

آنالیز مولتی اومیکس زیر گروه نابالغ مبتلا به RAS بسیار مقاوم از لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوزاد

چکیده

لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوزاد (ALL) بازآرایی شده با KMT2A نشان دهنده مقاوم ترین نوع لوسمی دوران کودکی است. برای کشف ناهمگنی مولکولی این بیماری، ما توالی یابی RNA، آنالیز آرایه متیلاسیون، کل اگزوم و توالی یابی عمیق هدفمند را روی ۸۴ نوزاد مبتلا به لوسمی بازآرایی شده با KMT2A انجام دادیم. خوشه بندی مولتی اومیکس ما به دنبال استنتاج تک نمونه ای و تک سلولی تمایز خون ساز، پنج خوشه یکپارچه (ICs) قوی را با فاکتورهای رونویسی اصلی مختلف، شرکای همجوشی و مراحل متناظر B--لنفوپوئیتیک و رشد اولیه هماتو-اندوتلیال ایجاد می کند: IRX- نوع متمایز (IC1)، نوع IRX غیر متمایز (IC2)، نوع HOXA MLLT1 (IC3)، نوع HOXA MLLT3 (IC4) و نوع HOXA AFF1 (IC5). نکته مهم، آنالیز دقیق جهش ما نشان می دهد که تعداد جهش های مسیر RAS پیش آگهی را پیش بینی می کند و مقاوم ترین زیر گروه IC2 دارای ۱۰۰٪ فرکانس و سنگین ترین بار جهش های مسیر RAS است. یافته های ما ناهمگونی درون و بین بیمار ناهمگونی ALL نوزاد با KMT2A را که قبلاً کمتر مورد توجه قرار گرفته بود برجسته می کند و منطقی برای توسعه آینده طبقه بندی خطر با هدایت ژنومیک و درمان فردی ارائه می دهد.

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) شایع ترین بدخیمی کودکان است که در آن تا ۵ درصد موارد در دوران نوزادی (کمتر از ۱۲ ماهگی) تشخیص داده می شود و از نظر بیولوژیکی و بالینی با ALL در کودکان بزرگتر



وحید رضا اصفهانی^۱

۱- کارشناسی ارشد سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس ژن

لوسمی حاد با فنوتیپ مخلوط B/M MYELOID (B/M omics-integrative MPAL؛ n = 2) استفاده کردیم و را انجام دادیم. خوشه‌بندی، و به دنبال آن خصوصیات زیرگروهی گسترده شامل بیان ژن، متیلاسیون DNA، جهش و تغییرات تعداد کپی می‌شود. این رویکرد مولتی اومیکس یک طبقه‌بندی مولکولی واقعاً بی‌طرفانه از ALL نوزادان KMT2A-r را نشان می‌دهد و سرخ‌هایی را برای تشخیص‌های ژنومیک محور و استراتژی‌های درمانی بالقوه ارائه می‌دهد.

نتایج

آنالیز تک‌آمیکس ترنسکریپتوم، زیرگروه‌های IRX و HOXA ALL نوزادان KMT2A-r را تأیید کرد. ابتدا، توالی‌یابی RNA را روی نمونه‌های تشخیصی ۶۱ نوزاد با KMT2A-r B-ALL (n = 59) یا B/M MPAL (n = 2) به عنوان یک گروه کشفی انجام دادیم. در مجموع، ۱۱۱ رونوشت فیوژن شناسایی و به صورت تجربی اعتبارسنجی شدند، که ۹۵٪ آن ترکیبات مربوط به KMT2A بود. در ۲۵ مورد از ۶۱ مورد (۴۱٪)، پیوند جایگزین از همجوشی KMT2A با پرش اگزون ۱۱ KMT2A شناسایی شد. همجوشی متقابل KMT2A (یعنی X-KMT2A) در ۱۷ مورد (۲۸٪) مشاهده شد که بیشتر در موارد ۱۵) KMT2A-AFF1 مورد از ۱۷ مورد). علاوه بر همجوشی‌های KMT2A، سه مورد (۵٪) دارای ۵ همجوشی غیرمرتبط با KMT2A بودند که دو مورد از آنها شامل ژن AFF1 بودند: AFF1-SPATA13 و AFF1-HSPA8.

خوشه‌بندی بیان ژن مبتنی بر توالی‌یابی RNA دو زیرگروه پایدار را در لوسمی نوزادان KMT2A-r نشان داد که با بیان متفاوت فاکتورهای رونویسی IRX و HOXA مشخص شد، همانطور که قبلاً گزارش شده بود (زیرگروه IRX و زیرگروه HOXA). آنالیز شبکه بیشتر IRX1 و HOXA9 را به عنوان دو تنظیم‌کننده اصلی که تعداد زیادی از ژن‌های پایین دستی را در هر زیرگروه کنترل می‌کنند شناسایی کرد. برخلاف یک گزارش قبلی، بیان رونوشت متقابل AFF1-KMT2A با الگوی بیان IRX/HOXA مرتبط نبود، در حالی که نقطه شکست ژن KMT2A به طور قابل توجهی با الگوی IRX/HOXA در موارد KMT2A-AFF1 مرتبط بود.

متمایز است. ALL نوزاد با فرکانس بالای بازآرایی ژن KMT2A (همچنین به عنوان MLL شناخته می‌شود) (KMT2A-r) مشخص می‌شود که در ۷۵٪ موارد یافت می‌شود و با فنوتیپ پیش‌ساز سلول B نابالغ CD1۰ منفی و پیش‌آگهی بسیار ضعیف همراه است. اگرچه جدیدترین کارآزمایی بالینی سراسری ما، MLL-۱۰، بقای نوزادان مبتلا به KMT2A-r ALL4 را به طور قابل توجهی بهبود بخشیده است، نرخ بقای بدون رویداد (EFS) هنوز کمتر از ۴۰ درصد در سراسر جهان است. ماهیت تهاجمی بیماری در زمان تاخیر کوتاه آن بین وقوع بازآرایی KMT2A در رحم و پیشرفت آشکار بیماری در دوران نوزادی منعکس می‌شود. این دوره کوتاه مدت، ژنوم ALL نوزاد را ثابت و عمدتاً در هنگام تشخیص بدون تغییر می‌کند. در میان چند رویداد ژنتیکی، جهش‌های مکرر RAS، و همچنین جهش‌های FLT۳ و یا بیان بیش از حد، مدت‌هاست که شناسایی شده‌اند. با این وجود، کاربرد ترجمه‌ای این انحرافات به عنوان عوامل خطر و یا اهداف درمانی برای ALL نوزادان هنوز مورد بحث است. بنابراین، در درمان نوزادان مبتلا به ALL، مثبت بودن بازآرایی KMT2A تنها عامل خطر مولکولی تثبیت شده باقی می‌ماند، و هیچ طبقه‌بندی مولکولی دیگری در سراسر جهان پذیرفته نیست، که نیاز به درک بهتر ناهمگونی مولکولی در ALL نوزادان KMT2A-r دارد.

توسعه اخیر روش‌های یادگیری ماشین برای کشف زیرکلاس یکپارچه از داده‌های مولتی اومیکس عملکرد بسیار خوبی را در کشف زیرشاخه‌های سرطانی پیچیده‌تر و مرتبط با بالینی نسبت به آنچه که می‌توان با خوشه‌بندی تک اومیکس به دست آورد، نشان داده است. از آنجایی که لوسمی KMT2A-r دارای یک امضای مولکولی مشترک است و بنابراین تمایل دارد در برابر سایر زیرگروه‌های ALL با هم جمع شود، یک رویکرد مولتی اومیکس که فقط موارد KMT2A-r را هدف قرار می‌دهد، طرح بهینه برای کشف ناهمگونی واقعی در ALL نوزادان KMT2A-r خواهد بود. اگرچه نادر بودن این بیماری تا به امروز این رویکرد را با مشکل مواجه کرده است.

در این مطالعه، ما از نمونه‌های تشخیصی ۸۴ نوزاد مبتلا به لوسمی KMT2A-r، از جمله B-ALL (n = 82) و

در مقایسه با نوزادان IC4، IC1، یا IC5 نشان دادند (به ترتیب 1.5×10^{-3} ، 0.017 و 0.042) (log-rank P = 1.5 10^{-3})، بقای کلی (OS) روند مشابهی را نشان داد، با نوزادان IC2 که بدترین سیستم عامل را نشان می دادند، اگرچه اهمیت آماری فقط بین IC2 و IC1، دو IC از زیرگروه IRX به دست آمد (log-rank P = 0.015؛ شکل 1c). در یک مدل رگرسیون چند متغیره کاکس با عوامل پیش آگهی بالینی (شکل 1d)، ICها به طور قابل توجهی با EFS، مستقل از سایر پارامترهای پیش آگهی مرتبط بودند (با IC2 به عنوان گروه مرجع؛ P = 0.040 و P = 0.046 برای IC1 و IC5، به ترتیب).

برای تأیید این نتایج خوشه بندی، ما علاوه بر آن آنالیز آرایه متیلاسیون DNA را در گروهی مستقل از ۲۳ نوزاد با KMT2A-r B-ALL انجام دادیم. با استفاده از طبقه بندی کننده k-نزدیک ترین همسایه (KNN) مدل سازی شده روی گروه کشف ۶۱ نوزاد، پنج برچسب کلاس (IC1-5) به ۲۳ مورد دیگر اختصاص داده شد که پروفایل های متیلاسیون DNA خاص خوشه ای و همچنین شریک همجواری را خلاصه می کرد. توزیع ها علاوه بر این، EFS روند مشابهی را نشان داد و نوزادان IC2 ضعیف ترین EFS را نشان دادند. در مجموع، خوشه بندی بدون نظارت دوگانه ما، پنج آی سی مرتبط با پیش آگهی را در ALL نوزاد KMT2A-r شناسایی کرد.

غنی سازی تفاضلی امضاهای توسعه ای ICها را تعریف می کند

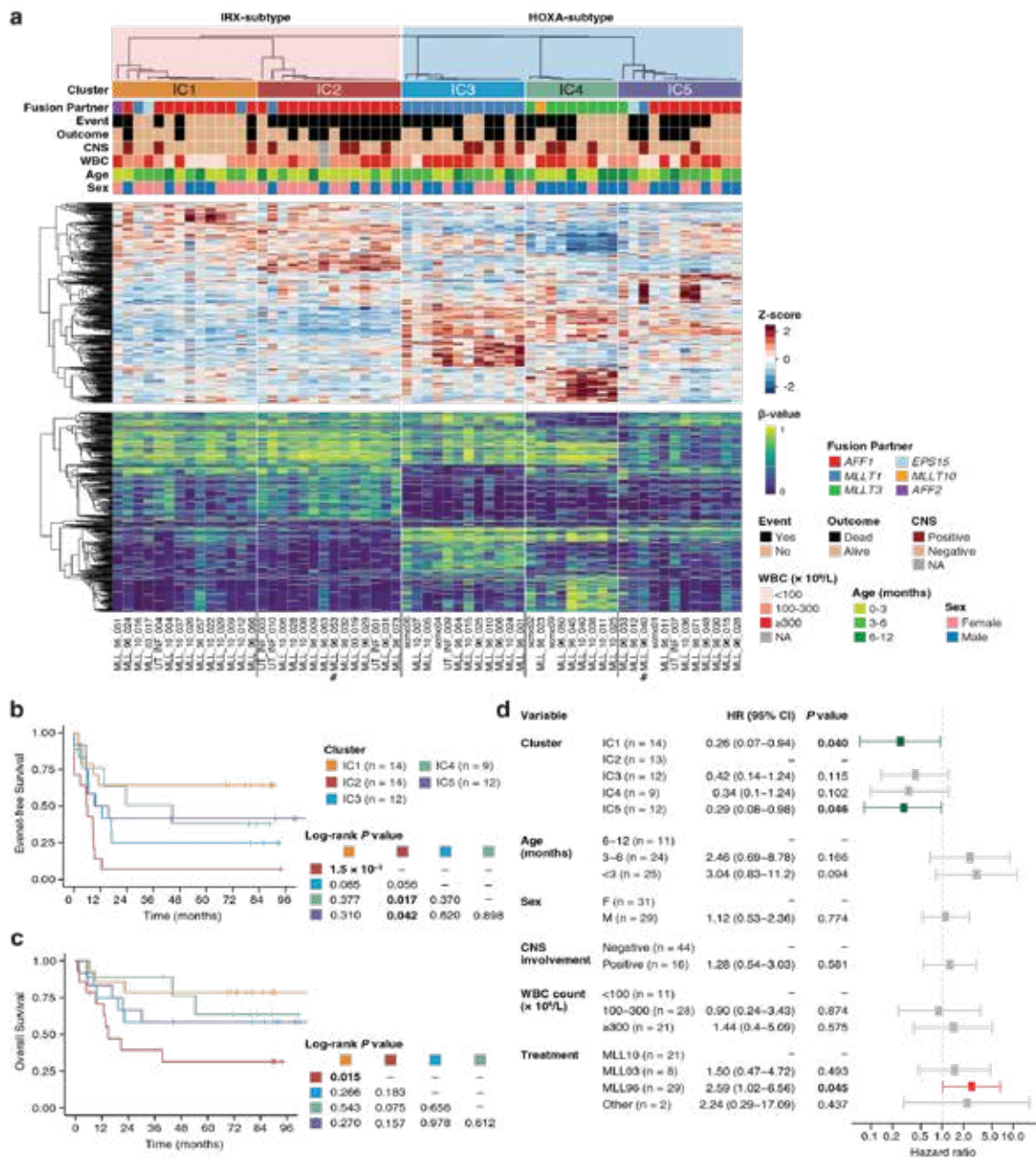
از آنجایی که افزودن اطلاعات متیلاسیون وضوح خوشه بندی را بهبود بخشید، در مرحله بعد وضعیت متیلاسیون DNA در سطح ژنوم این پنج IC را بررسی کردیم. در سطح کلی، سطوح متیلاسیون DNA توزیع های مشابهی را بین ICها در سراسر ژنوم و همچنین درون ژن ها و جایگاه های پروموتور نشان داد که نشان می دهد مجموعه های کوچکی از مکان های هدف اختصاصی IC، به جای تفاوت های شدید ژنومی، متمایز می شوند. متیلوم های آی سی برای تعریف مارکرهای اختصاصی IC، در مرحله بعد به طور مشترک رونوشت و متیلوم DNA موارد کشف شده خود را آنالیز کردیم. ابتدا، ژن های نشانگر مبتنی بر بیان برای هر خوشه شناسایی شدند که بر اساس وضعیت متیلاسیون

قابل توجه است، در حالی که نوع فرعی IRX فقط در نوزادان KMT2A-AFF1 مثبت گزارش شده است، ما سه نوزاد KMT2A-MLLT1، یک KMT2A-EPS15 و یک نوزاد KMT2A-AFF2 را در زیرگروه IRX شناسایی کردیم. روندی به سمت پیش آگهی ضعیف قبلاً گزارش شده زیرگروه IRX نیز در میان موارد KMT2A-AFF1 مشاهده شد، در حالی که هیچ تفاوتی در بقا مشاهده نشد هنگامی که همه شرکای فیوژن گنجانده شدند.

زیرگروه های مولکولی اجماع دوگانه ALL نوزادان KMT2A-r

اگرچه خوشه بندی مبتنی بر بیان ژن قادر بود محور IRX/HOXA را به عنوان زیرساخت ALL نوزاد KMT2A-r تأیید کند، به منظور آشکار کردن زیر گروه های بیماری تصفیه شده تر، ما همان ۶۱ نمونه لوسمی نوزاد را با آرایه متیلاسیون DNA آنالیز کردیم. همانند خوشه بندی مبتنی بر ترانسکریپتوم، خوشه بندی تک اومیکس مبتنی بر متیلاسیون DNA نتوانست بیش از دو خوشه پایدار را شناسایی کند و بیماران را به نوزادان KMT2A-AFF1 مثبت در مقابل سایرین تقسیم کرد. با این حال، از آنجایی که دو لایه اومیکس ویژگی های کلیدی متفاوتی را برای خوشه بندی بیماران به دست می آوردند، ما در مرحله بعد به دنبال طبقه بندی مجدد آنها با در نظر گرفتن ترانسکریپتوم و متیلوم DNA هستیم. به جز خوشه بندی به دو زیر گروه ($k=2$)؛ زیر گروه های IRX در مقابل (HOXA)، خوشه بندی مبتنی بر همجواری شبکه ای شباهت (SNF) با توجه به معیارهای پایداری ارزیابی شده، پنج زیر گروه را به عنوان پایدارترین ها شناسایی کرد (خوشه یکپارچه ۵-۱). (IC1-5)؛ شکل 1a). بنابراین، زیر گروه IRX به IC1 و IC2 تقسیم شد، در حالی که زیر گروه HOXA به سه IC تقسیم شد که به طور قابل توجهی با شرکای همجواری همبستگی داشت: MLLT1 (IC3)؛ فیشر دقیق ($P = 3.7 \times 10^{-8}$)، MLLT3؛ فیشر ($P = 5.6 \times 10^{-6}$) AFF1 و (exact's $P = 5.6 \times 10^{-6}$)؛ فیشر ($P = 5.7 \times 10^{-6}$)، به ترتیب. سایر ویژگی های بیمار، از جمله عوامل پیش آگهی بالینی شناخته شده مانند سن، ارتباط معنی داری با انتساب IC نداشت.

نکته مهم این است که این ICها با نتایج بالینی همراه بودند، که در آن نوزادان در IC2 کوتاه ترین EFS را



شکل ۱: خوشه‌بندی ادغام‌کننده دوگانه KMT2A-r نوزادان ALL.

الف) هیت مپ جامع دوگانه از KMT2A-r نوزادان ALL. بالا: ویژگی‌های بالینی آسیب شناختی گروه کشف ۶۱ نوزاد. دندروگرام از خوشه بندی اجماع است و فاصله نمونه تا نمونه را نشان می‌دهد. میانه: نقشه حرارتی بیان ژن‌های نشانگر خوشه ای. ۱۰۰ ژن مارکر بالا یا کاهش قابل توجهی برای هر یک از پنج IC گنجانده شد. پایین: هیت مپ متیلاسیون پروب‌های نشانگر خوشه ای. ۱۰۰ پروب مارکر به طور قابل توجهی یا هیپومتیله برای هر یک از پنج IC گنجانده شد. علائم اعداد (#) دو مورد را با B/M MPAL نشان می‌دهد. سیستم عصبی مرکزی CNS، گلبول سفید NA، WBC در دسترس نیست.

ب) آنالیز بقا با مقایسه EFS (ب) و OS (ج) اهای مختلف ALL نوزادان KMT2A-r.

د) تحلیل مخاطرات متناسب کاکس چند متغیره برای EFS. فاکتورهای پیش آگهی بالینی شناخته شده، و همچنین پروتکل‌های درمانی، در مدل گنجانده شدند. یک بیمار (MLL_96_063) به دلیل از دست دادن اطلاعات بالینی از مطالعه خارج شد. در مجموع ۶۰ نوزاد وارد شدند و تعداد فرعی موارد در هر گروه متغیر نشان داده شده است. نوارهای خط فاصله اطمینان ۹۵٪ را نشان می‌دهد. مقادیر P خام دو طرفه نشان داده شده است. نسبت خطر HR، فاصله اطمینان CI.

دیفرانسیل محدودتر شد. در نتیجه، ۳۸، ۳۲، و ۷۳ ژن به ترتیب به عنوان ژن های نشانگر دوگانه IC2، IC3، و IC4 شناسایی شدند (شکل ۲a، b). اگرچه هیچ ژنی به عنوان مارکر دوگانه اومیکس برای IC1 و IC5 شناسایی نشد. در میان مارکرهای اومیکس دوگانه، FLT1 بیشترین کاهش متیلاسیون و تنظیم مثبت هماهنگ را در IC2 نشان داد (شکل ۲c). FLT1 گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGFR1) را کد می کند، که از نظر فیزیولوژیکی در پیش سازهای خونساز بیان نمی شود اما گزارش شده است که مسئول محلی سازی داخل مغز استخوان و بقای سلول های ALL است. علاوه بر این، نشانگرهای کلیدی خونساز و دودمان B، از جمله CD34، MME (رمزکننده CD10) و DNNT، در بین ژن های نشانگر دوگانه اومیکس یافت شدند (شکل ۲d)، که نشان می دهد IC های مختلف وضعیت های رشدی متفاوتی نسبت به سلول B دارند. دودمان. در واقع، ژن های نشانگر رشدی سلول B به طور متغیر بین IC ها بیان و متیله شدند.

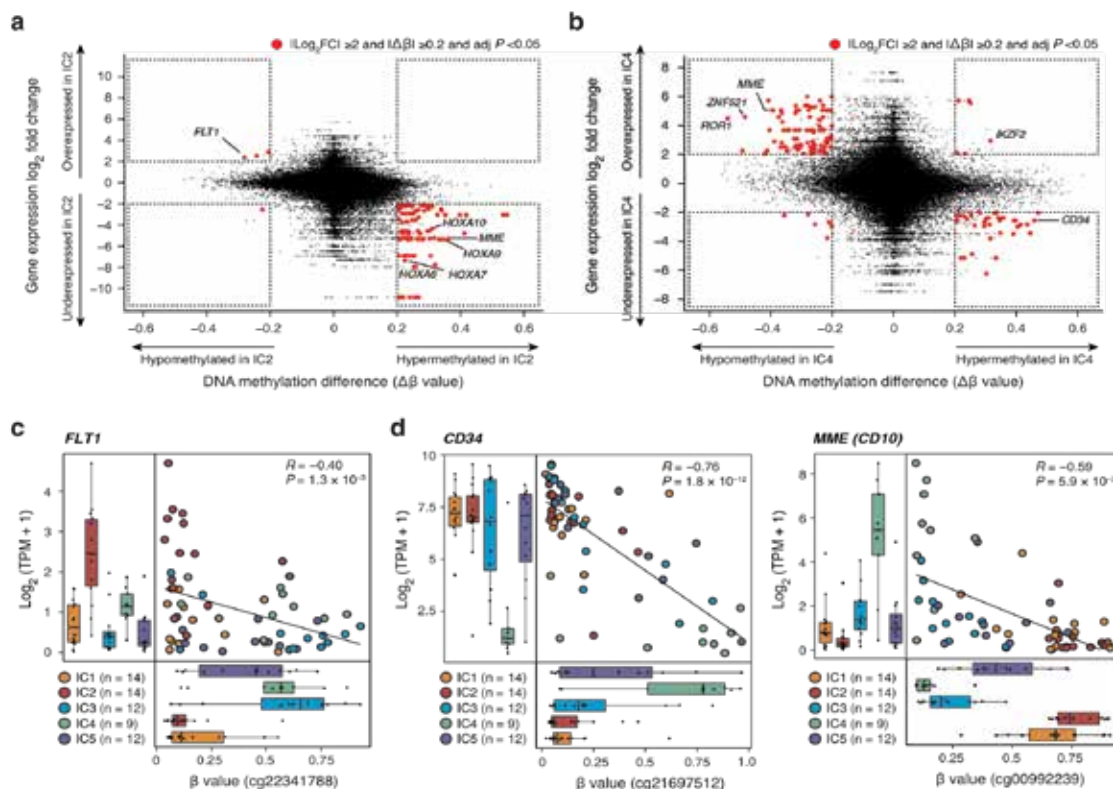
برای حل بیشتر مراحل رشد خوشه ای خاص، ما از مارکرهای نوع سلولی B-Lineage تعریف شده توسط یک مطالعه ترنسکرپتوم تک سلولی کبد جنین انسان و ارزیابی غنی سازی تک نمونه از این امضای رشدی استفاده کردیم. به طور جالبی، امضای رشدی سلول B به طور متفاوتی در پنج IC غنی شدند، با غنی سازی متمایز از امضای سلول بنیادی خونساز/پیش ساز چند توان (HSC/MPP) در IC1، امضای pre-pro-B در IC3 و IC5، و امضای pre-B در IC4 (شکل ۳a، b). غنی سازی امضای pre-B در IC4 با الگوی بیان CD34 منفی و MME مثبت این زیر گروه مطابقت داشت (شکل ۲d). مقایسه با توالی یابی RNA منتشر شده و مجموعه داده های آراییه متیلاسیون اجداد سلول B طبیعی، وضعیت بالغ تر IC4 را با شناسایی بیان مشترک و امضای متیلاسیون بین IC4 و اجداد نرمال تأیید کرد. جالب توجه دیگر، پیش آگهی ضعیف IC2 بود، که غنی سازی امضای منفی را برای تمام مراحل پیش ساز سلول B نشان داد (شکل ۳a، c). حتی در مقایسه با IC1، که این خوشه را به عنوان تمایز نیافته ترین زیر گروه ALL نوزادان تعریف می کند. اگرچه بیان مشترک مارکرهای میلوئید و تغییر اصل و نسب معمولاً در درمان ALL نوزادان KMT2A-r مشاهده می شود، بیان امضای

دودمان میلوئیدی بین IC ها تفاوت معنی داری نداشت. از آنجایی که این نتایج نشان داد که زیرگروه IRX (IC1-2) در مقایسه با زیرگروه HOXA (IC3-5) نسبت به دودمان سلول B کمتر متمایز است، ما فرض کردیم که ALL نوزادان نوع IRX، حالات سلولی رشد خونساز اولیه را حفظ می کند. برای پرداختن به این موضوع، ما اهداف مثبت IRX1 و HOXA9 را با آنالیز شبکه ای از داده های بیان ژن بیمار استخراج کردیم، که سپس بر روی یک اطلس رونویسی ارگانوژنز اولیه (شکل ۳d) پیش بینی شد. طرح ریزی فعالیت های تک سلولی رگولون های IRX1 و HOXA9 نشان داد که فعالیت رگولون IRX1 به وضوح در بخش های پیش ساز هماتو-اندوتلیال و سلول های اندوتلیال غنی شده است، در حالی که تنظیم HOXA9 در هیچ نوع سلول خاصی غنی نشده است (شکل ۳e). بر این اساس، امضای سلول های اندوتلیال مشتق شده از کبد جنین انسان و همچنین رشد اولیه جنین انسان در زیرگروه IRX در مقایسه با زیرگروه HOXA (شکل ۳f) غنی شد، در حالی که تفاوت معنی داری بین IC1 و IC2 مشاهده نشد. وضعیت متیلاسیون DNA این رابطه را تأیید کرد، با تقویت کننده های اندوتلیال در زیرگروه IRX و تقویت کننده های پیش ساز لنفاوی هیپومتیله در زیرگروه HOXA (شکل ۳g، h). در مجموع، فعالیت های مشخصه ای از دودمان B و رشد اولیه هماتو-اندوتلیال، مراحل رشد خوشه ای خاص ALL نوزاد را تعریف می کنند.

چشم انداز متمایز تغییرات ژنومی در IC های

ALL نوزاد KMT2A-r

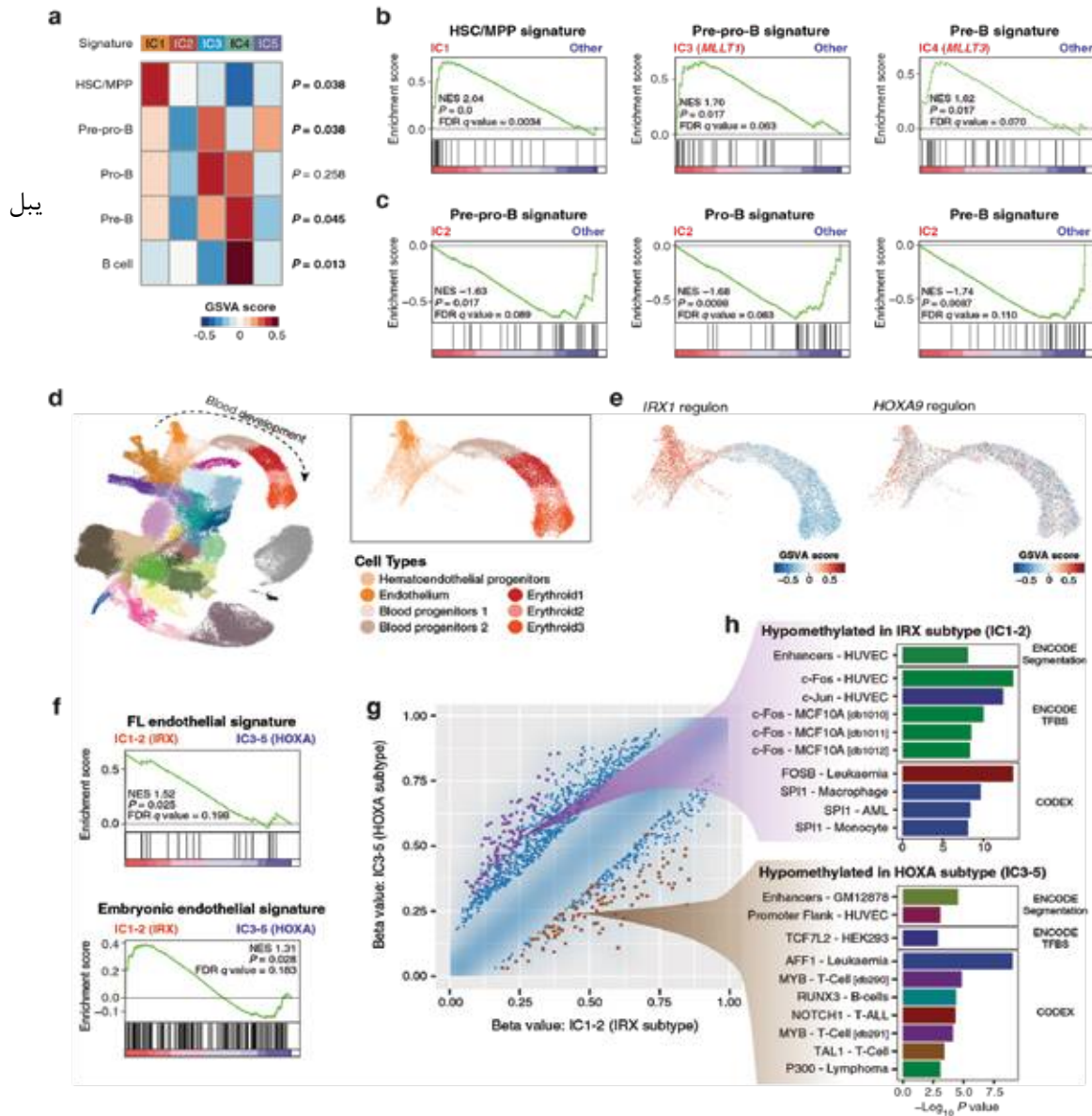
برای توصیف بیشتر اساس مولکولی زیرگروه های ALL نوزادان، در مرحله بعد چشم انداز جهش تمام ۶۱ نوزاد از گروه کشف را با استفاده از توالی یابی کل اگزوم (WES) و یا توالی یابی عمیق هدفمند (deep-seq) ژن های جهش یافته مکرر در ALL را نوزاد بررسی کردیم. اول، WES در ۱۹ مورد از ۶۱ مورد کشف با میانگین عمق توالی ۱۴۰ انجام شد، که توسط آن ۶۳ تغییرات تک نوکلئوتیدی سوماتیک غیر خاموش (SNVs) یا درج و یا حذف (indels) شناسایی شد، و ۵۹ SNVs/indels در ۴۴ ژن (۹۴٪) با آمپلیکون یا توالی یابی عمیق مبتنی بر ضبط اعتبارسنجی شدند. تعداد ۳۰۱ جهش غیر خاموش در هر اگزوم با گزارش های



شکل ۲: مقایسه یکپارچه ترانسکرپتوم و متیلوم DNA در ALL نوزاد.

الف و ب) پراکندگی یکپارچه تفاوت‌های بیان متضاد را با تفاوت‌های متیلایون DNA در IC2 (الف) و IC4 (ب) ترسیم می‌کند. ژن‌ها و پروب‌هایی که تفاوت‌های قابل توجهی در بیان ژن دارند (تغییر برابر $|\log_2| \geq 2$ و $P < 0.05$ تنظیم‌شده دو طرفه) و متیلایون $|\Delta\beta| \geq 0.2$ و $P < 0.05$ تنظیم‌شده دو طرفه) با رنگ قرمز برجسته می‌شوند.

ج و د) بیان ژن مرتبط و متیلایون DNA نشانگرهای خوشه‌ای دوگانه اومیکس *FLT1* (ج)، *CD34* و *MME* (د). ضرایب همبستگی پیرسون (R) و مقادیر P همبستگی پیرسون خام نشان داده شده است. نمودارهای جعبه‌ای میانه و چارک اول نشان می‌دهد. سبیل از کوچکترین تا بزرگترین مقادیر در $1.5 \times IQR$ از لولاهای جعبه گسترش می‌یابد.



بیل

شکل ۳: غنی سازی افتراقی دودمان B و امضاهای رشدی هماتو-اندوتلیال در نوزاد KMT2A-r ALL.

(الف) آنالیز غنی سازی که بیان امضاهای رشد سلول B را در پنج IC مقایسه می‌کند. نمرات غنی سازی در سطح نمونه فردی با استفاده از GSEA محاسبه شد و مقدار متوسط برای هر امضا در هر خوشه ترسیم شده است. مقادیر Kruskal-Wallis P در سمت راست هیئت مپ نشان داده شده است.

(ب) غنی سازی خوشه‌ای خاص از امضاهای B-تاریخ ارزیابی شده با GSEA. نمره غنی سازی نرمال NES، نرخ کشف نادرست FDR.

(ج) غنی سازی قابل توجهی از امضاهای B-progenitor در IC2.

(د) تجسم تقریب و طرح ریزی منیفولد یکنواخت (UMAP) از یک اطلس بیان ژن تک سلولی منتشر شده گاسترولاسیون موش (n=116312 سلول). کادر بالا سمت راست یک بخش بزرگ‌نمایی شده از مسیر رشد خون را نشان می‌دهد (n=13881 سلول).

(ه) غنی سازی GSEA اهداف مثبت IRX1 و HOXA9 در مسیر تکوین خون.

(و) آنالیز غنی سازی امضاهای سلول‌های اندوتلیال با مقایسه زیرگروه IRX در مقابل زیرگروه HOXA. (ز) نمودار پراکندگی چگالی با مقایسه سطوح متیلاسیون DNA زیرگروه IRX و زیرگروه HOXA. متیلاسیون افتراقی بر اساس مناطق کاشی کاری ژنومی با یک پنجره ۵ کیلوبایتی ارزیابی شد. سطوح متیلاسیون نواحی کاشی کاری به صورت چگالی با رنگ آبی نشان داده می‌شود و نقاط منفرد در ۱٪ پراکنده ترین مناطق کاشی کاری رسم می‌شوند. ۱۰۰ ناحیه تحت تیپ‌های IRX و HOXA به‌طور قابل توجهی به رنگ‌های بنفش و قهوه‌ای نشان داده شده‌اند.

(ح) آنالیز غنی سازی LOLA در ۱۰۰ منطقه متیله متفاوت که در (ز) برجسته شده است. ده مقوله برتر که به طور قابل توجهی غنی شده از ورودی‌های CODEX یا ENCODE پایگاه داده‌های LOLA Core نشان داده شده است.

قبلی ۸،۱۲ سازگار بود که بار جهشی پایین ALL نوزاد را تأیید می‌کند. علاوه بر این، Deep-Seq در تمام ۶۱ مورد کشف با عمق متوسط ۹۹۸ انجام شد و ۹۳ جهش غیر خاموش در ۱۱ ژن شناسایی شد. در ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل شده با هر دو WES و WES، Deep-seq نتوانست ۶ مورد از ۱۹ (۳۲٪) جهش ساب کلونال را با فرکانس آلی متغیر (VAFs) کمتر از ۱۰٪ شناسایی شده با عمق دنباله تشخیص دهد، که نشان دهنده حساسیت ۱.۵ برابری بالاتر است. دنباله عمیق ما بر روی WES (جهش ۱۹ در مقابل ۱۳) برای تشخیص جهش ساب کلونال. علاوه بر این، ۲۹ تغییر تعداد کپی (CNAs؛ ۱.۵ در هر مورد) و دو تغییر ساختاری نامرتبط با KMT2A (SVs) با استفاده از WES و عمیق seq شناسایی شدند.

با ترکیب تمام جهش‌ها و CNAهای شناسایی شده توسط WES و Deep Seq، ژن‌های مسیر گیرنده تیروزین کیناز- RAS (RTK-RAS) اغلب تغییر می‌کردند (شکل ۴a). در این میان، KRAS (۲۱ مورد از ۶۱ مورد؛ ۴۳٪) و FLT3 (۲۰ مورد از ۶۱ مورد؛ ۳۳٪) و NRAS (۱۹ مورد از ۶۱ مورد؛ ۳۱٪) عود کننده‌ترین ژن‌ها بودند. به طور کلی، ۴۴ مورد از ۶۱ مورد (۷۲٪) دارای حداقل یک جهش در مسیر RTK-RAS بودند. در مقایسه با فرکانس‌های گزارش شده قبلی جهش‌های مسیر RTK-RAS در ALL نوزاد (۴۳-۴۷٪) ۸،۱۲ فرکانس ۱.۵ برابر بالاتر ما را می‌توان با حساسیت بالاتر عمق دنباله ما برای تشخیص جهش ساب کلونال توضیح داد. در واقع، ۴۵ جهش از ۹۳ (۴۸٪) جهش شناسایی شده توسط عمیق seq ساب کلونال با $VAFs < 10\%$ بودند (شکل ۴b).

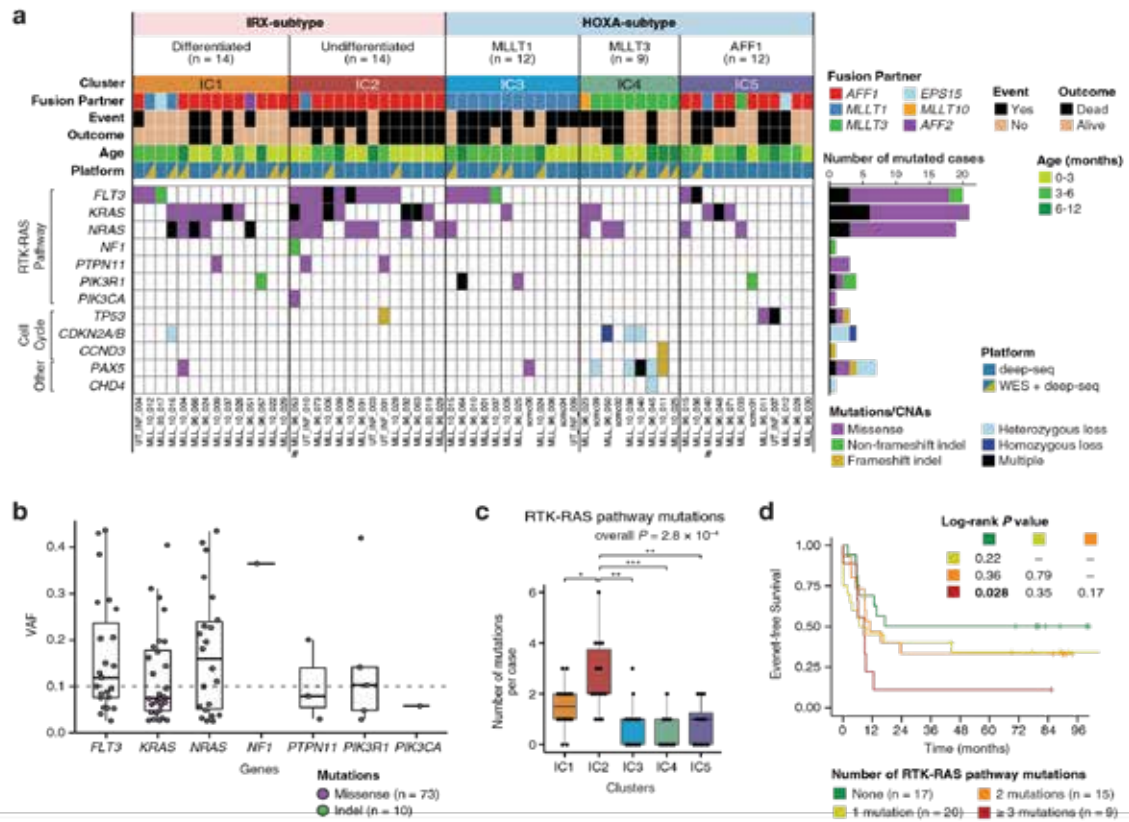
هنگام مقایسه چشم اندازه‌های جهشی بین خوشه‌ها، پیش آگهی ضعیف IC2 با فراوانی ۱۰۰٪ (۱۴ مورد از ۱۴ مورد) جهش‌های مسیر RTK-RAS مشخص شد. به طور قابل توجهی، مشخص شد که IC2 تعداد قابل توجهی جهش‌های مسیر RTK-RAS را نسبت به سایر ICها جمع‌آوری کرده است (تست مجموع رتبه ویلکاکسون $P < 0.05$)، با میانگین ۲.۶ جهش (محدوده ۱-۶) در هر مورد. از IC2 (شکل ۴c). به همین ترتیب، مسیرهای MAPK و ERK پایین دست RAS به طور قابل توجهی در IC2 تنظیم مثبت شدند و IC2 را از زیرگروه IRX دیگر IC1 متمایز می‌کردند. شایان ذکر است، اگرچه نه مثبت بودن ساده جهش‌های مسیر

RTK-RAS و نه وقوع همزمان جهش‌های FLT3 و RAS به طور قابل توجهی با میزان بقا مرتبط نبود، پس از طبقه‌بندی بر اساس تعداد جهش‌های مسیر RTK-RAS در هر مورد، نوزادان با جهش‌های ≤ 3 در RTK مسیر RAS- در مقایسه با نوزادان بدون جهش در مسیر RTK-RAS به طور قابل توجهی بدتر EFS را نشان داد ($\log\text{-rank } P = 0.028$ ؛ شکل ۴d)، که اهمیت تشخیص دقیق تنوع ساب کلونال را برای طبقه‌بندی خطر ALL نوزادان برجسته می‌کند. در واقع، در یک مورد IC2 (UT_INF_001) که نمونه عود برای آن در دسترس بود، دو جهش (PTPN11 و FLT3) RTK-RAS در هنگام تشخیص، VAFها را در عود افزایش دادند، که نشان دهنده سهم این جهش‌ها در عود در این مورد است، اگرچه اهمیت جهش‌های RTK-RAS به عنوان محرک‌های عود باید با یک گروه بزرگ‌تر ارزیابی شود. خوشه دیگری با چشم انداز جهش متمایز IC4 بود که فرکانس قابل توجهی بالاتری از CNAها و یا جهش در تنظیم کننده‌های چرخه سلولی و ژن 5exacts را نشان داد (شکل ۴a). علاوه بر این، ۱۲ مورد از ۲۳ مورد در کوهورت توسعه یافته تحت WES و یا عمقی قرار گرفتند که به موجب آن ۳ مورد از ۳ مورد در IC2 دارای جهش‌های منفرد غالب ($VAF > 40\%$) یا چندین جهش مسیر RTK-RAS بودند. در نهایت، برای اعتبار سنجی بیشتر، ما از یک مجموعه داده توالی RNA منتشر شده از ۳۱ نمونه تشخیصی KMT2A-r نوزاد B-ALL (EGAS00001000246) بهره‌برداری کردیم. با ساخت و استفاده از یک طبقه‌بندی کننده KNN مبتنی بر بیان، به ۳۱ نوزاد برچسب‌های IC اختصاص داده شد که الگوهای بیان خاص خوشه‌ای و توزیع مشخصه شرکای همجوشی را خلاصه می‌کرد. باز هم نشان داده شد که IC2 دارای فرکانس قابل توجهی بالاتری از جهش‌های مسیر RTK-RAS نسبت به سایر ICها است، اگرچه تعداد جهش‌های ساب کلونال باید بیشتر با استفاده از یک توالی یابی عمیق تأیید شود. روش. به طور کلی، توالی یابی عمیق ما تنوع ساب کلونال قابل توجهی را در ALL نوزادان شناسایی کرد، که قبلاً گزارش شده است، اما کم‌تر از آن قدردانی شده است، و IC2 با پیش آگهی ضعیف را با بار قابل توجهی از ساب کلون‌های جهش یافته RTK-RAS مشخص کرد.

قبلی ۸،۱۲ سازگار بود که بار جهشی پایین ALL نوزاد را تأیید می‌کند. علاوه بر این، Deep-Seq در تمام ۶۱ مورد کشف با عمق متوسط ۹۹۸ انجام شد و ۹۳ جهش غیر خاموش در ۱۱ ژن شناسایی شد. در ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل شده با هر دو WES و WES، Deep-seq نتوانست ۶ مورد از ۱۹ (۳۲٪) جهش ساب کلونال را با فرکانس آلی متغیر (VAFs) کمتر از ۱۰٪ شناسایی شده با عمق دنباله تشخیص دهد، که نشان دهنده حساسیت ۱.۵ برابری بالاتر است. دنباله عمیق ما بر روی WES (جهش ۱۹ در مقابل ۱۳) برای تشخیص جهش ساب کلونال. علاوه بر این، ۲۹ تغییر تعداد کپی (CNAs؛ ۱.۵ در هر مورد) و دو تغییر ساختاری نامرتبط با KMT2A (SVs) با استفاده از WES و عمیق seq شناسایی شدند.

با ترکیب تمام جهش‌ها و CNAهای شناسایی شده توسط WES و Deep Seq، ژن‌های مسیر گیرنده تیروزین کیناز- RAS (RTK-RAS) اغلب تغییر می‌کردند (شکل ۴a). در این میان، KRAS (۲۱ مورد از ۶۱ مورد؛ ۴۳٪) و FLT3 (۲۰ مورد از ۶۱ مورد؛ ۳۳٪) و NRAS (۱۹ مورد از ۶۱ مورد؛ ۳۱٪) عود کننده‌ترین ژن‌ها بودند. به طور کلی، ۴۴ مورد از ۶۱ مورد (۷۲٪) دارای حداقل یک جهش در مسیر RTK-RAS بودند. در مقایسه با فرکانس‌های گزارش شده قبلی جهش‌های مسیر RTK-RAS در ALL نوزاد (۴۳-۴۷٪) ۸،۱۲ فرکانس ۱.۵ برابر بالاتر ما را می‌توان با حساسیت بالاتر عمق دنباله ما برای تشخیص جهش ساب کلونال توضیح داد. در واقع، ۴۵ جهش از ۹۳ (۴۸٪) جهش شناسایی شده توسط عمیق seq ساب کلونال با $VAFs < 10\%$ بودند (شکل ۴b).

هنگام مقایسه چشم اندازه‌های جهشی بین خوشه‌ها، پیش آگهی ضعیف IC2 با فراوانی ۱۰۰٪ (۱۴ مورد از ۱۴ مورد) جهش‌های مسیر RTK-RAS مشخص شد. به طور قابل توجهی، مشخص شد که IC2 تعداد قابل توجهی جهش‌های مسیر RTK-RAS را نسبت به سایر ICها جمع‌آوری کرده است (تست مجموع رتبه ویلکاکسون $P < 0.05$)، با میانگین ۲.۶ جهش (محدوده ۱-۶) در هر مورد. از IC2 (شکل ۴c). به همین ترتیب، مسیرهای MAPK و ERK پایین دست RAS به طور قابل توجهی در IC2 تنظیم مثبت شدند و IC2 را از زیرگروه IRX دیگر IC1 متمایز می‌کردند. شایان ذکر است، اگرچه نه مثبت بودن ساده جهش‌های مسیر



شکل ۴: چشم انداز جهشی زیر گروه های ALL نوزاد KMT2A-r

جهش های ژنی و CNA در زیر گروه های مختلف لوسمی نوزادان KMT2A-r. علائم اعداد (#) دو مورد را با MPAL نشان می دهد. VAF بهای جهش های مسیر RTK-RAS با عمق دنباله شناسایی شدند. ۰.۱ VAF با یک خط افقی چین نشان داده می شود. نمودارهای جعبه ای میانه و چارک اول اسوم را نشان می دهند. c تعداد جهش در مسیر RTK-RAS در هر مورد. همه ۶۱ مورد از گروه کشف شامل: IC1 (n=14)، IC2 (n=14)، IC3 (n=12)، IC4 (n=9) و IC5 (n=12). نمودارهای جعبه ای میانه و چارک اول اسوم را نشان می دهند. مقدار P کلی از آزمون کروسکال-والیس است. مقادیر P برای مقایسه های خوشنای زوجی از آزمون مجموع رتبه ای دو طرفه Wilcoxon است. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. مقادیر P خام به شرح زیر است: IC2 (P=0.034 در مقابل IC1)، 1.2 × 10⁻³ (IC2 در مقابل IC1)، 7.0 × 10⁻⁴ (IC2 در مقابل IC3)، 1.2 × 10⁻¹⁰ (IC5) و 1.2 × 10⁻¹⁰ (IC5) در مقابل IC4 بر اساس تعداد جهش های مسیر RTK-RAS.



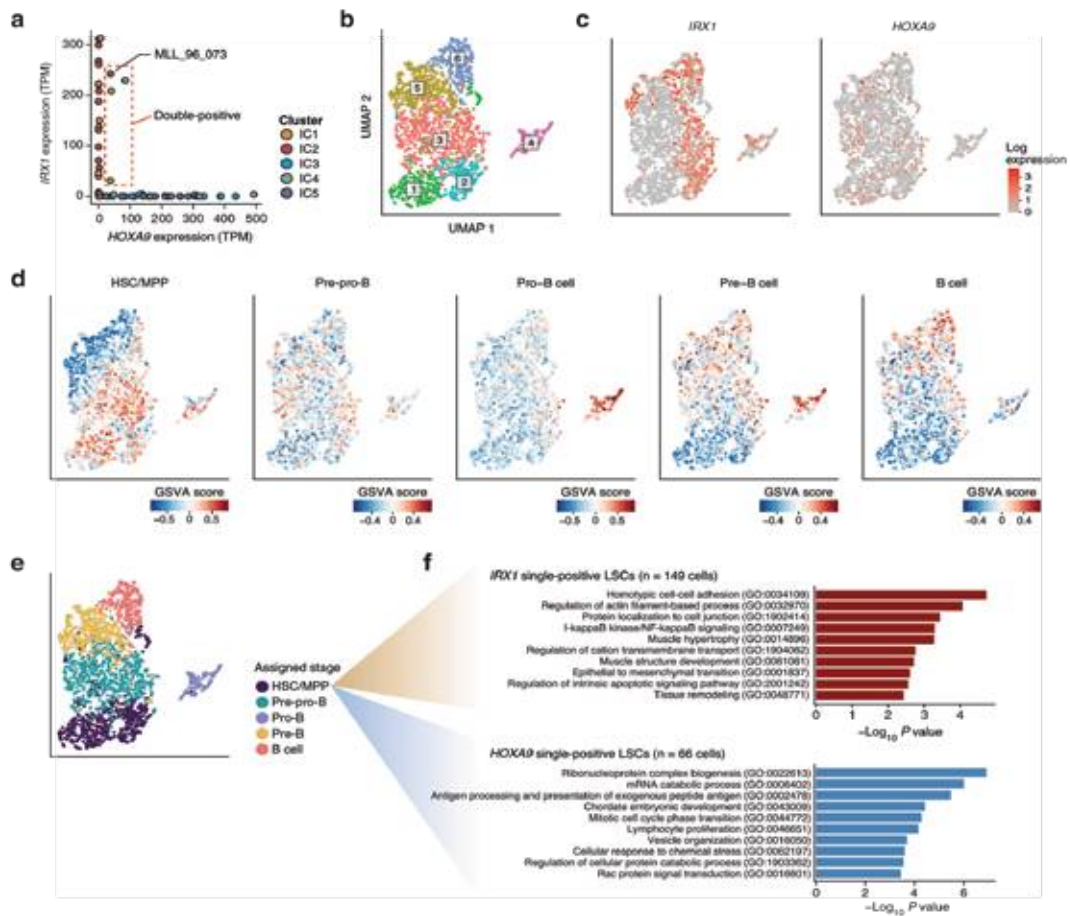
لوسمیک نشان داد، که جمعیت LSC آن نیز در مقایسه با LSCهای تک مثبت IRX1 MLL_96_073، تنظیم مثبت مارکرهای سلول لنفوئیدی فعال را نشان داد.

از آنجایی که این نتایج نشان می‌دهد که سوئیچ مولکولی IRX/HOXA به شدت در سطح تک سلولی کنترل می‌شود و با فنوتیپ‌های مختلف سلول‌های بنیادی مرتبط است، در مرحله بعد بررسی کردیم که آیا دوگانگی IRX/HOXA مستقیماً توسط انکوپروتئین‌های همجوشی KMT2A کنترل می‌شود. برای این منظور، ما رسوب ایمنی کروماتین را با توالی یابی (ChIP-seq) برای سه رده سلولی مشتق از ALL نوزاد (KMT2A-AFF1 نوع IRX، KMT2A-MLL1 نوع HOXA و KMT2A-AFF1 نوع HOXA) انجام دادیم، قابل توجه، در رده سلولی نوع IRX (PER-785)، سیگنال‌های تراشه‌های KMT2A، H3K4me3، H3K27ac و RNA پلیمراز II در جایگاه ژن IRX1 بسیار غنی شده بودند، اما در جایگاه خوشه‌ای HOXA غیرقابل شناسایی بودند، و بالعکس در HOXA. خطوط سلولی نوع (PER-494 و PER-784)، مطابق با پروفایل‌های بیان mRNA (شکل ۶).

در راستای اتصال مستقیم KMT2A به جایگاه IRX1، یک سنجش گزارشگر افزایش فعالیت پروموتور IRX1 و همچنین پروموتور HOXA9 را توسط یک همجوشی کایمریک KMT2A-Aff1 نشان داد که B-ALL30 مبتنی بر KMT2A-AFF1 را خلاصه و مدل می‌کند. نشان می‌دهد که KMT2A-AFF1 پتانسیل ایجاد مستقیم برنامه‌های IRX و HOXA را دارد. با تعریف تقویت‌کننده‌ها به‌عنوان جایگاه‌های H3K27ac مثبت و H3K4me3 کم یا منفی، تقویت‌کننده‌ها به طور قابل توجهی با بیان بالاتر ژن‌های هدف همبستگی داشتند، جایی که تقویت‌کننده‌های نوع HOXA در جایگاه‌های متعهدتر مربوط به تمایز/فعال‌سازی سلول B در مقایسه با تقویت‌کننده‌های نوع IRX غنی‌تر شدند. در مجموع، این مشاهدات نشان می‌دهد که همجوشی‌های KMT2A، به ویژه KMT2A-AFF1، ظرفیت انتخاب و فعال کردن برنامه IRX یا HOXA را دارند و در نهایت باعث ایجاد فنوتیپ‌های مختلف رشدی B-ALL می‌شوند.

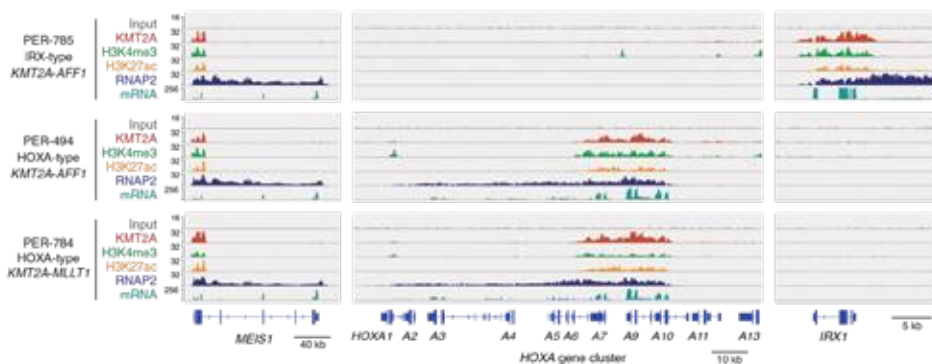
ادغام‌های KMT2A به طور مستقیم سوئیچ IRX/HOXA را برای القای فنوتیپ‌های بدخیم مختلف کنترل می‌کنند.

علیرغم الگوی بیان متقابل انحصاری فاکتورهای رونویسی IRX و HOXA، چهار مورد (۶.۶٪) هر دو IRX1 و HOXA9 را با رونوشت در میلیون $(TPM) > 10$ بیان کردند (شکل ۵a). برای درک بهتر مکانیسم‌های تنظیمی سطح سلولی محور IRX/HOXA، در مرحله بعد توالی‌یابی RNA تک سلولی را روی یک مورد مثبت در (MLL_96_073) IC2 انجام دادیم. از نمونه خون محیطی تشخیصی با محتوای سلول‌های لوسمی ۹۵ درصد، سلول‌های CD45 کم نور CD19+ لوسمی جدا شده و توالی‌یابی شدند (شکل ۵b). مطابق با مشاهدات حاصل از توالی‌یابی RNA حجیم، IRX1 و HOXA9 به روشی عمدتاً متقابل در سطح تک سلولی بیان شدند (شکل ۵c)، اگرچه بخش کوچکی (۸۹٪) از سلول‌های ۲۰۰۴، ۴.۴٪ از سلول‌های دوگانه مثبت) سلول‌ها باید برای وجود واقعی آنها بیشتر مورد بررسی قرار گیرند. آنالیز غنی‌سازی در سطح تک سلولی، خوشه‌هایی از سلول‌ها را با غنی‌سازی افتراقی امضاهای رشدی سلول B نشان داد (شکل ۵d)، که نشان می‌دهد بلاست‌های لوسمیک از یک بیمار منفرد حاوی ناهمگنی قابل توجهی است که رشد طبیعی را به سمت دودمان سلول B تقلید می‌کند. با شناسایی امضاهای مارکر خوشه، به هر خوشه یک مرحله رشدی مربوطه اختصاص داده شد (شکل ۵e). پیش‌بینی نزدیک‌ترین همسایه و استنتاج شبه‌زمان بر اساس اجداد سلول‌های B کبد جنین، سلسله‌مراتب رشدی را در بلاست‌های لوسمی تأیید کرد، جایی که سلول‌های لوسمی بیان متوالی نشانگرهای رشدی شبیه پیش‌سازهای سلول B طبیعی را نشان دادند، در حالی که بیان نابجا زودهنگام و/یا طولانی‌مدت را نیز نشان دادند. سایر تنظیم‌کننده‌های توسعه با در نظر گرفتن خوشه HSC/MPP به عنوان یک جمعیت سلول‌های بنیادی لوسمیک (LSC)، سلول‌های LSC تک مثبت HOXA9 تنظیم مثبت قابل توجهی در امضای سلول‌های لنفوئیدی تکثیر یافته و همچنین ژن‌های چرخه سلولی نشان دادند (شکل ۵f)، که LSCهای تک مثبت IRX1 را به عنوان یک LSCهای تک مثبت مشخص می‌کند. جمعیت LSC ساکن به همین ترتیب، یک مورد تک مثبت HOXA9 (MLL_96_015) تمایز سلسله‌مراتبی را در بلاست‌های



شکل ۵: آنالیز رونوشت تک سلولی یک نوزاد با ALL دو مثبت IRX/HOXA.

الف) نمایش دو بعدی بیان ژن IRX1 و HOXA9 در هر نمونه بیمار. مورد ALL دو مثبت (MLL_96_073) مشخص شده است.
 ب) تجسم UMAP ترنسکریپتوم تک سلولی MLL_96_073. خوشه‌ها با روش لوون شناسایی شدند.
 ج) مقادیر بیان عادی IRX1 و HOXA9 را در سلول‌های لوسمی MLL_96_073 ثبت کنید.
 د) غنی سازی در سطح تک سلولی امضاهای رشدی دودمان B محاسبه شده با الگوریتم GSVA.
 ه) استنباط مراحل رشد سلول‌های لوسمی از MLL_96_073. امضاهای مارکر برای خوشه‌های سلولی شناسایی شده در (ب) محاسبه شد و به عنوان مراحل رشد تعریف کننده خوشه اختصاص داده شد.
 و) اصطلاحات هستی شناسی ژن غنی شده در LSCهای IRX1 مثبت (n=149 سلول؛ پانل بالایی) و LSCهای HOXA9 مثبت (n=66 سلول؛ پانل پایینی).



شکل ۶: چشم انداز کروماتین مختلف زیرگروه‌های IRX و HOXA از رده‌های سلولی نوزاد KMT2A-r ALL.

پروفیل‌های تراشده‌ای KMT2A⁺H3K4me3⁺H3K27ac⁺ RNA پلیمراز II (RNAP2) در جایگاه‌های HOXA، MEIS1 و IRX1. پروفایل‌های توالی یابی RNA نیز به تصویر کشیده شده است.

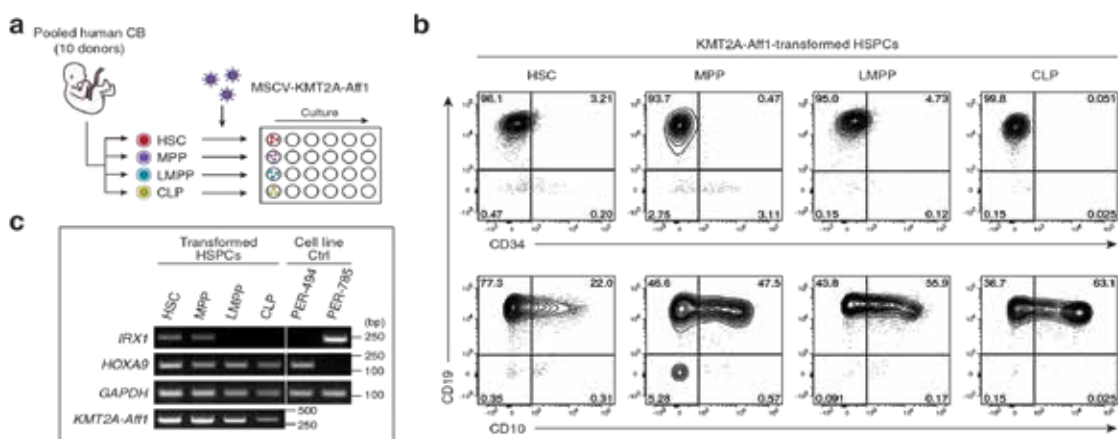
مسیر رشد لنفوئیدی از دست می‌رود و سلول‌های مبدا را به عنوان یک عامل کلیدی در تصمیم‌گیری سرنوشت IRX/HOXA توسط همجوشی‌های KMT2A دخیل می‌دانند.

بحث

این مطالعه پاتوبیولوژی مولکولی ناهمگن ALL نوزاد KMT2A-r را با استفاده از یک رویکرد کاملاً بدون نظارت و یکپارچه مولتی اومیکس نشان می‌دهد. از آنجایی که انواع سرطان‌ها از رویکردهای ادغام‌کننده اومیکس برای کشف زیرگروه‌های بیماری جدید مرتبط بالینی بهره‌مند شده‌اند، خوشه‌بندی دوگانه اومیکس مبتنی بر SNF ما به طور قوی پنج زیر گروه (IC1-5) را در ALL نوزادان KMT2A-r شناسایی کرد که به طور قابل توجهی با پیش‌آگهی بیمار از آنجایی که SNF شباهت‌های ثابت و مکمل بیمار به بیمار را در لایه‌های اومیکس متعدد شناسایی می‌کند، به احتمال زیاد رویکرد خوشه‌بندی مبتنی بر SNF ما با موفقیت شباهت‌های مشترک و متمایز بیمار را با اطلاعات رونوشت و متیلوم ادغام کرده است. به اندازه کافی متمایز برای خوشه بندی در آنالیز تک اومیکس. این پنج آی سی به طور کلی به دو زیر گروه طبقه بندی

ALL نوع IRX به عنوان مبدأ به HSCs/MPP بدون پرایم لنفوئیدی نیاز دارد.

در نهایت، از آنجایی که پروفایل‌های مولکولی بیماران رده‌های سلولی به طور مداوم بلوغ دودمان B متمایز ALL نوزادان نوع IRX و نوع HOXA را نشان می‌داد، ما پرسیدیم که آیا سلول‌های مبدا نقشی در تصمیم‌گیری سرنوشت با همجوشی KMT2A به سمت IRX داشتند یا خیر. یا زیرگروه HOXA. برای بررسی پتانسیل ایجاد ALL نوع IRX و HSCs، MPPs، HOXA، پیش‌سازهای چندتوان با لنف اولیه (LMPPs) و پیش‌سازهای لنفوئیدی معمولی (CLPs) از خون بند ناف انسان (CB) که با KMT2A-ff transduced شده بودند، خالص شدند. و در شرایط تقویت‌کننده لنفوئید کشت می‌شود (شکل 7a). در هفته 6، هر چهار محفظه سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز خون‌ساز (HSPC) به فنوتیپ B-ALL یا CD34-CD19+ و بیان متغیر CD10 (شکل 7b)، از جمله از CD10+ CLP‌های اصلی تبدیل شدند. به طرز جالبی، بلاست‌های لوسمی IRX1 مثبت فقط از HSC یا MPPها پدید آمدند، در حالی که بلاست‌های HOXA9 مثبت از هر چهار بخش HSPC پدید آمدند (شکل 7c). این نتایج نشان می‌دهد که پتانسیل لوسموژنیک نوع IRX زودتر از پتانسیل نوع HOXA



شکل 7: پتانسیل شروع کننده لوسمی نوع IRX در رشد سلول‌های B زودتر از پتانسیل نوع HOXA از بین می‌رود.

الف) طرح کلی شمانیک سنجش تبدیل CB در شرایط آزمایشگاهی. HSCهای CB مرتب شدند، با KMT2A-Aff1 انتقال داده شدند و روی سلول‌های استرومای MS-5 تحت شرایط لنفاوی کشت داده شدند.

ب) نمودارهای فلوسیتومتری HSPCهای تبدیل شده با IRX1 RT-PCR. c) RT-PCR IRX1 و HOXA9 در HSPCهای تبدیل شده. رده‌های سلولی نوع HOXA (PER-494) و نوع IRX (PER-785) به عنوان کنترل نشان داده شده اند. آزمایش‌ها به طور مستقل سه بار تکرار شدند و نتایج نماینده نشان داده شده است. داده‌های منبع به عنوان یک فایل داده منبع ارائه می‌شوند.

می‌شود. روش تشخیص جهش با میانگین عمق توالی ~1000. از آنجایی که ALL نوزاد به ویژه با جهش‌های ساب کلونال RTK-RAS غنی شده است و نتایج ما سهم بالقوه تنوع ساب کلونال را در میزان عود بالاتر نشان می‌دهد، تشخیص دقیق جهش‌های ساب کلونال RTK-RAS بر اساس توالی یابی عمیق از اهمیت ویژه ای برای تصمیم گیری بالینی برخوردار است.

توسعه اخیر ترانس کریپتومیکس تک سلولی همچنین بینش‌هایی را در مورد سلول‌های مختلف منشاء زیرگروه‌های ALL نوزادان ارائه می‌دهد. با استفاده از مجموعه‌های پیچیده ژنی مشتق شده از اطلس‌های سلولی تکاملی، تجزیه و تحلیل ما ضعیف‌ترین توسعه خونساز و B لئوسازی IC2 با پیش آگهی ضعیف و همچنین غنی‌سازی مشترک امزاهای همتا-اندوتلیال اولیه در زیرگروه (IC1 و IC2) IRX را نشان داد. این نتایج همراه با عدم حضور تقویت‌کننده‌های دودمان سلولی B در یک رده سلولی زیرگروه IRX، سلول‌های نابالغ‌تر منشأ زیرگروه IRX را در مقایسه با زیرگروه HOXA نشان می‌دهد. در واقع، لوسمی نوع IRX برای تبدیل CB توسط KMT2A-Aff1، بر خلاف زیرگروه HOXA، که می‌تواند از LMPP یا CLP ناشی شود، به HSCs/MPP‌های بدون پرایم لنفوئیدی نیاز داشت. از آنجایی که عملکرد KMT2A نوع وحشی و ترکیب شده به روشی وابسته به بافت سلولی و KMT2A-Aff1 فعالیت پروموتور هر دو IRX1 و HOXA9 را در شرایط مستقل از زمینه سنجش‌های گزارشگر افزایش می‌دهد، حالت سلولی منشأ ممکن است یک عامل تعیین کننده حیاتی برای IRX باشد. تصمیم HOXA/ CB HSCs/MPP انکوپروتئین KMT2A-AFF1. اگرچه HSCs/MPP باعث ایجاد هر دو نوع IRX و نوع ALL HOXA شد، با توجه به منشأ درون رحمی بازآرایی KMT2A6,7 و امزاهای مختلف اپی ژنتیک بین کبد جنینی و CB HSCs/MPP، HSPCs36، کبد جنین ممکن است کاندیدهای امیدوارکننده تری باشند. مستعد ابتلا به ALL نوع IRX.

یکی دیگر از عوامل تعیین کننده پروفایل‌های مولکولی در ALL KMT2A-r ژن‌های شریک همجوشی هستند. تا به امروز، بیش از ۹۰ شریک فیوژن گزارش شده است که از این میان سه ژن شریک اصلی تقریباً ۹۰

می‌شوند: زیرگروه IRX و زیرگروه HOXA. ولین بار توسط ترنتین و همکارانش به عنوان نوزادان مبتلا به ALL مبتنی بر KMT2A-AFF1 فاقد بیان مشخصه ژن‌های HOXA شناسایی شد. در طول دهه گذشته، چندین مطالعه پروفایل بیان ژن این زیرگروه IRX کم HOXA را در ALL نوزادان KMT2A-AFF1 تأیید کرده‌اند و میزان عود بالاتر آن نیز گزارش شده است. در واقع، خوشه‌بندی ساده مبتنی بر بیان موارد کشف ما، زیرساخت IRX/HOXA را تأیید کرد، در حالی که وجود نادر موارد غیر KMT2A-AFF1 را در این زیرگروه نشان داد. نکته قابل توجه، با این حال، خوشه‌بندی ادغام‌کننده omics ما زیرگروه IRX را به دو زیرگروه مجزا (IC1 و IC2) با پیش‌آگهی‌های بسیار متمایز، که تا به امروز هرگز شرح داده نشده‌اند، تفکیک کرد. مشخص‌ترین ویژگی‌های ژنومی IC2 با پیش‌آگهی ضعیف، فراوانی ۱۰۰ درصدی جهش‌های مسیر RTK-RAS و ناهمگنی آشکار درون نمونه با بار بالای زیرکلون‌های جهش یافته RTK-RAS است. اخیراً Ma و همکاران. نشان داده‌اند که کلون مؤسس عود در B-ALL اطفال اغلب از یک ساب کلون کوچک در هنگام تشخیص منشأ می‌گیرد و جهش‌های مسیر RAS ساب کلونال با VAF‌های کم ۲٪ می‌توانند گسترش یافته و عود کنند. بنابراین، وجود چندین ساب کلون جهش یافته RTK-RAS در IC2 ممکن است شانس این را افزایش دهد که حداقل یکی از این ساب کلون‌های جهش یافته از طریق درمان شکسته شود و منجر به عود شود. در واقع، توالی‌یابی ما از یک نمونه عود جفتی از یک مورد (UT_INF_001) IC2 نشان داد که دو جهش RTK-RAS در هنگام تشخیص به عود در این مورد کمک کرده‌اند. با این حال، ناپدید شدن جهش‌های RTK-RAS در زمان عود نیز گزارش شده است. علاوه بر این، مطابق با بار بالای جهش‌های RTK-RAS، مسیرهای MAPK و ERK پایین‌دست RAS به طور قابل توجهی در IC2 نسبت به IC1 تنظیم مثبت شدند، که نشان‌دهنده کاربرد بالقوه داروهای هدف‌گیری، مانند مهارکننده‌های MEK، برای این زیرگروه کشنده است. مهمتر از همه، کشف این بار جهش RTK-RAS بسیار بالا در IC2 و همچنین فراوانی بالاتر جهش‌های مسیر RTK-RAS در کل گروه ما نسبت به مطالعات قبلی (۷۲٪ در مقابل ۴۷-۴۳٪) به عمق ما نسبت داده

پروفایل‌های متیلاسیون نسبتاً مشابهی را بین نوزادان KMT2A-germline و KMT2A-MLLT3 نشان دادند که ممکن است به دلیل وضعیت رایج -pre-B KMT2A-germline و MLLT3 ALL نوزادان باشد. علاوه بر این، IC4) ALL نوزاد مبتنی بر -KMT2A MLLT3 نمایه مشخصی از تغییرات ژنتیکی همکاری با CNAهای مکرر و جهش در PAX5 و تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی (CDKN2A/B و CCND3) را نشان داد که نشان‌دهنده پاتوژنز منحصر به فرد این زیرگروه KMT است.

به طور خلاصه، آنالیز اومیکس و اعتبار سنجی عملکردی ما به طور جامع ناهمگنی مولکولی ALL نوزاد KMT2A-r را نشان می‌دهد، که توسط مناظر جهشی متمایز، مراحل متناظر تمایز طبیعی متوقف شده و سلول‌های بالقوه منشأ نشان داده می‌شود. نکته قابل توجه، بالاترین بار جهشی RTK-RAS نشان‌دهنده نابالغ ترین و مقاوم ترین موارد است، و در مورد اهمیت طبقه بندی مبتنی بر ژنومیک آینده نگر و استراتژی‌های درمانی بالقوه ای که این مسیر را هدف قرار می‌دهند، استدلال می‌کند، اگرچه مطالعات پیش‌بالینی بیشتر ضروری است.

منبع:

<https://www.nature.com/articles/s41467-022-32266-4>

درصد از ALL نوزادان KMT2A-r بر عهده دارند: MLLT1 (22%)، AFF1 (49%) یا MLLT3 (16%) گروه اکتشاف ما (n=61) به خوبی توزیع سیتوژنتیک واقعی را نشان داد، که شامل ۳۲ مورد، KMT2A-AFF1 (52%)، KMT2A-MLLT3 (26%) و KMT2A-MLLT1 (15%) بود. قابل ذکر است، آنالیز بدون نظارت ما همبستگی‌های قابل توجهی را بین پروفایل‌های مولکولی مولتی اومیکس و شرکای همجوشی، به ویژه در زیرگروه HOXA نشان داد: MLLT3 (IC4)، MLLT1 (IC3) و AFF1 (IC5). بر خلاف نوع فرعی IRX، سه IC نوع HOXA غنی‌سازی متغیری از امضاهای پیش‌ساز سلول B را نشان دادند: امضای pre-pro-B در IC3 و IC5، و امضای pre-B در IC4. مراحل مختلف تمایز دودمان B متوقف شده ممکن است به قابلیت‌های آموزشی مختلف ترکیبات مختلف KMT2A نسبت داده شود، همانطور که توسط یک سیستم مدل گزارش شده پیشنهاد شده است، که در آن HSPCهای CB انسانی از نظر ژنتیکی به pro-B و pre-B-ALL تبدیل شدند. KMT2A-Aff1 و KMT2A-MLLT3 به ترتیب. یک بررسی اخیر موردی که بازآرایی مجدد KMT2A-MLLT3 را در بیماران بالغ بسیار نادر B-ALL گزارش می‌کند، ترجیح آموزنده KMT2A-MLLT3 را برای بلوغ دودمان B نشان می‌دهد. علاوه بر این، دو مطالعه اخیر پروفایل متیلاسیون DNA،