

نشریه فارماکوژنومیک

وفناوری‌های  
امیکس



فصلنامه پزشکی / سال چهارم / شماره سیزدهم / قیمت: ۱۵۰۰۰۰ ریال / پاییز ۱۴۰۱ / شماره شاپا ۷۲۳۶-۲۶۷۶



ژنوم شما بر نحوه پاسخگویی به داروها مؤثر است.



صاحب امتیاز:

شرکت دانش بنیان گروه توسعه فناوری پزشکی آمیتیس ژن

مدیر مسئول: دکتر رویا امیری نژاد

سرمدیر: مهندس سیده نیره مصلحی

مدیر اجرایی و طراح: فاطمه محمدی پور

طراح: فاطمه محمدی پور

صفحه آرا: فریبا دولت آبادی

ویراستاری و ارزیابی مقالات: زهرا انتشاری

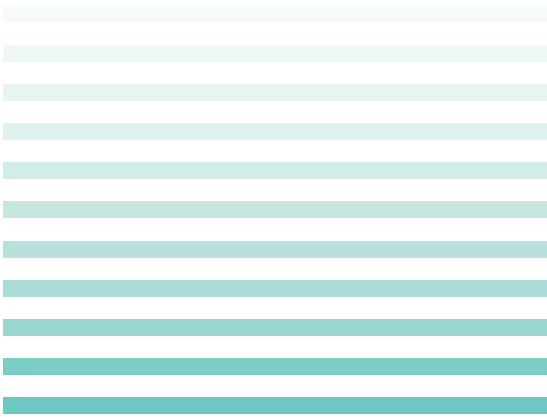
اعضای هیئت تحریریه در کارگروه‌ها (به ترتیب حروف الفبا):  
دکتر محمدرضا اکبری، دکتر ملیحه انتظاری،  
دکتر ناصر پارسا، دکتر سلام حیدری نژاد،  
دکتر عادل حیدری نژاد، دکتر علی اصغر رحیمی،  
دکتر رضا رفوگران، دکتر ندا سرای گرد افشاری،  
دکتر حسن سعادت، دکتر رضا شیرکوهی،  
دکتر محمد علی صارمی، دکتر جمشید مولایی،  
دکتر بهار نقوی، دکتر رضا نکوئیان، دکتر مجید نیک پی،  
دکتر سید مسعود هوشمند، دکتر محمود یعقوبی

شماره تماس: ۸۸۹۸۵۲۹۳ (۰۲۱)

آدرس: تهران، ابتدای خیابان ایتالیا، پلاک ۲، طبقه ۱، واحد ۱

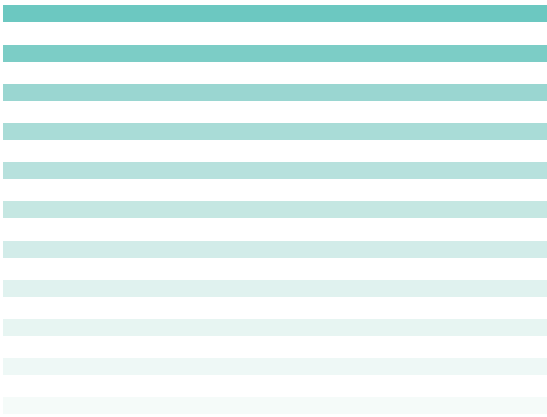
وب سایت: [WWW.PGOTjournal.com](http://WWW.PGOTjournal.com)

ایمیل: [info@PGOTJournal.com](mailto:info@PGOTJournal.com)



## فهرست مطالب:

امضای مولتی اومیکس از اکسپوزوم انسان در اوایل زندگی .....	۴
شناسایی زیرگروه‌های استنوسارکوم با پیش آگهی متمایز و درمان طبقه‌بندی شده با استفاده از آنالیزهای مولتی اومیکس .....	۲۲
تعیین مشخصات مولکولی مرتبط با اتوفازی با هدف درمان با استفاده از آنالیز مولتی اومیکس .....	۳۸
آنالیز مولتی اومیکس زیرگروه نابالغ مبتلا به RAS بسیار مقاوم از لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوزاد.....	۵۴
کاربرد فارماکوژنتیک در انکولوژی .....	۶۸



# امضای مولتی اومیکس از اکسپوزوم انسان در اوایل زندگی

## چکیده

برخورد با عوامل محیطی در اوایل زندگی نقش مهمی در سلامت طول زندگی ایفا می کند، با این حال فنوتیپ های مولکولی ای که تحت اثرات محیطی هستند، به خوبی شناخته شده نیستند. ما در پروژه اکسپوزوم اولیه زندگی انسان (HELIX)، ارتباط اکسپوزوم فردی متشکل از بیش از ۱۰۰ مواجهه شیمیایی، فضای باز، اجتماعی و سبک زندگی در دوران بارداری و کودکی را با پروفایل مولتی اومیکس بررسی می کنیم. ما ۱۱۷۰ ارتباط را شناسایی کردیم که ۲۴۹ مورد آن در بارداری و ۹۲۱ در دوران کودکی بود و پاسخ های بیولوژیکی بالقوه را نشان می دادند. اثرات محیطی زمان بارداری، از جمله سیگار کشیدن مادر، کادمیوم و مولیبدن، عمدتاً با تغییرات متیلاسیون DNA کودک مرتبط است. در مقابل، اثرات محیطی دوران کودکی با ویژگی هایی در تمام لایه های omics مرتبط است. منبع جامع و منحصربه فرد ما از همه ارتباطات (<https://helixomics.isglobal.org>) برای هدایت تحقیقات آینده در مورد آثار بیولوژیکی اکسپوزوم اولیه زندگی مفید خواهد بود.

## مقدمه

اگرچه سهم محیطی در ریسک بیماری ۹۰-۷۰ درصد تخمین زده می شود، بخش بزرگی از عوامل خطرزای محیطی ناشناخته باقی مانده یا به خوبی تعریف نشده اند. بیش از یک دهه پیش، اصطلاح "اکسپوزوم" ابداع شد تا تمام عوامل محیطی (یعنی عوامل غیر ژنتیکی) را که انسان در طول زندگی در معرض آنها قرار می گیرد، در بر بگیرد. از نظر تاریخی، مطالعات بهداشت محیطی تقریباً به طور انحصاری بر روی عواملی مانند آلودگی هوا، سرب



طاهره مهدی زاده<sup>۱</sup>

۱-کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی بیومتریال، دانشگاه مازنجان

رویان، مازندران، ایران

پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس ژن



دود تنباکو بیشترین بررسی را دارد. تا حدی کمتر، سایر مواجهه‌های مختلف، از فلزات و آلودگی هوا گرفته تا عوامل اجتماعی-اقتصادی، با متیلاسیون مرتبط هستند و در پایگاه‌های داده عمومی فهرست‌بندی شده‌اند (<http://www.ewascatalog.org>). اگرچه علائم اپی‌ژنتیک، رونویسی ژن و در نتیجه پروتئوم را تنظیم می‌کند، رابطه‌ی بین آنها و اکسپوزوم کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. متابولوم، که می‌تواند پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فعالیت میکروبیوم، و همچنین درونی‌سازی مستقیم مواجهه‌ها را منعکس کند، در تحقیقات اکسپوزومی مورد توجه ویژه قرار گرفته است. در این کار، هدف ما این بود که ارتباط اکسپوزوم اولیه زندگی را که در ۱۳۰۱ جفت مادر-کودک پرژه‌ی HELIX اندازه‌گیری شد، با داده‌های فنوتیپ مولکولی عمیق ارزیابی شده در دوران کودکی را بررسی کنیم. با مستندسازی سیستماتیک همه ارتباط بین اکسپوزوم و فنوتیپ‌های مولکولی، ما منبع منحصر به فردی (<https://helixomics.isglobal.org>) برای شناسایی بیومارکرهای جدید و اثرات بیولوژیکی اولیه در طول دوره‌های زندگی آسیب‌پذیر فراهم کردیم.

## نتایج

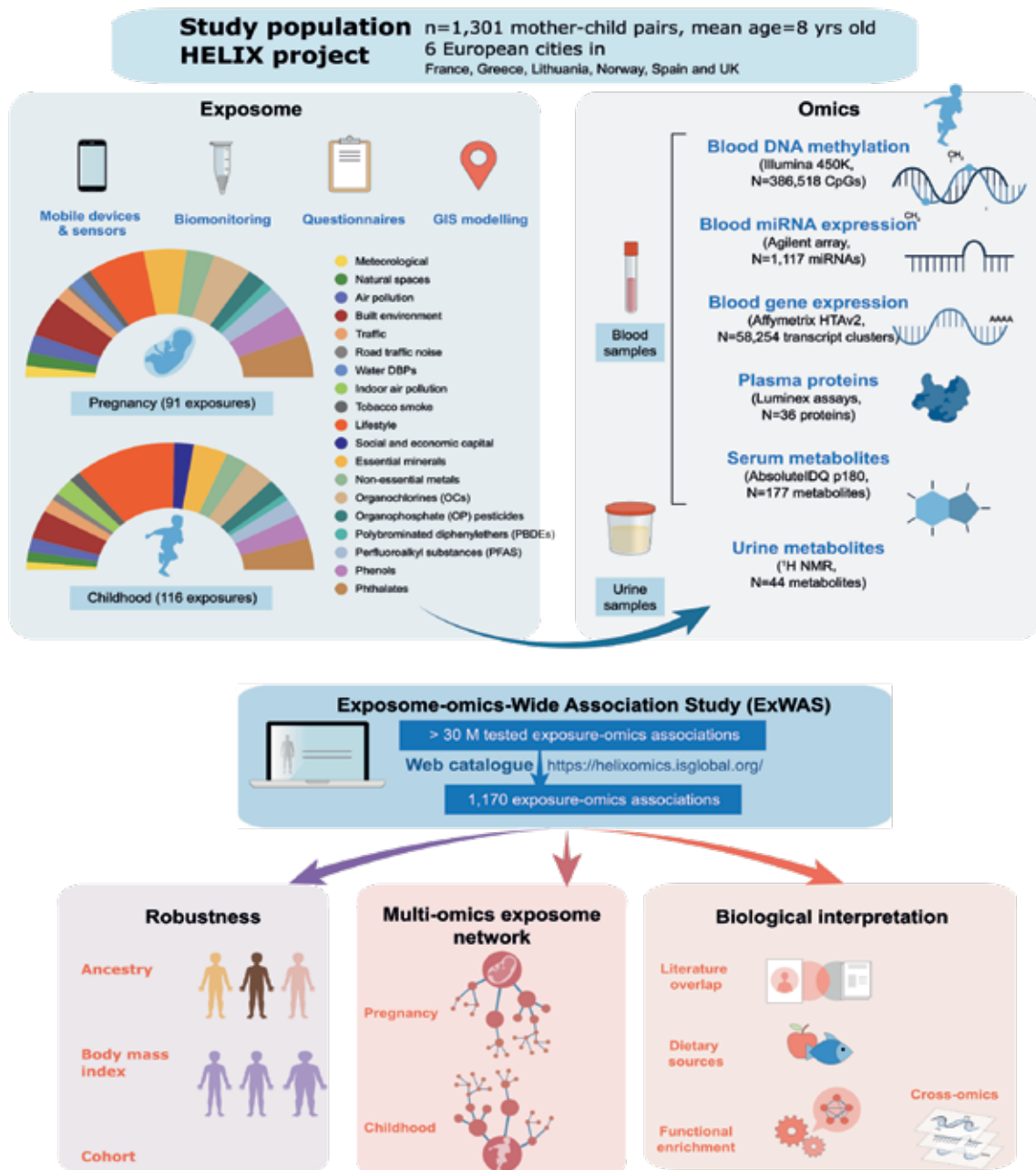
### ایجاد اکسپوزوم اولیه و فنوتیپ‌های مولتی امیکس در کودکان HELIX

ما اکسپوزوم اولیه زندگی را در ۱۳۰۱ جفت مادر-کودک از پروژه HELIX، یک مطالعه کوهورت مبتنی بر جمعیت طولی چند مرکزی در ۶ مکان در اروپا (اسپانیا، انگلستان، فرانسه، لیتوانی، نروژ و یونان) ارزیابی کردیم (شکل ۱). ۹۱ مواجهه با عوامل محیطی را در دوران بارداری و ۱۱۶ مورد را در دوران کودکی زمانی که کودکان بین ۶ تا ۱۱ ساله بودند اندازه‌گیری کردیم. قرار مواجهه با عوامل محیطی در نوزده گروه شامل موارد رو به رو دسته بندی شد: عوامل هواشناسی، فضاهای طبیعی، آلودگی هوای داخلی و خارجی، محیط ساخته شده، ترافیک جاده، صدا، محصولات جانبی ضد عفونی آب، مصرف دخانیات، عوامل سبک زندگی (رژیم غذایی، فعالیت بدنی)، سرمایه اجتماعی و اقتصادی، مواد معدنی ضروری، آلاینده‌های شیمیایی (فلزات غیر ضروری، کلرهای ارگانیک، آفت کش‌های ارگانوفسفره، دی

یا آفت کش‌ها متمرکز بود. اصل اساسی مفهوم اکسپوزوم فراخوانی برای یک رویکرد جامع و سیستماتیک برای ارزیابی اثرات محیط بر سلامت است. علاوه بر این، اکسپوزوم نه تنها شامل مواجهه‌های خارجی، بلکه پاسخ‌های بیولوژیکی داخلی به این مواجهه‌ها از طریق بررسی داده‌های مولکولی با ابعاد بالا است.

تشخیص زودهنگام تغییرات فیزیولوژیکی در سطح مولکولی مربوط به برخورد با عوامل محیطی قبل از تظاهر علائم بالینی در جمعیت‌های سالم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. چنین اطلاعاتی ممکن است از محتلم بودن بیولوژیکی ارتباطات محیطی-سلامتی در مطالعات جمعیت پشتیبانی کند، به درک مکانیسم‌های سم‌شناسی کمک کند یا توضیح دهد که چگونه مواجهه‌های چندگانه ممکن است بر اساس تأثیر مشترک آنها بر مسیرهای بیولوژیکی (مانند التهاب) یا عامل محیطی (مانند رژیم غذایی) گروه‌بندی شوند. همچنین می‌تواند به شناسایی بیومارکرهایی برای پیش‌بینی مواجهه‌های فعلی و گذشته کمک کند. مطالعات یکپارچه پروفایل omics شخصی، جمع‌آوری داده‌های با کارایی بالا در لایه‌های مولکولی متعدد، نشان داده‌اند که پروفایل‌های مولکولی شخصی ممکن است برای ارزیابی خطر بیماری، تشخیص شرایط اولیه بالینی و شروع استراتژی‌های پیشگیرانه مفید باشد. رشد جنین و دوران کودکی پیامدهای مادام‌العمر دارد و برای بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله چاقی، بیماری‌های قلبی متابولیک اختلالات کمبود توجه و بیش‌فعالی (ADHD) و عملکرد ریه حیاتی است. بنابراین، زندگی اولیه دوره مهمی برای مطالعه محرک‌های بیولوژیکی اولیه بیماری است: مواجهه با عوامل محیطی در طول این دوره‌های آسیب‌پذیر رشدی ممکن است اثرات برجسته‌ای در سطح مولکولی داشته باشد که ممکن است تا بزرگسالی از نظر بالینی غیرقابل تشخیص باقی بماند.

عمدتاً مکانیسم‌های مولکولی حاصل از تأثیر عوامل محیطی از طریق لنز اپی‌ژنتیک مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. تصور می‌شود که اپی‌ژنوم پاسخ‌های سلولی به آشفتگی‌های محیطی را تنظیم می‌کند و حافظه و انعطاف سلولی را فراهم می‌کند. در میان تمام علائم اپی‌ژنتیک، متیلاسیون DNA بیشترین مطالعه را در تنظیمات اپیدمیولوژیک دارد. و در بین همه مواجهه‌ها،



شکل ۱: مروری بر مطالعه مولتی اومیکس اکسپوزوم اولیه

هزار و سیصد و یک جفت مادر و کودک از پروژه HELIX در این مطالعه شرکت کردند. اکسپوزوم اولیه در دوران بارداری و کودکی با استفاده از روش های مختلف ارزیابی شد. نمودارهای دایره ای نشان دهنده نسبت مواجهه های ارزیابی شده در هر خانواده است. صفات مولکولی در کودک با استفاده از شش پلتفرم omics مختلف با استفاده از خون (سلول های خون، سرم یا پلاسما) یا ادرار اندازه گیری شد. سپس، یک مطالعه Exposome-omics-Wide Association (ExWAS) انجام شد، که امیکس تاثیرات محیطی را یک به یک مدلسازی کرد و برای عوامل مخدوش کننده تنظیم کرد. تمام نتایج خلاصه شده را می توان در <https://helixomics.isglobal.org/> یافت. در مجموع، ۱۱۷۰ رابطه ی اومیکس- تاثیرات محیطی آستانه های تصحیح چندگانه تست را پشت سر گذاشتند. پس از بررسی استحکام این ارتباط با اجداد، BMI و گروه، آنها از طریق اومیکس- تاثیرات تجسم شدند. در نهایت، ما تفسیر بیولوژیکی از جمله همپوشانی با مقالات قبلی، شناسایی منابع غذایی، تجزیه و تحلیل غنی سازی عملکردی و مقایسه های متقابل بیولوژیکی و ماتریس متقابل را انجام دادیم.



برای شناسایی ارتباط آماری معنی دار مواجهه-اومیکس، تصحیح برای مقایسه‌های چندگانه برای هر مواجهه در هر مجموعه داده اومیکس اعمال شد. برای این منظور، ما ارتباطات قابل توجهی را در نظر گرفتیم که با مقادیر  $p$  زیر نرخ کشف نادرست (FDR) 0.05 برای اومیکس در سطح ژنوم، و زیر یک نسخه اصلاح شده از برش Bonferroni برای پروتئین‌ها و متابولیت‌ها (که شامل تقسیم می‌شود) مقدار  $p$  اسمی توسط تعداد موثر تست (ENT) تعیین شده از ساختار همبستگی مجموعه داده با این معیارها، ۱۱۷۰ ارتباط مواجهه-اومیکس از نظر آماری معنی دار بود. و فنوتیپ‌های مولکولی در مجموع ۲۴۹ شامل ۵۲ مواجهه منحصر به فرد و ۲۰۹ ویژگی مولکولی منحصر به فرد را شامل می‌شود، در حالی که ۹۲۱ ارتباط با اکسپوزوم دوران کودکی با ۸۴ مواجهه منحصر به فرد و ۴۵۴ ویژگی مولکولی منحصر به فرد مطابقت دارد.

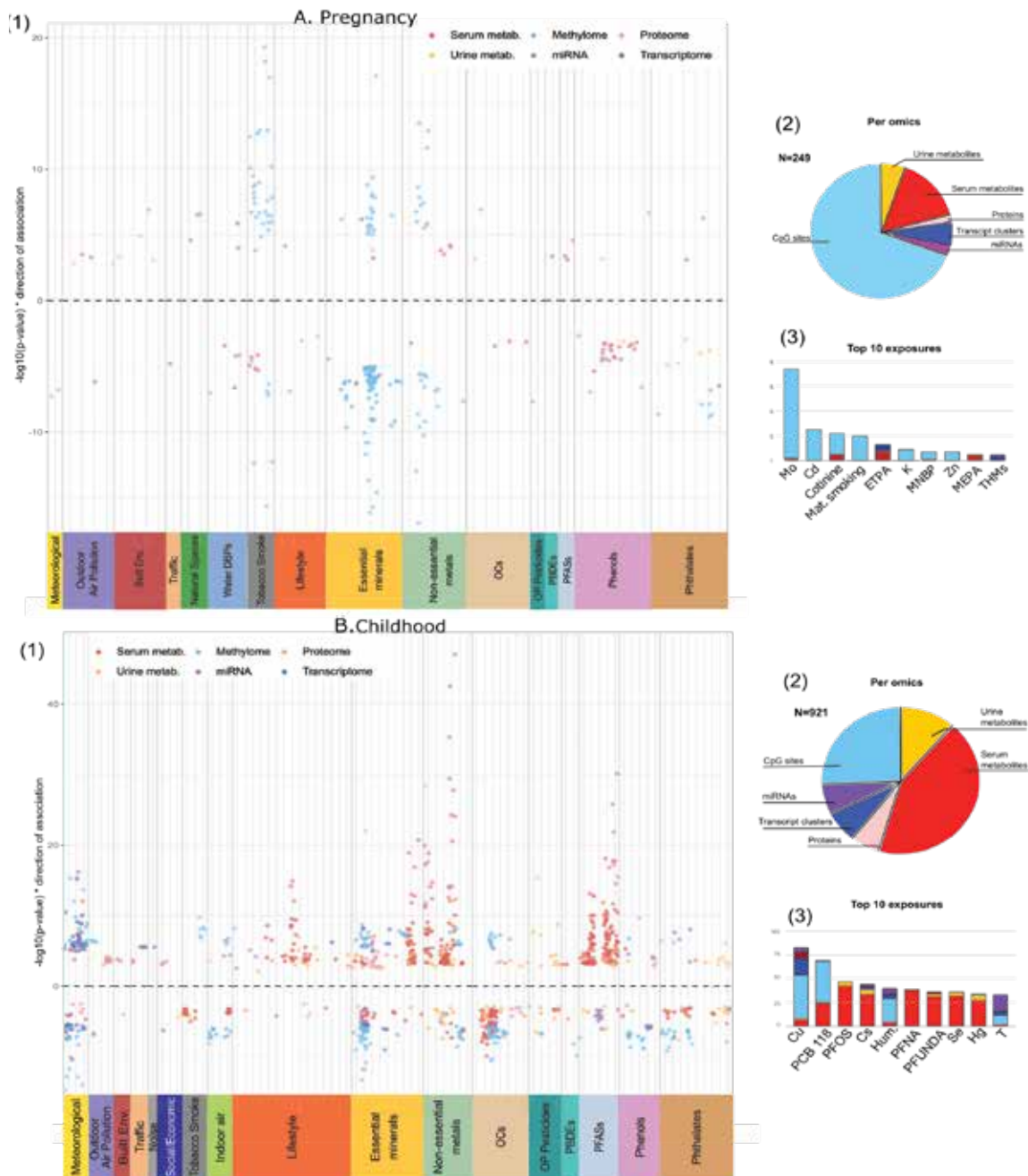
نمودارهای میامی، ارتباط اومیکس-تأثیرات محیط را با خانواده عوامل محیطی و لایه مولکولی نشان می‌دهند (شکل 2A1، B1). اکسپوزوم حاملگی عمدتاً با متیلاسیون DNA کودک همراه بود (۷۰٪ از ارتباط‌های مشاهده شده) (شکل 2A2). در مقابل، اکسپوزوم دوران کودکی با تمام لایه‌های مولکولی همراه بود، با متابولوم سرم بالاترین تعداد ارتباط را نشان داد (۴۳٪ از ارتباط‌های مشاهده شده) (شکل 2B2). مواجهه‌ها محیطی دوران بارداری در اکثر ارتباطات شامل مولیدن (Mo)، کادمیوم (Cd)، کوتینین (بیومارکر مواجهه با تنباکو) و سیگار کشیدن مادر (داده‌های پرسشنامه) بود (شکل 2A3). مواجهه دوران کودکی با بیشترین ارتباط شامل مس (Cu)، ترکیبات کلر آلی (PCB ۱۱۸)، مواد پرفلوئوروآلکیل (PFOS)، سزیم (Cs) و رطوبت (شکل 2B3) بود. سایر مواجهه‌ها مانند آلودگی هوای بیرون، محیط ساخته شده، ترافیک جاده‌ای و سر و صدا، ارتباط کمی را نشان دادند. از بین ۸۳ مواجهه اندازه‌گیری شده در دوران بارداری و دوران کودکی، ۱۴ جفت مواجهه-اومیکس در دو دوره از نظر آماری معنی‌دار بودند: 6CpG مربوط به سیگار کشیدن، و چندین اسید چرب با زنجیره بلند مربوط به کوتینین، هگزا کلروبنزن (HCB)، پرفلوراندکانات. (PFUnDA) و جیوه.

فنیل اترهای پلی برومینه، مواد پرفلوئوروآلکیل، فنل‌ها و فتالات‌ها (شکل ۱). سطوح مختلف مواجهه عوامل محیطی در گروه‌های HELIX در جاهای دیگر بیشتر توضیح داده شده است. ابزار ارزیابی میزان مواجهه با عامل محیطی شامل اندازه‌گیری مبتنی بر طیف‌سنجی جرمی بیومارکرهای برخورد با مواد شیمیایی در ادرار و خون، مانیتورهای مواجهه، سنجش از دور و روش‌های مکانی، و مصاحبه‌های مبتنی بر پرسشنامه بود.

برای همین کودکان (بین ۶ تا ۱۱ سال) فنوتیپ مولکولی مولتی اومیکس عمیق، از جمله اندازه‌گیری متیلاسیون DNA خون (450K، Illumina)، بیان ژن خون (HTA، Affymetrix، v2.0)، بیان miRNA خون را انجام دادیم (شکل ۱). در حالی که متیلاسیون DNA خون و ترانس کریپتومیکس در کل ژنوم با 58254 CpGs، 386518 خوشه رونوشت (TCs) و 1117 miRNA اندازه‌گیری شد. پروتئین‌های پلاسما شامل ۳۶ سیتوکین، آپولیپوپروتئین و آدیپوکین بود. متابولیت‌های سرم (N=177) شامل اسیدهای آمینه، آمین‌های بیوژنیک، آسید کارنیتین‌ها، گلیسروفسفولیپیدها، اسفنگولیپیدها و مجموع هگزوزها بودند که طیف وسیعی از آنالیت‌ها و مسیرهای متابولیک را در یک سنجش هدفمند پوشش می‌دهند. متابولیت‌های ادرار (N=44) عمدتاً شامل اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، نیکوتین‌امیدها، آمین‌ها و فنل‌های مشتق شده از میکروبی روده می‌شوند. حدود ۹۱ درصد از کودکان داده‌های مولکولی حداقل از ۴ پلتفرم اومیکس را داشتند.

### نتایج مطالعه همبستگی گسترده اکسپوزومی - اومیکس (ExWAS)

ما ابتدا به طور سیستماتیک ارتباط بین هر متغیر محیطی و هر ویژگی مولکولی را به صورت متوالی و مستقل از طریق ExWAS با استفاده از یک رویکرد آماری مشابه با مطالعات ارتباطات گسترده ژنوم (GWAS) آزمایش کردیم (شکل ۱). به طور کلی، بیش از ۳۰ میلی‌متر ارتباط تأثیر محیطی-اومیکس را از طریق مدل‌های رگرسیون خطی تنظیم‌شده برای مجموعه‌ای از عوامل مخدوش‌کننده آزمایش کردیم: گروه، سن کودک، جنس، توده بدنی (zBMI)، اصل و نسب، تحصیلات مادر و متغیرهای کمی خاص اومیکس.



شکل ۲: نتایج مطالعه همبستگی گسترده Exposome-omics (ExWAS) برای اکسپوزوم‌های بارداری و دوران کودکی.

خلاصه‌ای از ارتباط بین اکسپوزوم حاملگی و چند آمیکس اندازه گیری شده در ۱۳۰۱ کودک: طرح میامی (۱)؛ نمودارهای دایره‌ای که نسبت ارتباط با لایه‌های مولکولی مختلف را نشان می‌دهد (۲). و ۱۰ تاثیر محیطی بارداری (۳). B خلاصه‌ای از همبستگی‌های اومیکس اکسپوزوم-کودک در دوران کودکی: طرح میامی (۱)؛ نمودارهای دایره ای که نسبت ارتباط با لایه‌های مولکولی مختلف را نشان می‌دهد (۲) و ۱۰ مواجهه برتر دوران کودکی (۳). در طرح‌های میامی، هر نقطه مربوط به یک ارتباط که آمیکس- تاثیرات محیطی است. محورهای y مقادیر  $-\log_{10} p$  ضرب در جهت ارتباط (علامت ضریب رگرسیون) را نشان می‌دهند. و محور x تاثیرات محیطی را در امتداد ۱۹ خانواده تاثیرات محیطی گروه‌بندی می‌کند و هر خط عمودی نشان‌دهنده یک تاثیر محیطی جداگانه با مقداری ارزش برای جلوگیری از همپوشانی نقاط است. در منهن (نقطه)، نمودار دایره‌ای و هیستوگرام، رنگ‌ها لایه مولکولی را نشان می‌دهند.





دوران کودکی، قوی ترین تغییرات اثر برای جیوه، As، Se، PFAS و الگوهای غذایی (به عنوان مثال ماهی و امتیاز KIDMED)، برای PM داخل خانه و سیگار کشیدن والدین، و برای BPA و متغیرهای هواشناسی مشاهده شد. آنها در زیر با جزئیات بیشتر مورد بحث قرار می گیرند.

### ادغام شبکه ای از شاخص مولتی اومیکس از اکسپوزوم

برای تجسم اینکه آیا یک ویژگی مولکولی به چندین تاثیر محیطی متصل است یا خیر و بالعکس، شبکه های اکسپوزومی مولتی اومیکس خاص دوره را بر اساس ۱۱۷۰ ارتباط آماری اکسپوزوم-اومیکس ساختیم. گره های این شبکه ها ۵۳۸ ویژگی مولکولی منحصر به فرد یا تاثیر محیطی درگیر در این ارتباط هستند و لبه ها ۱۱۷۰ ارتباط اکسپوزوم-تاثیر محیطی هستند.

شبکه اکسپوزوم حاملگی، که عمدتاً از CpG ها (۷۰٪) تشکیل شده است، به طور متوسط دارای ۱.۳ اتصال در هر گره (یعنی درجه) و میانگین کوتاه ترین طول مسیر ۱.۹ (شکل ۴) بود. این عدد نشان دهنده طول متوسط (تعداد گره ها) کوتاه ترین مسیر بین هر گره و هر گره دیگری است که ۱.۹ مقدار کمی است. این عدم اتصال را می توان با فاصله وسیع در امتداد ژنوم سایت های CpG که با آرایه 450 K ارزیابی شده و همبستگی نسبتاً کم آنها توضیح داد. شبکه اکسپوزوم حاملگی شامل ۳ جزء اصلی متصل، که بزرگترین آنها حاوی کمتر از ۳۰ درصد از گره ها بود. این ۳ خوشه از نظر اندازه، تعداد مواجهه محیطی و نوع داده های اومیکس که آن ها را تشکیل می دهند بسیار متفاوت بودند (جدول ۱).

شبکه اکسپوزوم دوران کودکی با میانگین ۱.۹ اتصال در هر گره و متوسط کوتاه ترین طول مسیر ۴.۳ به طور متراکم تری متصل بود. بزرگترین مؤلفه متصل شامل ۹۰٪ از تمام گره ها بود (شکل ۵). این اتصال، ماهیت مرتبط متابولوم سرم و ادرار را برجسته می کند، که نشان دهنده اکثر ارتباط های تاثیر محیطی-اومیکس شبکه است (به ترتیب ۴۳ و ۲۶ درصد). در بزرگترین مؤلفه متصل، ما ۱۱ جزء فرعی به هم پیوسته را با استفاده از روش خوشه بندی ساختاری بدون نظارت شناسایی کردیم (جدول ۱).

### استحکام نتایج با توجه به zBMI کودک و گروه

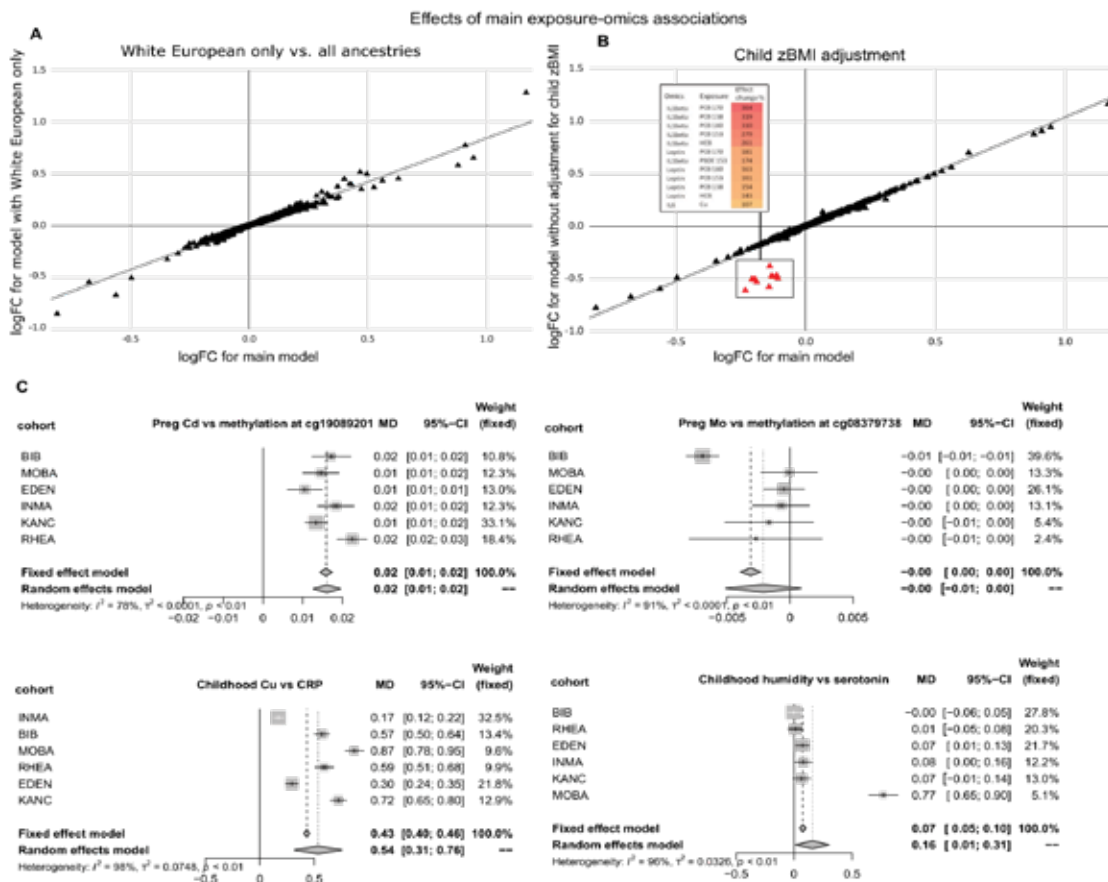
برای ۱۱۷۰ رابطه ای امیکس-مواجهه محیطی مهم، چندین تحلیل حساسیت انجام دادیم. اول، HELIX شامل ۱۱۷۱ کودک اجدادی اروپایی و بقیه از اجداد دیگر است. ما ExWAS را فقط در کودکانی که اصل و نسب اروپایی داشتند تکرار کردیم، و تفاوت قابل توجهی در اندازه اثر (یعنی بیش از دو برابر شدن) بین دو مدل مشاهده نکردیم. سپس، با توجه به تأثیر بالقوه چاقی کودک هم بر سطوح خونی آلاینده های چربی دوست و هم بر روی برخی ویژگی های مولکولی، ما ارتباط ها را با و بدون تنظیم برای zBMI کودک، به عنوان نماینده چاقی کودک مقایسه کردیم. ما مشاهده کردیم که ۱۲ همبستگی بیش از دو برابر در اندازه اثر داشتند (شکل ۳B). این موارد شامل مواد شیمیایی چربی دوست (PCB 170، PCB 153 و PCB 180) و پروتئین هایی بودند که توسط بافت چربی (IL1، لپتین و IL6) تولید می شوند.

در قدم بعدی، ناهمگونی را در بین گروه ها با اجرای ۱۱۷۰ ربط امیکس-مواجهه محیطی بررسی کردیم. حدود نیمی از همه همبستگی ها مقادیر ناهمگنی  $< 0.5$  (I2) را با تغییرات دوره و لایه مولکولی ارائه کردند. علاوه بر آمار I2 که ممکن است در متا-آنالیز با تعداد کمی از مطالعات بیش از حد تخمین زده شود. در حالی که به نظر می رسد برخی از ارتباطات بین گروه ها، حتی با I2 بالا (مانند کادمیوم مادر و متیلاسیون در cg19089201)، بسیار سازگار هستند، برای برخی دیگر ناهمگنی بیشتری وجود دارد با برخی از گروه ها که به عنوان نقاط پرت عمل می کنند (مانند شرایط هواشناسی کودک و سروتونین) (شکل ۳C).

در نهایت، با توجه به ماهیت همبسته اکسپوزوم، مدل های چند تاثیر را برای آن ویژگی های اومیکس مرتبط با بیش از یک مواجهه اجرا کردیم، زمانی که این مواجهه ها همبستگی کمتر از ۰.۸ داشتند و به گروه های مواجهه متفاوت تعلق داشتند (به جز مواجهه های فردی که به رژیم غذایی تعلق داشتند، فلزات یا پارابن هایی که به عنوان گروه های جداگانه در نظر گرفتیم). برای مواجهه های دوران بارداری، قوی ترین تغییر اثر برای سطوح کادمیوم مادر (Cd) مشاهده شد که کاهش بیش از ۲۵٪ از ارتباط با تنظیم صفت مولکولی برای سیگار کشیدن را نشان داد. متغیرها برای تاثیر محیطی

و در مورد ارتباط متابولیت‌ها با الگوهای غذایی و آلاینده‌ها انجام شد (ExposomeExplorer31). شکل ۷). سپس، آنالیزهای غنی سازی عملکردی را با استفاده از چندین پایگاه داده عمومی صورت گرفت (شکل ۶B-D). در زیر، یافته‌های اصلی برای گروه‌های مواجهه را شرح می‌دهیم.

در مرحله بعد، ما با هدف ارزیابی تفسیر بیولوژیکی، ارتباط‌های مواجهه-امیکس موجود در ۳ بارداری و ۱۱ خوشه دوران کودکی را بررسی کردیم. ابتداء، جستجوی سیستماتیک از همپوشانی با مقالات مربوط به ارتباط متیلاسیون DNA با مواجهه‌ی محیطی و صفات (EWAS Atlas/Catalogue16,30، شکل ۶A-C)

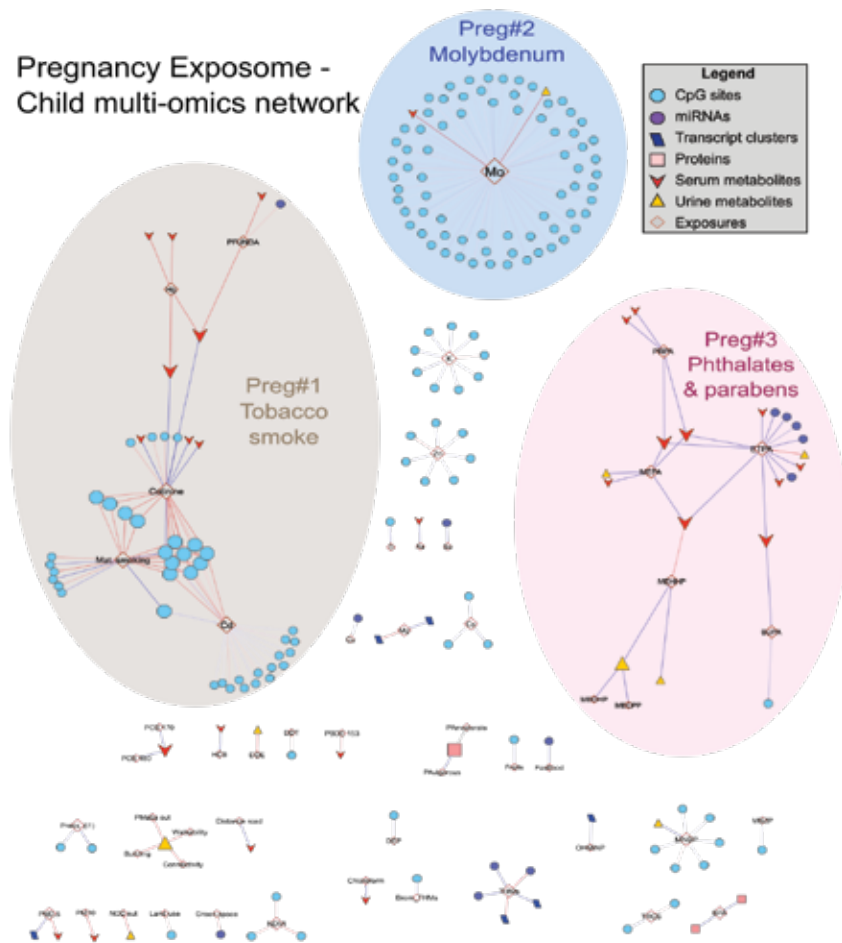


شکل ۳: استحکام ارتباطات اصلی اکسپوزوم-امیکس.

مقایسه اندازه‌های اثر ۱۱۷۰ ارتباط اکسپوزوم-امیکس مدل اصلی، که شامل همه کودکان است (N = 1301) و برای zBMI و اصل و نسب کودک تنظیم شده است، در مقابل اندازه‌های اثر مدل‌های جایگزین. هر مثلث نشان دهنده یک ارتباط است. محور x نشان دهنده اندازه اثر نوردی بر روی ویژگی omics در مدل اصلی است، در حالی که محور y نشان دهنده اندازه اثر در مدل جایگزین است. یک مدل جایگزین همه متغیرهای کمکی را شامل می‌شد اما به کودکان اجداد اروپایی محدود می‌شد (N = 1171) هیچ تفاوت عمده ای مشاهده نشد. B مدل جایگزین شامل همه کودکان بود و برای zBMI کودک تنظیم نشده بود. ارتباط امیکس - تاثیرات محیطی با درصد تغییر بین مدل‌های بالای ۱۰۰ درصد به رنگ قرمز است و شامل پروتئین‌ها و آلاینده‌های شیمیایی چربی دوست کودکان است که در جدول ذکر شده است. C نمودارهای جنگلی که متاآنالیزهای وزنی واریانس معکوس با اثرات ثابت و تصادفی را نشان می‌دهد: سطوح Cd مادر و متیلاسیون DNA کودک در CpG cg19089201 (زن n = 1173 MYO1G اثرات همسان)، سطح مس کودک و سطح CRP کودک در پلاسما (n = 1170)، با اثرات ثابت در گروه‌ها. سطوح Mo مادر و متیلاسیون DNA کودک در CpG cg08379738 (زن n = 1173 DENND1C)، که توسط یکی از گروه‌ها (BiB) هدایت می‌شود. رطوبت در دوران کودکی (۱ ماه قبل از نمونه‌برداری) و سطح سروتونین سرم کودک (n = 1198)، که توسط یکی از گروه‌ها (MoBA) هدایت می‌شود. هر گروه با یک تخمین نقطه ای نشان داده می‌شود که با فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI) برای اثر و وزن کوهورت به عنوان یک مربع خاکستری محدود شده است. ۹۵٪ CI حاصل از متاآنالیز اثرات ثابت و تصادفی به صورت الماس نشان داده شده است. اندازه اثر به عنوان تغییر log2 برابر omics (log2FC)، یا تفاوت در سطوح متیلاسیون، برای محدوده بین چارکی (IQR) متغیرهای مواجهه پیوسته گزارش می‌شود.



Pregnancy Exposome - Child multi-omics network



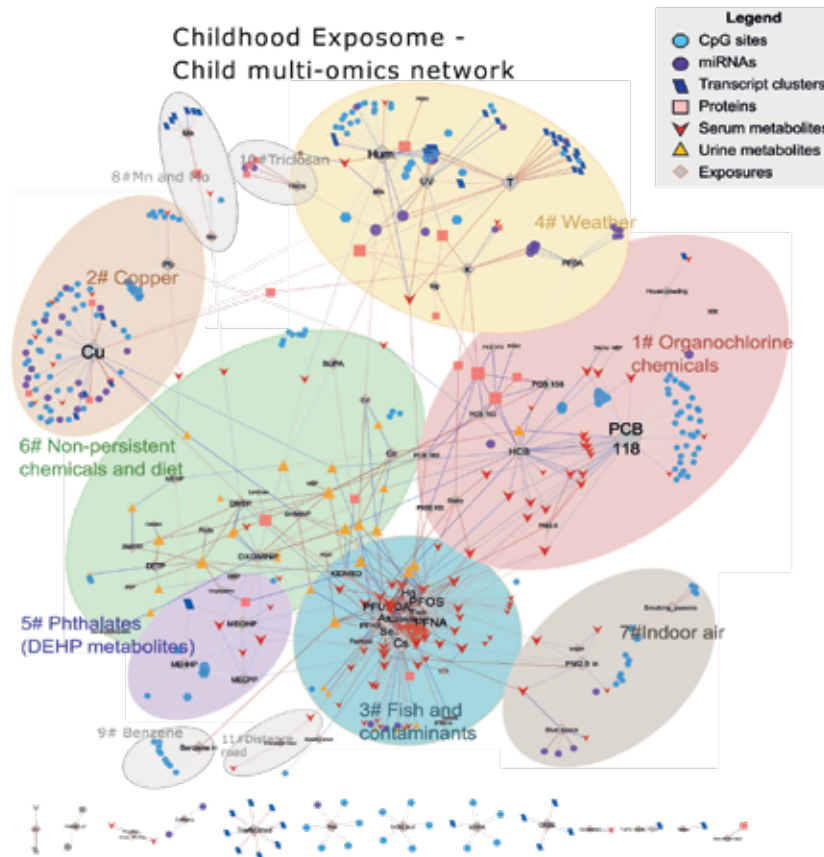
شکل ۴: نقشه شبکه از شاخص‌های مولتی اومیکس-تاثیر محیطی حاملگی.

تجسم شبکه ای از مطالعه ارتباط گسترده حاملگی (ExWAS). اگر ارتباط آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود، یک مواجهه‌ی محیطی و یک ویژگی مولکولی به هم متصل شدند (آبی اگر مثبت و قرمز اگر منفی بود). فقط اجزای متصل با حداقل دو ویژگی مولکولی نمایش داده شد. گره‌های شبکه بسته به اینکه تاثیر محیطی یا ویژگی‌های یک لایه مولکولی خاص باشند، با رنگ/شکل متفاوتی به تصویر کشیده می‌شوند. سه مولفه اصلی متصل تفسیر شدند که به دلیل اندازه، تعداد تاثیر محیطی و نوع اومیکس که آنها را تشکیل می‌دادند، بسیار متفاوت بودند. جدول خلاصه با ویژگی‌های خوشه را در جدول ۱ می‌توان یافت.



جدول ۱ خوشه‌های پر توده‌ی حاملگی و دوران کودکی بر اساس ارتباط با پروفایل‌های مولتی اومیکس اندازه‌گیری شده در دوران کودکی (N = ۱۳۰۱)

ویژگی مرتبط با اومیکس								تاثیر محیطی	خوشه‌ها
کل ژن‌های نامزد شده	کل	ادراک	سرم متاب	پروتئین‌ها	miRNA بیان	بیان ژن	متیلایسبون DNA		
<b>دوره بارداری</b>									
۹۱	۸۴	۰	۸	۰	۱	۰	۹۳	سی دی، کوتینین، سیگار کشیدن مادر، جیوه، PFUNDA	دود تنباکو
۴۷	۴۷	۱	۱	۰	۰	۰	۲۷	Mo	مولیبیدن
۱۴	۴۷	۲	۴۲	۳	۱	۱	۳۴	.MEHHP, .PRPA, .MEPA, .ETPA, .MEOHP, .MECPP, .BUPA	فتالات‌ها و پارابن‌ها
<b>دوران کودکی</b>									
۱۴	۴۷	۲	۴۲	۳	۱	۱	۳۴	PCB, 138 PCB, HCB, 118 PCB, 180 PCB, PM2.5, 153, 170 PCB, نان، DDE, چربی رژیم غذایی، MIBP, MEP	مواد شیمیایی آلی کلر
۹۸	۸	۱	۸	۶	۷۱	۵	۲۵	مس، سرب، کاربری زمین	مس
۵	۱۷	۸	۶۵	۲	۳	۰	۲	.PFUNDA, .Se, .PFNA, .Cs, .PFOS, .As, .Hg, .PFHXS, کوتینین، لبنیات، 153 PBDE، فست فود، .ETS, BTEX، شیرینی	ماهی و آلاینده‌ها
۵۶	۸۷	۰	۴	۵	۸۱	۱۲	۰.۳	.BPA, .Mg, .PFOA, .K, .UV, .T, .Hum, PM10, .Tl	آب و هوا
۰.۱	۶۱	۰	۷	۰	۰	۱	۸	.MECPP, .MEHHP, .MEOHP, .MEHP تولیدات نانوایی	فتالات‌ها (متابولیت‌های DEHP)
۵۱	۸۳	۱۲	۱	۲	۱	۰	۳۱	.Co, .DMTP, .KIDMED, .OXOMINP, .Cd, .OHMiNP, .DETP, .BUPA, .DEP, سبزیجات، گوشت، غلات، مشارکت اجتماعی، DMP	مواد شیمیایی غیر ماندگار و رژیم غذایی
۲۱	۲۲	۰	۵	۰	۴	۰	۳۱	PM2.5 داخلی، سیگار کشیدن والدین، فضای عمگین، MNBP	هوای داخل خانه
۸	۰.۱	۰	۲	۱	۰	۶	۱	Mo, Mn	منگنز و مولیبیدن
۷	۹	۰	۰	۰	۰	۰	۹	بنزن داخلی	بنزن
۵	۵	۰	۰	۳	۲	۰	۰	تریکلوزان	تریکلوزان
۰	۲	۰	۲	۰	۰	۰	۰	road Distance	road Distance



شکل ۵: نقشه شبکه ای از شاخص‌های مولتی اومیکس اکیسپوزوم دوران کودکی.

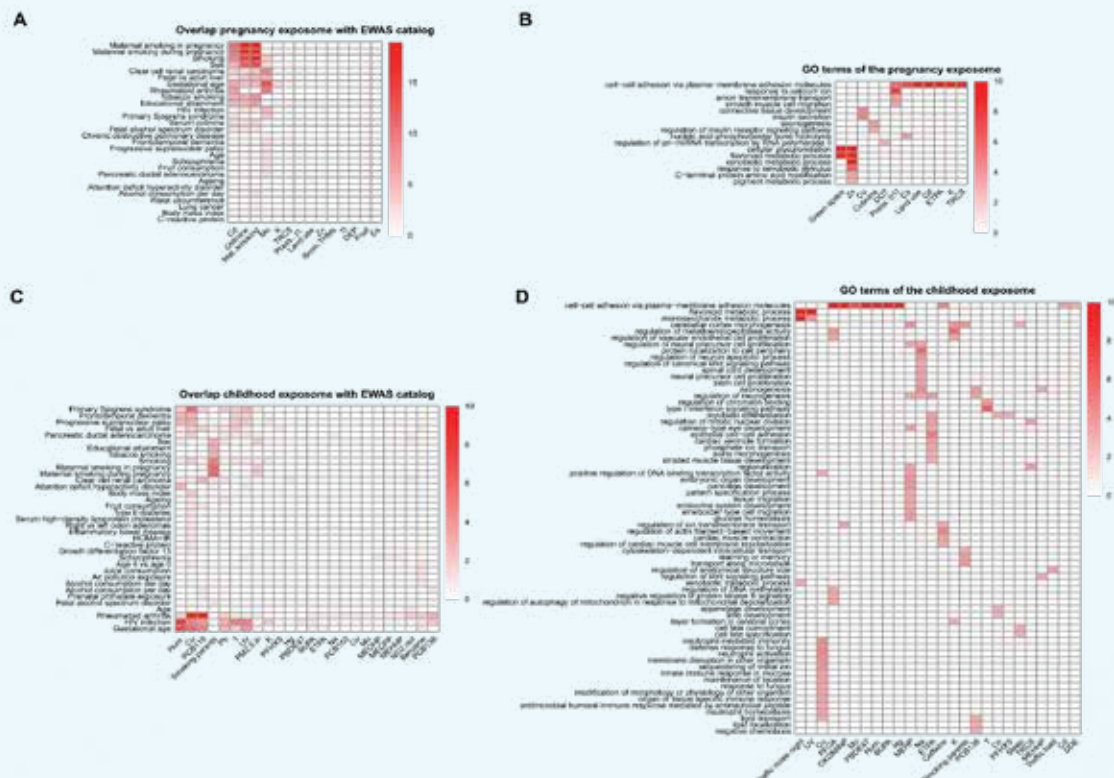
تجسم شبکه ای از مطالعه رابطه‌ی گسترده اکیسپوزوم-اومیکس در دوران کودکی (ExWAS). گره‌های شبکه بسته به اینکه تاثیر محیطی یا ویژگی‌های یک لایه مولکولی خاص باشند، با رنگ/شکل متفاوتی به تصویر کشیده می‌شوند. اگر ارتباط آنها از نظر آماری معنی‌دار بود، تاثیر محیطی و یک ویژگی مولکولی با یک لایه مرتبط بودند (آبی اگر مثبت و قرمز اگر منفی بود). فقط اجزای متصل با حداقل دو ویژگی مولکولی نمایش داده شد. اگر ارتباط آنها از نظر آماری معنی‌دار بود، تاثیر محیطی و یک ویژگی مولکولی به هم متصل می‌شدند و فقط اجزای متصل با حداقل دو ویژگی مولکولی نمایش داده شدند. شبکه اکیسپوزوم دوران کودکی از نظر ویژگی‌های اومیکس ارائه شده و سطح اتصال متقابل متنوع بود، با بزرگترین مؤلفه متصل شامل ۹۰٪ از تمام گره‌ها. در این شبکه، ۱۱ خوشه با استفاده از آنالیز خوشه ساختاری بدون نظارت شناسایی شدند، و در شکل مشروح شدند.

سیناپس کولینرژیک، سیگنال دهی انسولین، و چندین نوع سرطان (شکل ۶B-D).  
کادمیوم قبل از تولد (Cd)، یک فلز سنگین، با متیلاسیون خون کودک مرتبط بود و با سیگار کشیدن مادر در خوشه #1 preg ثبت شد. آنالیزهای چند تاثیر محیطی برخی از همپوشانی بین این سیگنال‌ها را پیشنهاد کرد. این را می‌توان تا حدی با این واقعیت توضیح داد که جزء تنباکو است و در داده‌های ما مادرانی که سیگار می‌کشیدند تقریباً دو برابر سطح Cd در مقایسه با غیر سیگاری‌ها نشان دادند. با این حال، ما ۱۴ CpG اضافی را شناسایی کردیم که منحصر به Cd بودند (شکل ۲A، B). هنگام محدود کردن آنالیز ما از Cd مادر به مادران غیر سیگاری (۴۸) CpG، ۵۱ (۹۹۸ N= جایگاه) شناسایی شد. اینها با اثرات شناخته شده سیگار کشیدن، و نه با CpG‌های مرتبط با Cd ادرار در خون بزرگسالان یا با Cd جفت در بافت جفت همپوشانی نداشتند. ما همچنین چندین ارتباط برای کیفیت هوا در دوران کودکی پیدا کردیم که بین آلاینده‌های بیرون و داخل

### سیگار کشیدن مادر اثرات قوی و طولانی مدت بر متیلوم کودک نشان می‌دهد و نشانه‌های جدیدی برای کادمیوم قبل از تولد و آلودگی هوای داخل خانه شناسایی شده است.

شاخص متیلاسیون برای سیگار کشیدن مادر در سنین مختلف به خوبی ثبت شده است. در HELIX، سیگار کشیدن مادر در دوران بارداری با استفاده از پرسشنامه و سطوح کوتینین ادراری مادر مرتبط با ۲۴ CpG منحصر به فرد، که نشان‌دهنده ۹ جایگاه منحصر به فرد مشروح به ۸ زن است، که تا حد زیادی با CpG‌های حساس به سیگار توصیف شده همپوشانی دارند، ارزیابی شد. در EWAS Atlas/Catalogue (شکل ۶A-C).  
مواجهه‌ی کودک با دود سیگار دیگران نیز با داده‌های قبلی همپوشانی دارد، اما به میزان کمتری نسبت به سیگار کشیدن مادر (خوشه ای شماره ۷). اثرات سیگار کشیدن دوره خاص در HELIX در جاهای دیگر مورد بررسی قرار گرفته است. آنالیز غنی سازی عملکردی مسیرهای زیر را شناسایی کرد: توسعه آکسون، شناخت،





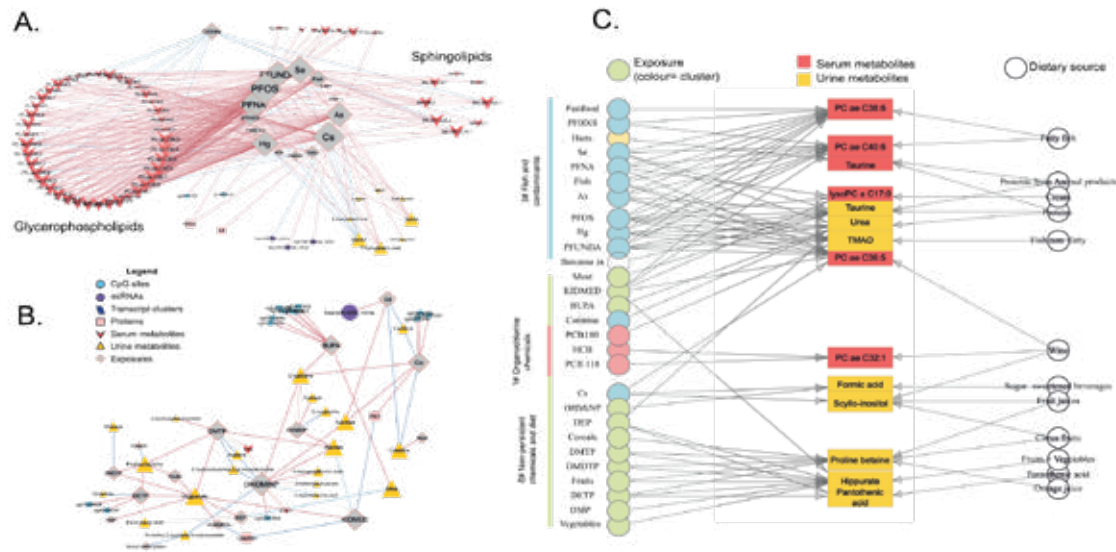
شکل ۶: تفسیر بیولوژیکی پیوندهای اکسپوزوم-اومیکس از طریق همپوشانی داده‌های پیشین و غنی سازی عملکردی.

الف) همپوشانی CpG‌های مرتبط با اکسپوزوم حاملگی (ستون‌ها) با CpG‌های مرتبط با صفات / مواجهه در کاتالوگ EWAS (ردیف‌ها).

ب) آنالیز غنی‌سازی عملکردی اکسپوزوم حاملگی (ستون‌ها) برای اصطلاحات (ردیف‌ها) اونتولوژی ژن (GO).

ج) همپوشانی CpG‌های مرتبط با اکسپوزوم (ستون‌ها) دوران کودکی با CpG‌های مرتبط با صفات/تاثیر محیطی در کاتالوگ EWAS (ردیف‌ها). د) تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی اکسپوزوم (ستون‌ها) دوران کودکی برای اصطلاحات GO (ردیف‌ها). متغیرهای مواجهه‌ی محیطی، صفات / تاثیر محیطی کاتالوگ EWAS، و اصطلاحات GO بر اساس خوشه بندی سلسله مراتبی مرتب شده اند. برای همپوشانی با کاتالوگ EWAS، رنگ تعداد CpG‌های همپوشانی را نشان می‌دهد. برای آنالیز غنی‌سازی عملکردی، رنگ نشان‌دهنده مقدار p تنظیم‌شده  $-\log_{10}$  غنی‌سازی است. برای تسهیل تجسم، اصطلاحات GO مرتبط را حذف کردیم و مقادیر p تنظیم شده  $-\log_{10} > 10$  به عنوان ۱۰ کدگذاری می‌شوند.





شکل ۷: شاخص متابولیت منابع غذایی و اکسپوزوم دوران کودکی.

الف) خوشه کودکی شماره ۳ شامل ارتباط قابل توجهی بین ماهی و چندین آلاینده (As، جیوه، PFOS) و متابولیت‌های سرم (عمدتاً گلیسرولفسفولیپیدها) است.

ب) خوشه کودکی شماره ۶ شامل ارتباط قابل توجهی بین رژیم غذایی (سبزیجات، میوه‌ها، غلات) و آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (OP) با متابولیت‌های ادراری است. برای قسمت الف و ب گرهِ‌های شبکه با رنگ/شکل متفاوتی به تصویر کشیده می‌شوند، بسته به اینکه آن‌ها تاثیر محیطی یا ویژگی‌های یک لایه مولکولی خاص باشند. اگر ارتباط آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود، تاثیر محیطی و یک ویژگی مولکولی با یک لایه مرتبط بودند (آبی اگر مثبت و قرمز اگر منفی بود).

ج) نمودارهای سه‌جانبه بر اساس وجود ارتباط بین متابولیت‌ها-قرار گرفتن در نمونه‌های HELIX (در سمت چپ) و متابولیت‌ها-دریافت رژیم غذایی بر اساس پایگاه داده ExposomeExplorer (در سمت راست). متابولیت‌های سرم و ادرار به ترتیب به رنگ‌های قرمز و زرد و مواجهه‌ی محیطی رنگ‌های آبی (ماهی و آلاینده‌ها)، قرمز (مواد شیمیایی آلی کلر) یا سبز (مواد شیمیایی غیر پایدار و رژیم غذایی) با توجه به خوشه‌ای که به آن تعلق دارند نشان داده می‌شوند.

(PFAS) و عناصر ضروری غیر سمی (سلنیوم (Se) و سزیم (=Cs)، همراه با لیپیدهای سرم حاوی اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA) و تری متیل آمین (N-اکسید ادراری (TMAO)، دی متیل آمین و هومارین (شکل ۷A). با استفاده از ارتباط سیستماتیک متابولیت-رژیم غذایی یافت شده در مطالعات جمعیتی قبلی که در ExposomeExplorer پایگانی شده بود، منشاء غذایی این ارتباط متابولیت مواجهه را تأیید کردیم، در این مورد، مصرف ماهی و محصولات حیوانی (شکل ۷C). علاوه بر این، مدل‌های چند مواجهه‌ی محیطی تأیید کردند که بیشتر این ارتباط‌ها به‌ویژه با جیوه، As و PFAS پس از تنظیم رژیم غذایی و سایر مواجهه‌های مشترک کاهش یافتند. این برای TMAO و As که حتی پس از تنظیم ارتباط‌ها باقی ماندند، صادق نبود.

به طور مشابه، خوشه کودکی شماره ۶ شامل ۲۱ متابولیت از ۴۴ متابولیت ادراری اندازه گیری شده بود، از جمله هیپورات، پرولین بتائین و N-متیل نیکوتینیک اسید که

همپوشانی نداشتند. در میان جالب‌ترین موارد، مواجهه با آلودگی هوای داخل خانه با بنزن با 9 CpG (دوران خوشه‌ای شماره ۹) مرتبط بود که یکی از آنها به سطوح PM2.5 در مطالعات قبلی مربوط می‌شد (شکل ۶C). علاوه بر این، سطوح جذب PM2.5 در داخل خانه، مارکر کربن سیاه/ عنصری ناشی از احتراق، با متیلاسیون ۹ CpG، از جمله دو مورد مشترک با مواجهه با تنباکو (شکل ۶C و A)، و با کاهش سطوح سرمی مرتبط بود. آمینو اسیدهای شاخه دار (BCAA)، آسیل کارنیتین C4 و دو اسفنگولیپید (خوشه کودکی شماره ۷). برخی از این ارتباطات پس از تنظیم برای سیگار کشیدن والدین کاهش یافت.

**سرم و متابولوم ادرار مسیرهای اصلی قرار مواجهه با آلاینده‌های شیمیایی را نشان می‌دهد.** خوشه کودکی شماره ۳ شامل مصرف ماهی (اطلاعات جمع آوری شده از طریق پرسشنامه)، فلزات سمی (جیوه (Hg) و آرسنیک (As))، مواد پر و پلی فلوروآلکیل



متیونین در دوران کودکی همراه بود. مس کودک با ۸۹ ویژگی مولکولی مرتبط بود که در لایه‌های مختلف اومیکس توزیع شده است (دوران خوشه‌های شماره ۲). یکی از ارتباطات با کمترین مقدار p با افزایش سطح پروتئین واکنشی (CRP)، نشانگر التهاب بود. علاوه بر این، CpG‌های مرتبط با مس قبلاً با چاقی، دیابت نوع ۲ و آرتریت روماتوئید، یک اختلال التهابی مزمن، در میان دیگران مرتبط بوده اند (شکل ۶C) مسیرهای غنی شده برای مس شامل: پاسخ ایمنی، ذخیره چربی و جداسازی یون‌های فلزی (شکل ۶D) تنظیم برای قرار گرفتن در معرض همزمان (به عنوان مثال سرب) به طور قابل توجهی این ارتباط را تغییر نداد. علاوه بر این، در دوران کودکی، سایر عناصر کمیاب ضروری با ویژگی‌های مولکولی متعدد بدون همپوشانی بین آنها همراه بودند، همانطور که انتظار می‌رفت به دلیل نقش‌های اساسی ذاتی آنها. به عنوان مثال، روی (Zn) با رونویسی بالاتر CA1 (کرنیک انیدراز ۱) مرتبط بود، که بیان آن تحت تأثیر در دسترس بودن  $Zn^2+$  شناخته شده است و از  $Zn^2+$  به عنوان یک کوفاکتور برای فعالیت آنزیمی خود استفاده می‌کند.

### شرایط آب و هوایی با تأثیر در تمام لایه‌های اومیکس همراه است

شرایط آب و هوایی یا عوامل هواشناسی (دما، رطوبت، پوشش ابر و فشار اتمسفر)، به ویژه، زمانی که شدید، تعیین کننده قوی سلامت و مرگ و میر هستند. با این حال، هیچ مطالعه‌ای برای ارزیابی سیستماتیک تأثیر آنها بر فنوتیپ‌های مولکولی وجود ندارد. ما شرایط آب و هوایی را از طریق اطلاعات جغرافیایی همراه با داده‌های ایستگاه‌های هواشناسی تخمین زدیم. در دوران کودکی، شرایط آب و هوایی در طول یک ماه قبل از اندازه‌گیری اومیکس با تمام لایه‌های مولکولی، به جز متابولوم ادرار (دوران خوشه‌ای شماره ۴) مرتبط بود. متابولیت‌های سرمی مرتبط با متغیرهای هواشناسی شامل تورین، دی متیل آرژینین نامتقارن (ADMA)، آسپل کارنیتین C5 و سروتونین بودند که قبلاً به عنوان بیومارکر محرومیت از خواب، ریتم شبانه روزی و علت شناسی افسردگی گزارش شده بودند. آنها همچنین با سه پروتئین مرتبط بودند: آدیپونکتین، MCP1 و HGF آدیپونکتین، یک

بیومارکر شناخته شده مصرف میوه و سبزیجات هستند (شکل C، VB). این خوشه همچنین شامل آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (OP) اندازه‌گیری شده در ادرار بود که مسیر بالقوه مواجهه با عوامل محیطی را از طریق دریافت رژیم غذایی میوه‌ها و سبزیجات پیشنهاد می‌کند. همچنین در دوران کودکی خوشه شماره ۶، متابولیت‌های DiNP را یافتیم، اعضای خانواده فتالات که عمدتاً برای تولید پلاستیک‌های انعطاف‌پذیر مانند بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شوند. در مقابل، متابولیت‌های DEHP (MEOHP، MEHHP، MECPP، MEHP)، همچنین فتالات‌های موجود در پلاستیک، در دوران کودکی خوشه‌ای شماره ۵ ثبت شدند و با ۱۳ CpG همراه بودند، بدون همپوشانی واضح با صفات اقرارگیری‌های گزارش شده (شکل MEOHP، MECPP و ۶C). با تعدادی از اسفنگومیلین‌های سرم ارتباط منفی داشتند (SM C16:0، SM C18:0، SM C18:1، SM C20:2) با (SM (OH) C14:1 و SM (OH) C16:1). مواجهه‌ی با متابولیت‌های DEHP و پارابن‌ها، ترکیبات مصنوعی موجود در محصولات مراقبت شخصی، نیز ارتباط منفی با اسفنگومیلین‌ها (SM (OH) C16:1) و والین در کودکان نشان داد.

### عناصر کمیاب ضروری اجزای کلیدی اکسپوزوم هستند

عناصر کمیاب ضروری در موجودات زنده برای اطمینان از رشد طبیعی و حفظ عملکردهای بیولوژیکی مورد نیاز هستند، اما در صورت وجود بیش از حد می‌توانند سمی باشند. ما ۹ عنصر ضروری را در خون کامل اندازه‌گیری کردیم (Co، Cu، Mn، Mo، Na، K، Mg، Zn، Se)، و تعداد قابل توجهی از ارتباط‌های تأثیر محیطی - اومیکس، عمدتاً با مولیبدن مادر (Mo)، و مس کودک یافتیم (Cu). مولیبدن مادر به سطوح متیلاسیون CpG 72 مربوط بود که نشان دهنده ۶۳ جایگاه بود. هیچ مجموعه ژن مرتبطی برای ژن‌های مشروح شده در این CpG 72 شناسایی نشد، اما ۱۳ مورد از آنها قبلاً مربوط به سن حاملگی بوده اند (شکل ۶A). مو به عنوان یک عامل مشترک از ۴ آنزیم انسانی که در واکنش‌های کلیدی مختلف از جمله تنظیم آمینو اسیدهای حاوی گوگرد مانند متیونین نقش دارند عمل می‌کند. در مجموعه داده ما، مو مادر با سطوح بالاتر

کمی با بیان سیس (eQTM)، به معنای همبستگی بین بیان ژن و متیلاسیون DNA را شناسایی کردیم. از 187 CpG مرتبط با اکسپوزوم دوران کودکی، ۹ مورد eQTM در مجموع ۱۱ ژن داشتند. با این حال، هیچ یک از این eQTM ها به طور اسمی با مواجهه های مشابه با سایت CpG همراه نبودند. همچنین با استفاده از ابزار miRwalk v3، ژن های هدفمند 49 miRNA مرتبط با اکسپوزوم دوران کودکی را جستجو کردیم. هفده ژن از ۱۲۶۷ ژن مورد نظر با همان مواجهه های miRNA اصلی و در جهت مورد انتظار (سطوح miRNA بالاتر - بیان ژن کمتر) مرتبط بودند. آنها شامل ۷ نوردهی منحصر به فرد (Cd، Cu، K، PFOA، عوامل هواشناسی) و 9 miRNA منحصر به فرد بودند.

همچنین همپوشانی ارتباطات مواجهه های دوران کودکی را برای ۱۲ متابولیت (اسیدهای آمینه، گلوکز، کارنیتین و کراتینین) که هم در ادرار و هم در سرم اندازه گیری شده بودند، مقایسه کردیم. در اهمیت اسمی، ۲۷.۳٪ از انجمن های ادرار در سرم تکرار می شود. و ۷٪ از انجمن های سرمی در ادرار تکرار می شود. جای تعجب نیست که پیوندهای تکراری متابولیت هایی با بالاترین همبستگی بین ماتریس ها (کارنیتین، گلیسین و کراتینین) را شامل می شود.

### بحث

این اولین مطالعه اکسپوزومی است که به طور سیستماتیک طیف وسیعی از مواجهه های محیطی را در دوره های آسیب پذیر اولیه زندگی با تاثیر مولتی اومیکس در دوران کودکی مرتبط می کند. ما ۱۱۷۰ ارتباط منحصر به فرد بین مواجهه های محیطی و ویژگی های مولکولی، ۲۴۹ مربوط به بارداری و ۹۲۱ ارتباط با مواجهه های محیطی دوران کودکی را مشاهده کردیم. این مطالعه با تقسیم این ارتباطات به خوشه های شبکه برای تجسم و با انجام تفسیر بیولوژیکی سیستماتیک، پاسخ های بیولوژیکی بالقوه و منابع مواجهه های محیطی را نشان می دهد. یافته های ما تغییرات متیلاسیون مداوم مرتبط با سیگار کشیدن مادر در بارداری و منابع اصلی مواجهه های محیطی آلاینده های شیمیایی از طریق رژیم غذایی را بر اساس بیومارکرها مرتبط با غذا تأیید می کند. علاوه بر این، ما ارتباطات جدید به ویژه با عناصر کمیاب ضروری، شرایط آب و هوایی، کیفیت

تنظیم کننده ضروری گرمایی با رطوبت افزایش می یابد (در اروپا در زمستان بیشتر است) و با اشعه ماوراء بنفش کاهش می یابد (در تابستان بیشتر است). این مطابق با مطالعات قبلی است که نشان می دهد قرار گرفتن در معرض دمای سرد به مدت ۲ ساعت باعث افزایش سطح آدیپونکتین پلاسما می شود. بزرگی برخی از این ارتباطات (کارنیتین، C5، آدیپونکتین، سروتونین) پس از مواجهه با بیسفنول A (BPA)، که قبلاً برای کاهش انتشار آدیپونکتین وجود داشت، بیش از ۵۰٪ کاهش یافت. در نهایت، CpG های مرتبط با شرایط آب و هوایی با CpG های گزارش شده برای عفونت، در میان دیگران همپوشانی دارند (شکل ۶C). و ژن های مربوط به دما برای پاسخ سلولی به اینترفرون نوع I غنی شدند (شکل ۶D). بیماری های عفونی از الگوهای فصلی پیروی می کنند و در شرایط خاص هواشناسی شیوع بیشتری دارند، همانطور که اخیراً در امواج مختلف همه گیری COVID-19 نشان داده شده است.

### آلاینده های آلی پایدار (POPs) و تغییرات مولتی اومیکس در کودکان

ما دریافتیم که POPs در کودکان، به ویژه PCB ۱۱۸، شبه دیوکسین (۶۹ رابطه)، HCB (28) و PCB 138 (14)، با متیلاسیون DNA، متابولیت های سرم و پروتئین های پلاسما (IL1B و لپتین) در گروه بندی خوشه های دوران کودکی مرتبط هستند (شکل ۵). قبلاً گزارش شده بود که CpGs در این خوشه به بیماری التهابی آرتریت روماتوئید مربوط می شود و IL1B و لپتین توسط بافت چربی همانطور که در بالا توضیح داده شد تولید می شوند. ما همچنین یک ارتباط مثبت منحصر به فرد PCB 180 و TMAO ادراری را مشاهده کردیم، بدون هیچ گونه ارتباط دیگری با سایر متابولیت های مرتبط با ماهی که در بالا توضیح داده شد.

### تکرار ارتباط های اکسپوزر-ومیک در لایه های مولکولی و ماتریس های بیولوژیکی

ما بررسی کردیم که آیا ارتباط اکسپوزوم دوران کودکی با متیلاسیون DNA، بیان ژن و miRNA که همه در سلول های خون ارزیابی شده اند، به ژن های یکسانی اشاره می کنند یا خیر. برای هر CpG، ما متیلاسیون های صفت



انسان‌ها از طریق رژیم غذایی (در این مورد مصرف میوه و ماهی) به بدن منتقل می‌شوند، که اثر بیولوژیکی آن ممکن است توسط میکروبیوم روده تغییر کند و به پیچیدگی پروفایل‌های متابولومیک در نمونه‌های زیستی انسانی اضافه کند. ایجاد شبکه گسترده‌ای از فعل و انفعالات مواد مغذی-آلاینده که کاملاً ناشناخته باقی مانده و با روش‌های

ارزیابی مرسوم به خوبی تعریف نشده است. در میان مارکرهای مولکولی جدید شناسایی شده، شش گروه از مواجهه‌ی محیطی مکانیسم‌های بیولوژیکی قابل قبولی برای بیماری را برجسته می‌کنند. اول، مس یک عنصر کمیاب ضروری برای فرآیندهای سلولی متعدد، از جمله تنفس میتوکندری، دفاع آنتی‌اکسیدانی، سنتز انتقال دهنده‌های عصبی، و متابولیسم آهن است. در مطالعات قبلی HELIX، مس با چندین پیامد سلامتی مانند عملکرد ضعیف‌تر ریه، BMI و فشار خون بالاتر، و افزایش علائم ADHD مرتبط بوده است، و در اینجا ما مسیرهای مختل بالقوه‌ای را نشان می‌دهیم که ممکن است این ارتباط‌ها را واسطه کند: پاسخ ایمنی، ذخیره چربی و جداسازی از یون‌های فلزی دوم، مسیرهای شناسایی شده برای دود تنباکو (توسعه آکسون، شناخت، سیناپس کولینرژیک، سیگنال دهی انسولین و چندین نوع سرطان) به طور مشابه با اثرات سیگار کشیدن مادر بر پیامدهای سلامتی شناسایی شده در کودکان HELIX (فشار خون و BMI بالاتر، و افزایش مشکلات رفتاری). ما تصدیق می‌کنیم که همانطور که متیلاسیون DNA در خون اندازه‌گیری شد، شناسایی مسیرهای مربوط به سایر بافت‌ها (به عنوان مثال رشد مغز و آکسون) باید با احتیاط مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. اگر مواجهه‌ی محیطی در اوایل رشد اتفاق بیفتد، ممکن است علائم متیلاسیون DNA در سراسر بافت‌ها حفظ شود یا ژن‌های یکسان در مسیرهای مختلف در بافت‌های مختلف دخیل باشند. سوم، کیفیت هوای داخل ساختمان در دوران کودکی با مارکرهای متابولیک (BCAA و آسپیل کارنیتین) مرتبط بود. مطالعه HELIX اولین موردی بود که ارتباطی بین آلودگی هوای داخل خانه و چاقی کودکان پیدا کرد. متابولیسم نامنظم BCAA و آسپیل کارنیتین‌ها با چاقی و مقاومت به انسولین در مطالعات متعدد مرتبط بوده و در شرکت کنندگان چاق جوانی که در معرض آلودگی هوای نزدیک جاده قرار داشتند، شناسایی شده است.

هوای داخل ساختمان، آلاینده‌های پایدار، فتالات‌ها و پارابن‌ها شناسایی می‌کنیم. منبع جامع ما از همه ارتباطات (<https://helixomics.isglobal.org/>) اولین در نوع خود است و برای هدایت تحقیقات آینده در مورد آثار بیولوژیکی اکسیوزوم اولیه زندگی مفید خواهد بود. کاتالوگ وب ما چندین کاربرد دارد: ایجاد بیومارکرها، شناسایی منابع تاثیرات محیطی و درک مکانیسم‌های بیولوژیکی. داده‌های تولید شده در این مطالعه منبعی برای توسعه بیومارکرهای اپی‌ژنتیکی مواجهه‌های گذشته فراهم می‌کند. به عنوان مثال، به طور کلی اعتقاد بر این بود که عنصر ضروری مولیبدن (Mo) برای سلامت انسان بی‌خطر است. با این حال، شواهد فزاینده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد Mo بیش از حد با اثرات رشدی و با پیامدهای نامطلوب سلامتی مرتبط است. در این مطالعه، سطوح مادری Mo با تغییرات متیلاسیون در تعداد قابل توجهی از CpG‌ها مرتبط بود که حداقل تا دوران کودکی (زمانی که آنها را شناسایی کردیم) پایدار بود. متیلاسیون در این CpG‌ها می‌تواند برای پیش بینی سطوح تاثیر قبل از تولد استفاده شود.

همچنین، مطالعه ما توانایی متابولومیک را برای انعکاس دقیق منابع غذایی و اثر میکروبی روده بالقوه مواجهه‌ی محیطی نشان می‌دهد. قوی‌ترین و مهم‌ترین ارتباط در میان تمام اکسیوزومی‌های آزمایش شده برای As و Hg با تری‌متیل‌آمین-N-اکسید (TMAO) و گلیسروفسولیبیدها پیدا شد. بسیاری از این روابط، به جز رابطه‌ی TMAO-As، پس از تنظیم برای مصرف ماهی و سایر ترکیبات مرتبط با ماهی ضعیف شدند. در واقع، قبلاً ثابت شده بود که TMAO بین مصرف کم ماهی تفاوت قائل است، در حالی که هومارین (یک متابولیت موجود در ماهیچه صدف‌ها) برای مصرف زیاد/غیر صدف در جمعیت‌هایی با مصرف غذاهای دریایی بالا مانند اسپانیا و ژاپن بود. TMAO به عنوان ارتباطی که پس از تنظیم مواجهه با ماهی، قوی‌ترین ارتباط باقی ماند، نقش مستقل میکروبیوم روده را نیز نشان می‌دهد. این یافته مطالعه قبلی ما را بر روی زنان باردار از گروه INMA اسپانیا تایید می‌کند. شواهد دیگر نشان می‌دهد که میکروبیوم روده ممکن است متابولیسم آرسنیک و حساسیت رشد عصبی را نسبت به این مواجهه تغییر دهد. نکته مهم این است که در این مطالعه نشان می‌دهیم که بسیاری از مواد شیمیایی

بیولوژیکی در طراحی مطالعات اکسپوزومی کلیدی است. بیشتر ارتباط هایی که ما برای اکسپوزوم حاملگی پیدا کردیم، متیلوم بود (۷۰٪ از ارتباط های مشاهده شده). این مطابق با مقالات قبلی است که نشان می دهد اپی ژنوم به عنوان منبع اصلی "حافظه" و پلاستیسیته سلولی عمل می کند. اگرچه، ممکن است تا حدی ماهیت طراحی مطالعه و پوشش اومیکس ما را منعکس کند (یعنی تعداد مارکرهای تحلیل شده در هر لایه اومیکس و همبستگی های درون اومیکس آنها). در مقابل، مواجهه های اخیر در دوران کودکی با ویژگی هایی در تمام لایه های اومیکس همراه بود. شواهد تا به امروز نشان می دهد که متابولوم به طور خاص به شدت تحت تأثیر محیط مستقیم قرار دارد و بنابراین ممکن است برای تشخیص ارتباط در تنظیمات مقطعی حساس تر باشد. با این وجود، بسیاری از ارتباطات مقطعی با متیلوم یافت شد و، اگرچه کمتر، ارتباط طولانی مدت با سایر اومیکس نیز یافت شد. علاوه بر این، مطابقت کم بین متیلوم و miRNAome با رونوشت پیچیدگی بالای تنظیم رونویسی را برجسته می کند و نشان می دهد که هر لایه مولکولی ممکن است پنجره ای از اثرات اکسپوزوم را بگیرد. یافته های ما همچنین اهمیت ماتریس بیولوژیکی را نشان می دهد. اگرچه به دلیل استفاده از پلتفرم های مختلف برای ارزیابی آنها، نمی توانیم مقایسه جامعی از متابولوم های ادرار و سرم انجام دهیم، در میان متابولیت های قابل مقایسه، تنها تعداد کمی از آنها ارتباط ثابتی با اکسپوزوم در هر دو ماتریس بیولوژیکی نشان دادند. بنابراین، هم ماتریس های بیولوژیکی و هم ماتریس های دیگر باید به طور ایده آل در مطالعات اکسپوزوم مورد بررسی قرار گیرند و اطلاعات تکمیلی را ارائه دهند. در نهایت، ما همپوشانی کمی را در ارتباط برای مواجهه با حاملگی و دوران کودکی مشاهده کردیم، که احتمالاً به دلیل همبستگی کم مواجهه بین دوره ای، تفاوت در مسیر مواجهه ی محیطی یا دوز بین دوره ها، و پویایی پاسخ مولکولی است (یعنی مطالعه ما قادر به ثبت پاسخ های بلند مدت اکسپوزوم حاملگی است اما فقط پاسخ های کوتاه مدت اکسپوزوم دوران کودکی). این امر اهمیت پنجره های مواجهه و انتخاب چارچوب دوره زندگی برای مطالعات اکسپوزومی را برجسته می کند. مطالعه ما دارای نقاط قوت متعددی است. اول، ارزیابی جامع مواجهه های محیطی در دو دوره زمانی حیاتی توسعه، از جمله بیومارکرهای بسیار حساس برای

تغییر متابولیسم BCAA و آسیل کارنیتین ممکن است یک بیومارکر مهم برای مطالعه بیشتر در رابطه با آلودگی هوا و خطر بیماری قلبی-متابولیک در زندگی بعدی باشد. چهارم، POPها به طور مداوم با پیامدهای نامطلوب بهداشتی مرتبط بوده اند. علاوه بر ارتباطی که احتمالاً با توزیع چربی در کودکان مرتبط است، ما همچنین یک ارتباط مثبت بین PCB 180 و TMAO، محصول میکروبیوتای روده و فعالیت آنزیم مونوکسیژناز حاوی فلاوین کبدی (FMO3) مشاهده کردیم. این ارتباط قبلاً در حیوانات و انسان گزارش شده بود و مستقل از منابع غذایی مشترک بالقوه PCBs و TMAO و BMI ظاهر شد. در حال حاضر، TMAO به عنوان یک عامل ایجاد کننده بیماری قلبی عروقی پیشنهاد شده است، اما تحقیقات بیشتری در مورد پیوند مکانیکی بین PCB، فعالیت / بیان FMO3 و پیامدهای قلبی عروقی مورد نیاز است. پنجم، ما ارتباط هایی با فتالات ها و پارابن ها با وزن مولکولی بالا پیدا کردیم، این ترکیبات مصنوعی هستند که به سرعت در بدن متابولیزه می شوند و مشکوک به اختلالات غدد درون ریز هستند و به شیوه ای خاص بر سلامتی تأثیر می گذارند. مواجهه با فتالات ها بیشتر از طریق رژیم غذایی، بلعیدن گرد و غبار و تا حدودی از طریق استنشاق اتفاق می افتد. امضای متابولیک فتالات ها و پارابن ها به وضوح به الگوهای غذایی مربوط نمی شود، بلکه به یک مسیر متابولیک درون زاء، اسفنگوامیلین ها، که اجزای لیپیدی ساختاری مهم غشای سلولی در گیر در سیگنال دهی هستند و در بسیاری از اختلالات دخیل هستند، مربوط می شود. گزارش شده است که واسطه های بیوسنتز اسفنگوکوزین و والین در زنان باردار در معرض فتالات و پارابن افزایش یافته است. ششم، نتایج ما همچنین بینش هایی درباره مکانیسم های بالقوه عمل برای شرایط آب و هوایی ارائه می دهد: به نظر می رسد که اثرات مستقیم (مانند تنظیم گرمایی) و اثرات غیرمستقیم (مثلاً تعیین سایر مواجهه ها مانند بقای ویروس) دارند، یا می توانند نشان دهنده ی متغیرهای دیگر باشند. (به عنوان مثال ساعات روشنایی روز یا تغییرات رژیم غذایی به دلیل تغییرات فصلی). بررسی شرایط هواشناسی در مجموعه داده های اومیکس طولی بزرگتر که الگوهای فصلی را پوشش می دهند برای روشن کردن مکانیسم های علی نهایی مورد نیاز است. مطالعه ما نشان می دهد که انتخاب لایه مولکولی و ماتریس



بر دود تنباکو، کادمیوم ممکن است منشأهای دیگری مانند برنج، سیب زمینی و گندم داشته باشد، زمانی که به طور مکرر در مقادیر زیاد مصرف شود. هدف رویکردهای مخلوط یا چند آلاینده برای مقابله با این موضوع به طور سیستماتیک است، با این حال، اینها هنوز برای مجموعه داده‌های اومیکس با ابعاد بالا مانند ما مناسب نیستند. سوم، مقایسه ما با ادبیات قبلی و تحلیل‌های غنی‌سازی عملکردی توسط سوگیری موجود در پایگاه‌های داده عمومی محدود شده است. چهارم، اگرچه اکثر مطالعات اپیدمیولوژیک از نمونه‌های بیولوژیکی استفاده می‌کنند که به آسانی برای اندازه‌گیری پروفایل‌های اومیکس در دسترس هستند، اما اینها ممکن است بافت هدف ایده‌آل برای پیامدهای سلامت مربوطه نباشند. پنجم، برخی از ارتباط‌ها ناهمگونی بالایی را در بین گروه‌ها (مانند رطوبت و سروتونین) نشان دادند. این را می‌توان با سطوح مختلف مواجهه، همبستگی متفاوت با عوامل مخدوش‌کننده، یا حجم نسبتاً کوچک نمونه در هر گروه توضیح داد. در نهایت، اگرچه مدل‌های ما برای عوامل مخدوش‌کننده تنظیم شده‌اند، ممکن است همچنان مخدوش‌کننده باقیمانده وجود داشته باشد و پیوندهای علی باید از طریق مداخلات، تحلیل‌های تصادفی‌سازی مندلی، مطالعات متقابل متنی یا مدل‌های *in vivo/in vitro* اثبات شوند.

برای نتیجه‌گیری، این اولین مطالعه جامع از شاخص مولتی اومیکس اکسپوزوم اولیه زندگی نشان می‌دهد که فنوتیپ‌های مولکولی می‌توانند پاسخ‌های بیولوژیکی یا منابع مواجهه‌های محیطی را در زمان اولیه زندگی نشان دهند. علاوه بر یافته‌های اصلی شرح داده شده در اینجا، کل کاتالوگ نتیجه در دسترس عموم است (<https://helixomics.isglobal.org/>) که امکان کاوش در فهرست کامل روابط اکسپوزوم-اومیکس را فراهم می‌کند. با اطلاعات غنی از اکسپوزوم و مولکولی موجود، ما منبع ارزشمندی را در اختیار جامعه علمی برای توسعه و اعتبار سنجی بیومارکرهای مواجهه و پاسخ، شناسایی منابع غذایی، بهبود درک خود از علت شناسی بیماری و در نهایت ارتقای سیاست‌های سلامت عمومی قرار می‌دهیم.

#### منبع:

<https://www.nature.com/articles/s41467-022-34422-2>

بسیاری از مواجهه‌های شیمیایی و مدل‌سازی فضایی وسیع از محیط بیرون و محیط ساخته شده. دوم، ارزیابی گسترده مولتی اومیکس فنوتیپ‌های مولکولی. سوم، پوشش جغرافیایی گسترده و حجم نمونه نسبتاً بزرگ که توانستیم بسیاری از نوردهی‌ها و ویژگی‌های اومیکس را اندازه‌گیری کنیم. در نهایت، ما چندین آنالیز حساسیت را انجام دادیم که تأیید می‌کردند یافته‌ها از نظر اجداد و zBMI قوی هستند، به استثنای برخی از ترکیبات مواجهه چربی دوست و ویژگی‌های مولکولی خاص.

مطالعه ما نیز محدودیت‌هایی دارد. اول، پلتفرم‌های اومیکس دارای سوگیری پوشش و مسائل تفسیرپذیری بیولوژیکی هستند. به عنوان مثال، روش LC-MS/MS (Biocrates) پوشش کم دارد و ترکیب زنجیره جانبی اسید چرب خاصی را برای لیپیدها ارائه نمی‌دهد، اما به طور گسترده در مطالعات کوهورت بزرگ استفاده می‌شود و اندازه‌گیری‌های قابل تکرار با حاشیه نویسی بدون ابهام را ارائه می‌دهد که به راحتی قابل مقایسه با مطالعات دیگر ما متذکر شدیم که لایه‌های مولکولی اضافی و فناوری‌های اومیکس مورد علاقه برای مطالعات اکسپوزومی آینده وجود دارد که در مطالعه ما گنجانده نشده‌اند، مانند متازنوم روده، طیف‌سنجی جرمی با وضوح بالا حساس یا روش‌های تک سلولی. علاوه بر این، تأثیر تنوع ژنتیکی، به تنهایی یا در ترکیب با اکسپوزوم، در این مطالعه در نظر گرفته نشد. دوم، تأثیرات مختلف با انواع و سطوح مختلف خطای اندازه‌گیری اندازه‌گیری می‌شوند. به عنوان مثال، سطوح ادرار مواد شیمیایی غیر پایدار دارای تنوع درون فردی بالایی است و انتظار می‌رود که به‌ویژه از خطای اندازه‌گیری کلاسیک که منجر به سوگیری میرایی می‌شود، رنج ببرد. استراتژی‌های نمونه‌گیری مکرر و طرح‌های طولی، ممکن است به از هم گسیختگی اثرات متابولیک پایدار مختل‌کننده‌های غدد درون ریز پیشنهاد شده در مطالعه ما کمک کند. انتظار می‌رود مواجهه‌های اندازه‌گیری شده توسط مدل‌ها و پرسشنامه‌ها از انواع دیگر خطاهای اندازه‌گیری با اثرات قابل پیش‌بینی کمتر رنج ببرند. علاوه بر این، ماهیت همبسته اکسپوزوم، شناسایی مواجهه باراندگی را دشوار می‌کند. در اینجا ما سعی کردیم اثرات را با مدل‌های متقابل تنظیم شده یا طبقه‌بندی شده جدا کنیم. به عنوان مثال، با اجرای مدل‌های طبقه‌بندی شده در مادران غیر سیگاری، اثرات اختصاصی Cd را شناسایی کردیم. علاوه

## 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<sup>۱</sup>

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 پیش آگهی 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، WNT، MYC و 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

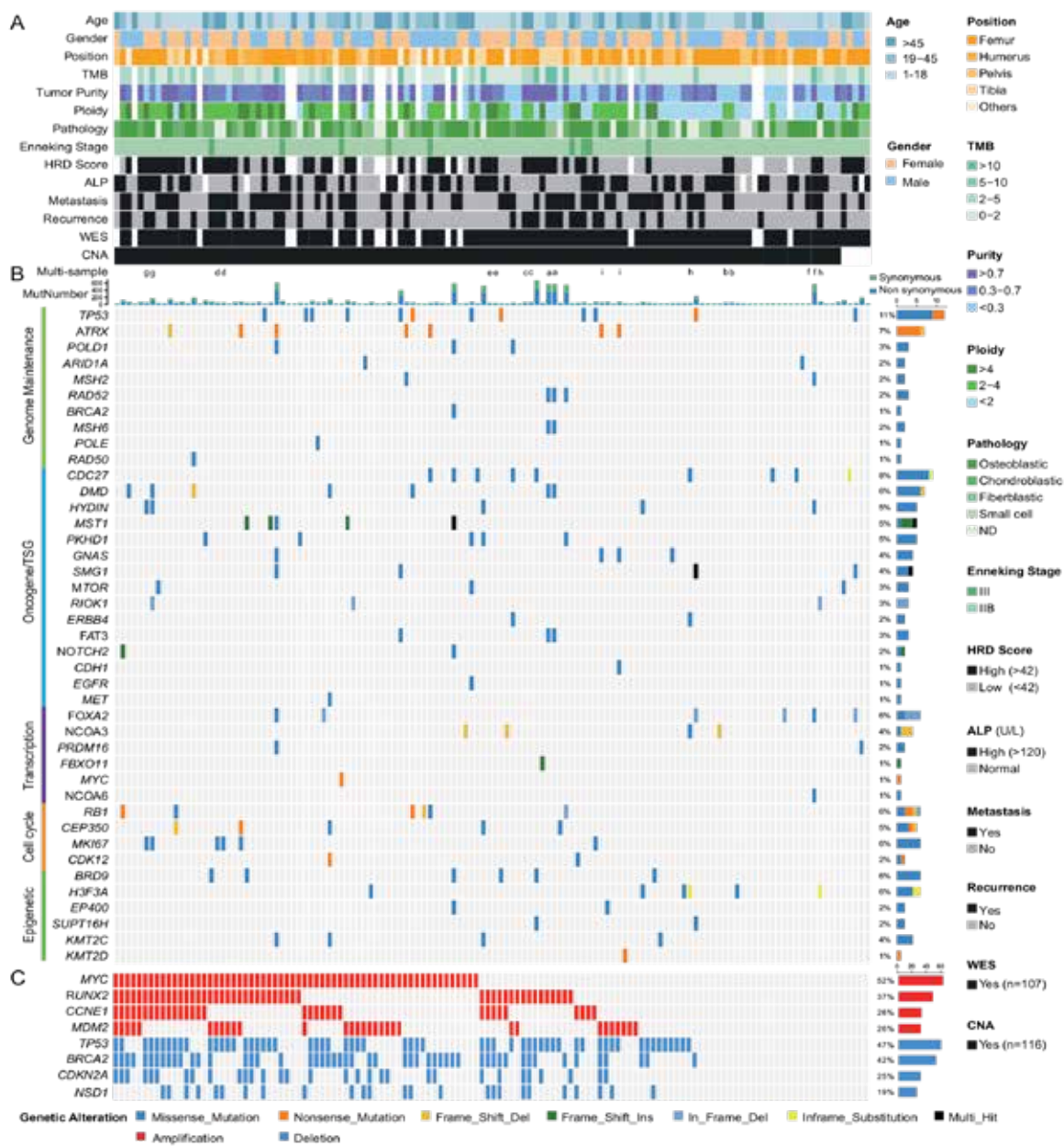
فای تکرارشونده شامل RUNX2 (8q24.13، 52٪)، MYC (6p21.1، 37٪)، PDGFRA (4q12، 35٪)، CCNE1 (19q12، 26٪) و MDM2 (12q15، 26٪) (شکل ۲B). حذف های مکرر شامل سرکوب کننده های کلیدی تومور TP53 (17p13.1، 47٪)، RB1 (13q14.13، 42٪)، NSD1 و CDKN2A/CDKN2B (9p21.3، 25٪) (5q35.2، 19٪) (شکل ۲C). علاوه بر این، CNAها در ۵۰ 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، 2p، 8q، 11p، 19q و 21p ذکر کردیم. در میان آنها، 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



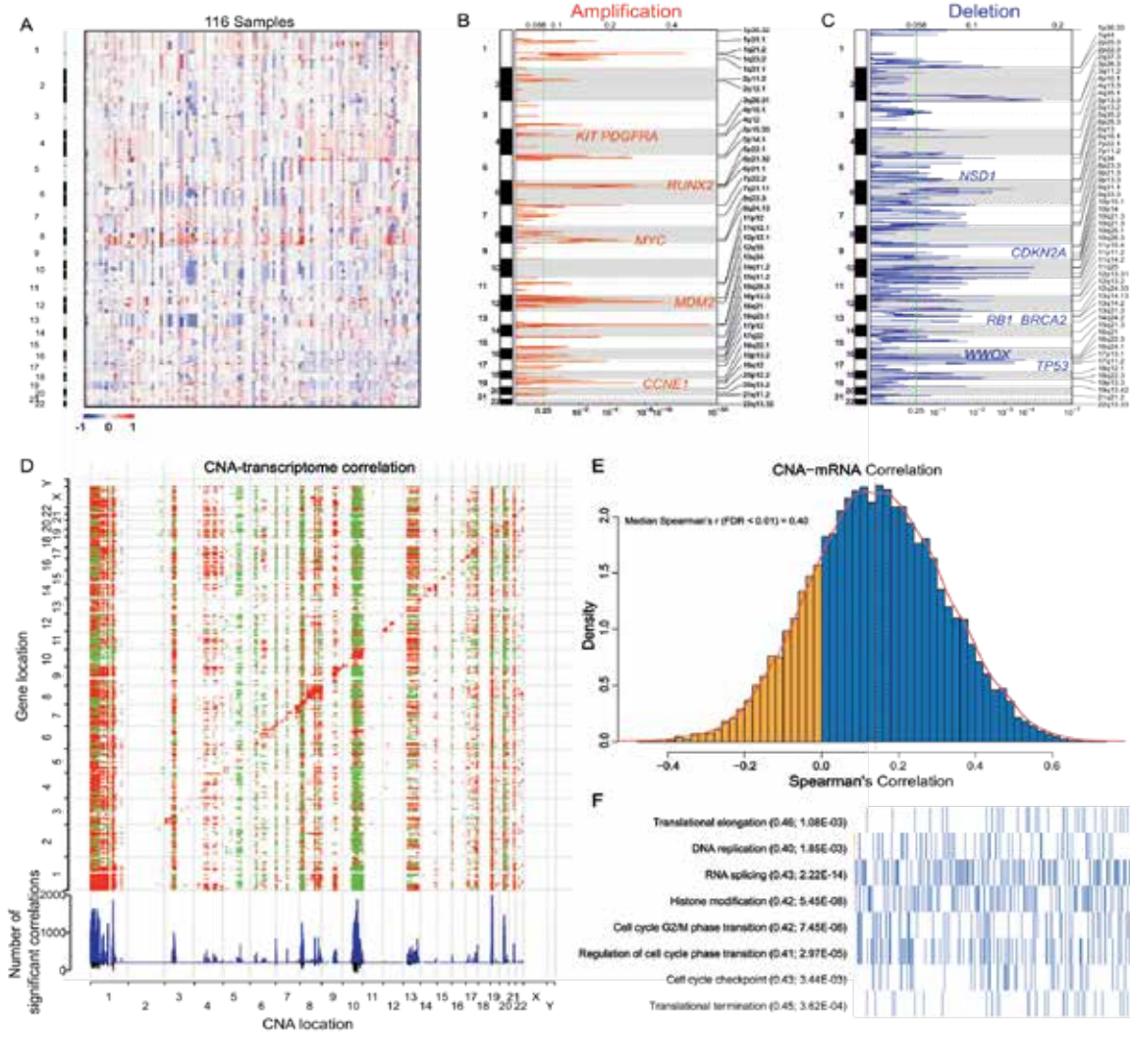
شکل ۱: چشم انداز ژنومی OS:

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.

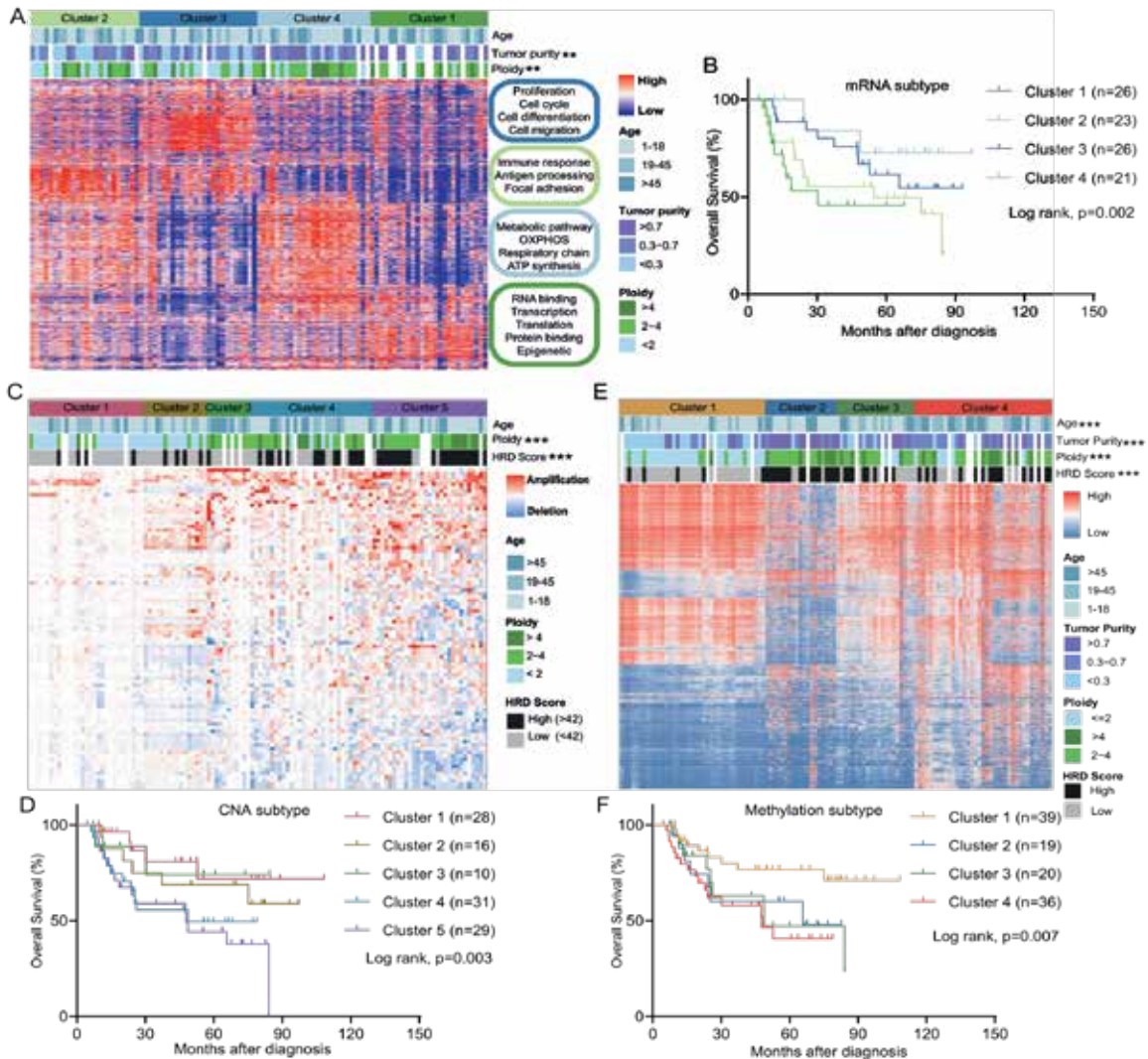
گرفت (شکل ۳D). کلاستر ۱ تقریباً فاقد CNA های قابل توجه بود، که دارای خلوص تومور و آنپلوئیدی کمتری بود که مربوط به فعال شدن سیستم ایمنی و پیش آگهی بالینی مطلوب بود. مشابه CNA Cluster 2، عمدتاً از تومورهای با خلوص پایین تشکیل شده است که با 1q31.1 فراوانتر (BCHE)، 3q36.1 (RGS1)، 5p14.1 (PTGS2، NR5A2)، 11p12 (API5) (PRDM9)، 21q11.2 (LIPI1، RBM11) 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 بیماری 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- $\beta$  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).

د) 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.

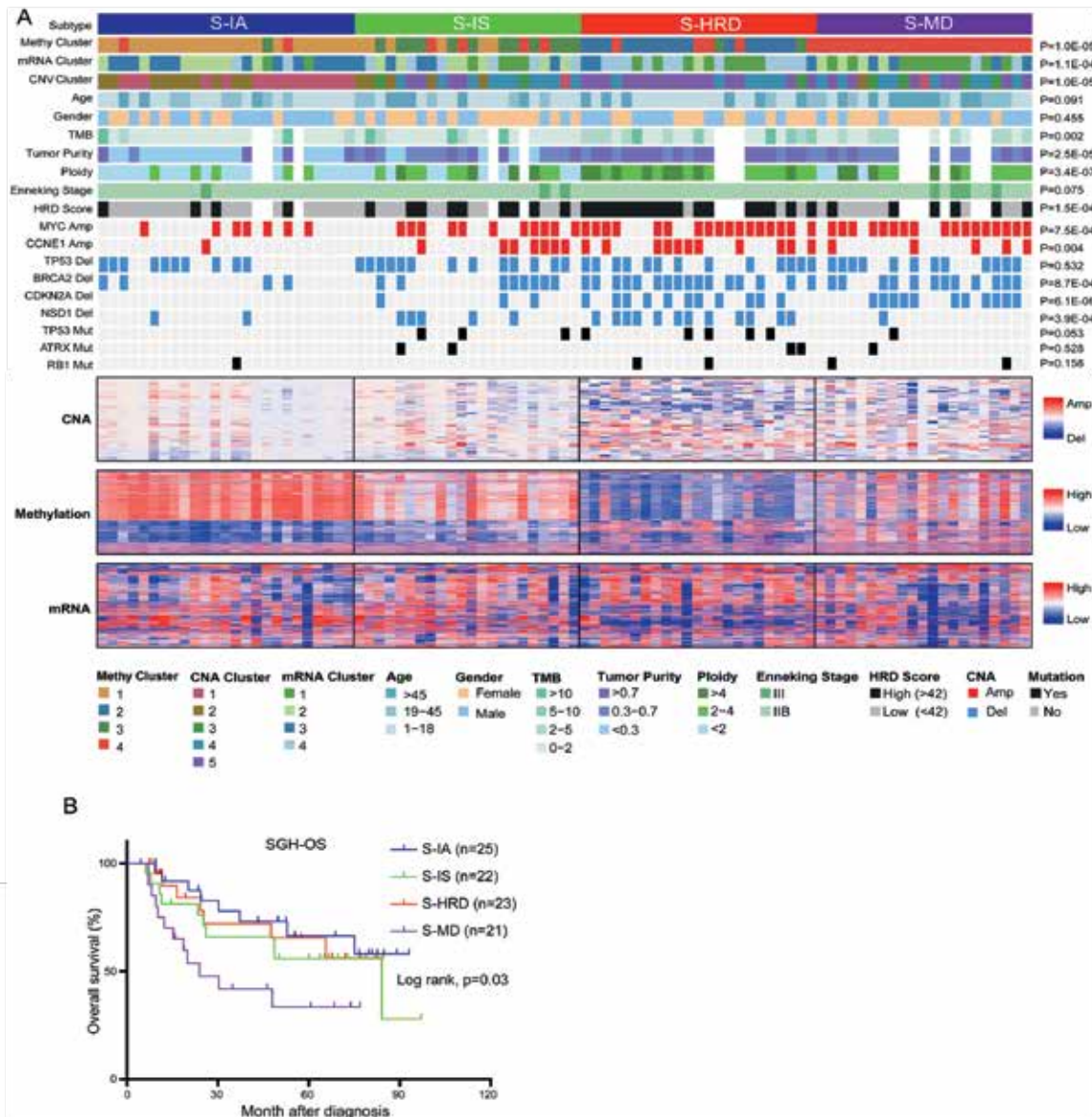
ما ارتباط بالینی زیرگروه بندی یکپارچه را بیشتر آزمایش کردیم و نتایج نشان داد که چهار زیرگروه به طور قابل توجهی در پیش آگهی بالینی متفاوت هستند (رتبه ورود، p = 0.03، شکل ۴B). پس از طبقه بندی بیماران بر اساس مرحله Enneking، زیرگروه‌های یکپارچه هنوز هم به شدت با پیش آگهی بیمار در بیماران مرحله IIB Enneking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

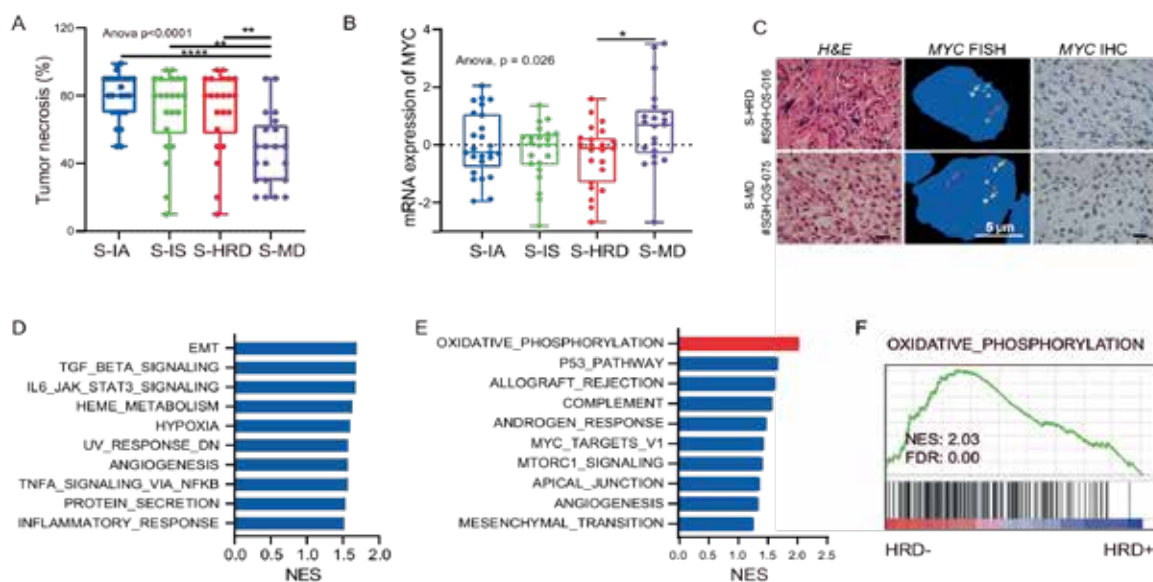
الف) خوشه بندی یکپارچه از ۹۱ بیمار. بالا، چپ به راست: زیرگروه فعال شده با سیستم ایمنی (S-IA iCluster1)، نوع فرعی سرکوب شده سیستم ایمنی (S-IS iCluster2)، نوع فرعی غالب (S-HRD iCluster3) و زیرگروه مبتنی بر MYC (S-MD iCluster4). نتایج خوشه‌بندی تک پلت فرم: خوشه متیلاسیون DNA، خوشه mRNA و خوشه CNA. ویژگی‌های بالینی اولیه: سن، جنسیت و مرحله انکینگ. تغییرات ژنتیکی: خلوص تومور، پلوییدی، 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- $\beta$  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

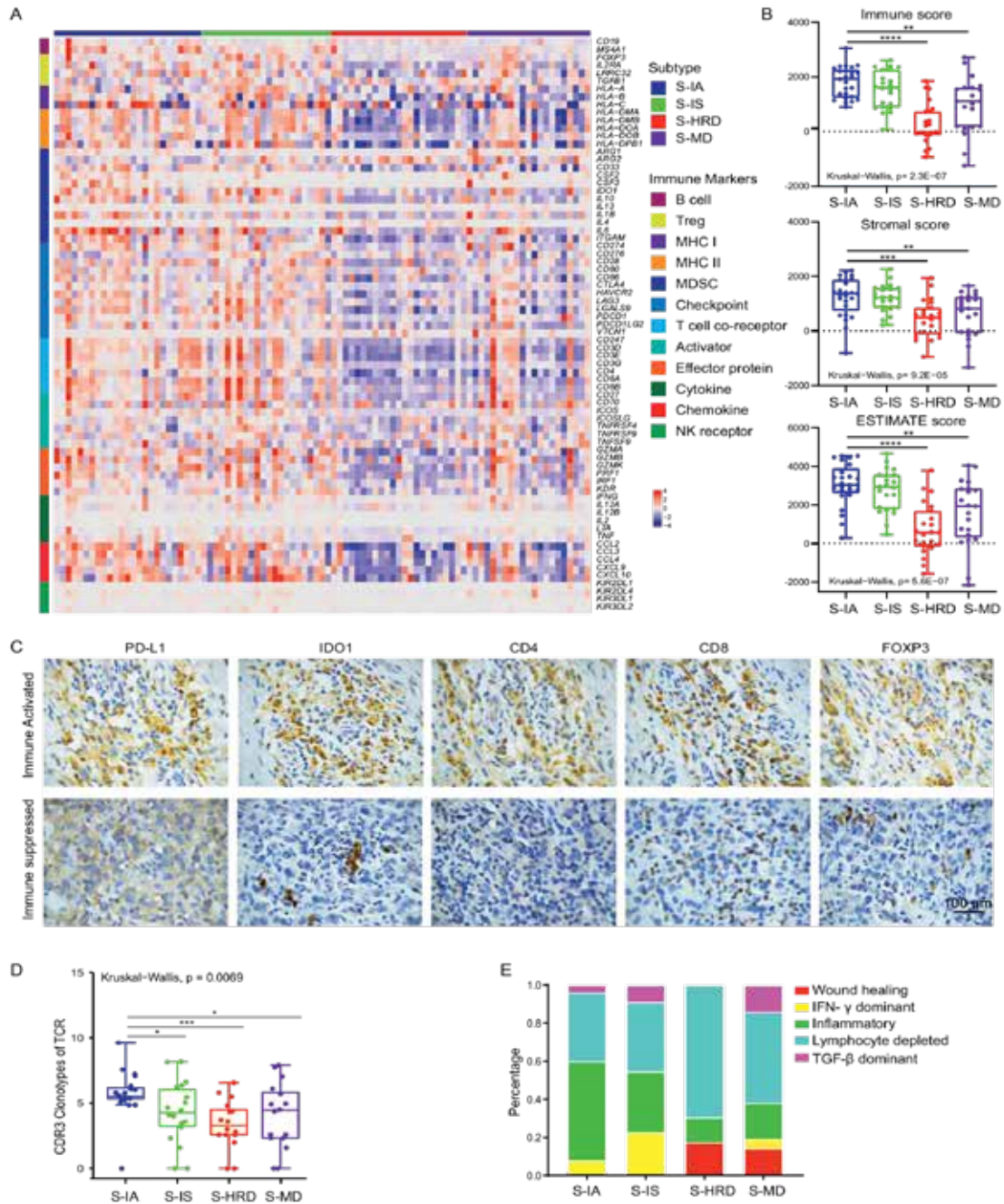


شکل 5: امپلی فای MYC با مهارت HR با فعال سازی OXPPOS و پیش آگهی ضعیف همراه بود.

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

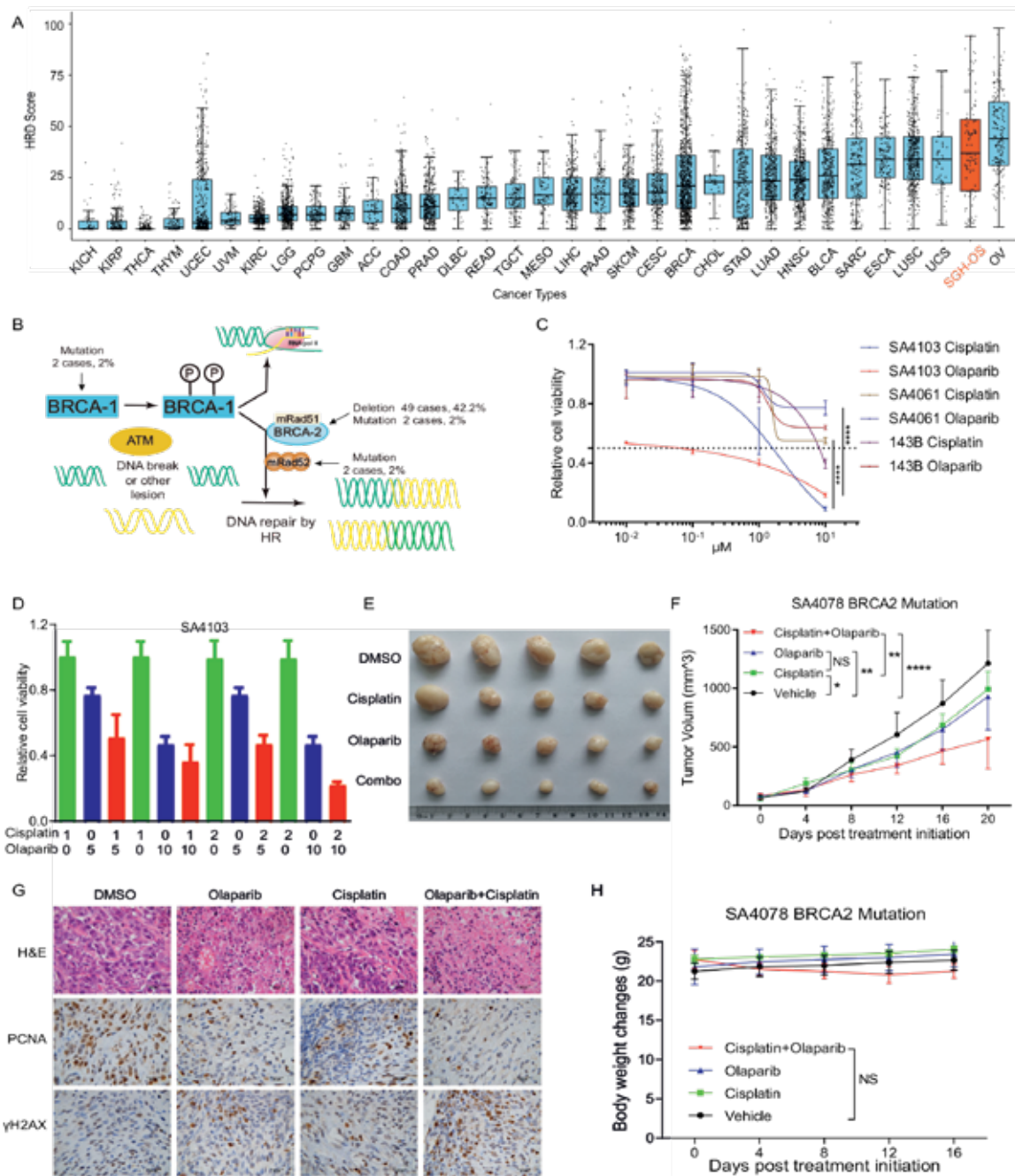
(ب) سطح بیان ژن MYC در هر زیرگروه. آزمون Student t در آنالیز تفاوت معنادار بین S-HRD و S-MD به کار گرفته شد.

(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 (ج) بازآرایی MYC بین مهارت منابع انسانی تقویت شده با MYC و OS کمبود منابع انسانی تقویت شده با MYC. E، F GSEA



شکل ۶: چشم انداز ایمنی OS.

(الف) نقشه حرارتی از ۷۲ مارکر ایمنی در بیماران OS. اطلاعات زیرگروه یکپارچه هر بیمار در بالا توضیح داده شده است.  
 (ب) امتیاز ایمنی، امتیاز نفوذ استرومایی و امتیاز تخمینی در بین هر زیرگروه یکپارچه. تجزیه و تحلیل آماری با آزمون کروسکال-والیس انجام شد.  
 (ج) ایمونوهیستوشیمی PD-L1 و CD4، CD8، IDO1، FOXP3 و Cluster 1-2 و Cluster 3-4. کلونوتیپ‌های  
 (د) CDR3 از TCRها در هر زیرگروه.  $P=0.0069$ . آنالیز آماری با آزمون کروسکال-والیس انجام شد.  
 (ه) توزیع زیرگروه‌های ایمنی در زیرگروه‌های یکپارچه. ستاره‌ها سطوح معنی داری را تعریف می‌کنند ( $p < 0.05$  \*  $p < 0.01$  \*\*  $p < 0.001$  \*\*\*  $p < 0.0001$  \*\*\*\*).



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.  $p < 0.05$ \*,  $p < 0.001$ \*\*\*,  $p < 0.01$ \*\* 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 مارکرها 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- $\gamma$ ) 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- $\beta$ ) 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.

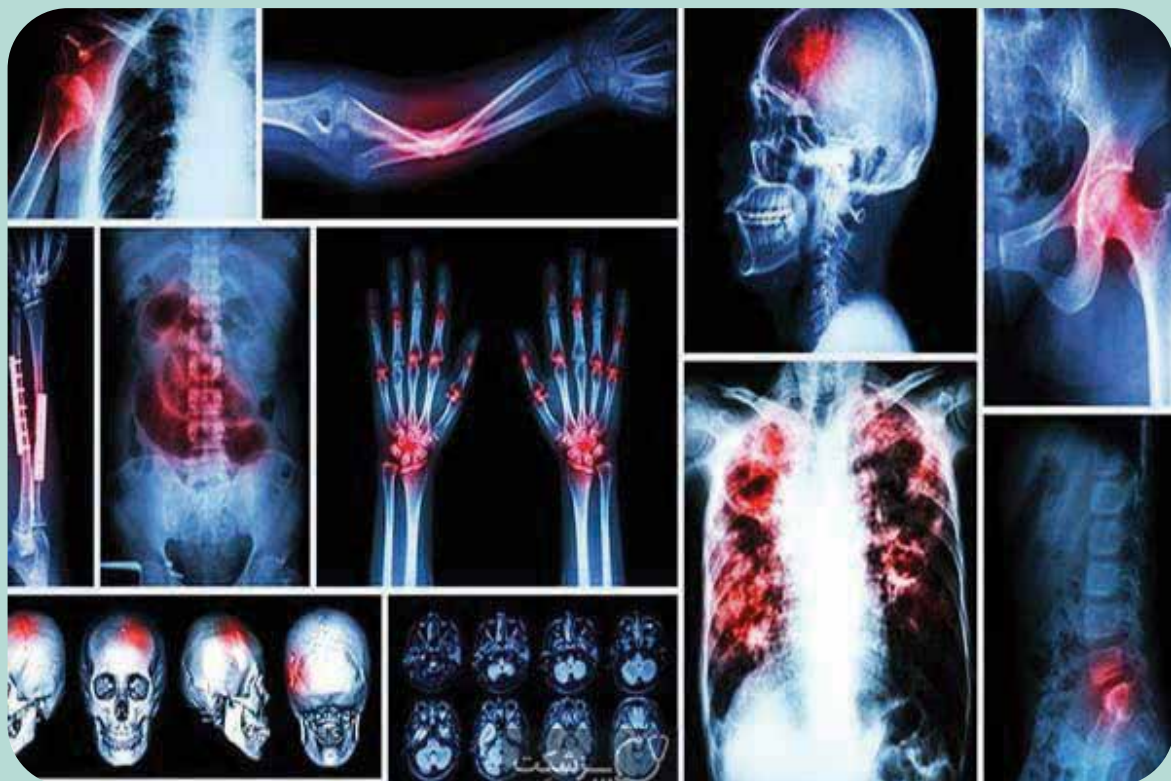
**منبع:**

<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 نئوادجوانست مبتنی بر پلاتین، پیش آگهی مطلوبی داشتند که در نتایج ما تأیید شد.





مرکز شتابدهی و نوآوری رایژن

مرکز شتابدهی و نوآوری رایژن را به کمک جمعی از اساتید برجسته ایران تأسیس کردیم تا دانشجویان و محققان جوان و متعدد حوزه زیست پزشکی، بتوانند کسب و کار دانش محور خود را ایجاد کنند و نه تنها جزه فرهیختگان علمی کشور باشند بلکه دانش خود را به ثروت تبدیل کنند.

## خدمات تخصصی

### مشاوره های تخصصی



کارآفرینان و مدیران موفق در حوزه های مختلف در مرکز نوآوری و شتابدهی، ما را همراهی می کنند و تیم های پذیرفته شده از تجربیات آن ها بهره مند می شوند

### خدمات آموزشی و مربیگری

ما در مرکز نوآوری و شتابدهی، برای افراد دارای ایده های ناب کلاس ها، دوره ها و کارگاه های آموزشی مرتبط با حوزه های مختلف را برگزار می کنیم



### معرفی فضاها و خدمات



ما در مرکز نوآوری و شتابدهی در تلاشیم تا با فراهم آوردن تمام بسترهای مورد نیاز در مسیر راه اندازی کسب و کارتان شما را همراهی کنیم

### سرمایه گذاری

این مرکز علاوه بر ارائه امکانات و خدمات در دوره های شتاب دهی، با توجه به نوع فعالیت تیم استارت آپ، سرمایه گذاری برای تیم های پذیرفته شده فراهم می کند



با ما در ارتباط باشید

[www.RayaaGen.ir](http://www.RayaaGen.ir)

[RayaGen\\_Accelerator](https://www.instagram.com/RayaGen_Accelerator)

[RayaGen\\_Accelerator](https://www.facebook.com/RayaGen_Accelerator)

اشتیاق، خلاقیت و مقاومت.

اساسی ترین مهارت ها در کسب و کار هستند.

اگر این ها را دارید، برای فتح قله آماده هستید.

## تعیین مشخصات مولکولی مرتبط با اتوفازژی با هدف درمان با استفاده از آنالیز مولتی اومیکس

### چکیده:

اتوفازژی یکی از عوامل اصلی مقاومت در برابر درمان سرطان است. تلاش‌های بسیاری برای فهم و غلبه بر مقاومت درمانی مرتبط با اتوفازژی انجام شده است اما این تلاش‌ها در مرحله کلینیک ناموفق بوده‌است. در این مطالعه، ما اثر اتوفازژی برای تخمین وضعیت اتوفازژی تومور را ایجاد می‌کنیم. سپس ما تقریباً ۱۰۰۰۰ نمونه تومور را در ۳۳ نوع سرطان از The Cancer Genome Atlas به گروه‌های با اسکور بالا و پایین اتوفازژی طبقه‌بندی می‌کنیم. ما ارتباط بین ویژگی‌های مولکولی چند بعدی و اتوفازژی تومور را مشخص می‌کنیم و اثرات وضعیت اتوفازژی را بر پاسخ دارویی بیشتر تحلیل می‌کنیم. برخلاف دیدگاه مرسوم که القای اتوفازژی به عنوان یک مکانیسم مقاومتی کلیدی در طول درمان سرطان عمل می‌کند، تجزیه و تحلیل ما نشان می‌دهد که القای اتوفازژی ممکن است سلول‌های سرطانی را به داروهای ضد سرطان نیز حساس کند. ما اثر چندین داروی ضد سرطان را در شرایط *in vitro* و *in vivo* به صورت تجربی تأیید می‌کنیم و نشان می‌دهیم که القاکننده‌های اتوفازژی به طور بالقوه سلول‌های تومور را از طریق کاهش سطح بیان DDIT4 به اتوپوزید حساس می‌کنند. مطالعه ما یک دید جامع از تغییرات در سطح مولکولی مرتبط با اتوفازژی تومور ارائه کرده و فرصتی را برای تجزیه و تحلیل با استفاده از مولتی اومیکس مرتبط با بررسی همزمان حساسیت چند دارو بر اتوفازژی فراهم می‌کند.

### مقدمه:

اتوفازژی که به عنوان ماکرواتوفازژی نیز شناخته می‌شود، یک فرآیند کاتابولیک تخریب لیزوزومی است و در طی



### زهرا انشاری<sup>۱</sup>

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران  
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس زن



و تحلیل جامع مولتی اومیکس برای توضیح بیشتر در مورد تغییرات مولکولی مربوط به اتوفاژی در سرطان وجود دارد.

مطالعات اخیر شواهد محکمی را در پیش‌بینی اتوفاژی از طریق سنجش‌های مبتنی بر LC3، سنجش‌های مبتنی بر SQSTM1/p62 و بررسی مستقیم ساختارها و سرنوشت مرتبط با اتوفاژی توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داده‌اند. با این حال، هیچ یک از این رویکردها در حال حاضر تحت شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیک انسان امکان پذیر نیست. با وجود تعداد زیادی ژن مرتبط با اتوفاژی که در چندین پایگاه داده از جمله، MSigDB15، Autophagy Database، THANATOS، HADB، HAMDB و ncRDeathDB شناسایی و جمع‌آوری شده‌اند، هیچ نشانی از تأثیر ژنی برای تخمین وضعیت اتوفاژی در نمونه‌های سرطان مشاهده نشده است. در این مطالعه، ما از آنالیز ژن تک‌نمونه (ssGSEA)، یک روش پرکاربرد برای تخمین وضعیت اتوفاژی در تعداد زیادی از نمونه‌های سرطان، و به دنبال آن یک آنالیز جامع برای درک تغییرات مولکولی در اتوفاژی استفاده می‌کنیم.

علاوه بر این، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که اتوفاژی به عنوان یک مکانیسم مقاومتی کلیدی در درمان ضد سرطان عمل می‌کند و مهار اتوفاژی می‌تواند حساسیت دارویی را بهبود بخشد. به عنوان مثال، تیوکونازول که ATG4 را هدف قرار می‌دهد، می‌تواند اتوفاژی را برای افزایش سمیت سلولی شیمی درمانی در رده‌های سلولی سرطانی متعدد مهار کند. شواهد *in vivo* بیشتر نشان داده‌اند که مهارکننده‌های اتوفاژی رشد تومورهای ایجاد شده را مهار می‌کنند و پاسخ به درمان سرطان را بهبود می‌بخشند. بر اساس این شواهد امیدوارکننده، ده‌ها کارآزمایی بالینی شامل مهارکننده‌های اتوفاژی در حال انجام است، به عنوان مثال، کلروکین یا هیدروکسی کلروکین، در ترکیب با سایر داروها، مانند مهارکننده mTOR تمسیرولیموس، مهارکننده پروتازوم بورتوزومیب و هیستاتینوبیتورلاس ترکیب مهارکننده اتوفاژی پانتوپرازول با دوستاکسل نیز در سرطان پروستات مقاوم به اختگی متاستاتیک مورد بررسی قرار گرفته است. بیشتر تلاش‌ها بر مهار اتوفاژی برای ارتقای اثربخشی درمان سرطان متمرکز است.

در این کار، ما وضعیت اتوفاژی تومور را برای ۱۰۰۰۰

تکامل حفظ شده است که توسط آن سلول‌ها هموستاز سلولی را از طریق بازیافت مواد مغذی از اندامک‌ها و پروتئین‌های آسیب‌دیده حفظ می‌کنند. اتوفاژی، به عنوان تلاقی فرآیندهای بیولوژیکی متعدد، می‌تواند سرطان‌ها را از طریق چندین لایه تغییرات مولکولی، از ژنومیکس (بررسی تمام محتوای ژنی یک جاندار) گرفته تا ترنسکریپتومیکس (بررسی تمام محتوای ترنسکریپتوم یا محتوای قابل رونویسی) و پروتئومیکس (بررسی محتوای پروتئینی) را تحت تأثیر قرار دهد. به عنوان مثال، حذف تک آلی ژن تنظیم‌کننده اتوفاژی BECN1 به تومورزایی در بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان سینه، پروستات و ریه کمک می‌کند. بیان بیش از حد BECN1 تکثیر سلولی را در سلول‌های سارکوم سینوویال سرکوب می‌کند. کاهش بیان ژن ۵ مربوط به اتوفاژی (ATG5) سرطانزایی ملانوم پوستی در مراحل اولیه را افزایش می‌دهد. تجزیه و تحلیل پروتئومیکس نشان داده است که مهار APE1 و اتوفاژی می‌تواند بر مقاومت به سیسپلاتین (داروی شیمی درمانی) در آدنوکارسینوم ریه در رده سلولی A549 با افزایش آپوپتوز، غلبه کند. علاوه بر این، یک شبکه تنظیم‌کننده مولکولی چند بعدی توسط miRNAها و فاکتورهای رونویسی (TFs) نقش ضروری در فرآیند اتوفاژی ایفا می‌کند، ساخته شده است. حاصل از گرسنگی و اتوفاژی القا شده با راپاماسین را تنظیم می‌کند و miRNA-30a اتوفاژی را مهار می‌کند و سلول‌های توموری را با تنظیم کاهشی بیان BECN1 در تومورهای استرومایی دستگاه گوارش به آمیتینیب حساس می‌کند. مطالعات گسترده نشان داده است که FOXO که عضوی از خانواده TFs است در افزایش بیان ژن‌های دخیل در اتوفاژی نقش دارند. FOXO1، یکی از اعضای FOXO TFs، می‌تواند با برهمکنش با ATG7، مسیر اتوفاژیک را القا کند و منجر به افزایش آپوپتوز در تومورها شود. فعال‌سازی FOXO3 مراحل متعددی را برای پروموت کردن مسیر اتوفاژیک تسهیل می‌کند، از جمله افزایش تشکیل نقاط WIPI و القای ULK2 و تجمع LC3h در این نقاط. FOXO3 می‌تواند FOXO1 را برای تنظیم منفی اتوفاژی در سلول‌های سرطانی مهار کند. این مطالعات یک تعامل پیچیده در فرآیند اتوفاژی را نشان می‌دهد. با این حال، در حال حاضر یک تجزیه

نمونه تومور در ۳۳ نوع سرطان از TCGA برآورد می‌کنیم. ما بیشتر ارتباط بین ویژگی‌های مولکولی چند بعدی و اتوفازی تومور را مشخص می‌کنیم و اثرات وضعیت اتوفازی را بر پاسخ به دارو نشان می‌دهیم. از طریق این چشم انداز جامع تغییرات مولکولی مرتبط با اتوفازی تومور، مطالعه ما بینش بیولوژیکی را در مورد هدف گیری درمانی اتوفازی ارائه می‌دهد.

### نتایج

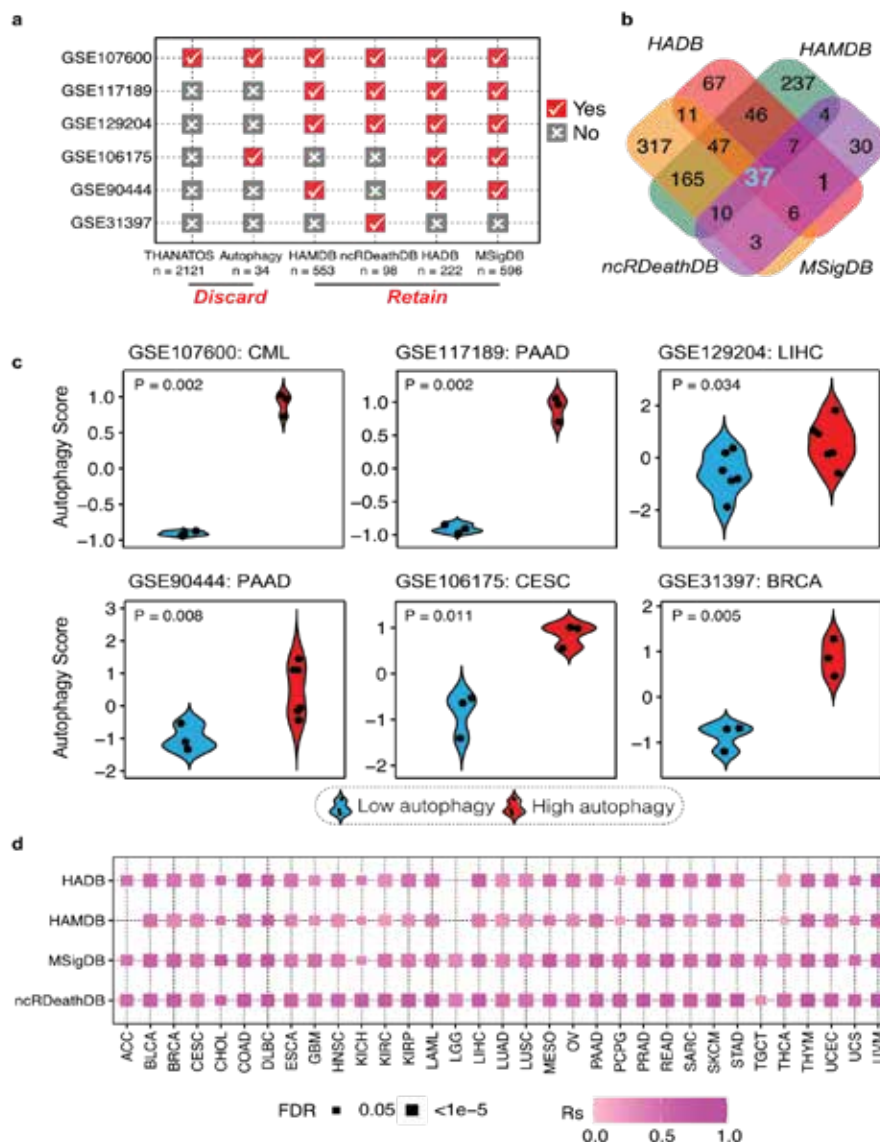
#### شناسایی یک امضای ژن برای تخمین وضعیت اتوفازی در نمونه‌های سرطانی

برای تخمین وضعیت اتوفازی، ابتدا ژن‌های مربوط به اتوفازی را از شش پایگاه داده (MSigDB، HADB، HAMDB، ncRDeathDB، THANATOS، Autophagy) و همچنین شش مجموعه داده مستقل با وضعیت اتوفازی شناخته شده (GSE107600، GSE117189، GSE11746، GSE129020، GSE117600، GSE117466، GSE12902، HAMDB، HAMDB، HAMDB) و اتوفازی جمع‌آوری کردیم. و سپس از الگوریتم ssGSEA برای محاسبه امتیازات اتوفازی بر اساس ژن‌های مربوط به اتوفازی در هر پایگاه داده در تمام شش مجموعه داده مستقل استفاده کردیم. نمرات ssGSEA بر اساس ژن‌های مربوط به اتوفازی از ۴ پایگاه داده (ncRDeathDB، MSigDB، HADB، HAMDB) می‌تواند خطوط سلولی را در وضعیت اتوفازی بالا در مقابل وضعیت اتوفازی کم در حداقل ۴ مجموعه داده مستقل (که با رنگ قرمز مشخص شده اند) به دقت تشخیص دهد (شکل ۱a). ما مجموعه‌های دقیق ژن اتوفازی را با استفاده از ژن‌های (n=۳۷) که در هر چهار پایگاه داده در این مطالعه همپوشانی دارند، ادغام کردیم (شکل ۱b). سی و دو ژن از ۳۷ ژن به طور مستقیم در مراحل کلیدی اتوفازی نقش دارند. به عنوان مثال، آنها در شروع (به عنوان مثال، ULK1، ULK2، ATG13، RB1CC1، همچنین به عنوان FIP200 شناخته می‌شوند)، هسته زایی (به عنوان مثال، PIK3C3، همچنین به عنوان VPS34، BCL2، UVRAG، و ATG14 شناخته می‌شود)، افزایش طول (به عنوان مثال، ATG5، ATG7، ATG3، ATG12، ATG16L1، GABARAPL1، MAP1LC3A و MAP1LC3B)، بارگیری محموله (به عنوان مثال،

#### چشم انداز کلی تغییرات مرتبط با اتوفازی مولتی اومیکس در انواع مختلف سرطان

برای درک الگوی جهانی تغییرات مولکولی مرتبط با فرآیند اتوفازی، ما این نمونه‌ها را از TCGA به گروه‌های دارای امتیاز اتوفازی با امتیاز بالا، نمره متوسط و امتیاز پایین با استفاده از توزیع سه‌کال‌های امتیاز طبقه‌بندی کردیم. در مجموع، ۲۴ نوع سرطان با بیش از ۳۰ نمونه در گروه اتوفازی با امتیاز بالا و گروه اتوفازی با نمره کم برای آنالیز بعدی استفاده شد. برای شناسایی تغییرات مولکولی مرتبط با اتوفازی، از الگوریتم تطبیق امتیاز گرایش (PSM) استفاده کردیم که به طور گسترده در مطالعات قبلی مورد استفاده قرار گرفته است تا اثرات مخدوش کننده‌های بالینی (مانند جنس، سن در تشخیص اولیه پاتولوژیک، خلوص تومور، مرحله پاتولوژیک و نوع بافت شناسی). آنالیز کلی را در شکل ۲a خلاصه کردیم.

در این مطالعه، ما ۵ ویژگی مولکولی مختلف از جمله mRNA، پروتئین، miRNA، ۲۱۸ ۲۰۲۸۸، ۳۷۸۵ ۲۴۳۵، جهش و ۴۵۰ تغییر تعداد کپی سوماتیک (SCNA) را در ۲۴ نوع سرطان آزمایش کردیم (شکل ۲a). ما تعداد قابل توجهی از تغییرات مولکولی مرتبط با وضعیت اتوفازی را شناسایی کردیم (شکل ۲b) و تغییرات به طور قابل توجهی در انواع مختلف سرطان متفاوت بود. به عنوان مثال، بیان mRNA بیشترین تعداد تغییرات را نشان داد (۸۵۳۱ نوع mRNA)، که از ۵۸ ژن در کارسینوم مری



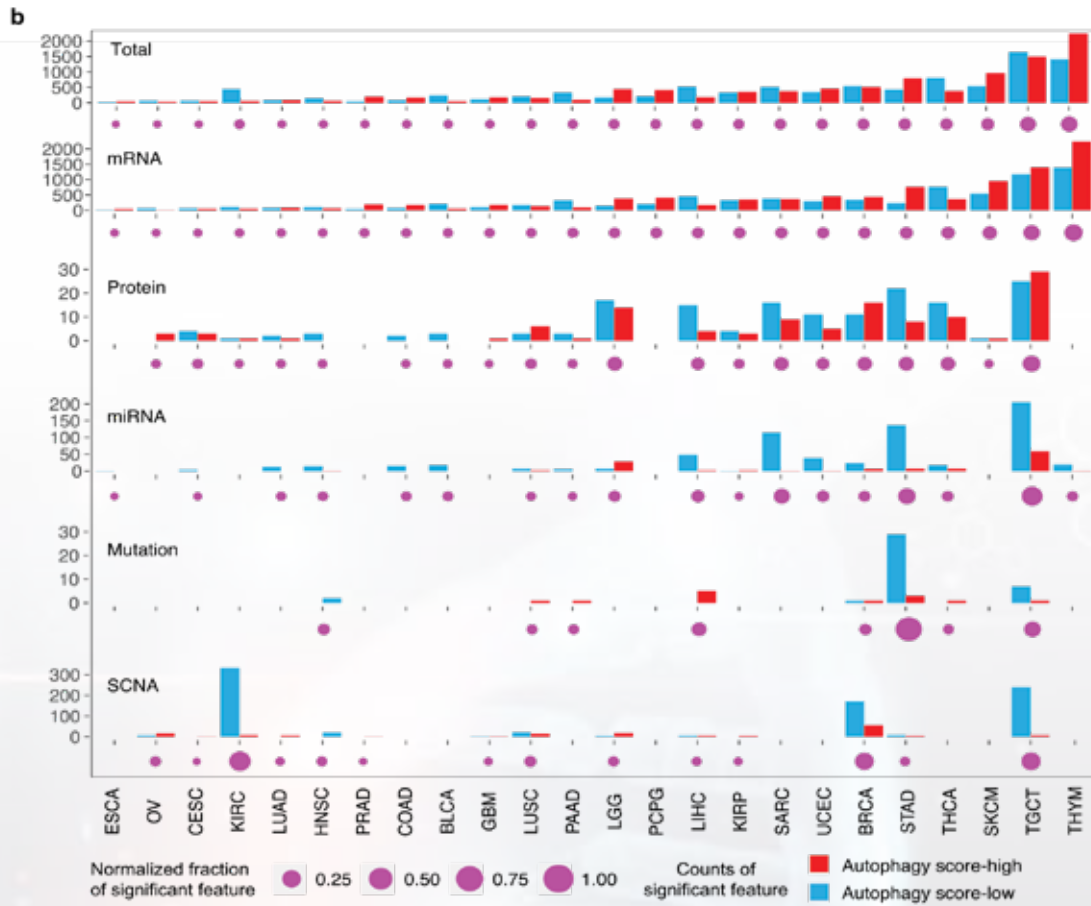
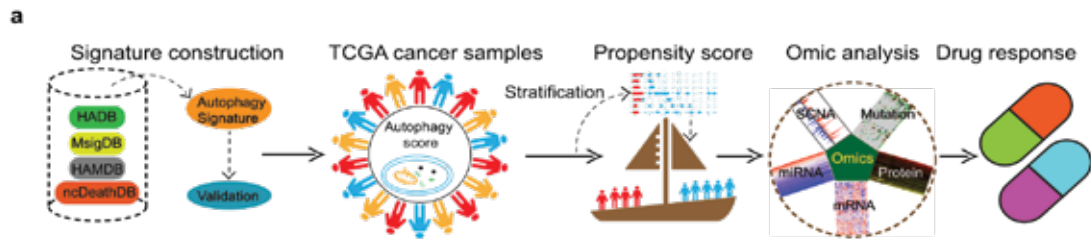
شکل ۱: شناسایی امضای ژن برای تخمین وضعیت اتوفازی در نمونه‌های سرطانی.

الف) وضعیت اتوفازی با نمرات اتوفازی بر اساس لیست‌های ژنی از ۶ پایگاه داده در ۶ مجموعه داده عمومی ارزیابی شد. «Yes» (علامت بررسی) نشان‌دهنده یک لیست ژن است که برای وضعیت اتوفازی تأیید شده است. «No» (x) نشان‌دهنده بی‌اعتباری فهرست ژنی است.

ب) نمودار ون لیست ژن‌های مربوط به اتوفازی از ۴ پایگاه داده با عملکرد بهتر.

ج) امتیازات اتوفازی از ۶ مجموعه داده بر اساس امضای مجموعه ۳۷ ژن در گروه با امتیاز اتوفازی بالا (قرمز) و گروه کم امتیاز اتوفازی (آبی). برای ارزیابی تفاوت از آزمون t دو طرفه دانشجویی استفاده شد.  $P < 0.05$ .

د) همبستگی بین نمرات اتوفازی بر اساس مجموعه ۳۷ ژنی و مجموعه‌های ژنی از HADB, HAMDB, MSigDB, و ncRDeathDB در بین نمونه‌های تومور TCGA. شدت رنگ نشان دهنده ضریب همبستگی اسپیرمن ( $R_s$ ) است. اندازه مستطیل نشان دهنده FDR برای همبستگی اسپیرمن است.  $FDR < 0.05$  عدم وجود مستطیل به معنای عدم اهمیت است برای آزمون فرضیه‌های چندگانه از روش بنجامینی و هوچبرگ استفاده شد. مخفف‌ها: کارسینوم ACC آدنوکورتیکال، کارسینوم اروتنلیال مثانه BLCA، کارسینوم مهاجم پستان BRCA، کارسینوم سلول سنگفرشی دهانه رحم CESC و آدنوکارسینوم اندوسرویکال، کلانژیوکارسینوم CHOL، آدنوکارسینوم کولون COAD، آدنوکارسینوم کولون COAD، آدنوکارسینوم کولون COAD، آدنوکارسینوم کولون COAD، آدنوکارسینوم کولون COAD، کولون COAD، آدنوکارسینوم کولون COAD کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن، کروموفوب کلیه KICH، کارسینوم سلول شفاف کلیوی KIRC، کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه کلیه، لوسمی حاد میلوئیدی LAML، کلیوم با درجه پایین تر مغز LGG، LIHC، کارسینوم کبدی کوآدسلولو کارس لوزاریس، کارسینوم مزوتلیومیای MESO، سیستم‌های سرورژ تخمدان، PAAD آدنوکارسینوم پانکراس، فنوکروموسیتوم و پاراگانگلیوما PCPG، آدنوکارسینوم پروستات PRAD، آدنوکارسینوم رکتوم، سارکوم سارکوم، SKCM تومور پوستی تست، تومور پوستی STTHM، تومور پوستی UCEC Uterine Corpus End، کارسینوسارکوم رحم، SKCM سرطان رحم، کارسینوسارکوم رحم UCS، ملانوم UVM لوسمی میلوژن مزمن CML.



شکل ۲: مروری بر پنج ویژگی مولکولی در انواع سرطان.

(الف) آنالیز یکپارچه مولتی-اومیکس و پاسخ دارویی در انواع مختلف سرطان.

(ب) تعداد هر ویژگی مولکولی تغییر یافته (miRNA، mRNA، جهش، پروتئین و SCNA) و کل ویژگی‌های مولکولی تغییر یافته در گروه‌های با امتیاز اتوفازی بالا (قرمز) و امتیاز اتوفازی پایین (آبی) از نمونه‌های تومور TCGA. نقطه سرخابی نشان‌دهنده درصد ویژگی‌های مهم نسبت به کل ویژگی‌ها در هر سرطان است. SCNA = تغییرات تعداد کپی سوماتیک.



دو سرطان غنی شده است (گلیوبلاستوما مولتی فرم: FDR = 0.041; PRAD: FDR = 0.017؛ شکل ۳b). غنی سازی انتقال اپیتلیال - مزانشیمی (EMT) در گروه STAD و TGTC با امتیاز اتوفازی بالا، ارتباط بین اتوفازی و EMT را نشان می‌دهد (شکل ۳b).

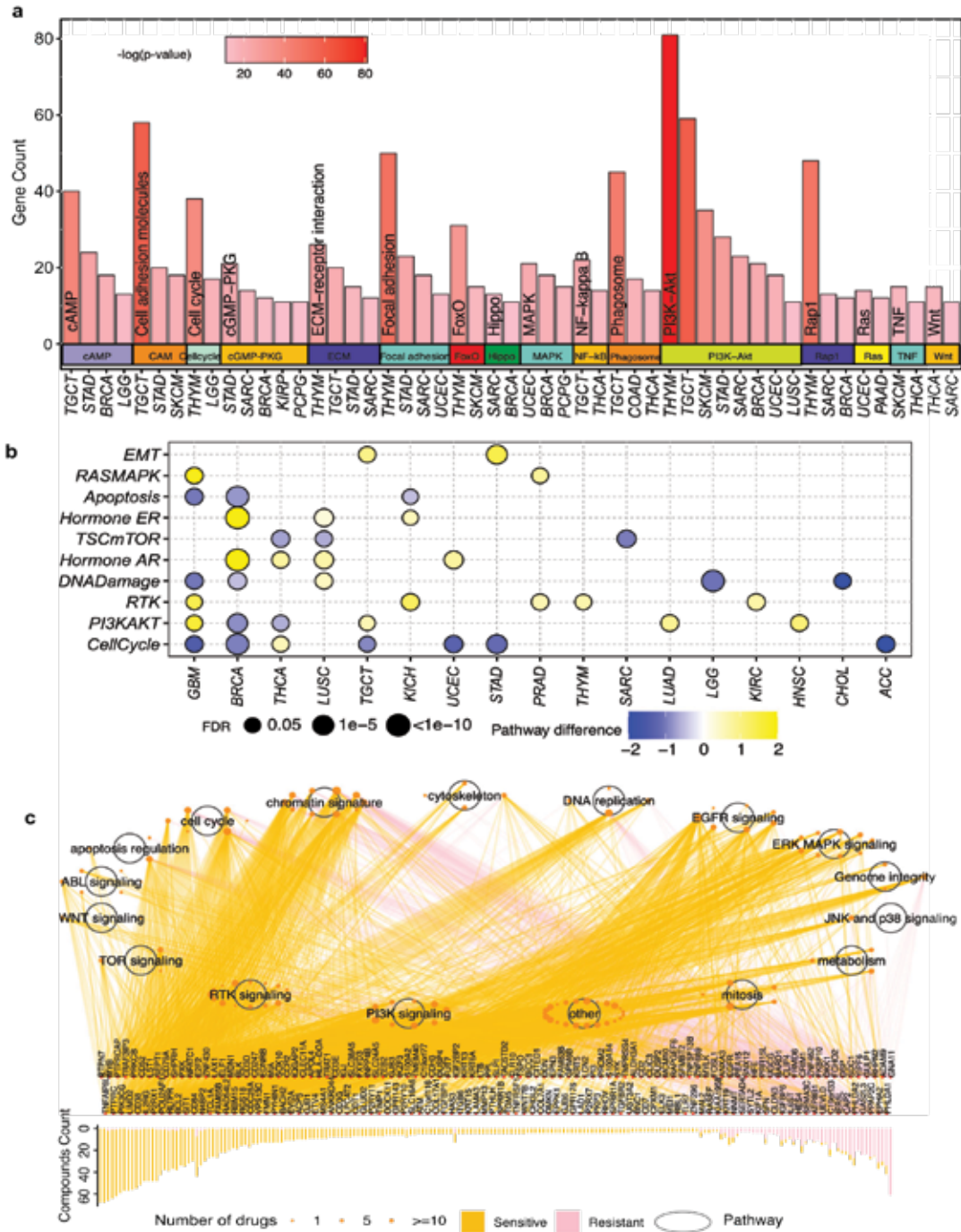
برای بررسی بیشتر ارتباط بین مسیرهای بیولوژیکی و پاسخ دارویی، ما همبستگی بین بیان mRNA ژن‌ها در مسیرهای مرتبط با سرطان و ناحیه زیر منحنی دوز-پاسخ 252 (AUC) داروی ضد سرطان در ژنومیک حساسیت دارویی را محاسبه کردیم. ما دریافتیم که ۱۹۷ ژن مرتبط با اتوفازی بیان شده متفاوت در ۱۶ مسیر سیگنال دهی سرطان با پاسخ دارویی به ۱۱۹ داروی ضد سرطان در حداقل سه نوع سرطان (FDR < 0.05، |RS| > 0.3) و اکثر ژن‌ها مرتبط هستند. با حساس شدن داروهای ضد سرطان مرتبط است (شکل ۳c) این مسیرها شامل برخی از مسیرهای مرتبط با اتوفازی، مانند مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT، مسیر سیگنالینگ MAPK و مسیر سیگنالینگ mTOR هستند (شکل ۳c). به عنوان مثال، مسیر سیگنالینگ PI3K، که گزارش شده است یک مهارکننده حساسیت شیمیایی است، به طور قابل توجهی در هر دو پروفایل mRNA و پروتئین متفاوت بود. ما دریافتیم که ۷۹ ژن در مسیر سیگنال دهی PI3K با حساسیت ۱۱ داروی ضد سرطان و ۳۴ ژن در مسیر سیگنالینگ PI3K با مقاومت نه داروی ضد سرطان مرتبط هستند. تنظیم مسیر سیگنالینگ MAPK حساسیت دارویی سلول‌های سرطانی را در انواع مختلف سرطان افزایش می‌دهد. ما دریافتیم که ۳۶ ژن در مسیر سیگنال دهی MAPK با حساسیت ۱۱ داروی ضد سرطان و چهار ژن در مسیر سیگنالینگ MAPK با مقاومت نه داروی ضد سرطان مرتبط هستند. مطالعات قبلی همچنین نشان داده اند که تنظیم مسیر سیگنالینگ mTOR می‌تواند سلول‌های سرطانی را نسبت به داروهای ضد سرطان حساس کند. ما دریافتیم که ۲۶ ژن در مسیر سیگنال دهی mTOR با حساس شدن دو داروی ضد سرطان و ۱۰ ژن در مسیر سیگنالینگ mTOR با مقاومت نه داروی ضد سرطان مرتبط هستند این نتایج یک دیدگاه جامع برای کاوش استراتژی‌های درمانی از طریق هدف قرار دادن ژن‌ها در مسیرهای سیگنالینگ ارائه می‌دهد.

تا ۳۶۳۲ ژن در تیموما متغیر بود (THYM؛ شکل ۲b). در مقابل، تنوع جسمی حداقل تغییرات را نشان داد، با تنها ۵۱ جهش در هشت نوع سرطان، از ۱ جهش در کارسینوم سلول سنگفرشی ریه (LUSC) تا ۳۲ جهش در آدنوکارسینوم معده (STAD). فراوانی هر ویژگی مولکولی در پروفایل‌های مولکولی مختلف در سرطان‌ها بسیار متفاوت است. به عنوان مثال، چندین نوع سرطان، از جمله THYM، تومور سلول زایای بیضه (TGCT)، و ملانوم پوستی پوست (SKCM)، تعداد بیشتری از تغییرات را بین گروه‌های امتیاز اتوفازی بالا و کم امتیاز اتوفازی نشان دادند (شکل ۲b).

### ارتباط بین اتوفازی و بیان mRNA/پروتئین و مسیرهای سیگنالینگ

برای بررسی ارتباط بین اتوفازی و بیان mRNA، ما بر روی mRNAهای تغییر یافته قابل توجه در ۲۴ سرطان تمرکز کردیم. این ژن‌های تغییر یافته در ۱۶ مسیر از دایره المعارف ژن‌ها و ژنوم‌های کیوتو (KEGG) که با بیش از ۱۰ ژن در حداقل دو نوع سرطان غنی شده بودند ( $p \text{ value} < 0.05$ )؛ شکل ۳a). این مسیرها شامل برخی از مسیرهای مرتبط با اتوفازی مانند مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT، مسیر سیگنالینگ MAPK و فاگوزوم است که اغلب گزارش شده است که فرآیند اتوفازی را در چندین سرطان تعدیل می‌کند.

داده‌های پروتئومیکس عملکردی آرایه‌های پروتئین فاز معکوس، پروتئین‌های کل و سفریله شده مرتبط با سرطان را پوشش می‌دهند. برای درک بیشتر اثرات بالقوه اتوفازی بر بیان پروتئین، نمرات مسیر را بین گروه با امتیاز اتوفازی بالا و گروه نمره کم اتوفازی بر اساس بیان پروتئین در ۱۰ مسیر سیگنالینگ سرطان، که بر اساس فاز معکوس تعریف شده‌اند، مقایسه کردیم. آرایه پروتئین از TCGA قابل ذکر است، ما دریافتیم که مسیر mTOR در گروه کم امتیاز اتوفازی در سه سرطان به طور قابل توجهی غنی شده است (LUSC: نرخ کشف کاذب [FDR] = 0.032؛ SARC: FDR = 0.004، کارسینوم تیروئید (THCA) (FDR = 0.09)؛ 3b)، که با مشاهدات قبلی که مسیر mTOR از اتوفازی جلوگیری می‌کند، مطابقت داشت. علاوه بر این، ما دریافتیم که مسیر RAS-MAPK، به عنوان فعال کننده اتوفازی، در گروه با امتیاز اتوفازی در



شکل ۳: ارتباط بین اتوفازی و بیان mRNA / روتین و مسیرهای سیگنالیینگ.

(الف) مسیرهای غنی شده با تعداد ژن بیش از ۱۰ در حداقل دو سرطان توسط mRNAهای تغییر یافته قابل توجهی در مقایسه گروه با نمره بالا در اتوفازی در مقابل گروه کم امتیاز اتوفازی. بارپلات ژنهای غنی شده را نشان می‌دهد. شدت رنگ بارپلات نشان دهنده اهمیت مسیرهای غنی شده است. غنی سازی مسیرها با بسته "clusterProfile" ارزیابی شد.

(ب) مسیرهای سیگنال دهی تغییر یافته بر اساس داده‌های پروتئومیکس عملکردی آرایه‌های پروتئین فاز معکوس در گروه با امتیاز اتوفازی در مقابل گروه کم امتیاز اتوفازی برای سرطان‌های متعدد، رنگ نشان دهنده تفاوت امتیاز مسیر است. اندازه نقطه نشان دهنده FDR برای امتیاز مسیر است.

(ج) همبستگی اسپیرمن بین سطوح بیان mRNA ژن‌های مرتبط با اتوفازی در مسیرهای سیگنالیینگ مختلف و ناحیه زیر منحنی در ۱۰۷۴ رده سلول سرطانی. بارپلات تعداد داروهایی را که هر ژن را هدف قرار می‌دهند، نشان می‌دهد. نقطه نارنجی مسیر هدف دارو را نشان می‌دهد. اندازه نقطه نشان‌دهنده تعداد ژن‌های مرتبط با حساسیت دارویی است.



در گروه ۴ نوع سرطان با امتیاز اتوفازی بالا تنظیم شد و FOXA2 توسط فعالیت اتوفازی در سلول‌های بنیادی سرطان تخمدان تنظیم شد. در مجموع، نتایج ما نشان می‌دهد که TFها نقش نظارتی مهمی در اتوفازی دارند که بینش‌های بیولوژیکی را برای تحقیقات بیشتر ارائه می‌دهد.

### ارتباط بین اتوفازی و تغییرات تعداد کپی سوماتیک

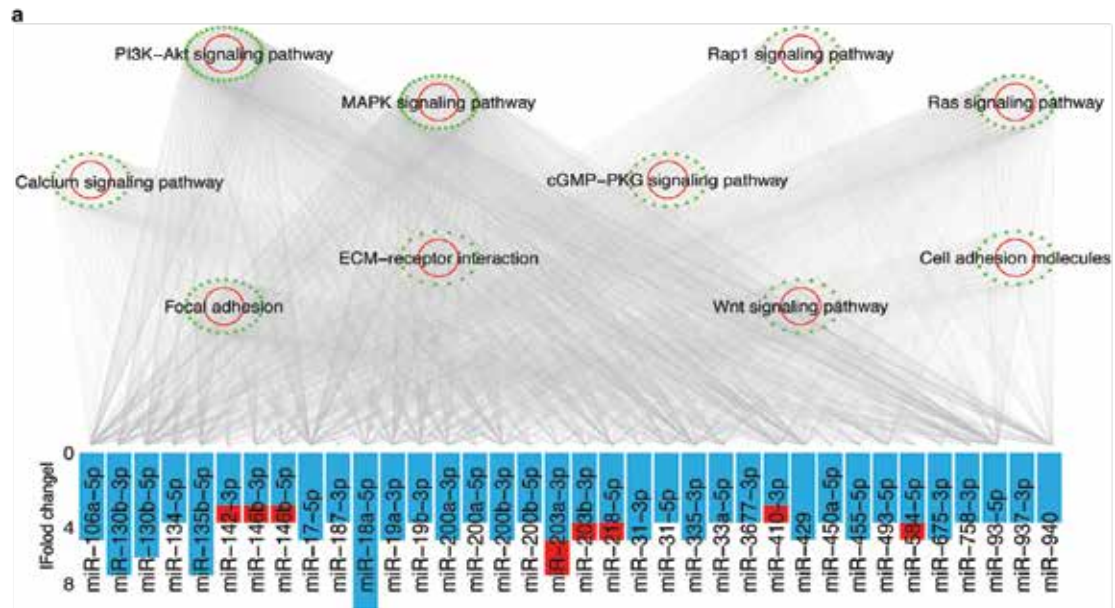
SCNAها می‌توانند بر سطح بیان ژن‌ها در فرآیندهای متعدد اتوفازی در انواع مختلف سرطان تأثیر بگذارند. به عنوان مثال، افزایش تعداد کپی 5q منجر به بیان بیش از حد SQSTM1، یک محموله اتوفازی، در سرطان کلیه می‌شود. تقویت تعداد کپی در 2q37 منجر به افزایش سطح بیان ATG16L1، یک جزء کلیدی از یک مجتمع پروتئینی بزرگ مرتبط با اتوفازی در سرطان پروستات می‌شود. برای بررسی نقش SCNAها در سرطان‌های متعدد، ما ۸۲ SCNA را ارزیابی و شناسایی کردیم که به طور قابل توجهی در ۱۴ نوع سرطان تغییر یافته بودند (شکل 5a)، از ۱ SCNA در آدنوکارسینوم پروستات (PRAD) تا ۳۳ SCNA در BRCA. این مناطق ۸۵۰ ژن را پوشش می‌دهند که از ۱ ژن در PRAD تا ۳۴۱ ژن در کارسینوم سلول شفاف کلیه را شامل می‌شود (KIRC؛ شکل 2b). به عنوان مثال، ما در مجموع ۶۹ حذف را در ۱۳ نوع سرطان شناسایی کردیم (شکل 5a)، با پوشش ۵۸۸ ژن در این مناطق. ما تنها ۳۶ تقویت را در ۱۰ نوع سرطان با ۲۶۷ ژن واقع در این مناطق شناسایی کردیم (شکل 5a).

علاوه بر این، ۱۶ ژن قابل عمل بالینی در این SCNAهای تغییر یافته نگهداری شدند (شکل 5b)، و آنها توسط ۳۷ داروی ضد سرطان از چهار دسته، از جمله درمان هدف و ایمونوتراپی (شکل 5c) مورد هدف قرار گرفتند. به عنوان مثال، حذف 2q37.3 شایع‌ترین SCNA در گروه چهار سرطانی با امتیاز اتوفازی است (BRCA، LGG، OV، و KIRP؛ شکل 5a). پروتئین مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (PDCD1)، به عنوان هدف پمبرولیزوماب و نیولوماب برای ایمونوتراپی سرطان، در ناحیه 2q37.3 در BRCA و LGG قرار دارد (شکل 5b). MTOR، به‌عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین مؤلفه‌هایی که فرآیند اتوفازی را در

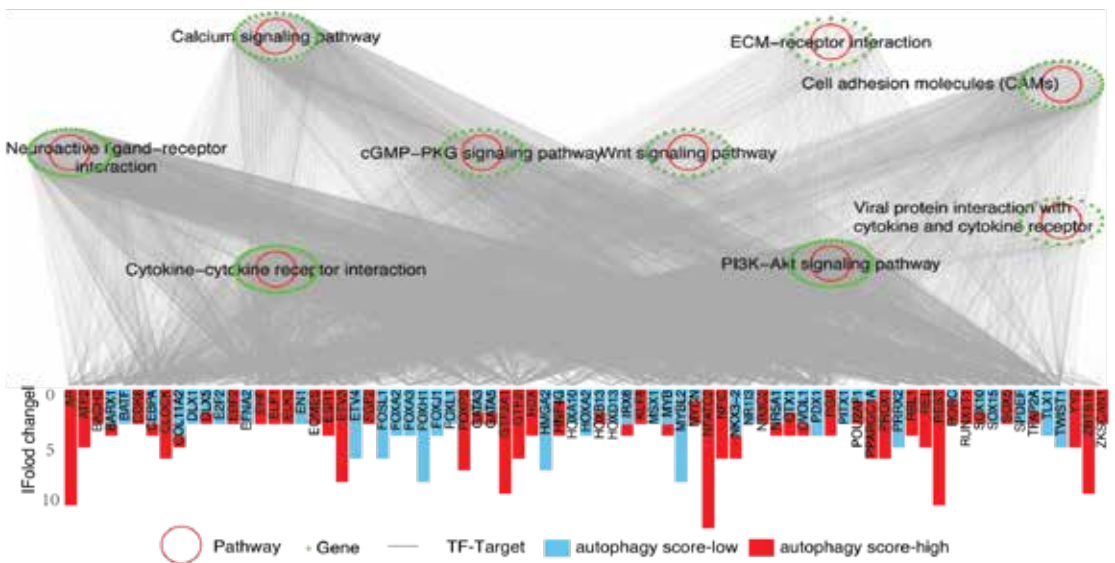
### شبکه تنظیمی در میان miRNAهای مربوط به اتوفازی، ژن‌های هدف و TFs

برای درک بیشتر شبکه تنظیمی در اتوفازی، ما ۳۶ miRNA مربوط به اتوفازی را در حداقل چهار سرطان شناسایی کردیم و یک شبکه تنظیمی هدف miRNA برای بررسی اثرات miRNAها بر اتوفازی ساختیم. ما ۴۰۶۲ لبه بین ۳۶ miRNA و ژن ۱۹۹۴ را با تغییرات بیانی قابل توجه در حداقل سه سرطان شناسایی کردیم (شکل 4a). این ژن‌های هدف‌گیری شده توسط miRNAها در چندین مسیر مرتبط با اتوفازی، از جمله مسیرهای سیگنالینگ PI3K-AKT و MAPK غنی شدند (شکل 4a). به عنوان مثال، در مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT، miR-106a، miR-17-5p، و miR-93-5p بیان کمتری در گروه با امتیاز اتوفازی در حداقل چهار سرطان دارند (شکل 4a). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که miR-106a، miR-17-5p و miR-93-5p به عنوان اعضای خانواده miR-17 می‌توانند با هدف قرار دادن ژن‌های مرتبط با اتوفازی، اتوفازی را مهار کنند. این miRNAها و فعل و انفعالات متنوع، بینش‌های مهمی را در مورد مکانیسم‌های تنظیمی اتوفازی درگیر در سرطان ارائه می‌دهند.

TFs تنظیم کننده‌های حیاتی بیان ژن هستند. ما دریافتیم که ۹۴ TF به طور قابل توجهی در حداقل ۹ سرطان تغییر یافته است، و این 1759 mRNA TFهای متفاوت را مورد هدف قرار می‌دهد (شکل 4b). mRNAهای مورد هدف توسط TFها در ۹ مسیر سیگنالینگ، از جمله مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT مربوط به اتوفازی غنی شدند (شکل 4b). ژن‌های مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT توسط ۶۶ TF مورد هدف قرار گرفتند که شامل FOXA1، FOXA3، FOXJ1، FOXL1 و FOXH1 بود. این TFها، به عنوان اعضای خانواده TF سرچنگال (FOX)، به طور قابل توجهی در گروه با امتیاز اتوفازی از انواع سرطان‌های متعدد تنزل یافتند (شکل 4b)، که با دانش قبلی که از بین رفتن FOXA3 فرآیند اتوفازی را افزایش می‌دهد، مطابقت دارد. جالب توجه است، ما همچنین تغییراتی را در چندین عضو دیگر خانواده FOX تحت وضعیت اتوفازی مشاهده کردیم. به عنوان مثال، FOXP2 در گروه ۷ نوع سرطان با امتیاز اتوفازی بالا تنظیم شد (شکل 4b)، و جهش بی‌هوده FOXP1، به عنوان همان زیر کلاس FOXA2، می‌تواند باعث ایجاد اتوفازی ۵۶ شود.



b Pathway - Gene — miRNA-Target autophagy score-low autophagy score-high

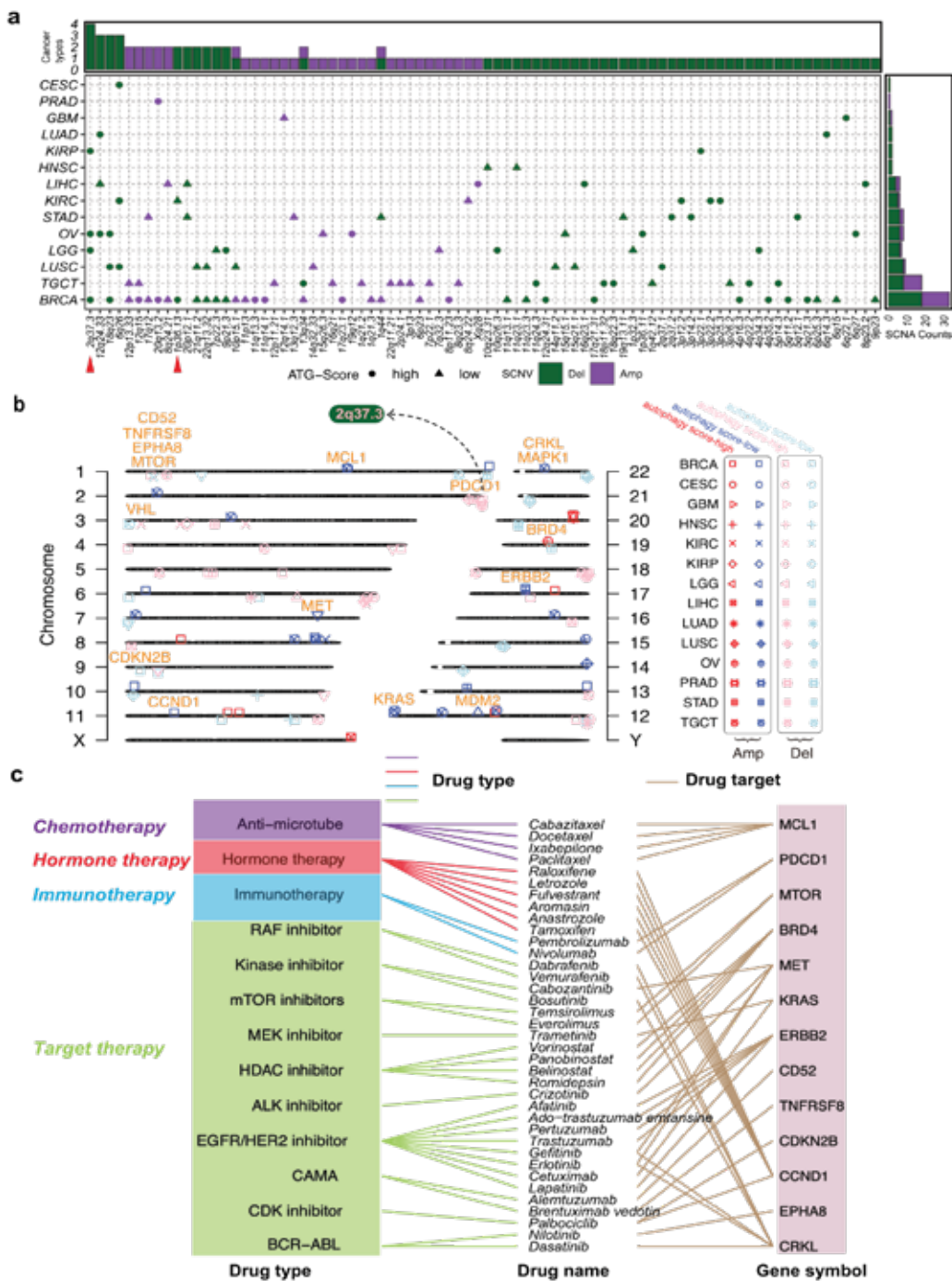


Pathway - Gene — TF-Target autophagy score-low autophagy score-high

شکل ۴: شبکه‌های تنظیم کننده miRNA-target و TF-target در اتوفازی.

الف) مسیرهای مهم KEGG که توسط lncRNA در شبکه تنظیمی هدف miRNA غنی شده است. نقاط سبز: ژن دایره‌های قرمز: مسیرهای KEGG غنی شده با  $FDR < 0.05$ . بارپلات تعداد انواع سرطان با miRNAهای تغییر یافته را نشان می‌دهد. محور Y نشان دهنده | fold change | است.

ب) مسیرهای KEGG قابل توجهی که توسط lncRNA در شبکه تنظیمی TF-هدف غنی شده است. نقاط سبز: ژن دایره قرمز: مسیرهای KEGG غنی شده با  $FDR < 0.05$ . بارپلات تعداد انواع سرطان با TFهای تغییر یافته را نشان می‌دهد. محور Y نشان دهنده | fold change | است.



شکل ۵: ارتباط بین SCNA و اتوفازی در چندین سرطان.

الف) ویژگی‌های خلاصه SCNA در سرطان‌های متعدد نوار بالایی تعداد انواع سرطان با تقویت (بنفش) یا حذف (سبز تیره) را نشان می‌دهد. نوار سمت راست تعداد تقویت (بنفش) یا حذف (سبز تیره) در هر سرطان را نشان می‌دهد. دایره‌ها نشان دهنده امتیاز اتوفازی بالا هستند. مثلث‌ها نشان دهنده امتیاز اتوفازی کم است.

ب) نمودار کروموزوم مکان‌های SCNA‌های مرتبط با اتوفازی را با تغییرات قابل توجه یا ژن‌های ذخیره شده در گروه با امتیاز اتوفازی در مقابل گروه کم امتیاز اتوفازی نشان می‌دهد. قرمز نشان دهنده تقویت است. آبی نشان دهنده حذف در گروه با امتیاز اتوفازی است. صورتی نشان دهنده تقویت است. آبی روشن نشان دهنده حذف در گروه کم امتیاز اتوفازی است. برجسب نارنجی CAG‌ها را نشان می‌دهد. c داروهای مورد تایید FDA که CAG‌ها را در SCNA‌های مرتبط با اتوفازی هدف قرار می‌دهند.

سرطان با امتیاز اتوفازی به بسیاری از داروها از جمله ارلوتینیب در هفت نوع سرطان حساس تر هستند (شکل ۶). این یافته در تضاد با دیدگاه سنتی است که اتوفازی منجر به مقاومت دارویی می‌شود، که نشان‌دهنده اثرات پیچیده اتوفازی بر پاسخ دارویی است.

### پاسخ دارویی حساس کننده اتوفازی در شرایط in vivo و in vitro

ملانوما یکی از برترین انواع سرطان (THYM، TGCT، SKCM) با بیشترین تعداد تغییرات تحت تاثیر وضعیت اتوفازی است (شکل ۲b)، و شایع‌تر از دو نوع سرطان دیگر است. بنابراین ما پاسخ دارویی حساس شده توسط اتوفازی در ملانوم را بررسی کردیم. ما پنج دارو (BMS708163، CMK، BMS536924، DMOG، etoposide) را انتخاب کردیم که پیش بینی می‌شد در وضعیت اتوفازی بالا به SKCM حساس باشند (شکل ۷a)، به استثنای CGP.082996 به دلیل در دسترس نبودن. در میان این داروها، هر دو رده سلولی A375 و SK-MEL-28 به طور قابل توجهی به اتوپوزید و BMS536924 تحت شرایط اتوفازی ناشی از راپامایسین حساس شدند (شکل ۷b). ما وضعیت اتوفازی سلول‌های ملانوما را در شرایط مختلف با وسترن بلات LC3A/B و p6268 بررسی کردیم که فعال شدن اتوفازی با درمان راپامایسین را تایید می‌کند (شکل ۷c). بنابراین، etoposide و BMS536924 برای آزمایش‌های بیشتر در این مطالعه انتخاب شدند. ما سنجش حساسیت دارویی را بر روی داروهای انتخاب شده در سه رده سلولی مختلف ملانوم (SK-MEL-28، SK-MEL-5، SK-MEL-28) تحت شرایط اتوفازی ناشی از راپامایسین در مقابل شرایط کنترل انجام دادیم. آزمایش‌های ما نشان داد که سه رده سلولی ملانوما به اتوپوزید و BMS536924 در شرایط اتوفازی ناشی از راپامایسین حساس تر هستند (شکل ۷b). با در نظر گرفتن سایر اثرات ضد سرطانی بالقوه راپامایسین بر روی رده‌های سلولی ملانوما، ما بیشتر از گرسنگی (به جای راپامایسین) برای القای اتوفازی استفاده کردیم و مشاهده کردیم که سلول‌های SK-MEL-28، SK-MEL-5، SK-MEL-28 و SK-MEL-5 به اتوپوزید و BMS536924 حساس تر هستند. (شکل ۷d). علاوه بر این، ما سنجش مرگ سلولی را انجام دادیم و مشاهده کردیم که اتوپوزید و

توسعه دارو هدف قرار می‌دهد، در ناحیه حذف 1p36.13 در نمونه‌های با امتیاز اتوفازی KIRC و BRCA قرار دارد (شکل ۵b). قابل توجه، MTOR توسط مهارکننده‌های mTOR تمسیرولیموس و اورولیموس (RAD001؛ شکل ۵c) مورد هدف قرار گرفت، که در مطالعات متعدد به‌عنوان داروهای امیدوارکننده‌ای برای بهبود حساسیت درمان ترکیبی با واسطه وضعیت اتوفازی گزارش شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که SCNAهای مرتبط با اتوفازی می‌توانند بر حساسیت داروهای ضد سرطان، از جمله داروهای برای درمان هدف و ایمونوتراپی تأثیر بگذارند.

### اثرات عملکردی وضعیت اتوفازی بر پاسخ دارویی

مطالعات گسترده نشان داده‌اند که اتوفازی می‌تواند تومورزایی را افزایش دهد و مهار اتوفازی می‌تواند سلول‌های تومور مقاوم را نسبت به شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و درمان هدفمند حساس کند. ما به طور جامع ارتباط بین وضعیت اتوفازی و پاسخ دارویی را به تصویر کشیدیم. ما ابتدا همبستگی بین امتیاز اتوفازی و داده‌های دارویی ۱۳۸ دارو را در TCGA64 محاسبه کردیم. ما دریافتیم که تعداد داروهای مرتبط با اتوفازی از ۷ در ACC تا ۷۳ در TGCT متفاوت است. در میان این داروها، در مجموع ۴۱ دارو، ۳۲ ژن قابل عمل بالینی (CAG) را هدف قرار می‌دهند که توسط ۱۳ داروی مورد تایید سازمان غذا و دارو (FDA) مورد هدف قرار می‌گیرند. این CAGها در چهار لایه مولکولی مختلف (بیان mRNA، بیان پروتئین، SCNA و جهش جسمی) از ۲۰ نوع سرطان تغییر یافتند (شکل ۶). به عنوان مثال، ژن قابل عمل بالینی AR به طور قابل توجهی در سطوح mRNA و پروتئین در ۱۰ نوع سرطان، از جمله PRAD، تغییر کرد. AR مورد هدف بیکالوتامید آنتی‌آندروژن (شکل ۶) به طور مداوم گزارش شده است که باعث افزایش اتوفازی در سلول‌های سرطانی پروستات می‌شود ۶۵،۶۶. علاوه بر این، ما مشاهده کردیم که پاکلیتاکسل در بیماران مبتلا به LUAD و امتیاز اتوفازی بالا مقاوم‌تر بود، که با مشاهدات قبلی مطابقت دارد که ۳ - متیل آدنین (MA-3)، یک مهارکننده اتوفازی، سلول‌های A549 را به حساسیت بیشتری نسبت به پاکلیتاکسل سوق می‌دهد. با کمال تعجب، نمونه‌های



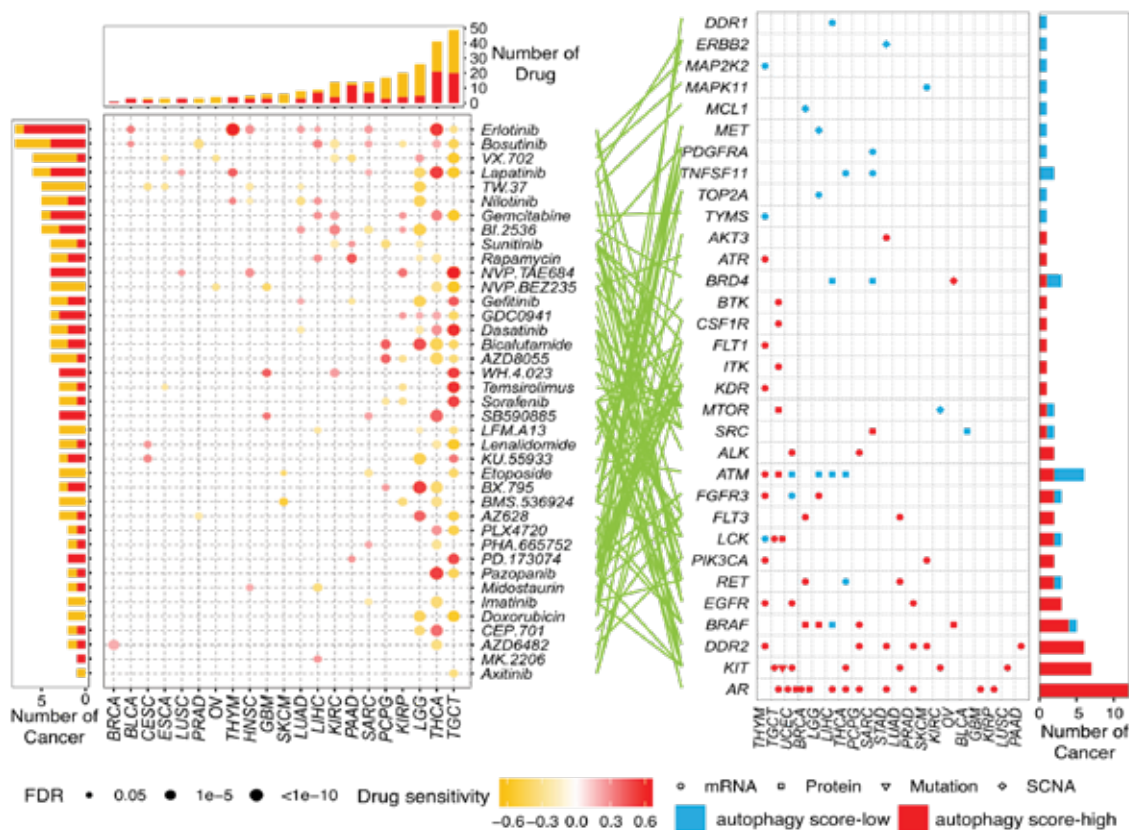
تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشانگرهای اتوفازی، شامل هر دو LC3A/B و p62، نشان داد که وضعیت اتوفازی بافت‌های تومور توسط راپامایسین افزایش یافته است (شکل Yg). ما مشاهده کردیم که رشد تومور به طور قابل توجهی توسط اتوپوزید با راپامایسین القاء کننده اتوفازی (شکل Yf) مهار شد، همانطور که با حجم تومور در مقاطع زمانی مختلف (شکل Yh)، و حجم تومور و وزن تومور در نقطه زمانی که موش‌ها مورد بررسی قرار گرفتند، مهار شد. قربانی کرد.

### مکانیسم بالقوه پاسخ دارویی حساس کننده القاء اتوفازی

برای توضیح اینکه چگونه القاکننده اتوفازی سلول‌های تومور را به اتوپوزید حساس می‌کند، آنالیز توالی‌یابی

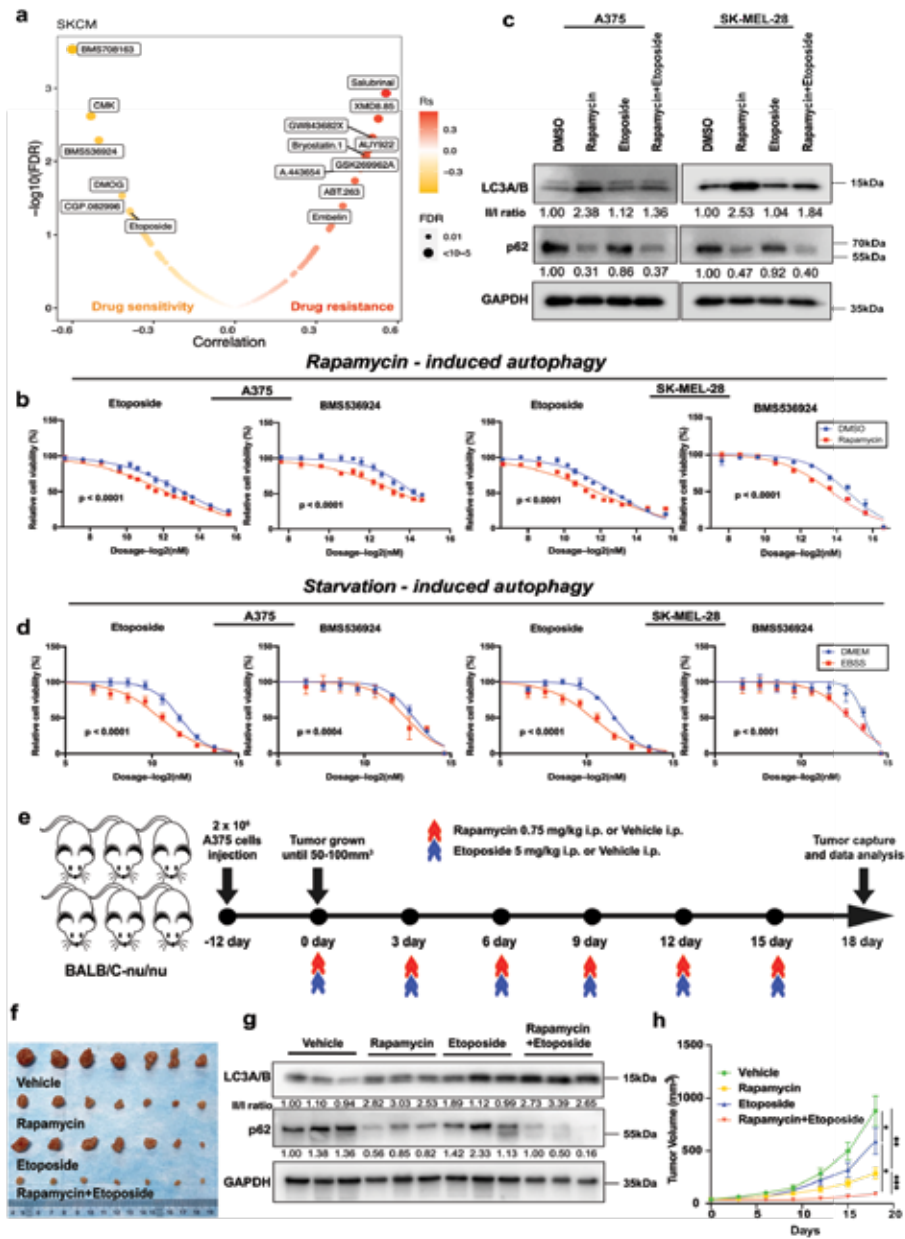
BMS536924 سلول‌های ملانوم بیشتری را در شرایط اتوفازی ناشی از راپامایسین/گرسنگی از بین بردند. این نتایج نشان می‌دهد که القای اتوفازی احتمالاً باعث حساسیت دارویی می‌شود.

برای تایید بیشتر اثرات اتوفازی بر پاسخ دارویی در داخل بدن، اتوپوزید، یک داروی ضد تومور مورد استفاده در کلینیک، را برای ایجاد یک مدل زونگرافت با رده سلولی A375 انتخاب کردیم، که الگوی بسیار مشابهی با SK-MEL- دارد. ۲۸ در حساسیت دارویی (شکل Yb، d). ما از اتوپوزید به تنهایی یا در ترکیب با راپامایسین القاء کننده اتوفازی برای درمان موش‌های BALB/C-nu/nu استفاده کردیم (شکل Ye). همه موش‌ها قربانی شدند و تومور در روز هجدهم برداشته شد (شکل Yf).



شکل ۶: اثرات تغییرات مولکولی در ژن‌های بالینی قابل عمل بر پاسخ دارویی.

حساسیت داروهایی که ژن‌های قابل عمل بالینی را با هرگونه تغییر در سطوح mRNA، پروتئین، جهش و SCNA هدف قرار می‌دهند. نقطه در پانل سمت چپ نشان دهنده همبستگی اسپیرمن بین داده‌های دارویی متناسب شده و نمرات اتوفازی در سرطان‌های متعدد است (قرمز: مثبت، مشبک: مقاوم به دارو؛ نارنجی: منفی، حساس به دارو). اشکال مختلف در پانل سمت راست نشان دهنده انواع مختلفی از امضاهای مولکولی است. نقطه قرمز: گروه اتوفازی امتیاز بالا. نقطه آبی: امتیاز اتوفازی-گروه پایین.



شکل ۷: مشخصات پاسخ دارویی مرتبط با اتوفاجی در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی.

الف) پاسخ دارویی مرتبط با وضعیت اتوفاجی در SKCM. نقطه نارنجی نشان دهنده حساسیت است. نقطه قرمز نشان دهنده مقاومت است.

ب) د) منحنی‌های دوز-پاسخ برای مقدار میانگین زنده‌مانی سلولی اتوپوزید و BMS536924 در شرایط القا شده با رایپامایسین (ب) یا ناشی از گرسنگی (د) و غیر القا شده در رده سلولی ملانوم A375 و SK-MEL-28. زنده ماندن سلول به سطح سلول‌های تیمار شده با DMSO (ب) یا DMEM (د) نرمال شد. DMEM: مدیوم Eagle Modified Dulbecco برای کنترل. EBSS: محلول نمک متعادل برای گرسنگی. نوارهای خطا میانگین  $\pm$  SD را نشان می‌دهد. داده‌های غربالگری دارو گروه‌های مختلف (n=4) برآزش و با منحنی‌های دوز-پاسخ سیگموتیدی مقایسه شدند.

ج) وسترن بلات مارکرهای اتوفاجی در رده‌های سلولی A375 و SK-MEL-28 تیمار شده با DMSO، رایپامایسین، اتوپوزید و رایپامایسین + اتوپوزید. نسبت شدت باند LC3-II/LC3-I و LC3-II/LC3-I p62 نرمال شده به DMSO در زیر لکه‌ها نمایش داده می‌شود. نتایج مشابهی در حداقل سه آزمایش مستقل مشاهده شد. ه) طراحی آزمایش‌های پیوند زئوگرافت. موش نود با  $2 \times 10^6$  سلول A375 تزریق شد. هنگامی که اندازه تومور به 50 تا 100 میلی‌متر معکب رسید، موش‌ها با حامل، 75/0 میلی‌گرم بر کیلوگرم رایپامایسین به صورت داخل صفاقی، 5 میلی‌گرم بر کیلوگرم اتوپوزید یا ترکیب رایپامایسین و اتوپوزید هر 3 روز (n7) تحت درمان قرار گرفتند. موش‌ها با استفاده از "mouse-animal-rodent-mammal-little" که تحت مجوز ساده شده (https://www.fda.gov/oc/ohrt/mouse-animal-rodent-mammal-little) به تصویر کشیده شدند. و) تومورهای بریده شده برای نشان دادن اندازه تومور در روز 18 (ز). وسترن بلات مارکرهای اتوفاجی در بافت موش با درمان وسیله نقلیه، رایپامایسین، اتوپوزید و رایپامایسین + اتوپوزید. نسبت شدت باند LC3-II/LC3-I و LC3-II/LC3-I p62 نرمال شده به وسیله نقلیه در زیر لکه‌ها نمایش داده می‌شود (n=3). ح) آنالیز کمی حجم تومور در مقاطع زمانی مختلف با درمان (n=7). نوارهای خطا میانگین  $\pm$  SD را نشان می‌دهد. تفاوت در گروه‌های متعدد با آنالیز ANOVA یک طرفه برآورد شد. مقادیر P به شرح زیر است: p=0.011 (وسایل نقلیه در مقابل اتوپوزید)، p=0.0012 (خودرو در مقابل رایپامایسین)، p=0.026 (اتوپوزید در مقابل رایپامایسین+رایپامایسین) و g، c. p=0.0012



و راپامایسین با لنتی ویروس DDIT4-OE یا لنتی ویروس کنترل منفی آلوده شدند و بیان نسبی DDIT4 در سلول‌های تیمار شده با لنتی ویروس etoposide + راپامایسین DDIT4-OE افزایش یافت. سلول‌های تیمار شده با لنتی ویروس + etoposide راپامایسین + کنترل منفی، همانطور که توسط وسترن بلات نشان داده شده است (شکل ۸e). هنگامی که DDIT4 بیش از حد بیان شد، زنده ماندن سلول بازسازی شد (شکل ۸f). کارایی و ویژگی siRNAهای DDIT4 در A375 و SK-MEL-28 مورد بررسی قرار گرفت، و وضعیت اتوفازی سلول‌ها در هنگام کوبیدن DDIT4 نیز مورد بررسی قرار گرفت. کارایی لنتی ویروس DDIT4-OE در A375 و SK-MEL-28 و وضعیت اتوفازی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

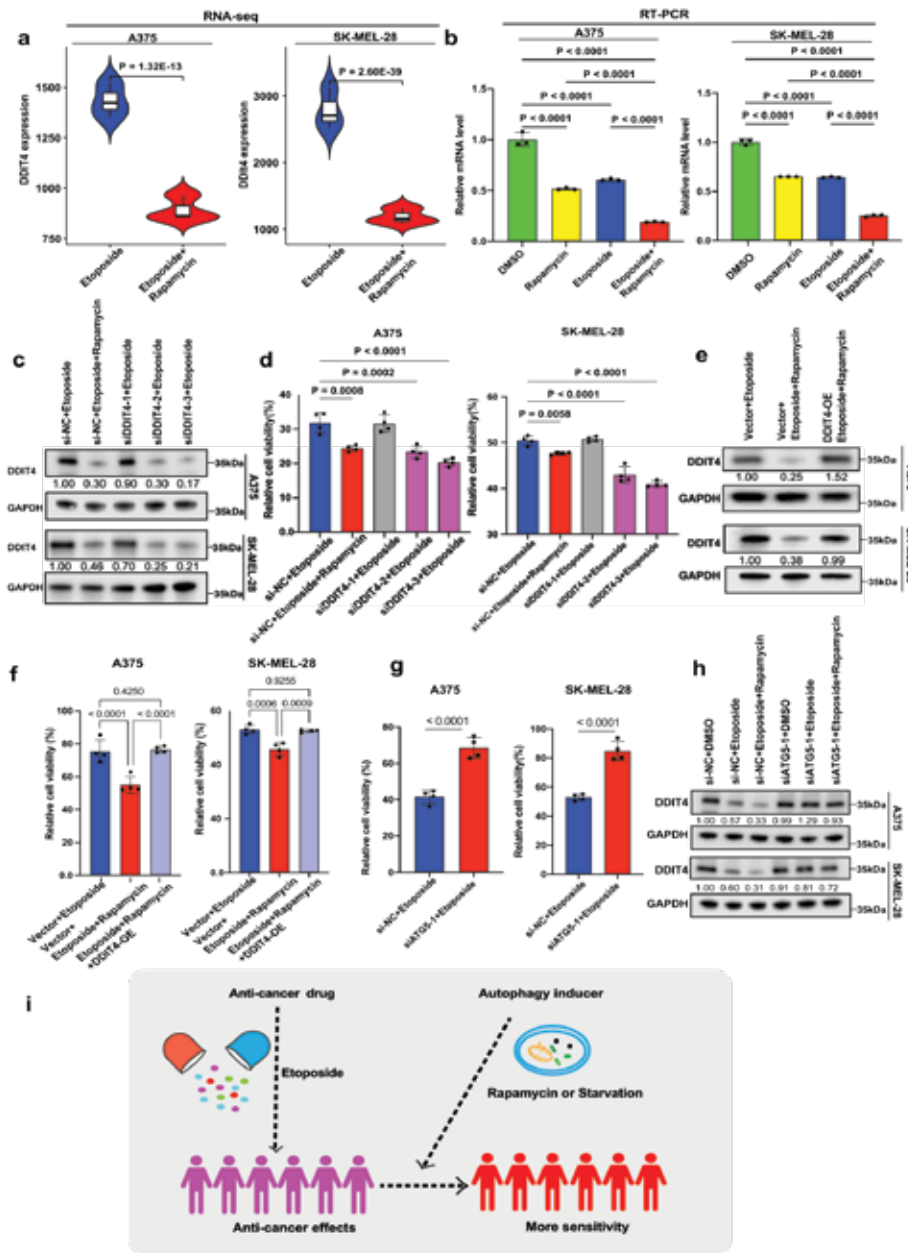
علاوه بر این، ما اتوفازی را با ترانسفکشن سه siRNAهای ATG5 (si-ATG5) به سلول‌های A375 و SK-MEL-28 تحت درمان با اتوپوزید مهار کردیم و کارایی siRNAهای ATG5 با وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. زنده ماندن سلولی نسبی A375 و SK-MEL-28 به طور قابل توجهی با اتوپوزید و si-ATG5-1 افزایش یافت (شکل ۸g). بیان DDIT4 همچنین زمانی که si-ATG5-1 به ترتیب به سلول‌های A375 و SK-MEL-28 تحت درمان با اتوپوزید ترانسفکت شد، به طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۸h). در مجموع، نتایج ما نشان می‌دهد که سلول‌های ملانوما ممکن است در صورت حضور با یک القاکننده اتوفازی نسبت به اتوپوزید حساس‌تر باشند و این الگو ممکن است از طریق DDIT4 واسطه شود (شکل ۸i).

#### بحث

اتوفازی می‌تواند تومورزایی را افزایش دهد و با پاسخ سلولی به ایمونوتراپی، هورمون درمانی و درمان هدف مرتبط است. آنالیز جامع مولتی اومیکس و پاسخ‌های درمانی مرتبط با اتوفازی به طور قابل توجهی به درمان سرطان کمک می‌کند. علیرغم نقش حیاتی اتوفازی، هیچ روش کاربردی برای تخمین وضعیت اتوفازی در تعداد زیادی از بیماران وجود ندارد. در این مطالعه، ما پیشنهاد کردیم تا وضعیت اتوفازی بیماران را بر اساس امضای ژن اتوفازی تعریف کنیم که بررسی نقش

(RNA-seq) RNA را برای سلول‌های A375 و SK-MEL-28 انکوبه شده با اتوپوزید در مقابل اتوپوزید + راپامایسین انجام دادیم. آنالیز PCA نشان داد که نمونه‌ها به خوبی خوشه‌بندی شدند. ما ۹۴۶ ژن با بیان متفاوت بین اتوپوزید در مقابل اتوپوزید + راپامایسین در سلول‌های A375 و ۷۸۲ ژن بیان شده متفاوت در سلول‌های SK-MEL-28 شناسایی کردیم. در میان این ژن‌ها، ۲۹۰ ژن با هم تداخل دارند که بیان متفاوتی بین اتوپوزید در مقابل اتوپوزید + راپامایسین در A375 و SK-MEL-28 با  $|\text{fold change}| > 1.5$  و مقدار p تنظیم شده  $< 0.05$  بر اساس این ۲۹۰ ژن با همپوشانی بیان شده متفاوت، ما بیشتر آنالیز غنی‌سازی مسیر KEGG را انجام دادیم و متوجه شدیم که چندین ژن تنظیم شده (EGF, FGF1, BINP3, DDIT4, PPP2R2B, SFN) اغلب در مسیرهای مرتبط با سرطان یا اتوفازی، مانند مسیر سیگنالینگ PI3K-AKT و مسیر سیگنالینگ mTOR. ما بیشتر این ژن‌های مرتبط با عملکرد را با RT-PCR بررسی کردیم و دریافتیم که بیان نسبی DDIT4 در گروه راپامایسین + اتوپوزید در مقایسه با راپامایسین یا اتوپوزید به تنهایی کمترین میزان بود، که با حجم تومور چهار گروه در یک مدل زنگرافت (شکل ۹h). RNA-seq نشان داد که DDIT4 در A375 و SK-MEL-28 هنگام درمان با اتوپوزید و راپامایسین در مقایسه با اتوپوزید به تنهایی به طور قابل توجهی کاهش یافت (شکل ۸a)، که در A375 و SK-MEL-28 با RT-PCR تأیید شد (شکل ۸b). علاوه بر این، ما همچنین مشاهده کردیم که بیان DDIT4 توسط راپامایسین در یک داده عمومی از GSE2778470 کاهش یافت.

برای بررسی نقش عملکردی DDIT4 در سلول‌های ملانوما حساس‌کننده اتوفازی به اتوپوزید، ما سه siRNA (si-DDIT4) را به ترتیب به سلول‌های A375 و SK-MEL-28 تحت درمان با اتوپوزید انتقال دادیم. بیان DDIT4 در اتوپوزید + si-DDIT4-2 یا si-DDIT4-3 و سلول‌های اتوپوزید + راپامایسین کاهش یافت، همانطور که توسط وسترن بلات نشان داده شده است (شکل ۸c). زنده ماندن سلولی نسبی A375 و SK-MEL-28 به طور قابل توجهی با etoposide و si-DDIT4-2 یا si-DDIT4-3 مهار شد (شکل ۸d). علاوه بر این، سلول‌های A375 و SK-MEL-28 تیمار شده با اتوپوزید



شکل ۸: مکانیسم بالقوه از طریق توصیف عملکردی DDIT4 در شرایط آزمایشگاهی.

الف) بیان mRNA DDIT4 در A375 و SK-MEL-28 توسط RNA-seq (n=3) در جعبه میانه  $1 \pm$  چارک را نشان می‌دهند، با سبب‌هایی که تا شدیدترین نقطه داده در محدوده ۱.۵ بین چارکی از مرزهای جعبه گسترش می‌یابند. اهمیت (p value) بیان شده متفاوت با بسته "DESeq2" ارزیابی شد.

ب) بیان mRNA نسبی DDIT4 در A375 و SK-MEL-28 توسط RT-PCR (n=3).

ج) وسترن بلات DDIT4 در سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 تیمار شده با si-NC یا siRNA DDIT4 در ترکیب با اتوپوزید. شدت باند DDIT4 نرمال شده به si-NC + etoposide در زیر لکه‌ها نمایش داده می‌شود.

د) زنده ماندن سلولی سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 تیمار شده با si-NC یا siRNA DDIT4 در ترکیب با اتوپوزید (n=4). نوارهای صورتی نشان‌دهنده شکست موفقیت‌آمیز (si-DDIT4-1 و si-DDIT4-2) یا si-DDIT4 است، در حالی که نوار خاکستری نشان‌دهنده شکست ناموفق (si-DDIT4-3) است. وسترن بلات DDIT4 در سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 ترانسفکت شده با لنتی ویروس یا وکتور DDIT4-OE در ترکیب با اتوپوزید و رایپامایسین. شدت باند DDIT4 نرمال شده به Vector+Etoposide در زیر لکه‌ها نمایش داده می‌شود.

ه) زنده ماندن سلولی سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 ترانسفکت شده با لنتی ویروس یا وکتور DDIT4-OE در ترکیب با اتوپوزید و رایپامایسین (n=4) و زنده ماندن سلولی سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 تیمار شده با si-NC یا siRNA ATG5 در ترکیب با اتوپوزید (n=4).

و) وسترن بلات DDIT4 در سلول‌های A375 یا SK-MEL-28 تیمار شده با si-NC یا siRNA ATG5 در ترکیب با اتوپوزید. شدت باند DDIT4 نرمال شده به si-NC + DMSO در زیر لکه‌ها نمایش داده می‌شود. (z) تصویری برای مکانیسم بالقوه پاسخ دارویی حساس کننده القاکننده اتوفژی. a, d, f, g. داده‌ها به عنوان میانگین  $\pm$  SD ارائه شد.



مهیار اتوفازای به دلیل کاهش تخریب متابولیت‌های ایمنی تضعیف می‌شود. بنابراین، ترکیب محرک‌های اتوفازای و ایمونوترابی ممکن است یک جهت جایگزین برای درمان سرطان ارائه دهد.

چالش‌هایی در مطالعه اتوفازای وجود دارد که نیاز به بررسی بیشتری دارد. ما وضعیت اتوفازای نسبی را در نمونه‌های تومور تخمین زدیم، که ممکن است در توانایی آن برای انعکاس وضعیت واقعی اتوفازای در بیماران محدود باشد. اتوفازای یک فرآیند بیولوژیکی پویا است که شامل تنظیم مولکول‌های مختلف مرتبط است. بنابراین، ارزیابی دقیق آن با ارزیابی تعداد کمی از نشانگرهای مرتبط با اتوفازای، مانند LC3 یا P62 و غیره دشوار است. اگرچه می‌توان از شمار اتوفازای برای نظارت بر وضعیت اتوفازای استفاده کرد، این رویکرد حتی در سلول‌های کشت شده نیز چالش برانگیز است. خطوط و ارگانیسم‌های مدل ۸۰، در نمونه‌های بزرگ مقیاس (10000~) بیمار ناگفته نماند. مشابه این، هیچ رویکرد مستقیمی برای ارزیابی وضعیت هیپوکسی در بیماران وجود ندارد، در حالی که ما فقط می‌توانیم به طور غیرمستقیم از طریق امضای ۱۵ ژنی به وضعیت هیپوکسی دسترسی پیدا کنیم. آنالیز ما بر اساس RNA-seq در انواع مختلف سلول در یک نمونه است. تلاش‌های بیشتر باید ناهمگونی تومور را در نظر بگیرد، به‌ویژه با پیشرفت‌های فناوری پروفایل تک سلولی. در نهایت، اکثر کارآزمایی‌های بالینی به دلیل چالش فنی نظارت بر وضعیت اتوفازای در داخل بدن، اطلاعاتی در مورد وضعیت اتوفازای نمونه‌های سرطانی بیماران ندارند. در حال حاضر، بیشتر مطالعات بر روی مهیار اتوفازای متمرکز شده‌اند، در حالی که اهمیت القای اتوفازای نادیده گرفته شده است، که منجر به درک محدودی از نحوه تأثیرگذاری امضاهای مولکولی توسط ریزمحیط اتوفازای و تفسیر منطقی از پیامدهای نامطلوب دارویی غیرمنتظره در درمان ضد سرطان می‌شود. با این وجود، مطالعه ما بر اهمیت نظارت بر وضعیت اتوفازای تومور در مطالعات بالینی آینده تأکید دارد.

#### منبع:

<https://www.nature.com/articles/s41467-022-33946-x>

عملکردی اتوفازای در بیماران را تسهیل می‌کند. سپس تمام نمونه‌های سرطان TCGA را بر اساس امضای اتوفازای به گروه‌های با امتیاز اتوفازای بالا و گروه‌های با امتیاز اتوفازای پایین طبقه‌بندی کردیم. برای بررسی اثرات اتوفازای بر مولکول‌های بیولوژیکی در سرطان‌ها، از یک الگوریتم امتیاز گرایش برای به حداقل رساندن اختلال عوامل مخدوش‌کننده مختلف استفاده کردیم: خلوص تومور، جنسیت، قومیت، سن در هنگام تشخیص و وضعیت سیگار کشیدن. ما چندین ویژگی مولکولی مرتبط با اتوفازای را در ۲۴ نوع سرطان، از جمله mRNA، miRNA و بیان پروتئین، جهش‌های سوماتیک و SCNA شناسایی کردیم. علاوه بر این، ما تأثیر شبکه تنظیمی را در بین مولکول‌های مختلف بر روی فرآیند اتوفازای، که جامع‌ترین چشم‌انداز تا کنون است، بررسی کردیم. این نقشه جامع بینش‌های بیولوژیکی قوی را برای تحقیقات آینده ارائه می‌کند، که با آنالیز دقیق قبلی داده‌های مقیاس بزرگ، از جمله TCGA و ICGC22 نشان داده شده است. آنالیز یکپارچه ما نشان می‌دهد که وضعیت اتوفازای می‌تواند بر تغییرات ویژگی‌های مولکولی در لایه‌های مولتی اومیکس در تومورهای مختلف تأثیر بگذارد.

قابل ذکر است، ما دریافتیم که در مجموع ۳۲ CAG به طور قابل توجهی در بین ۲۰ نوع سرطان تغییر کرده‌اند، و انواع سرطان‌های متعدد می‌توانند به داروهایی که این CAGها را هدف قرار می‌دهند پس از القای اتوفازای مقاوم یا حساس باشند (شکل ۶). برخلاف دیدگاه مرسوم که مهیار اتوفازای حساسیت دارویی را ایجاد می‌کند، آنالیز جامع ما و آزمایش‌های *in vitro/in vivo* فرصتی را برای استفاده از تحلیل ویژگی‌های مولکولی شخصی‌شده برای غلبه بر مقاومت دارویی چندگانه ناشی از اتوفازای برجسته می‌کند. با این حال، توجه به این نکته مهم است که تنها با آزمایش‌های منفرد (به عنوان مثال، تک دارو یا رده سلولی)، نتیجه‌گیری اینکه اتوفازای ممکن است حساسیت دارویی را برای تعداد قابل توجهی از داروهای ضد سرطان ایجاد کند، بسیار چالش برانگیز خواهد بود. تجزیه و تحلیل ما بیشتر نشان داد که DDIT4 یک هدف بالقوه برای واسطه‌های القای اتوفازای برای حساس کردن سلول‌های تومور به اتوپوزید است. مطالعات اخیر نشان داده است که سیستم ایمنی بدن با

## 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<sup>۱</sup>

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 ترنسکرپتوم، 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  $1.5 \times 10^{-3}$ ،  $0.017$  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 همجوشی 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

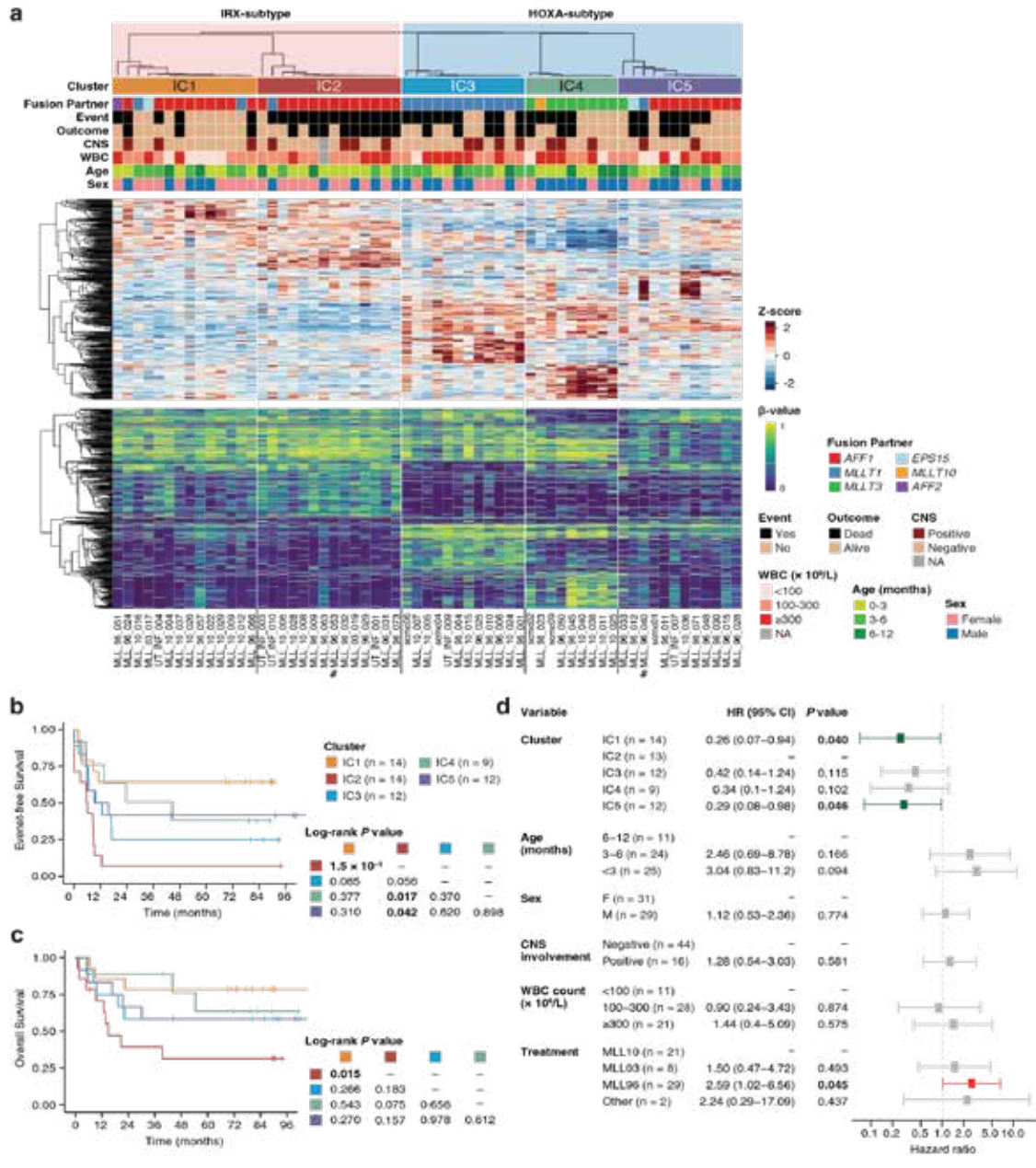
از آنجایی که افزودن اطلاعات متیلاسیون وضوح خوشه بندی را بهبود بخشید، در مرحله بعد وضعیت متیلاسیون DNA در سطح ژنوم این پنج IC را بررسی کردیم. در سطح کلی، سطوح متیلاسیون DNA توزیع های مشابهی را بین ICها در سراسر ژنوم و همچنین درون ژن ها و جایگاه های پروموتور نشان داد که نشان می دهد مجموعه های کوچکی از 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 همجوشی 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 همجوشی 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) ج) آنالیز بقا با مقایسه EFS (ب) و OS (ج) اهای مختلف ALL نوزادان KMT2A-r.

د) تحلیل مخاطرات متناسب کاکس چند متغیره برای EFS. ICها و 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.

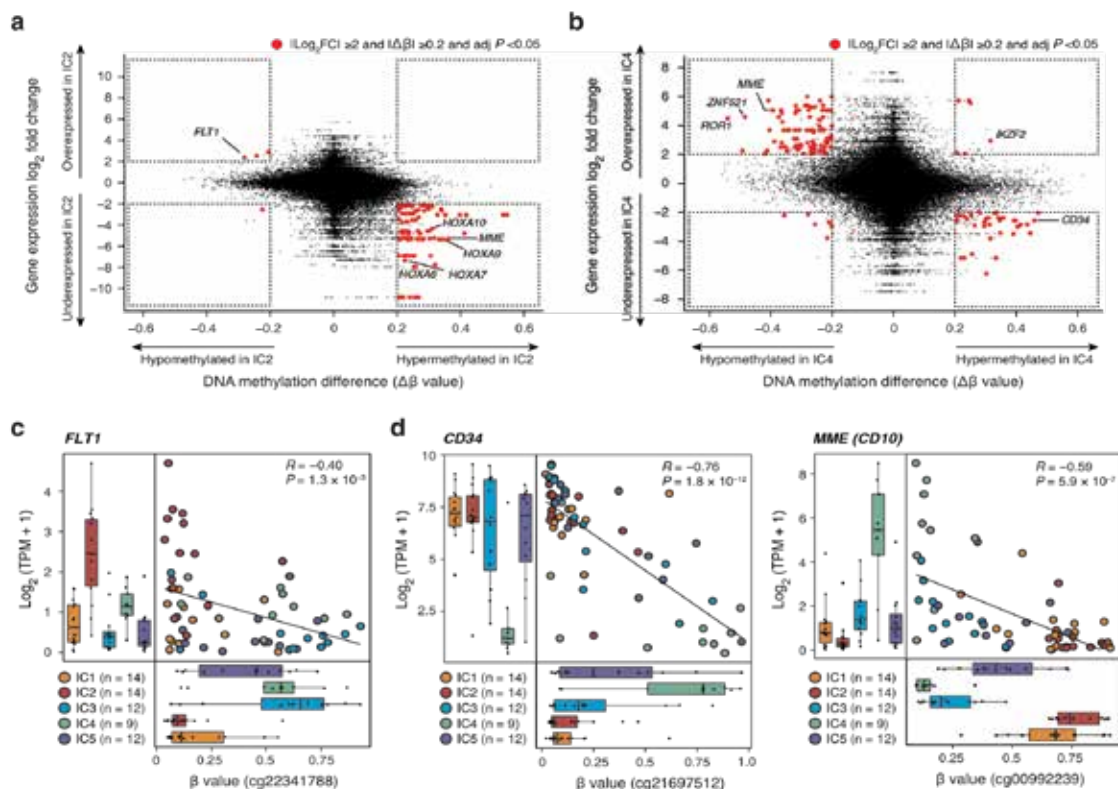
برای حل بیشتر مراحل رشد خوشه ای خاص، ما از مارکرهای نوع سلولی B-Lineage تعریف شده توسط یک مطالعه ترنسکرپتوم تک سلولی کبد جنین انسان و ارزیابی غنی سازی تک نمونه از این امضای رشدی استفاده کردیم. به طور جالبی، امضای رشدی سلول B به طور متفاوتی در پنج IC غنی شدند، با غنی سازی متمایز از امضای سلول بنیادی خونساز/پیش 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

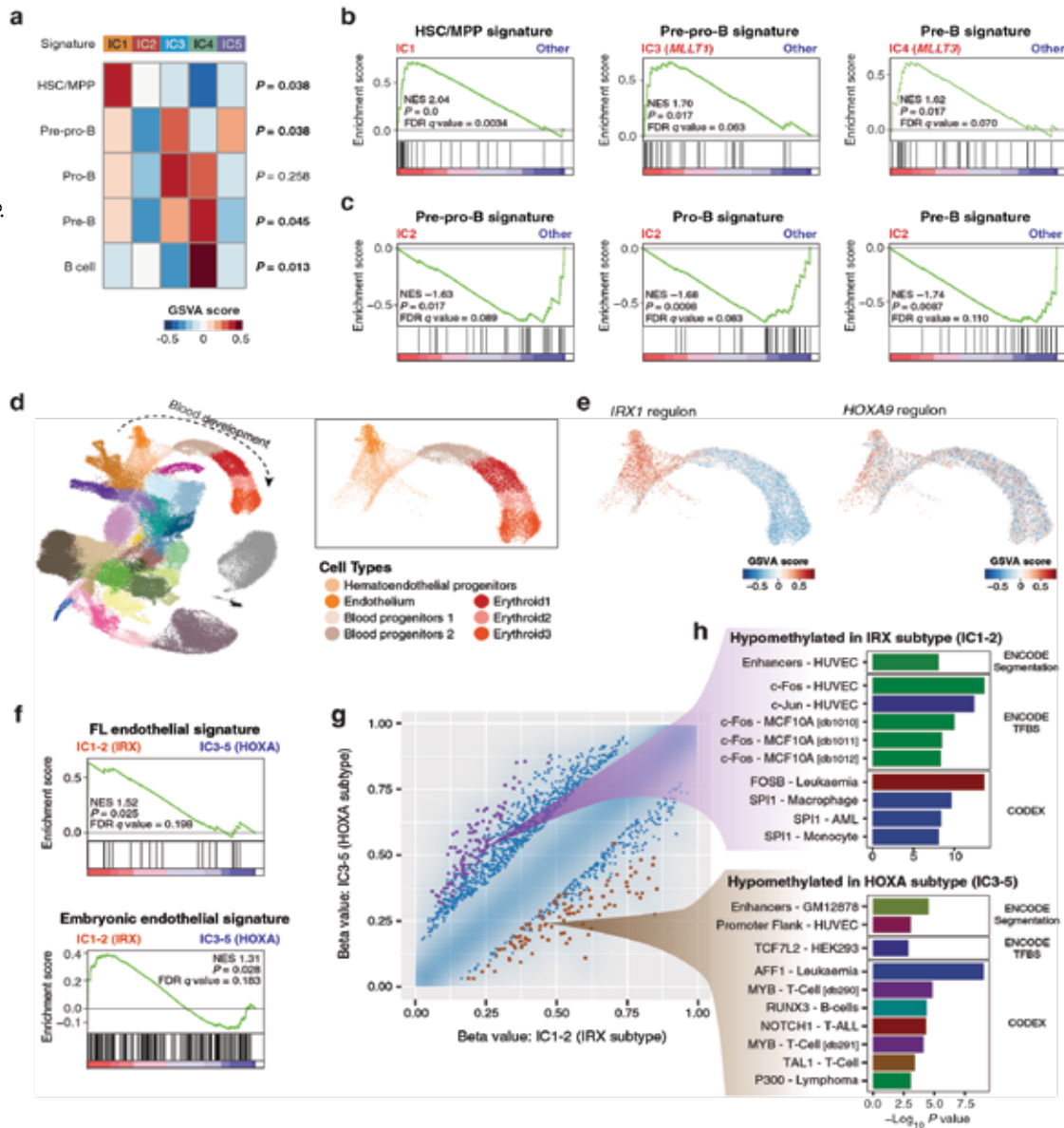


شکل ۲: مقایسه یکپارچه ترانسکرپتوم و متیلوم DNA در ALL نوزاد.

الف و ب) پراکندگی یکپارچه تفاوت‌های بیان متضاد را با تفاوت‌های متیلایسون 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 متیلایسون  $|\Delta\beta| \geq 0.2$  و  $P < 0.05$  تنظیم‌شده دو طرفه) با رنگ قرمز برجسته می‌شوند.

ج و د) بیان ژن مرتبط و متیلایسون 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 ALL نوزاد KMT2A-r.

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.

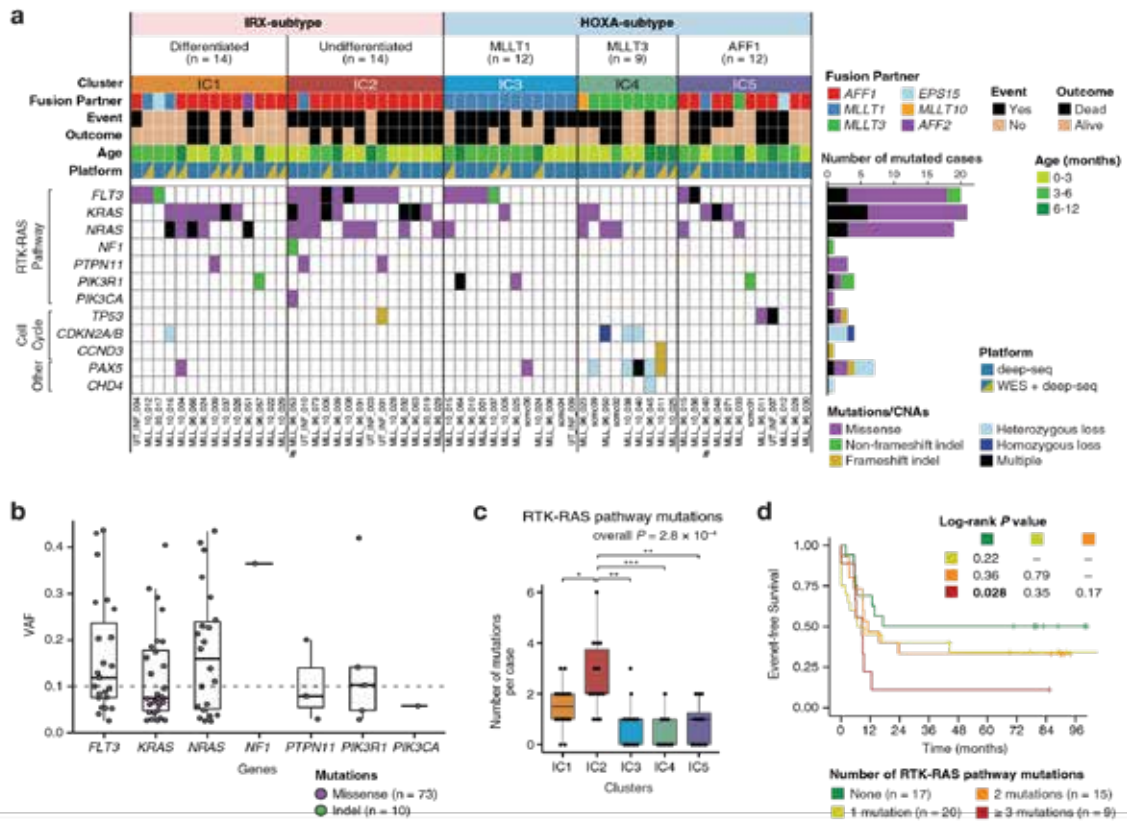
ح) آنالیز غنی سازی LOLA در ۱۰۰ منطقه متیله متفاوت که در (ز) برجسته شده است. ده مقوله برتر که به طور قابل توجهی غنی شده از ورودی‌های CODEX یا ENCODE پایگاه داده‌های LOLA Core نشان داده شده است.

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 مشخص کرد.

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  $\leq 3$  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  $5\text{exacts}$  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.



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 در مقابل IC1،  $1.2 \times 10^{-3}$ ، IC2 در مقابل IC3،  $7.0 \times 10^{-4}$ ، IC3 در مقابل IC4 و IC5،  $1.2 \times 10^{-10}$ . آنالیز بقا بر اساس تعداد جهش های مسیر RTK-RAS.



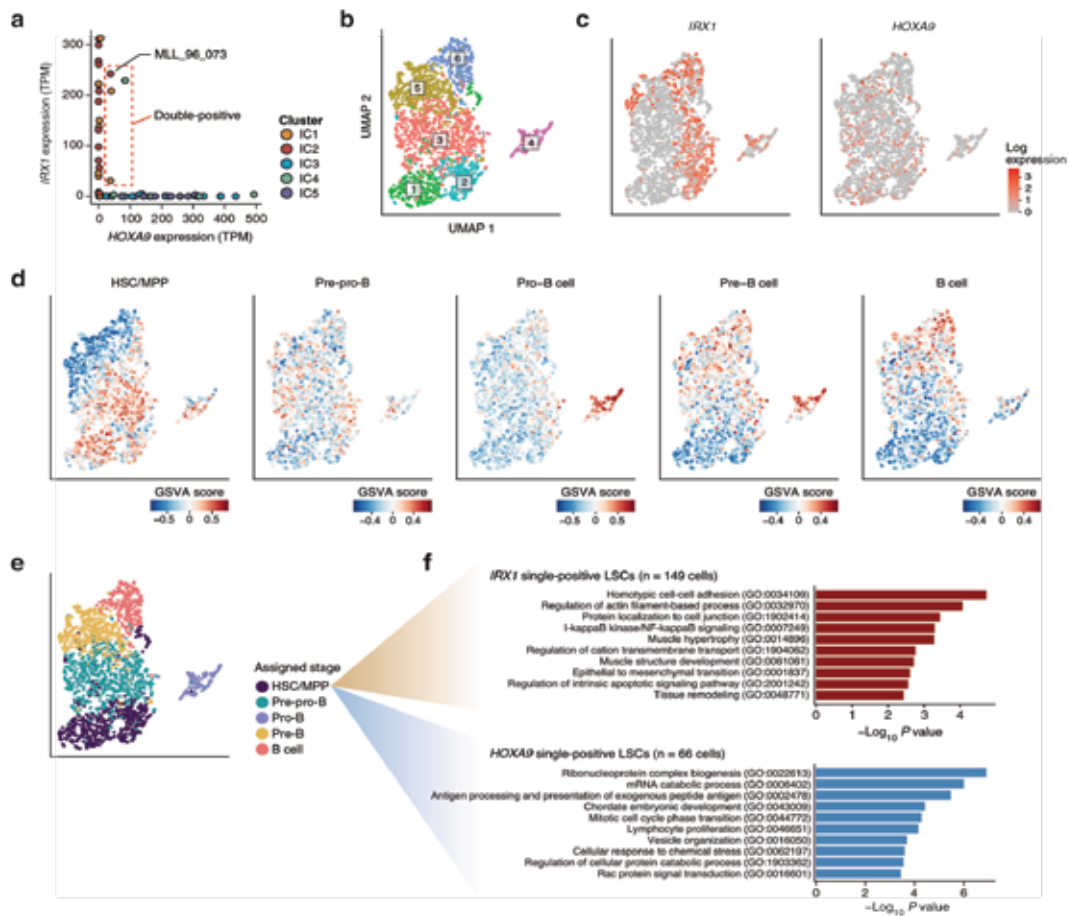
لوسمیک نشان داد، که جمعیت LSC آن نیز در مقایسه با LSC های تک مثبت MLL\_96\_073 IRX1، تنظیم مثبت مارکرهای سلول لنفوئیدی فعال را نشان داد.

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 آنکو پروتئین‌های 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-MLLT1 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.

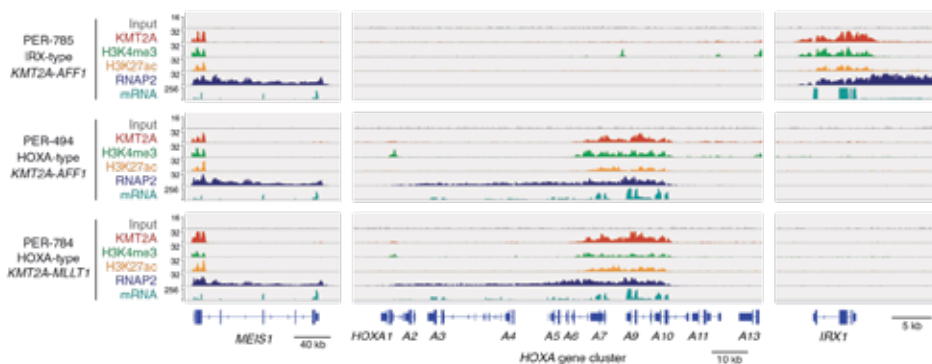
## ادغام‌های KMT2A به طور مستقیم سوئیچ IRX/HOXA را برای القای فنوتیپ‌های بدخیم مختلف کنترل می‌کنند.

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 LSC های تک مثبت IRX1 را به عنوان یک LSC های تک مثبت مشخص می‌کند. جمعیت LSC ساکن به همین ترتیب، یک مورد تک مثبت HOXA9 (MLL\_96\_015) تمایز سلسله مراتبی 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 ترنسکرپتوم 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 مثبت HOXA9 (n=66 سلول؛ پانل پایینی).



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

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

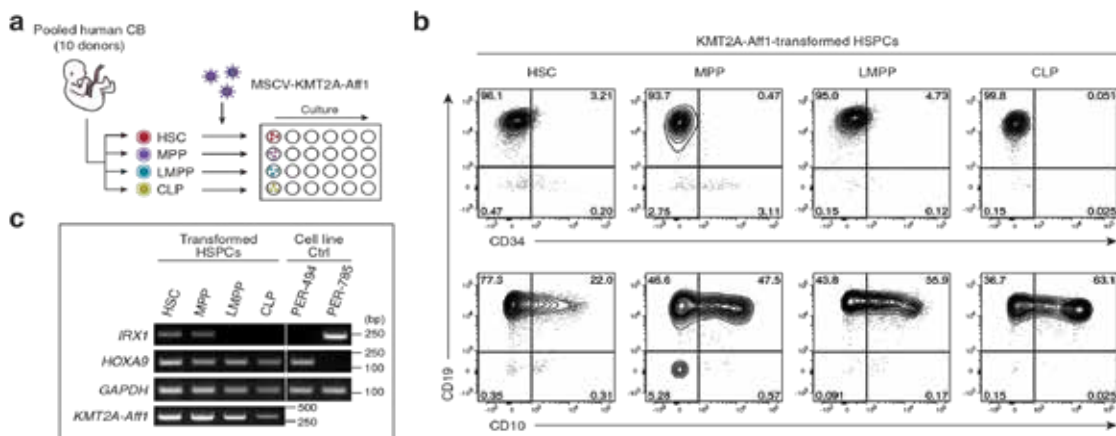
مسیر رشد لنفوئیدی از دست می‌رود و سلول‌های مبدا را به عنوان یک عامل کلیدی در تصمیم‌گیری سرنوشت IRX/HOXA توسط همجوشی‌های KMT2A دخیل می‌دانند.

### 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 (شکل 7b) B-ALL با 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 هماتو-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 نابالغ تر 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، اگرچه KMT2A-AFF1. 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، 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 نابالغ‌ترین و مقاوم‌ترین 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،

## کاربرد فارماکوژنتیک در انکولوژی

### چکیده

اصطلاح «فارماکوژنتیک» برای توصیف مطالعه تنوع در پاسخ دارویی به دلیل وراثت استفاده می‌شود. این با «تداخلات ژن - دارو» مرتبط است. بعداً اصطلاح «فارماکوژنومیک» معرفی شد و شامل تمام ژن‌های موجود در ژنوم است که می‌توانند پاسخ دارویی را تعریف کنند. کاربرد فارماکوژنتیک در انکولوژی به دلیل شاخص درمانی محدود داروهای شیمی درمانی و خطر عوارض جانبی تهدید کننده زندگی از اهمیت بالایی برخوردار است. بسیاری از مطالعات ژنومیک سرطان بر روی جهش‌های جسمی اکتسابی متمرکز شده‌اند. با این حال، شواهد فزاینده نشان می‌دهد که تغییرات ژنتیکی به ارث رسیده نقش کلیدی در خطر سرطان و نتیجه درمان دارند. هدف از این بررسی، خلاصه کردن وضعیت فارماکوژنومیک در انکولوژی، با تمرکز تنها بر جهش‌های مولفه است. پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی را می‌توان در ژن‌هایی یافت که آنزیم‌های متابولیک و اهداف سلولی اکثر داروهای شیمی‌درمانی را کد می‌کنند. با این وجود، پیش بینی نتیجه درمان هنوز برای اکثر رژیم‌ها ممکن نیست. در این بررسی، ما جامع‌ترین جفت‌های دارو-ژن مورد مطالعه - دانش فعلی و محدودیت‌های فعلی را مورد بحث قرار می‌دهیم. با این حال، قبل از اینکه این مارکرها به طور معمول در تشخیص و درمان بالینی استفاده شوند، مطالعات بیشتری در گروه‌های بزرگ‌تری از بیماران سرطانی با اعتبارسنجی دقیق بیومارکرهای فارماکوژنتیک ضروری است.



### غزل قجری<sup>۱</sup>

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



## مقدمه

درمان در انکولوژی در دهه گذشته به دلیل انقلاب اخیر در مداخلات پزشکی پیشرفت زیادی داشته است. شاخص‌های درمانی محدود، نرخ پاسخ کلی متغیر و نتایج بالینی، و سمیت‌های ناشی از شیمی‌درمانی نمونه‌هایی از مشکلات ناشی از درمان سرطان هستند. اگرچه بسیاری از بیماران تظاهرات بالینی مشابهی دارند، اما پاسخ کاملاً متفاوتی به یک درمان نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد برخی از طرح‌های درمانی در بیماران مبتلا به سرطان بی اثر هستند. از سوی دیگر، این ممکن است منجر به عوارض جانبی دارویی شود یا احتمال درمان بیش از حد را افزایش دهد. بهینه‌سازی رژیم‌های درمانی برای هر بیمار به طور قابل‌تصور منجر به نتایج بالینی بهتری خواهد شد. در سال‌های اخیر، با توجه به پیشرفت ژنومیک پزشکی و پروتئومیکس، دانش خود را در مورد تفاوت‌های شخصی در فارماکوژنتیک و فارماکودینامیک بر اساس ترکیب ژنتیکی بهبود بخشیده‌ایم.

فارماکوژنتیک مطالعه عوامل ژنتیکی است که بر پاسخ و سمیت دارو تأثیر می‌گذارد. این بر تنوع در ژنوم انسان تمرکز دارد. در حالی که جهش‌های جسمی با نشانگرهای مولکولی موجود در بافت تومور مرتبط است، فارماکوژنومیک مارکرهای ژنتیکی را که ارزش پیش‌بینی نتیجه درمان دارویی دارند مورد مطالعه قرار می‌دهد. دانش کامل تر و کاربرد رایج مارکرها فارماکوژنومیک به ویژه در عمل سرطان شناسی مهم و مطلوب است، زیرا شاخص درمانی داروها معمولاً بسیار محدود است و عواقب اثرات نامطلوب و سمیت ممکن است شدید یا حتی تهدید کننده زندگی باشد. اگر بتوان پیش‌بینی کرد که چه افرادی می‌توانند از درمان سود ببرند و کدام یک ممکن است از سمیت مرتبط با شیمی‌درمانی رنج ببرند، مراقبت کلی از بیماران سرطانی به طور قابل توجهی بهبود می‌یابد.

هدف اصلی این بررسی، بازنگری وضعیت فارماکوژنتیک امروزه در زمینه انکولوژی است. ما به ویژه بر روی تغییرات ژنتیکی مربوط به درمان‌های انکولوژیک تمرکز می‌کنیم. همچنین محدودیت‌ها و ابزارهایی را در نظر خواهیم گرفت که فارماکوژنومیک را می‌توان در عمل بالینی معمول برای بیماران انکولوژی اجرا کرد.

## عمده داده‌های فارماکوژنتیک فعلی در انکولوژی

تعداد فعلی جفت‌های فارماکوژنومیک ژنومیک دارو-ژن شناخته شده و مورد مطالعه در انکولوژی در مقایسه با سایر داروها نسبتاً ناچیز است. نمونه‌هایی از این جفت‌ها در زیر مورد بحث قرار خواهند گرفت.

### ژنوتیپ دی هیدروپیریمیدین دهیدروژناز و دوز فلوروپیریمیدین

فلوروپیریمیدین‌ها مانند 5-Fluorouracil (5-FU)، کپسیتابین و تگافور به طور گسترده در درمان بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان کولورکتال، سرطان سر و گردن و سرطان سینه استفاده می‌شوند. در دهه‌های گذشته، افزایش درک مکانیسم اثر دارو منجر به توسعه روش‌های جدیدی شده است که می‌تواند فعالیت آن را افزایش دهد. با وجود پیشرفت اخیر، مقاومت دارویی یک محدودیت مهم برای کاربرد 5-FU باقی مانده است.

دی هیدروپیریمیدین دهیدروژناز (DPD) با تبدیل تا ۸۰ درصد به متابولیت‌های غیرفعال در متابولیسم 5-FU شرکت می‌کند و بنابراین مسئول حذف آن است. توسط ژن DPYD کدگذاری می‌شود. به دلیل تنوع زیاد برای DPD بین افراد، اثرات متفاوتی (اثربخشی، مقاومت و سمیت) از درمان با 5-FU مشاهده شده است. شایع‌ترین عوارض جانبی در بیماران مبتلا به کمبود آنزیم DPD عبارتند از: سرکوب میلوسیت، موکوزیت، سمیت عصبی و اسهال. اگرچه بیش از ۳۰ پلی مورفیسم ژن (SNPs) و همچنین درج یا حذف) در ژن DPYD شناخته شده است، اما تنها ۳ مورد از آنها مربوط به فعالیت کم DPD و سمیت 5-FU بالاتر است.

در سال ۱۹۸۴ پیشنهاد شد که کمبود DPD با بیش از حد تیمین و اوراسیل مرتبط است. مطالعاتی وجود دارد که این فرضیه را تایید می‌کند. در یک مورد بالینی یک زن ۲۷ ساله که تحت درمان با 5-FU قرار گرفته بود، عوارض شدید عصبی و خونی مشاهده شد. در آزمایش ادرار او سطوح بالایی از تیمیدین و اوراسیل وجود داشت. در مورد دیگری الگوی توارث اتوزومی مغلوب مورد بحث قرار گرفت: هنگام تجویز دوز آزمایشی 5-FU هم برای بیمار و هم برای پدرش، نیمه تایم حذف طولانی‌مدت بدون هیچ کاتابولیت در بیمار وجود داشت، در حالی

(A551T)، G1601A (DPYD\*4)، T1679G3 (DPYD) نیز قابل استفاده است. همه این تغییرات منجر به کاهش فعالیت DPD می شود. با این حال، همه موارد با کاهش فعالیت DPD را نمی توان با پلی مورفیسم های DPYD توضیح داد. به طور خلاصه، آزمایش ژنتیکی برای DPYD\*2A به عنوان مارکر پیش بینی سمیت 5-FU دارای ارزش اخباری مثبت حدود ۵۰ درصد در مقایسه با حدود ۹۵ درصد منفی است. علاوه بر این، سمیت 5-FU نمی تواند تنها به دلیل کمبود DPD باشد. چندین ژن دیگر ممکن است بر فعالیت 5-FU اثر داشته باشند: ABCB1، متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز، و تیمیدیلات سنتتاز. با این حال، مطالعات کافی برای آنها وجود ندارد،

که در نمونه پدرشان کمبود نسبی DPD وجود داشت. مشاهده شد. انواع مختلفی وجود دارد که پس از تعیین توالی ژن DPYD یافت شده است. مهمترین آنها پلی مورفیسم G به A در اینترون ۱۴ است (inv14 + 1G > A) یا DPYD\*2A؛ جهش پرش اگزون). در یک مطالعه بر روی بیماران انکولوژی تحت درمان با 5-FU، حدود ۵۵٪ از افرادی که کمبود DPD داشتند دچار نوتروپنی درجه ۴ شدند، در حالی که تنها ۱۳٪ از بیماران با فعالیت طبیعی DPD این واکنش نامطلوب را متحمل شدند. با این حال، این تنها پلی مورفیسمی نیست که تاکنون کشف شده است. چندین نوع دیگر شرح داده شده است: IVS11 + 1G > T، 731A > C (E244V)، 1651G > A

بنابراین نتایج تا کنون متناقض به نظر می رسد.

جدول ۱ - خلاصه ای از رایج ترین آنزیم ها و یا سیستم های حمل و نقل، ژن هایی که برای آنها کد می کنند، داروهای متابولیزه شده و نتایج مورد انتظار درمان

آنزیم / ناقل	ژن	واریانت های مختلف یک آلل	دارو	اثر	نئوپلاسم
دی هیدروپیرامیدین دهیدروژناز	DPYD	DYPD*13 DPYD*8 DPYD*7 DPYD*12 DPYD*3 DYPD*4 DPYD*2A DPYD*9A	Fluoropyrimidines - 5-fluorouracil, capecitabine, tegafur	اثر بخشی / مقاومت / سمیت	سرطان کولورکتال، سرطان سینه، سرطان سر و گردن
تیمیدیلات سنتتاز	TYMS	TSER*2، TSER*3	5-fluorouracil, capecitabine	اثر بخشی / سمیت	کولورکتال، مثانه، کارسینوم معده
متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز	MTHFR	667 C > T 1298A > C	5-fluorouracil, methotrexate	اثر بخشی / سمیت	سرطان کولورکتال، سرطان تخمدان، سرطان معده
تیوپورین اس-متیل ترانسفراز	TPMT	PMT*2-24 (TPMT*1 TPMT*2 TPMT*3A TPMT*3B TPMT*3C TPMT*4)	آزاتیوپرین، مراکاپتوپیرون، تیوگوانین	دوز / سمیت / ADR	لوسمی لنفاوی حاد، سرطان تخمدان، سرطان سینه

جدول ۱ - خلاصه‌ای از رایج‌ترین آنزیم‌ها و یا سیستم‌های حمل و نقل، ژن‌هایی که برای آنها کد می‌کنند، داروهای متابولیزه شده و نتایج مورد انتظار درمان

آنزیم / ناقل	ژن	واریانت‌های مختلف یک آلل	دارو	اثر	نتوپلاسم
اوریدین دی فسفات گلوکوروئوزیل ترانسفراز	UGT1A1	UGT1A1*27، UGT1A1*28، UGT1A1*6	irinotecan	سمیت / ADR	کارسینوم کولورکتال
گلووتاتیون اس ترانسفرازها	GST	GSTM1، GSTP1	ترکیبات پلاتین - سیکلوفسفامید، کربوپلاتین، دوکسوروبیسین، سیس پلاتین، اگزالی پلاتین	اثربخشی / سمیت / ADR	سرطان روده بزرگ، سرطان مثانه، سر و گردن، ریه، تخمدان و بیضه
گروه مکمل متقاطع ترمیم اکسیژون ۱	ERCC1	496 C > T، 8092 C > A، 19007 T > C	داروهای ضد سرطان حاوی پلاتین	اثربخشی / سمیت	سرطان ریه سلول غیر کوچک، سرطان مثانه، کارسینوم کولورکتال
گروه مکمل متقاطع ترمیم اکسیژون ۲	ERCC2	965 G > A، 225 A > C	داروهای ضد سرطان حاوی پلاتین - اگزالیپلاتین	اثربخشی / سمیت	سرطان روده بزرگ، سرطان تخمدان، کارسینوم ریه سلول غیر کوچک
binding ATP cassettes	ABCB1، ABCC2، ABCG2	1236 C > T، 3435 C > T، 2677 G > T، 421 C > A، ABCC2*2	irinotecan	اثربخشی / سمیت / مقاومت	سرطان تخمدان
گروه مکمل متقاطع اشعه ایکس ۱	XRCC1	1301 G > A	داروهای ضد سرطان پلاتین، ۵-فلوئورواوراسیل	اثربخشی / سمیت	سرطان روده بزرگ، معهده و ریه سلول غیر کوچک
سیتوکروم P450 2D6	CYP2D6	حدود ۰.۸ آلل نوع CYP2D6. رایج‌ترین آنها، CYP2D6*4، CYP2D6*3، و CYP2D6*5 CYP2D6*6	تاموکسیفن	اثربخشی / سمومیت	سرطان سینه

### تیمیدیلات سنتتاز (TS)

DPD تنها آنزیمی نیست که مسئول متابولیسم 5-FU است. یکی دیگر از مواردی که در مسیر دارو دخیل است تیمیدیلات سنتتاز است. TS با سنتز تیمیدین مرتبط است و هدفی برای 5-FU است که آن را مهار می کند. ژن کد کننده TS TYMS است. دو آلل مختلف برای این ژن کشف شده است - با یک توالی ۲ تکراری (TSER\*2) و با یک توالی ۳ تکراری (TSER\*3) (همچنین به جدول ۱ مراجعه کنید). TSER\*3 در بیماران مبتلا به کارسینوم کولورکتال در مقایسه با افراد مبتلا به پلی مورفیسم TSER\*۲ در درمان با 5-FU با نتیجه بهتر همراه است. با این وجود، به نظر نمی رسد همه بیماران مبتلا به آلل TSER\*۳ پیامد بدتری داشته باشند. محتمل ترین توضیح، تغییر دیگری است (یک SNP  $G > C$ )، که منجر به فعالیت TS پایین تر، قابل مقایسه با آلل TSER\*۲ می شود. این SNP در حدود ۲۹ تا ۵۷ درصد از آلل های TSER\*۳ کشف شده است. تقویت TS به عنوان یک عامل پیش آگهی برای درمان با 5-FU نه تنها در کارسینوم کولورکتال، بلکه در سرطان مثانه و معده نیز استفاده می شود. استفاده از TYMS همراه با ژنوتیپ DPYD ممکن است به انتخاب بیمارانی کمک کند که پاسخ بهتری به درمان 5-FU و عوارض جانبی کمتری داشته باشند.

### متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR)

متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز آنزیمی است که در مسیر 5-FU و متوترکسات (MTX) شرکت می کند. نقش مهمی در متابولیسم فولات و متیونین و در نتیجه در سنتز و متیلاسیون DNA ایفا می کند. MTHFR یک سوبسترای 5-FU (۵،۱۰) متیلن تتراهیدروفولات) را متابولیزه می کند و بنابراین کاهش عملکرد این آنزیم با افزایش فعالیت 5-FU همراه است، در حالی که حساسیت MTX کاهش می یابد. شایع ترین پلی مورفیسم برای ژنی که MTHFR را کد می کند  $T > C$  677C است (همچنین به جدول ۱ مراجعه کنید). نوع  $T > C$  677C MTHFR برای اولین بار توسط Frosst و همکاران کشف شد، به عنوان یک نوع علت برای پروتئین MTHFR گرما ناپذیر. پروتئین حرارت پذیر MTHFR با ۵۰ درصد فعالیت کمتر در شرایط آزمایشگاهی همراه

است. همچنین اولین عامل خطر ژنتیکی بود که برای اسپینا بیفیدا شناسایی شد. مجموعه عظیمی از کار روی این نوع، در ارتباط با انواع داروها، فنوتیپها و بیماریها وجود دارد، و بسیاری از آنها متناقض هستند. این دارو در تعداد بیشماری از بیماریها از جمله بیماریهای قلبی عروقی، سرطانها، اختلالات بارداری و رشد و در زمینه داروهایی مانند متوترکسات (هم به عنوان شیمی درمانی و هم برای التهاب) مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر این، مطالعات نشان داده اند که آلل T با هموسیستئین کل بالاتری نسبت به آلل C به ویژه در افرادی که فولات پلاسما کمتری دارند، مرتبط است. در مطالعات بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد اطفال تحت درمان با متوترکسات، آلل T با احتمال کمتری برای بقای بدون رویداد مرتبط بود، اما یک عامل خطر برای سمیت یا تشنج نبود. برخی از مطالعات نشان داده اند که آلل T ممکن است در مقایسه با آلل C در بروز بیماری (نئوپلاسمهای کولورکتال، نئوپلاسمهای پستان) محافظ باشد. برای تعیین نقش این پلی مورفیسم در پاسخ به آنتی فولاتها و آنتی متابولیتها و تعریف قطعی نقش آن در بیماری، به مطالعات بزرگ تری که نشان دهنده جمعیتهای مختلف است، نیاز است.

در یک مطالعه بر روی ۴۳ بیمار مبتلا به سرطان تخمدان، تحت درمان با MTX، سمیت درجه ۳-۴ در ۷۷٪ از افرادی که برای ژنوتیپ TT هموزیگوت بودند، ۶٪ در افراد هتروزیگوت و ۸٪ برای افراد مبتلا به ژنوتیپ هموزیگوت CC مشاهده شد. سطح هموسیستئین در بیمارانسی که برای ژنوتیپ TT هموزیگوت بودند بالاتر بود و با افزایش سمیت همراه بود. علاوه بر این، بیماران با ژنوتیپ TT هنگام درمان با 5-FU نتیجه بهتری را نشان دادند. در یک کارآزمایی بالینی روی ۴۳ نفر مبتلا به سرطان کولورکتال که 5-FU مصرف کردند، ژنوتیپ هموزیگوت برای TT با پاسخ بهتر و بقای کلی نشان داد. اگرچه مطالعات مختلف زیادی تاکنون در مورد متابولیسم 5-FU و اهمیت جهش های ژن DPYD، TYMS و MTHFR انجام شده است، هنوز نمی توان سمیت 5-FU را پیش بینی کرد. در نتیجه، مطالعات بیشتری باید انجام شود تا فارماکوژنتیک به یک عمل عمومی تبدیل شود.

۱ مراجعه کنید). فراوانی تغییرات TPMT در قفقازی‌ها ۱۰ درصد با شایع‌ترین جهش TPMT\*3A است، در حالی که در جمعیت آسیایی بیشترین جهش مشاهده شده TPMT\*3C است.

مهم‌ترین مزیت آزمایش ژنوتیپ ژن TPMT برای ارزیابی دوز تیوپورین این است که می‌توان از سرکوب شدید میلوس بدون به خطر انداختن کارایی درمان اجتناب کرد. آزمایش TPMT به طور گسترده در سراسر جهان در آزمایشگاه‌های خدمات معمول در دسترس است، اما این بستگی به تخصص بالینی دارد که آیا آزمایش اجرا می‌شود یا خیر. در حالی که متخصصان پوست به سرعت آزمایش معمول TPMT را پذیرفته‌اند، متخصصان گوارش به طور خاص غربالگری TPMT را توصیه نمی‌کنند. از سوی دیگر، آزمایش TPMT قبل از استفاده از مرکاپتوپورین در لوسمی دوران کودکی الزامی است. علاوه بر این، TPMT مقرون به صرفه است - هزینه مراقبت بستری برای یک بیمار مبتلا به کمبود TPMT که به طور ناخواسته با آزاتیوپورین درمان شده است، برآورد شده است که هزینه بیش از ۴۰۰ آزمایش برای فعالیت TPMT را پوشش می‌دهد.

### ژنوتیپ اوریدین دی فسفات گلوکورونوزیل ترانسفراز (UGT) و ایرینوتکان

UGT-1 آنزیم اصلی در گلوکورونیداسیون بیلی روبین و همچنین بسیاری از داروهای چربی دوست مانند متابولیت فعال SN-38 - irinotecan است. Irinotecan یک داروی ضد سرطان است که در بسیاری از رژیم‌های درمانی برای درمان سرطان کولورکتال استفاده می‌شود. جهش در ژن UGT-1 نیز می‌تواند باعث سندرم گیلبرت شود. SN-38 عمدتاً توسط آنزیم یوریدین دی فسفات گلوکورونیل ترانسفراز (UGT1A1) 1A1 پاک می‌شود. انواع مختلفی از ژن وجود دارد اما مهم‌ترین آنها UGT1A1\*28 (درج عنصر TA در ناحیه پروموتور ژن UGT1) است. این تغییرات فعالیت آنزیم را مختل می‌کند و متابولیسم irinotecan را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در افرادی که از نظر آلل UGT1A1\*28 هموزیگوت هستند، فعالیت 70 UGT1 درصد کاهش می‌یابد. بسیاری از مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تغییرات در ژن UGT1 با افزایش سمیت (اسهال شدید و

### دوز تیوپورین اس متیل ترانسفراز (TPMT) و تیوپورین

تیوپورین‌ها نه تنها برای بیماری‌های غیر بدخیم (IBD، آرتریت روماتوئید) استفاده می‌شوند، بلکه برای درمان ضد سرطان در بدخیمی‌های خونی نیز قابل استفاده هستند. سه پیش‌داروی زیر آزاتیوپورین، مرکاپتوپورین و تیوگوانین (TG) توسط TPMT غیرفعال می‌شوند و همان متابولیت‌های نوکلئوتید TG فعال (TGN) را تولید می‌کنند. کشف شده است که بین فعالیت TPMT و غلظت TGN همبستگی وجود دارد. در بیمارانی که از نظر آلل غیر فعال هموزیگوت هستند، سرکوب میلوسکوپی شدید مشاهده می‌شود. در افرادی که هتروزیگوت هستند با تجویز دوز معمولی تیوپورین، ممکن است سرکوب میلوسکوپی متوسط تا شدید نیز دیده شود.

داروهای ضد سرطان آزاتیوپورین، ۶- مرکاپتوپورین (6-MP) و ۶- تیوگوانین اغلب برای رژیم‌های درمانی ALL استفاده می‌شوند. متابولیسم آنها توسط TPMT تنظیم می‌شود. این آنزیم از یک طرف داروها را از طریق متیلاسیون غیرفعال می‌کند و در نتیجه بر سمیت آنها تأثیر می‌گذارد و از طرف دیگر 6-MP را به متیل تیونوزین ۵- پرایم مونوفسفات تبدیل می‌کند (متابولیتی که منجر به مهار سنتز de novo پورین می‌شود. ممکن است منجر به اثرات سمی شود). اکنون مشخص شده است که به دلیل ناهمگونی ژنتیکی، فعالیت TPMT به طور گسترده ای در یک جمعیت متفاوت است. مطالعات ۳ فنوتیپ مختلف را یافتند: به ترتیب با فعالیت طبیعی، متوسط و غایب TPMT یک همبستگی معکوس غیرقابل انکار بین کاهش فعالیت TPMT و غلظت MP-6 در گلبول‌های قرمز و بلاست‌های ALL وجود دارد. به منظور اجتناب از عوارض جانبی جدی، تنظیم دوز ضروری است که بسته به فعالیت TPMT انجام شود. اگرچه تعداد کل انواع TPMT کشف شده بیش از ۲۰ (TPMT\*2-24) است، شایع‌ترین آنها TPMT\*2 است (در یک دختر ۸ ساله تحت درمان برای ALL که دچار سمیت شدید هماتولوژیک شده است، یافت می‌شود. دوزهای خوراکی معمولی (MP-6) و TPMT\*3A، که هر دو باعث تغییرات اسید آمینه می‌شوند که منجر به تجزیه پروتئین TPMT و در نتیجه کاهش فعالیت می‌شود (همچنین به جدول

نوتروپنی) به دلیل اختلال در فعالیت irinotecan مرتبط است. شیوع آلل UGT1A1\*28 بین جمعیت‌ها متفاوت است: بیشترین در آفریقای (۴۵٪) و کمترین در آسیایی (۱۷-۷٪)، در حالی که برای قفقازی‌ها این درصد ۲۲-۳۹٪ است. با این حال، در بیماران آسیایی، به جز این پلی مورفیسم، برخی از انواع دیگر ژن UGT1A1 یافت شد - آلل UGT1A1\*6 و UGT1A1\*27 (همچنین به جدول ۱ مراجعه کنید). بنابراین، برای اینکه پزشکان بتوانند درمان با ایرینوتکان را متناسب با آن انجام دهند، مطالعات جمعیتی خاص لازم است.

### گلوکوتایون اس ترانسفراز پلی مورفیسم ژن و ترکیبات پلاتین

گلوکوتایون اس ترانسفرازها (GSTs) شامل خانواده ای از آنزیم‌ها هستند که مسئول سم زدایی بیگانه بیوتیک‌ها از جمله ترکیبات پلاتین هستند. دسته‌های مختلفی از GSTها وجود دارد که هر کدام توسط یک ژن یا خانواده ژنی متفاوت کدگذاری می‌شوند. زمانی که بیماران سرطانی با داروهای مانند سیکلوفسفامید، کربوپلاتین، دوکسوروبیسین، سیسپلاتین درمان می‌شوند، پلی مورفیسم‌ها در ژن‌ها ممکن است منجر به تغییر اثر یا تظاهرات سمیت شوند.

GST توسط GSTP1 کدگذاری می‌شود. شایع ترین پلی مورفیسم در این ژن، که با نتیجه درمانی بهتر از درمان با اگزالیپلاتین همراه است، SNP غیر مترادف در اگزون ۵ (313 A > G) است. در حدود ۴۰ تا ۴۵ درصد از جمعیت قفقازی و در ۲۷ درصد از جمعیت آسیایی مشاهده می‌شود. یک مطالعه روی ۱۰۷ بیمار مبتلا به CRC پیشرفته که تحت درمان با 5-FU/oxaliplatin قرار گرفتند، تفاوت معنی‌داری را بین افراد دارای ژنوتیپ واریانت و آنهایی که ژنوتیپ وحشی داشتند نشان داد: میانگین بقای گروه اول ۲۴.۹ ماه بود، در حالی که گروه دوم - ۷.۹ ماه. ماه‌ها. در گروهی متشکل از ۶۴ بیمار مبتلا به سرطان دستگاه گوارش که درمان مبتنی بر اگزالیپلاتین دریافت کردند، کاهش فعالیت GST با افزایش سمیت همراه بود. نوروپاتی شدید (درجه ۳) اغلب در بیمارانی که دارای ژنوتیپ نوع وحشی هستند دیده شده است.

یک متآنالیز منتشر شده بر روی پلی مورفیسم‌های ژن

گلوکوتایون S-ترانسفراز در بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیر کوچک (NSCLC) نشان داد که هم ژنوتیپ GSTM1 پوچ و هم ژنوتیپ GG ژن GSTP1 Ile105Val با نتیجه بالینی و پاسخ درمانی بهتر به سیسپلاتین مرتبط است. شیمی درمانی مبتنی بر پلی مورفیسم‌های ژن GSTP1 Ile105Val در بیماران آسیایی شرقی مبتلا به NSCLC بیشتر از بیماران قفقازی بود. افراد چینی مبتلا به NSCLC پاسخ درمانی بهتری نشان دادند، که با این واقعیت مرتبط بود که آنها ناقل پلی مورفیسم صفر GSTM1 بودند. با این حال، برای اینکه نقش پلی مورفیسم‌های GST بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد، آزمایش‌های بالینی کامل تر و از نظر قومیتی متنوع تر لازم است که در آینده انجام شود.

### گروه مکمل متقاطع ترمیم اکسیژون ۱ (ERCC1)

ژن شرکت کننده ERCC1 مسیر برش نوکلئوتیدی است و همچنین با یک ترمیم خاص ژنی مرتبط است که توسط داروهای ضد سرطان حاوی پلاتین انجام می‌شود. مشخص شده است که سطوح بالای ERCC1 در بیماران مبتلا به سرطان مثانه با پیامد بدتری همراه است. با این حال، در کارسینوم ریه سلول غیر کوچک، یک پلی مورفیسم در اگزون ۴ (496 C > T)، به دلیل کاهش فعالیت ERCC1 با نرخ بقای بهتر همراه است. در یک کارآزمایی بالینی دیگر، شامل ۹۱ بیمار مبتلا به CRC پیشرفته و تحت درمان با 5-FU/oxaliplatin، پلی مورفیسم فوق مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیمارانی که برای نوع واریانت هموزیگوت بودند، نسبت به بیمارانی که هتروزیگوت (۴۲.۳٪) یا با ژنوتیپ وحشی (۲۱.۴٪) بودند، به طور قابل توجهی نرخ پاسخ بالاتری (۶۱.۹٪) داشتند. به طور خلاصه، افزایش ترمیم DNA منجر به کاهش اثربخشی داروهای مبتنی بر پلاتین می‌شود. با این حال، مطالعات بیشتری برای تایید این داده‌ها ضروری است که برخی از نتایج متناقض نیز منتشر شده اند.

هر دو ژن ERCC1 و ERCC2 برای سیستم ترمیم DNA مهم هستند و بنابراین در مسیر ترمیم برش نوکلئوتیدی نقش دارند. یک مطالعه بالینی در جمعیت چین در سال ۲۰۱۲ در بین ۲۱۳ بیمار مبتلا به این بیماری و ۲۴۰

ABCC2\*2 است که با کاهش اثرات نامطلوب ناشی از درمان ایرینوتکان (معمولاً اسهال) همراه است. در مطالعه ای بر روی ۱۶۷ بیمار تحت درمان با ایرینوتکان، تنها ۱۰ درصد با هاپلوتیپ ABCC2\*2 در مقایسه با ۴۴ درصد در سایر بیماران اسهال داشتند.

داده‌های کنونی ناقل‌های دارویی خاص، از جمله ابرخانواده ATP را به‌عنوان یک عامل کلیدی برای مقاومت دارویی و پاسخ‌های تغییر یافته نشان می‌دهند. اخیراً پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی مختلف در این ناقل‌ها شناسایی شده‌اند. مطالعات آتی می‌تواند نقش ناهمگونی ژنتیکی را در انتقال دهنده‌های ATP نشان دهد و بنابراین ممکن است امکان درمان هدفمند و فردی با حداقل سمیت و حداکثر اثربخشی را فراهم کند.

#### گروه مکمل متقاطع اشعه ایکس ۱ (XRCC1)

پروتئین ترمیم کننده DNA XRCC1، که در انسان توسط ژن XRCC1 کدگذاری می‌شود، در شکستگی‌های تک رشته ای DNA که در اثر قرار گرفتن در معرض پرتوهای یونیزان و عوامل آلکیله کننده، در ترمیم برش پایه و ترمیم برش نوکلئوتید ایجاد می‌شود، نقش دارد. این مکانیسم‌ها بر اثربخشی داروهای ضد سرطان پلاتین تأثیر دارند. یک SNP (1301 G > A; Arg399Gln) منجر به ظرفیت برداشتن پایه جهش یافته، خطر بالاتر ابتلا به سرطان و پاسخ بدتر در افراد مبتلا به CRC پیشرفته می‌شود. در یک کارآزمایی بالینی بر روی ۶۱ بیمار مبتلا به CRC پیشرفته که درمان 5-FU/oxaliplatin دریافت کردند، ۷۳ درصد از افراد با پاسخ خوب ناقل ژنوتیپ نوع وحشی بودند در حالی که هیچ یک از پاسخ دهندگان هموزیگوت نبودند. همچنین مشخص شد که در بیماران NSCLC با این آلل، میزان بقا به طور قابل توجهی کوتاهتر بود.

مطالعات مولکولی ارتباط بین SNPها در XRCC1، خطر ابتلا به سرطان‌های مختلف (به عنوان مثال سرطان معده) و ارزش پیش بینی آنها برای نتیجه درمان را نشان می‌دهد. در یک مطالعه، شامل ۶۱۲ بیمار سرطان معده، ایمونوهیستوشیمی (IHC) برای ارزیابی پروفایل بیان پروتئین XRCC1 در نمونه‌های جراحی استفاده شد. مشخص شد که بیماران IHC منفی بیشتر از بیماران IHC مثبت از شیمی درمانی کمکی مبتنی بر پلاتین سود می‌برند. این نتایج از این ایده حمایت

فرد کنترل بدون سرطان نشان داد که SNPهای موجود در این ژن‌ها مسئول افزایش خطر CRC هستند. چهار SNP عملکردی ژنوتیپ شدند: ERCC1 Asn118Asn، ERCC2 Asp312Asn، C8092A، و Lys751Gln. مشخص شد که افراد با ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم ERCC1 C8092A AA و CA/AA در مقایسه با ژنوتیپ CC، خطر بیشتری برای سرطان روده بزرگ داشتند. با این حال، هیچ SNP دیگری مشاهده نشد که ارتباط مهمی با CRC داشته باشد. بنابراین، پلی‌مورفیسم ERCC1 C8092A ممکن است به یک مارکر مهم برای حساسیت به سرطان کولورکتال در میان جمعیت چین تبدیل شود. با این حال، مطالعات بزرگتر برای تأیید این یافته‌ها قبل از اجرای آنها در عمل روزمره ضروری است.

#### کاست‌های اتصال (ATP(ABCB1,ABCC2,ABCG2)

انتقال دهنده‌های کاست اتصال دهنده ATP (که به آنها انتقال دهنده ABC نیز گفته می‌شود) یک ابرخانواده سیستم حمل‌ونقل را نشان می‌دهند که از انرژی اتصال و هیدرولیز ATP برای انتقال لایه‌های مختلف در سراسر غشای سلولی استفاده می‌کند. هر گونه تغییر در فعالیت آنها ممکن است منجر به تغییر در کلیانس داروهای مختلف (از جمله عوامل شیمی درمانی) شود.

ژن ABCB1 (همچنین به نام MDR1 - مقاومت چند دارویی) برای یک گلوکوپروتئین P کد می‌کند. بیان بیش از حد این گلوکوپروتئین در سلول‌هایی دیده می‌شود که به رژیم‌های ضد سرطانی خاص مقاوم هستند. دو SNP مترادف (C1236T در اگزون ۱۲ و C3435T در اگزون ۲۶) و یک SNP غیر مترادف (G2677T در اگزون ۲) وجود دارد که به نظر می‌رسد در هاپلوتیپ \*2 MDR1 به هم مرتبط باشند. آنها در جمعیت اروپایی-آمریکایی (تا ۶۲٪)، در جمعیت آفریقایی-آمریکایی (۱۳٪) و همچنین در جمعیت آسیایی دیده شده‌اند. این هاپلوتیپ منجر به تنظیم مثبت گلیکوپروتئین P، افزایش فعالیت ناقل دارو و کاهش کلیانس SN-38 می‌شود.

برخی دیگر از ناقلان دارویی که در متابولیسم ایرینوتکان نقش دارند ABCG2 و ABCC2 هستند. اولین مورد به عنوان پروتئین مقاومت به سرطان پستان نیز شناخته می‌شود و یک تغییر خاص C > A 421 مسئول وضعیت irinotecan است، در حالی که دومی دارای هاپلوتیپ

می کند که بیان منفی XRCC1 تومورها را نسبت به شیمی درمانی های مبتنی بر پلاتین حساس تر می کند. تشخیص بیان XRCC1 در افراد مبتلا به سرطان معده می تواند راهنمایی بالینی در هنگام انتخاب درمان کمکی بهینه ارائه دهد. با این حال، مطالعات گسترده تری برای تایید مکانیسم های دقیق ضروری است.

### CYP2D6

یکی از رایج ترین داروهای مورد استفاده برای درمان سرطان سینه وابسته به هورمون، تاموکسیفن است. سرطان سینه زمانی که گیرنده استروژن (+ER) را بیان می کند به هورمون وابسته است و بنابراین استروژن معمولاً برای رشد آنها ضروری است. برخی از داروها تعدیل کننده های انتخابی ER نامیده می شوند زیرا اتصال استروژن به ERها را مهار می کنند و تکثیر تومورهای +ER ناشی از استروژن را کاهش یا حذف می کنند. تاموکسیفن نمونه ای از تعدیل کننده های انتخابی ER است و به طور گسترده برای درمان زنان یائسه و یائسه مبتلا به سرطان سینه متاستاتیک، برای شیمی درمانی کمکی و برای درمان پیشگیرانه برای زنان با خطر بالای ابتلا به سرطان پستان استفاده می شود. فعالیت فارماکولوژیک آن به آنزیم کبدی سیتوکروم (CYP2D6) (P450 2D6) بستگی دارد که تاموکسیفن را به متابولیت فعال آندوکسیفن تبدیل می کند. مشاهده شده است که بیماران با کاهش فعالیت CYP2D6 یا در نتیجه ژنوتیپ خود، یا به دلیل مصرف داروهای دیگر، مهار کننده CYP2D6، آندوکسیفن کمتری تولید می کنند که از طرف دیگر منجر به مزایای درمانی ضعیف می شود.

تا به امروز، حدود ۸۰ نوع آلل CYP2D6 یافت شده است، اما رایج ترین آنها عبارتند از، CYP2D6\*4، CYP2D6\*5، CYP2D6\*3، و CYP2D6\*6 (همچنین به جدول ۱ مراجعه کنید). بسیاری از پلی مورفیسم ها بی صدا هستند و منجر به آللهایی می شوند که پروتئین هایی را با فعالیت طبیعی CYP2D6 بیان می کنند (به نام آللهای متابولیسم گسترده (EM)). سایر آللهای حذف ژن یا پلی مورفیسم هایی دارند که منجر به عدم بیان پروتئین یا بیان پروتئین بدون فعالیت CYP2D6 می شود (متابولیسم ضعیف (PM)). گروه سوم

از آللهای شامل پلی مورفیسم ها هستند که فعالیت آنزیم را کاهش می دهند - آللهای متابولیسم واسطه (IM). بسته به ژنوتیپ، افراد می توانند متابولیزه کننده های گسترده/طبیعی، متوسط یا ضعیف باشند. متابولیسم های گسترده یا عادی دارای ژنوتیپ EM/PM یا EM/EM و متابولیسم طبیعی سوبستراهای CYP2D6 هستند. متابولیزه های میانی دارای ژنوتیپ IM/IM یا IM/PM و فعالیت آنزیم CYP2D6 بین متابولیزه های گسترده و ضعیف هستند. و متابولیسم های ضعیف افرادی هستند که دو آلل PM دارند. همچنین نوع دیگری از آللهای وجود دارد - آللهای متابولیزه کننده فوق سریع، که از آللهای چندگانه با فعالیت طبیعی تشکیل شده است. آنها با متابولیسم فوق سریع سوبستراهای CYP2D6 مرتبط هستند.

در مطالعه ای روی ۸۰ زن مبتلا به سرطان پستان که به تازگی تشخیص داده شده بود، سطوح تاموکسیفن و آندوکسیفن حدود ۴ ماه پس از شروع درمان اندازه گیری شد. بیمارانی که متابولیسم ضعیفی داشتند (PM/PM) غلظت آندوکسیفن بین دو تا چهار برابر کمتر از افرادی بود که دارای ژنوتیپ EM/EM و EM/PM بودند. این کارآزمایی یک اثر وابسته به دوز ژن را پیشنهاد کرد. از سوی دیگر، برخی از SSRIها و SNRIها وجود دارند که اغلب در طول شیمی درمانی با تاموکسیفن برای کاهش عوارض جانبی آن (گرگرفتگی) تجویز می شوند که همچنین مهار کننده های CYP2D6 هستند. بنابراین، SSRIها و SNRIها ممکن است اثر منفی بر اثربخشی تاموکسیفن داشته باشند. در یک مطالعه آینده نگر کوچک روی ۱۲ زن مبتلا به سرطان سینه، غلظت پلاسمایی اندازه گیری شده آندوکسیفن ۴ هفته پس از شروع مصرف پاروکستین (SSRI) حدود دو برابر کاهش یافت، به این معنی که CYP2D6 متابولیسم آندوکسیفن را واسطه می کند.

نقش ژنوتیپ CYP2D6 در یک مطالعه بالینی آلمانی روی زنان مبتلا به سرطان پستان تهاجمی اولیه +ER تأیید شد، زیرا برخی از آنها درمان کمکی تاموکسیفن را دریافت کردند، در حالی که برخی دیگر این کار را نکردند. مشاهده شد که بیمارانی که متابولیسم متوسط یا ضعیف داشتند (با ژنوتیپ های EM/PM، PM/PM، IM/IM یا IM/PM) دوره های کوتاه تری بدون عود

جهش یافته هموزیگوت  $DPYD\ IVS\ 14 + 1G > A$ ،  $mutzyantsogete\%$  ۱.۲٪، هموزی هتروزیگوت، ۱.۲٪) MS4AG4+4. جهش یافته، ۲۴.۷٪ جهش هموزیگوت)، ۴۳.۵٪ ( $MTHFR\ 677C > T$ ) جهش یافته هتروزیگوت، ۹.۴٪ جهش یافته هموزیگوت) و  $MTHFR\ 1298A > C$  (جهش یافته هتروزیگوت، ۸.۲٪ جهش یافته هتروزیگوت). در افرادی که برای پلی مورفیسیم  $MTHFR\ 1298A > C$  هتروزیگوت یا هموزیگوت بودند، فرکانس سمیت خونساز افزایش یافت. هیچ ارتباط آماری معنی داری بین پلی مورفیسیم های  $DPYD$ ،  $TYMS$  و سمیت های ناشی از فلوروپیریمیدین یافت نشد. نویسندگان پیشنهاد می کنند که پلی مورفیسیم های  $MTHFR$  ممکن است به عنوان عوامل مرتبط با سمیت فلوروپیریمیدین در نظر گرفته شوند و می توانند به عنوان نشانگرهای زیستی پیش بینی کننده برای بیماران مبتلا به CRC که می توانند بیشترین سود را از رژیم های مبتنی بر فلوروپیریمیدین دریافت کنند، استفاده شوند. در یک مطالعه گذشته نگر دیگر بر روی ۱۰۸ بیمار چینی مبتلا به سرطان متاستاتیک معده، نویسندگان، تأثیر پانل متشکل از ۹ پلی مورفیسیم ژنتیکی را در ژن های دخیل در ترمیم و  $ERCC1\ rs2298881/ ERCC2\ rs13181$  و  $XRCC1/rs25448$  (XRCC1/rs25448) و  $rs1799793/ GSTT1/rs2266637$  و  $GSTP1/rs1695$ )، اگزالی پلاتین ( $GSTT1/rs2266637$  و  $GSTP1/rs1695$ )، و متابولیسم فلوروپیریمیدین ( $MTHFR/rs1801133$  و  $rs1801131$ ) در پیش بینی پاسخ بالینی و بقای بیماران هنگام دریافت اپیپارو لیپولاتین و اکسالیفلواتین. آنها دریافتند که سه مورد از SNP ها تأثیر نامطلوبی بر پاسخ بالینی و بقا دارند:  $XRCC1\ rs25489$ ، هموزیگوت برای آلل  $ERCC2\ rs1799793$  A.  $ERCC2$  ژنوتیپ GA و  $ERCC2\ rs13181$  - هتروزیگوت و هموزیگوت برای آلل G. گروه پرخطر (بدون SNP های نامطلوب) میانگین 206 PFS روز و سیستم عامل ۵۳۴ روز را نشان دادند، در حالی که گروه با خطر ضعیف (با SNP1 نامطلوب) ۱۲۳ PFS روز و سیستم عامل ۲۸۱ روز داشتند. بنابراین، گروه کم خطر ۲.۳ برابر خطر پیشرفت در مقایسه با گروه با خطر خوب داشت. بر اساس نتایج، نویسندگان پیشنهاد می کنند که پلی مورفیسیم های زیر  $XRCC1\ rs25487$ ،  $ERCC2\ rs13181$  و  $rs1799793$  را می توان قبل از

و بقای بدون رویداد داشتند، در مقایسه با افرادی که متابولیسم های طبیعی داشتند. ژنوتیپ های EM/EM یا IM/EM. در گروهی که تاموکسیفن مصرف نکردند، ژنوتیپ  $CYP2D6$  نتوانست بر بقا تأثیر بگذارد، که منجر به این نتیجه شد که فعالیت  $CYP2D6$  نمی تواند به عنوان مارکر پیش آگهی برای سرطان پستان استفاده شود، زیرا تنها می تواند نتیجه را با درمان تاموکسیفن تخمین بزند.

تنوع زیادی در بین مطالعات انجام شده تاکنون وجود دارد که مقایسه آنها را دشوار می کند. برای مثال، هیچ یک از این مطالعات اطلاعاتی در مورد ارتباط بین ژنوتیپ  $CYP2D6$ ، سطوح پلاسمایی اندوکسیفن و نتیجه درمان ارائه نمی دهد. مصرف همزمان داروهای مختلف که به عنوان مهارکننده های  $CYP2D6$  عمل می کنند (نه تنها SSRI) نیز باید در همه کارآزمایی ها در نظر گرفته شود. علاوه بر این، دوز تاموکسیفن بین افراد متفاوت است، بنابراین ممکن است عامل مهمی در درمان بیمارانی باشد که متابولیسم ضعیفی دارند. به طور خلاصه، کارآزمایی های گذشته نگر بزرگ تر، مقایسه گروه های مختلف جمعیت، و همچنین درمان با تاموکسیفن با درمان های جایگزین، قبل از اینکه آزمایش  $CYP2D6$  در تمرین روزمره ممکن شود، ضروری است.

### اثر متقابل ژن های متعدد بر پاسخ درمانی

پاسخ دارویی یک ویژگی پیچیده است که پروتئین های زیادی را شامل می شود. از نقطه نظر بیولوژیکی، انتظار می رود که مسیرهای متابولیک مختلف با هم رقابت کنند و اثر یک پلی مورفیسیم بر روی مسیر متابولیسم دارو می تواند توسط پلی مورفیسیم های دیگر تغییر یابد.

عوامل شیمی درمانی مبتنی بر فلوروپیریمیدین، 5-FU یا کاپسیتابین، پایه اصلی رژیم های شیمی درمانی برای سرطان های کولورکتال و گوارشی در هر دو حالت متاستاتیک و ادجوانت باقی مانده اند.

در یک مطالعه گذشته نگر بر روی ۸۵ بیمار مبتلا به CRC که تحت درمان مبتنی بر فلوروپیریمیدین قرار گرفتند و ۹۱.۸ درصد از افراد از سمیت رنج می بردند، تأثیر پلی مورفیسیم های  $DPYD$ ،  $TYMS$  و  $MTHFR$  مورد بررسی قرار گرفت. پلی مورفیسیم های زیر شناسایی شدند: ۲۹.۴٪ ( $DPYD\ 85\ T > C$ ) جهش هتروزیگوت، ۷.۱٪

یک داروی خاص را ارزیابی کنند تا اطمینان حاصل شود که کاهش دوز یا اجتناب از دارو برای کاهش عوارض جانبی یا جلوگیری از سمیت بر نتیجه درمان تأثیر نمی‌گذارد.

فارماکوژنومیکس استفاده از اطلاعات ژنومی و سایر اطلاعات «اومیکس» برای کمک به راهنمایی، اطلاع رسانی و فردی کردن درمان دارویی است. علم زیربنایی فارماکوژنتیک به سرعت در طی ۵۰ سال از زمانی که برای اولین بار پیشنهاد شد که ژنتیک ممکن است بر فنوتیپ‌های پاسخ دارویی تأثیر بگذارد، تکامل یافته است. این فرآیند به موازات پیشرفت در توالی‌یابی DNA و سایر فناوری‌های مولکولی رخ داده است. اطلاعات فارماکوژنومیک به طور فزاینده‌ای در پرونده‌های سلامت الکترونیکی (EHRs) ادغام می‌شود و این اطلاعات به سرعت در حال تبدیل شدن به یک جزء مهم از «برخورد درمانی» است. رشد سریع دانش فارماکوژنومیک مرتبط با بالینی، چالش‌های مرتبط با اجرای فارماکوژنومیک را برجسته می‌کند، یکی از آنها در دسترس قرار دادن این اطلاعات برای پزشکان به روشی عملی و به راحتی قابل درک است. برای انجام این کار نیاز به دستورالعمل‌های عینی و مبتنی بر شواهد و سرمایه‌گذاری در زیرساخت مورد نیاز برای دسترسی به موقع اطلاعات فارماکوژنومیک برای پزشکان است. از آنجایی که پزشکان نسخه‌هایی را برای داروها می‌نویسند نه ژن‌ها، بیشتر موسسات بر روی جفت دارو-ژن تمرکز کرده‌اند. برای کمک به مراقبان، بسیاری از مؤسسات هشدارهای خودکار مبتنی بر رایانه ایجاد کرده‌اند که هر زمان دارویی تجویز می‌شود که

درمان شناسایی کرد، بنابراین می‌توان از آنها به عنوان ابزاری برای ارزیابی گزینه‌های درمانی در بیماران مبتلا به سرطان متاستاتیک معده استفاده کرد.

## ملاحظات خاص برای کاربرد فارماکوژنومیک در عمل انکولوژی

یکی از کاربردی‌ترین کاربردهای فارماکوژنومیک، اگر داده‌های کافی و معتبر از آزمایش‌های بالینی متعدد در آینده جمع‌آوری شود، مناسب‌ترین انتخاب در محیط‌های بیماری زمانی که چندین رژیم معادل وجود دارد، خواهد بود. بنابراین، اگر خطر مسمومیت بالا باشد، انتخاب یک درمان بر دیگری برای پزشکان آسان‌تر خواهد بود، یا اگر احتمال پاسخ مورد انتظار بیشتر باشد، بهترین رژیم را انتخاب کنند. در شرایطی که تنها یک گزینه برای درمان وجود دارد، اطلاعات کافی در مورد داروها می‌تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد تا خطرات سمیت در برابر مزایای بالقوه سنجیده شود. از سوی دیگر، اگر به خوبی شناخته شده باشد که خطرات سمی بالقوه وجود دارد، آنگاه می‌توان دوز داروهای شیمی درمانی را با توجه به مشخصات ژنتیکی هر بیمار تنظیم کرد. سوال دیگری که مطرح می‌شود این است که اگر برای جلوگیری از مسمومیت دوز را کاهش دهیم باز هم اثر مطلوب درمان را خواهیم داشت؟ این پاسخ را می‌توان تنها از تجزیه و تحلیل‌های گذشته نگر بزرگ آینده در مورد جفت دارو-ژن، در صورتی که ژنوتیپ در عمل روزمره رایج‌تر شود، ارائه داد. در آینده، به احتمال زیاد پزشکان باید با احتیاط نسبت ریسک به فایده و احتمال فارماکوژنومیک

### نتیجه گیری

مهم ترین مشکلاتی که شیمی درمانی سرطان با آن مواجه می شود، ایجاد مقاومت دارویی و عوارض جانبی شدید است. از آنجایی که اکثر عوامل ضد سرطانی خاص تومور نیستند، منجر به آسیب سلول های طبیعی نیز می شوند. این امر از استفاده از دوزهای بالای داروها که می تواند برای ریشه کنی جمعیت های کمتر حساس سلول های تومور ضروری باشد، جلوگیری می کند. تنوع در پاسخ درمانی را می توان با تغییرات ژنتیکی فردی، خاص برای هر فرد توضیح داد. پیشرفت فارماکوژنتیک می تواند سنگ اساسی برای تحول در درمان سرطان باشد. معرفی ژنوتیپ بیمار در محیط های بالینی می تواند تصمیم گیری در مورد رژیم های شیمی درمانی و دوز دارو را با حداکثر اثر و حداقل خطر سمیت تسهیل کند. اگرچه مطالعات مختلف بسیاری تاکنون انجام شده است، اما هنوز اطلاعات بیشتری لازم است تا پزشکی شخصی شده در عمل روزمره به کار گرفته شود.

مطالعات اخیر ثابت می کند که فارماکوژنتیک ابزاری امیدوارکننده برای پزشکی شخصی است.

### منبع :

<https://biomarkerres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40364-020-00213-4>

آزمایش فارماکوژنومیک ممکن است اطلاعات مفیدی برای آن ارائه کند، «آتش» می دهد. به عنوان مثال، در کلینیک مایو ۱۷ جفت دارو-ژن وجود دارد که هنگام تجویز برای آنها هشدار «آتش» وجود دارد. این جفت ها عبارتند از: سیتالوپرام، اسیتالوپرام، کلوپیدوگrel - CYP2C19. کدئین، فلوکستین، فلووکسامین، پاروکستین، تاموکسیفن، ترامادول، ونلافاکسین - CYP2D6. Triopurine - TMPT; SLCO1B1 - تارکولیموس CYP3A5؛ - آباکویر - HLA-B\*57:01؛ - آلپوپورینول - HLA-B\*58:01؛ - کاربامازاپین - HLA-B\*15:02 و - HLA-A\*31:01. وارفارین - CYP2C9 و VKORC1. تصمیم گیری در مورد اجرای هشدار بستگی به دستورالعمل های مبتنی بر شواهد دارد که از منابعی مانند کنسرسیونوم اجرای فارماکوژنتیک بالینی می آید. هشدارهای جفت دارو-ژن کنونی در درجه اول «واکنشی» هستند، به این معنی که آنها از پزشک - بر اساس اهداف خود برای بیمار - می خواهند که آزمایش ژنتیکی را در پاسخ به هشدار دستور دهد. اگرچه اولین گام مهم است، اما هشدارهای واکنشی تنها یک گام به سمت هدف نهایی را نشان می دهد، که شامل داشتن داده های فارماکوژنومیک برای یک بیمار خاص «به طور پیشگیرانه» در پرونده الکترونیک سلامت (EHRs) است، بنابراین هیچ تاخیری در انتظار برای یک بیمار وجود نخواهد داشت. نتیجه آزمایش تا اطلاعات فارماکوژنومیک به طور یکپارچه در جریان کار بالینی گنجانده شود.

## This Number articles

Multi-omics signatures of the human early life exposome .....	4
Multi-omics analysis identifies osteosarcoma subtypes with distinct prognosis indicating stratified treatment .....	22
Multi-omics characterization of autophagy-related molecular features for therapeutic targeting of autophagy.....	38
Multi-omics analysis defines highly refractory RAS burdened immature subgroup of infant acute lymphoblastic leukemia.....	54
Application of pharmacogenetics in oncology .....	68





**Magazine Owner: AmitisGen Med TECH Group**

**Responsible Director: Dr. Roya Amirinejad**

**Editor In Chief: Seyedeh Nayyere Moslehi**

**Telephone: +98(21)88985293**

**Email: [info@PGOTJournal.com](mailto:info@PGOTJournal.com)**

**Editorial Board According:**

**Dr.N.Afshari, Dr.M.R.Akbari, Dr.M.Entezari,  
Dr.A.Heydarinejad, Dr.S.Heydarinejad,  
Dr .S.M.Houshmad, Dr.J.Molaei, Dr.B.Naghavi,  
Dr.R.Nekouian, Dr.M. Nikpay, Dr.N.Parsa,  
Dr.A.A.Rahimi, Dr.H.Saadat, , Dr.M.A.Saremi,  
Dr.R.Shirkoohi, Dr.M.Yaghubi**

PharmacoGenomics  
& Technologies  
JOURNAL



Medical Journal / 4 year / No.13 / 150000 Rials / 2022 Autumn / ISSN 2676 -7236



Your Genome Affects The Way You Respond to Drugs.

