

Single-cell sequencing maps gene expression to mutational phylogenies in PDGF- and EGF-driven gliomas

单细胞测序将基因表达映射到PDGF和EGF驱动胶质瘤中的突变系统发育

GBM 为最常见且致死率极高的脑部肿瘤；其常渗入邻近组织，且形状多变而无确定范围。是一种神经胶质瘤，是脑瘤中特别致命的一种。这种脑瘤具有高浸润性，可大范围转移，与健康脑组织混合在一起，使得通过外科手术除去肿瘤而不引起严重后果几乎是不可能的。而且肿瘤分离转移，形成卫星肿瘤的癌细胞能够逃过治疗，常常引起复发。

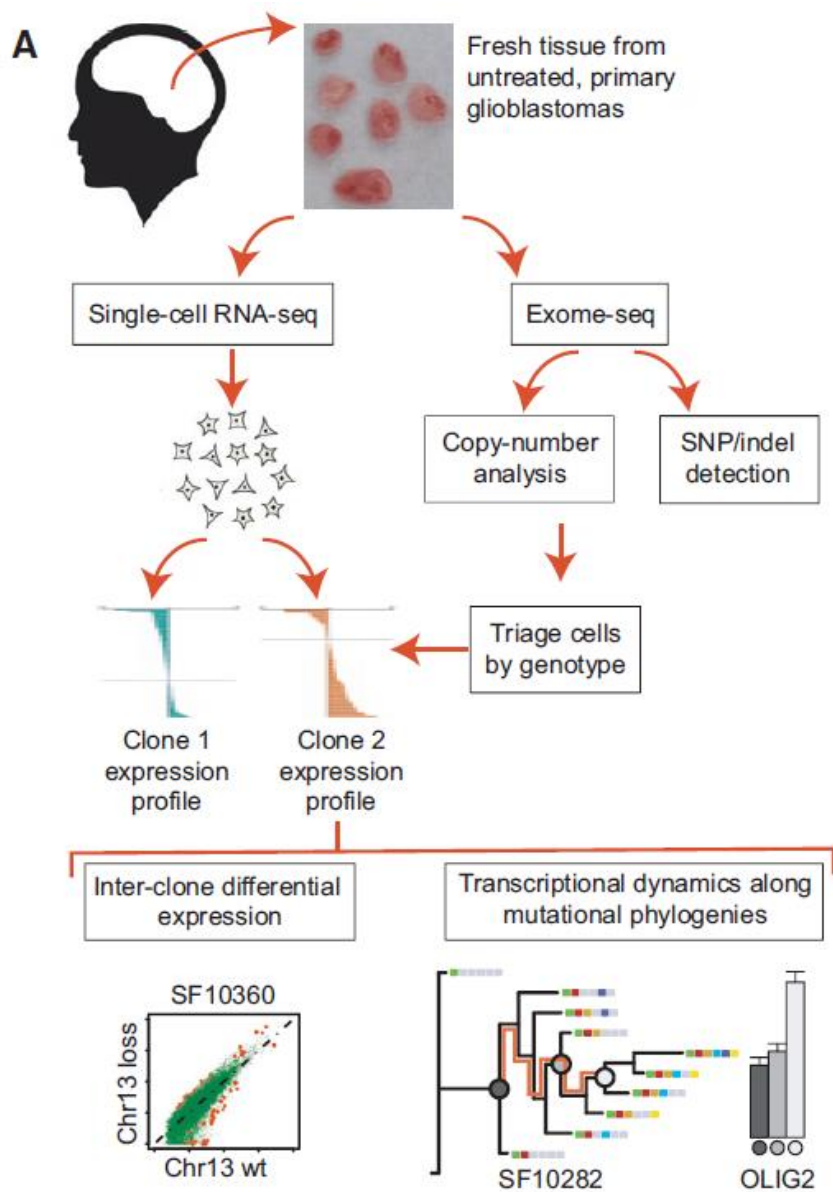


EGF能促进表皮细胞组织内多种细胞的生长分裂
PDGF是一种重要的促有丝分裂因子，具有刺激特定细胞群分裂增殖的能力

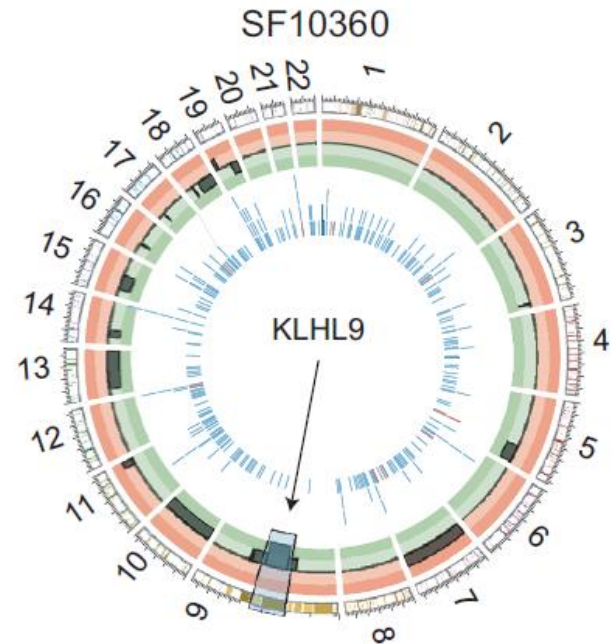
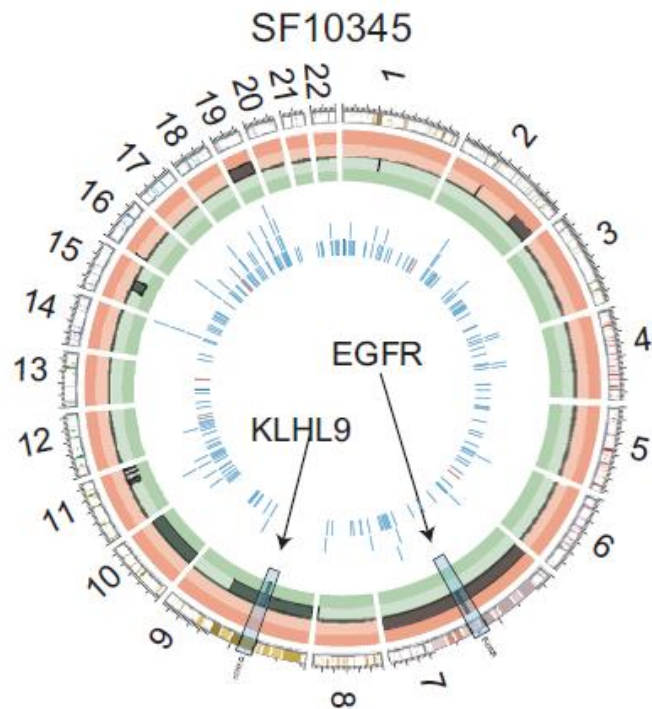
酪氨酸激酶抑制剂主要通过抑制细胞信号转导而抑制肿瘤细胞的生长和增殖，促进细胞凋亡
少突胶质细胞分布于中枢神经系统，其异常可以引发脑肿瘤

- 多形性成胶质细胞瘤 (GBM)
- 表皮生长因子 (EGF)
- 血小板衍生生长因子 (PDGF)
- 受体酪氨酸激酶 (RTK)
- 拷贝数变异 (CNV)
- 单核苷酸变体 (SNV)
- 寡突细胞祖细胞(OPCs)

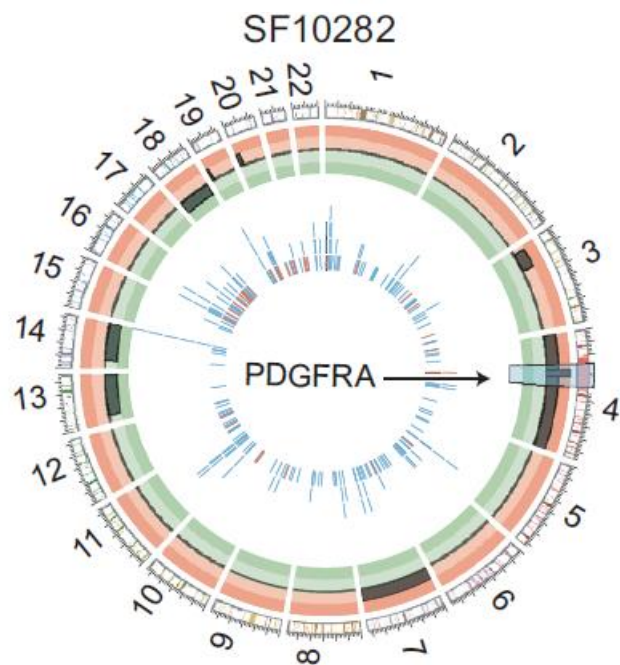
三个主要GBM的实验设计和管道，病理学，基因组和转录组学特征



所有病例均证实了生长因子基因的扩增



B

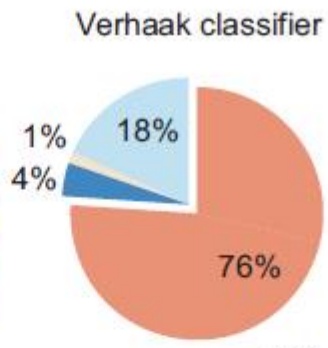
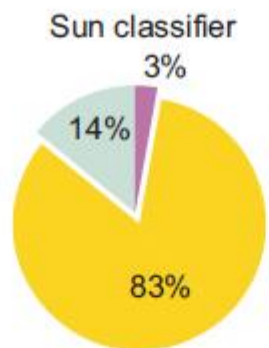


PDGFRA在SF10282中有12个拷贝数，
EGFR在SF10345中有122个拷贝数，
KLHL9不在SF10345或SF10360中表达

C

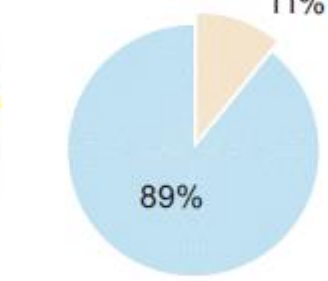
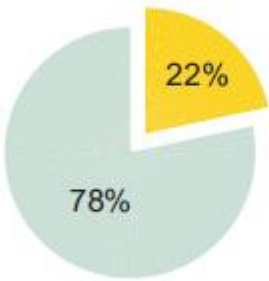
61↑

SF10282:
Sex: M
Age: 65
Diag: GBM
EGFR wt
IDH1 wt
PTEN mut
TP53 mut



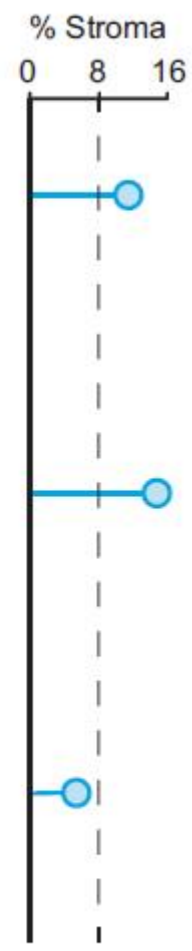
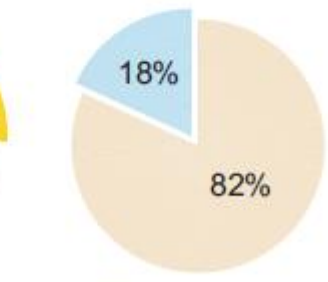
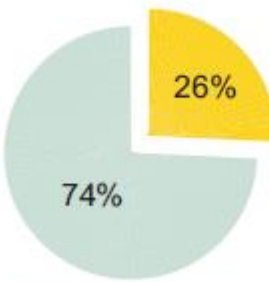
66↑

SF10345:
Sex: F
Age: 51
Diag: GBM
EGFR+
IDH1 wt
ATRX wt
TP53 wt



63↑

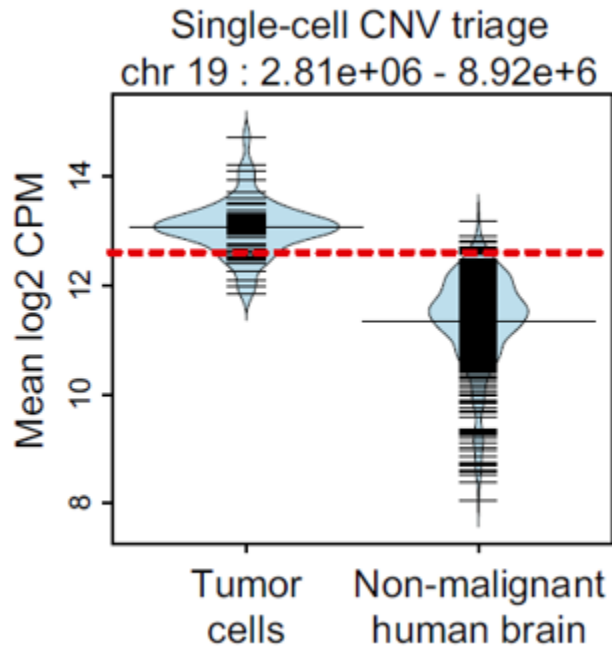
SF10360:
Sex: M
Age: 60
Diag: GBM
EGFR wt
IDH1 wt
ATRX wt
TP53 mut



根据Verhaak亚型的分类SF10345和SF10360是经典的/间充质和主要的EGFR驱动。SF10282主要是亲神经,上调pdgf通路基因,并广泛表达寡突细胞祖细胞(OPCs)的标记。然而SF10282包含有神经干细胞(NSC)样表达谱的细胞亚群。这些细胞在Verhaak计划中分类为间质/古典

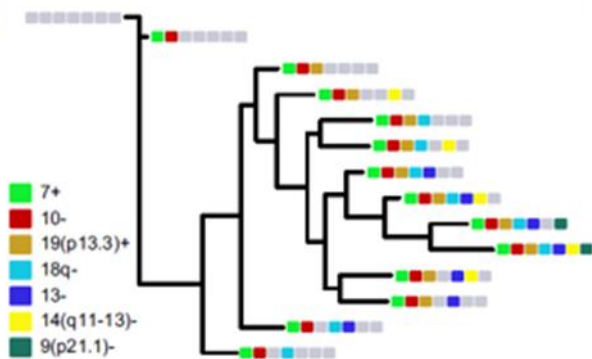
拷贝数改变的系统发生比对到基因表达克隆结构

A



在19p13.3上的拷贝数增益轨迹中的读数计数分布，将SF10360中的细胞与正常脑控制进行比较。正常细胞分布的第5百分位数由红线表示。

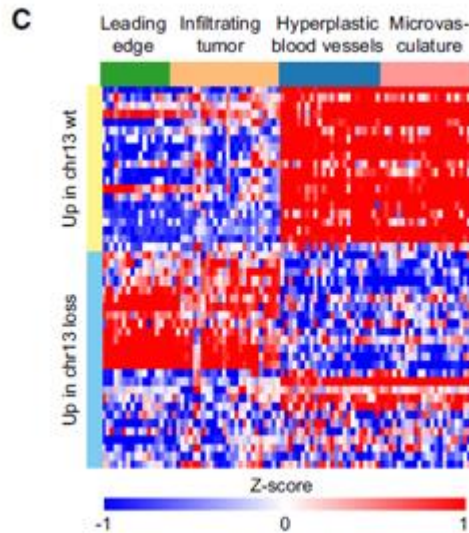
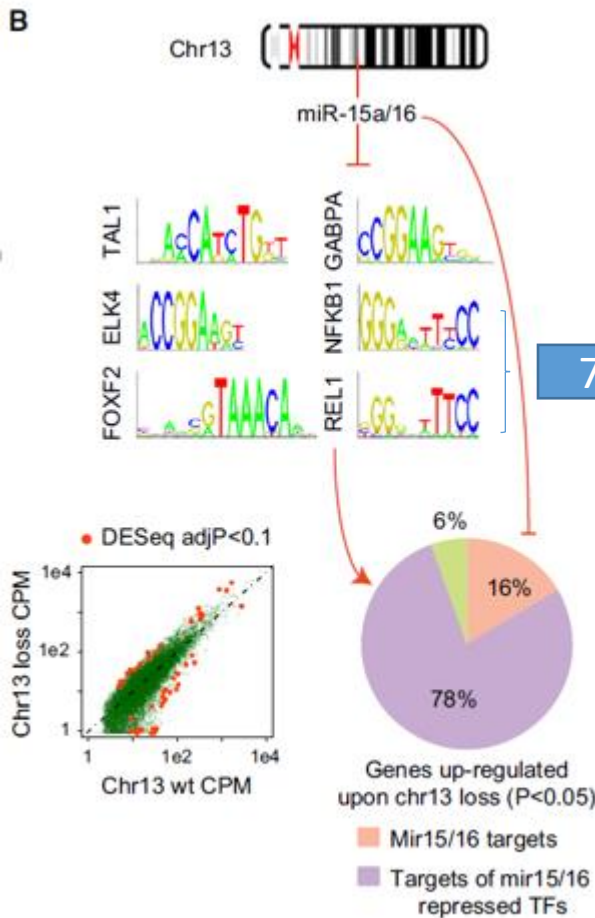
A



使用CNV基因型之间的Jaccard距离来评估细胞间相似性，使用Fitch-Margoliash方法将系统发育适用于每个肿瘤样品

在SF10360中，染色体7增益是一个创始事件，与染色体10的丢失一起出现，染色体13的丢失独立地出现在SF10360的两个不同的亚克隆中

SF10360亚克隆差异表达的基因组分析

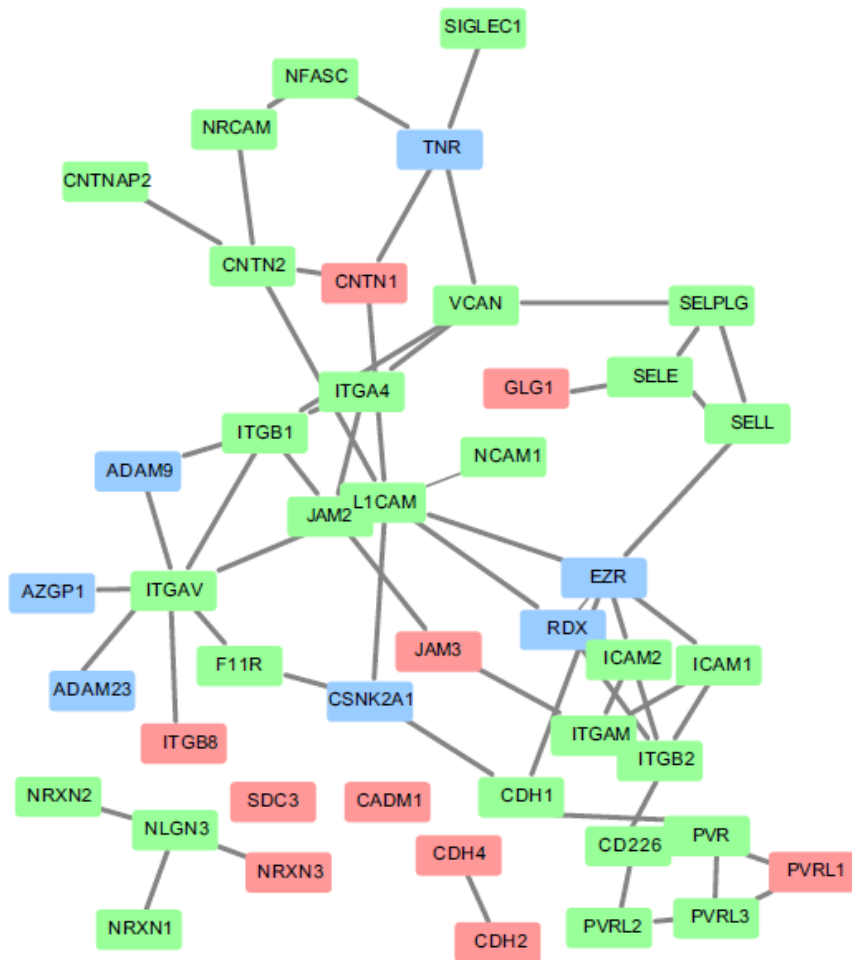


在野生型细胞中上调的基因在周边血管区域中富集，在染色体13缺失上调的基因在Leading edge和浸润性肿瘤中富集

染色体13缺失上调的16%基因被验证了miR-15a / 16的直接靶标
 另外78%来自富含miR-15a / 16靶向转录因子motifs的位点
 细胞粘附途径基因的76%富集NF-kB / REL识别motifs

D

Cell adhesion pathway $q=0.06$
 - indirect miR-15/16 targets



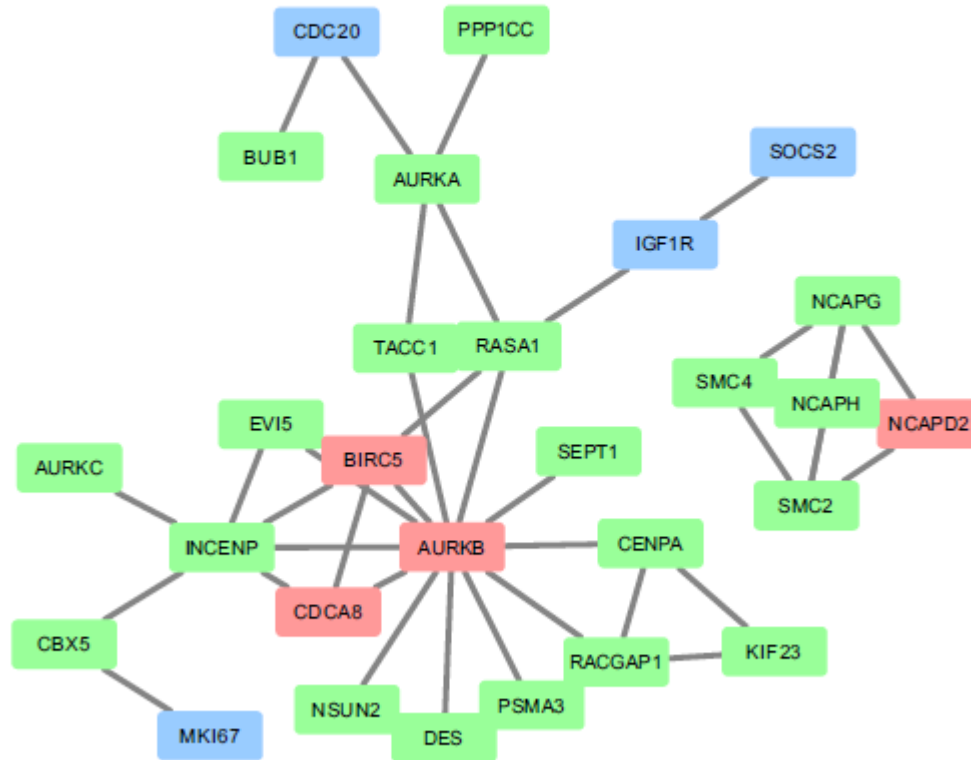
- Protein-protein interaction
- Gene in pathway
- Gene up-regulated upon chr13 loss
- Both

在染色体13损失上差异表达的基因的蛋白质相互作用网络，其是miR-15a / 16调节转录因子的靶标，在细胞粘附途径中具有蛋白质相互作用的叠加

与渗透性表型一致，细胞粘附分子过表达。这包括结合粘附分子，整合素，解体素和涉及入侵的细胞表面受体

E

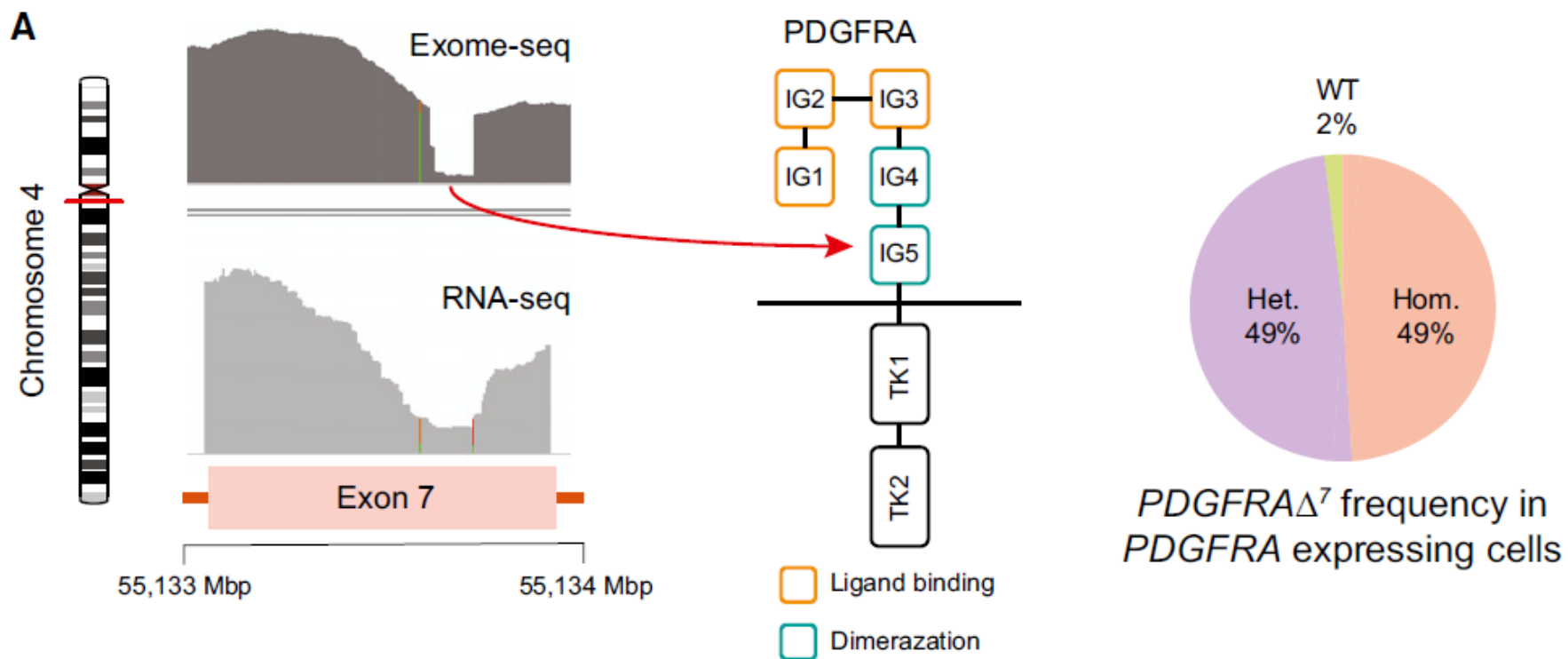
Aurora B kinase pathway $q=0.03$
 - direct mir15/16 targets



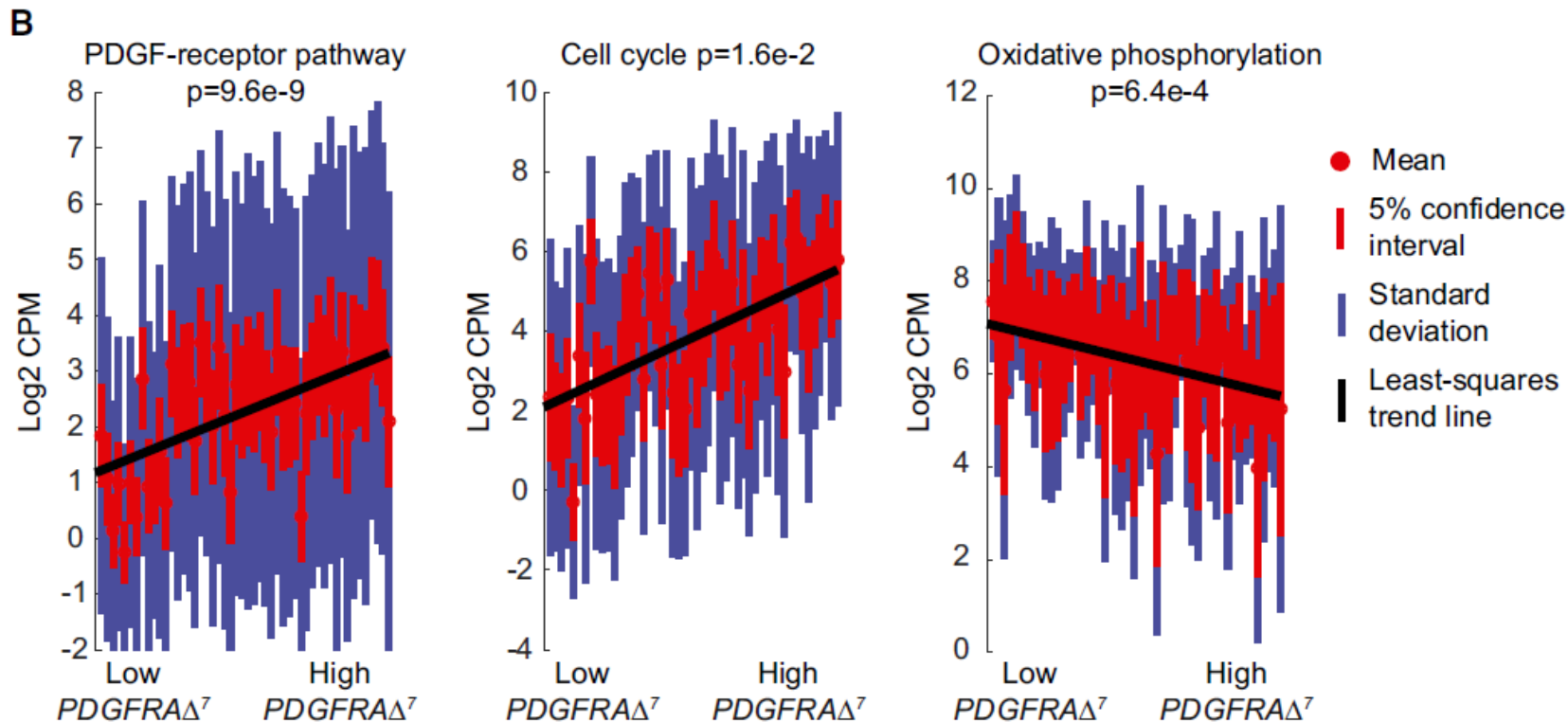
- Protein-protein interaction
- Gene in pathway
- Gene up-regulated upon chr13 loss
- Both

在染色体13损失上差异表达的基因的蛋白质相互作用网络，尤其是miR-15a / 16的直接的，有效的靶标，在Aurora B激酶中具有蛋白质相互作用的叠加

PDGFR突变体的剂量反应分析



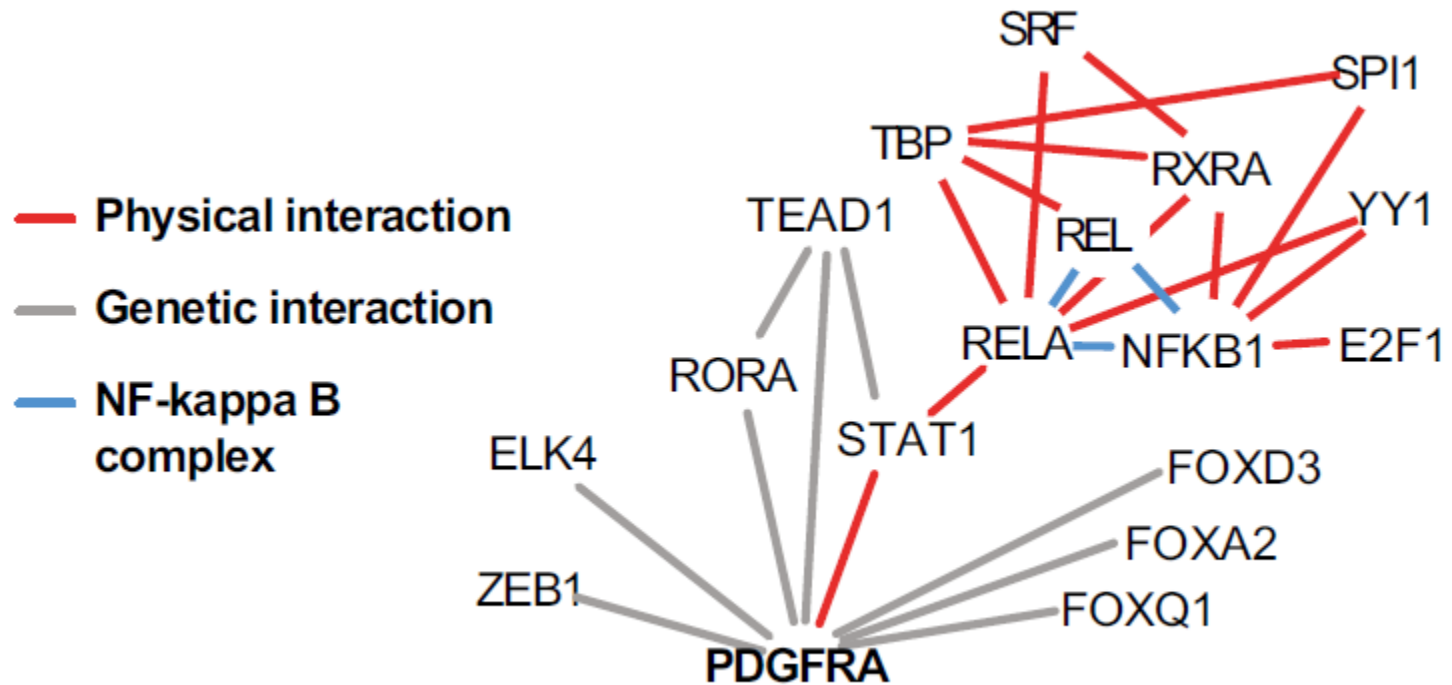
PDGFRA基因外显子7的外显子（左上）和RNA-seq读数（左下）的范围。Exon7一段小缺失靶向了PDFG受体的免疫球蛋白样结构域IG5（中心）。49%的PDGFRA的细胞是PDGFRA Δ^7 纯合子表达，另外49%表达杂合。



与PDGFRA Δ^7 相关的富集基因集,通路基因在各个细胞中分布,从低水平PDGFRA Δ^7 到高水平PDGFRA Δ^7 。与PDGFRA Δ^7 正相关的基因富集于PDGF-受体信号网络和细胞周期,与PDGFRA Δ^7 负相关的基因富集于氧化磷酸化。

我们推断PDGFRA Δ^7 可能会增强PDGF-受体信号

C

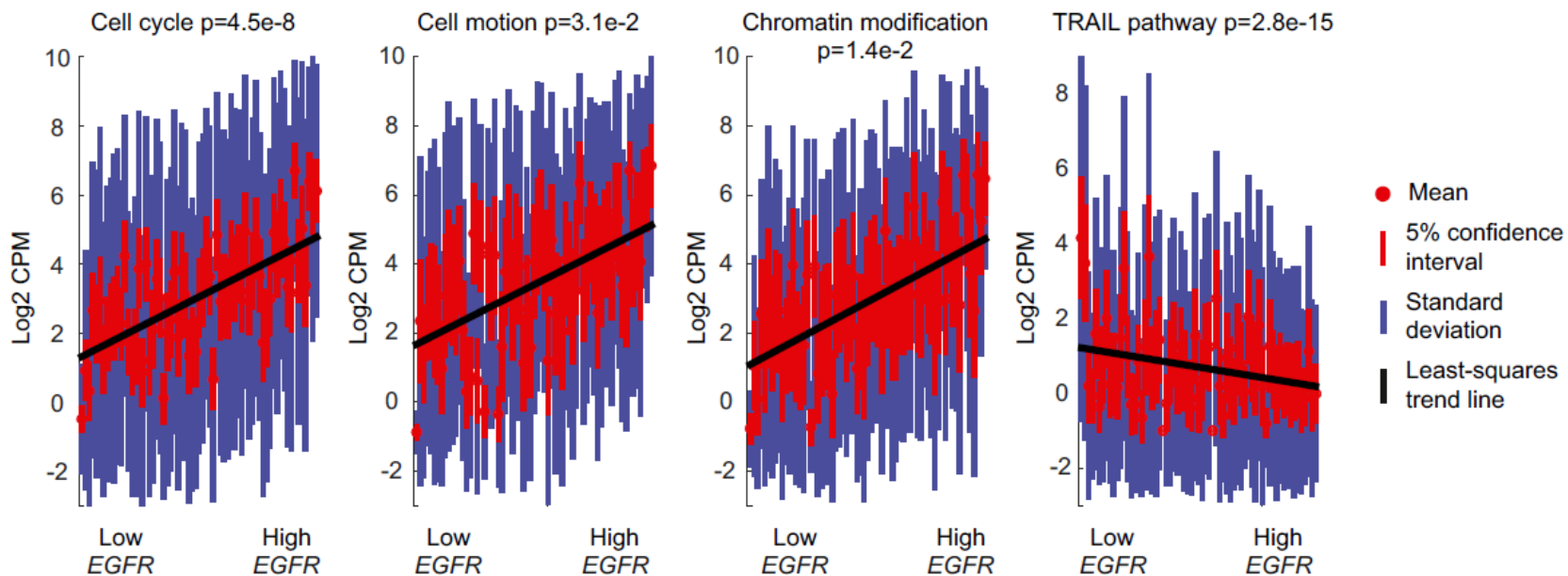


基因转录因子的相互作用网络

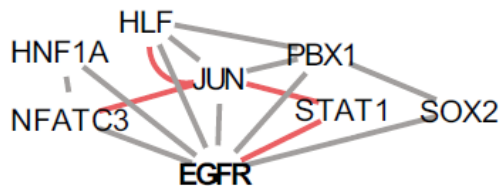
物理相互作用是由蛋白质组学实验鉴定的蛋白质产物之间的相互作用。

遗传相互作用是在敲除实验中抑制另一基因时发生的基因表达变化。

遗传和物理相互作用说明STAT1和NF-KB可能作为PDGFRA Δ^7 的下游效应因子

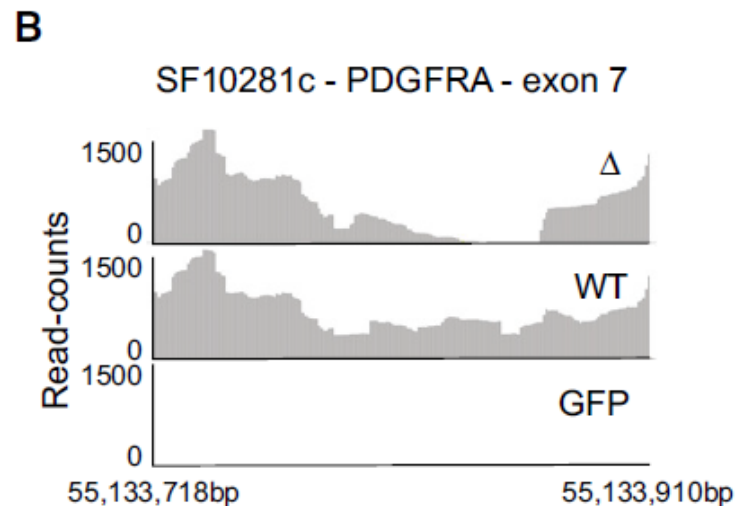
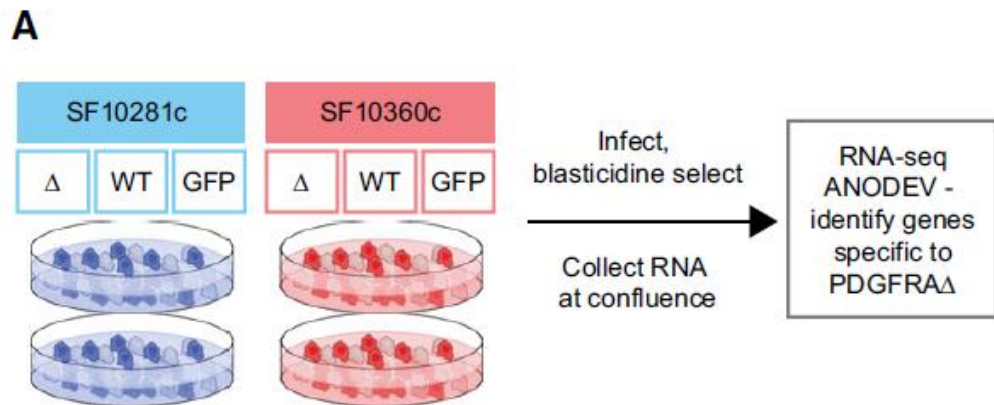


— Physical interaction
 — Genetic interaction

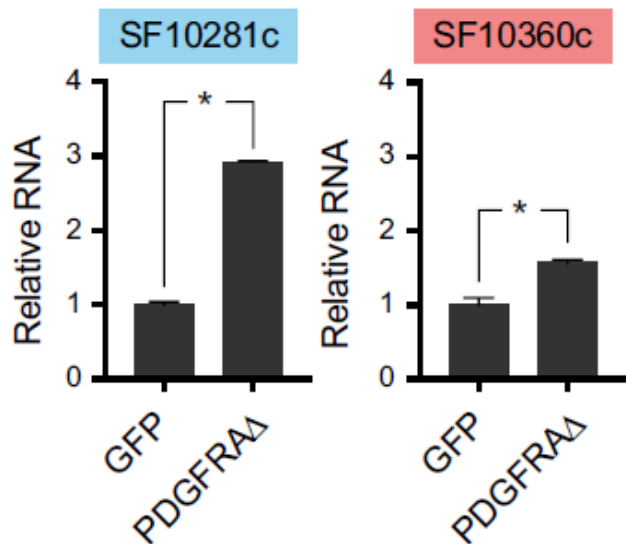


增加的细胞周期基因的基因集合，以及与染色质修饰和细胞运动相关的基因集，SOX2在胚胎、神经和神经胶质瘤干细胞和c-jun(参与glioma-genesis的抗凋亡因子)与EGFR剂量相关

PDGFRA Δ 7的体外分析

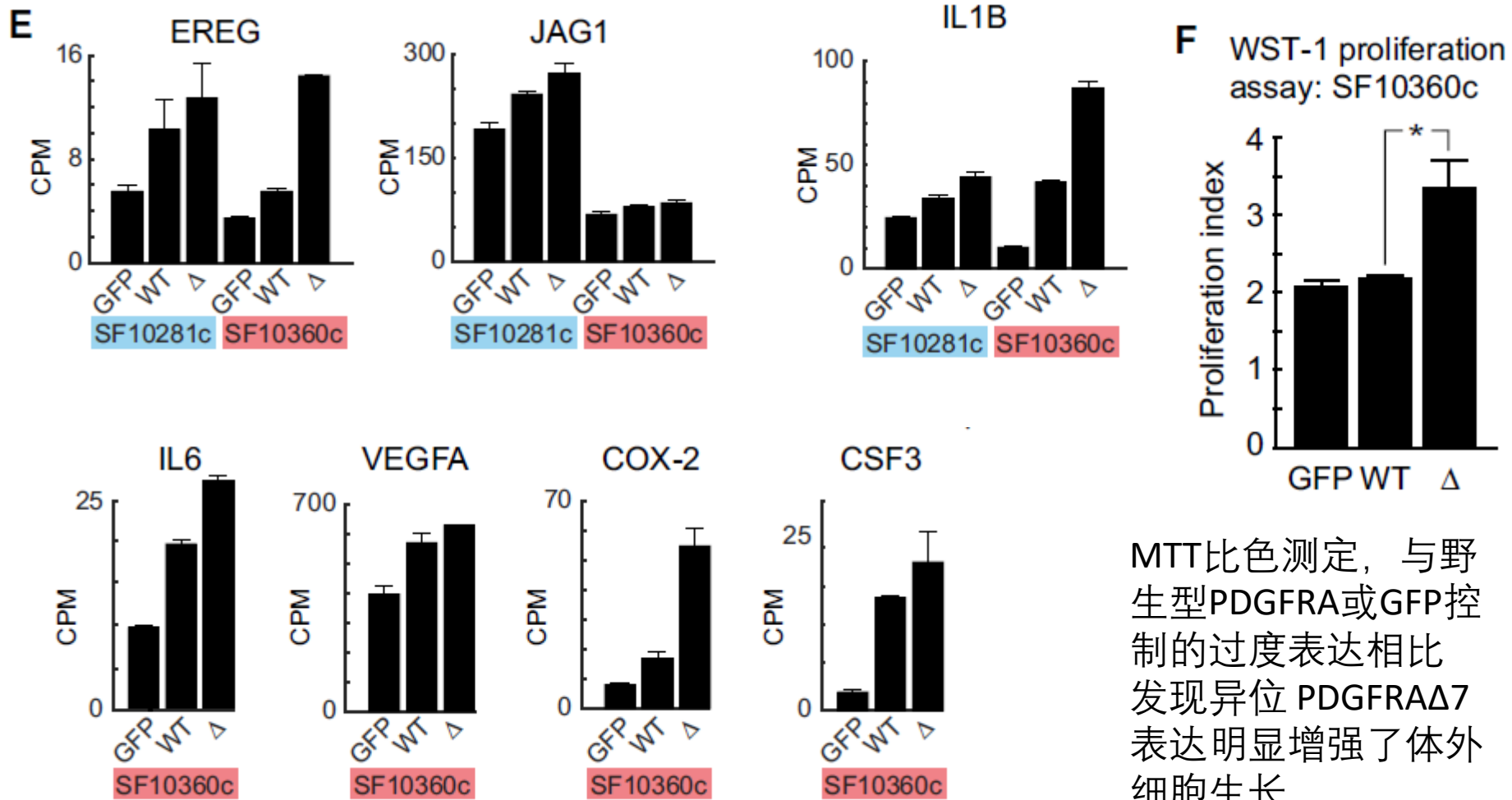


C Wild-type PDGFRA expression qPCR



这些细胞株没有强烈表达PDGFRA的内源性，但在各自的培养基中检测到PDGFRA和PDGFRA Δ 7 mRNA的稳健表达

在PDGFRA Δ 7的异位表达时，在两种细胞系中都诱导了内源的野生型PDGFRA

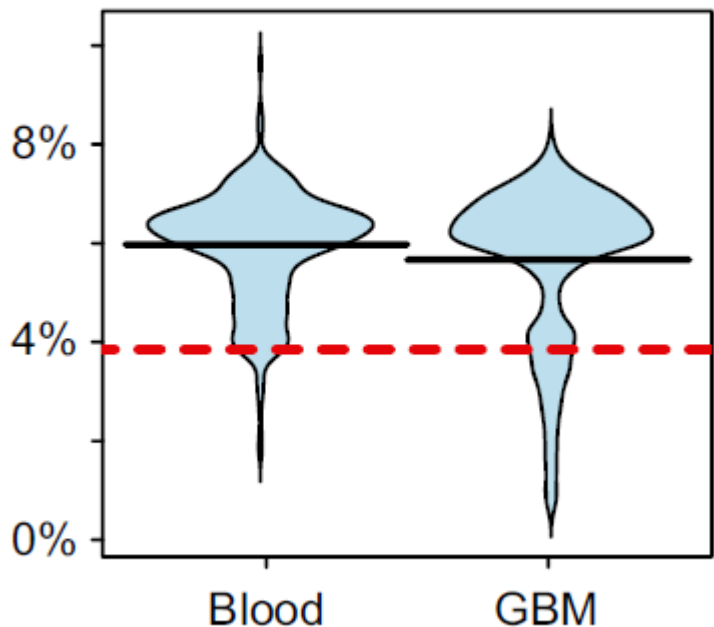


MTT比色测定，与野生型PDGFRA或GFP控制的过度表达相比发现异位 PDGFRA Δ 7 表达明显增强了体外细胞生长

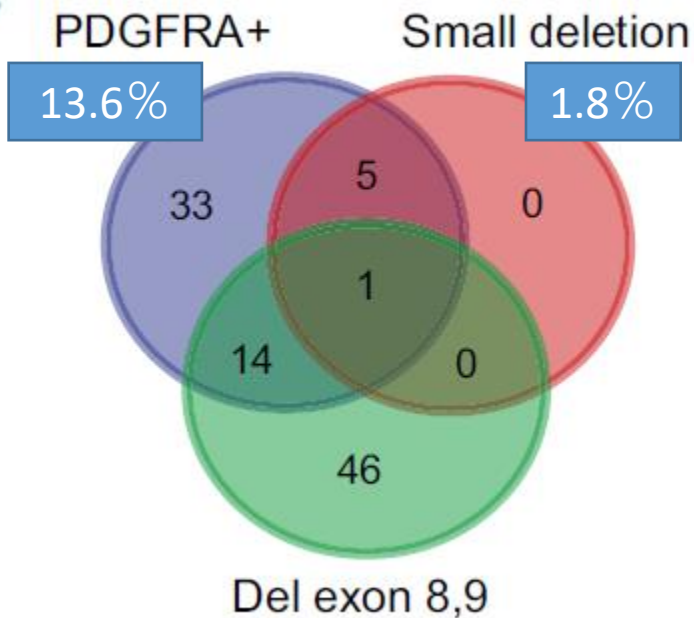
基因丰富了与PDGF结合的基因分子功能，以及其他生长因子的结合

TCGA数据分析揭示影响二聚化结构域的一系列PDGFRA突变

A % reads mapping exons 8 & 9



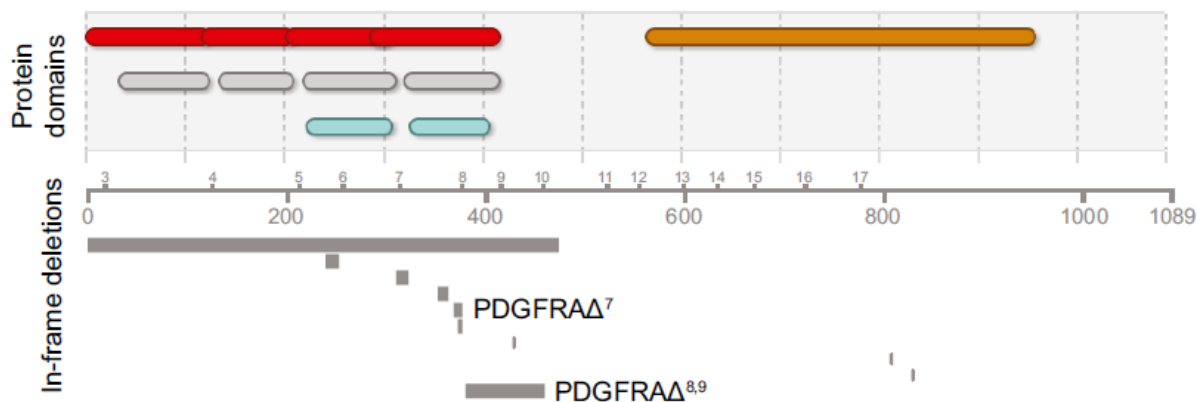
B



外显子8和9的缺失，或影响PDGFRA二聚化结构域的小缺失

C

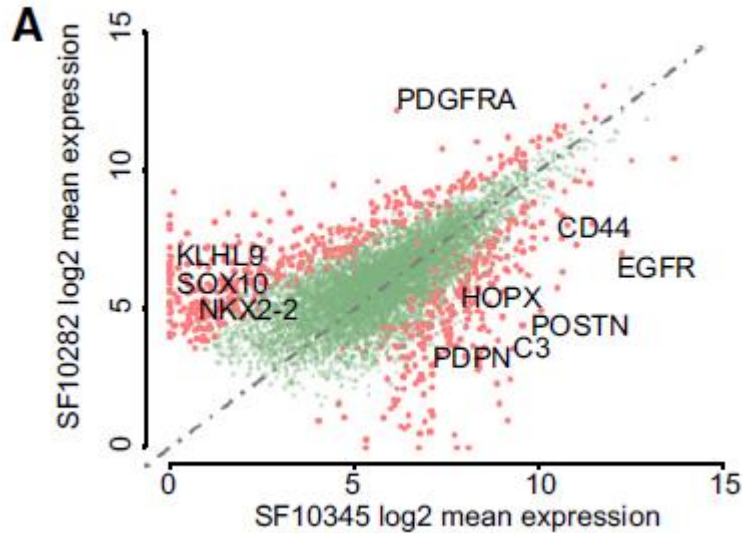
■ I-set domain
■ Immunoglobulin-like fold ■ Tyrosine-protein kinase, catalytic domain



所有的小缺失发生在PDGFRA扩增病例中

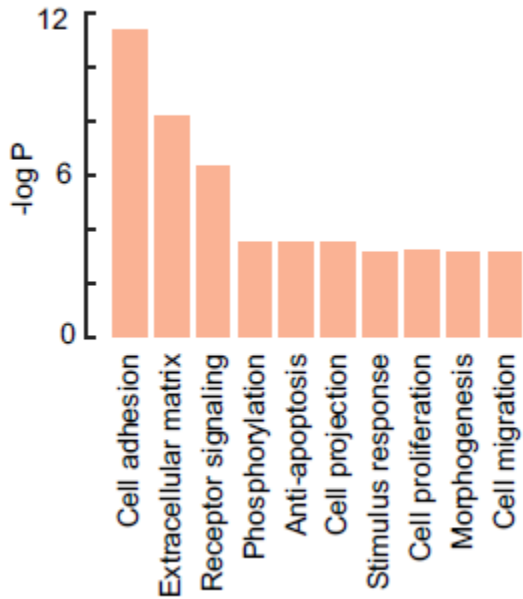
PDGFRA Δ 7, PDGFRA Δ 8,9和其他小的框内缺失靶向PDGFRA细胞外结构域的免疫球蛋白I-set亚结构域。这些结构域参与受体二聚化

EGF-和PDGF驱动的GBM之间的基因表达的差异

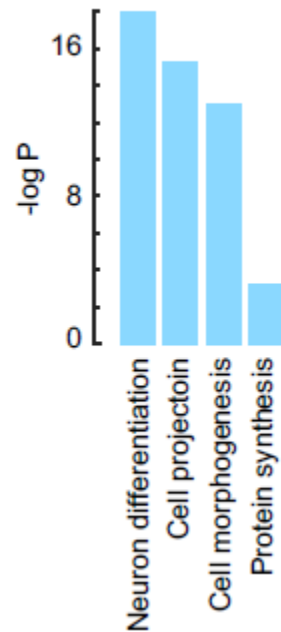


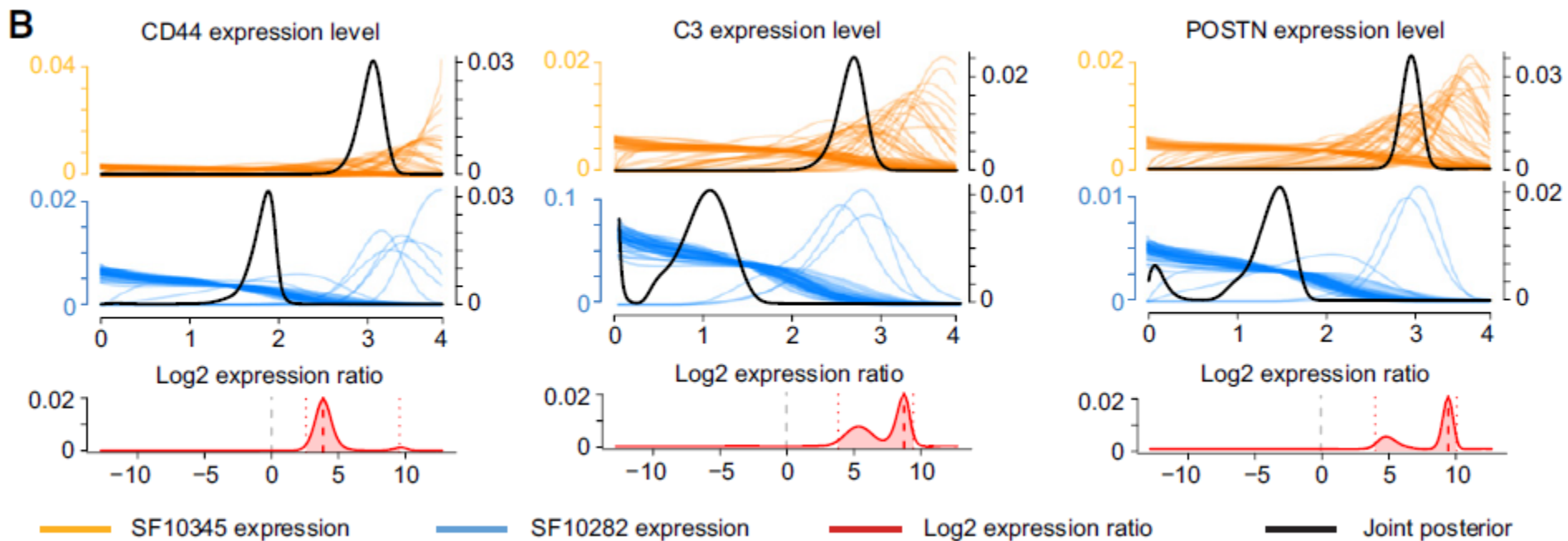
在SF10345中EGFR被上调，细胞粘附分子和介导运动性的基因过表达
神经元分化途径在SF10282中上调的基因中是显著的，这些基因是OPCs表达主要的因子：PDGFRA，NKX2-2，SOX10，SEMA5A，LINGO1，S100B，MAP2

Up in SF10345



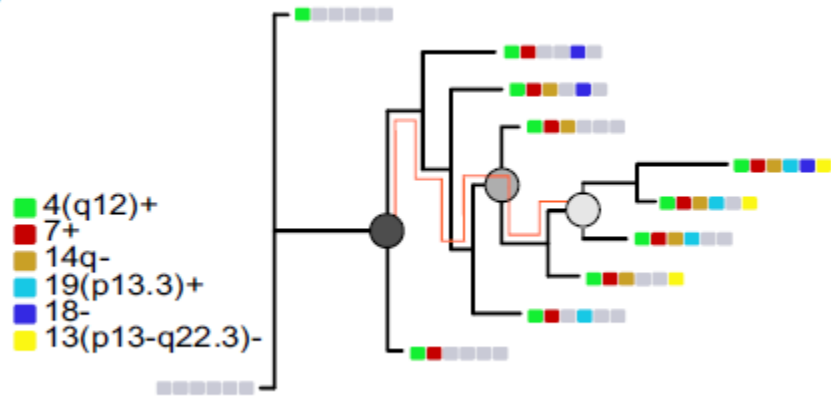
Up in SF10282



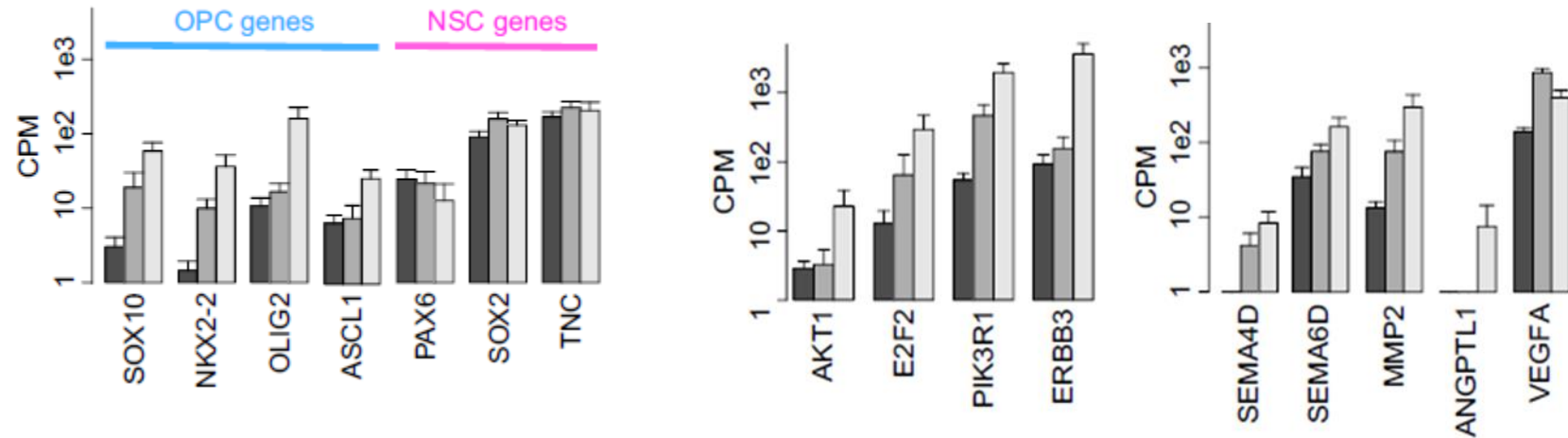


编码介导干细胞归巢的粘附分子的CD44、在SF10345中超过14倍富集
SF10345 C3和POSTN均上调了数百倍

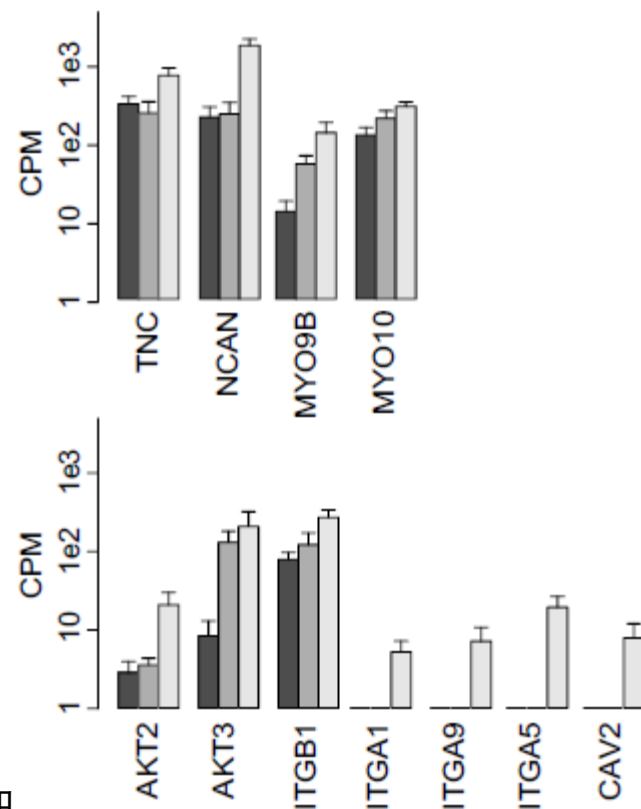
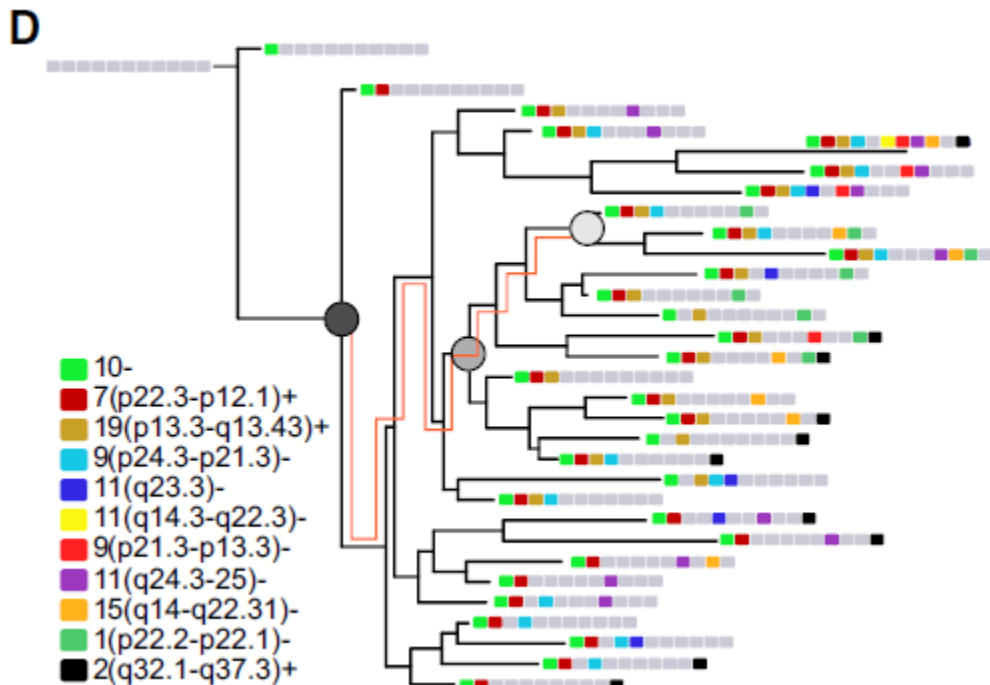
C



系统发育中NSC和OPC基因表达的分析显示PAX6, SOX2和TNC的组成型高表达, 但是在伪时间下OPC基因OLIG2, ASCL1, NKX2-2和SOX10逐渐增加。PI3K / AKT通路基因和与血管生成有关的基因也伴随增加



每个叶子对应于具有相同CNV基因型的一组独特的细胞。条形图显示逐渐获得CNV的细胞组的选择基因的平均 (\pm SD) 表达



SF10345显示了编码与神经胶质瘤运动和侵袭相关的细胞外基质和跨膜蛋白的基因的进行性上调，如tenacin-C, 神经干和整合素。

有助于神经胶质瘤侵袭和恶性肿瘤的AKT途径基因AKT2和AKT3和神经胶质瘤侵袭和神经干细胞迁移所需的II类肌球蛋白随着沿着SF10345系统发育的骨干移动，它们也逐渐上调

- **(1) 用一句话概括此研究的主要结论或创新点**

- 肿瘤单细胞RNA-seq可以作为肿瘤进展的快照，给浸润性肿瘤治疗提供新的思路

- **(2) 此研究对你有何启发**

- 我们可以对植物进行单细胞测序，以获得植物各个组织不同时间不同空间的基因表达

- **(3) 此研究还存在哪些问题可以改进**

- 本实验研究内容丰富，但是针对每一项的研究不够深入，希望可以对PDGFRA更加深入的研究