفته شوند. در واقع، بیماران با نمرات HRD بالا در شیمی درمانی نئوادجوانت مبتنی بر پلاتین، پیش آگهی مطلوبی داشتند که در نتایج ما تأیید شد.

