BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS

AVANCE DE TESIS

"INFLUENCIA DE MICROAMBIENTE PROINFLAMATORIO PERINATAL EN LA LEUCEMOGÉNESIS"

ALUMNA

AURORA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

Director de Tesis	**Codirector de Tesis**	**Asesor externo**
Dra. Bertha Alicia León Chávez	**Dra. Rosana Pelayo Camacho**	**Dra. Verónica Ramos**
Posgrado en Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.	Laboratorio de Oncoinmunología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, México	Instituto GENYO, Granada, España

Comité revisor:

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dr. Juan Carlos Balandrán Juárez

Dr. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez

Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres

BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres, Dr. Juan Carlos Baladran Juárez y el Dr. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Influencia de microambiente pro-inflamatorio perinatal en la leucemogénesis"**, que presenta la alumna **Aurora Rodríguez Martínez** para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintiséis días del mes de agosto del año dos mil veintiuno.

ATENTAMENTE

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres

Dr. Juan Carlos Baladran Juárez

Dr. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez

Posgrado en Ciencias Químicas
FCQ - ICUAP

Edif. 105 I, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 2 29-55-00 Ext. 7387

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia y amigos, quienes saben exactamente quiénes son, cuya opinión sobre mí nunca cambió sin importar lo bueno o lo malo de los tiempos. Tenemos que ver a nuestro alrededor y tomar nota de las personas que siempre han creído en nosotros. Nunca hay que darles por sentado.

Gracias a mis tutoras, Doctora en Ciencias Bertha Alicia León Chávez y Doctora en Ciencias Rosana Pelayo Camacho, así como al Comité Revisor y a los distintos Maestros que tuve el honor de aprender de su experiencia, su mentoría para el desarrollo del proyecto fue indispensable.

Gracias a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por haberme acogido en una travesía más, siempre será con orgullo mi alma máter.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada en el periodo comprendido de enero 2019 a diciembre 2020, su apoyo fue indispensable para mi manutención.

Gracias al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (CONCyTEP) por haberme tomado en cuenta para la convocatoria “Beca Tesis CONCyTEP 2020”.

Gracias a la comunidad global de programadores, en especial a la Free Software Foundation, al Human Cell Atlas, a Satija-Lab, en fin, a todos aquellos que desarrollan, parchan, distribuyen, y en general construyen un mundo mejor tecleo tras tecleo.

Tabla de contenido

Tabla de figuras 6

Lista de abreviaciones 7

Resumen 9

Introducción 10

Marco teórico 11

Hematopoyesis embrionaria y fetal 11

Leucemia pediátrica 18

Hematopoyesis e inflamación 20

Secuenciación de ARN de célula única 21

Justificación 29

Hipótesis 29

Objetivos 29

Materiales y métodos 30

Análisis de transcriptómica de célula única 30

Líneas celulares 32

Cultivos primarios de estroma de cordón umbilical 32

Cultivos tridimensionales basados en esferoides de estroma 34

Ensayos de proliferación en cultivo tridimensional 34

Resultados y discusión 36

Análisis del estado proinflamatorio de la hematopoyesis fetal, leucémica y normal pediátrica por transcriptómica de célula única 36

Proliferación de líneas celulares leucémicas en esferoides de estroma de cordón umbilical con estimulo proinflamatorio de LPS 52

Discusión general 57

Conclusión 60

Referencias 61

Recursos suplementarios 69

Scripts 69

Tabla de figuras

Fig. 1 / *Sitios anatómicos hematopoyéticos primordiales durante la gestación y posterior al nacimiento*……..***12***

Fig. 2 / *Métricas comunes para control de calidad para el análisis de scRNA-seq.* ……..***23***

Fig. 3 / *Visualización de la reducción dimensional de los datos de los dos primeros componentes principales en el análisis de scRNA-seq.* ……..…….....***25***

Fig. 4 / *Visualización del conteo total de UMI's antes y después de normalizar en el análisis de scRNA-seq.* ……..… ***26***

Fig. 5 / *Mapa transciptómico de célula única de la hematopoyesis fetal, leucémica pediátrica y normal pediátrica* ……..... ***36***

Fig. 6 / *Perfil transcripcional de genes seleccionados de las hematológicas de los tres grupos muestrales, amarillo NBM, rojo LBM y azul FL* ……....***37***

Fig.7 / *Perfil transcripcional de genes seleccionados de las células hematopoyéticas troncales y progenitores multipotentes entre FL, LBM y NBM* …… ***39***

Tabla 1. *Valor de p del análisis de expresión diferencial de las proteínas de choque térmico del FL con respecto LBM y NBM*…… ***41***

Fig. 8 / *Expresión diferencial de CXCR4 entre los grupos muestrales durante las diferentes etapas de diferenciación de B*.....***42***

Fig. 9 / *Diferencias en el perfil de expresión génico asociado a la inflamación.*…***44***

Fig. 10 */ Nivel de expresión de genes inmunomoduladores y reguladores de la inflamación en el estroma del hígado fetal*……***48***

Fig. 11 */ Mapa de calor de las interacciones celulares predichas de acuerdo con la expresión de ligando y receptores entre el estroma de hígado fetal y las células hematopoyéticas troncales de hematopoyesis fetal, leucémica y normal pediátrica*……..***51***

Fig. 12 | *Colonización de esferoides de cordón umbilical por células leucémicas*…***53***

Fig. 13 */ Velocidad de proliferación de las células leucémicas en diferentes condiciones de estroma de cordón umbilical* ……***56***

Lista de abreviaciones

- **ATP**: Trifosfato de adenosina, del inglés: ***A****denosine* ***Tri******p****hosphate.*
- **CTFR®**: **C**ell**T**race **F**ar **R**ed™, kit para rastreo de proliferación celular, marca registrada de Thermo Fisher.
- **DNA**: Ácido desoxirribonucleico, del inglés: **D**eoxyribo**n**ucleic **A**cid.
- **EMBL**: Laboratorio Europeo de Biología Molecular, dependencia de la Unión Europea, en inglés: ***E****uropean* ***M****olecular* ***B****iology* ***L****aboratory.*
- **FL**: Hígado fetal, del inglés: ***F****etal* ***L****iver*
- **GSEA**: Análisis de enriquecimiento de conjuntos génicos, del inglés: ***G****ene* ***S****et* ***E****nrichment* ***A****nalysis*.
- **HE**: **H**ematopoyesis de **E**mergencia.
- **HIF**: Factor Inducible por Hipoxia, del inglés: ***H****ypoxia* ***I****nducible* ***F****actor*.
- **HSC**: Células Hematopoyéticas Troncales, del inglés: ***H****ematopoietic* ***S****tem* ***C****ells*.
- **HSPC**: Células hematopoyéticas troncales y progenitoras, del inglés: ***H****ematopoietic* ***S****tem and* ***P****recursor* ***C****ells.*
- **INEGI**: **I**nstituto **N**acional de **E**stadística y **G**eografía
- **LBM**: Médula ósea leucémica, del inglés: ***L****eukemic* ***B****one* ***M****arrow*.
- **LLA**: **L**eucemia **L**infoblástica **A**guda.
- **LPS**: **L**ipo**p**oli**s**acárido
- **LSC**: Células leucémicas troncales, del inglés: ***L****eukemic* ***S****tem* ***C****ells*.
- **MPP**: Población progenitora multipotente, del inglés: ***M****ultipotent* ***P****recursor* ***P****opulation*.

- **MSC**: Células mesenquimales troncales, del inglés: ***M**esenchymal **S**tem **C**ells*.
- **NBM**: Médula ósea normal, del inglés: ***N**ormal **B**one **M**arrow*.
- **NCBI**: Centro Nacional para la Información Biotecnológica, dependencia estadounidense, en inglés: ***N**ational **C**enter for **B**iotechnology **I**nformation*.
- **NFκB**: Factor nuclear kappa B, del inglés: ***N**uclear **F**actor **Kappa B***.
- **NK**: (Células) Asesinas naturales, del inglés: ***N**atural **K**iller (Cells).*
- **PCA**: Análisis de componentes principales, del inglés: ***P**rincipal **C**omponent **A**nalysis.*
- **RNA**: Ácido ribonucleico, del inglés: ***R**ibo**n**ucleic **A**cid*.
- **RT-PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa, del inglés: ***R**everse **T**ranscriptase – **P**olymerase **C**hain **R**eactión.*
- **SCF**: Factor de células troncales, del inglés: ***S**tem **C**ell **F**actor*.
- **t-SNE**: Incrustación de vecinos estocásticos por distribución t, del inglés: ***t-D**istributed **S**tochastic **N**eighbor **E**mbedding.*
- **UMAP**: Aproximación y Proyección de Variedad Uniforme, del inglés: ***U**niform **M**anifold **A**pproximation and **P**rojection.*
- **UMI**: Identificador molecular único, del inglés: ***U**nique **M**olecular **I**dentificator.*

Resumen

Las leucemias son el tipo más común de cáncer pediátrico en México, América Latina y el mundo. En las leucemias, como en los demás tipos de cáncer, el entorno microambiental juega un papel crucial durante la génesis, progresión y desenlace, puesto que, de las interacciones de las células malignas con su contraparte normal y el microambiente que los rodea en todas dimensiones, se derivan fenómenos como la remodelación estromal, la evasión inmunitaria y la metástasis, hasta la muerte o remisión.

La leucemia infantil, a diferencia de la mayoría de las neoplasias asociadas al envejecimiento, es considerada una enfermedad del desarrollo, en la que situaciones y características oncopromotoras, presumiblemente suceden durante la gestación del individuo o en la etapa perinatal.

El objetivo de este proyecto fue realizar un análisis de expresión diferencial de marcadores moleculares inflamatorios de la hematopoyesis en el hígado fetal con respecto a la hematopoyesis de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda de células B, con el fin de investigar la existencia de componentes del microambiente hematopoyético fetal que potencialmente facilitan la leucemogénesis bajo condiciones inflamatorias.

Para ello, se realizó un análisis de datos de secuenciación masiva de RNA de célula única de material público correspondiente a hematopoyesis de hígado fetal y leucemia infantil. Adicionalmente, se utilizaron sistemas organoides con líneas celulares de leucemia y células estromales, para explorar la capacidad de activación hematopoyética bajo condiciones proinflamatorias en el contexto del microambiente fetal.

Fuimos capaces de identificar HSC/MPP con un inmunofenotipo fuertemente comprometido hacia el linaje B en la médula ósea leucémica que mantuvieron un perfil inflamatorio y de ciclo celular muy similar a las HSC/MPP. Por otra parte, se comprobó que el estroma de cordón umbilical regula la proliferación de las células leucémicas disminuyendo de manera significativa su velocidad selectivamente en las células que se encuentran en un nicho hipóxico.

Introducción

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia maligna de células linfoides inmaduras de B o T. La LLA es el tipo de leucemia de mayor incidencia en la población entre 0-19 años[1–3]. Los estudios epidemiológicos muestran que la incidencia varía con la edad, con el mayor pico en los infantes entre las edades de 2 a 5 años[4].

Otro aspecto epidemiológico de la leucemia es la variación entre el grupo étnico. La población latinoamericana tiene la tasa de incidencia más alta en todos los grupos etarios con respecto a otros grupos étnicos. Adicionalmente, la velocidad con la que incrementa la tasa de incidencia es mayor que en las poblaciones no hispanas. Se desconoce la causa subyacente de estas observaciones, aunque se han postulado varias hipótesis que incluyen disparidades en el estado socioeconómico, riesgos ambientales, mutaciones genéticas heredadas o una combinación de factores[5].

Durante la etapa embrionaria la hematopoyesis es mucho más susceptible a las fuerzan oncopromotores, debido a la alta tasa de proliferación de las células hematopoyéticas troncales y progenitoras y su sensibilidad a las señales celulares que regulan su diferenciación y migración a los distintos órganos. Esta hipótesis es respaldada por la teoría de Greeves y colaboradores, la cual surge al investigar gemelos monocigóticos que desarrollaron leucemia a edades distintas con la particularidad que ambos hermanos presentan una alteración genética principal, generalmente una traslocación con el mismo punto de ruptura cromosómica, pero diferentes mutaciones genéticas secundarias. Esto deja prever dos situaciones; la leucemia tiene un mismo origen clonal y dicha predisposición oncológica *per se* no es suficiente para detonar la leucemia al nacer, es decir, de alguna manera la crisis blástica permanece latente hasta que surge un evento o hit secundario que desencadena la enfermedad[6].

La hematopoyesis fetal como adulta es un proceso jerarquizado cuya diferenciación es regulada por los factores solubles e interacciones que aporte su respectivo microambiente[7]. Cualquier perturbación en el microambiente, ya sea por factores genéticos, epigenéticos o ambientales como la inflamación alterará la homeostasis del proceso normal de hematopoyesis promoviendo la aparición, mantenimiento y progreso de la leucemia.

Este trabajo trata de comprender la naturaleza de las células leucémicas troncales en la etapa fetal y su relación con diferentes tipos de microambiente, para tratar de dilucidar los elementos que intervienen en la etiología de la leucemia congénita, que afecta la vida de miles de infantes y sus familias en nuestro país y el mundo.

Marco teórico

Hematopoyesis embrionaria y fetal

Con la gastrulación, uno de los primeros tejidos en diferenciarse es el aparato circulatorio, y con él, la pléyade de células que componen la sangre y la linfa, células que provienen de un mismo precursor llamado “Célula Troncal Hematopoyética” (HSC por sus siglas en inglés: *Hematopoietic Stem Cell*)[8].

La producción de células sanguíneas depende de las HSCs, una población celular multipotente con habilidad de autorrenovación y diferenciación hacia los diferentes linajes sanguíneos. Las HSCs son capaces de autorrenovarse mediante división asimétrica, y de las dos células resultantes de la mitosis, una conservará su troncalidad y multipotencialidad, mientras que la otra se encaminará a un linaje específico. Este es un proceso finamente coordinado con los componentes del microambiente hematopoyético, los cuales proveerán de las condiciones necesarias para la hematopoyesis[8], cuya locación variará concomitante a los cambios en la anatomía del humano durante la gestación y el desarrollo (Fig. 1)[9].

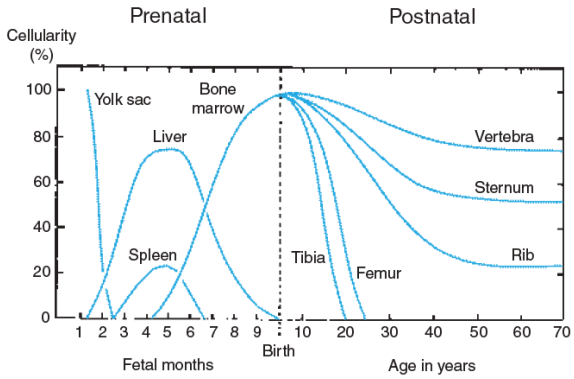


Fig. 1 / Sitios anatómicos hematopoyéticos primordiales durante la gestación y posterior al nacimiento. *En el gráfico se representa el aumento o disminución del porcentaje de celularidad de las células hematológicas en distintos sitios anatómicos en función al tiempo, en meses, previo al nacimiento y en años posterior al nacimiento.*[8]

Los progenitores más primitivos de los que tenemos conocimiento surgen durante la migración de las células mesodérmicas hacia el saco vitelino, en donde generan "*islas de sangre*", en las cuales se desarrollan células eritroides y macrófagos que no tienen la capacidad de autorrenovación ni diferenciación multilinaje. Las primeras HSCs capaces de reconstitución multilinaje y autorrenovación a largo plazo aparecen en la región ventral de la aorta-gónada-mesonefros a partir del endotelio hemogénico en un proceso conocido como transición endotelio-hematopoyético, donde las HSCs entran a circulación para posteriormente colonizar el hígado fetal para expandirse y diferenciarse[8,10]. Por último, las HSCs migran a la médula ósea para permanecer ahí el resto de la vida del individuo, estas pueden ser encontradas en este tejido a partir de las semanas 10 a 15 de gestación, pero será hasta la semana 24 cuando se convierte en el sitio de mayor actividad hematopoyética[8,10]. Durante la vida posnatal, las células hematopoyéticas que residen en la médula ósea se encuentran en directa asociación con el microambiente estromal en nichos especializados para mantener un estado estable (primordialmente quiescente) de las HSCs para regular su autorrenovación y diferenciación[9]. En contraste, el hígado fetal mantiene una alta frecuencia de división de las células HSCs para soportar los

requerimientos del crecimiento y desarrollo embrionario. Esto sugiere que el hígado fetal provee de un ambiente que favorece la expansión y la autorrenovación de las HSCs fetales.[11]

Los estudios del 2005 de Matthew A. Matin y Mickie Bathia[11] demostraron que el estroma de hígado fetal humano, en comparación con el estroma de médula ósea de adulto, tiene una mayor expresión de reguladores de la vía Wnt, lo que da como resultado un aumento en la proliferación y autorrenovación de las HSCs, mientras que en el estroma de médula ósea la señalización de Notch juega un papel más central en el mantenimiento de la población de HSCs en un estado de quiescencia, ya sea directamente a través de la activación por Jag1 o indirectamente por la señalización de Notch dentro del microambiente, además de mantener una expresión diferencial de factores de secreción o de unión a membrana[11].

La célula hematopoyética troncal

Como se menciona previamente, las células HSC dan lugar a todos los linajes sanguíneos y mantienen permanentemente el sistema hematopoyético adulto durante toda la vida de un individuo a través de la autorrenovación y la diferenciación, lo cual está mediado por diferentes factores extrínsecos e intrínsecos de las células HSC[10].

Algunas de las señalizaciones extrínsecas mejor descritas para regular el destino de las células HSC se describen a continuación.

En el sistema hematopoyético, la señalización de NOTCH es esencial para la generación de células madre hematopoyéticas embrionarias definitivas y controla varios pasos en el desarrollo de las células T[12]. Dependiendo del ligando de NOTCH específico, diferentes receptores de NOTCH y sus respectivos genes blanco serán activados promoviendo una respuesta celular determinada. Hasta la fecha, se han identificado cuatro receptores diferentes de NOTCH 1-4 y cinco ligandos, JAGGED1-2 y DELTA1, 3 y 4[10]. Además, otras vías de señalización interactúan con la vía NOTCH, lo que aumenta la complejidad del resultado de la señalización NOTCH. En los mamíferos, hay 4 receptores NOTCH altamente homólogos con funciones parcialmente superpuestas, lo que dificulta el estudio de las funciones de

la señalización NOTCH en la hematopoyesis[12]. Por ejemplo, la activación de NOTCH1 por Delta1 y 4 es necesaria para la diferenciación de células T mientras que inhibe la diferenciación del linaje de células B. La activación de NOTCH2 mediada por JAGGED 2 o DELTA1 inhibe la diferenciación mieloide e induce la generación de células HSC de reconstitución a largo plazo y progenitores multipotentes, y el cultivo de células HSC de sangre de cordón umbilical en solución con JAGGED1 inducen su expansión *ex vivo*. Se cree que los ligandos NOTCH que se expresan en la médula ósea circundante son fundamentales para promover el mantenimiento de las células HSC a través de la activación de los receptores NOTCH expresados en estas[10].

La vía de señalización de WNT, es iniciada con la interacción de los ligandos WNT con el complejo receptor Frizzled. En ausencia de la de los ligandos WNT, el transductor de señal β-catenina es fosforilado y rápidamente degradado, mientras que en presencia de los ligandos WNT, β-catenina se estabiliza y se transloca al núcleo con diferentes factores transcripcionales como LEF. Se sugiere que la vía WNT promueve la expansión de las células HSC[10].

El factor TGF-β y sus familiares que incluyen proteínas morfogénicas óseas y activinas han sido implicados en la regulación de la proliferación, hibernación, quiescencia y diferenciación de células HSC. La creciente evidencia sugiere que la superfamilia de TGF-β juega un papel integral en la intercomunicación intercelular entre las células HSC y su microambiente, así como dentro de las células a nivel intracelular[10].

La familia de TGF-β contiene tres isoformas en mamíferos estrechamente relacionadas: TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3. A pesar de esta alta homología de secuencia, estudios *in vivo* de *knock out* de las tres isoformas revelan diferencias sorprendentes, lo que ilustra su falta de redundancia. TGF-β1 es la isoforma más abundante que se encuentra de manera ubicua que regula un amplio rango de funciones celulares como: proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, angiogénesis y formación ósea. La principal función atribuida de TGF-β en las células HSC es la inhibición de la proliferación. Muchos estudios revelan que este

efecto se debe principalmente porque promueve la disminución de la expresión de receptores de citocinas como IL-1, GM-CSF, IL-3, G-CSF y SCF. Además, TGF-β induce el arresto del ciclo celular por medio de la sobreexpresión del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina, p57KIP2[13].

El eje de señalización CXCL12-CXCR4, es probablemente la vía mejor descrita de las células HSC. CXCR4, pertenece al grupo de receptores de quimiocinas acoplados a proteínas G, los cuales están formados por siete proteínas transmembranales cuyos principales ligandos son las quimiocinas, en el caso de CXCR4, CXCL12[14]. En la hematopoyesis adulta, CXCR4, el cual esta expresado en las células HSC, es uno de los principales mediadores de la retención de estas en la médula ósea mediante la interacción con la quimiocina CXCL12 expresada por las células del microambiente en este sitio anatómico[7]. Sin embargo, CXCL12 ha demostrado diferentes roles dependiendo de qué células se secreta. Por ejemplo, la CXCL12 de los osteoblastos mejora el mantenimiento de las células progenitoras linfoides tempranas, pero no las células HSC. Por otro lado, el CXCL12 producido por células del estroma perivascular promueve el mantenimiento y la movilización de las células HSC. Mientras que la eliminación de la expresión de CXCL12 en células mesenquimales troncales (MSC, por sus siglas en inglés: *Mesenchymal Stem Cell*) positivas a nestina reduce notablemente la presencia de las células HSC en la médula ósea[15].

El factor SCF, al igual que CXCL12, es una proteína muy importante para la retención de las células HSC, las cuales expresan ricamente su receptor c-Kit, activando las vías src, PI3K, Ras-Raf-MAPK y JAK/STAT [7,15].

Los interferones son citocinas inflamatorias que de forma canónica se liberan en respuesta a patógenos como virus y bacterias, sin embargo, existe evidencia que sugiere que tienen un papel importante durante el desarrollo hematopoyético embrionario. En modelos de pez cebra, el *knock out* del ortólogo para el receptor de ING-γ demuestran una reducción importante de las células HSC emergentes de la pared dorsal de la aorta, mientras que el *knock down* del mismo receptor disminuye la expresión de Runx1. En cambio, en la hematopoyesis adulta, el papel del ING-γ

ha sido muy controversial. Estudios in vitro en células humanas reportan que ING-γ tiene un efecto supresor en las células HSPC pero que en sinergia con otros factores como IL-3, IL-6, EPO e IL-1B pueden estimular la proliferación de las células HSPC. Una de las primeras pruebas in vivo que demuestran que los interferones podrían afectar el compartimento progenitor hematopoyético adulto surgió en un informe que estudia la infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica en ratones. Los autores observaron que la infección por el virus causaba el agotamiento de los progenitores hematopoyéticos y demostraron que la aplasia en la médula ósea después de la infección no ocurría en ratones que carecían de ambos receptores de IFN-α/β[16].

El factor TNF-α es una de las citocinas proinflamatorias más estudiadas con funciones centrales en la inmunidad de los mamíferos y la homeostasis celular. El TNF-α es un ligando de muerte inducido tras la infección que puede provocar dos tipos de muerte celular programada: apoptosis y necrosis. El destino de una célula expuesta al TNF-α depende del contexto celular, en particular del estado de ubiquitinación de la enzima serina-treonina-quinasa1 que interactúa con el receptor de TNF-α. Cuando la enzima serina-treonina-quinasa1 se encuentra poliubiquitinada promueve la supervivencia mediante la activación de la vía NF-kB, mientras que si la enzima serina-treonina-quinasa1 no está ubiquitinada junto con la ablación de la proteína inhibidora de apoptosis cIAP y la caspasa 8 activa, se promoverá apoptosis. Por último, si en las células donde las caspasas están inactivadas, la enzima serina-treonina-quinasa1 fosforila a la enzima serina-treonina-quinasa3, resulta en ejecución de la necrosis[16,17]. En el trabajo publicado por Emmanuelle Passegué comprueban que TNF-α actúa de manera diferencial en las células HSC y HSPC, activando NF-kB promoviendo la proliferación y diferenciación mieloide[17].

El microambiente hematopoyético adulto

En mamíferos, la hematopoyesis ocurre principalmente en la médula ósea. Aquí, las células que conforman la médula regulan dinámicamente el destino de las células HSPC, previendo de distintas señales como se menciona anteriormente. La médula

ósea es un sistema celular altamente complejo. Los principales componentes celulares del nicho de las células HSPC se describen a continuación.

Las células endosteales, las cuales son células tubulares que forman una interfaz entre el hueso y la médula ósea que se cree se diferencian a partir de las células MSC. Estas células son las encargadas de regular el tamaño de la población de las células HSPC, regulando su estado de quiescencia mediante la producción de CXCL12, Angiopoyetina-1, trombopoyetina, osteopontina e inhibiendo la expresión de ligandos de WNT[7,10].

Las células endoteliales, secretan una gran variedad de citocinas y factores que regulan el estado proliferativo y de diferenciación de las células HSPC. Por ejemplo, E-selectina, regula negativamente la quiescencia de las células HSPC; CXCL12 y SCF también son producidos por las células endoteliales[7,10].

Luego tenemos al conjunto de células perivasculares, en las que se encuentran las células reticulares ricas en CXCL12, las MSC y los pericitos. Estos expresan factores como CXCL12 y VCAM-1 los cuales retendrán en la médula ósea a las células HSPC. Las células MSC, son células estromales positivas a CD146, CD105 y CD51 capaces de soporte a la hematopoyesis y de autorrenovación con el potencial de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Otro componente perivascular importante son las células del sistema nervioso simpático las cuales regulan la expresión de citocinas en los demás componentes celulares[7,10].

Los adipocitos y su enriquecimiento en la médula ósea este asociado a una disminución en la proliferación de las células HSC y a procesos de senescencia[7,10].

Finalmente, la hipoxia, es un componente del microambiente extrínseco, el cual se ha observado incrementa la expresión de CXCL12 en el nicho endosteal promoviendo el tráfico de las HSPC a la médula ósea. También se ha comprobado que el factor inducible por hipoxia (HIF, del inglés: *Hypoxia Inducible Factor*) induce directamente de CXCL12 y regula el metabolismo de las HSPC hacia un estado anaeróbico. Se ha comprobado que la deleción de HIF1-α causa promueve el

agotamiento de las células HSPC. Adicionalmente, se sugiere que el estado hipóxico del nicho hematopoyético protege a las células HSC del estrés oxidativo reduciendo el daño al ADN[10].

Leucemia pediátrica

De acuerdo con los comunicados de prensa otorgados por el INEGI y la Secretaría de Salud del Gobierno de México[18,19], se estima que al año se presentan entre cinco y seis mil casos nuevos de cáncer en menores de 18 años de los cuales 50 % de éstos serán leucemias. Las leucemias linfoblásticas agudas representan tres cuartas partes de los casos de las cuales aproximadamente el 80% son de progenitores de células B. La leucemia es ligeramente más frecuente en varones con una proporción de 55%, y el mayor pico de incidencia sucede entre las edades de 2 a 5 años[4].

La leucemia linfoblástica aguda de linaje pre-B es uno de los subtipos de leucemia que más afecta a la población infantil mexicana. Este cáncer se caracteriza por precursores linfoides de la médula ósea que adquieren alteraciones genéticas secuenciales, lo que resulta en una maduración interrumpida y una proliferación incontrolable[20].

La leucemia infantil es una enfermedad del desarrollo de origen multifactorial. Un elemento clave para comprender la fisiopatología de la leucemia es el contexto microambiental en el que se desarrolla. El componente celular del microambiente en la médula ósea consiste en las células sanguíneas tanto precursoras como su progenie, así como de las células estromales, que forman la matriz extracelular, los vasos sanguíneos, y osteoblastos en la región más próxima al hueso. Todas estas células actúan en concierto mediante moléculas de adhesión y secreción de factores solubles, que, aunados a las señales sistémicas provenientes de la sangre, determinarán el destino de ambos procesos hematopoyéticos y leucémicos. [7]

La leucemia, y en general cualquier neoplasia, transcurrida en la infancia es esencialmente una enfermedad del desarrollo, ya que, a diferencia de un cáncer iniciado en la adultez, aún no se ha llevado a cabo una considerable acumulación

de eventos oncopromotores. Poco se sabe en cuanto a la ontología de la leucemia pediátrica, no obstante, se ha propuesto que la leucemia tiene un origen prenatal.

Greaves y colaboradores en 1993[21], proponen el modelo de los dos hits, en dicho modelo se sugiere que la leucemia infantil tiene un origen prenatal donde ocurren las primeras lesiones genéticas y con ello surgen las primeras clonas preleucémicas, las cuales permanecerán silentes hasta el momento en que un segundo evento resulte en las condiciones necesarias para la aparición clínica de la enfermedad. La evidencia que sustenta el modelo se dio al estudiar gemelos monocigóticos con leucemia, los cuales contenían la misma traslocación cromosómica en el mismo punto de quiebre. Esta fue la primera evidencia que sugería que la alteración genética debía aparecer previo al nacimiento. Estudios posteriores recaudaron información sobre más casos de gemelos monocigóticos los cuales, a pesar de tener las mismas alteraciones cromosómicas de alto riesgo para LLA y otros tipos de leucemia, presentaban la enfermedad a diferentes edades, desde meses hasta 9 años posterior al primer hermano diagnosticado[6,22–24]. Adicionalmente, estudiaron una serie de muestras de sangre proveniente del tamiz neonatal de pacientes con LLA para corroborar que las alteraciones con origen prenatal también se presentaban en hijos únicos. No sorprendentemente, dichos estudios confirmaron los hechos observados en gemelos. Las muestras de sangre que habían sido tomadas de los pacientes con LLA que habían sido tomadas al nacer contenían las mismas alteraciones cromosomales que al diagnóstico[6,22–24].

Por otro lado, otra bondad del estudio con gemelos monocigóticos es que permitió estudiar las alteraciones secundarias diferenciales de ambos hermanos. Dichas alteraciones fueron principalmente alteraciones en el número de copias y variaciones de un solo nucleótido. Lo cual refleja que hay una evolución subclonal independiente y divergente posnatal entre hemanos[22]. Finalmente, se estudió la prevalencia de alteraciones cromosomales asociadas a la leucemia (por ejemplo, AML1-ETO) en sangre de cordón umbilical de donantes sanos determinó que en células de linaje linfoide y mieloide la prevalencia de este tipo de traslocaciones era hasta 100 veces mayor que el riesgo de padecer leucemia, es decir,

aproximadamente el 1 % de los recién nacidos tiene una población preleucémica putativa con una probabilidad del 99 % de que dichas clonas preleucémicas originadas durante el desarrollo fetal nunca progresen a LLA[22,24–26].

Hematopoyesis e inflamación

La inflamación, es un proceso fisiológico el cual es crucial para la resolución de enfermedades infecciosas y reparación de tejidos mediante una respuesta inflamatoria aguda, la cual suele estar autolimitada. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que la inflamación crónica puede promover la carcinogénesis induciendo evasión inmune y favoreciendo la selección de clonas oncogénicas[27].

La hematopoyesis, tanto fetal como adulta, es un proceso dinámico y atento a las distintas exigencias por las que vive nuestro organismo. Las HSCs y su progenie son capaces de modular su proliferación, diferenciación y migración mediante señales inflamatorias. Un ejemplo claro es la hematopoyesis de emergencia (HE)[28]. Durante la HE las células hematopoyéticas troncales y progenitoras responden a las citocinas excretadas de manera periférica o local, o mediante la detección de patrones moleculares asociados a patógenos, tales como lipopolisacáridos (LPS, del inglés: *lipopolysaccharyd*), flagelina, lipoproteínas, así como patrones moleculares asociados a daño como fragmentos de ADN, matriz extracelular, ATP, histonas, etc. Ambos tipos de patrones moleculares serán reconocidos por el componente celular del nicho hematopoyético que exprese receptores de patrones de reconocimiento. Se sabe que las HSCs expresan dichos receptores[29].

La detección de este tipo de moléculas se da principalmente durante infecciones agudas de origen bacteriano o viral, y permite adaptar la producción celular para satisfacer la mayor demanda de células del sistema inmune. La HE principalmente promueve la producción de células de inmunidad innata. Es importante entender cómo el sistema hematopoyético responde a este tipo de componentes moleculares ya que se ha propuesto que la exposición anticipada a infecciones o la respuesta anormal inmune de infecciones comunes durante la etapa perinatal podría tener implicaciones en la aparición de neoplasias hematológicas[29].

Para demostrar el papel fundamental del microambiente para el surgimiento, mantenimiento y progresión de la leucemia, tenemos, por ejemplo, los experimentos de Zambetti y colaboradores de 2016, donde demuestran que Células Troncales Mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés: *Mesenchymal Stem Cell*) de pacientes con síndromes preleucémicos promueven daño genotóxico a las células HSCs por medio de la excreción de DAMPs (Patrones moleculares asociados a daño, por sus siglas en inglés: Damage Associated Molecular Patrons) expresados de manera aberrante, promoviendo la transformación maligna de aquellas HSCs con predisposición genética[30].

Estudios del microambiente en la médula ósea indican que tanto las HSCs como las células troncales leucémicas (LSC, por sus siglas en inglés: *Leukemic Stem Cell*, la homóloga cancerígena de las células HSC) residirán en un nicho que sea favorable para la troncalidad de la población, esto es, en condiciones favorables para células en estado quiescente. Estos nichos se tienen caracterizados como microambientes hipóxicos, ricos en CXCL12, SCF, Angiopoyetina-1, CXCL4, entre otras moléculas. Conforme la célula HSC, así como la célula LSC, se diferencian y van adquiriendo compromiso hacia algún linaje, estas células residirán preferiblemente en un ambiente más normóxico y menos abundante en SCF, CXCL12, pero con mayor disponibilidad de EPO, G-SCF, ANGPT1, OPN, IL-7 y VCAM1[7,31].

Secuenciación de ARN de célula única

La secuenciación de ARN permite generar un perfil de los transcritos en una muestra el cual ganó gran popularidad durante los años 2000, remplazando progresivamente otras tecnologías como los microarreglos[32].

Típicamente, la secuenciación de ARN se realiza en muestras con una mezcla de tipos celulares, comúnmente conocido con el anglicismo "*bulk-RNA-seq*", el cual permite caracterizar el perfil transcripcional entre un tejido o muestra bajo diferentes condiciones, sin embargo, la secuenciación *bulk-RNA* solo permite estimar un promedio en los niveles de expresión de cada gen en una población de células, sin considerar la heterogeneidad de la expresión génica entre las células individuales de una misma muestra, convirtiéndose en una herramienta insuficiente para analizar

sistemas complejos como el sistema nervioso central. Para superar estas limitaciones, surgieron nuevos protocolos que permitieron aplicar la secuenciación de ARN con resolución de célula única (scRNA-seq, por su anglicismo, *single cell RNA sequencing*)[32].

Entre muchas otras metodologías, resalta la de 10X genomics de Chromium™ cuya principal ventaja es que puede registrar el mayor número de células por muestra en un mismo tubo de reacción, el cual utiliza un sistema de fluidos para encapsular células individuales en gotas, las cuales funcionan como micro reactores donde se realiza la RT-PCR, y la formación de las librerías sobre una perla etiquetada con un oligonucleótido de secuencia única de 16 pares de bases, conocido como código de barras para la identificación de cada célula, un "identificador molecular único" (UMI, por sus siglas en inglés: *Unique Molecular Identificator*) de 10 pares de bases, el cual permitirá identificar cuántas lecturas detectadas durante la secuenciación provienen de un mismo mensajero y un oligonucleótido poli-T para la captura de los RNA mensajeros[33].

Análisis estándar de los datos de secuenciación de RNA de célula única

Al igual que los datos de secuenciación de "*bulk-RNA-seq"*, los datos crudos de secuenciación de célula única estarán en un archivo o archivos "*.fastq"* los cuales requieren ser preprocesados antes de poder extraer información para el análisis de los datos.

Los datos de secuenciación de los experimentos scRNA-seq, primero deben ser converidos en una matriz de valores de expresión, que usualmente contiene el número de UMI's de cada gen para cada célula[34]. Existen varios programas para generar la matriz de conteo, como CellRanger®, Kallisto-Bustoos, MK3, dropEst, entre otros que funcionan con los principales sistemas operativos (GNU/Linux, Windows, IOS). Aunque cada programa sigue su propio algoritmo de análisis, todos mantienen el mismo principio. Las lecturas del archivo de secuenciación se alinean a un genoma de referencia de cDNA y posteriormente cuenta el número de UMI's mapeados para cada gen. CellRanger® de 10X Genomics® es uno de los programas más utilizados para la generación de la matriz de conteo, que además

tiene otras funciones para el preprocesamiento de los datos, aunque su principal desventaja es su alta demanda de memoria RAM; el requerimiento mínimo recomendado es de 120 Gb, pudiendo necesitar mucho más dependiendo del tamaño de los datos. En general, este es un paso lento, y computacionalmente muy demandante independientemente del programa de elección. Es por ello, que la mayoría de los repositorios de datos de secuenciación de célula única permiten tener acceso a los datos crudos o bien a las matrices de conteo[35].

El siguiente paso en el flujo de trabajo, es el control de calidad de la muestra. Es importante eliminar células de baja calidad ya que las librerías de baja calidad pueden generar sesgos en el agrupamiento celular causado por el perfil transcripcional de daño creando estados o trayectorias intermediarios artificiales. Realizar un correcto control de calidad en los datos permitirá eliminar la mayor cantidad de ruido durante el análisis.

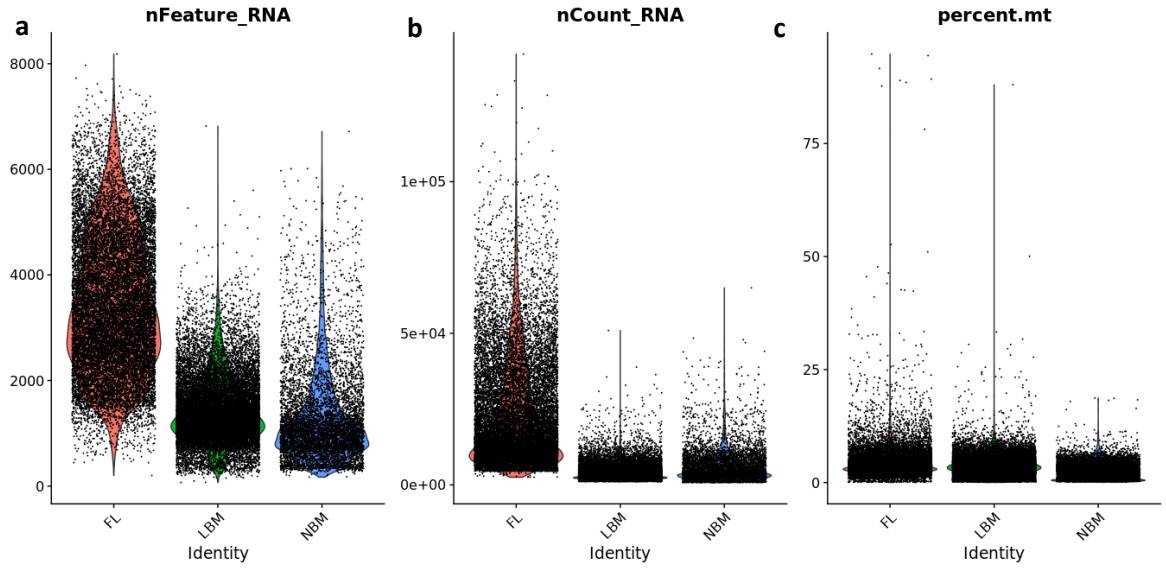


*Fig. 2 / Métricas comunes para control de calidad para el análisis de scRNA-seq. Observamos tres tipos de gráficos **a**, el conteo total de genes; **b**, el conteo total lecturas y **c**, el porcentaje de genes mitocondriales, de cada célula correspondiente a cada muestra.*

Las métricas para el control de calidad usualmente incluyen el número de conteo de lecturas, el número de conteo de genes y el porcentaje de genes mitocondriales por

célula. Se deben eliminar las perlas vacías o dobletes/tripletes/multipletes. Normalmente se genera un gráfico con número de UMI's contados en función de los códigos de barras o células; y se calcula el punto de inflexión para encontrar la proporción óptima entre células y UMI's, este gráfico se conoce popularmente como "de rodilla". La aproximación más fácil para realizar el control de calidad es eliminando de forma manual aquellas células con un tamaño de librería baja fuera del umbral inferior de la media, dado por la desviación estándar, sin embargo, la elección correcta del valor del umbral requiere mucha experiencia[35]. Otro parámetro importante que considerar durante el control de calidad es el porcentaje de genes mitocondriales contados por célula. Una célula con un porcentaje alto de genes mitocondriales puede significar que era una célula no viable en proceso de muerte celular. Usualmente se considera como límite superior 5-10 % de genes mitocondriales. [34,36] Algunos de los programas más populares para el control de calidad son Seurat, SingleCellExperiment, Pagoda2 y Scanpy.

Otros factores para considerar, dependiendo de los datos utilizados y el objetivo del investigador es el estado del ciclo celular ya puede generar gran heterogeneidad dentro de una misma población de células, es por ello que puede elegirse hacer una corrección para minimizar este efecto;[37] y el efecto por lotes o "*batch effect*" el cual debe corregirse si se utilizan datos de diferentes fuentes o con diferentes técnicas utilizadas para minimizar la heterogeneidad causada por diferencias técnicas. Algunos programas utilizados para la corrección por lotes son Conos y Harmony. [34,36]

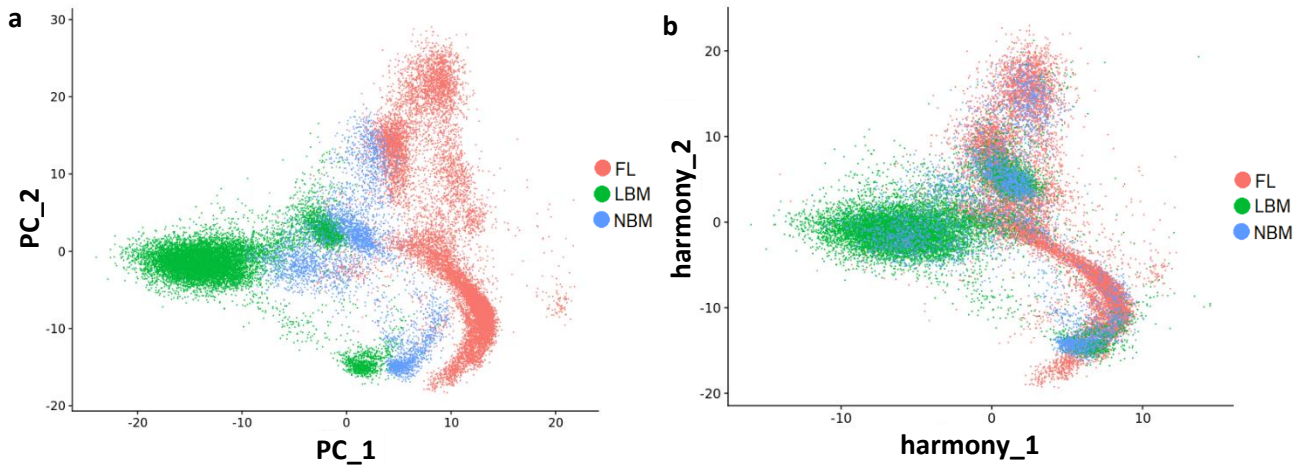


Fig. 3 / Visualización de la reducción dimensional de los datos de los dos primeros componentes principales en el análisis de scRNA-seq. a, sin corrección por lotes; b, con corrección por lotes utilizando el programa Harmony.

El siguiente paso en el análisis de datos de scRNA-seq es la normalización. La diferencia en el número total de UMI's contados entre cada célula puede deberse a factores técnicos más que a variaciones biológicas. La normalización es un paso crucial para revelar la verdadera heterogeneidad biológica en los datos. El número de UMI's o de las lecturas de todas las células se pueden normalizar dividiendo esos valores por el factor de tamaño, el cual es una estimación de cuánta variación en la profundidad de secuenciación o la eficiencia de captura de ARN afecta la cuantificación general de la expresión génica en una célula[34,35]. Seurat implementa un método de normalización de escala global "*LogNormalize*" que normaliza las medidas de expresión génica de cada célula por la expresión total, lo multiplica por un factor de escala (10.000 de forma predeterminada) y transforma el resultado en logaritmo.

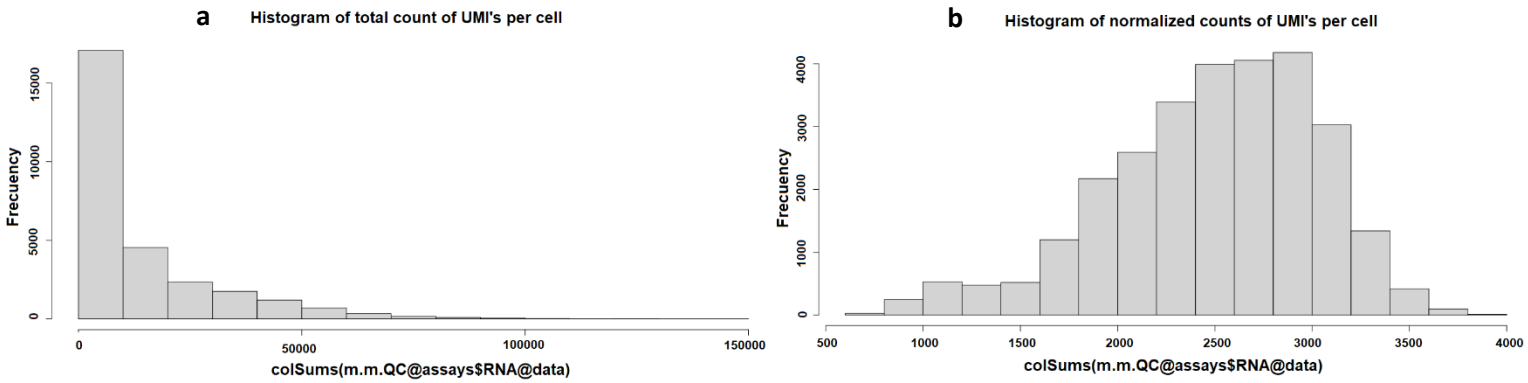


Fig. 4 / Visualización del conteo total de UMI's antes y después de normalizar en el análisis de scRNA-seq. Se grafica la frecuencia de células con función en el conteo total de UMI's ***a,*** *antes de normalizar;* ***b,*** *normalizado usando la función "LogNormalize" del paquete Seurat.*

Después de la normalización, es requerido identificar los genes con mayor variabilidad para posteriormente usar estos para la reducción dimensional.

La reducción dimensional se define como resumir un gran conjunto de variables con un conjunto más pequeño de variables, conservando la mayor cantidad de información posible. El método de reducción de dimensionalidad más común para scRNA-seq es el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés: *Principal Component Analysis*), que crea una combinación lineal de genes que capturan mejor la varianza en los datos[34]. Una vez hecho el PCA, se debe elegir un número de dimensiones o PC's (PC's, por sus siglas en inglés: *Principal Components*) significativos para continuar con el análisis. En la mayoría de los casos simplemente establecerán un valor "razonable" pero arbitrario, que suele oscilar entre 10 y 50 PC's. Esto suele ser satisfactorio, ya que los PC's posteriores explican tan poca variación que su inclusión u omisión no tiene un efecto importante. Para realizar esto, se puede apoyar de un gráfico conocido comúnmente como de "codo" en el cual se grafica el porcentaje de varianza explicada por cada PC en el conjunto de datos, que se muestra en una escala logarítmica[35].

A continuación, se procede con el agrupamiento o clusterización de las comunidades celulares. En Seurat, el agrupamiento más popular es basado en

gráficos ya que es una técnica flexible y escalable para agrupar grandes conjuntos de datos de scRNA-seq. Primero se construye un gráfico utilizado los datos de la primera reducción dimensional, donde cada nodo es una célula que está conectada a sus vecinos más cercanos en el espacio de alta dimensión (el número de PC's seleccionados). Los bordes se ponderan en función de la similitud entre las células involucradas, con un mayor peso dado a las células que están más estrechamente relacionadas[34–36]. Luego se aplican algoritmos para identificar "comunidades" de células que están más conectadas a células de la misma comunidad que a células de diferentes comunidades. Los gráficos de reducción dimensional usualmente utilizados para este paso son el UMAP (del inglés: *Uniform Manifold Aproximation and Projection*) y t-SNE (del inglés: *t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*). La mayor diferencia UMAP en comparación con t-SNE es el equilibrio entre la estructura local y global que representan: UMAP a menudo es mejor para preservar la estructura global en la proyección final. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, debido a que UMAP y t-SNE necesariamente deforman la alta dimensión de los datos cuando se proyecta a dos o tres dimensiones, cualquier eje o distancia en dimensiones más bajas no se puede interpretar directamente[38].

Una vez que se genera la clusterización, se puede optar por identificar los genes que se expresan diferencialmente en cada clúster. Estos marcadores permiten asignar un significado biológico a cada grupo en función de su anotación funcional. Posteriormente, si se cuenta con suficiente información bibliográfica uno puede generar la anotación de las poblaciones celulares. Sin embargo, examinar manualmente las listas de genes marcadores puede llevar mucho tiempo y requiere conocimiento y mucha experiencia del sistema biológico que se está estudiando[34]. Otra forma de realizar la anotación de las identidades celulares realizando una propagación de etiquetas utilizando programas como SingleR y un conjunto de datos de referencia. SingleR asigna etiquetas a las células en función de las muestras de referencia con las correlaciones de rango de Spearman más altas, utilizando solo los genes marcadores entre pares de etiquetas para centrarse en las diferencias relevantes entre los tipos de células. También realiza un paso de ajuste

fino para cada célula donde las correlaciones se vuelven a calcular solo con los genes marcadores para las etiquetas de mayor puntuación. Esto tiene como objetivo resolver cualquier ambigüedad entre esas etiquetas eliminando el ruido de los marcadores irrelevantes de otras etiquetas[35].

Una vez identificadas las poblaciones presentes en los datos de scRNA-seq dependiendo de las necesidades del investigador se puede proceder a una gran variedad de análisis como expresión diferencial entre poblaciones celulares provenientes de diferentes muestras, análisis de trayectoria, muy útiles para diferenciación celular y desarrollo, predicción de interacciones celulares, inferencia de redes regulatorias entre poblaciones celulares entre probablemente muchas otras aplicaciones que se desarrollan constantemente.

Justificación

La leucemia infantil es un problema de salud pública en México, América Latina y el mundo. Muchos factores genéticos y ambientales potencialmente influyen en su aparición, aunque hasta la fecha ningún estudio ha podido comprobar una causalidad directa, únicamente correlacionar su incidencia con la exposición a algunos agentes tóxicos. La generación de modelos teóricos y experimentales para conocer los componentes microambientales durante la gestación que potencialmente cooperan en la leucemogénesis temprana desde etapas prenatales, es de alta relevancia para el conocimiento y la intervención de esta enfermedad.

Hipótesis

Un microambiente hematopoyético proinflamatorio durante el periodo pre- y peri-natal podría contribuir al daño de la diferenciación normal y el establecimiento de clonas preleucémicas.

Objetivos

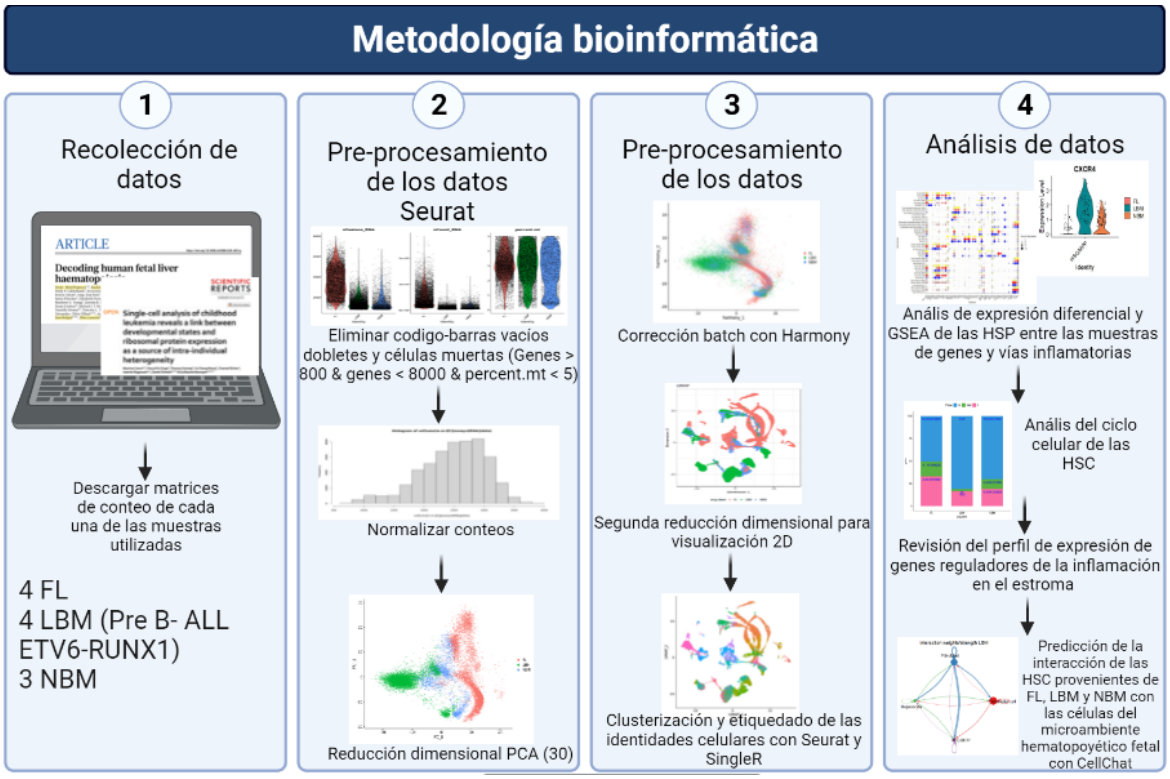
General: Investigar los componentes biológicos y moleculares del microambiente hematopoyético fetal que potencialmente facilitan la leucemogénesis bajo condiciones inflamatorias.

Específicos:

- Caracterizar el perfil inflamatorio expresado por las células de soporte y por las HSCs durante la hematopoyesis fetal.
- Determinar qué factores inflamatorios durante la hematopoyesis fetal podrían promover procesos oncogénicos.
- Evaluar velocidad de proliferación de las líneas celulares Nalm6 y RS4;11 en cocultivos tridimensionales de estroma perinatal (estroma de cordón umbilical), bajo el estímulo proinflamatorio de LPS.

Materiales y métodos

Análisis de transcriptómica de célula única



Recolección de datos

Los datos de transcriptómica de célula única fueron obtenidos de dos trabajos experimentales independientes[20,39] utilizando la plataforma Chromium single-cell-chemistry v2(*10X Genomics*®) . Los datos de transcriptómica fueron descargados en los archivos de matriz de conteo con el código de acceso otorgado por los autores de las bases de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (*EMBL*®)[39] y del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*NCBI*®)[20].

Se descargaron cuatro muestras de hígado fetal del primer trimestre de gestación, cuatro muestras de aspirado de médula ósea pediátrica con traslocación ETV6-RUNX1 al diagnóstico y tres muestras de aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos en los que se descartó la leucemia, utilizadas como el control de normalidad. Los ID, datos adicionales de las muestras y códigos de acceso están resumidos en el recurso suplementario *Script 3*.

Preprocesamiento y procesamiento de los datos

> Las matrices de datos fueron leídas con el paquete Seurat(*Satija-Lab*®)[40] para R(*R Project*®) siguiendo las recomendaciones de los desarrolladores.

>Se realizó un filtro de control de calidad considerando inviables a las células cuya proporción de genes mitocondriales superaron el 5 % del total de transcritos.

>Se normalizaron los conteos de UMIs (del inglés: *Unique Molecular Indentifier*) con el método “LogNormalize”.

>Se identificaron los 2000 genes con mayor variabilidad génica por dispersión del número de conteos de cada UMI.

>Se hizo la reducción dimensional por PCA (del inglés: *Principal Component Analysis*). Para determinar que fuesen los primeros 30 PCAs como representativos, se tomó un valor arbitrario del gráfico de codo calculado (véase el recurso suplementario *Script 5*).

>Se realizó la corrección por lotes utilizando el programa Harmony (*Korsunsky, et al.*)[41] para posteriormente generar los mapas de reducción dimensional UMAP (del inglés: *Uniform Manifold Aproximation and Projection*) y t-SNE (del inglés: *t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*), todo esto siguiendo las indicaciones del desarrollador.

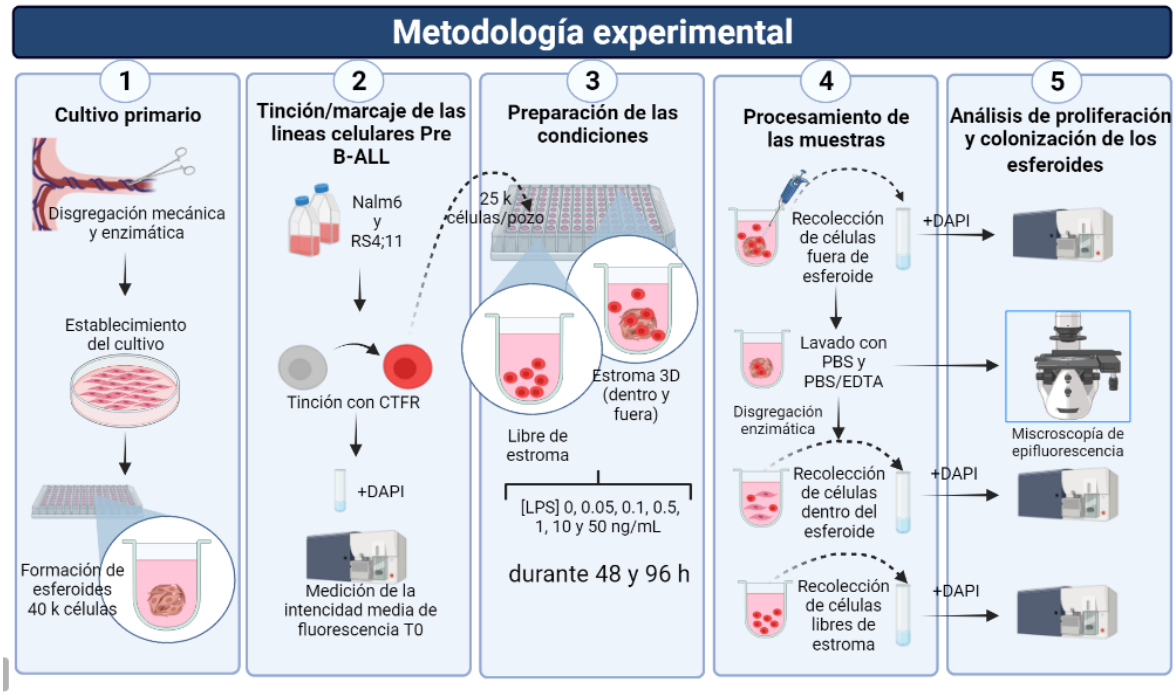
>Se generó el agrupamiento y el etiquetado de las identidades celulares con el programa SingleR (*Bioconductor*®), propagando un etiquetado a partir de una referencia confeccionada con base en *Popescu, et al., 2019*[39], con las identidades celulares otorgadas por los autores de las muestras de hígado fetal (véase el recurso suplementario *Script 4*).

>Se hizo el análisis de expresión diferencial (véase el recurso suplementario *Script 5*) con el paquete Seurat(*Satija-Lab*®)[40] para R(*R Project*®) siguiendo las recomendaciones de los desarrolladores.

>Se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos génicos con el paquete Seurat(*Satija-Lab*®)[40] para R(*R Project*®) siguiendo las recomendaciones de los desarrolladores (véase el recurso suplementario *Script 6*)

>Se identificó la fase del ciclo celular en la que estaba cada célula con el paquete Seurat(*Satija-Lab*®)[40] para R(*R Project*®) siguiendo las recomendaciones de los desarrolladores (véase recurso suplementario *Script 7*).

>Se realizó la predicción de interacciones célula-célula con el paquete CellChat (*Jin, et al., 2021*)[42] para R(*R Project*®) (véase recurso suplementario *Script 8*).



Líneas celulares

Líneas celulares humanas de leucemia linfoblástica aguda pre-B: RS4;11 y Nalm6, fueron cultivadas en una densidad de 500x10^3 cel/mL en medio RPMI (REF:72400-047) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de solución penicilina y estreptomicina (REF: 15140-122).

Cultivos primarios de estroma de cordón umbilical

Las muestras de cordón umbilical fueron obtenidas de individuos nacidos por cesárea con el fin de garantizar la esterilidad de las muestras obtenidas. Estas

fueron transportadas en tubos de centrifuga de 50 mL estériles con 10 mL de PBS y procesadas inmediatamente o máximo 24 h posterior al nacimiento de la siguiente forma:

1. Las muestras fueron lavadas consecutivamente con PBS para eliminar restos de sangre y coágulos.
2. Con material quirúrgico estéril se diseccionó una porción de placenta de aproximadamente 2 cm^2 y 1 cm de longitud del cordón.
3. Posteriormente, se disgregó manualmente con tijeras quirúrgicas el cordón umbilical sobre una placa de 3 cm de diámetro cada uno.
4. El cordón fue digerido con colagenasa durante 15 min. Posteriormente se inactivó con medio con SFB y se colocaron los pequeños fragmentos de tejido sobre pozos de una placa de 24 pozos con 500 µL de medio MEM-Alpha suplementado con 10 % de SFB y 2 % de solución de penicilina y estreptomicina.
5. Se incubaron en condiciones estándar, 37 °C, 5 % de saturación de CO_2 a presión atmosférica.
6. A los tres días fueron retirados los pedazos de tejido de las placas de 24 pozos y se cambió el medio en ese momento y de forma consecutiva aproximadamente cada 3 días. Se verificó constantemente que no hubiera contaminación por bacterias o levaduras.
7. Cuando los pozos llegaron a confluencia se hizo el primer pase a una placa de 3 cm de diámetro. Posteriormente se expandió el cultivo dependiendo de la velocidad de crecimiento de las células.
8. Cuando se dejaron de observar detritos celulares o eritrocitos en el cultivo, es decir, una monocapa limpia de células, se cambió la concentración de antibiótico al 1 %.

Cultivos tridimensionales basados en esferoides de estroma

Se cultivaron 40000 células estromales por pozo en placas de 96 pozos en condiciones no adherentes, es decir, pozos redondos recubiertos de agarosa al 1 %, en un volumen de 100 µL del medio de cultivo completo MEM-alpha.

Después de 48 h en estas condiciones se formaron los esferoides que se identificaron por microscopía óptica.

Ensayos de proliferación en cultivo tridimensional

Las líneas celulares Nalm6 y RS4:11 fueron teñidas con el colorante CellTrace Far Red™ (CTFR) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se registró la intensidad de fluorescencia para el tiempo cero (T0). Posteriormente se sembraron 25k células de cada línea celular por esferoide al momento en que se adiciona el tratamiento de LPS (control, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10 y 50 ng/mL) en medio convencional. Se cuantificó la proliferación de las células teñidas a las 48 y 96 h, libres de estroma, del interior y exterior del esferoide por citometría de flujo con el indicador CTFR y el marcador de viabilidad DAPI (5 µL/tubo, agregados al momento de la adquisición a [1µg/mL]). Las células fuera del esferoide se recuperaron por pipeteo, mientras que las células dentro del esferoide se obtuvieron después de dos lavados con PBS y uno con PBS/EDTA al 0.5 M seguido de una disgregación enzimática con TrypLE™ Previo a la disgregación enzimática se realizó el registro fotográfico de los esferoides colonizados por las células leucémicas.

Se evaluó la cantidad de células leucémicas que colonizaron los esferoides utilizando el programa ImageJ para calcular el valor medio de iluminación de los pixeles en cada fotografía, el valor de densidad integrado (IntDen) (sumatoria del valor de iluminación de cada píxel), el área aproximada del esferoide en pixeles y el valor medio de iluminación de fondo. Posteriormente se calculó el valor corregido de densidad integrada (CIntDen) con la siguiente fórmula:

$$CIntDen = (IntDen)-(Area * Media_fondo)$$

Posteriormente, los valores de CIntDen fueron comparados entre los grupos muestrales: las diferentes concentraciones LPS y como segunda variable el tiempo de cultivo o el tipo de línea celular, RS4;11 o Nalm6 usando la prueba no paramétrica Scheirer–Ray–Hare en R (Ver script 1). EL valor p con significancia estadística se consideró menor o igual a 0.05.

A continuación, a partir de los valores medios de fluorescencia del T0, 48 y 96 h obtenidos por citometría de cada tratamiento, se ajustaron los valores obtenidos a una curva exponencial en Excel para obtener el valor de la constante de disminución de la fluorescencia de CTFR, el cual disminuye proporcionalmente de acuerdo con el número de divisiones celulares, es decir, el valor de la constante será inversamente proporcional al valor de la constante de división celular o proliferación. Una vez obtenidos los valores de las constantes para cada grupo muestral, se evaluaron las diferencias usando la prueba no paramétrica Scheirer–Ray–Hare en R (Ver script 2). El valor p con significancia estadística se considera cuando es igual o menor a 0.05.

Resultados y discusión

Análisis del estado proinflamatorio de la hematopoyesis fetal, leucémica y normal pediátrica por transcriptómica de célula única

A partir del procesamiento de los datos libres de transcriptómica de célula única de cuatro muestras de hígado fetal (FL, del inglés: *Fetal Liver*) del primer trimestre de gestación, cuatro de aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda pre-B (LBM, del inglés: *Leukemic Bone Marrow*) con traslocación cromosomal t(12;21) (p13;q22) y tres de aspirado de médula ósea de pediátricos normales (NBM, del inglés: *Normal Bone Marrow*) se infirió el perfil inflamatorio de 12,535, 11,767 y 3,965 células hematológicas de FL, LBM y NBM respectivamente.

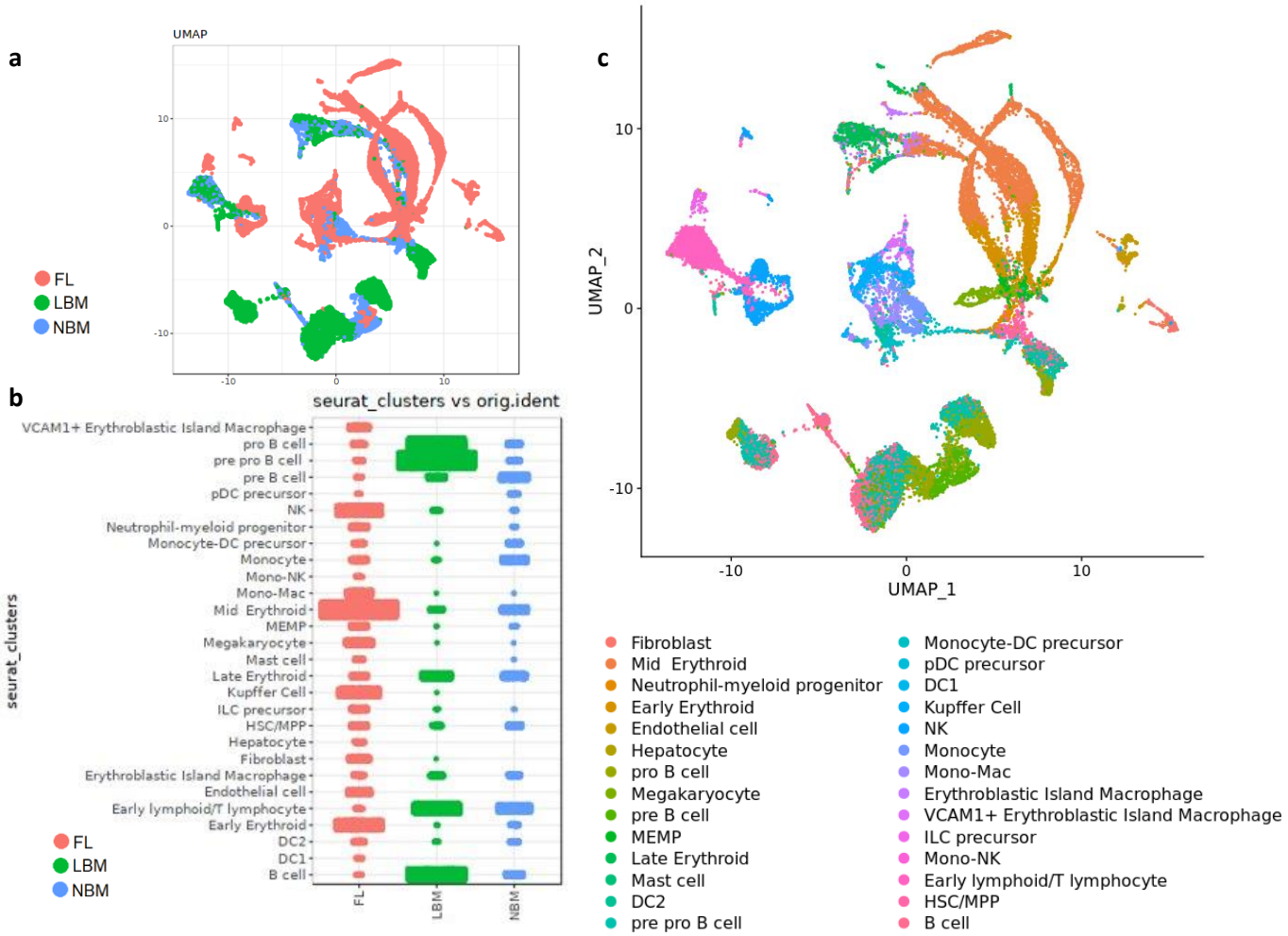


Fig. 5 / Mapa transciptómico de célula única de la hematopoyesis fetal, leucémica pediátrica y normal pediátrica. a, *Visualización UMAP integrada por color de las células hematológicas del FL, LBM y NBM.* ***b,*** *Número de células de cada identidad celular por*

grupo muestral. Para ver el valor numérico absoluto ver archivo suplementario 6. ***c,*** *Visualización UMAP de las identidades celulares encontradas por transcriptómica de célula única en FL (rosa), LBM (verde) y NBM (azul).*

De los cuales se establecieron veintiocho poblaciones celulares por medio de la propagación de identidades celulares a partir de una referencia etiquetada manualmente con las identidades proporcionadas por los autores del artículo “Decoding human fetal liver haematopoiesis” usando SingleR (Fig. 5c y recurso suplementario *Archivo 7*). La proporción de células de cada identidad varía entre los grupos muestrales (Fig. 5b). El hígado fetal está altamente enriquecido con progenitores tempranos y medianos eritroides y células NK principalmente, también es el único grupo muestral en el que se obtuvieron células endoteliales y fibroblastos. La muestra de médula ósea leucémica esta superpoblada por células de linaje B.

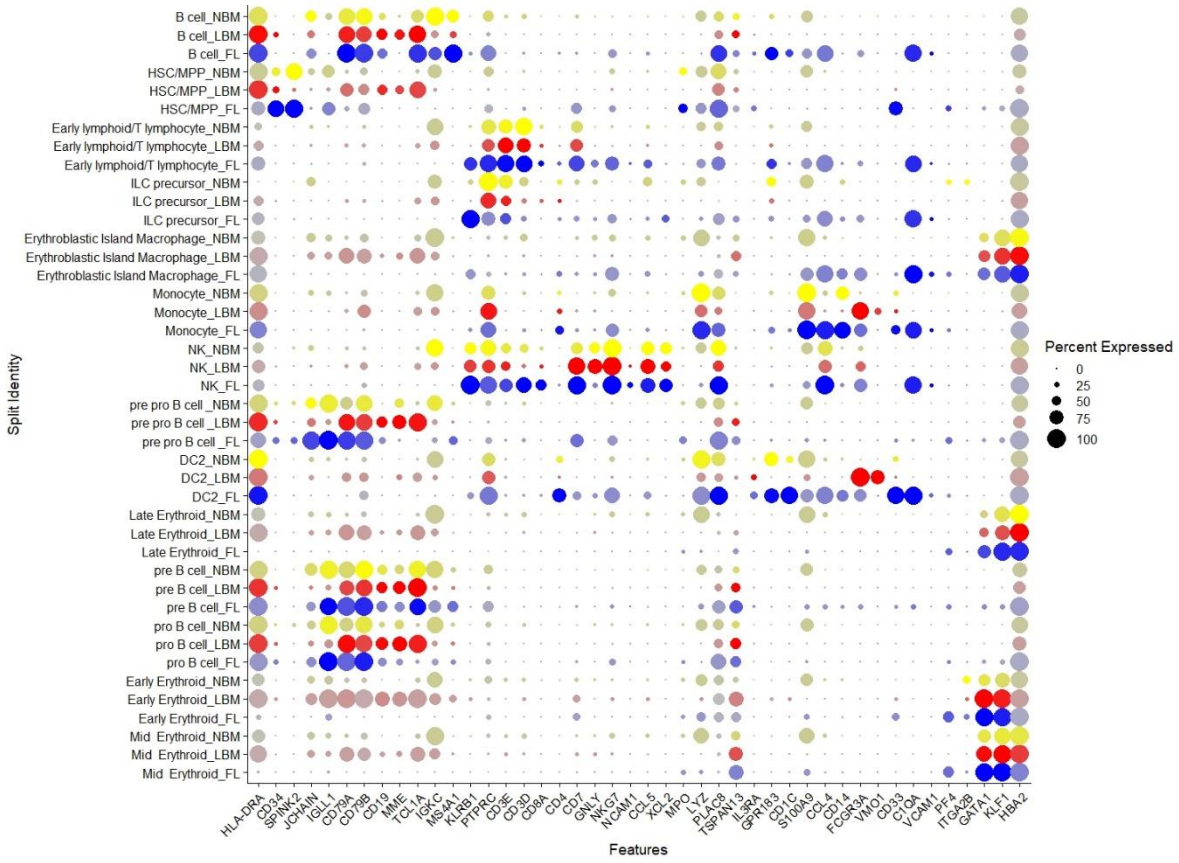


***Fig. 6 / Perfil transcripcional de genes seleccionados de las hematológicas de los tres grupos muestrales, amarillo NBM, rojo LBM y azul FL. El** tamaño del círculo representa el porcentaje de dicha población que expresa el marcador correspondiente y la saturación del color indica el nivel de expresión.*

Debido a que no todas las identidades celulares en los tres grupos muestrales tenían el número mínimo de células necesarias para realizar un análisis estadístico, el análisis de expresión diferencial y de enriquecimiento de conjuntos génicos (GSEA, del inglés: *Gene Set Enrichment Analysis*) se hizo solamente con las 14 identidades celulares que cumplieron con las condiciones (véase recurso suplementario *Archivo 6*). Adicionalmente se verificó que las identidades celulares reconocidas concordaran con marcadores moleculares canónicos de cada estado celular (Fig. 6)

Diferencias en el perfil inflamatorio de las células troncales hematopoyéticas y progenitoras multipotentes entre la hematopoyesis fetal y pediátrica leucémica y normal.

A partir del análisis de expresión diferencial se comparó la expresión de 90 factores secretados y receptores importantes en la regulación inflamatoria adicionales a los marcadores canónicos (Fig. 7a), de los cuales se encontró que 14 se expresaban de manera diferencial entre al menos alguno de los grupos muestrales con un valor de p igual o menor a 0.05.

La primera diferencia notable, en HSC/MPP provenientes LBM es la alta expresión de marcadores de linaje de B y expresan ~3.5 veces menos el marcador de troncalidad SPINK2 aunque no hay variación diferencial en la expresión de CD34 en las HSP/MPP de LBM con respecto a FL y NBM. Esto nos sugiere que, aunque el algoritmo agrupó a las HSP/MPP de LBM con dicha identidad, puede que sea una población predominante de blastos leucémicos con un perfil de expresión más troncal que el resto. Para corroborar esto, usando la función *CellCycleScoring* de

Seurat (*Satija-Lab*), se determinaron las fases del ciclo celular: G1, G2M o S a partir del perfil transcripcional de cada célula (Fig. 7b).

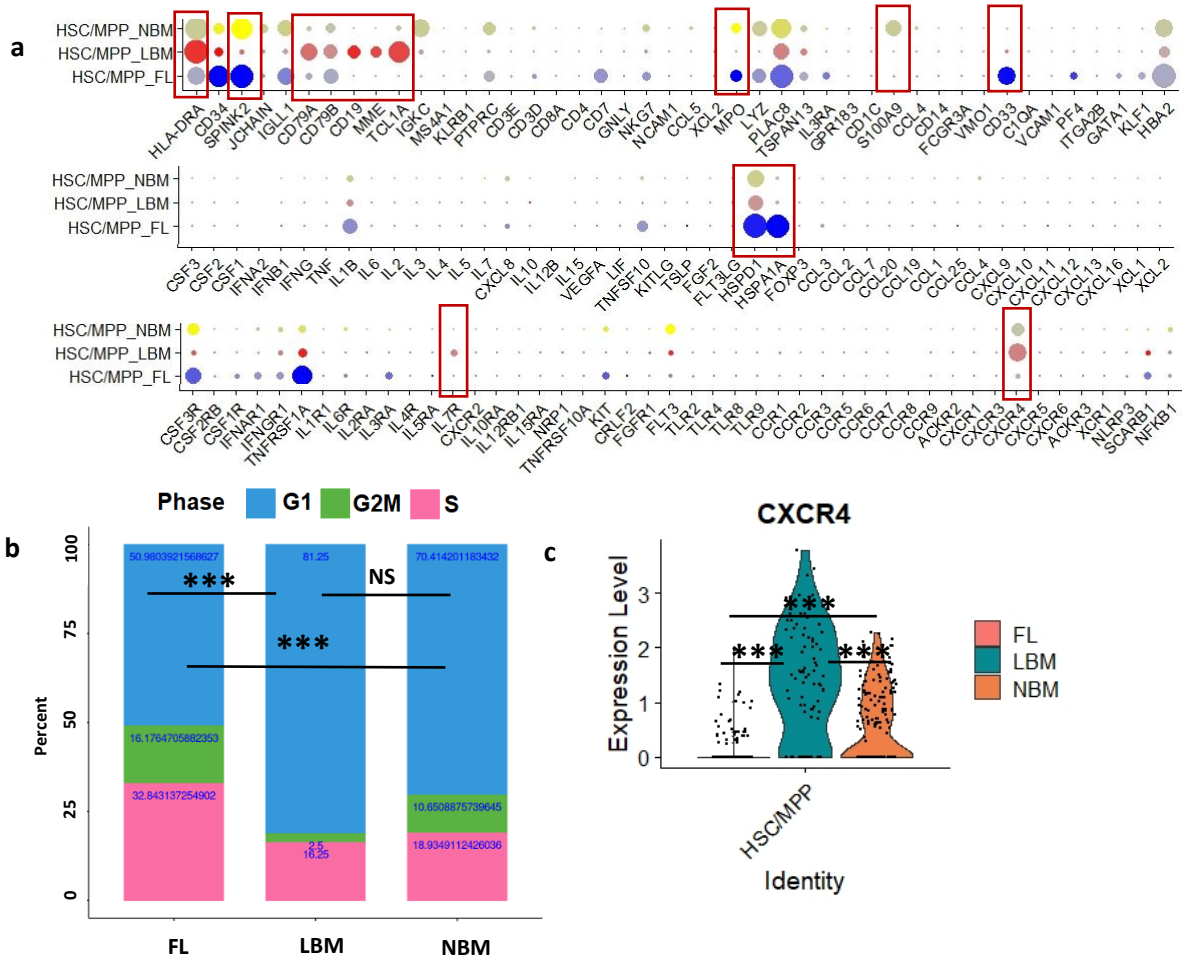


Fig. 7 / Perfil transcripcional de genes seleccionados de las células hematopoyéticas troncales y progenitores multipotentes entre FL, LBM y NBM. a, *El tamaño del círculo representa el porcentaje de células que expresan el gen de cada identidad celular, mientras que la saturación del color representa el nivel de expresión promedio de cada una de las identidades celulares. El color azul, rojo y amarillo, representan a los grupos muestrales FL, LBM y NBM respectivamente.* ***b,*** *Porcentaje de células en las tres etapas del ciclo celular: G1, GM2 y S en los tres grupos muestrales. Las diferencias estadísticamente significantes son indicadas (***p<0.005).* ***c,*** *Gráfico del nivel de expresión de CXCR4 en las células HSC/MPP.*

Las células HSC/MPP provenientes de la médula ósea normal y leucémica tienen una baja proporción de células en fase S y G2M predominando la fase G1. Es importante señalar que, aunque *CellCycleScoring* no es capaz de discernir entre la fase G1 y G0, es posible que la predominancia de esta fase en las células HSP/MPP de LBM y NBM nos indique un estado proliferativo bajo o de quiescencia. Adicionalmente, como era de esperar, las células HSC/MPP del FL tienen un mayor porcentaje de células en S/G2M. Aunque las HSC/MPP de NBM y LBM se encuentran en un estado de proliferación baja, es posible que sean HSCs de reconstitución de corto plazo ya que carecen del marcador CD33, que además de ser un marcador de compromiso mieloide, también ha sido identificado como un marcador de reconstitución a largo plazo en células HSC y leucémicas en leucemia mieloide[43]. El encontrar este marcador únicamente en las HSC/MPP del FL puede indicar que durante esta etapa del desarrollo las HSC de reconstitución a largo plazo sean mucho más abundantes que en NBM y LBM.

Las HSC/MPP de la LBM carecen del marcador de compromiso mieloide MPO[44,45], lo cual concuerda con las empobrecidas poblaciones mieloides observadas en este grupo muestral. Conjuntamente, expresan a la baja las proteínas S100A9 (Fig. 7) y S100A8 (véase recurso suplementario *Archivos CSV de expresión diferencial*) la cual es una proteína multifacética que se expresa, igualmente durante el compromiso hacia la diferenciación mieloide[46], pero además regulan la inflamación de manera ambivalente y son un importante protector de estrés oxidativo[47]. Esta expresión a la baja de las proteínas S100A8/9 es observada también en las HSC/MPP del FL.

Adicionalmente, se evaluó el perfil transcripcional del conjunto de proteínas de choque térmico, ya que esta familia de genes es la que presenta mayor expresión diferencial entre las poblaciones HSP/MPP en las tres muestras, (véase recurso suplementario *Archivo 8*) en las que evaluamos con detenimiento la expresión de 11 proteínas de choque térmico que demostraron ser expresadas diferencialmente (Tabla 1), destacando que en ninguno de estos genes hubo diferencias significativas en su expresión entre LBM y NBM.

Tabla 1. Valor de p del análisis de expresión diferencial de las proteínas de choque térmico del FL con respecto LBM y NBM

Gen	*LBM*	*NBM*
HSPA1A	*7.36E-33*	*6.72E-59*
HSPA1B	*4.94E-32*	*1.28E-57*
HSP90AA1	*5.11E-32*	*2.46E-50*
HSPD1	*1.43E-23*	*4.67E-32*
HSPE1	*5.22E-18*	*7.80E-35*
HSP90AB1	*1.66E-17*	*NS*
HSPH1	*3.17E-14*	*2.04E-27*
HSP90B1	*2.21E-08*	*NS*
HSPA6	*5.23E-08*	*7.90E-20*
HSPB1	*0.00410982*	*3.19E-26*
HSPA8	*NS*	*3.40E-31*

Las proteínas de choque térmico son una familia de proteínas encargadas de estabilizar proteínas intracelulares en respuesta a estrés fisiológico, patológico, químico y ambiental. Se ha reportado que diferentes tipos de células troncales (embrionales, adultas y pluripotentes inducidas) mantienen niveles altos de expresión de este tipo de proteínas, no solo para protegerlas de diferentes tipos de estrés, sino para regular la actividad de factores transcripcionales y señales celulares intrínsecas y extrínsecas. Particularmente, en las HSC se ha descrito que la proteína Hsp70 promueve la diferenciación eritroide manteniendo estable al factor transcripcional GATA1[48].

Destaca que el único gen para proteína de choque térmico que no tiene una expresión diferencial ente FL y LBM, pero sí entre FL y NBM, es HSPA8, de la cual se sabe promueve la supervivencia de HSC mediante la regulación a la baja de la apoptosis[48]; la sobreexpresión de HSPA8 se ha asociado a la aparición y mal pronóstico de leucemia.

Por último, tenemos el gen del receptor CXCR4 que se expresa diferencialmente entre los tres grupos muestrales. Las HSC/MPP del FL tienen el menor nivel de expresión seguido de las células HSC/MPP de NBM y, por último, las células

HSC/MPP de LBM son las que mayor nivel de expresión de CXCR4 tienen (Fig. 7c). La interacción entre las proteínas CXCR4 y CXCL12 en las HSC y las células estromales del nicho endosteal en la médula ósea respectivamente, por años se ha descrito como un eje central para la regulación del estado de quiescencia/diferenciación de las HSC por su actividad quimioatrayente[49] y su actividad protectora del estrés oxidativo[50] sobre éstas. En este análisis se observa que las HSC fetales tienen la expresión más baja de CXCR4, pero su expresión de CXCR4 se va incrementado a medida que las células maduran durante su diferenciación a células B (Fig.8), lo cual concordaría con estudios realizados en ratones *knock out* de CXCR4, en los que se comprueba que la diferenciación de las HSC en la aorta-gónada-mesonefros, saco vitelino, placenta y su posterior colonización en el hígado fetal, transcurre sin aparente problema su expresión parece ser indispensable para la colonización en la médula ósea[14]. En las HSC/MPP de LBM y NBM también observamos que durante la diferenciación se incrementa la expresión de CXCR4, aunque la diferencia de expresión en LBM es menos drástica que en su contraparte normal.

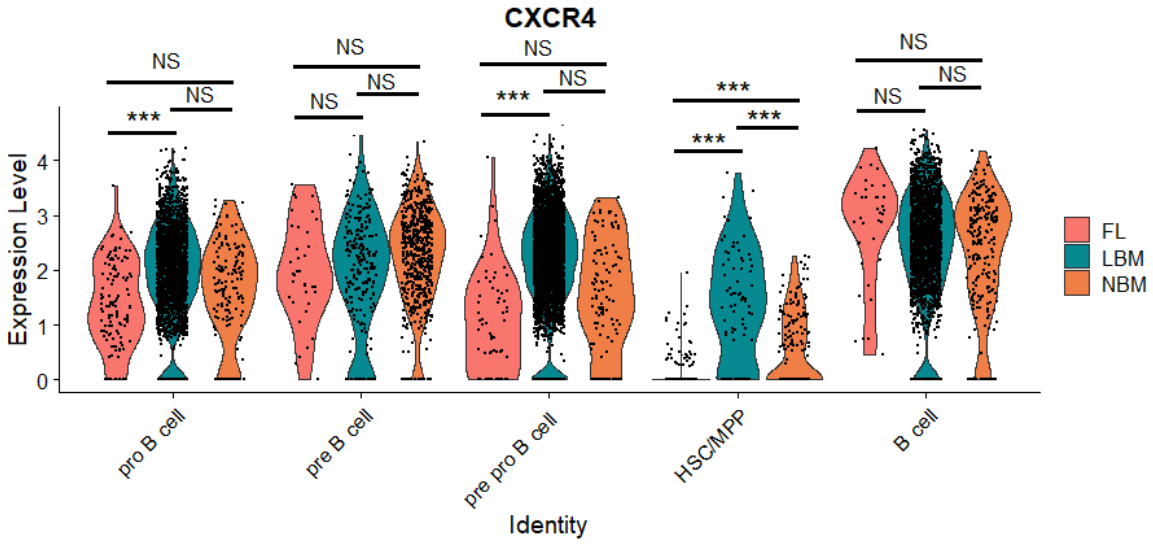


Fig. 8 / Expresión diferencial de CXCR4 entre los grupos muestrales durante las diferentes etapas de diferenciación de B. *Las diferencias estadísticamente significantes son indicadas (*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001).*

En el análisis de expresión diferencial no se obtienen diferencias significativas en la expresión de otros genes marcadores de inflamación como citocinas, quimiocinas y sus receptores. Por ello se realizó un análisis GSEA para estudiar de una manera más integral la actividad de diferentes vías inflamatorias. En la Fig.9 se muestran las vías de señalización en las que al menos haya un grupo muestral con puntaje de enriquecimiento diferencial.

Las HSC/MPP del FL se encuentran más enriquecidas de manera significativa en las vías HIF y TNFR1 con respecto a las muestras de LBM y NBM; mientras que las células HSC/MPP provenientes de las médulas óseas se encuentran enriquecidas de manera significativa en las vías IL-12, IL-17 y TNFR2 con respecto a la muestra de FL. La vía de IL-10 tiene una expresión diferencial entre los tres grupos muestrales. Y por último, tenemos que las vías IL-3, IFNA, NF-kB y receptores TOLL se encuentran enriquecidas de manera significativa únicamente entre las muestras de FL con NBM.

Como se ha mencionado previamente, las HSC requieren de un microambiente especializado que brinde las condiciones adecuadas para su función parénquima, uno de los requerimientos presentados por las HSC es el de la hipoxia, puesto que, en condiciones de bajo estrés oxidativo, este grupo celular puede mantenerse en un estado metabólico bajo y de quiescencia, situación necesaria para su renovación[51].

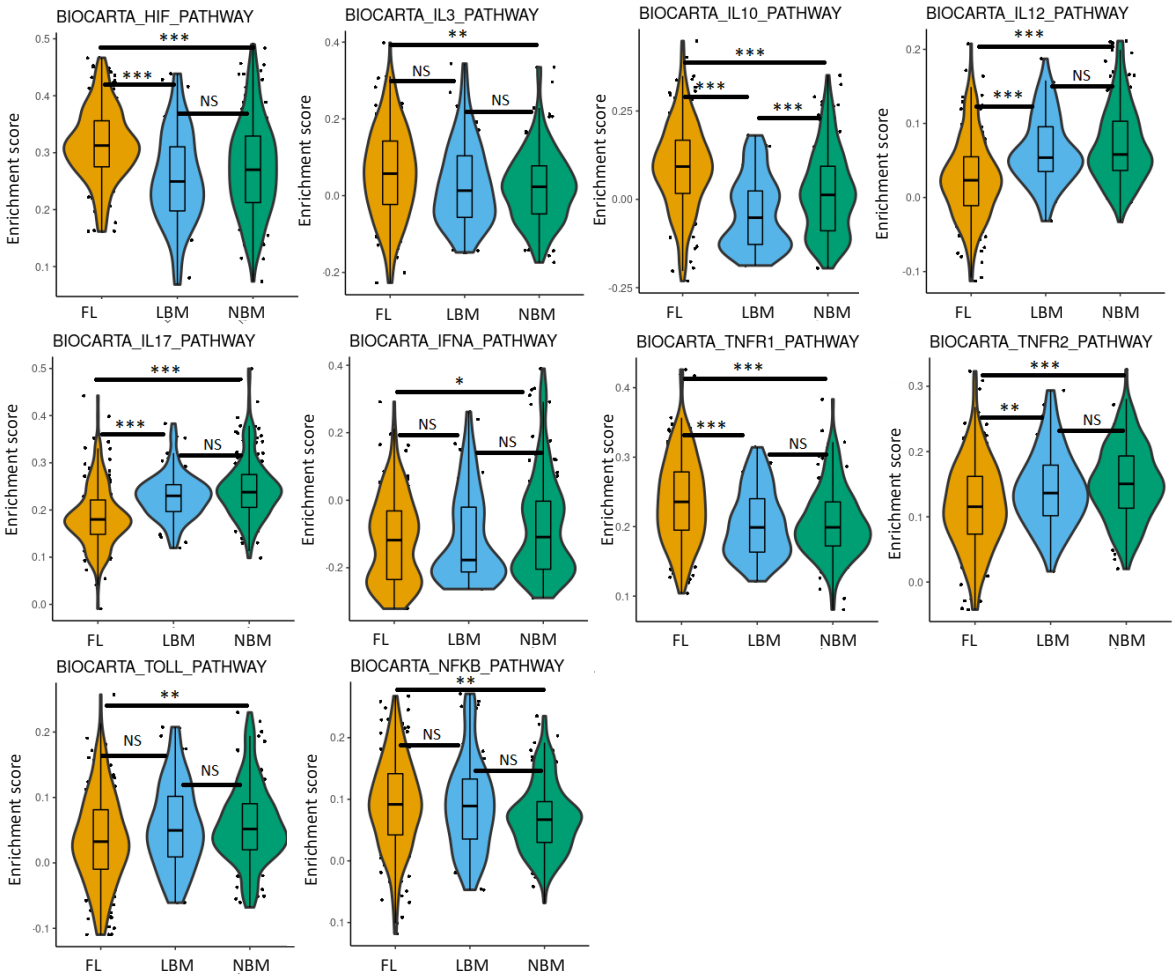


Fig. 9 / Diferencias en el perfil de expresión génico asociado a la inflamación. *Las diferencias estadísticamente significantes son indicadas (*p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001).*

Uno de los principales mediadores de la respuesta a hipoxia son los factores inducibles por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés: *Hipoxia Inducible Factor*), los cuales se sabe inducen expresión de genes que proangiogénicos y moduladores del ciclo celular[51,52]. No sorprende entonces que las HSC/MPP de FL tengan un perfil enriquecido de la vía HIF con respecto a LBM y NBM, ya que está bien descrito el estado hipóxico del feto con respecto a sus homólogos adultos[53]. Es de gran interés observar que no hay una actividad diferencial de la vía HIF entre las HSC/MPP de las LBM y NBM lo que indica que ambas probablemente residan en un nicho con las mismas características de hipoxia.

Otras vías de señalización en la que se diferencia el FL de las médulas óseas normal y leucémica son IL-12 e IL-17. Ambas enriquecidas en NBM y LBM con respecto al FL, la respuesta en general desencadenada por estas dos interleucinas es promover la activación de células T y NK, así como promover la liberación de citocinas en endotelio, fibroblastos y epitelio, e inducir diferenciación de los progenitores hematopoyéticos[54,55]. Aunque IL-12 promueve la respuesta inmune de las Th1, se ha observado que exposiciones prolongadas a esta citocina promueven el agotamiento y tolerancia de las células Th1[55]. Por otro lado, las HSC/MPP del FL presentaron enriquecimiento en la vía IL-3 la cual es un importante estimulante de las células MPP. Estudios clínicos en pacientes con citopenia o falla medular, han demostrado que la administración prolongada de IL-3 en conjunto con otros factores de crecimiento, ayuda a normalizar el conteo celular en sangre[55]. Esto podría indicar que, durante el desarrollo hematopoyético fetal, IL-3 podría ser importante para promover el estado super proliferativo de las HSPC.

Finalmente, otra diferencia importante entre las HSC/MPP de la médula ósea y FL es su polarización en las respuestas de tipo TNFR1 y TNFR2, siendo la primera más enriquecida en el FL y la segunda más enriquecida en NBM y LBM. TNFR1 se caracteriza por activar la vía canónica de NF-kB, la cual se encuentra también enriquecida en FL, y bajo el contexto adecuado también puede inducir muerte celular, mientras que TNFR2 puede además activar la vía no canónica de NF-kB[56]. Se ha implicado un papel importante de la vía de señalización canónica de NF-kB en la autorrenovación, función y desarrollo en las células HSPC usando células fetales murinas[57,58] y concordantemente, en células HSPC adultas, se demostró que la señalización no canónica de NF-kB juega un papel crucial para regular positivamente la autorrenovación en las células HSPC, el mantenimiento de las funciones de apoyo de las células del nicho osteoblástico, la regulación de la expansión de HSPC y el compromiso del linaje regulando negativamente la expresión de las citocinas inflamatorias de apoyo a las células HSPC[58].

En conclusión, las células HSC/MPP de la médula ósea leucémica, a pesar de su notable compromiso hacia el linaje de B, mantienen grandes similitudes en el estado

inflamatorio e hipóxico con su contraparte normal en la médula ósea y no con las HSC/MPP del hígado fetal como se había hipotetizado.

Expresión de reguladores inflamatorios en el estroma de hígado fetal.

Como se mencionó previamente, la leucemia infantil es un padecimiento probablemente de origen prenatal. Estudiar las señales celulares que intervienen durante el desarrollo sano de la hematopoyesis es de suma importancia para comprender los potenciales insultos que podrían desencadenar procesos oncogénicos. Es importante recalcar que la inflamación es un importante regulador tanto en la hematopoyesis adulta como en la fetal que permitirá modular la diferenciación, proliferación, estado metabólico y oxidativo de las HSC de acuerdo con las necesidades corporales.

Por ello se revisó el perfil de expresión génica diferentes citocinas, quimiocinas y receptores moduladores de la inflamación y la respuesta inmune del estroma de hígado fetal, el cual incluye células endoteliales, fibroblastos y hepatocitos (Fig. 10 y archivo suplementario 9 y 10).

A diferencia de HSC/MPP que expresaban bajos niveles de factores solubles y receptores mediadores de la inflamación, el estroma del hígado fetal tiene una expresión rica de estos marcadores. Esto es indicativo del papel tan importante que tiene el estroma en la modulación de las células troncales y progenitoras. Cada proteína aporta identidad celular específica, aunque, parece ser que los hepatocitos, por su perfil de expresión, no son el principal componente estromal mediador de la inflamación, con algunas excepciones que se detallan más adelante.

En el caso de las proteínas de choque térmico HSPD1 y HSPA1A tienen una expresión alta en las tres identidades celulares, concomitante con las observaciones realizadas en HSC/MPP de FL, las cuales también son ricas en su expresión. TNFSF10 es aportado principalmente por el endotelio y los hepatocitos, pero los receptores tipo 1 y 2 de TNF (TNFRSF1A y TNFRSF1B) son expresados ricamente en los fibroblastos, indicando que éstos tendrán un papel de intermediarios en la señalización de TNF. De manera similar, el estroma de FL es pobre en la expresión

de interferón gama, pero rico en su receptor, lo cual indica que la señal de interferón provendrá de manera exógena y que para que las HSC/MPP respondan requieren de la intervención del estroma ya que estas últimas, no expresan niveles bajos del receptor.

Un marcador inflamatorio en el que solo intervienen los hepatocitos es el receptor estimulante de colonias estimulante 3 (CSF3R), que es esencial para la maduración de granulocitos y en la proliferación, diferenciación y supervivencia del linaje de neutrófilos. Aunque no se descarta que la expresión de CSF3R tenga un papel inmunomodulador durante el desarrollo fetal, la expresión también se observa en hepatocitos adultos y parece estar implicado en la regeneración del tejido después de daño tisular[59]. Por otra parte, el endotelio es el principal aportador de CXCL16 y IL-4R. CXCL16 es una molécula quimioatrayente de células T y NKT; es producida como respuesta a IFNG y TNF alfa y se encuentra sobre expresado en tumores sólidos con un perfil proinflamatorio[60]. IL4R es un receptor que puede unirse a IL-4 y IL-13. Tradicionalmente, la activación de este receptor induce la respuesta Th2[55].

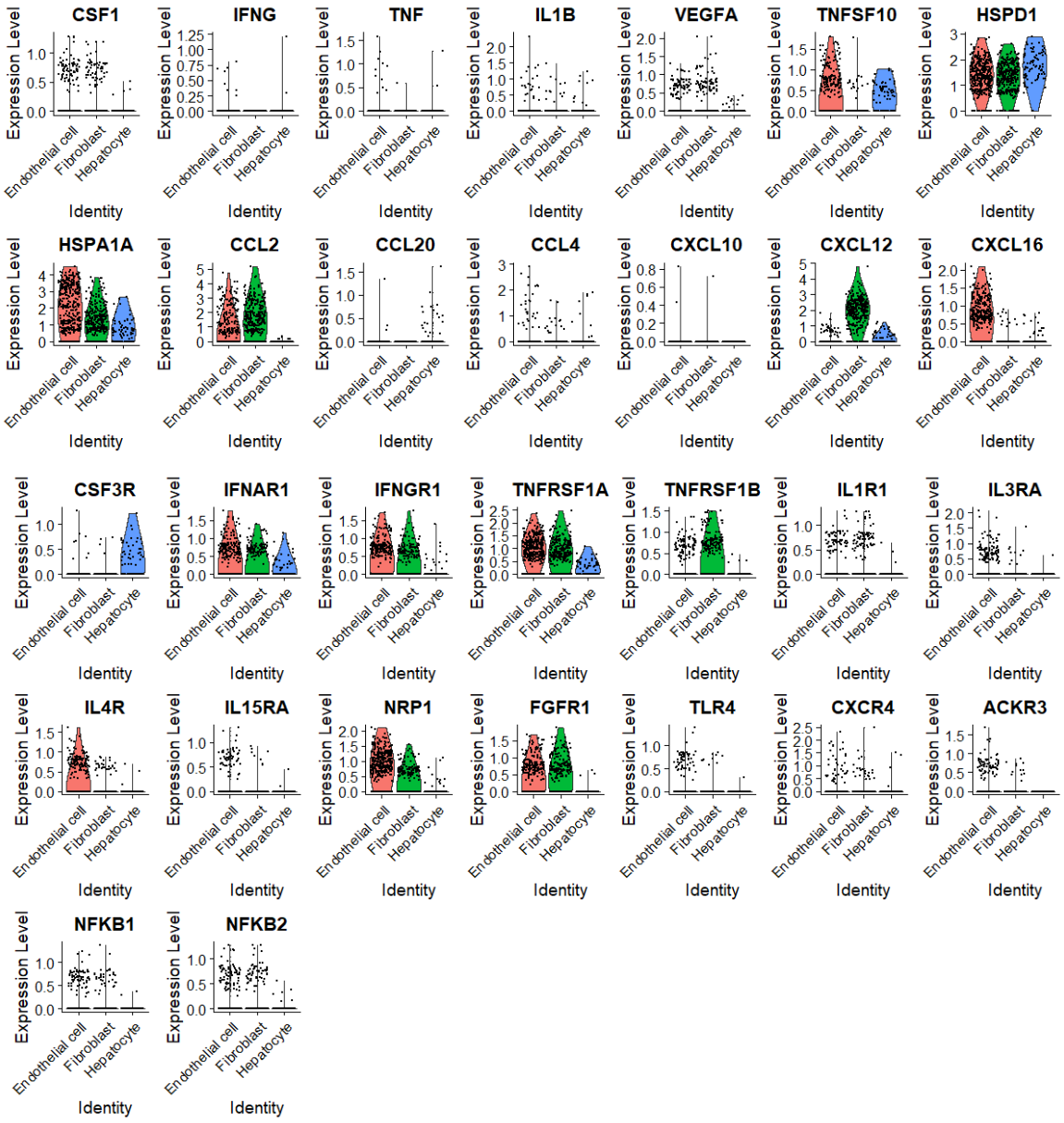


Fig. 10 / Nivel de expresión de genes inmunomoduladores y reguladores de la inflamación en el estroma del hígado fetal.

De manera interesante, los fibroblastos son el principal componente estromal que expresa CXCR12. Como se mencionó previamente, el eje CXCL12/CXCR4 es crucial para la colonización de los nichos troncales en la médula ósea y el mantenimiento del estado troncal de las HSC, aunque no es crucial para el

desarrollo de la hematopoyesis fetal si es esencial para la diferenciación de células B[14,49,50]. De manera interesante el endotelio y los fibroblastos, aunque de forma módica, expresan CXCR4 y el receptor tipo “scavenger” CXCR7 (ACKR3) cuya función es el secuestro, la degradación y la transcitosis de las quimiocinas CXCL12 y CXCL11[61].

Las células endoteliales y fibroblastos se diferencian de los hepatocitos por la expresión de CCL2, que genera una potente actividad quimioatrayente en monocitos y basófilos; la alteración del gen del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR)se ha asociado con enfermedades hematológicas como el desorden mieloproliferativo de células troncales y linfoma; y neuropilina 1 (NRP1) que regula diferentes vías de señalización relacionadas con la migración, supervivencia y atracción celular en el desarrollo de vasos y circuitos neuronales fuera del sistema nervioso central, uno de sus correceptores es el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGFA) que también se expresa en el estroma del FL[61].

Por último, el estroma de hígado fetal expresa mediadores canónicos de una respuesta proinflamatoria, IL1-B y su receptor, NF-kB1 y NF-kB2, y TLR4.

Predicción de las interacciones entre el estroma de hígado fetal y las HSC/MPP del hígado fetal y médula ósea leucémica y normal.

Para predecir qué tipo de influencia tendría el microambiente hematopoyético fetal sobre las HSC/MPP de la médula ósea normal y leucémica se realizó un análisis de interacción célula-célula con CellChat (Fig. 11). El tipo de interacción esta detallado en el recurso suplementario 11.

Los fibroblastos son el componente del estroma que mayor cantidad de señales eferentes tiene en los tres grupos muestrales (Fig. 10). Mientras que las señales receptoras están muy equilibradas en todos los componentes celulares en la hematopoyesis fetal, al incluir las células hematopoyéticas troncales de médula ósea leucémica y normal, las señales que reciben los hepatocitos disminuyen en proporción con el resto de los componentes celulares.

Existen señales que se encuentran presentes exclusivamente en el hígado fetal, cómo la vía de angiopoyetina, la cual concuerda con la sobre activación de HIF en el FL, la ausencia de la interacción endotelial ICAM y SELL.

Las células HSC/MPP leucémicas carecen de la interacción de galectina, específicamente con la LGALS9, la cual se ha encontrado que es capaz de activar específicamente la vía AP-1 y no la de NF-kB.

Y finalmente tenemos las interacciones específicas de las HSC/MPP de la médula ósea normal en la que destacan interacciones con la matriz extracelular como colágeno, laminina, e interacciones con el endotelio como PECAM y VCAM.

También tenemos interacciones que son exclusivas de las HSC/MPP con el estroma del hígado fetal. Como ICAM, SELL, FN1 y THBS, las cuales son proteínas de adhesión celular.

La señal MDK, en la normalidad es una señal eferente exclusivamente mientras que en las HSC/MPP del FL y LBM es una señal bidireccional. MDK es una proteína secretada que funciona como citocina y factor de crecimiento y media su señal a través de receptores proteoglicanos y no proteoglicanos de la superficie celular.

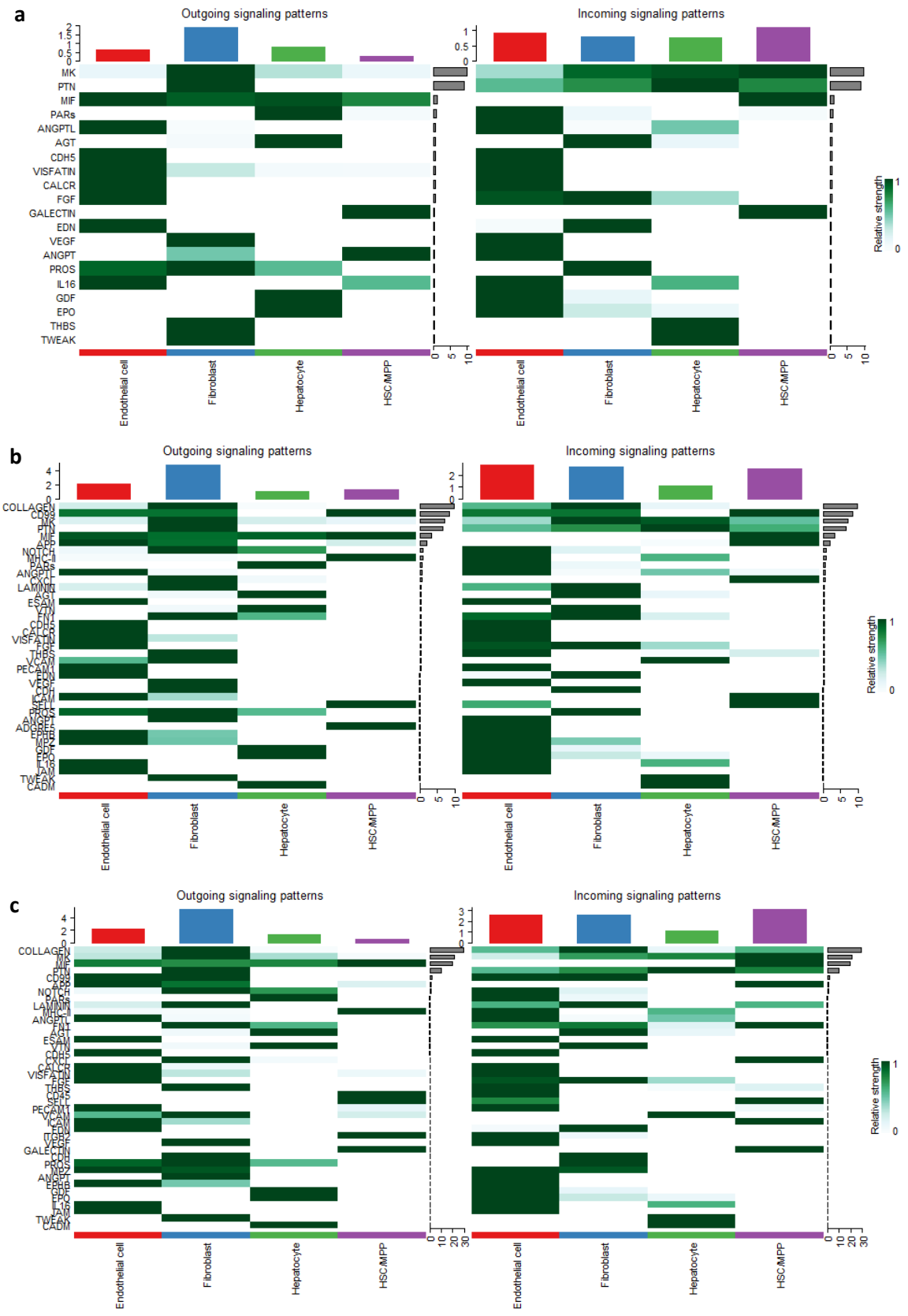

a
Outgoing signaling patterns
Incoming signaling patterns
MK
PTN
MIF
PARs
ANGPTL
AGT
CDH5
VISFATIN
CALCR
FGF
GALECTIN
EDN
VEGF
ANGPT
PROS
IL16
GDF
EPO
THBS
TWEAK
Endothelial cell
Fibroblast
Hepatocyte
HSC/MPP
Relative strength
b
Outgoing signaling patterns
Incoming signaling patterns
COLLAGEN
Endothelial cell
Fibroblast
Hepatocyte
HSC/MPP
Relative strength
c
Outgoing signaling patterns
Incoming signaling patterns
COLLAGEN
Endothelial cell
Fibroblast
Hepatocyte
HSC/MPP
Relative strength

Fig. 11 / Mapa de calor de las interacciones celulares predichas de acuerdo con la expresión de ligando y receptores entre el estroma de hígado fetal y las células hematopoyéticas troncales de hematopoyesis fetal, leucémica y normal pediátrica. *Interacciones celulares entre el estroma de hígado fetal y HSC/MPP. En cada gráfico se observan a la izquierda las señales aferentes de cada subtipo celular, mientras que del lado derecho se observan las señales eferentes o que reciben cada uno de los subtipos celulares entre el estroma del hígado fetal y las HSC/MPP* ***a,*** *del hígado fetal;* ***b,*** *de la médula ósea leucémica y;* ***c,*** *de la médula ósea normal. La saturación del color verde indica la fuerza de esta interacción predicha entre las células de acuerdo con el nivel de expresión de los ligandos y/o receptores.*

Proliferación de líneas celulares leucémicas en esferoides de estroma de cordón umbilical con estimulo proinflamatorio de LPS

Las líneas celulares de leucemia linfoblástica, Nalm6 y RS4;11 fueron capaces de colonizar los esferoides de estroma de cordón umbilical detectado a partir de las 48 h mediante microscopía de epifluorescencia (Fig. 12a,b). La cantidad de células colonizadas identificadas por la tinción de CellTrace™ Far Red (CTFR) (véase recurso suplementario *Archivo 1*), no fue diferente entre ambas líneas celulares (Fig. 12c) ni varió significativamente dependiendo de la concentración de LPS administrado. A las 96 h posterior al inicio del cocultivo, el número de células leucémicas de Nalm6 y RS4;11 que colonizaron el esferoide incrementó significativamente con respecto al número de células detectadas a las 48 h con un valor de *p* de 1.31E-5 y 9.46E-12 respectivamente. Sin embargo, nuevamente no se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de LPS. Adicionalmente, a las 96 h, hay mayor número de células en los esferoides colonizados por la línea celular RS4;11 con respecto a los esferoides colonizados por la línea celular Nalm6 (p = 0.000844).

Para la evaluación de la proliferación de las líneas celulares ante los diferentes tipos de interacción con el estroma (dentro del esferoide [*in*], fuera del esferoide [*out*], libre de estroma [*sf*]) de determinó la intensidad media de fluorescencia del colorante CTFR a las 0 h, 48 h y 96 h y se ajustó a una curva exponencial para calcular la constante de velocidad de la disminución del colorante, la cual es proporcional a las veces que se ha dividido la célula (véase recurso suplementario *Archivos 2 y 3*).

En ambas líneas celulares, Nalm6 y RS4;11, la interacción más estrecha con el estroma (*in*) redujo significativamente la velocidad de proliferación con respecto a la condición libre de estroma (*sf*) ($p_{Nalm6} = 0.0000245$, $p_{RS4;11} = 0.0098092$) (Fig. 13a,b).

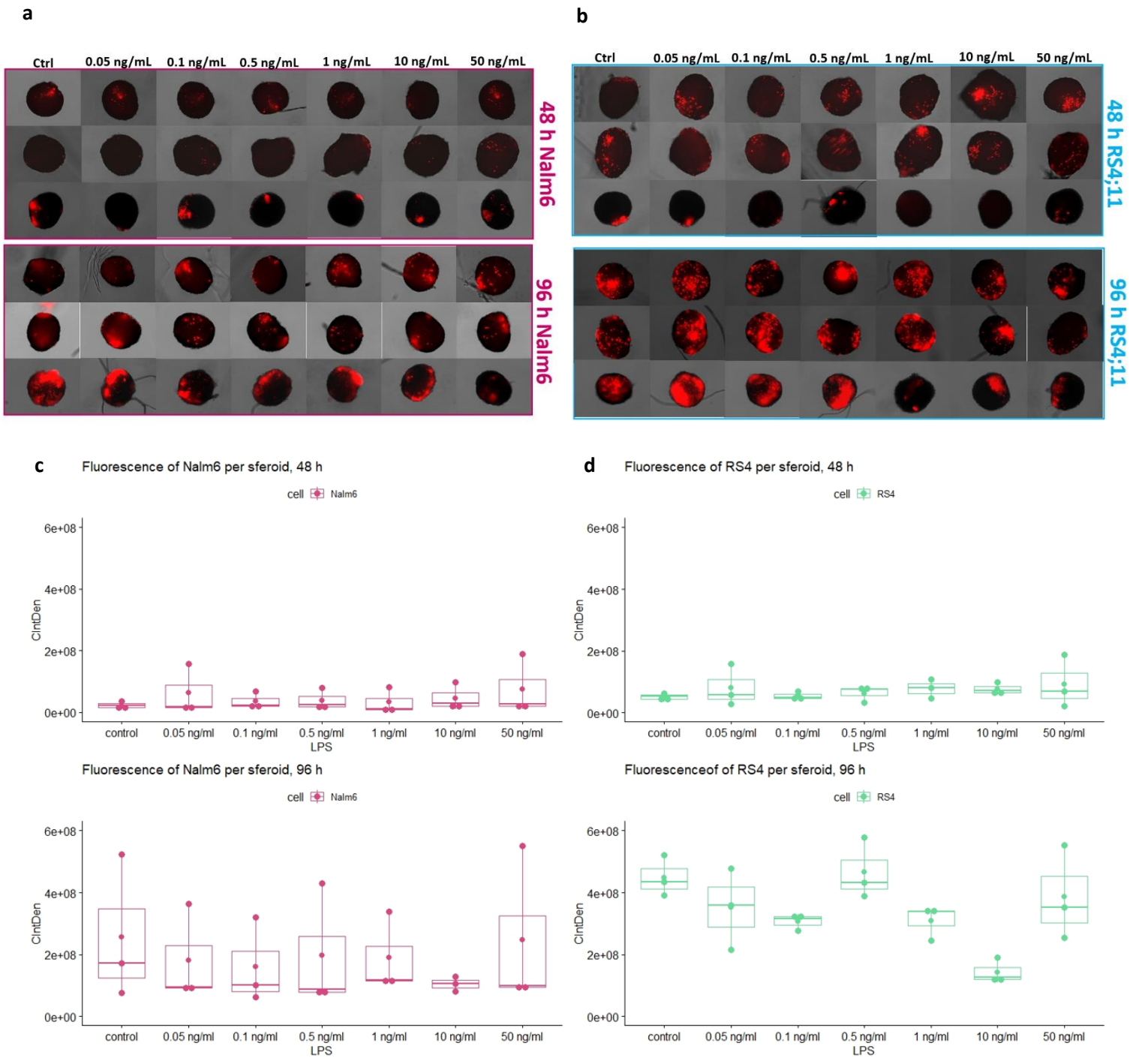


Fig. 12 | Colonización de esferoides de cordón umbilical por células leucémicas. a**, Fotografías de los esferoides de estroma de cordón umbilical colonizados a las 48 h y 96 h por la línea celular Nalm6 y **b,** RS4;11 teñidas en rojo bajo diferentes concentraciones de LPS (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10 y 50 ng/ml). **c,d** Valor de la intensidad integrada del área corregida de los esferoides colonizados por cada línea celular a las 48 h y 96 h de cada condición de LPS por triplicado. Se obtuvo una colonización significativamente mayor (p<0.001) a las 98 h con respecto al cultivo de las 48 h para cada línea celular respectivamente y hubo una mayor colonización a las 48 h (*p<0.05) y a las 96 h (*** p<0.001) en la línea celular RS4;11 con respecto a la línea celular Nalm6.*

De manera interesante, la línea celular Nalm6 parece ser menos sensible a la interacción con el estroma, ya que las células que se mantienen fuera del esferoide proliferan con la misma velocidad que las células que se cultivaron libre de estroma, mientras que en la línea celular RS4;11 las células que proliferan fuera del esferoide tienen una velocidad de proliferación intermedia a la condición dentro del esferoide y libre de estroma.

El efecto del LPS en la proliferación de las líneas celulares, reiteradamente, no tiene efectos significativos en Nalm6 y solamente a la concentración de 0.1 ng/mL se incrementa la velocidad de proliferación con respecto al control en RS4;11.

La falta de respuesta a LPS no se debe a la falta de expresión de TLR4,ya que está reportado en el Atlas de Expresión del Instituto Europeo de Bioinformática, que Nalm6 expresa el ARN mensajero de TLR4 (véase recurso suplementario *Archivo 4*), y aunque en dicho reporte no se detectó la expresión de TLR4 en RS4;11, en un artículo publicado en el 2006[62], comprobaron por RT-PCR que las dos líneas celulares expresan el ARN mensajero de TLR4, siendo su expresión más alta en Nalm6 con respecto a RS4;11. De igual forma, está registrado en el Atlas de Expresión del Instituto Europeo de Bioinformática que el endotelio de cordón umbilical expresa TLR4 (véase recurso suplementario *Archivo 5*) y en un trabajo publicado en 2013, comprueban que, aunque la expresión de TLR4 en las células mesenquimales del cordón umbilical es baja, el LPS es capaz de inducir la translocación de NFκB al núcleo. No obstante, los resultados obtenidos en ambos trabajos citados concuerdan con que el LPS no promueve una respuesta proliferativa en las líneas celulares Nalm6, RS4;11 o en las células mesenquimales troncales de cordón umbilical aun usando concentraciones de 40 µg/mL y 1 µg/mL

respectivamente[62,63]. Esto sugiere la importancia del análisis de vías de activación y diferenciación asociadas a inductores proinflamatorios.

Aunque se ha reportado que el LPS promueve la proliferación y supervivencia de células malignas en otras enfermedades oncohematológicas como mieloma múltiple, estos efectos son significativos en líneas celulares a partir de concentraciones de 1-5 µg/mL[64,65], con resultados ambiguos en cultivos primarios de pacientes[65]. Adicionalmente, de acuerdo con los resultados de Brümmendorf y colaboradores publicados en el 2016, la presencia de LPS en estroma de médula ósea en cocultivo con HSPC de cordón umbilical no promueve una duplicación significativamente diferente con respecto a su control, pero incrementa la proporción de las células $CD34^+$ al final del cultivo, sugiriendo junto con experimentos adicionales que la presencia del LPS en los cocultivos promueve mielopoyesis y una mayor retención de células troncales[66].

Por otra parte, la evidencia experimental obtenida en este trabajo nos sugiere que el estroma de cordón umbilical podría tener capacidad de dar soporte hematopoyético o leucemogénico con características similares al estroma de médula ósea ya que observamos colonización de los esferoides en ambas líneas celulares. En el Atlas de Expresión del Instituto Europeo de Bioinformática se reporta que el endotelio del cordón umbilical expresa moléculas que permiten la quimiotaxis y adhesión de células hematopoyéticas troncales y leucémicas como CXCL12, CXCL11 y VCAM1 (véase recurso suplementario *Archivo 5*).

De manera remarcable, los resultados comprueban que las interacciones entre los esferoides de estroma de cordón umbilical y las células leucémicas son selectivas y probablemente permitan recapitular de *in vitro* diferentes estados de diferenciación leucémica, siendo probablemente las células asociadas al estroma y a los nichos hipóxicos en células malignas con un perfil de troncalidad como lo demuestran estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación por el Dr. Balandrán, en el que comprobaron que este tipo de cultivo tridimensional con estroma de médula ósea es selectivo y que las células leucémicas que colonizan el esferoide

tienen una mayor capacidad de reconstitución leucémica en xenotransplante murino[31].

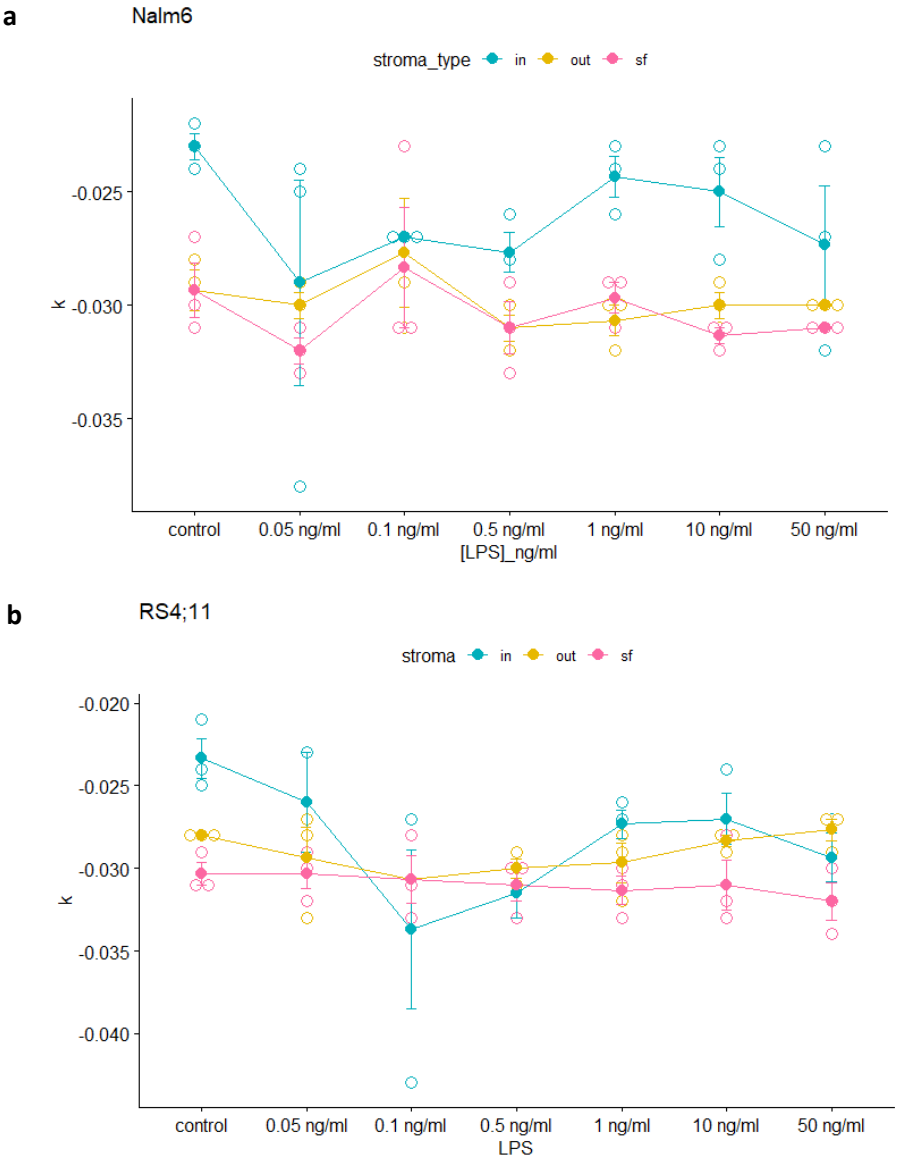


Fig. 13 / Velocidad de proliferación de las células leucémicas en diferentes condiciones de estroma de cordón umbilical. *Gráfico del valor de la constante de velocidad de disminución de la intensidad media de fluorescencia (k), indicado por color si las* ***a,*** *Células Nalm6 o* ***b,*** *Células RS4;11 crecieron libre de estroma, si fueron recolectadas fuera del esferoide (out), o asociadas al esferoide (in); bajo diferentes concentraciones de LPS (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10 y 50 ng/mL) por triplicado.*

Discusión general

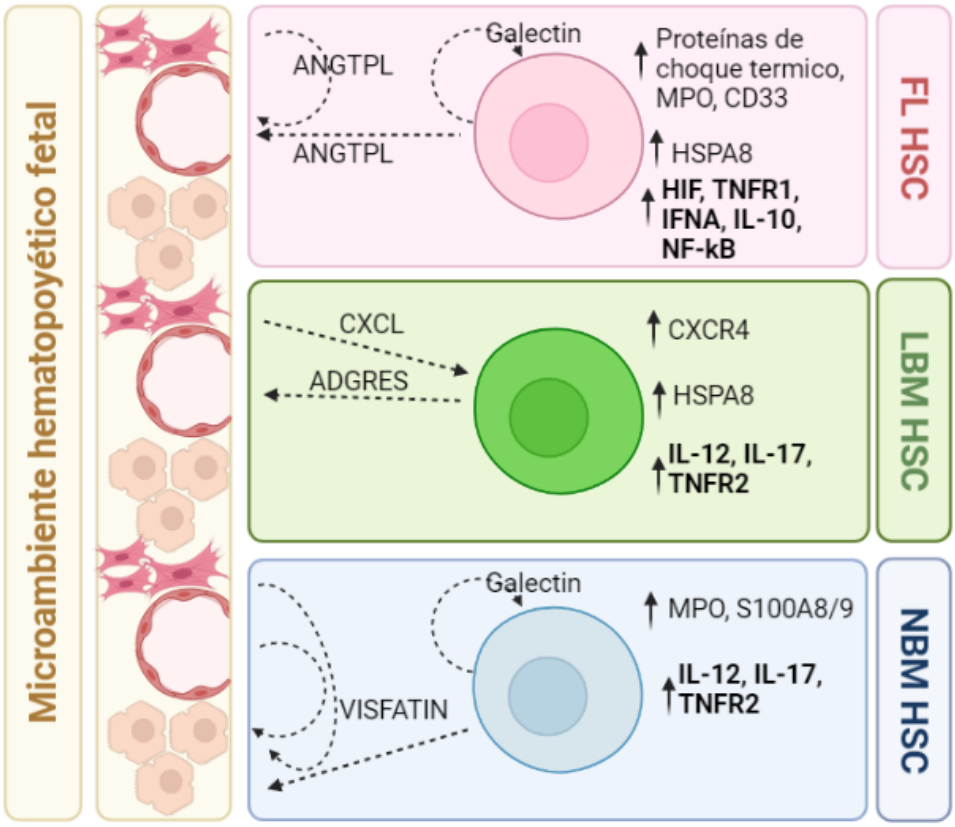
Al comparar las características de las células HSC/MPP de hematopoyesis fetal, leucémica y normal pediátrica por medio de un análisis bioinformático de transcriptoma de célula única para explorar si las células HSC tienen el potencial de ser perturbadas por el microambiente hematopoyético fetal en condiciones estacionarias o proinflamatorias.

Con base en los resultados del análisis transcriptómico pudimos identificar a las células HSC/MPP en los tres sistemas, siendo de gran relevancia que las HSC/MPP provenientes de la médula ósea leucémica mantenían un perfil inflamatorio y de ciclo celular muy similar a las HSC/MPP normales a pesar de no tener un fenotipo de célula troncal con base en los marcadores clásicos junto con una alta expresión de marcadores de compromiso de linaje B. Esto sugiere que las HSC/MPP identificadas en la médula ósea leucémica podrían pertenecer a la subpoblación de células iniciadoras de la leucemia. Estas células se caracterizaron por una expresión al alta del receptor CXCR4. Por otro lado, las células HSC/MPP identificadas en la médula ósea se caracterizaron por expresar niveles más altos de CD33 y MPO, marcadores de compromiso mieloide y en el caso de CD33 también de reconstitución a largo plazo, pero principalmente por la sobreexpresión de varias proteínas de choque térmico con respecto a las médulas óseas con algunas excepciones. Aunque en las tres muestras identificadas, no se detectaron niveles altos en la expresión de receptores o ligandos mediadores de la respuesta inflamatoria, el análisis de GSEA revela que en general, el perfil inflamatorio de las células HSC/MPP de NBM y LBM es más parecido, a excepción de las vías IL-10, NF-kB e IFNA.

Por otra parte, se caracterizó el perfil de citocinas, quimiocinas y sus receptores del componente estromal: endotelio, fibroblastos y hepatocitos. A partir del análisis transcriptómico se comprobó que todos los componentes celulares del estroma del hígado son capaces de responder a diferentes estímulos inflamatorios y actuar como posibles intermediarios de diferentes señales inflamatorias en las que destaca la respuesta de interferón gamma, factor de necrosis tumoral, diferentes

interleucinas inflamatorias y TLR4. Este último es de gran relevancia para nuestro estudio experimental ya que, aunque no se obtuvieron diferencias significativas en los tratamientos de LPS en presencia del cordón umbilical, no se descarta que la respuesta pueda ser diferente con el estroma de hígado fetal.

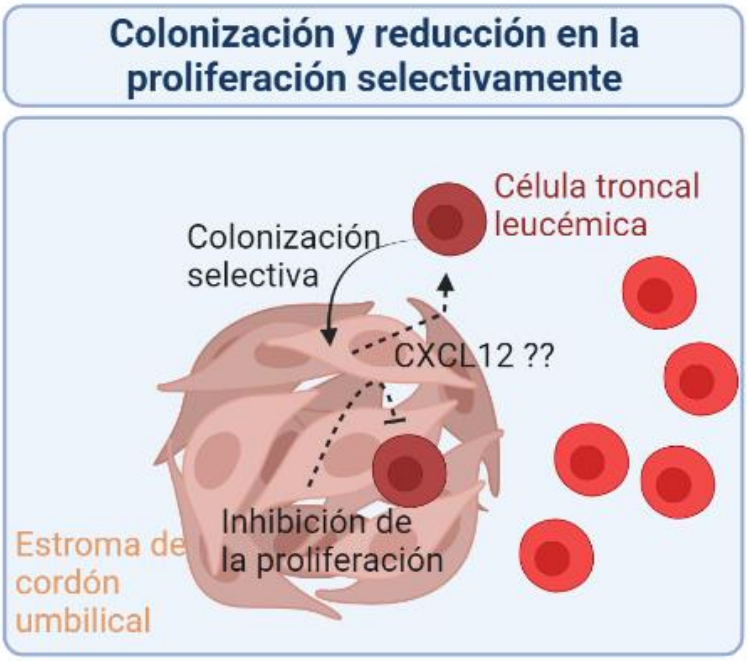
Adicionalmente, se realizó una predicción de las interacciones célula-célula entre el estroma de hígado fetal y las HSC/MPP de los diferentes orígenes. Este análisis comprobó que las interacciones celulares entre el estroma hematopoyético fetal con las HSC/MPP, presuntivamente, diferente con las provenientes de las médulas óseas que con respecto a las propias del FL con algunas diferencias entre ellas.



La proliferación de las células leucémicas disminuye de manera significativa en presencia del estroma de cordón umbilical. El caso de la línea celular Nalm6, esta es menor solamente dentro del esferoide, mientras que la línea celular RS4;11 disminuye significativamente dentro y fuera del esferoide. En este punto, es importante aclarar las implicaciones biológicas que tienen cada uno de los

microambientes modelados, en primer lugar las células leucémicas que se encuentran libre de estroma representan nuestro control de máxima proliferación, ya que no se encuentran expuestos a ninguna señal que indique lo contrario, en segundo lugar tenemos las células leucémicas que crecen fuera del esferoide, las cuales serán influenciadas por algunos factores del esferoide y por último las células dentro de, que significa que son células con la capacidad de migrar a un ambiente diferente, hipóxico, el cual reducirá su capacidad de proliferación. Adicionalmente se ha comprobado por el Dr. Juan Carlos Balandrán, que las células que residen dentro del esferoide tienen una mayor capacidad de reconstituir la leucemia en xenotrasplantes, sugiriendo que no solamente son células malignas, sino que también, es este nicho pueden residir las células iniciadoras de leucemia.

Este comportamiento puede ser explicado debido a que el estroma de cordón umbilical comparte similitudes con las células mesenquimales de la médula ósea. Este expresa factores como CXCL12 y el factor de célula troncal que promueven la migración y quiescencia de HSC dentro de la población de células leucémicas.



Conclusión

El perfil transcriptómica de las tres fuentes de células hematopoyéticas sugiere una similitud entre las células HSC del hígado fetal y médula ósea normal, respecto al mantenimiento de marcadores de reconstitución hematopoyética a largo plazo y de marcadores de compromiso hacia la diferenciación mieloide con una expresión moderada-baja de CXCR4. Además, ambas poblaciones mantienen una señalización de galectina autocrina. Algunas importancias importantes son la clara disminución de la expresión de proteínas de choque térmico y un incremento en las interacciones con moléculas de adhesión celular en las células HSC de la médula ósea.

Una de las principales diferencias entre las células HSC leucémicas de sus contrapartes normales posnatal y prenatal, es una importante ganancia de marcadores de compromiso a linaje B y pérdida total de marcadores de compromiso mieloide a pesar de mantener un estado de proliferación baja y un estado proinflamatorio similar a su contra parte normal. NF-kB fue la única vía de señalización que tuvo un puntaje de enriquecimiento similar a las HSC del FL.

El microambiente estromal del cordón umbilical regula de forma selectiva la proliferación de una subpoblación de células leucémicas. Aunque el efecto del LPS en la proliferación de las subpoblaciones de células leucémicas seleccionadas por el estroma de cordón umbilical requiere retomarse y probar el efecto de este con diferentes componentes celulares microambientales.

En conclusión, el perfil inflamatorio y las interacciones celulares putativas entre las HSC leucémicas y el microambiente perinatal mantienen mayores similitudes con su contraparte normal postnatal que con respecto al prenatal.

Referencias

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. cancer* **136**, E359-86 (2015).
2. Bray, F., Ren, J.-S., Masuyer, E. & Ferlay, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* **132**, 1133–1145 (2013).
3. Antoni, S., Soerjomataram, I., Møller, B., Bray, F. & Ferlay, J. An assessment of GLOBOCAN methods for deriving national estimates of cancer incidence. *Bull. World Health Organ.* **94**, 174–184 (2016).
4. Zhang, H.-H. *et al.* Genetic variants and clinical significance of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Ann. Transl. Med.* **7**, (2019).
5. Quiroz, E. *et al.* The emerging story of acute lymphoblastic leukemia among the Latin American population – biological and clinical implications. *Blood Rev.* **33**, 98–105 (2019).
6. Greaves, M. F., Maia, A. T., Wiemels, J. L. & Ford, A. M. Review article Leukemia in twins : lessons in natural history. *Blood* **102**, 2321–2333 (2003).
7. Pinho, S. & Frenette, P. S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 303–320 (2019).
8. Kaushansky, K. *et al. Williams Hematology*. (Mc Graw Hill, 2016).
9. Mikkola, H. K. A. & Orkin, S. H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733–3744 (2006).
10. Hoffman, R. *et al. Hematology. Basic principles and practice.* (2018).
11. Martin, M. A. & Bhatia, M. Analysis of the Human Fetal Liver Hematopoietic Microenvironment. *Stem Cells Dev.* **14**, 493–504 (2005).
12. Schwanbeck, R. & Just, U. The Notch signaling pathway in hematopoiesis and hematologic malignancies. *Haematologica* **96**, 1735 (2011).
13. Kim, S.-J. & Letterio, J. Transforming growth factor-β signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk. 2003 179* **17**, 1731–1737 (2003).
14. Biology, C. & Cross, G. R. Concise review : CXCR4 / CXCL12 signaling in immature hematopoiesis — lessons from pharmacological and genetic models. *Stem Cells* **33**, 2391–2399 (2015).
15. Lee, D., Kim, D. W. & Cho, J. Y. Role of growth factors in hematopoietic stem cell niche. *Cell Biol. Toxicol.* **36**, 131–144 (2020).
16. Clapes, T., Lefkopoulos, S. & Trompouki, E. Stress and non-stress roles of inflammatory signals during HSC emergence and maintenance. *Front. Immunol.* **7**, 1–15 (2016).
17. M, Y. & E, P. TNF-α Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration. *Cell Stem Cell* **25**, 357-372.e7 (2019).

18. Secretaria de Salud, M. Comunicado de prensa No.055: La leucemia representa el 50 por ciento de los casos de cáncer infantil | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. *Gobierno de México* https://www.gob.mx/salud/prensa/055-la-leucemia-representa-el-50-por-ciento-de-los-casos-de-cancer-infantil (2019).

19. INEGI. Comunicación Social 4 de Febrero, Día Mundial contra el Cáncer. *Comunicado de prensa no. 61/18 INEGI* vol. 61/18 13 (2018).

20. Caron, M. *et al.* Single-cell analysis of childhood leukemia reveals a link between developmental states and ribosomal protein expression as a source of intra-individual heterogeneity. *Sci. Rep.* **10**, 1–12 (2020).

21. Ford, A. M. *et al.* In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* **363**, 358–360 (1993).

22. Greaves, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 471–484 (2018).

23. Greaves, M. F. & Wiemels, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 639–649 (2003).

24. Mori, H. *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8242–7 (2002).

25. Schäfer, D. *et al.* Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood* **131**, 821–826 (2018).

26. Lausten-thomsen, U., Madsen, H. O., Vestergaard, T. R., Hjalgrim, H. & Nersting, J. Prevalence of t (12 ; 21)[ETV6-RUNX1]– positive cells in healthy neonates. *Blood* **117**, 186–190 (2016).

27. Vilchis-Ordoñez, A., Ramírez-Ramírez, D. & Pelayo, R. The triad inflammation-microenvironment-tumor initiating cells in leukemia progression. *Curr. Opin. Physiol.* **19**, 211–218 (2021).

28. Welner, R. S. *et al.* Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* **112**, 3753–3761 (2008).

29. Takizawa, H., Boettcher, S. & Manz, M. G. Review article Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. **119**, 2991–3002 (2012).

30. Zambetti, N. A. *et al.* Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Cell Stem Cell* **19**, 613–627 (2016).

31. Juan Carlos, B. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Niche Functions in the Biology of Leukemia Initiating Cells of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. (CINVESTAV, CDMX, 2018).

32. Hemberg, M. *et al.* Analysis of single cell RNA-seq data. *2021-07-23* https://www.singlecellcourse.org/ (2021).

33. See, P., Lum, J., Chen, J. & Ginhoux, F. A Single-Cell Sequencing Guide for Immunologists. *Front. Immunol.* **0**, 2425 (2018).

34. Wu, Y. & Zhang, K. Tools for the analysis of high-dimensional single-cell RNA sequencing data. *Nat. Rev. Nephrol.* **16**, 408–421 (2020).

35. Gottardo, R., Hicks, S., Lun, A. & Amezquita, R. *Orchestrating Single-Cell Analysis with Bioconductor*. (Bioconductor, 2021).

36. Hwang, B., Lee, J. H. & Bang, D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1–14 (2018).

37. Cell-Cycle Scoring and Regression. https://satijalab.org/seurat/archive/v3.1/cell_cycle_vignette.html.

38. Pearce, A. & Coenen, A. Understanding UMAP. https://pair-code.github.io/understanding-umap/.

39. Popescu, D.-M. *et al.* Decoding human fetal liver haematopoiesis. *Nature* **574**, 365–371 (2019).

40. Stuart, T. *et al.* Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **177**, 1888-1902.e21 (2019).

41. Korsunsky, I. *et al.* Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat. Methods* **16**, 1289–1296 (2019).

42. Jin, S. *et al.* Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nat. Commun.* **12**, 1088 (2021).

43. Taussig, D. C. *et al.* Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: Implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* **106**, 4086–4092 (2005).

44. Strobl, H. *et al.* Myeloperoxidase expression in CD34+ normal human hematopoietic cells. *Blood* **82**, 2069–2078 (1993).

45. Attar, E. C. & Scadden, D. T. Regulation of hematopoietic stem cell growth. *Leukemia* **18**, 1760–1768 (2004).

46. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Mouse MRP8 and MRP14, two intracellular calcium-binding proteins associated with the development of the myeloid lineage. *Blood* **79**, 1907–1915 (1992).

47. Donato, R. *et al.* Functions of S100 Proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**, 24–57 (2012).

48. Fan, G.-C. Genetics of Stem Cells, Part A. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **111**, 305–22 (2012).

49. Nie, Y., Han, Y. C. & Zou, Y. R. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 777–783 (2008).

50. Zhang, Y. *et al.* CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).

51. Takubo, K. *et al.* Regulation of the HIF-1α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 391–402 (2010).

52. Dengler, V. L., Galbraith, M. D. & Espinosa, J. M. Transcriptional regulation by

hypoxia inducible factors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49**, 1–15 (2014).

53. Madan, A., Varma, S. & Cohen, H. J. Developmental stage-specific expression of the α and β subunits of the HIF-1 protein in the mouse and human fetus. *Mol. Genet. Metab.* **75**, 244–249 (2002).

54. Eng, V. M. *et al.* The stimulatory effects of interleukin (IL)-12 on hematopoiesis are antagonized by IL-12-induced interferon γ in vivo. *J. Exp. Med.* **181**, 1893–1898 (1995).

55. Ekmekcioglu, S., Kurzrock, R. & Grimm, E. A. Hematopoietic Growth Factors and Cytokines. *Mol. Basis Cancer Fourth Ed.* (2015) doi:10.1016/B978-1-4557-4066-6.00057-3.

56. Wajant, H. & Siegmund, D. TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 1–14 (2019).

57. Grossmann, M. *et al.* The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11848–11853 (1999).

58. Zhao, C. *et al.* Noncanonical NF-κB signaling regulates hematopoietic stem cell self-renewal and microenvironment interactions. *Stem Cells* **30**, 709–718 (2012).

59. Touw, I. P., Valkhof, M., Erkeland, S. J., Meijers, K. & Danen-van Oorschot, A. Expression of G-CSF Receptor during Embryonic Development in a Csf3r-Cre Knock-In Mouse Model. *Blood* **110**, 2233–2233 (2007).

60. Guo, L., Cui, Z. M., Zhang, J. & Huang, Y. Chemokine axes CXCL12/CXCR4 and CXCL16/CXCR6 correlate with lymph node metastasis in epithelial ovarian carcinoma. *Chin. J. Cancer* **30**, 336–343 (2011).

61. Weizmann Institute of Science. ACKR3. *GeneCards* https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACKR3&keywords=ACKR3 (2021).

62. Corthals, S. L. *et al.* Differential immune effects mediated by Toll-like receptors stimulation in precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **132**, 452–458 (2006).

63. Chen, D. *et al.* Expression and role of Toll-like receptors on human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **15**, 423–433 (2013).

64. Bagratuni, T. *et al.* Toll-Like Receptor 4 Activation Promotes Multiple Myeloma Cell Growth and Survival Via Suppression of The Endoplasmic Reticulum Stress Factor Chop. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).

65. Bohnhorst, J. *et al.* Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* **20**, 1138–1144 (2006).

66. Ziegler, P., Boettcher, S., Takizawa, H., Manz, M. G. & Brümmendorf, T. H. LPS-stimulated human bone marrow stroma cells support myeloid cell development and progenitor cell maintenance. *Ann. Hematol.* **95**, 173–178 (2016).

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. cancer* **136**, E359-86 (2015).

2. Bray, F., Ren, J.-S., Masuyer, E. & Ferlay, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* **132**, 1133–1145 (2013).

3. Antoni, S., Soerjomataram, I., Møller, B., Bray, F. & Ferlay, J. An assessment of GLOBOCAN methods for deriving national estimates of cancer incidence. *Bull. World Health Organ.* **94**, 174–184 (2016).

4. Zhang, H.-H. *et al.* Genetic variants and clinical significance of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Ann. Transl. Med.* **7**, (2019).

5. Quiroz, E. *et al.* The emerging story of acute lymphoblastic leukemia among the Latin American population – biological and clinical implications. *Blood Rev.* **33**, 98–105 (2019).

6. Greaves, M. F., Maia, A. T., Wiemels, J. L. & Ford, A. M. Review article Leukemia in twins : lessons in natural history. *Blood* **102**, 2321–2333 (2003).

7. Pinho, S. & Frenette, P. S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 303–320 (2019).

8. Kaushansky, K. *et al. Williams Hematology*. (Mc Graw Hill, 2016).

9. Mikkola, H. K. A. & Orkin, S. H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733–3744 (2006).

10. Hoffman, R. *et al. Hematology. Basic principles and practice.* (2018).

11. Martin, M. A. & Bhatia, M. Analysis of the Human Fetal Liver Hematopoietic Microenvironment. *Stem Cells Dev.* **14**, 493–504 (2005).

12. Schwanbeck, R. & Just, U. The Notch signaling pathway in hematopoiesis and hematologic malignancies. *Haematologica* **96**, 1735 (2011).

13. Kim, S.-J. & Letterio, J. Transforming growth factor-β signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk. 2003 179* **17**, 1731–1737 (2003).

14. Biology, C. & Cross, G. R. Concise review : CXCR4 / CXCL12 signaling in immature hematopoiesis — lessons from pharmacological and genetic models. *Stem Cells* **33**, 2391–2399 (2015).

15. Lee, D., Kim, D. W. & Cho, J. Y. Role of growth factors in hematopoietic stem cell niche. *Cell Biol. Toxicol.* **36**, 131–144 (2020).

16. Clapes, T., Lefkopoulos, S. & Trompouki, E. Stress and non-stress roles of inflammatory signals during HSC emergence and maintenance. *Front. Immunol.* **7**, 1–15 (2016).

17. M, Y. & E, P. TNF-α Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration. *Cell Stem Cell* **25**, 357-372.e7 (2019).

18. Secretaria de Salud, M. Comunicado de prensa No.055: La leucemia representa el 50 por ciento de los casos de cáncer infantil | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. *Gobierno de México* https://www.gob.mx/salud/prensa/055-la-leucemia-representa-el-50-por-ciento-de-los-casos-de-cancer-infantil (2019).

19. INEGI. Comunicación Social 4 de Febrero, Día Mundial contra el Cáncer.

Comunicado de prensa no. 61/18 INEGI vol. 61/18 13 (2018).

20. Caron, M. *et al.* Single-cell analysis of childhood leukemia reveals a link between developmental states and ribosomal protein expression as a source of intra-individual heterogeneity. *Sci. Rep.* **10**, 1–12 (2020).

21. Ford, A. M. *et al.* In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* **363**, 358–360 (1993).

22. Greaves, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 471–484 (2018).

23. Greaves, M. F. & Wiemels, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 639–649 (2003).

24. Mori, H. *et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8242–7 (2002).

25. Schäfer, D. *et al.* Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood* **131**, 821–826 (2018).

26. Lausten-thomsen, U., Madsen, H. O., Vestergaard, T. R., Hjalgrim, H. & Nersting, J. Prevalence of t (12 ; 21)[ETV6-RUNX1]– positive cells in healthy neonates. *Blood* **117**, 186–190 (2016).

27. Vilchis-Ordoñez, A., Ramírez-Ramírez, D. & Pelayo, R. The triad inflammation-microenvironment-tumor initiating cells in leukemia progression. *Curr. Opin. Physiol.* **19**, 211–218 (2021).

28. Welner, R. S. *et al.* Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* **112**, 3753–3761 (2008).

29. Takizawa, H., Boettcher, S. & Manz, M. G. Review article Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. **119**, 2991–3002 (2012).

30. Zambetti, N. A. *et al.* Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Cell Stem Cell* **19**, 613–627 (2016).

31. Juan Carlos, B. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Niche Functions in the Biology of Leukemia Initiating Cells of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. (CINVESTAV, CDMX, 2018).

32. Hemberg, M. *et al.* Analysis of single cell RNA-seq data. *2021-07-23* https://www.singlecellcourse.org/ (2021).

33. See, P., Lum, J., Chen, J. & Ginhoux, F. A Single-Cell Sequencing Guide for Immunologists. *Front. Immunol.* **0**, 2425 (2018).

34. Wu, Y. & Zhang, K. Tools for the analysis of high-dimensional single-cell RNA sequencing data. *Nat. Rev. Nephrol.* **16**, 408–421 (2020).

35. Gottardo, R., Hicks, S., Lun, A. & Amezquita, R. *Orchestrating Single-Cell Analysis with Bioconductor*. (Bioconductor, 2021).

36. Hwang, B., Lee, J. H. & Bang, D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1–14 (2018).

37. Cell-Cycle Scoring and Regression. https://satijalab.org/seurat/archive/v3.1/cell_cycle_vignette.html.

38. Pearce, A. & Coenen, A. Understanding UMAP. https://pair-code.github.io/understanding-umap/.

39. Popescu, D.-M. *et al.* Decoding human fetal liver haematopoiesis. *Nature* **574**, 365–371 (2019).

40. Stuart, T. *et al.* Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **177**, 1888-1902.e21 (2019).

41. Korsunsky, I. *et al.* Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat. Methods* **16**, 1289–1296 (2019).

42. Jin, S. *et al.* Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nat. Commun.* **12**, 1088 (2021).

43. Taussig, D. C. *et al.* Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: Implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* **106**, 4086–4092 (2005).

44. Strobl, H. *et al.* Myeloperoxidase expression in CD34+ normal human hematopoietic cells. *Blood* **82**, 2069–2078 (1993).

45. Attar, E. C. & Scadden, D. T. Regulation of hematopoietic stem cell growth. *Leukemia* **18**, 1760–1768 (2004).

46. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Mouse MRP8 and MRP14, two intracellular calcium-binding proteins associated with the development of the myeloid lineage. *Blood* **79**, 1907–1915 (1992).

47. Donato, R. *et al.* Functions of S100 Proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**, 24–57 (2012).

48. Fan, G.-C. Genetics of Stem Cells, Part A. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **111**, 305–22 (2012).

49. Nie, Y., Han, Y. C. & Zou, Y. R. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 777–783 (2008).

50. Zhang, Y. *et al.* CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).

51. Takubo, K. *et al.* Regulation of the HIF-1α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 391–402 (2010).

52. Dengler, V. L., Galbraith, M. D. & Espinosa, J. M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49**, 1–15 (2014).

53. Madan, A., Varma, S. & Cohen, H. J. Developmental stage-specific expression of the α and β subunits of the HIF-1 protein in the mouse and human fetus. *Mol. Genet. Metab.* **75**, 244–249 (2002).

54. Eng, V. M. *et al.* The stimulatory effects of interleukin (IL)-12 on hematopoiesis are antagonized by IL-12-induced interferon γ in vivo. *J. Exp. Med.* **181**, 1893–1898 (1995).

55. Ekmekcioglu, S., Kurzrock, R. & Grimm, E. A. Hematopoietic Growth Factors and Cytokines. *Mol. Basis Cancer Fourth Ed.* (2015) doi:10.1016/B978-1-4557-4066-6.00057-3.

56. Wajant, H. & Siegmund, D. TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death balance of macrophages. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 1–14 (2019).

57. Grossmann, M. *et al.* The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11848–11853 (1999).

58. Zhao, C. *et al.* Noncanonical NF-κB signaling regulates hematopoietic stem cell self-renewal and microenvironment interactions. *Stem Cells* **30**, 709–718 (2012).

59. Touw, I. P., Valkhof, M., Erkeland, S. J., Meijers, K. & Danen-van Oorschot, A. Expression of G-CSF Receptor during Embryonic Development in a Csf3r-Cre Knock-In Mouse Model. *Blood* **110**, 2233–2233 (2007).

60. Guo, L., Cui, Z. M., Zhang, J. & Huang, Y. Chemokine axes CXCL12/CXCR4 and CXCL16/CXCR6 correlate with lymph node metastasis in epithelial ovarian carcinoma. *Chin. J. Cancer* **30**, 336–343 (2011).

61. Weizmann Institute of Science. ACKR3. *GeneCards* https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACKR3&keywords=ACKR3 (2021).

62. Corthals, S. L. *et al.* Differential immune effects mediated by Toll-like receptors stimulation in precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **132**, 452–458 (2006).

63. Chen, D. *et al.* Expression and role of Toll-like receptors on human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **15**, 423–433 (2013).

64. Bagratuni, T. *et al.* Toll-Like Receptor 4 Activation Promotes Multiple Myeloma Cell Growth and Survival Via Suppression of The Endoplasmic Reticulum Stress Factor Chop. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).

65. Bohnhorst, J. *et al.* Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* **20**, 1138–1144 (2006).

66. Ziegler, P., Boettcher, S., Takizawa, H., Manz, M. G. & Brümmendorf, T. H. LPS-stimulated human bone marrow stroma cells support myeloid cell development and progenitor cell maintenance. *Ann. Hematol.* **95**, 173–178 (2016).

Recursos suplementarios

Scripts

Scripts 1

```
library(dplyr)

library(ggpubr)

library(ggplot2)

library(datasets)

##Import datasets

# Convert dose as a factor and recode the levels

levels_df <- unique(Fluorescencia_esferoides_fotos$LPS)

Fluorescencia_esferoides_fotos$LPS <- factor(Fluorescencia_esferoides_fotos$LPS,

                    levels = levels_df,

                    labels = c("control", "0.05 ng/ml", "0.1 ng/ml", "0.5 ng/ml",
"1 ng/ml", "10 ng/ml", "50 ng/ml"))

# Convert dose as a factor and recode the levels

FS.df48 <- subset(Fluorescencia_esferoides_fotos, time == "48h")

FS.df96 <- subset(Fluorescencia_esferoides_fotos, time == "96h")

FS.dfNalm6 <- subset(Fluorescencia_esferoides_fotos, cell == "Nalm6")

FS.dfRS4 <- subset(Fluorescencia_esferoides_fotos, cell == "RS4")

FS.dfNalm648 <- subset(FS.dfNalm6, time == "48h")

FS.dfNalm696 <- subset(FS.dfNalm6, time == "96h")

FS.dfRS448 <- subset(FS.dfRS4, time == "48h")

FS.dfRS496 <- subset(FS.dfRS4, time == "96h")


##Visualize data

ggboxplot(FS.dfNalm648, x = "LPS", y = "CIntDen", color = "cell",

       add = c("mean_se", "dotplot"),

       palette = c("#D74880"), main = "Fluorescence of Nalm6 per sferoid, 48 h",
point.size = 2) + expand_limits(y=c(0, 600000000))


ggboxplot(FS.dfNalm696, x = "LPS", y = "CIntDen", color = "cell",

          add = c("mean_se", "dotplot"),

          palette = c("#D74880"), main = "Fluorescence of Nalm6 per sferoid, 96
h", point.size = 2) + expand_limits(y=c(0, 600000000))



ggboxplot(FS.dfRS448, x = "LPS", y = "CIntDen", color = "cell",
```

```
          add = c("mean_se", "dotplot"),
          palette = c("#64DC96"), main = "Fluorescence of RS4 per sferoid, 48 h",
point.size = 2) + expand_limits(y=c(0, 600000000))


ggboxplot(FS.dfRS496, x = "LPS", y = "CIntDen", color = "cell",
          add = c("mean_se", "dotplot"),
          palette = c("#64DC96"), main = "Fluorescenceof of RS4 per sferoid, 96
h", point.size = 2) + expand_limits(y=c(0, 600000000))


###ANOVA test vs time
Nalm6.ANOVA <- aov(CIntDen ~ time * LPS, data = FS.dfNalm6)
summary(Nalm6.ANOVA)
plot(Nalm6.ANOVA, 1)
leveneTest(CIntDen ~ time * LPS, data = FS.dfNalm6)
plot(Nalm6.ANOVA, 2)
aov_residualsNalm6 <- residuals(object = Nalm6.ANOVA)
shapiro.test(x = aov_residualsNalm6 )

TukeyHSD(Nalm6.ANOVA, which ="time")
TukeyHSD(Nalm6.ANOVA, which ="LPS")

RS4.ANOVA <- aov(CIntDen ~ time * LPS, data = FS.dfRS4)
summary(RS4.ANOVA)
plot(RS4.ANOVA, 1)
leveneTest(CIntDen ~ time * LPS, data = FS.dfRS4)
plot(RS4.ANOVA, 2)
aov_residualsRS4 <- residuals(object = RS4.ANOVA)
shapiro.test(x = aov_residualsRS4 )

TukeyHSD(RS4.ANOVA, which ="time")
TukeyHSD(RS4.ANOVA, which ="LPS")

###ANOVA test vs cell
FS48.ANOVA <- aov(CIntDen ~ cell * LPS, data = FS.df48)
summary(FS48.ANOVA)
plot(FS48.ANOVA, 1)
leveneTest(CIntDen ~ time * LPS, data = FS.df48)
```

```
plot(FS48.ANOVA, 2)
aov_residualsNalm6 <- residuals(object = FS48.ANOVA)
shapiro.test(x = aov_residualsNalm6 )

TukeyHSD(FS48.ANOVA, which ="cell")
TukeyHSD(FS48.ANOVA, which ="LPS")

FS96.ANOVA <- aov(CIntDen ~ cell * LPS, data = FS.df96)
summary(FS96.ANOVA)
plot(FS96.ANOVA, 1)
leveneTest(CIntDen ~ time * LPS, data = FS.df96)
plot(FS96.ANOVA, 2)
aov_residualsNalm6 <- residuals(object = FS96.ANOVA)
shapiro.test(x = aov_residualsNalm6 )

TukeyHSD(FS96.ANOVA, which ="cell")
TukeyHSD(FS96.ANOVA, which ="LPS")

################################################################################
##################
#---Scheirer-Ray-Hare test (NON PARAMETRIC)
################################################################################
####################################
##Rank variables
RankC <- rank(FS.dfNalm6$CIntDen)
time<- (FS.dfNalm6$time)
LPS <- (FS.dfNalm6$LPS)
Nalm6_Rank <- data.frame(RankC, time, LPS)
levels_Nalm6 <- unique(Nalm6_Rank$LPS)
Nalm6_Rank$LPS <- factor(Nalm6_Rank$LPS,
                         levels = levels_Nalm6,
                         labels = c("control", "0.05 ng/ml", "0.1 ng/ml", "0.5
ng/ml", "1 ng/ml", "10 ng/ml", "50 ng/ml"))

##Test
Nalm6.aov <- aov(RankC ~ time * LPS, data = Nalm6_Rank)
summary(Nalm6.aov)
TukeyHSD(Nalm6.aov, which ="time")
```

```
TukeyHSD(Nalm6.aov, which ="LPS")


##RS4 vs time
RankC <- rank(FS.dfRS4$CIntDen)
time<- (FS.dfRS4$time)
LPS <- (FS.dfRS4$LPS)
RS4_Rank <- data.frame(RankC, time, LPS)
levels_RS4 <- unique(RS4_Rank$LPS)
RS4_Rank$LPS <- factor(RS4_Rank$LPS,
                       levels = levels_RS4,
                       labels = c("control", "0.05 ng/ml", "0.1 ng/ml", "0.5
ng/ml", "1 ng/ml", "10 ng/ml", "50 ng/ml"))


##Test
RS4.aov <- aov(RankC ~ time * LPS, data = RS4_Rank)
summary(RS4.aov)
TukeyHSD(RS4.aov, which ="time")
TukeyHSD(RS4.aov, which ="LPS")


####48h between cells


##Rank variables
RankC <- rank(FS.df48$CIntDen)
cell<- (FS.df48$cell)
LPS <- (FS.df48$LPS)
FS48_Rank <- data.frame(RankC, cell, LPS)
levels_FS48 <- unique(FS48_Rank$LPS)
Nalm6_Rank$LPS <- factor(FS48_Rank$LPS,
                         levels = levels_FS48,
                         labels = c("control", "0.05 ng/ml", "0.1 ng/ml", "0.5
ng/ml", "1 ng/ml", "10 ng/ml", "50 ng/ml"))


##Test
FS48.aov <- aov(RankC ~ cell * LPS, data = FS48_Rank)
summary(FS48.aov)
TukeyHSD(FS48.aov, which ="cell")
TukeyHSD(FS48.aov, which ="LPS")
```

```
####96h between cells


##Rank variables
RankC <- rank(FS.df96$CIntDen)
cell<- (FS.df96$cell)
LPS <- (FS.df96$LPS)
FS96_Rank <- data.frame(RankC, cell, LPS)
levels_FS96 <- unique(FS96_Rank$LPS)
Nalm6_Rank$LPS <- factor(FS96_Rank$LPS,
                         levels = levels_FS96,
                         labels = c("control", "0.05 ng/ml", "0.1 ng/ml", "0.5
ng/ml", "1 ng/ml", "10 ng/ml", "50 ng/ml"))


##Test
FS96.aov <- aov(RankC ~ cell * LPS, data = FS96_Rank)
summary(FS96.aov)
TukeyHSD(FS96.aov, which ="cell")
TukeyHSD(FS96.aov, which ="LPS")
```

Scripts 2

```
library(dplyr)
library(ggpubr)
library(car)
##Import datasets

# Convert dose as a factor and recode the levels
levels_Nalm6 <- unique(Nalm6$LPS)
Nalm6$LPS <- factor(Nalm6$LPS,
                    levels = levels_Nalm6,
                    labels = c("control", "0.05 ng/ml", "0.1 ng/ml", "0.5
ng/ml", "1 ng/ml", "10 ng/ml", "50 ng/ml"))
#Frequency table
table(Nalm6$stroma, Nalm6$LPS)

##Visualize data
```

```
ggline(Nalm6, x = "LPS", y = "k", color = "stroma",
       add = c("mean_se", "dotplot"), ###With standar error
       palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "#FC67A2"), main = "Nalm6",
point.size = 2)
###ANOVA test
Nalm6.ANOVA <- aov(k ~ stroma * LPS, data = Nalm6)
summary(Nalm6.ANOVA)
plot(Nalm6.ANOVA, 1)
leveneTest(k ~ stroma * LPS, data = Nalm6)
plot(Nalm6.ANOVA, 2)
aov_residualsNalm6 <- residuals(object = Nalm6.ANOVA)
shapiro.test(x = aov_residualsNalm6 )

##If require know the mean, sd, se ...
#group_by(Nalm6, stroma, LPS) %>%
#  summarise(
#    count = n(),
#    mean = mean(k, na.rm = TRUE),
#    sd = sd(k, na.rm = TRUE)
#  )

###Tukey multiple pairwise comparition
TukeyHSD(Nalm6.ANOVA, which ="stroma")
TukeyHSD(Nalm6.ANOVA, which ="LPS")

# Convert dose as a factor and recode the levels
levels_RS4 <- unique(RS4$LPS)
RS4$LPS <- factor(RS4$LPS,
                  levels = levels_RS4,
                  labels = c("control", "0.05 ng/ml", "0.1 ng/ml", "0.5
ng/ml", "1 ng/ml", "10 ng/ml", "50 ng/ml"))
#Frequency table
table(RS4$stroma, RS4$LPS)

##Visualize data
```

```
ggline(RS4, x = "LPS", y = "k", color = "stroma",
       add = c("mean_se", "dotplot"), ###With standar error
       palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "#FC67A2"), main = "RS4;11",
point.size = 2)
###ANOVA test
RS4.ANOVA <- aov(k ~ stroma * LPS, data = RS4)
summary(RS4.ANOVA)


##If require know the mean, sd, se ...
#group_by(RS4, stroma, LPS) %>%
#  summarise(
#    count = n(),
#    mean = mean(k, na.rm = TRUE),
#    sd = sd(k, na.rm = TRUE)
#  )


###Tukey multiple pairwise comparition
TukeyHSD(RS4.ANOVA, which ="stroma")
TukeyHSD(RS4.ANOVA, which ="LPS")
plot(RS4.ANOVA, 1)
leveneTest(k ~ stroma * LPS, data = RS4)
plot(RS4.ANOVA, 2)
aov_residualsRS4 <- residuals(object = RS4.ANOVA)
shapiro.test(x = aov_residualsRS4 )


##############################################################################
###########################################
#---Scheirer-Ray-Hare test (NON PARAMETRIC)
##############################################################################
###########################################
##Rank variables
Rankk <- rank(Nalm6$k)
stroma<- (Nalm6$stroma)
LPS <- (Nalm6$LPS)
Nalm6_Rank <- data.frame(Rankk, stroma, LPS)
```

```
levels_Nalm6 <- unique(Nalm6_Rank$LPS)
Nalm6_Rank$LPS <- factor(Nalm6_Rank$LPS,
                     levels = levels_Nalm6,
                     labels = c("control", "0.05 ng/ml", "0.1 ng/ml", "0.5
ng/ml", "1 ng/ml", "10 ng/ml", "50 ng/ml"))

##Test
Nalm6.aov <- aov(Rankk ~ stroma * LPS, data = Nalm6_Rank)
summary(Nalm6.aov)
TukeyHSD(Nalm6.aov, which ="stroma")
TukeyHSD(Nalm6.aov, which ="LPS")

##Rank variables
Rankk <- rank(RS4$k)
stroma<- (RS4$stroma)
LPS <- (RS4$LPS)
RS4_Rank <- data.frame(Rankk, stroma, LPS)
levels_RS4 <- unique(RS4_Rank$LPS)
RS4_Rank$LPS <- factor(RS4_Rank$LPS,
                       levels = levels_RS4,
                       labels = c("control", "0.05 ng/ml", "0.1 ng/ml",
"0.5 ng/ml", "1 ng/ml", "10 ng/ml", "50 ng/ml"))

##Test
RS4.aov <- aov(Rankk ~ stroma * LPS, data = RS4_Rank)
summary(RS4.aov)
TukeyHSD(RS4.aov, which ="stroma")
TukeyHSD(RS4.aov, which ="LPS")
```

Scripts 3

```
NUMBER,SAMPLE,SAMPLE_ID,TISSUE,GENDER,TYPE,AGE,
1,FL1_cd45n,4834STDY7002878,FETAL_LIVER,MALE,HEALTHY,FL,8W
2,FL1_cd45p,4834STDY7002877,FETAL_LIVER,MALE,HEALTHY,FL,8W
3,FL2_cd45n,4834STDY7038751,FETAL_LIVER,MALE,HEALTHY,FL,9W
4,FL2_cd45p,4834STDY7038750,FETAL_LIVER,MALE,HEALTHY,FL,9W
```

```
5,FL3_cd45n,FCAImmP7198629,FETAL_LIVER,FEMALE,HEALTHY,Fl,9W
6,FL3_cd45p,FCAImmP7198628,FETAL_LIVER,FEMALE,HEALTHY,FL,9W
7,FL4_cd45n,FCAImmP7316892,FETAL_LIVER,FEMALE,HEALTHY,FL,9W
8,FL4_cd45p,FCAImmP7316889,FETAL_LIVER,FEMALE,HEALTHY,FL,9W
9,LBM1,ETV6-RUNX1_1,BONE_MARROW,LEUKEMIC,MALE,LBM,5.8Y
10,LBM2,ETV6-RUNX1_2,BONE_MARROW,LEUKEMIC,MALE,LBM,5.8Y
11,LBM3,ETV6-RUNX1_3,BONE_MARROW,LEUKEMIC,MALE,LBM,5.8Y
12,LBM4,ETV6-RUNX1_4,BONE_MARROW,LEUKEMIC,MALE,LBM,5.8Y
13,NBM1,PBMMC_1,BONE_MARROW,HEALTHY,MALE,NBM,2.7Y
14,NBM2,PBMMC_2,BONE_MARROW,HEALTHY,MALE,NBM,2.7Y
15,NBM3,PBMMC_3,BONE_MARROW,HEALTHY,MALE,NBM,2.7Y
```

Scripts 4

```
library(dplyr)
library(SingleCellExperiment)
library(Seurat)
library(scater)
library(stringr)
library(tidyverse)


###Load files


FL3_cd45n.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL3_cd45n/GRCh38")
FL3_cd45p.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL3_cd45p/GRCh38")
FL4_cd45n.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL4_cd45n/GRCh38")
FL4_cd45p.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL4_cd45p/GRCh38")



colnames(FL3_cd45p.data) <- paste("FL3_cd45p", colnames(FL3_cd45p.data),
sep = "_")
colnames(FL3_cd45n.data) <- paste("FL3_cd45n", colnames(FL3_cd45n.data),
sep = "_")
colnames(FL4_cd45p.data) <- paste("FL4_cd45p", colnames(FL4_cd45p.data),
sep = "_")
```

```
colnames(FL4_cd45n.data) <- paste("FL4_cd45n", colnames(FL4_cd45n.data),
sep = "_")



###Create Seurat object


FL3_cd45n <- CreateSeuratObject(counts = FL3_cd45n.data, project = "FL")

FL3_cd45p <- CreateSeuratObject(counts = FL3_cd45p.data, project = "FL")

FL4_cd45n <- CreateSeuratObject(counts = FL4_cd45n.data, project = "FL")

FL4_cd45p <- CreateSeuratObject(counts = FL4_cd45p.data, project = "FL")

rm(FL1_cd45n.data, FL1_cd45p.data, FL2_cd45n.data, FL2_cd45p.data,
FL3_cd45n.data, FL3_cd45p.data, FL4_cd45n.data, FL4_cd45p.data,
LBM1.data, LBM2.data, LBM3.data, LBM4.data, NBM1.data, NBM2.data,
NBM3.data)


###Merge Seurat objects

refer <- merge(FL3_cd45n, y = c(FL3_cd45p, FL4_cd45n, FL4_cd45p))

rm(FL1_cd45n, FL1_cd45p, FL2_cd45n, FL2_cd45p, FL3_cd45n, FL3_cd45p,
FL4_cd45n, FL4_cd45p, LBM1, LBM2, LBM3, LBM4, NBM1, NBM2, NBM3)


###Percentage of Mitho genes and QC


refer.sc <- as.SingleCellExperiment(refer)

refer.sc


exprs(refer.sc) <- log2(

  scater::calculateCPM(refer.sc, size.factors = NULL) + 1)


refer.percellQC <- perCellQCMetrics(refer.sc)

refer.percellQC


refer.perfeatureQC <- perFeatureQCMetrics(refer.sc)

refer.perfeatureQC


plotHighestExprs(refer.sc, exprs_values = "counts")
```

```
refer[["percent.mt"]] <- PercentageFeatureSet(refer, pattern = "^MT-")

VlnPlot(refer, features = c("nFeature_RNA", "nCount_RNA", "percent.mt"),
ncol = 3)

rm(refer.sc)


plot1 <- FeatureScatter(refer, feature1 = "nCount_RNA", feature2 =
"percent.mt")

plot2 <- FeatureScatter(refer, feature1 = "nCount_RNA", feature2 =
"nFeature_RNA")

CombinePlots(plots = list(plot1, plot2))


refer.QC <- subset(refer, subset = nFeature_RNA > 200 & nFeature_RNA <
8000 & percent.mt < 5)

refer.QC

plot1 <- FeatureScatter(refer.QC, feature1 = "nCount_RNA", feature2 =
"percent.mt")

plot2 <- FeatureScatter(refer.QC, feature1 = "nCount_RNA", feature2 =
"nFeature_RNA")

CombinePlots(plots = list(plot1, plot2))


rm(refer)


hist(colSums(refer.QC@assays$RNA@data))

refer.QC <- NormalizeData(refer.QC, normalization.method =
"LogNormalize", scale.factor = 10000)

hist(colSums(refer.QC@assays$RNA@data))


##Variable genes

refer.QC <- FindVariableFeatures(refer.QC, selection.method = "disp",
nfeatures = 2000)

top10 <- head(VariableFeatures(refer.QC), 10)


plot1 <- VariableFeaturePlot(refer.QC)

plot2 <- LabelPoints(plot = plot1, points = top10)


CombinePlots(plots = list(plot1, plot2))
```

```
##Scaling the data


all.genes <- rownames(refer.QC)
refer.QC <- ScaleData(refer.QC, features = all.genes)


refer.QC[["RNA"]]@scale.data[1:5, 1:5]


##PCA


refer.QC <- RunPCA(refer.QC, features = VariableFeatures(object =
refer.QC))
refer.QC
DimPlot(refer.QC, reduction = "pca")


###############Elbow Plot
ElbowPlot(refer.QC, ndims = 50)


##Cluster the cells
####FindNeighbors
refer.QC <- FindNeighbors(refer.QC, dims = 1:30)
####Create clusters
refer.QC <- FindClusters(refer.QC, resolution = 0.5)


##UMAP/tSNE
###UMAP
refer.QC <- RunUMAP(refer.QC, dims = 1:30)
DimPlot(refer.QC, reduction = "umap")


##Finding differentially expressed features
##Para encontrar marcadores que diferenciarán los clusters
##Y nos ayudará a encontrar las anotaciones de los clusters
cluster1.markers <- FindMarkers(refer.QC, ident.1 = 1, min.pct = 0.25)
head(cluster1.markers, n = 5)
######Marcadores del cluster 1 GZMB, GXMA, CCL5, CD8A, GNLY
```

```
cluster5.markers <- FindMarkers(refer.QC, ident.1 = 5, min.pct = 0.25)
head(cluster5.markers, n = 5)


####for all clusters
refer.QC.markers <- FindAllMarkers(refer.QC, only.pos = TRUE, min.pct =
0.25, logfc.threshold = 0.25)
refer.QC.markers %>% group_by(cluster) %>% top_n(n = 2, wt = avg_log2FC)


##Visualizacion de marcadores en UMAP
FeaturePlot(refer.QC, features = c("CXCL12", "CXCR4", "ACTB", "MKI67"))


###Cambiar nombre de clusters de num a letras
#new.cluster.ids <- letters[1:length(levels(l3s))]
#names(new.cluster.ids) <- levels(l3s)
#l3s <- RenameIdents(l3s, new.cluster.ids)
#DimPlot(l3s, reduction = "umap", label = TRUE, pt.size = 0.5) +
NoLegend()


######Cell
annotation##########################################################
##Import csv files with the cell annotation
FL3n_labels <- FCAImmP7198629
FL3p_labels <- FCAImmP7198628
FL4n_labels <- FCAImmP7316892
FL4p_labels <- FCAImmP7316889


rm(FCAImmP7198629, FCAImmP7198628, FCAImmP7316892, FCAImmP7316889)


varn3 <- str_extract(Cells(refer.QC),"FL3_cd45n_(...............)")
varn3 <- str_replace(varn3, "FL3_cd45n_", "")
varn31 <- data_frame(varn3)
names(varn31)[names(varn31) == "varn3"] <- "Barcodes"
varn32 <- merge(FL3n_labels, varn31, by = "Barcodes")
```

```
varp3 <- str_extract(Cells(refer.QC),"FL3_cd45p_(.............)")
varp3 <- str_replace(varp3, "FL3_cd45p_", "")
varp31 <- data_frame(varp3)
names(varp31)[names(varp31) == "varp3"] <- "Barcodes"
varp32 <- merge(FL3p_labels, varp31, by = "Barcodes")

varn4 <- str_extract(Cells(refer.QC),"FL4_cd45n_(.............)")
varn4 <- str_replace(varn4, "FL4_cd45n_", "")
varn41 <- data_frame(varn4)
names(varn41)[names(varn41) == "varn4"] <- "Barcodes"
varn42 <- merge(FL4n_labels, varn41, by = "Barcodes")

varp4 <- str_extract(Cells(refer.QC),"FL4_cd45p_(.............)")
varp4 <- str_replace(varp4, "FL4_cd45p_", "")
varp41 <- data_frame(varp4)
names(varp41)[names(varp41) == "varp4"] <- "Barcodes"
varp42 <- merge(FL4p_labels, varp41, by = "Barcodes")

refer.labels.df <- rbind(varn32, varp32, varn42, varp42)
refer.labels.vc <- refer.labels.df$Cell.Labels

save(refer.QC, file="~/PX/reference.RData")
refer.QC$seurat_clusters <- refer.labels.vc
rm(varn3, varn31, varn32, varp3, varp31, varp32, varn4, varn41, varn42,
varp4, varp41, varp42)

levels.id <- unique(refer.QC$seurat_clusters)
names(levels.id) <- levels(refer.QC)
refer.newlabeled <- RenameIdents(refer.QC, levels.id)
DimPlot(refer.newlabeled, reduction = "umap", label = TRUE, pt.size =
0.5) + NoLegend()

save(refer.newlabeled, file="~/PX/reference_labeled.RData")
```

```
rm(FL3p_labels, FL3n_labels, FL4p_labels, FL4n_labels, refer.labels.df,
refer.labels.vc, refer.percellQC, refer.perfeatureQC, refer.QC,
refer.QC.markers)
```

Scripts 5

```
library(dplyr)

library(SingleCellExperiment)

library(Seurat)

library(scater)

library(harmony)


###Load files


FL1_cd45n.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL1_cd45n/GRCh38")

FL1_cd45p.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL1_cd45p/GRCh38")

FL2_cd45n.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL2_cd45n/GRCh38")

FL2_cd45p.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL2_cd45p/GRCh38")

FL3_cd45n.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL3_cd45n/GRCh38")

FL3_cd45p.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL3_cd45p/GRCh38")

FL4_cd45n.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL4_cd45n/GRCh38")

FL4_cd45p.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/FL4_cd45p/GRCh38")

LBM1.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/LBM1")

LBM2.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/LBM2")

LBM3.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/LBM3")

LBM4.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/LBM4")

NBM1.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/NBM1")

NBM2.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/NBM2")

NBM3.data <- Read10X(data.dir = "~/processed_data/NBM3")


###Create Seurat object

FL1_cd45n <- CreateSeuratObject(counts = FL1_cd45n.data, project = "FL")

FL1_cd45p <- CreateSeuratObject(counts = FL1_cd45p.data, project = "FL")

FL2_cd45n <- CreateSeuratObject(counts = FL2_cd45n.data, project = "FL")

FL2_cd45p <- CreateSeuratObject(counts = FL2_cd45p.data, project = "FL")

FL3_cd45n <- CreateSeuratObject(counts = FL3_cd45n.data, project = "FL")
```

```
FL3_cd45p <- CreateSeuratObject(counts = FL3_cd45p.data, project = "FL")

FL4_cd45n <- CreateSeuratObject(counts = FL4_cd45n.data, project = "FL")

FL4_cd45p <- CreateSeuratObject(counts = FL4_cd45p.data, project = "FL")

LBM1 <- CreateSeuratObject(counts = LBM1.data, project = "LBM")

LBM2 <- CreateSeuratObject(counts = LBM2.data, project = "LBM")

LBM3 <- CreateSeuratObject(counts = LBM3.data, project = "LBM")

LBM4 <- CreateSeuratObject(counts = LBM4.data, project = "LBM")

NBM1 <- CreateSeuratObject(counts = NBM1.data, project = "NBM")

NBM2 <- CreateSeuratObject(counts = NBM2.data, project = "NBM")

NBM3 <- CreateSeuratObject(counts = NBM3.data, project = "NBM")


###Merge Seurat objects

m.m <- merge(FL1_cd45n, y = c(FL1_cd45p, FL2_cd45n, FL2_cd45p, FL3_cd45n,
FL3_cd45p, FL4_cd45n, FL4_cd45p, LBM1, LBM2, LBM3, LBM4, NBM1, NBM2,
NBM3),  add.cell.ids = c("FL_cd45n", "FL1_cd45p", "FL2_cd45n",
"FL2_cd45p", "FL3_cd45n", "FL3_cd45p", "FL4_cd45n", "FL4_cd45p", "LBM1",
"LBM2", "LBM3", "LBM4", "NBM1", "NBM2", "NBM3"), project = "m.m")


rm(FL1_cd45n.data, FL1_cd45p.data, FL2_cd45n.data, FL2_cd45p.data,
FL3_cd45n.data, FL3_cd45p.data, FL4_cd45n.data, FL4_cd45p.data,
LBM1.data, LBM2.data, LBM3.data, LBM4.data, NBM1.data, NBM2.data,
NBM3.data)

rm(FL1_cd45n, FL1_cd45p, FL2_cd45n, FL2_cd45p, FL3_cd45n, FL3_cd45p,
FL4_cd45n, FL4_cd45p, LBM1, LBM2, LBM3, LBM4, NBM1, NBM2, NBM3)

###Percentage of Mitho genes and QC


m.m.sc <- as.SingleCellExperiment(m.m)

m.m.sc


exprs(m.m.sc) <- log2(

  scater::calculateCPM(m.m.sc, size.factors = NULL) + 1)


m.m.percellQC <- perCellQCMetrics(m.m.sc)

m.m.percellQC


m.m.perfeatureQC <- perFeatureQCMetrics(m.m.sc)

m.m.perfeatureQC
```

```
plotHighestExprs(m.m.sc, exprs_values = "counts")


m.m[["percent.mt"]] <- PercentageFeatureSet(m.m, pattern = "^MT-")

VlnPlot(m.m, features = c("nFeature_RNA", "nCount_RNA", "percent.mt"),
ncol = 3)


plot1 <- FeatureScatter(m.m, feature1 = "nCount_RNA", feature2 =
"percent.mt")

plot2 <- FeatureScatter(m.m, feature1 = "nCount_RNA", feature2 =
"nFeature_RNA")

CombinePlots(plots = list(plot1, plot2))


m.m.QC <- subset(m.m, subset = nFeature_RNA > 800 & nFeature_RNA < 8000 &
percent.mt < 5)

m.m.QC


VlnPlot(m.m.QC, features = c("nFeature_RNA", "nCount_RNA", "percent.mt"),
ncol = 3)

plot1 <- FeatureScatter(m.m.QC, feature1 = "nCount_RNA", feature2 =
"percent.mt")

plot2 <- FeatureScatter(m.m.QC, feature1 = "nCount_RNA", feature2 =
"nFeature_RNA")

CombinePlots(plots = list(plot1, plot2))


save(m.m.QC, file="~/PX/filtered.RData")

rm(m.m, m.m.percellQC, m.m.perfeatureQC, m.m.sc)


##Normalización

load("~/PX/filtered.RData")


hist(colSums(m.m.QC@assays$RNA@data))

m.m.QC <- NormalizeData(m.m.QC, normalization.method = "LogNormalize",
scale.factor = 10000)

hist(colSums(m.m.QC@assays$RNA@data))


##Variable genes
```

```
m.m.QC  <- FindVariableFeatures(m.m.QC , selection.method = "disp",
nfeatures = 2000)
top10 <- head(VariableFeatures(m.m.QC ), 10)


plot1 <- VariableFeaturePlot(m.m.QC)
plot2 <- LabelPoints(plot = plot1, points = top10)


CombinePlots(plots = list(plot1, plot2))


##Scaling the data


all.genes <- rownames(m.m.QC)
m.m.QC <- ScaleData(m.m.QC, features = all.genes)


m.m.QC[["RNA"]]@scale.data[1:5, 1:5]


##PCA


m.m.QC <- RunPCA(m.m.QC, features = VariableFeatures(object = m.m.QC))
m.m.QC
DimPlot(m.m.QC, reduction = "pca")
DimPlot(m.m.QC, reduction = "pca", split.by = "orig.ident")


DimHeatmap(m.m.QC, dims = 1:15, cells = 500, balanced = TRUE)


##BATCH EFECT CORRECTION
options(repr.plot.height = 2.5, repr.plot.width = 6)
m.m.QC <- m.m.QC %>%
  RunHarmony("orig.ident", plot_convergence = TRUE)


DimPlot(m.m.QC, reduction = "harmony")
DimPlot(m.m.QC, reduction = "harmony", split.by = "orig.ident")
```

```
########Select the number of PCA
##############JackSTRAW
#m.m.QC <- JackStraw(m.m.QC, num.replicate = 100)
#m.m.QC <- ScoreJackStraw(m.m.QC, dims = 1:20)
#JackStrawPlot(m.m.QC, dims = 1:15)

###############Elbow Plot
ElbowPlot(m.m.QC, reduction = "harmony", ndims = 50)

##Cluster the cells
####FindNeighbors
m.m.QC <- FindNeighbors(m.m.QC, dims = 1:30,  reduction = "harmony")
####Create clusters
m.m.QC <- FindClusters(m.m.QC, resolution = 0.5)

##UMAP/tSNE
###UMAP
m.m.QC <- RunUMAP(m.m.QC, reduction = "harmony", dims = 1:30)
DimPlot(m.m.QC, reduction = "umap")
DimPlot(m.m.QC, reduction = "umap", split.by = "orig.ident")

#m.m.QC <- RunUMAP(m.m.QC, reduction = "pca", dims = 1:30)
#DimPlot(m.m.QC, reduction = "umap")
#DimPlot(m.m.QC, reduction = "umap", split.by = "orig.ident")

###tSNE
m.m.QC <- RunTSNE(m.m.QC, dims = 1:30, reduction = "harmony")
DimPlot(m.m.QC, reduction = "tsne")

##Finding differentially expressed features
##Para encontrar marcadores que diferenciarán los clusters
##Y nos ayudará a encontrar las anotaciones de los clusters
cluster1.markers <- FindMarkers(m.m.QC, ident.1 = 1, min.pct = 0.25)
head(cluster1.markers, n = 5)
```

```
######Marcadores del cluster 1 GZMB, GXMA, CCL5, CD8A, GNLY


cluster5.markers <- FindMarkers(m.m.QC, ident.1 = 5, min.pct = 0.25)

head(cluster5.markers, n = 5)

######Marcadores

VlnPlot(m.m.QC, features =  rownames(head(cluster1.markers, n = 5)))

VlnPlot(m.m.QC, features =  rownames(head(cluster5.markers, n = 5)))

####for all clusters

m.m.QC.markers <- FindAllMarkers(m.m.QC, only.pos = TRUE, min.pct = 0.25,
logfc.threshold = 0.25)

m.m.QC.markers %>% group_by(cluster) %>% top_n(n = 2, wt = avg_log2FC)


##Visualizacion de marcadores en UMAP

FeaturePlot(m.m.QC, features = c("PTPRC", "CD34", "CD19", "CD3E",
"NCAM1", "CD14", "CD33", "ITGAX", "MME", "IL3RA", "GYPA", "AFP", "THY1"))

FeaturePlot(m.m.QC, features = c("CD34", "CD19"), split.by =
"orig.ident")

###No se encontró CXCL12

##grep('CXCL12', rownames(m.m.QC))


##Heat map de genes expresados diferencialmente por cluster

DoHeatmap(m.m.QC, features = c("PTPRC", "CD34", "CD19", "CD3E", "NCAM1",
"CD14", "CD33", "ITGAX", "MME", "IL3RA", "GYPA", "AFP", "THY1")) +
NoLegend()

DimPlot(m.m.QC, reduction = "umap", label = TRUE)


###Cambiar nombre de clusters de num a letras

#new.cluster.ids <- letters[1:length(levels(l3s))]

#names(new.cluster.ids) <- levels(l3s)

#l3s <- RenameIdents(l3s, new.cluster.ids)

#DimPlot(l3s, reduction = "umap", label = TRUE, pt.size = 0.5) +
NoLegend()


save(m.m.QC, file="~/PX/processed.RData")


######Cell
annotation#####################################################
```

```
### SC annotation


## Loading of required libraries



# Parallelization

library(future) # Works with NormalizeData(), ScaleData(), JackStraw(),
FindMarkers(), FindIntegrationAnchors(), FindClusters()

#plan("multiprocess", workers=4)

plan("multisession", workers=4) #Rstudio

options(future.globals.maxSize = 4000 * 1024^2) #Set if you got error
that exceeds maximum size


library(dplyr)

library(Seurat)

library(ggplot2)

library(SingleR)

library(scuttle)


## Load your data


load("~/PX/processed.RData") # 8.7 GB

DimPlot(m.m.QC, reduction = "umap", label = TRUE, pt.size = 0.5) +
NoLegend()


## Load other dataset that has already been annotated

load("~/PX/reference_labeled.RData")

DimPlot(refer.newlabeled, reduction = "umap", label = TRUE, pt.size =
0.5) + NoLegend()


DoHeatmap(m.m.QC, features = c("PTPRC", "CD34", "CD19", "CD3E", "NCAM1",
"CD14", "CD33", "ITGAX", "MME", "IL3RA", "GYPA", "AFP", "THY1"), size =
3) + NoLegend()

DoHeatmap(refer.newlabeled, features = c("PTPRC", "CD34", "CD19", "CD3E",
"NCAM1", "CD14", "CD33", "ITGAX", "MME", "IL3RA", "GYPA", "AFP", "THY1"),
size = 3) + NoLegend()

  theme(text = element_text(size = 6))
```

```
m.m.sc <- as.SingleCellExperiment(m.m.QC)

m.m.sc <- logNormCounts(m.m.sc)

refer.sc <- as.SingleCellExperiment(refer.newlabeled)

refer.sc <- logNormCounts(refer.sc)


m.m.LB.sc <- SingleR(test=m.m.sc, ref=refer.sc,
labels=refer.sc$seurat_clusters, de.method="wilcox") ####40 min

table(m.m.LB$seurat_clusters)


save(m.m.LB.sc, file="~/PX/m.m.LB.sc_labeled.RData")


labels_test <- m.m.LB.sc$labels

m.m.QC$seurat_clusters <- labels_test


Idents(object = m.m.QC) <- labels_test

levels.id <- unique(m.m.QC$seurat_clusters)

levels(m.m.QC) <- levels.id

names(levels.id)<- levels(m.m.QC)

m.m.LB <- m.m.QC


DimPlot(refer.newlabeled, reduction = "umap", label = TRUE, pt.size =
0.5) + NoLegend()


DimPlot(m.m.LB, reduction = "umap", label = TRUE, pt.size = 0.5, size =
3, split.by = "orig.ident")

save(m.m.LB, file="~/PX/m.m.LB_labeled.RData")


rm(m.m.LB.sc, m.m.QC, m.m.sc, refer.newlabeled, refer.sc)


###Diferential gene expresion

load("~/PX/m.m.LB_labeled.RData")

levels.id <- unique(m.m.LB$seurat_clusters)

cells_to_test <- c("HSC/MPP", "pro B cell", "pre pro B cell ", "pre B
cell", "B cell", "Early Erythroid", "Mid Erythroid", "Late Erythroid",
"ILC precursor", "Early lymphoid/T lymphocyte", "Monocyte",
"Erythoblastic Island Macrophage", "NK", "DC2")
```

```
markers.to.plot <- c("HLA-DRA", "CD34", "SPINK2", "JCHAIN", "IGLL1",
"CD79A", "CD79B", "CD19", "MME", "TCL1A", "IGKC", "MS4A1", "LBT",
"KLRB1",

                     "PTPRC", "CD3E", "CD3D", "CD8A", "CD4", "CD7",
"GNLY", "NKG7", "NCAM1", "CCL5", "XCL2", "MPO", "LYZ", "PLAC8",
"TSPAN13",

                     "IL3RA", "GPR183", "CD1C", "S100A9", "CCL4", "CD14",
"FCGR3A", "VMO1", "CD33", "C1QA", "VCAM1", "PF4", "ITGA2B", "GATA1",

                     "KLF1", "HBA2", "THY1", "ESAM", "ECM1", "APOA1",
"AFP")


DotPlot(m.m.LB, features = (markers.to.plot), cols = c("blue", "red",
"yellow"), dot.scale = 8,

        split.by = "orig.ident", idents = cells_to_test) + RotatedAxis()




Secreted_inflamatory_factors <- c("CSF3", "CSF2", "CSF1", "IFNA2",
"IFNB1", "IFNG", "TNF", "IL1B", "IL6", "IL2", "IL3",

                                  "IL4", "IL5", "IL7", "CXCL8",  "IL10",
      "IL12B", "IL15", "VEGFA", "LIF", "TNFSF10",

                                  "KITLG", "TSLP", "FGF2",
"FLT3LG","HSPD1", "HSPA1A", "hsp90a.1", "FOXP3", "CCL3",

                                  "CCL2", "CCL7", "CCL12", "CCL20",
"CCL19", "CCL1", "CCL25", "CCL4", "CXCL9","CXCL10",

                                  "CXCL11", "CXCL12", "CXCL13",
      "CXCL16", "XCL1", "XCL2")

DotPlot(m.m.LB, features = (Secreted_inflamatory_factors), cols =
c("blue", "red", "yellow"), dot.scale = 8,

        split.by = "orig.ident", idents = cells_to_test) + RotatedAxis()


Membring_anchored_inflamatory_factors <- c("CSF3R", "CSF2RB", "CSF1R",
"IFNAR1", "IFNGR1", "TNFRSF1A", "IL1R1", "IL6R",

                                           "IL2RA", "IL3RA", "IL4R",
"IL5RA", "IL7R", "CXCR2", "IL10RA", "IL12RB1",

                                           "IL15RA", "NRP1", "TNFRSF10A",
"KIT", "CRLF2","FGFR1","FLT3","TLR2",

                                           "TLR4", "TLR8", "TLR9",
"CCR1", "CCR2", "CCR3", "CCR5", "CCR6", "CCR7", "CCR8",

                                           "CCR9", "ACKR2", "CXCR1",
"CXCR3", "CXCR4", "CXCR5", "CXCR6", "CXCR7",

                                           "XCR1", "NLRP3", "SCARB1",
"NFKB1")
```

```
DotPlot(m.m.LB, features = (Membring_anchored_inflamatory_factors), cols
= c("blue", "red", "yellow"), dot.scale = 8,
        split.by = "orig.ident", idents = cells_to_test) + RotatedAxis()


Senescence_markers <-   c("GLB1",   "BHLHE40",  "TXN",      "CDKN2A",
      "CDKN1A",   "TP53",     "HMGA2",    "HIRA",     "CBX5",     "H2AX",
      "ATM",      "ATR",
                        "TP53BP1", "MRNIP",    "CHK1",     "MRE11",
      "RAD50",    "NBN",      "MKI67")

DotPlot(m.m.LB, features = (Senescence_markers), cols = c("blue", "red",
"yellow"), dot.scale = 8,
        split.by = "orig.ident", idents = cells_to_test) + RotatedAxis()


Oxidative_stress_hipoxia_markers <- c("HIF1A", "SLC2A1", "CA9", "BNIP3L",
"LDHD", "NFE2", "NFE2L1", "NFE2L2", "GATA1",
                                    "FOXO1", "FOXO3", "FOXO4", "EPO",
"EPOR", "SOD1", "SOD2", "SOD3", "GPX1", "GPX4", "CAT",
                                    "PRDX1", "PRDX2", "PRDX3", "ATM",
"TP53", "SESN2", "GADD45A", "MAPK11", "PTPN1", "PTPN2", "BCR",
                                                        "CDKN1A",
"CDKN2A", "CDK1", "CDK2", "CDK4", "CDK6", "CDC25C")

DotPlot(m.m.LB, features = (Oxidative_stress_hipoxia_markers), cols =
c("blue", "red", "yellow"), dot.scale = 8,
        split.by = "orig.ident", idents = cells_to_test) + RotatedAxis()


BM_adipogenesis_markers <- c("CEBPB",     "RGS2",     "DIO2",
      "PPARGC1A", "PRDM16",   "FOXC2",    "UCP1",     "PPARG")

DotPlot(m.m.LB, features = (BM_adipogenesis_markers), cols = c("blue",
"red", "yellow"), dot.scale = 8,
        split.by = "orig.ident", idents = cells_to_test) + RotatedAxis()




immune.deg.cluster0 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"FL", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "B cell",
logfc.threshold = log(2))


######CVS files with DEG


NBMvsFL_cluster1 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Fibroblast",
logfc.threshold = log(2))
```

```
write.csv(NBMvsFL_cluster1, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster1.csv")

NBMvsFL_cluster2 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mid  Erythroid",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster2, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster2.csv")

NBMvsFL_cluster3 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Neutrophil-myeloid
progenitor", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster3, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster3.csv")

NBMvsFL_cluster4 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Early Erythroid",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster4, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster4.csv")

NBMvsFL_cluster5 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Endothelial cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster5, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster5.csv")

NBMvsFL_cluster6 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Hepatocyte",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster6, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster6.csv")

NBMvsFL_cluster7 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pro B cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster7, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster7.csv")

NBMvsFL_cluster8 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Megakaryocyte",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster8, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster8.csv")

NBMvsFL_cluster9 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pre B cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster9, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster9.csv")

NBMvsFL_cluster10 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "MEMP",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster10, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster10.csv")

NBMvsFL_cluster11 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Late Erythroid",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster11, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster11.csv")
```

```
NBMvsFL_cluster12 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mast cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster12, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster12.csv")

NBMvsFL_cluster13 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "DC2",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster13, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster13.csv")

NBMvsFL_cluster14 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pre pro B cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster14, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster14.csv")

NBMvsFL_cluster15 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Monocyte-DC
precursor", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster15, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster15.csv")

NBMvsFL_cluster16 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pDC precursor",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster16, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster16.csv")

NBMvsFL_cluster17 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "DC1",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster17, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster17.csv")

NBMvsFL_cluster18 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Kupffer Cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster18, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster18.csv")

NBMvsFL_cluster19 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "NK",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster19, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster19.csv")

NBMvsFL_cluster20 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Monocyte",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster20, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster20.csv")

NBMvsFL_cluster21 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mono-Mac",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster21, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster21.csv")

NBMvsFL_cluster22 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Erythroblastic
Island Macrophage", logfc.threshold = log(2))
```

```
write.csv(NBMvsFL_cluster22, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster22.csv")

NBMvsFL_cluster23 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "VCAM1+
Erythroblastic Island Macrophage", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster23, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster23.csv")

NBMvsFL_cluster24 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "ILC precursor",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster24, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster24.csv")

NBMvsFL_cluster25 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mono-NK",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster25, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster25.csv")

NBMvsFL_cluster26 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Early lymphoid/T
lymphocyte", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster26, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster26.csv")

NBMvsFL_cluster27 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "HSC/MPP",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster27, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster27.csv")

NBMvsFL_cluster28 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 = "FL",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "B cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsFL_cluster28, file="~/CSV/NBMvsFL_cluster28.csv")


NBMvsLBM_cluster1 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident =
"Fibroblast", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster1, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster1.csv")

NBMvsLBM_cluster2 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mid
Erythroid", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster2, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster2.csv")

NBMvsLBM_cluster3 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Neutrophil-
myeloid progenitor", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster3, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster3.csv")

NBMvsLBM_cluster4 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Early
Erythroid", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster4, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster4.csv")
```

```
NBMvsLBM_cluster5 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Endothelial
cell", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster5, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster5.csv")

NBMvsLBM_cluster6 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident =
"Hepatocyte", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster6, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster6.csv")

NBMvsLBM_cluster7 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pro B
cell", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster7, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster7.csv")

NBMvsLBM_cluster8 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident =
"Megakaryocyte", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster8, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster8.csv")

NBMvsLBM_cluster9 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pre B
cell", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster9, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster9.csv")

NBMvsLBM_cluster10 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "MEMP",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster10, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster10.csv")

NBMvsLBM_cluster11 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Late
Erythroid", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster11, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster11.csv")

NBMvsLBM_cluster12 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mast cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster12, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster12.csv")

NBMvsLBM_cluster13 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "DC2",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster13, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster13.csv")

NBMvsLBM_cluster14 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pre pro B
cell", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster14, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster14.csv")

NBMvsLBM_cluster15 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Monocyte-DC
precursor", logfc.threshold = log(2))
```

```
write.csv(NBMvsLBM_cluster15, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster15.csv")

NBMvsLBM_cluster16 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pDC
precursor", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster16, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster16.csv")

NBMvsLBM_cluster17 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "DC1",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster17, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster17.csv")

NBMvsLBM_cluster18 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Kupffer
Cell", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster18, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster18.csv")

NBMvsLBM_cluster19 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "NK",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster19, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster19.csv")

NBMvsLBM_cluster20 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Monocyte",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster20, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster20.csv")

NBMvsLBM_cluster21 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mono-Mac",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster21, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster21.csv")

NBMvsLBM_cluster22 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident =
"Erythroblastic Island Macrophage", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster22, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster22.csv")

NBMvsLBM_cluster23 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "VCAM1+
Erythroblastic Island Macrophage", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster23, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster23.csv")

NBMvsLBM_cluster24 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "ILC
precursor", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster24, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster24.csv")

NBMvsLBM_cluster25 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mono-NK",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster25, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster25.csv")
```

```
NBMvsLBM_cluster26 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Early
lymphoid/T lymphocyte", logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster26, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster26.csv")

NBMvsLBM_cluster27 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "HSC/MPP",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster27, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster27.csv")

NBMvsLBM_cluster28 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "NBM", ident.2 =
"LBM", verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "B cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(NBMvsLBM_cluster28, file="~/CSV/NBMvsLBM_cluster28.csv")



FLvsLBM_cluster1 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Fibroblast",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster1, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster1.csv")

FLvsLBM_cluster2 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mid  Erythroid",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster2, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster2.csv")

FLvsLBM_cluster3 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Neutrophil-myeloid
progenitor", logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster3, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster3.csv")

FLvsLBM_cluster4 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Early Erythroid",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster4, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster4.csv")

FLvsLBM_cluster5 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Endothelial cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster5, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster5.csv")

FLvsLBM_cluster6 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Hepatocyte",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster6, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster6.csv")

FLvsLBM_cluster7 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pro B cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster7, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster7.csv")
```

```
FLvsLBM_cluster8 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Megakaryocyte",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster8, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster8.csv")

FLvsLBM_cluster9 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pre B cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster9, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster9.csv")

FLvsLBM_cluster10 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "MEMP",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster10, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster10.csv")

FLvsLBM_cluster11 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Late Erythroid",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster11, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster11.csv")

FLvsLBM_cluster12 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mast cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster12, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster12.csv")

FLvsLBM_cluster13 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "DC2",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster13, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster13.csv")

FLvsLBM_cluster14 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pre pro B cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster14, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster14.csv")

FLvsLBM_cluster15 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Monocyte-DC
precursor", logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster15, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster15.csv")

FLvsLBM_cluster16 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "pDC precursor",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster16, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster16.csv")

FLvsLBM_cluster17 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "DC1",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster17, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster17.csv")

FLvsLBM_cluster18 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Kupffer Cell",
logfc.threshold = log(2))
```

```
write.csv(FLvsLBM_cluster18, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster18.csv")

FLvsLBM_cluster19 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "NK",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster19, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster19.csv")

FLvsLBM_cluster20 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Monocyte",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster20, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster20.csv")

FLvsLBM_cluster21 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mono-Mac",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster21, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster21.csv")

FLvsLBM_cluster22 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Erythroblastic
Island Macrophage", logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster22, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster22.csv")

FLvsLBM_cluster23 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "VCAM1+
Erythroblastic Island Macrophage", logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster23, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster23.csv")

FLvsLBM_cluster24 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "ILC precursor",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster24, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster24.csv")

FLvsLBM_cluster25 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Mono-NK",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster25, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster25.csv")

FLvsLBM_cluster26 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "Early lymphoid/T
lymphocyte", logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster26, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster26.csv")

FLvsLBM_cluster27 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "HSC/MPP",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster27, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster27.csv")

FLvsLBM_cluster28 <- FindMarkers(m.m.LB, ident.1 = "FL", ident.2 = "LBM",
verbose = TRUE, group.by="orig.ident", subset.ident = "B cell",
logfc.threshold = log(2))

write.csv(FLvsLBM_cluster28, file="~/CSV/FLvsLBM_cluster28.csv")
```

Scripts 6

```
library(dplyr)

library(Seurat)

library(ggplot2)

library(SingleCellExperiment)

library(escape)

library(dittoSeq)


load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/m.m.LB_labeled.RData")


HSP_MPP <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "HSC/MPP")

rm(m.m.LB)


GS.hallmark <- getGeneSets(library = "H")

GS.BIOCARTA <- getGeneSets(library = "C2")

GS.BIOCARTA <- GS.BIOCARTA[c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_G1_PATHWAY", "BIOCARTA_G2_PATHWAY", "BIOCARTA_HIF_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",

                             "BIOCARTA_IFNG_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",

                             "BIOCARTA_IL2_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY", "BIOCARTA_IL5_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL6_PATHWAY", "BIOCARTA_IL7_PATHWAY",

                             "BIOCARTA_NFKB_PATHWAY",
"BIOCARTA_TGFB_PATHWAY", "BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TOLL_PATHWAY",
"WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",

                             "BIOCARTA_WNT_PATHWAY",
"BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_P53_PATHWAY",
"WP_APOPTOSIS", "WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70")]


ES.HSP_MPP <- enrichIt(obj = HSP_MPP, gene.sets = GS.hallmark, cores = 2)

HSP_MPP <- Seurat::AddMetaData(HSP_MPP, ES.HSP_MPP)

ES.HSP_MPP <- enrichIt(obj = HSP_MPP, gene.sets = GS.BIOCARTA, cores = 2)

HSP_MPP <- Seurat::AddMetaData(HSP_MPP, ES.HSP_MPP)


colors <- colorRampPalette(c("#0348A6", "#7AC5FF", "#C6FDEC", "#FFB433",
"#FF4B20"))
```

```
bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/HSP_MPP_GSE_heaptmap.bmp",
width=1500, height=1000, units="px", res = 100)

dittoHeatmap(HSP_MPP, genes = NULL, metas = names(ES.HSP_MPP),

             annot.by = "orig.ident",

             fontsize = 9,

             cluster_cols = FALSE,

             heatmap.colors = colors(50))

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/HSP_MPP_GSE_violplot1.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(HSP_MPP, vars = c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_HIF_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_G1_PATHWAY",
"BIOCARTA_G2_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/HSP_MPP_GSE_violplot2.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(HSP_MPP, vars = c("BIOCARTA_P53_PATHWAY", "WP_APOPTOSIS",
"WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70", "BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY",
"BIOCARTA_WNT_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/HSP_MPP_GSE_violplot3.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(HSP_MPP, vars = c("BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL2_PATHWAY", "BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL5_PATHWAY", "BIOCARTA_IL6_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",
```

```
                theme = theme_classic())
dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/HSP_MPP_GSE_violplot4.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)
multi_dittoPlot(HSP_MPP, vars = c("BIOCARTA_IL7_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNG_PATHWAY"),
                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),
                ylab = "Enrichment scores",
                theme = theme_classic())
dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/HSP_MPP_GSE_violplot5.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)
multi_dittoPlot(HSP_MPP, vars = c("BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TGFB_PATHWAY",
"BIOCARTA_TOLL_PATHWAY", "WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",
"BIOCARTA_NFKB_PATHWAY"),
                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),
                ylab = "Enrichment scores",
                theme = theme_classic())
dev.off()


orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
CXCR4_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, CXCR4_Score)


HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(CXCR4_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)


orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
HIF_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_HIF_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, HIF_Score)
```

```
HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(HIF_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
P27_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_P27_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, P27_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(P27_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
G1_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_G1_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, G1_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(G1_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
G2_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_G2_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, G2_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(G2_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
P53_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_P53_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, P53_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(P53_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
```

```
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
APOPTOSIS_Score <- HSP_MPP$WP_APOPTOSIS
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
APOPTOSIS_HSP70_Score <- HSP_MPP$WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_HSP70_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_HSP70_Score ~ orig.ident, data =
HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
NOTCH_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, NOTCH_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(NOTCH_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
WNT_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_WNT_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, WNT_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(WNT_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
```

```
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL1R_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL1R_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL1R_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL1R_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL2_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL2_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL2_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL2_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL3_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL3_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL3_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL3_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL4_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL4_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL4_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL4_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)
```

```
orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL5_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL5_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL5_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL5_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL6_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL6_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL6_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL6_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL7_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL7_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL7_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL7_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL10_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL10_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL10_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL10_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL12_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL12_PATHWAY
```

```
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL12_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL12_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IL17_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IL17_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IL17_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IL17_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IFNA_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IFNA_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IFNA_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IFNA_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
IFNG_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_IFNG_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, IFNG_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(IFNG_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
TNFR1_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, TNFR1_Score)
```

```
HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(TNFR1_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
TNFR2_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, TNFR2_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(TNFR2_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
TGFB_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_TGFB_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, TGFB_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(TGFB_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
TOLL_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_TOLL_PATHWAY
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, TOLL_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(TOLL_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)

orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident
TLR4_Score <- HSP_MPP$WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE
HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, TLR4_Score)

HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(TLR4_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)
summary(HSP_MPP_df_ANOVA)
```

```
TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)


orig.ident <- HSP_MPP$orig.ident

NFKB_Score <- HSP_MPP$BIOCARTA_NFKB_PATHWAY

HSP_MPP_df <- data.frame(orig.ident, NFKB_Score)


HSP_MPP_df_ANOVA <- aov(NFKB_Score ~ orig.ident, data = HSP_MPP_df)

summary(HSP_MPP_df_ANOVA)

TukeyHSD(HSP_MPP_df_ANOVA)


##########################################################################
################################

#--pre pro B cell

##########################################################################
################################

load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/m.m.LB_labeled.RData")


pre_pro_B <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "pre pro B cell ")

rm(m.m.LB)


GS.hallmark <- getGeneSets(library = "H")

GS.BIOCARTA <- getGeneSets(library = "C2")

GS.BIOCARTA <- GS.BIOCARTA[c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_G1_PATHWAY", "BIOCARTA_G2_PATHWAY", "BIOCARTA_HIF_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",

                             "BIOCARTA_IFNG_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",

                             "BIOCARTA_IL2_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY", "BIOCARTA_IL5_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL6_PATHWAY", "BIOCARTA_IL7_PATHWAY",

                             "BIOCARTA_NFKB_PATHWAY",
"BIOCARTA_TGFB_PATHWAY", "BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TOLL_PATHWAY",
"WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",

                             "BIOCARTA_WNT_PATHWAY",
"BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_P53_PATHWAY",
"WP_APOPTOSIS", "WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70")]
```

```
ES.pre_pro_B <- enrichIt(obj = pre_pro_B, gene.sets = GS.BIOCARTA, cores
= 2)

pre_pro_B <- Seurat::AddMetaData(pre_pro_B, ES.pre_pro_B)


colors <- colorRampPalette(c("#0348A6", "#7AC5FF", "#C6FDEC", "#FFB433",
"#FF4B20"))


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_pro_B_GSE_heaptmap.bmp",
width=1500, height=1000, units="px", res = 100)

dittoHeatmap(pre_pro_B, genes = NULL, metas = names(ES.pre_pro_B),

             annot.by = "orig.ident",

             fontsize = 9,

             cluster_cols = FALSE,

             heatmap.colors = colors(50))

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_pro_B_GSE_violplot1.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_pro_B, vars = c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_HIF_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_G1_PATHWAY",
"BIOCARTA_G2_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_pro_B_GSE_violplot2.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_pro_B, vars = c("BIOCARTA_P53_PATHWAY",
"WP_APOPTOSIS", "WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70",
"BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY", "BIOCARTA_WNT_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()
```

```
bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_pro_B_GSE_violplot3.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_pro_B, vars = c("BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL2_PATHWAY", "BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL5_PATHWAY", "BIOCARTA_IL6_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_pro_B_GSE_violplot4.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_pro_B, vars = c("BIOCARTA_IL7_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNG_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_pro_B_GSE_violplot5.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_pro_B, vars = c("BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TGFB_PATHWAY",
"BIOCARTA_TOLL_PATHWAY", "WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",
"BIOCARTA_NFKB_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident

CXCR4_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY

pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, CXCR4_Score)


pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(CXCR4_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
```

```
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
HIF_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_HIF_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, HIF_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(HIF_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
P27_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_P27_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, P27_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(P27_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
G1_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_G1_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, G1_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(G1_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
G2_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_G2_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, G2_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(G2_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)
```

```
orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
P53_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_P53_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, P53_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(P53_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
APOPTOSIS_Score <- pre_pro_B$WP_APOPTOSIS
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_Score ~ orig.ident, data =
pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
APOPTOSIS_HSP70_Score <- pre_pro_B$WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_HSP70_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_HSP70_Score ~ orig.ident, data =
pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
NOTCH_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, NOTCH_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(NOTCH_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)
```

```
orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
WNT_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_WNT_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, WNT_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(WNT_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL1R_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL1R_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL1R_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL1R_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL2_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL2_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL2_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL2_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL3_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL3_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL3_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL3_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL4_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL4_PATHWAY
```

```
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL4_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL4_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL5_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL5_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL5_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL5_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL6_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL6_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL6_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL6_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL7_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL7_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL7_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL7_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL10_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL10_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL10_Score)
```

```
pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL10_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL12_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL12_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL12_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL12_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IL17_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IL17_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL17_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IL17_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IFNA_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IFNA_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IFNA_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IFNA_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
IFNG_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_IFNG_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IFNG_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(IFNG_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
```

```
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
TNFR1_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TNFR1_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(TNFR1_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
TNFR2_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TNFR2_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(TNFR2_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
TGFB_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_TGFB_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TGFB_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(TGFB_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
TOLL_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_TOLL_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TOLL_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(TOLL_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)
```

```
orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
TLR4_Score <- pre_pro_B$WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TLR4_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(TLR4_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_pro_B$orig.ident
NFKB_Score <- pre_pro_B$BIOCARTA_NFKB_PATHWAY
pre_pro_B_df <- data.frame(orig.ident, NFKB_Score)

pre_pro_B_df_ANOVA <- aov(NFKB_Score ~ orig.ident, data = pre_pro_B_df)
summary(pre_pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_pro_B_df_ANOVA)

##########################################################################
#################################

#--pro B cell

##########################################################################
#################################

load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/m.m.LB_labeled.RData")

pro_B <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "pro B cell")
rm(m.m.LB)

GS.hallmark <- getGeneSets(library = "H")
GS.BIOCARTA <- getGeneSets(library = "C2")
GS.BIOCARTA <- GS.BIOCARTA[c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_G1_PATHWAY", "BIOCARTA_G2_PATHWAY", "BIOCARTA_HIF_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",
                            "BIOCARTA_IFNG_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",
                            "BIOCARTA_IL2_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY", "BIOCARTA_IL5_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL6_PATHWAY", "BIOCARTA_IL7_PATHWAY",
```

```
                              "BIOCARTA_NFKB_PATHWAY",
"BIOCARTA_TGFB_PATHWAY", "BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TOLL_PATHWAY",
"WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",

                              "BIOCARTA_WNT_PATHWAY",
"BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_P53_PATHWAY",
"WP_APOPTOSIS", "WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70")]


ES.pro_B <- enrichIt(obj = pro_B, gene.sets = GS.BIOCARTA, cores = 2)

pro_B <- Seurat::AddMetaData(pro_B, ES.pro_B)


colors <- colorRampPalette(c("#0348A6", "#7AC5FF", "#C6FDEC", "#FFB433",
"#FF4B20"))


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pro_B_GSE_heaptmap.bmp", width=1500,
height=1000, units="px", res = 100)

dittoHeatmap(pro_B, genes = NULL, metas = names(ES.pro_B),

             annot.by = "orig.ident",

             fontsize = 9,

             cluster_cols = FALSE,

             heatmap.colors = colors(50))

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pro_B_GSE_violplot1.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pro_B, vars = c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_HIF_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_G1_PATHWAY",
"BIOCARTA_G2_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pro_B_GSE_violplot2.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pro_B, vars = c("BIOCARTA_P53_PATHWAY", "WP_APOPTOSIS",
"WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70", "BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY",
"BIOCARTA_WNT_PATHWAY"),
```

```
                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),
                ylab = "Enrichment scores",
                theme = theme_classic())
dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pro_B_GSE_violplot3.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)
multi_dittoPlot(pro_B, vars = c("BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL2_PATHWAY", "BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL5_PATHWAY", "BIOCARTA_IL6_PATHWAY"),
                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),
                ylab = "Enrichment scores",
                theme = theme_classic())
dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pro_B_GSE_violplot4.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)
multi_dittoPlot(pro_B, vars = c("BIOCARTA_IL7_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNG_PATHWAY"),
                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),
                ylab = "Enrichment scores",
                theme = theme_classic())
dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pro_B_GSE_violplot5.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)
multi_dittoPlot(pro_B, vars = c("BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TGFB_PATHWAY",
"BIOCARTA_TOLL_PATHWAY", "WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",
"BIOCARTA_NFKB_PATHWAY"),
                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),
                ylab = "Enrichment scores",
                theme = theme_classic())
dev.off()
```

```
orig.ident <- pro_B$orig.ident
CXCR4_Score <- pro_B$BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, CXCR4_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(CXCR4_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
HIF_Score <- pro_B$BIOCARTA_HIF_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, HIF_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(HIF_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
P27_Score <- pro_B$BIOCARTA_P27_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, P27_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(P27_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
G1_Score <- pro_B$BIOCARTA_G1_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, G1_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(G1_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
```

```
G2_Score <- pro_B$BIOCARTA_G2_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, G2_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(G2_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
P53_Score <- pro_B$BIOCARTA_P53_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, P53_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(P53_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
APOPTOSIS_Score <- pro_B$WP_APOPTOSIS
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
APOPTOSIS_HSP70_Score <- pro_B$WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_HSP70_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_HSP70_Score ~ orig.ident, data =
pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
NOTCH_Score <- pro_B$BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY
```

```
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, NOTCH_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(NOTCH_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
WNT_Score <- pro_B$BIOCARTA_WNT_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, WNT_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(WNT_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL1R_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL1R_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL1R_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IL1R_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL2_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL2_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL2_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IL2_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL3_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL3_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL3_Score)
```

```
pro_B_df_ANOVA <- aov(IL3_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL4_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL4_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL4_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IL4_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL5_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL5_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL5_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IL5_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL6_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL6_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL6_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IL6_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL7_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL7_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL7_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IL7_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
```

```
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL10_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL10_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL10_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IL10_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL12_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL12_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL12_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IL12_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IL17_Score <- pro_B$BIOCARTA_IL17_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IL17_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IL17_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
IFNA_Score <- pro_B$BIOCARTA_IFNA_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IFNA_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IFNA_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)
```

```
orig.ident <- pro_B$orig.ident
IFNG_Score <- pro_B$BIOCARTA_IFNG_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, IFNG_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(IFNG_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
TNFR1_Score <- pro_B$BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TNFR1_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(TNFR1_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
TNFR2_Score <- pro_B$BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TNFR2_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(TNFR2_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
TGFB_Score <- pro_B$BIOCARTA_TGFB_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TGFB_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(TGFB_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
TOLL_Score <- pro_B$BIOCARTA_TOLL_PATHWAY
```

```
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TOLL_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(TOLL_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
TLR4_Score <- pro_B$WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, TLR4_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(TLR4_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pro_B$orig.ident
NFKB_Score <- pro_B$BIOCARTA_NFKB_PATHWAY
pro_B_df <- data.frame(orig.ident, NFKB_Score)

pro_B_df_ANOVA <- aov(NFKB_Score ~ orig.ident, data = pro_B_df)
summary(pro_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pro_B_df_ANOVA)

#########################################################################
#################################
#--pre B cell
#########################################################################
#################################
load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/m.m.LB_labeled.RData")


pre_B <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "pre B cell")
rm(m.m.LB)


GS.hallmark <- getGeneSets(library = "H")
GS.BIOCARTA <- getGeneSets(library = "C2")
```

```
GS.BIOCARTA <- GS.BIOCARTA[c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_G1_PATHWAY", "BIOCARTA_G2_PATHWAY", "BIOCARTA_HIF_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",

                            "BIOCARTA_IFNG_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",

                            "BIOCARTA_IL2_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY", "BIOCARTA_IL5_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL6_PATHWAY", "BIOCARTA_IL7_PATHWAY",

                            "BIOCARTA_NFKB_PATHWAY",
"BIOCARTA_TGFB_PATHWAY", "BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TOLL_PATHWAY",
"WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",

                            "BIOCARTA_WNT_PATHWAY",
"BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_P53_PATHWAY",
"WP_APOPTOSIS", "WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70")]


ES.pre_B <- enrichIt(obj = pre_B, gene.sets = GS.BIOCARTA, cores = 2)

pre_B <- Seurat::AddMetaData(pre_B, ES.pre_B)


colors <- colorRampPalette(c("#0348A6", "#7AC5FF", "#C6FDEC", "#FFB433",
"#FF4B20"))


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_B_GSE_heaptmap.bmp", width=1500,
height=1000, units="px", res = 100)

dittoHeatmap(pre_B, genes = NULL, metas = names(ES.pre_B),

             annot.by = "orig.ident",

             fontsize = 9,

             cluster_cols = FALSE,

             heatmap.colors = colors(50))

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_B_GSE_violplot1.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_B, vars = c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_HIF_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_G1_PATHWAY",
"BIOCARTA_G2_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())
```

```
dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_B_GSE_violplot2.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_B, vars = c("BIOCARTA_P53_PATHWAY", "WP_APOPTOSIS",
"WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70", "BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY",
"BIOCARTA_WNT_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_B_GSE_violplot3.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_B, vars = c("BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL2_PATHWAY", "BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL5_PATHWAY", "BIOCARTA_IL6_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_B_GSE_violplot4.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_B, vars = c("BIOCARTA_IL7_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNG_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/pre_B_GSE_violplot5.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(pre_B, vars = c("BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TGFB_PATHWAY",
```

```
"BIOCARTA_TOLL_PATHWAY", "WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",
"BIOCARTA_NFKB_PATHWAY"),
                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),
                ylab = "Enrichment scores",
                theme = theme_classic())
dev.off()

orig.ident <- pre_B$orig.ident
CXCR4_Score <- pre_B$BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, CXCR4_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(CXCR4_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
HIF_Score <- pre_B$BIOCARTA_HIF_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, HIF_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(HIF_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
P27_Score <- pre_B$BIOCARTA_P27_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, P27_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(P27_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
G1_Score <- pre_B$BIOCARTA_G1_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, G1_Score)
```

```
pre_B_df_ANOVA <- aov(G1_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
G2_Score <- pre_B$BIOCARTA_G2_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, G2_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(G2_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
P53_Score <- pre_B$BIOCARTA_P53_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, P53_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(P53_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
APOPTOSIS_Score <- pre_B$WP_APOPTOSIS
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
APOPTOSIS_HSP70_Score <- pre_B$WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_HSP70_Score)
```

```
pre_B_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_HSP70_Score ~ orig.ident, data =
pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
NOTCH_Score <- pre_B$BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, NOTCH_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(NOTCH_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
WNT_Score <- pre_B$BIOCARTA_WNT_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, WNT_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(WNT_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL1R_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL1R_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL1R_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL1R_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL2_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL2_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL2_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL2_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
```

```
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL3_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL3_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL3_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL3_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL4_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL4_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL4_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL4_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL5_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL5_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL5_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL5_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL6_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL6_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL6_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL6_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)
```

```
orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL7_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL7_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL7_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL7_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL10_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL10_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL10_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL10_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL12_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL12_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL12_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL12_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IL17_Score <- pre_B$BIOCARTA_IL17_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IL17_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IL17_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
```

```
IFNA_Score <- pre_B$BIOCARTA_IFNA_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IFNA_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IFNA_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
IFNG_Score <- pre_B$BIOCARTA_IFNG_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, IFNG_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(IFNG_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
TNFR1_Score <- pre_B$BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, TNFR1_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(TNFR1_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
TNFR2_Score <- pre_B$BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, TNFR2_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(TNFR2_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
TGFB_Score <- pre_B$BIOCARTA_TGFB_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, TGFB_Score)
```

```
pre_B_df_ANOVA <- aov(TGFB_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
TOLL_Score <- pre_B$BIOCARTA_TOLL_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, TOLL_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(TOLL_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
TLR4_Score <- pre_B$WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, TLR4_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(TLR4_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

orig.ident <- pre_B$orig.ident
NFKB_Score <- pre_B$BIOCARTA_NFKB_PATHWAY
pre_B_df <- data.frame(orig.ident, NFKB_Score)

pre_B_df_ANOVA <- aov(NFKB_Score ~ orig.ident, data = pre_B_df)
summary(pre_B_df_ANOVA)
TukeyHSD(pre_B_df_ANOVA)

##########################################################################
################################

#--B cell

##########################################################################
################################
```

```
load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/m.m.LB_labeled.RData")


B_cell <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "B cell")

rm(m.m.LB)


GS.hallmark <- getGeneSets(library = "H")

GS.BIOCARTA <- getGeneSets(library = "C2")

GS.BIOCARTA <- GS.BIOCARTA[c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_G1_PATHWAY", "BIOCARTA_G2_PATHWAY", "BIOCARTA_HIF_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",

                             "BIOCARTA_IFNG_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",

                             "BIOCARTA_IL2_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY", "BIOCARTA_IL5_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL6_PATHWAY", "BIOCARTA_IL7_PATHWAY",

                             "BIOCARTA_NFKB_PATHWAY",
"BIOCARTA_TGFB_PATHWAY", "BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TOLL_PATHWAY",
"WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",

                             "BIOCARTA_WNT_PATHWAY",
"BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_P53_PATHWAY",
"WP_APOPTOSIS", "WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70")]


ES.B_cell <- enrichIt(obj = B_cell, gene.sets = GS.BIOCARTA, cores = 2)

B_cell <- Seurat::AddMetaData(B_cell, ES.B_cell)


colors <- colorRampPalette(c("#0348A6", "#7AC5FF", "#C6FDEC", "#FFB433",
"#FF4B20"))


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/B_cell_GSE_heaptmap.bmp",
width=1500, height=1000, units="px", res = 100)

dittoHeatmap(B_cell, genes = NULL, metas = names(ES.B_cell),

             annot.by = "orig.ident",

             fontsize = 9,

             cluster_cols = FALSE,

             heatmap.colors = colors(50))

dev.off()
```

```
bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/B_cell_GSE_violplot1.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(B_cell, vars = c("BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY",
"BIOCARTA_HIF_PATHWAY", "BIOCARTA_P27_PATHWAY", "BIOCARTA_G1_PATHWAY",
"BIOCARTA_G2_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/B_cell_GSE_violplot2.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(B_cell, vars = c("BIOCARTA_P53_PATHWAY", "WP_APOPTOSIS",
"WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70", "BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY",
"BIOCARTA_WNT_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/B_cell_GSE_violplot3.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(B_cell, vars = c("BIOCARTA_IL1R_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL2_PATHWAY", "BIOCARTA_IL3_PATHWAY", "BIOCARTA_IL4_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL5_PATHWAY", "BIOCARTA_IL6_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),

                ylab = "Enrichment scores",

                theme = theme_classic())

dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/B_cell_GSE_violplot4.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)

multi_dittoPlot(B_cell, vars = c("BIOCARTA_IL7_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL10_PATHWAY", "BIOCARTA_IL12_PATHWAY",
"BIOCARTA_IL17_PATHWAY", "BIOCARTA_IFNA_PATHWAY",
"BIOCARTA_IFNG_PATHWAY"),

                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),
```

```
                ylab = "Enrichment scores",
                theme = theme_classic())
dev.off()


bmp(file="/home/oem/Pictures/tesis_R/B_cell_GSE_violplot5.bmp",
width=1000, height=750, units="px", res = 100)
multi_dittoPlot(B_cell, vars = c("BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY",
"BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY", "BIOCARTA_TGFB_PATHWAY",
"BIOCARTA_TOLL_PATHWAY", "WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE",
"BIOCARTA_NFKB_PATHWAY"),
                group.by = "orig.ident", plots = c("jitter", "vlnplot",
"boxplot"),
                ylab = "Enrichment scores",
                theme = theme_classic())
dev.off()


orig.ident <- B_cell$orig.ident
CXCR4_Score <- B_cell$BIOCARTA_CXCR4_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, CXCR4_Score)


B_cell_df_ANOVA <- aov(CXCR4_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)


orig.ident <- B_cell$orig.ident
HIF_Score <- B_cell$BIOCARTA_HIF_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, HIF_Score)


B_cell_df_ANOVA <- aov(HIF_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)


orig.ident <- B_cell$orig.ident
P27_Score <- B_cell$BIOCARTA_P27_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, P27_Score)
```

```
B_cell_df_ANOVA <- aov(P27_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
G1_Score <- B_cell$BIOCARTA_G1_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, G1_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(G1_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
G2_Score <- B_cell$BIOCARTA_G2_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, G2_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(G2_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
P53_Score <- B_cell$BIOCARTA_P53_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, P53_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(P53_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
APOPTOSIS_Score <- B_cell$WP_APOPTOSIS
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
```

```
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)


orig.ident <- B_cell$orig.ident
APOPTOSIS_HSP70_Score <- B_cell$WP_APOPTOSIS_MODULATION_BY_HSP70
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, APOPTOSIS_HSP70_Score)


B_cell_df_ANOVA <- aov(APOPTOSIS_HSP70_Score ~ orig.ident, data =
B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)


orig.ident <- B_cell$orig.ident
NOTCH_Score <- B_cell$BIOCARTA_NOTCH_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, NOTCH_Score)


B_cell_df_ANOVA <- aov(NOTCH_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)


orig.ident <- B_cell$orig.ident
WNT_Score <- B_cell$BIOCARTA_WNT_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, WNT_Score)


B_cell_df_ANOVA <- aov(WNT_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)


orig.ident <- B_cell$orig.ident
IL1R_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL1R_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL1R_Score)


B_cell_df_ANOVA <- aov(IL1R_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)
```

```
orig.ident <- B_cell$orig.ident
IL2_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL2_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL2_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IL2_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
IL3_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL3_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL3_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IL3_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
IL4_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL4_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL4_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IL4_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
IL5_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL5_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL5_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IL5_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
```

```
IL6_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL6_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL6_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IL6_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
IL7_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL7_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL7_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IL7_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
IL10_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL10_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL10_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IL10_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
IL12_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL12_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL12_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IL12_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
IL17_Score <- B_cell$BIOCARTA_IL17_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IL17_Score)
```

```
B_cell_df_ANOVA <- aov(IL17_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
IFNA_Score <- B_cell$BIOCARTA_IFNA_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IFNA_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IFNA_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
IFNG_Score <- B_cell$BIOCARTA_IFNG_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, IFNG_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(IFNG_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
TNFR1_Score <- B_cell$BIOCARTA_TNFR1_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, TNFR1_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(TNFR1_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
TNFR2_Score <- B_cell$BIOCARTA_TNFR2_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, TNFR2_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(TNFR2_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
```

```
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
TGFB_Score <- B_cell$BIOCARTA_TGFB_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, TGFB_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(TGFB_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
TOLL_Score <- B_cell$BIOCARTA_TOLL_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, TOLL_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(TOLL_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
TLR4_Score <- B_cell$WP_TLR4_SIGNALING_AND_TOLERANCE
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, TLR4_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(TLR4_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)

orig.ident <- B_cell$orig.ident
NFKB_Score <- B_cell$BIOCARTA_NFKB_PATHWAY
B_cell_df <- data.frame(orig.ident, NFKB_Score)

B_cell_df_ANOVA <- aov(NFKB_Score ~ orig.ident, data = B_cell_df)
summary(B_cell_df_ANOVA)
TukeyHSD(B_cell_df_ANOVA)
```

Scripts 7

```
library(dplyr)

library(SingleCellExperiment)

library(Seurat)

library(scater)

library(stringr)

library(tidyverse)

library(ggpubr)


### Subset files

load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/m.m.LB_labeled.RData")


HSP_MPP <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "HSC/MPP")

save(HSP_MPP, file = "/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/HSP_MPP.RData")

rm(HSP_MPP)


pro_B <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "pre pro B cell ")

save(pro_B, file = "/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/pro_B.RData")

rm(pro_B)


pro_B <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "pro B cell")

save(pro_B, file = "/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/pro_B.RData")

rm(pro_B)


pre_B <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "pre B cell")

save(pre_B, file = "/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/pre_B.RData")

rm(pre_B)


B_cell <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "B cell")

save(B_cell, file = "/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/B_cell.RData")
```

```
rm(B_cell)


rm(m.m.LB)

################################## HSP_MPP

load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/HSP_MPP.RData")

DimPlot(HSP_MPP, reduction = "umap", pt.size = 0.8, group.by =
"orig.ident")

FeaturePlot(object = HSP_MPP, feature = c("MKI67", "NUSAP1"), pt.size =
0.5, split.by = "orig.ident")

FeaturePlot(object = HSP_MPP, feature = c("CD34", "SPINK2"), pt.size =
0.5, split.by = "orig.ident")


s.genes <- cc.genes$s.genes

g2m.genes <- cc.genes$g2m.genes

HSP_MPP <- CellCycleScoring(HSP_MPP, s.features = s.genes, g2m.features =
g2m.genes, set.ident = TRUE)


RidgePlot(HSP_MPP, features = c("NUSAP1", "TOP2A", "MKI67"))

RidgePlot(HSP_MPP, features = c("NUSAP1", "TOP2A", "MKI67"), group.by =
"orig.ident")


cc.cell.num <- table(HSP_MPP$Phase, HSP_MPP$orig.ident) %>% data.frame()

cc.cell.num <- cc.cell.num %>% rename(Var1 = "Phase", Var2 =
"orig.ident")

tot.FL <- 104+33+67

tot.LBM <- 65+2+13

tot.NBM <- 119+18+32


perc <- c((104*100/tot.FL), (33*100/tot.FL), (67*100/tot.FL),
          (65*100/tot.LBM), (2*100/tot.LBM), (13*100/tot.LBM),
          (119*100/tot.NBM), (18*100/tot.NBM), (32*100/tot.NBM))

cc.cell.num <- cbind(cc.cell.num, perc)

ggbarplot(cc.cell.num, x = "orig.ident", y = "perc",
          fill = "Phase", color = "Phase", palette = c("#3498DB",
"#5AB242", "#FA6DA4"),
          label = TRUE, lab.col = "blue", lab.pos = "in")
```

```
################################## pre_pro_B

load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/pre_pro_B.RData")


bmp(file="/home/oem/Pictures/UMAP_group.by_pre_pro_B.bmp", width=504,
height=412, units="px", res = 100)

DimPlot(pre_pro_B, reduction = "umap", pt.size = 0.8, group.by =
"orig.ident")

dev.off()


s.genes <- cc.genes$s.genes

g2m.genes <- cc.genes$g2m.genes

pre_pro_B <- CellCycleScoring(pre_pro_B, s.features = s.genes,
g2m.features = g2m.genes, set.ident = TRUE)


cc.cell.num <- table(pre_pro_B$Phase, pre_pro_B$orig.ident) %>%
data.frame()

cc.cell.num <- cc.cell.num %>% rename(Var1 = "Phase", Var2 =
"orig.ident")

tot.FL <- 9+12+37

tot.LBM <- 2400+591+1233

tot.NBM <- 41+30+37


perc <- c((9*100/tot.FL), (12*100/tot.FL), (37*100/tot.FL),

          (2400*100/tot.LBM), (591*100/tot.LBM), (1233*100/tot.LBM),

          (41*100/tot.NBM), (30*100/tot.NBM), (37*100/tot.NBM))

cc.cell.num <- cbind(cc.cell.num, perc)


bmp(file="/home/oem/Pictures/cc_proportion_pre_pro_B.bmp", width=703,
height=660, units="px", res = 100)

ggbarplot(cc.cell.num, x = "orig.ident", y = "perc",

          fill = "Phase", color = "Phase", palette = c("#3498DB",
"#5AB242", "#FA6DA4"),

          label = TRUE, lab.col = "blue", lab.pos = "in")

dev.off()
```

```
################################## pro_B

load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/pro_B.RData")


bmp(file="/home/oem/Pictures/UMAP_group.by_pro_B.bmp", width=504,
height=412, units="px", res = 100)

DimPlot(pro_B, reduction = "umap", pt.size = 0.8, group.by =
"orig.ident")

dev.off()


s.genes <- cc.genes$s.genes

g2m.genes <- cc.genes$g2m.genes

pro_B <- CellCycleScoring(pro_B, s.features = s.genes, g2m.features =
g2m.genes, set.ident = TRUE)


cc.cell.num <- table(pro_B$Phase, pro_B$orig.ident) %>% data.frame()

cc.cell.num <- cc.cell.num %>% rename(Var1 = "Phase", Var2 =
"orig.ident")

tot.FL <- 3+64+56

tot.LBM <- 708+577+1016

tot.NBM <- 24+51+76


perc <- c((3*100/tot.FL), (64*100/tot.FL), (56*100/tot.FL),

          (708*100/tot.LBM), (577*100/tot.LBM), (1016*100/tot.LBM),

          (24*100/tot.NBM), (51*100/tot.NBM), (76*100/tot.NBM))

cc.cell.num <- cbind(cc.cell.num, perc)


bmp(file="/home/oem/Pictures/cc_proportion_pro_B.bmp", width=703,
height=660, units="px", res = 100)

ggbarplot(cc.cell.num, x = "orig.ident", y = "perc",

          fill = "Phase", color = "Phase", palette = c("#3498DB",
"#5AB242", "#FA6DA4"),

          label = TRUE, lab.col = "blue", lab.pos = "in")

dev.off()


################################## pre_B
```

```
load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/pre_B.RData")


bmp(file="/home/oem/Pictures/UMAP_group.by_pre_B.bmp", width=504,
height=412, units="px", res = 100)

DimPlot(pre_B, reduction = "umap", pt.size = 0.8, group.by =
"orig.ident")

dev.off()


s.genes <- cc.genes$s.genes

g2m.genes <- cc.genes$g2m.genes

pre_B <- CellCycleScoring(pre_B, s.features = s.genes, g2m.features =
g2m.genes, set.ident = TRUE)


cc.cell.num <- table(pre_B$Phase, pre_B$orig.ident) %>% data.frame()

cc.cell.num <- cc.cell.num %>% rename(Var1 = "Phase", Var2 =
"orig.ident")

tot.FL <- 6+21+9

tot.LBM <- 169+32+36

tot.NBM <- 89+267+218


perc <- c((6*100/tot.FL), (21*100/tot.FL), (9*100/tot.FL),

          (169*100/tot.LBM), (32*100/tot.LBM), (36*100/tot.LBM),

          (89*100/tot.NBM), (267*100/tot.NBM), (218*100/tot.NBM))

cc.cell.num <- cbind(cc.cell.num, perc)


bmp(file="/home/oem/Pictures/cc_proportion_pre_B.bmp", width=703,
height=660, units="px", res = 100)

ggbarplot(cc.cell.num, x = "orig.ident", y = "perc",

          fill = "Phase", color = "Phase", palette = c("#3498DB",
"#5AB242", "#FA6DA4"),

          label = TRUE, lab.col = "blue", lab.pos = "in")

dev.off()


################################## B_cell

load("/media/oem/Seagate Portable
Drive/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/B_cell.RData")
```

```
bmp(file="/home/oem/Pictures/UMAP_group.by_B_cell.bmp", width=504,
height=412, units="px", res = 100)

DimPlot(B_cell, reduction = "umap", pt.size = 0.8, group.by =
"orig.ident")

dev.off()


s.genes <- cc.genes$s.genes

g2m.genes <- cc.genes$g2m.genes

B_cell <- CellCycleScoring(B_cell, s.features = s.genes, g2m.features =
g2m.genes, set.ident = TRUE)


cc.cell.num <- table(B_cell$Phase, B_cell$orig.ident) %>% data.frame()

cc.cell.num <- cc.cell.num %>% rename(Var1 = "Phase", Var2 =
"orig.ident")

tot.FL <- 26+7+2

tot.LBM <- 995+353+1012

tot.NBM <- 97+83+52


perc <- c((26*100/tot.FL), (7*100/tot.FL), (2*100/tot.FL),

          (995*100/tot.LBM), (353*100/tot.LBM), (1012*100/tot.LBM),

          (97*100/tot.NBM), (83*100/tot.NBM), (52*100/tot.NBM))

cc.cell.num <- cbind(cc.cell.num, perc)


bmp(file="/home/oem/Pictures/cc_proportion_B_cell.bmp", width=703,
height=660, units="px", res = 100)

ggbarplot(cc.cell.num, x = "orig.ident", y = "perc",

          fill = "Phase", color = "Phase", palette = c("#3498DB",
"#5AB242", "#FA6DA4"),

          label = TRUE, lab.col = "blue", lab.pos = "in")

dev.off()
```

Scripts 8

```
library(dplyr)

library(SingleCellExperiment)

library(Seurat)

library(scater)
```

```
library(CellChat)
library(tidyverse)
library(tidygraph)
library(pbapply)
library(parallel)
library(igraph)
library(ggraph)
library(patchwork)


#load("D:/Escritorio/PX/m.m.LB_labeled.RData")
#load("F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/HSP_MPP.RData")
#load("F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/pre_pro_B.RData")
#load("F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/pro_B.RData")
#load("F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/pre_B.RData")
#load("F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/B_cell.RData")
#load("F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/Stromal_Cells_FL.RDat
a")



Hepatocytes <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "Hepatocyte")
save(Hepatocytes,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/hepatocytes.RData")


Fibroblast <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "Fibroblast")
save(Hepatocytes,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/fibroblast.RData")


Endothelial <- subset(x = m.m.LB, seurat_clusters == "Endothelial cell")
save(Hepatocytes,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/endothelial.RData")


Stromal_Cells_FL <- merge(Hepatocytes, y = c(Fibroblast, Endothelial))
Stromal_Cells_FL <- subset(x = Stromal_Cells_FL, orig.ident == "FL")
save(Stromal_Cells_FL,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/Stromal_Cells_FL.RData
")
```

```
cells_to_test <- c("Hepatocyte", "Fibroblast", "Endothelial cell")



VlnPlot(Stromal_Cells_FL, features = gene_interest, group.by =
"seurat_clusters", idents = cells_to_test, pt.size = 0.5, )



Secreted_inflamatory_factors <- c("CSF3", "CSF2", "CSF1", "IFNA2",
"IFNB1", "IFNG", "TNF", "IL1B", "IL6", "IL2", "IL3",
                                  "IL4", "IL5", "IL7", "CXCL8",  "IL10",
      "IL12B", "IL15", "VEGFA", "LIF", "TNFSF10",
                                  "KITLG", "TSLP", "FGF2",
"FLT3LG","HSPD1", "HSPA1A", "hsp90a.1", "FOXP3", "CCL3",
                                  "CCL2", "CCL7", "CCL12", "CCL20",
"CCL19", "CCL1", "CCL25", "CCL4", "CXCL9","CXCL10",
                                  "CXCL11", "CXCL12", "CXCL13",
      "CXCL16", "XCL1", "XCL2")
DotPlot(Stromal_Cells_FL, features = (Secreted_inflamatory_factors), cols
= c("blue", "red", "yellow"), dot.scale = 8,
        idents = cells_to_test) + RotatedAxis()


Membring_anchored_inflamatory_factors <- c("CSF3R", "CSF2RB", "CSF1R",
"IFNAR1", "IFNGR1", "TNFRSF1A", "TNFRSF1B", "IL1R1", "IL6R",
                                           "IL2RA", "IL3RA", "IL4R",
"IL5RA", "IL7R", "CXCR2", "IL10RA", "IL12RB1",
                                           "IL15RA", "NRP1", "TNFRSF10A",
"KIT", "CRLF2","FGFR1","FLT3","TLR2",
                                           "TLR4", "TLR8", "TLR9",
"CCR1", "CCR2", "CCR3", "CCR5", "CCR6", "CCR7", "CCR8",
                                           "CCR9", "ACKR2", "CXCR1",
"CXCR3", "CXCR4", "CXCR5", "CXCR6", "ACKR3",
                                           "XCR1", "NLRP3", "SCARB1",
"NFKB1")
DotPlot(Stromal_Cells_FL, features =
(Membring_anchored_inflamatory_factors), cols = c("blue", "red",
"yellow"), dot.scale = 8,
        idents = cells_to_test) + RotatedAxis()


gene_interest<-  c("CSF1", "IFNG", "TNF", "IL1B", "VEGFA", "TNFSF10",
                                  "HSPD1", "HSPA1A", "CCL2",
"CCL20","CCL4","CXCL10",
```

```
                                    "CXCL12", "CXCL16")
VlnPlot(Stromal_Cells_FL, features = gene_interest, group.by =
"seurat_clusters", idents = cells_to_test, pt.size = 0.5, adjust = 5,
ncol = 7)


gene_interest<-  c("CSF3R", "IFNAR1", "IFNGR1", "TNFRSF1A", "TNFRSF1B",
"IL1R1", "IL3RA", "IL4R",
                   "IL15RA", "NRP1", "FGFR1",
                   "TLR4","CXCR4", "ACKR3", "NFKB1", "NFKB2")
VlnPlot(Stromal_Cells_FL, features = gene_interest, group.by =
"seurat_clusters", idents = cells_to_test, pt.size = 0.5, adjust = 5,
ncol = 7)


##################Objects###


B_linage <- merge(HSP_MPP, y = c(pre_pro_B, pro_B, pre_B, B_cell))
rm(B_linage, HSP_MPP, pre_pro_B, pro_B, pre_B, B_cell, Endothelial,
Fibroblast, Hepatocytes)


B_linage_FL <- subset(x = B_linage, orig.ident == "FL")
B_linage_LBM <- subset(x = B_linage, orig.ident == "LBM")
B_linage_NBM <- subset(x = B_linage, orig.ident == "NBM")


CellChat_FL <- merge(Stromal_Cells_FL, y = B_linage_FL)
save(CellChat_FL,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_FL.RData")
rm(B_linage_FL)


CellChat_LBM <- merge(Stromal_Cells_FL, y = B_linage_LBM)
save(CellChat_LBM,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_LBM.RData")
rm(B_linage_LBM)


CellChat_NBM <- merge(Stromal_Cells_FL, y = B_linage_NBM)
save(CellChat_NBM,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_NBM.RData")
rm(B_linage_NBM)
rm(Stromal_Cells_FL)
```

```
#load("F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_LBM.RData")
#load("F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_NBM.RData")
#load("F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_FL.RData")

########################Cell Chat
CellChat_FL <- createCellChat(object = CellChat_FL, group.by = "ident")
CellChatDB <- CellChatDB.human
dplyr::glimpse(CellChatDB$interaction)

#seleccionar un subconjunto
CellChatDB.use <- subsetDB(CellChatDB, search = "Secreted Signaling")
CellChat_FL@DB <- CellChatDB.use
CellChat_FL <- subsetData(CellChat_FL)

future::plan("multiprocess", workers = 2)

tempus <- Sys.time()
CellChat_FL <- identifyOverExpressedGenes(CellChat_FL)
CellChat_FL <- identifyOverExpressedInteractions(CellChat_FL)
# project gene expression data onto PPI network (optional)
CellChat_FL <- projectData(CellChat_FL, PPI.human)
tempus <- Sys.time() - tempus

################inferencia de comunicación

tempus2 <- Sys.time()
CellChat_FL <- computeCommunProb(CellChat_FL)
CellChat_FL <- filterCommunication(CellChat_FL, min.cells = 10)
tempus2 <- Sys.time() - tempus2

tempus3<- Sys.time()
CellChat_FL <- computeCommunProbPathway(CellChat_FL)
CellChat_FL <- aggregateNet(CellChat_FL)
```

```
tempus3 <- Sys.time() - tempus3


save(CellChat_FL,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_FL.RData")



groupSize <- as.numeric(table(CellChat_FL@idents))
par(mfrow = c(1,2), xpd=TRUE)

netVisual_circle(CellChat_FL@net$count,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Number of interactions")

netVisual_circle(CellChat_FL@net$weight,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Interaction weights/strength")

table(CellChat_FL@idents)
CellChat_FL@net$pval

df.net <- subsetCommunication(CellChat_FL)

df.net %>% as_tibble()

g1 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
```

```
  tally(name = "weight") %>%
  graph_from_data_frame()

g1 %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(mapping = aes(color = weight, alpha = weight),
                 arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  geom_node_text(mapping = aes(label = name )) +
  theme_graph()

df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  graph_from_data_frame() %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(aes(alpha = weight)) +
  #geom_node_point() +
  geom_node_text(aes(label=name)) +
  theme_graph()

df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  ggplot() +
  aes(x = weight, y = ..scaled..) +
  geom_density()
```

```
g2 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  #filter(weight > 6) %>%
  graph_from_data_frame() #%>%

g2 %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(mapping = aes(color = weight, alpha = weight),
                 arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  geom_node_text(mapping = aes(label = name )) +
  theme_graph()

g3 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target, pathway_name) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  #filter(weight > 0) %>%
  graph_from_data_frame() #%>%

g3 %>%
  ggraph(layout = 'linear', circular = TRUE) +
  #ggraph() +
  geom_edge_arc(aes(color = weight),
                arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
```

```
  #geom_edge_link() +
  geom_node_text(aes(label = name)) +
  theme_graph() +
  facet_wrap(facets = vars(pathway_name))


g3 %>%
  get.data.frame(what = "edges") %>%
  as_tibble() %>%
  arrange(desc(weight))


df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  arrange(desc(weight))


groupSize <- as.numeric(table(CellChat_FL@idents))
par(mfrow = c(1,2), xpd=TRUE)

netVisual_circle(CellChat_FL@net$count,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Number of interactions")

netVisual_circle(CellChat_FL@net$weight,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
```

```
                title.name = "Interaction weights/strength")


CellChat_FL <- netAnalysis_computeCentrality(CellChat_FL, slot.name =
"netP")


ht1 <- netAnalysis_signalingRole_heatmap(CellChat_FL, pattern =
"outgoing")

ht2 <- netAnalysis_signalingRole_heatmap(CellChat_FL, pattern =
"incoming")

ht1 + ht2


########################Cell Chat

CellChat_LBM <- createCellChat(object = CellChat_LBM, group.by = "ident")

CellChatDB <- CellChatDB.human

dplyr::glimpse(CellChatDB$interaction)


#seleccionar un subconjunto

CellChatDB.use <- subsetDB(CellChatDB, search = "Secreted Signaling")

CellChat_LBM@DB <- CellChatDB.use

CellChat_LBM <- subsetData(CellChat_LBM)


future::plan("multiprocess", workers = 2)


tempus <- Sys.time()

CellChat_LBM <- identifyOverExpressedGenes(CellChat_LBM)

CellChat_LBM <- identifyOverExpressedInteractions(CellChat_LBM)

# project gene expression data onto PPI network (optional)

CellChat_LBM <- projectData(CellChat_LBM, PPI.human)

tempus <- Sys.time() - tempus


################inferencia de comunicación


tempus2 <- Sys.time()

CellChat_LBM <- computeCommunProb(CellChat_LBM)

CellChat_LBM <- filterCommunication(CellChat_LBM, min.cells = 10)
```

```
tempus2 <- Sys.time() - tempus2


tempus3<- Sys.time()
CellChat_LBM <- computeCommunProbPathway(CellChat_LBM)
CellChat_LBM <- aggregateNet(CellChat_LBM)
tempus3 <- Sys.time() - tempus3


save(CellChat_LBM,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_LBM.RData")



groupSize <- as.numeric(table(CellChat_LBM@idents))
par(mfrow = c(1,2), xpd=TRUE)

netVisual_circle(CellChat_LBM@net$count,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Number of interactions")

netVisual_circle(CellChat_LBM@net$weight,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Interaction weights/strength")

table(CellChat_LBM@idents)
CellChat_LBM@net$pval

df.net <- subsetCommunication(CellChat_LBM)

df.net %>% as_tibble()

g1 <-
```

```
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  graph_from_data_frame()

g1 %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(mapping = aes(color = weight, alpha = weight),
                 arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  geom_node_text(mapping = aes(label = name )) +
  theme_graph()

df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  graph_from_data_frame() %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(aes(alpha = weight)) +
  #geom_node_point() +
  geom_node_text(aes(label=name)) +
  theme_graph()

df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
```

```
  tally(name = "weight") %>%
  ggplot() +
  aes(x = weight, y = ..scaled..) +
  geom_density()

g2 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  #filter(weight > 6) %>%
  graph_from_data_frame() #%>%

g2 %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(mapping = aes(color = weight, alpha = weight),
                 arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  geom_node_text(mapping = aes(label = name )) +
  theme_graph()

g3 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target, pathway_name) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  #filter(weight > 0) %>%
  graph_from_data_frame() #%>%

g3 %>%
```

```
  ggraph(layout = 'linear', circular = TRUE) +
  #ggraph() +
  geom_edge_arc(aes(color = weight),
                arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  #geom_edge_link() +
  geom_node_text(aes(label = name)) +
  theme_graph() +
  facet_wrap(facets = vars(pathway_name))


g3 %>%
  get.data.frame(what = "edges") %>%
  as_tibble() %>%
  arrange(desc(weight))


df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  arrange(desc(weight))


groupSize <- as.numeric(table(CellChat_LBM@idents))
par(mfrow = c(1,2), xpd=TRUE)

netVisual_circle(CellChat_LBM@net$count,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Number of interactions")
```

```
netVisual_circle(CellChat_LBM@net$weight,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Interaction weights/strength")


CellChat_LBM <- netAnalysis_computeCentrality(CellChat_LBM, slot.name =
"netP")


ht1 <- netAnalysis_signalingRole_heatmap(CellChat_LBM, pattern =
"outgoing")
ht2 <- netAnalysis_signalingRole_heatmap(CellChat_LBM, pattern =
"incoming")
ht1 + ht2


########################Cell Chat
CellChat_NBM <- createCellChat(object = CellChat_NBM, group.by = "ident")
CellChatDB <- CellChatDB.human
dplyr::glimpse(CellChatDB$interaction)


#seleccionar un subconjunto
CellChatDB.use <- subsetDB(CellChatDB, search = "Secreted Signaling")
CellChat_NBM@DB <- CellChatDB.use
CellChat_NBM <- subsetData(CellChat_NBM)


future::plan("multiprocess", workers = 2)


tempus <- Sys.time()
CellChat_NBM <- identifyOverExpressedGenes(CellChat_NBM)
CellChat_NBM <- identifyOverExpressedInteractions(CellChat_NBM)
# project gene expression data onto PPI network (optional)
CellChat_NBM <- projectData(CellChat_NBM, PPI.human)
tempus <- Sys.time() - tempus
```

```
################inferencia de comunicación

tempus2 <- Sys.time()
CellChat_NBM <- computeCommunProb(CellChat_NBM)
CellChat_NBM <- filterCommunication(CellChat_NBM, min.cells = 10)
tempus2 <- Sys.time() - tempus2

tempus3<- Sys.time()
CellChat_NBM <- computeCommunProbPathway(CellChat_NBM)
CellChat_NBM <- aggregateNet(CellChat_NBM)
tempus3 <- Sys.time() - tempus3

save(CellChat_NBM,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_NBM.RData")



groupSize <- as.numeric(table(CellChat_NBM@idents))
par(mfrow = c(1,2), xpd=TRUE)

netVisual_circle(CellChat_NBM@net$count,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Number of interactions")

netVisual_circle(CellChat_NBM@net$weight,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Interaction weights/strength")

table(CellChat_NBM@idents)
CellChat_NBM@net$pval
```

```
df.net <- subsetCommunication(CellChat_NBM)

df.net %>% as_tibble()

g1 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  graph_from_data_frame()

g1 %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(mapping = aes(color = weight, alpha = weight),
                 arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  geom_node_text(mapping = aes(label = name )) +
  theme_graph()

df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  graph_from_data_frame() %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(aes(alpha = weight)) +
  #geom_node_point() +
  geom_node_text(aes(label=name)) +
  theme_graph()
```

```
df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  ggplot() +
  aes(x = weight, y = ..scaled..) +
  geom_density()

g2 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  #filter(weight > 6) %>%
  graph_from_data_frame() #%>%

g2 %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(mapping = aes(color = weight, alpha = weight),
                 arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  geom_node_text(mapping = aes(label = name )) +
  theme_graph()

g3 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target, pathway_name) %>%
```

```
  tally(name = "weight") %>%
  #filter(weight > 0) %>%
  graph_from_data_frame() #%>%

g3 %>%
  ggraph(layout = 'linear', circular = TRUE) +
  #ggraph() +
  geom_edge_arc(aes(color = weight),
                arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  #geom_edge_link() +
  geom_node_text(aes(label = name)) +
  theme_graph() +
  facet_wrap(facets = vars(pathway_name))


g3 %>%
  get.data.frame(what = "edges") %>%
  as_tibble() %>%
  arrange(desc(weight))


df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  arrange(desc(weight))


groupSize <- as.numeric(table(CellChat_NBM@idents))
par(mfrow = c(1,2), xpd=TRUE)
```

```
netVisual_circle(CellChat_NBM@net$count,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Number of interactions")


netVisual_circle(CellChat_NBM@net$weight,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Interaction weights/strength")


CellChat_NBM <- netAnalysis_computeCentrality(CellChat_NBM, slot.name =
"netP")


ht1 <- netAnalysis_signalingRole_heatmap(CellChat_NBM, pattern =
"outgoing")
ht2 <- netAnalysis_signalingRole_heatmap(CellChat_NBM, pattern =
"incoming")
ht1 + ht2
########################Cell Chat
CellChat_NBM <- createCellChat(object = CellChat_NBM, group.by = "ident")
CellChatDB <- CellChatDB.human
dplyr::glimpse(CellChatDB$interaction)


#seleccionar un subconjunto
CellChatDB.use <- subsetDB(CellChatDB, search = "Secreted Signaling")
CellChat_NBM@DB <- CellChatDB.use
CellChat_NBM <- subsetData(CellChat_NBM)


future::plan("multiprocess", workers = 2)


tempus <- Sys.time()
CellChat_NBM <- identifyOverExpressedGenes(CellChat_NBM)
CellChat_NBM <- identifyOverExpressedInteractions(CellChat_NBM)
```

```
# project gene expression data onto PPI network (optional)
CellChat_NBM <- projectData(CellChat_NBM, PPI.human)
tempus <- Sys.time() - tempus

################inferencia de comunicación

tempus2 <- Sys.time()
CellChat_NBM <- computeCommunProb(CellChat_NBM)
CellChat_NBM <- filterCommunication(CellChat_NBM, min.cells = 10)
tempus2 <- Sys.time() - tempus2

tempus3<- Sys.time()
CellChat_NBM <- computeCommunProbPathway(CellChat_NBM)
CellChat_NBM <- aggregateNet(CellChat_NBM)
tempus3 <- Sys.time() - tempus3

save(CellChat_NBM,
file="F:/RNA_seq_files/Preprocessed_QC_Robjects/PX/CellChat_NBM.RData")



groupSize <- as.numeric(table(CellChat_NBM@idents))
par(mfrow = c(1,2), xpd=TRUE)

netVisual_circle(CellChat_NBM@net$count,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Number of interactions")

netVisual_circle(CellChat_NBM@net$weight,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Interaction weights/strength")
```

```
table(CellChat_NBM@idents)
CellChat_NBM@net$pval

df.net <- subsetCommunication(CellChat_NBM)

df.net %>% as_tibble()

g1 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  graph_from_data_frame()

g1 %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(mapping = aes(color = weight, alpha = weight),
                 arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  geom_node_text(mapping = aes(label = name )) +
  theme_graph()

df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  graph_from_data_frame() %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(aes(alpha = weight)) +
```

```
  #geom_node_point() +
  geom_node_text(aes(label=name)) +
  theme_graph()

df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  ggplot() +
  aes(x = weight, y = ..scaled..) +
  geom_density()

g2 <-
  df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  #filter(weight > 6) %>%
  graph_from_data_frame() #%>%

g2 %>%
  ggraph() +
  geom_edge_link(mapping = aes(color = weight, alpha = weight),
                 arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  geom_node_text(mapping = aes(label = name )) +
  theme_graph()

g3 <-
  df.net %>%
```

```
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target, pathway_name) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  #filter(weight > 0) %>%
  graph_from_data_frame() #%>%

g3 %>%
  ggraph(layout = 'linear', circular = TRUE) +
  #ggraph() +
  geom_edge_arc(aes(color = weight),
                arrow = arrow(length = unit(4, 'mm'))
  ) +
  #geom_edge_link() +
  geom_node_text(aes(label = name)) +
  theme_graph() +
  facet_wrap(facets = vars(pathway_name))


g3 %>%
  get.data.frame(what = "edges") %>%
  as_tibble() %>%
  arrange(desc(weight))


df.net %>%
  mutate(qval = p.adjust(pval)) %>%
  filter(qval < 0.05) %>%
  as_tibble() %>%
  group_by(source, target) %>%
  tally(name = "weight") %>%
  arrange(desc(weight))
```

```
groupSize <- as.numeric(table(CellChat_NBM@idents))
par(mfrow = c(1,2), xpd=TRUE)

netVisual_circle(CellChat_NBM@net$count,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Number of interactions")

netVisual_circle(CellChat_NBM@net$weight,
                 vertex.weight = groupSize,
                 weight.scale = T,
                 label.edge= F,
                 title.name = "Interaction weights/strength")

CellChat_NBM <- netAnalysis_computeCentrality(CellChat_NBM, slot.name =
"netP")

ht1 <- netAnalysis_signalingRole_heatmap(CellChat_NBM, pattern =
"outgoing")
ht2 <- netAnalysis_signalingRole_heatmap(CellChat_NBM, pattern =
"incoming")
ht1 + ht2
```

Archivos suplementarios

Archivo suplementario 1

LPS	time	cell	Area	Mean	Min	Max	IntDen	PArea	RawIntDen	CIntDen
0.05	48h	Nalm6	308627	79.734	0	3240	24607979	99.84	24607979	21743611.81
0.1	48h	Nalm6	338150	65.324	0	3015	22089158	99.707	22089158	18852048.05
0.5	48h	Nalm6	305949	81.518	0	4095	24940300	99.786	24940300	22142090.45
1	48h	Nalm6	314232	44.112	0	2253	13861336	99.347	13861336	11721101.85
10	48h	Nalm6	305572	32.764	0	835	10011757	98.868	10011757	7866641.56
50	48h	Nalm6	355935	35.503	0	1680	12636807	98.6	12636807	9886853.19

0	48h	Nalm6	297535	103.287	0	4095	30731605	99.873	30731605	27975835.83
0.05	96h	Nalm6	306521	289.964	26	4095	88879926	100	88879926	76755487.85
0.1	96h	Nalm6	355002	294.176	23	4095	104433056	100	104433056	93417343.94
0.5	96h	Nalm6	311231	234.442	21	4095	72965553	100	72965553	61163051.02
1	96h	Nalm6	338487	296.386	13	4095	100322785	100	100322785	87393935.55
10	96h	Nalm6	383321	344.724	26	4095	132139808	100	132139808	116991345.4
50	96h	Nalm6	433118	278.651	19	4095	120688797	100	120688797	104935862.2
0	96h	Nalm6	415714	270.302	25	4095	112368408	100	112368408	99736522.4
0.05	48h	Nalm6	404963	30.342	0	1129	12287245	99.725	12287245	9306717.32
0.1	48h	Nalm6	370007	51.604	0	4095	19093738	99.999	19093738	14425359.68
0.5	48h	Nalm6	418384	52.537	0	3303	21980688	99.939	21980688	16934976.96
1	48h	Nalm6	426949	68.837	0	2430	29389963	99.99	29389963	24193139.77
10	48h	Nalm6	313455	47.961	0	4095	15033694	100	15033694	10148811.28
50	48h	Nalm6	461982	75.365	0	4095	34817245	99.984	34817245	28513500.61
0	48h	Nalm6	375599	38.749	0	1118	14554255	99.449	14554255	11933700.78
0.05	96h	Nalm6	348326	527.085	29	4095	183597417	100	183597417	171872067.2
0.1	96h	Nalm6	395598	280.69	37	4095	111040235	100	111040235	89527220.16
0.5	96h	Nalm6	405947	283.292	20	4095	115001356	100	115001356	100077526.4
1	96h	Nalm6	371987	224.402	28	4095	83474606	100	83474606	70372107.9
10	96h	Nalm6	418203	309.823	25	4095	129568882	100	129568882	112652988.9
50	96h	Nalm6	389120	305.215	12	4095	118765349	100	118765349	79589136.52
0	96h	Nalm6	309476	331.047	20	1571	102450992	100	102450992	89326733.79
0.05	48h	Nalm6	312615	124.764	0	4095	39003237	99.696	39003237	36601415.96
0.1	48h	Nalm6	303326	531.31	4	4095	161160170	100	161160170	158029239
0.5	48h	Nalm6	288519	248.741	0	4095	71766632	99.986	71766632	69241225.19

1	48h	Nalm6	326779	256.752	0	4095	83901172	99.989	83901172	80386010.3
10	48h	Nalm6	306901	274.229	0	4095	84161009	99.994	84161009	81242687.39
50	48h	Nalm6	349865	290.991	0	4095	101807521	99.881	101807521	98301523.84
0	48h	Nalm6	353685	542.629	0	4095	191919628	99.999	191919628	188358373.7
0.05	96h	Nalm6	397463	1346.582		36	4095	535216555	100	535216555	522779540.3
0.1	96h	Nalm6	449933	818.446	15	4095	368245645	100	368245645	362594036.6
0.5	96h	Nalm6	425433	762.214	18	4095	324270994	100	324270994	319409996.5
1	96h	Nalm6	413086	1063.883		13	4095	439475083	100	439475083	429633722.1
10	96h	Nalm6	357553	958.301	6	4095	342643567	100	342643567	337770477.2
50	96h	Nalm6	348453	375.893	10	3694	130980985	100	130980985	128492333.7
0	96h	Nalm6	475449	1175.457		12	4095	558869656	100	558869656	550739478.1
0.05	48h	RS4	447989	156.903	0	4095	70290900	99.943	70290900	62856522.55
0.1	48h	RS4	414278	80.305	0	3846	33268539	99.87	33268539	27917310.07
0.5	48h	RS4	405574	127.996	0	4095	51911907	99.994	51911907	46133694.22
1	48h	RS4	385326	99.679	0	4095	38408993	99.989	38408993	33496857.15
10	48h	RS4	385716	292.577	1	4095	112851676	100	112851676	108479199.4
50	48h	RS4	316301	237.311	3	4095	75061841	100	75061841	70331559.55
0	48h	RS4	386182	68.471	0	1438	26442389	99.949	26442389	21908226.14
0.05	96h	RS4	429586	947.601	24	4095	407076314	100	407076314	390145470.6
0.1	96h	RS4	366146	625.941	31	4095	229185884	100	229185884	215646171.1
0.5	96h	RS4	339928	1040.171		58	4095	353583274	100	353583274	329266184.6
1	96h	RS4	432827	939.315	47	4095	406560878	100	406560878	387816006.3
10	96h	RS4	410260	637.63	22	4095	261594212	100	261594212	246025255.3
50	96h	RS4	355546	572.591	23	4095	203582545	100	203582545	190545739.8
0	96h	RS4	383616	959.78	33	4095	368186942	100	368186942	351388781

0.05	48h	RS4	424343	138.833	0	4095	58913003	99.992	58913003	52446440.02
0.1	48h	RS4	467731	139.618	0	3812	65303601	99.998	65303601	57688004.86
0.5	48h	RS4	457251	118.186	0	1617	54040442	99.995	54040442	48451920.28
1	48h	RS4	476350	192.163	0	4095	91536909	99.999	91536909	76483772.65
10	48h	RS4	371094	136.039	0	4095	50483199	99.999	50483199	45199933.72
50	48h	RS4	474878	138.777	0	4095	65902032	100	65902032	57703263.33
0	48h	RS4	430118	175.377	0	4095	75432753	99.994	75432753	69246795.92
0.05	96h	RS4	469517	967.67	31	4095	454337673	100	454337673	433363409.6
0.1	96h	RS4	427953	1162.507		36	4095	497498473	100	497498473 478711336.3
0.5	96h	RS4	403486	727.07	39	4095	293362729	100	293362729	276133069.8
1	96h	RS4	433455	1388.645		70	4095	601915053	100	601915053 578367610.1
10	96h	RS4	371552	965.947	40	4095	358899458	100	358899458	341685453.8
50	96h	RS4	412792	306.352	19	4095	126459781	100	126459781	110395567.5
0	96h	RS4	419598	651.079	38	4095	273191338	100	273191338	253353164.2
0.05	48h	RS4	297414	129.851	0	4095	38619375	99.98	38619375	35735351.44
0.1	48h	RS4	312935	518.069	4	4095	162121921	100	162121921	159058913.2
0.5	48h	RS4	300114	241.523	0	4095	72484344	99.996	72484344	69574438.66
1	48h	RS4	328729	255.605	0	4095	84024630	99.988	84024630	79874426.38
10	48h	RS4	334148	253.352	0	4095	84657148	99.943	84657148	80752628.62
50	48h	RS4	359418	286.163	0	4095	102851981	99.934	102851981	98826139.98
0	48h	RS4	344754	554.341	0	4095	191111189	99.994	191111189	187172719.3
0.05	96h	RS4	382666	1382.119		47	4095	528890133	100	528890133 521126222.5
0.1	96h	RS4	432696	846.582	23	4095	366312436	100	366312436	358955738.6
0.5	96h	RS4	419399	771.716	22	4095	323656915	100	323656915	315003455.4
1	96h	RS4	398415	1094.718		20	4095	436152091	100	436152091 433177126.2

10	96h	RS4	353553	967.63	7	4095	342108630	100	342108630	338501328.7
50	96h	RS4	388271	342.61	0	3694	133025678	99.982	133025678	126683659.5
0	96h	RS4	469237	1188.99	18	4095	557918061	100	557918061	554084863.9

Archivo suplementario 2

```
k,stroma,LPS
-0.024,in,0
-0.029,out,0
-0.03,sf,0
-0.023,in,0
-0.031,out,0
-0.031,sf,0
-0.022,in,0
-0.028,out,0
-0.027,sf,0
-0.024,in,0.05
-0.031,out,0.05
-0.031,sf,0.05
-0.025,in,0.05
-0.029,out,0.05
-0.032,sf,0.05
-0.038,in,0.05
-0.03,out,0.05
-0.033,sf,0.05
-0.027,in,0.1
-0.023,out,0.1
-0.023,sf,0.1
-0.027,in,0.1
-0.029,out,0.1
-0.031,sf,0.1
-0.027,in,0.1
-0.031,out,0.1
-0.031,sf,0.1
-0.026,in,0.5
-0.032,out,0.5
-0.029,sf,0.5
-0.029,in,0.5
-0.03,out,0.5
```

-0.031,sf,0.5

-0.028,in,0.5

-0.031,out,0.5

-0.033,sf,0.5

-0.024,in,1

-0.032,out,1

-0.029,sf,1

-0.026,in,1

-0.03,out,1

-0.031,sf,1

-0.023,in,1

-0.03,out,1

-0.029,sf,1

-0.024,in,10

-0.029,out,10

-0.031,sf,10

-0.023,in,10

-0.031,out,10

-0.032,sf,10

-0.028,in,10

-0.03,out,10

-0.031,sf,10

-0.023,in,50

-0.03,out,50

-0.031,sf,50

-0.032,in,50

-0.03,out,50

-0.031,sf,50

-0.027,in,50

-0.03,out,50

-0.031,sf,50

Archivo suplementario 3

k,stroma,LPS

-0.024,in,0

-0.028,out,0

-0.031,sf,0

-0.025,in,0

-0.028,out,0

-0.031,sf,0

-0.021,in,0
-0.028,out,0
-0.029,sf,0
-0.023,in,0.05
-0.028,out,0.05
-0.032,sf,0.05
-0.029,in,0.05
-0.027,out,0.05
-0.029,sf,0.05
NA,in,0.05
-0.033,out,0.05
-0.03,sf,0.05
-0.031,in,0.1
-0.028,out,0.1
-0.031,sf,0.1
-0.043,in,0.1
-0.031,out,0.1
-0.033,sf,0.1
-0.027,in,0.1
-0.033,out,0.1
-0.028,sf,0.1
-0.033,in,0.5
-0.029,out,0.5
-0.03,sf,0.5
NA,in,0.5
-0.03,out,0.5
-0.033,sf,0.5
-0.03,in,0.5
-0.031,out,0.5
-0.03,sf,0.5
-0.029,in,1
-0.028,out,1
-0.031,sf,1
-0.026,in,1
-0.029,out,1
-0.033,sf,1
-0.027,in,1
-0.032,out,1
-0.03,sf,1

-0.028,in,10

-0.028,out,10

-0.032,sf,10

-0.024,in,10

-0.028,out,10

-0.033,sf,10

-0.029,in,10

-0.029,out,10

-0.028,sf,10

-0.027,in,50

-0.027,out,50

-0.032,sf,50

-0.029,in,50

-0.027,out,50

-0.034,sf,50

-0.032,in,50

-0.029,out,50

-0.03,sf,50

Archivo suplementario 4

Expression Atlas

Query: Genes matching: 'TLR4', specifically expressed above the expression level cutoff: 0.5 TPM in experiment E-MTAB-2770

Selected columns: 2/934

Timestamp: Sat, 12-Jun-2021 19:10:35

Gene ID	Gene Name	NALM-6	RS4;11
ENSG00000004139	SARM1	1.0	
ENSG00000023445	BIRC3	0.5	
ENSG00000034152	MAP2K3	89.0	57.0
ENSG00000050748	MAPK9	27.0	8.0
ENSG00000055130	CUL1	126.0	109.0
ENSG00000055208	TAB2	60.0	17.0
ENSG00000064012	CASP8	21.0	6.0
ENSG00000065559	MAP2K4	17.0	8.0
ENSG00000068305	MEF2A	130.0	13.0
ENSG00000071242	RPS6KA2	2.0	1.0
ENSG00000072401	UBE2D1	21.0	11.0

ENSG00000072803	FBXW11	45.0	12.0	
ENSG00000076984	MAP2K7	38.0	25.0	
ENSG00000077150	NFKB2	26.0	27.0	
ENSG00000081189	MEF2C	31.0	88.0	
ENSG00000100030	MAPK1	68.0	23.0	
ENSG00000100324	TAB1	29.0	32.0	
ENSG00000100784	RPS6KA5	4.0		
ENSG00000100906	NFKBIA	62.0	64.0	
ENSG00000102882	MAPK3	40.0	37.0	
ENSG00000104312	RIPK2	24.0	13.0	
ENSG00000104365	IKBKB	40.0	11.0	
ENSG00000104695	PPP2CB	35.0	7.0	
ENSG00000104825	NFKBIB	34.0	84.0	
ENSG00000105053	VRK3	17.0	25.0	
ENSG00000105568	PPP2R1A	68.0	182.0	
ENSG00000106100	NOD1	14.0	1.0	
ENSG00000107643	MAPK8	22.0	6.0	
ENSG00000107968	MAP3K8	3.0	3.0	
ENSG00000108861	DUSP3	20.0	6.0	
ENSG00000108984	MAP2K6	4.0	3.0	
ENSG00000109320	NFKB1	42.0	16.0	
ENSG00000109332	UBE2D3	101.0	84.0	
ENSG00000110330	BIRC2	36.0	9.0	
ENSG00000112062	MAPK14	72.0	22.0	
ENSG00000112640	PPP2R5D	104.0	68.0	
ENSG00000113558	SKP1	31.0	73.0	
ENSG00000113575	PPP2CA	109.0	75.0	
ENSG00000114738	MAPKAPK3		50.0	33.0
ENSG00000115966	ATF2	64.0	12.0	
ENSG00000117676	RPS6KA1	66.0	63.0	
ENSG00000118260	CREB1	35.0	9.0	
ENSG00000120875	DUSP4	1.0		
ENSG00000123268	ATF1	49.0	12.0	
ENSG00000126456	IRF3	56.0	143.0	
ENSG00000126767	ELK1	33.0	13.0	
ENSG00000127666	TICAM1	11.0	13.0	
ENSG00000129465	RIPK3		4.0	
ENSG00000131323	TRAF3	22.0	5.0	
ENSG00000131508	UBE2D2	79.0	117.0	

ENSG00000134070	IRAK2	4.0	
ENSG00000135341	MAP3K7	51.0	14.0
ENSG00000136560	TANK	16.0	3.0
ENSG00000136869	TLR4	10.0	
ENSG00000137275	RIPK1	26.0	15.0
ENSG00000137713	PPP2R1B	46.0	16.0
ENSG00000139318	DUSP6	30.0	4.0
ENSG00000142192	APP	153.0	1.0
ENSG00000143947	RPS27A	1203.0	2319.0
ENSG00000150991	UBC	614.0	876.0
ENSG00000154589	LY96	17.0	52.0
ENSG00000157625	TAB3	12.0	2.0
ENSG00000162889	MAPKAPK2	154.0	85.0
ENSG00000164086	DUSP7	24.0	10.0
ENSG00000166167	BTRC	15.0	5.0
ENSG00000166484	MAPK7	10.0	3.0
ENSG00000168040	FADD	18.0	26.0
ENSG00000168256	NKIRAS2	37.0	26.0
ENSG00000168884	TNIP2	32.0	48.0
ENSG00000169032	MAP2K1	35.0	25.0
ENSG00000170315	UBB	1510.0	2866.0
ENSG00000170345	FOS	2.0	1.0
ENSG00000170458	CD14	0.7	
ENSG00000173039	RELA	46.0	45.0
ENSG00000175104	TRAF6	16.0	4.0
ENSG00000177189	RPS6KA3	40.0	7.0
ENSG00000177606	JUN	14.0	1.0
ENSG00000177889	UBE2N	76.0	48.0
ENSG00000179295	PTPN11	137.0	17.0
ENSG00000183735	TBK1	29.0	7.0
ENSG00000184216	IRAK1	184.0	174.0
ENSG00000185386	MAPK11	3.0	35.0
ENSG00000185507	IRF7	25.0	63.0
ENSG00000189403	HMGB1	764.0	601.0
ENSG00000197885	NKIRAS1	6.0	3.0
ENSG00000204305	AGER	27.0	30.0
ENSG00000213341	CHUK	31.0	6.0
ENSG00000221983	UBA52	365.0	1170.0
ENSG00000244687	UBE2V1	17.0	2.0

ENSG00000263528 IKBKE 15.0 17.0

ENSG00000269335 IKBKG 17.0 27.0

Archivo suplementario 5

Expression Atlas

Query: Genes matching: 'LBP OR SFTPD OR TRIL OR MAPK10 OR TICAM2 OR S100A12 OR DNM1 OR BPI OR CD36 OR CD14 OR S100B OR NOD2 OR BTK OR TLR4 OR DUSP4 OR LY86 OR DNM3 OR IRAK3 OR TLR2 OR MEF2C OR MAPK11 OR ITGAM OR PLCG2 OR RPS6KA2 OR SOCS1 OR PELI3 OR SARM1 OR ITGB2 OR LY96 OR MAP2K6 OR RPS6KA5 OR DUSP6 OR ECSIT OR TLR6 OR TAB1 OR DUSP7 OR CD180 OR UBC OR FOS OR UBB OR RPS27A OR NFKBIA OR UBA52 OR JUN OR BIRC3 OR HMGB1 OR PELI1 OR UBE2D3 OR RPS6KA1 OR APP', specifically expressed above the expression level cutoff: 0 TPM in experiment E-MTAB-3827

Selected columns: 27 (all)

Timestamp: Mon, 14-Jun-2021 19:14:42

Gene ID	Gene Name	CD14-positive, CD16-negative classical monocyte	macrophage	inflammatory macrophage	conventional dendritic cell	CD4-positive, alpha-beta thymocyte	CD8-positive, alpha-beta thymocyte	CD3-positive, CD4-positive, CD8-positive, double positive thymocyte	CD38-negative naive B cell	memory B cell	class switched memory B cell	CD4-positive, alpha-beta T cell	CD8-positive, alpha-beta T cell	alternatively activated macrophage	central memory CD4-positive, alpha-beta T cell	effector memory CD4-positive, alpha-beta T cell	central memory CD8-positive, alpha-beta T cell	effector memory CD8-positive, alpha-beta T cell	regulatory T cell	cytotoxic CD56-dim natural killer cell	erythroblast	CD34-negative, CD41-positive, CD42-positive megakaryocyte cell	mature eosinophil	mature neutrophil	segmented neutrophil of bone marrow	neutrophilic metamyelocyte	endothelial cell of umbilical vein (proliferating)	endothelial cell of umbilical vein (resting)
ENSG00000004139	SARM1	0.7	1.0	0.7	1.0	3.0	3.0	1.0	2.0	2.0	1.0	11.0	1.0	2.0	6.0	3.0	4.0	5.0	6.0	5.0	0.4	2.0	2.0	0.4	0.6	0.3	4.0	3.0
ENSG00000004975	DVL2	4.0	10.0	8.0	12.0	15.0	19.0	13.0	8.0	7.0	4.0	11.0	8.0	9.0	7.0	5.0	6.0	8.0	6.0	8.0	24.0	19.0	16.0	3.0	3.0	4.0	16.0	15.0
ENSG00000006432	MAP3K9	0.2	0.1	0.1	0.3	3.0	3.0	2.0	5.0	3.0	2.0	3.0	2.0	0.3	2.0	0.9	1.0	1.0	2.0	0.9	0.3	0.5	2.0	0.5	0.3	0.2	0.1	0.2
ENSG00000008294	SPAG9	72.0	69.0	53.0	51.0	31.0	27.0	34.0	9.0	6.0	5.0	21.0	12.0	99.0	10.0	7.0	7.0	16.0	9.0	12.0	45.0	32.0	24.0	142.0	77.0	15.0	61.0	58.0
ENSG00000008735	MAPK8IP2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.7	0.5	0.5	0.2	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.5	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3
ENSG00000010671	BTK	30.0	44.0	42.0	23.0	0.1	0.1	0.1	49.0	41.0	24.0	0.3	2.0	41.0	0.1	0.1	0.2	57.0	583.0	97.0	12.0	36.0	37.0	0.1	0.3
ENSG00000012983	MAP4K5	8.0	16.0	14.0	23.0	30.0	19.0	24.0	13.0	7.0	6.0	17.0	10.0	23.0	7.0	5.0	6.0	13.0	7.0	12.0	31.0	34.0	38.0	0.7	2.0	4.0	43.0	47.0
ENSG00000023445	BIRC3	25.0	8.0	91.0	2069.0	231.0	57.0	130.0	194.0	94.0	80.0	119.0	31.0	1.0	114.0	75.0	30.0	32.0	134.0	6.0	1.0	2.0	7.0	30.0	3.0	0.7	3.0	4.0
ENSG00000034152	MAP2K3	51.0	31.0	36.0	7.0	11.0	8.0	10.0	12.0	11.0	7.0	6.0	6.0	23.0	6.0	6.0	8.0	12.0	10.0	17.0	68.0	17.0	192.0	211.0	70.0	41.0	18.0	10.0
ENSG00000047579	DTNBP1	3.0	5.0	4.0	11.0	12.0	8.0	8.0	11.0	5.0	4.0	7.0	3.0	4.0	4.0	3.0	4.0	5.0	4.0	7.0	5.0	11.0	14.0	5.0	3.0	3.0	21.0	12.0

ENSG00000050327		ARHGEF5		0.4	0.2		1.0	0.5	0.4	0.6	0.4
0.2	1.0	0.9	0.5	0.7	0.3	0.5	0.7	0.6	0.1		
0.2	0.1	0.2	4.0	0.1	0.2						
ENSG00000050748		MAPK9	6.0	11.0	8.0	15.0	18.0	15.0	15.0	6.0	5.0
4.0	11.0	7.0	14.0	6.0	4.0	6.0	8.0	6.0	8.0	9.0	
10.0	10.0	4.0	5.0	9.0	17.0	18.0					
ENSG00000055130		CUL1	30.0	44.0	46.0	147.0	80.0	55.0	45.0	27.0	
23.0	19.0	71.0	30.0	63.0	34.0	25.0	27.0	37.0	31.0	38.0	
53.0	94.0	25.0	3.0	10.0	25.0	84.0	80.0				
ENSG00000055208		TAB2	57.0	53.0	41.0	155.0	63.0	41.0	47.0	23.0	
15.0	14.0	92.0	48.0	62.0	86.0	54.0	34.0	37.0	75.0	20.0	
36.0	71.0	16.0	99.0	84.0	33.0	37.0	35.0				
ENSG00000056558		TRAF1	10.0	9.0	97.0	553.0	30.0	27.0	22.0	4.0	3.0
3.0	54.0	34.0	17.0	39.0	20.0	22.0	38.0	47.0	11.0	0.7	3.0
14.0	16.0	2.0	14.0	3.0	3.0						
ENSG00000062725		APPBP2	7.0	14.0	12.0	17.0	32.0	25.0	24.0	7.0	5.0
4.0	19.0	6.0	21.0	10.0	7.0	8.0	10.0	11.0	8.0	9.0	
16.0	7.0	4.0	10.0	7.0	27.0	33.0					
ENSG00000064012		CASP8	31.0	17.0	12.0	12.0	28.0	26.0	44.0	11.0	
13.0	13.0	52.0	15.0	23.0	34.0	23.0	26.0	66.0	36.0	40.0	
10.0	13.0	73.0	74.0	100.0	28.0	6.0	6.0				
ENSG00000065559		MAP2K4	8.0	28.0	26.0	40.0	37.0	37.0	30.0	8.0	7.0
6.0	22.0	11.0	34.0	11.0	8.0	12.0	16.0	9.0	15.0	19.0	
21.0	10.0	31.0	48.0	12.0	23.0	26.0					
ENSG00000068305		MEF2A	26.0	68.0	32.0	55.0	46.0	36.0	37.0	23.0	
19.0	15.0	23.0	22.0	71.0	8.0	4.0	6.0	9.0	5.0	7.0	
28.0	30.0	16.0	40.0	25.0	23.0	50.0	35.0				
ENSG00000069966		GNB5	1.0	3.0	1.0	0.9	8.0	6.0	7.0	10.0	8.0
5.0	7.0	4.0	1.0	5.0	4.0	4.0	5.0	6.0	2.0	2.0	
41.0	2.0	0.8	0.5	0.3	4.0	5.0					
ENSG00000071242		RPS6KA2	1.0	56.0	10.0	7.0	10.0	2.0	3.0	0.9	1.0
0.5	2.0	0.7	15.0	0.6	0.3	0.4	0.4	0.6	0.2	2.0	1.0
79.0	0.9	5.0	33.0	67.0	57.0						
ENSG00000072401		UBE2D1	82.0	31.0	54.0	28.0	14.0	13.0	13.0	6.0	4.0
4.0	8.0	7.0	20.0	6.0	4.0	5.0	7.0	6.0	6.0	6.0	6.0
9.0	113.0	72.0	24.0	23.0	26.0						
ENSG00000072803		FBXW11	19.0	48.0	39.0	38.0	35.0	30.0	27.0	30.0	
19.0	13.0	28.0	15.0	59.0	16.0	11.0	16.0	22.0	19.0	22.0	
32.0	64.0	28.0	16.0	18.0	27.0	47.0	45.0				
ENSG00000073060		SCARB1	4.0	36.0	23.0	17.0	1.0	2.0	1.0	3.0	0.9
1.0	0.6	1.0	51.0	0.2	0.1	0.3	0.3	0.1	0.1	10.0	
13.0	0.5	1.0	2.0	0.4	23.0	23.0					
ENSG00000073803		MAP3K13	2.0	2.0	2.0	41.0	2.0	2.0	0.9	0.8	0.8
0.5	1.0	1.0	2.0	0.8	0.5	0.9	1.0	0.4	0.7	3.0	4.0
0.6	2.0	1.0	1.0	3.0	4.0						
ENSG00000074696		HACD3	1.0	36.0	33.0	11.0	27.0	27.0	22.0	3.0	3.0
3.0	11.0	7.0	48.0	6.0	4.0	7.0	9.0	6.0	8.0	32.0	
25.0	1.0	0.5	2.0	3.0	56.0	60.0					
ENSG00000075426		FOSL2	497.0	20.0	34.0	50.0	4.0	2.0	2.0	2.0	0.1
0.3	6.0	34.0	17.0	32.0	37.0	35.0	63.0	15.0	90.0	11.0	
11.0	302.0	393.0	159.0	32.0	58.0	55.0					
ENSG00000076984		MAP2K7	13.0	7.0	8.0	6.0	12.0	9.0	10.0	7.0	5.0
3.0	9.0	6.0	5.0	7.0	5.0	6.0	8.0	8.0	9.0	13.0	9.0
30.0	11.0	8.0	4.0	6.0	6.0						
ENSG00000077150		NFKB2	70.0	22.0	71.0	142.0	31.0	27.0	15.0	35.0	
27.0	21.0	19.0	22.0	4.0	19.0	15.0	9.0	14.0	14.0	13.0	7.0
12.0	34.0	346.0	34.0	7.0	19.0	14.0					

ENSG00000078369		GNB1	36.0	69.0	65.0	116.0	77.0	62.0	66.0	20.0	
15.0	11.0	48.0	31.0	84.0	24.0	19.0	22.0	27.0	26.0	28.0	
39.0	75.0	106.0	52.0	92.0	79.0	181.0	142.0				
ENSG00000078401		EDN1	0.8	0.2	4.0	0.6	4.0	2.0	1.0	0.4	0.6
0.3	2.0	1.0		0.1		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
1.0	8.0	2.0		1047.0	994.0						
ENSG00000078898		BPIFB2									
					0.1						
ENSG00000081189		MEF2C	10.0	9.0	2.0	2.0	0.6	0.5	1.0	58.0	
23.0	26.0	0.3	0.1	0.6					0.1	2.0	
11.0	148.0	0.5	1.0	6.0	0.7	44.0	33.0				
ENSG00000082996		RNF13	47.0	319.0	186.0	83.0	44.0	44.0	36.0	49.0	
28.0	23.0	42.0	23.0	295.0	26.0	25.0	24.0	32.0	26.0	30.0	
24.0	35.0	25.0	129.0	168.0	33.0	37.0	33.0				
ENSG00000084207		GSTP1	203.0	138.0	178.0	430.0	21.0	26.0	27.0	27.0	
30.0	10.0	21.0	27.0	197.0	29.0	31.0	42.0	46.0	29.0	98.0	
80.0	111.0	37.0	3.0	16.0	59.0	561.0	384.0				
ENSG00000084234		APLP2	288.0	625.0	448.0	128.0	17.0	8.0	16.0	52.0	
11.0	3.0	14.0	5.0	644.0	11.0	9.0	10.0	14.0	15.0	29.0	
97.0	47.0	69.0	117.0	139.0	25.0	344.0	288.0				
ENSG00000085511		MAP3K4	10.0	14.0	10.0	17.0	37.0	29.0	29.0	12.0	9.0
7.0	25.0	12.0	17.0	21.0	14.0	10.0	16.0	13.0	12.0	18.0	
17.0	9.0	0.3	2.0	12.0	22.0	26.0					
ENSG00000086061		DNAJA1	94.0	121.0	240.0	329.0	115.0	151.0	165.0	53.0	
26.0	21.0	61.0	142.0	332.0	48.0	47.0	40.0	56.0	38.0	59.0	
140.0	120.0	53.0	168.0	141.0	56.0	259.0	236.0				
ENSG00000087237		CETP	0.7	0.1	0.1	0.6	0.1		0.1	0.4	0.2
0.2		0.1	0.2				0.1	0.1	0.1	0.2	0.5
	0.6	0.4		2.0	2.0						
ENSG00000090376		IRAK3	123.0	14.0	16.0	8.0	0.6	0.1	0.5	4.0	0.4
0.1	0.2	5.0	8.0	0.2	0.1	0.1		0.7	0.3	10.0	
27.0	20.0	311.0	84.0	119.0	8.0	16.0					
ENSG00000090432		MUL1	15.0	40.0	42.0	17.0	19.0	16.0	17.0	9.0	
11.0	8.0	18.0	7.0	31.0	12.0	10.0	12.0	14.0	13.0	15.0	
19.0	23.0	32.0	11.0	14.0	12.0	29.0	32.0				
ENSG00000090621		PABPC4	39.0	52.0	38.0	27.0	29.0	27.0	22.0	18.0	
13.0	9.0	42.0	31.0	36.0	23.0	15.0	12.0	15.0	16.0	10.0	
41.0	31.0	20.0	2.0	5.0	15.0	64.0	63.0				
ENSG00000091436		MAP3K20	15.0	15.0	14.0	8.0	3.0	2.0	4.0	3.0	0.9
1.0	0.3	1.0	11.0	0.3	0.6	1.0	2.0	0.2	0.4	19.0	9.0
1.0	4.0	2.0	0.9	18.0	21.0						
ENSG00000091513		TF	0.1	0.1		0.2	0.4	0.3	0.2	0.1	0.1
	0.1	0.1	0.1	0.1		0.1	0.1		0.2	0.1	0.2
0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4						
ENSG00000100030		MAPK1	24.0	52.0	45.0	51.0	51.0	46.0	46.0	18.0	
15.0	10.0	32.0	20.0	79.0	20.0	15.0	26.0	36.0	18.0	58.0	
45.0	44.0	66.0	73.0	103.0	75.0	74.0	63.0				
ENSG00000100324		TAB1	4.0	13.0	9.0	8.0	17.0	14.0	11.0	5.0	4.0
3.0	9.0	8.0	12.0	7.0	5.0	6.0	8.0	6.0	8.0	12.0	
13.0	24.0	0.2	2.0	5.0	9.0	10.0					
ENSG00000100784		RPS6KA5	1.0	0.5	0.3	1.0	8.0	4.0	3.0	4.0	3.0
2.0	6.0	2.0	0.3	4.0	2.0	2.0	3.0	4.0	2.0	2.0	6.0
14.0	3.0	15.0	3.0	2.0	4.0						
ENSG00000100906		NFKBIA	1236.0	82.0	376.0	831.0	303.0	204.0	151.0	292.0	
99.0	85.0	130.0	332.0	26.0	197.0	216.0	54.0	76.0	119.0	92.0	
46.0	203.0	84.0	4036.0	222.0	58.0	47.0	71.0				

ENSG00000100979		PLTP	0.7	111.0	90.0	7.0	0.2	0.6	2.0	0.3	0.3
0.3	0.1	0.6	39.0	0.1	0.3	0.2	0.1	0.3	1.0	13.0	
17.0	9.0	0.5	2.0	1.0	20.0	34.0					
ENSG00000101197		BIRC7		0.3	0.1	0.1		0.1			
		1.0	0.2			0.1	0.5			0.2	0.1
ENSG00000101425		BPI	5.0	2.0	1.0						
		44.0	0.1							0.6	
65.0	3.0	19.0	348.0								
ENSG00000102010		BMX	0.1	0.1							
		0.8	2.0							0.1	
1.0	18.0	96.0	52.0	164.0	279.0						
ENSG00000102245		CD40LG	0.3				135.0	2.0	15.0	0.1	
	27.0	0.5		33.0	26.0	1.0	4.0	8.0	0.1	0.5	
10.0	1.0	0.1	0.3	0.2							
ENSG00000102882		MAPK3	14.0	20.0	10.0	21.0	16.0	15.0	9.0	6.0	7.0
4.0	13.0	9.0	12.0	13.0	10.0	7.0	8.0	16.0	8.0	7.0	
18.0	76.0	38.0	43.0	16.0	41.0	40.0					
ENSG00000104312		RIPK2	166.0	41.0	47.0	146.0	23.0	11.0	6.0	13.0	8.0
6.0	5.0	9.0	25.0	10.0	8.0	4.0	6.0	3.0	10.0	10.0	
51.0	42.0	44.0	27.0	6.0	24.0	24.0					
ENSG00000104332		SFRP1				0.1					
		0.1									
0.4	0.1	0.8	7.0	5.0	8.0						
ENSG00000104365		IKBKB	11.0	16.0	11.0	35.0	35.0	28.0	24.0	13.0	
11.0	7.0	25.0	10.0	14.0	14.0	9.0	10.0	16.0	12.0	12.0	8.0
13.0	40.0	8.0	15.0	11.0	18.0	21.0					
ENSG00000104695		PPP2CB	5.0	33.0	30.0	20.0	13.0	12.0	13.0	3.0	3.0
2.0	6.0	4.0	26.0	6.0	4.0	5.0	7.0	5.0	7.0	15.0	
22.0	2.0	1.0	4.0	5.0	77.0	52.0					
ENSG00000104814		MAP4K1	9.0	0.7	0.3	2.0	32.0	26.0	21.0	21.0	
31.0	21.0	19.0	13.0	0.4	26.0	24.0	27.0	38.0	32.0	17.0	3.0
7.0	22.0	2.0	4.0	2.0	0.3	0.4					
ENSG00000104825		NFKBIB	26.0	15.0	25.0	15.0	10.0	12.0	8.0	11.0	7.0
5.0	8.0	21.0	14.0	8.0	6.0	8.0	11.0	9.0	23.0	22.0	
11.0	41.0	31.0	9.0	5.0	10.0	9.0					
ENSG00000105053		VRK3	3.0	6.0	5.0	8.0	14.0	11.0	14.0	5.0	5.0
3.0	8.0	6.0	7.0	5.0	3.0	5.0	6.0	6.0	7.0	8.0	8.0
20.0	7.0	14.0	7.0	6.0	8.0						
ENSG00000105290		APLP1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2
0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2		0.1	0.1	4.0
	0.3	0.1	0.1	2.0	2.0						
ENSG00000105568		PPP2R1A	28.0	69.0	65.0	30.0	40.0	36.0	30.0	20.0	
20.0	14.0	32.0	20.0	98.0	25.0	18.0	22.0	26.0	25.0	33.0	
24.0	35.0	52.0	12.0	17.0	22.0	59.0	56.0				
ENSG00000105808		RASA4	3.0	6.0	3.0	5.0	8.0	7.0	4.0	2.0	1.0
0.8	8.0	3.0	3.0	2.0	1.0	1.0	2.0	2.0	0.7	1.0	1.0
1.0	1.0	0.7	0.2	1.0	2.0						
ENSG00000106100		NOD1	2.0	7.0	6.0	30.0	10.0	8.0	6.0	10.0	5.0
3.0	8.0	5.0	4.0	4.0	3.0	4.0	7.0	4.0	6.0	5.0	4.0
44.0	0.6	3.0	4.0	25.0	29.0						
ENSG00000106976		DNM1	0.6	0.5	0.1	1.0	0.4	0.4	0.3	0.2	0.2
0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1.0	5.0
0.9	0.5	0.3	0.2	0.3	0.5						
ENSG00000107643		MAPK8	11.0	10.0	8.0	27.0	35.0	27.0	29.0	7.0	4.0
4.0	20.0	13.0	6.0	7.0	4.0	4.0	9.0	5.0	8.0	8.0	7.0
8.0	6.0	7.0	6.0	20.0	24.0						

ENSG00000107968		MAP3K8	159.0	14.0	26.0	41.0	0.8	0.9	1.0	59.0	
16.0	11.0	1.0	7.0	18.0	2.0	3.0	16.0	25.0	0.7	61.0	9.0
21.0	39.0	170.0	46.0	38.0	6.0	8.0					
ENSG00000107984		DKK1									
										0.3	9.0
				23.0	115.0						
ENSG00000108861		DUSP3	27.0	75.0	68.0	41.0	5.0	5.0	2.0	2.0	3.0
2.0	4.0	4.0	86.0	3.0	2.0	2.0	3.0	3.0	2.0	27.0	
41.0	11.0	15.0	7.0	2.0	60.0	52.0					
ENSG00000108984		MAP2K6	5.0	2.0	0.3	10.0	15.0	15.0	16.0	2.0	1.0
2.0	8.0	6.0	5.0	6.0	4.0	5.0	7.0	3.0	4.0	1.0	0.4
8.0	15.0	27.0	6.0	4.0	10.0						
ENSG00000109320		NFKB1	54.0	25.0	52.0	327.0	60.0	49.0	25.0	33.0	
14.0	11.0	66.0	91.0	9.0	39.0	24.0	19.0	20.0	17.0	17.0	
16.0	23.0	20.0	76.0	34.0	31.0	41.0	41.0				
ENSG00000109332		UBE2D3	153.0	85.0	77.0	92.0	123.0	110.0	106.0	59.0	
34.0	30.0	109.0	126.0	91.0	64.0	48.0	43.0	61.0	57.0	56.0	
79.0	97.0	72.0	201.0	151.0	62.0	85.0	92.0				
ENSG00000109339		MAPK10	0.1				0.7	0.8	1.0		
				0.1	0.1						0.1
0.2					0.1						
ENSG00000110330		BIRC2	57.0	52.0	54.0	190.0	113.0	133.0	131.0	23.0	
15.0	15.0	55.0	43.0	55.0	28.0	18.0	22.0	31.0	27.0	40.0	
36.0	41.0	43.0	48.0	52.0	43.0	64.0	83.0				
ENSG00000110422		HIPK3	73.0	111.0	95.0	137.0	49.0	35.0	41.0	31.0	
23.0	20.0	50.0	25.0	80.0	45.0	38.0	44.0	54.0	37.0	57.0	
34.0	59.0	53.0	108.0	115.0	89.0	61.0	60.0				
ENSG00000111344		RASAL1	0.9	0.2		3.0	2.0	2.0	0.8	0.3	
	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1			2.0	
0.1											
ENSG00000111664		GNB3				0.2					0.1
	0.3					0.1	0.1			0.1	0.2
	0.3	0.3		2.0	3.0						
ENSG00000111961		SASH1	5.0	19.0	8.0	9.0	0.4	0.2	0.2	0.1	
0.1	0.2	0.2	19.0	2.0	1.0		0.1	0.1	0.1	0.2	0.3
0.2	0.4	0.5	0.1	53.0	63.0						
ENSG00000112062		MAPK14	41.0	51.0	46.0	40.0	70.0	52.0	68.0	13.0	8.0
7.0	28.0	21.0	51.0	13.0	8.0	13.0	20.0	12.0	24.0	62.0	
111.0	49.0	222.0	211.0	184.0	41.0	48.0					
ENSG00000112640		PPP2R5D	8.0	29.0	28.0	32.0	37.0	35.0	41.0	7.0	7.0
4.0	17.0	18.0	23.0	15.0	12.0	14.0	17.0	19.0	21.0	32.0	
29.0	25.0	6.0	14.0	15.0	48.0	50.0					
ENSG00000112799		LY86	101.0	114.0	63.0	6.0	18.0	6.0	2.0	74.0	
86.0	64.0	1.0	4.0	20.0			0.3	0.2	0.1	0.4	
28.0	0.4	1.0	0.2	5.0	0.9						
ENSG00000113263		ITK	0.9	0.2	0.1	2.0	191.0	130.0	116.0	0.1	0.1
0.1	234.0	74.0	3.0	108.0	78.0	67.0	84.0	95.0	41.0	0.3	0.1
4.0	0.6	1.0	0.4	0.2	0.3						
ENSG00000113558		SKP1	24.0	25.0	25.0	40.0	45.0	36.0	44.0	19.0	
13.0	10.0	39.0	32.0	32.0	19.0	13.0	14.0	19.0	17.0	16.0	
28.0	36.0	24.0	30.0	20.0	19.0	49.0	48.0				
ENSG00000113575		PPP2CA	90.0	67.0	54.0	90.0	60.0	64.0	73.0	35.0	
20.0	15.0	52.0	71.0	63.0	32.0	27.0	25.0	34.0	35.0	39.0	
56.0	62.0	26.0	63.0	47.0	41.0	81.0	83.0				
ENSG00000114251		WNT5A	0.3		0.3	105.0	4.0	5.0	3.0		
											2.0
				0.2	0.2						

ENSG00000114450		GNB4	17.0	83.0	68.0	94.0	17.0	6.0	10.0	18.0	9.0
5.0	1.0	5.0	61.0	0.7	0.5	0.5	0.9	0.6	0.7	22.0	
49.0	19.0	18.0	30.0	33.0	90.0	84.0					
ENSG00000114738		MAPKAPK3		94.0	116.0	129.0	94.0	39.0	29.0	25.0	5.0
6.0	4.0	23.0	27.0	107.0	25.0	20.0	13.0	16.0	20.0	26.0	
44.0	110.0	117.0	36.0	67.0	109.0	8.0	13.0				
ENSG00000115966		ATF2	20.0	33.0	29.0	60.0	66.0	55.0	58.0	18.0	
11.0	11.0	40.0	26.0	29.0	18.0	13.0	14.0	22.0	17.0	25.0	
25.0	46.0	12.0	14.0	23.0	23.0	56.0	59.0				
ENSG00000116106		EPHA4	0.1			0.7	4.0	2.0	1.0	4.0	1.0
10.0	10.0	10.0		26.0	16.0	11.0	9.0	7.0	8.0	0.1	0.1
0.6	3.0	4.0	2.0	16.0	19.0						
ENSG00000116670		MAD2L2	10.0	15.0	20.0	20.0	8.0	10.0	19.0	3.0	4.0
3.0	5.0	6.0	10.0	6.0	5.0	6.0	8.0	7.0	14.0	11.0	8.0
6.0	5.0	4.0	4.0	13.0	15.0						
ENSG00000117676		RPS6KA1	37.0	228.0	130.0	165.0	25.0	29.0	18.0	15.0	
21.0	12.0	25.0	23.0	304.0	30.0	28.0	32.0	41.0	35.0	75.0	
38.0	45.0	173.0	110.0	137.0	58.0	5.0	7.0				
ENSG00000118260		CREB1	10.0	18.0	14.0	33.0	62.0	47.0	51.0	23.0	
12.0	12.0	35.0	19.0	17.0	19.0	13.0	14.0	21.0	20.0	19.0	
26.0	28.0	21.0	26.0	37.0	25.0	35.0	32.0				
ENSG00000120659		TNFSF11	0.1			0.1	15.0	1.0	0.9		
	0.1	0.1		0.3		0.1		0.1	0.6	0.1	
0.3											
ENSG00000120875		DUSP4	5.0	0.1	0.2	56.0	36.0	7.0	33.0	0.2	0.1
0.2	0.6	0.5		6.0	9.0	2.0	2.0	53.0	0.1	0.7	0.3
0.5	0.1	0.1		11.0	7.0						
ENSG00000120899		PTK2B	131.0	38.0	19.0	64.0	142.0	135.0	111.0	59.0	
37.0	29.0	43.0	39.0	34.0	26.0	18.0	24.0	35.0	27.0	55.0	
28.0	35.0	150.0	106.0	144.0	128.0	0.6	0.8				
ENSG00000121653		MAPK8IP1		1.0	0.4	0.2	0.5	0.5	4.0	2.0	1.0
0.3	0.3	0.6	0.5	1.0	0.5	0.3	0.9	2.0	0.4	0.7	0.4
0.1	0.4	0.4	0.8	0.8	4.0	3.0					
ENSG00000122121		XPNPEP2	0.1	2.0	1.0	0.2	0.2	0.2	0.6	0.2	
0.1	0.1	0.1	6.0	0.2	0.3	0.1	0.6	0.4	1.0		
0.3	0.1	0.2	0.1	0.1							
ENSG00000123143		PKN1	62.0	46.0	34.0	48.0	55.0	57.0	38.0	31.0	
37.0	23.0	47.0	40.0	30.0	51.0	41.0	51.0	67.0	52.0	100.0	
25.0	49.0	160.0	24.0	38.0	46.0	92.0	72.0				
ENSG00000123268		ATF1	8.0	24.0	24.0	24.0	44.0	28.0	35.0	8.0	9.0
7.0	24.0	10.0	21.0	14.0	12.0	13.0	17.0	14.0	18.0	25.0	
22.0	11.0	10.0	16.0	30.0	17.0	20.0					
ENSG00000125997		BPIFB9P									
							0.1				
ENSG00000125999		BPIFB1	0.1	0.1		0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
	0.1	0.1	0.1		0.1		0.1	0.1		0.1	0.1
0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1						
ENSG00000126456		IRF3	6.0	16.0	17.0	36.0	39.0	35.0	36.0	14.0	
17.0	10.0	40.0	17.0	17.0	27.0	22.0	21.0	30.0	27.0	20.0	
19.0	21.0	114.0	9.0	14.0	15.0	17.0	18.0				
ENSG00000126767		ELK1	19.0	18.0	20.0	13.0	19.0	14.0	11.0	6.0	5.0
4.0	15.0	12.0	29.0	11.0	9.0	7.0	8.0	11.0	5.0	14.0	
19.0	9.0	10.0	4.0	6.0	11.0	13.0					
ENSG00000127191		TRAF2	1.0	8.0	14.0	23.0	13.0	12.0	10.0	4.0	4.0
3.0	7.0	3.0	7.0	5.0	3.0	4.0	5.0	5.0	5.0	8.0	8.0
23.0	1.0	3.0	6.0	10.0	10.0						

ENSG00000127588		GNG13						0.1	0.6	0.1	
								0.1			
ENSG00000127666		TICAM1	15.0	6.0	7.0	15.0	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0
2.0	2.0	2.0	5.0	2.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0
15.0	11.0	2.0	2.0	7.0	5.0						
ENSG00000127920		GNG11	2.0	0.2	0.2	3.0	0.2		0.2	1.0	5.0
0.8	0.2	0.3		0.5	0.3			1.0		11.0	
140.0	4.0	0.1	0.7	0.1	788.0	459.0					
ENSG00000127928		GNGT1				0.1			0.1		
		0.1									
0.6		0.1		0.1							
ENSG00000129465		RIPK3	5.0	14.0	11.0	23.0	13.0	12.0	13.0	3.0	4.0
3.0	7.0	2.0	19.0	6.0	5.0	5.0	9.0	6.0	9.0	1.0	2.0
52.0	12.0	21.0	15.0	2.0	2.0						
ENSG00000129988		LBP				0.1			0.1		
		0.2	0.8								
ENSG00000130159		ECSIT	13.0	13.0	21.0	5.0	12.0	12.0	10.0	11.0	
12.0	8.0	17.0	9.0	12.0	12.0	10.0	12.0	16.0	13.0	14.0	
22.0	10.0	10.0	0.3	1.0	5.0	13.0	17.0				
ENSG00000130522		JUND	227.0	48.0	51.0	50.0	173.0	149.0	208.0	239.0	
166.0	80.0	132.0	223.0	38.0	138.0	88.0	66.0	89.0	135.0	90.0	
149.0	168.0	136.0	117.0	107.0	38.0	50.0	26.0				
ENSG00000130758		MAP3K10	3.0	4.0	3.0	2.0	5.0	4.0	4.0	3.0	3.0
2.0	4.0	3.0	2.0	4.0	3.0	3.0	6.0	4.0	5.0	2.0	4.0
11.0	0.3	0.4	0.8	4.0	4.0						
ENSG00000131323		TRAF3	12.0	25.0	32.0	14.0	23.0	15.0	5.0	14.0	
16.0	11.0	12.0	7.0	11.0	9.0	7.0	7.0	9.0	12.0	5.0	4.0
2.0	13.0	19.0	4.0	14.0	16.0	13.0					
ENSG00000131508		UBE2D2	32.0	44.0	58.0	46.0	104.0	104.0	74.0	38.0	
29.0	21.0	64.0	56.0	37.0	36.0	28.0	29.0	34.0	43.0	38.0	
46.0	46.0	26.0	25.0	33.0	27.0	73.0	68.0				
ENSG00000133661		SFTPD	0.5	0.1	0.1						0.1
										0.1	
1.0		0.3		0.1							
ENSG00000134061		CD180	4.0	7.0	6.0	4.0	4.0	3.0	2.0	14.0	
14.0	11.0	1.0	1.0	14.0	0.6	0.4	0.5	1.0	0.6	0.6	3.0
2.0	11.0	4.0	3.0	1.0	1.0	2.0					
ENSG00000134070		IRAK2	50.0	7.0	26.0	5.0	22.0	7.0	8.0	4.0	7.0
3.0	3.0	2.0	2.0	4.0	3.0	4.0	5.0	4.0	18.0	4.0	
32.0	5.0	71.0	7.0	12.0	20.0	11.0					
ENSG00000134242		PTPN22	23.0	38.0	26.0	8.0	61.0	118.0	80.0	17.0	
22.0	14.0	36.0	40.0	41.0	25.0	25.0	38.0	68.0	33.0	93.0	8.0
22.0	71.0	36.0	75.0	154.0	0.2	0.5					
ENSG00000134317		GRHL1	0.4	0.5	0.9	2.0	0.6	0.5	0.5	0.3	0.2
0.1	0.2	0.2	4.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	8.0	0.4
7.0	0.4	0.3	0.7	1.0	0.9						
ENSG00000134398		AC008870.1							0.1	0.2	
ENSG00000135090		TAOK3	13.0	41.0	39.0	46.0	31.0	24.0	23.0	11.0	
11.0	8.0	21.0	12.0	45.0	14.0	9.0	14.0	20.0	13.0	23.0	
22.0	50.0	31.0	17.0	32.0	21.0	11.0	11.0				
ENSG00000135218		CD36	46.0	230.0	201.0	23.0	0.1	0.1			
			613.0	0.1				0.1	0.1	267.0	
121.0	0.8	0.2	7.0	1.0	0.2	1.0					

ENSG00000135272		MDFIC	11.0	56.0	68.0	63.0	43.0	15.0	15.0	8.0	
17.0	13.0	76.0	29.0	61.0	83.0	79.0	33.0	43.0	38.0	10.0	5.0
0.8	10.0	0.4	2.0	3.0	23.0	20.0					
ENSG00000135341		MAP3K7	12.0	27.0	20.0	28.0	51.0	37.0	38.0	11.0	8.0
7.0	23.0	13.0	32.0	10.0	7.0	9.0	14.0	12.0	13.0	23.0	
29.0	24.0	13.0	16.0	20.0	39.0	37.0					
ENSG00000135605		TEC	5.0	5.0	3.0	17.0	4.0	4.0	7.0	3.0	3.0
4.0	4.0	2.0	3.0	1.0	0.8	1.0	2.0	0.7	2.0	24.0	
167.0	72.0	3.0	3.0	16.0	0.8	1.0					
ENSG00000136279		DBNL	27.0	39.0	40.0	66.0	35.0	47.0	27.0	35.0	
30.0	19.0	38.0	18.0	35.0	19.0	13.0	14.0	20.0	17.0	22.0	
11.0	29.0	169.0	65.0	91.0	58.0	18.0	18.0				
ENSG00000136560		TANK	111.0	69.0	66.0	275.0	56.0	38.0	42.0	43.0	
21.0	22.0	25.0	18.0	56.0	23.0	20.0	16.0	24.0	24.0	12.0	
32.0	33.0	34.0	170.0	98.0	72.0	48.0	45.0				
ENSG00000136848		DAB2IP	0.1	0.1	0.1		1.0	0.9	3.0		0.1
							0.5			0.2	
				19.0	14.0						
ENSG00000136869		TLR4	86.0	119.0	102.0	6.0				0.7	2.0
2.0		2.0	269.0						0.1	12.0	0.2
31.0	118.0	303.0	32.0	38.0	79.0						
ENSG00000137275		RIPK1	20.0	26.0	24.0	40.0	35.0	29.0	21.0	7.0	8.0
6.0	26.0	11.0	32.0	18.0	15.0	19.0	27.0	16.0	31.0	17.0	
36.0	43.0	26.0	28.0	21.0	30.0	29.0					
ENSG00000137462		TLR2	229.0	25.0	45.0	10.0	0.9	0.3	0.1	2.0	0.7
0.5	2.0	2.0	18.0	1.0	0.6	0.1	0.1	0.1	0.1	19.0	0.4
5.0	584.0	314.0	8.0	0.6	0.4						
ENSG00000137713		PPP2R1B	6.0	16.0	17.0	37.0	32.0	23.0	28.0	6.0	6.0
5.0	17.0	7.0	43.0	9.0	6.0	8.0	12.0	9.0	9.0	25.0	
21.0	9.0	4.0	6.0	10.0	39.0	33.0					
ENSG00000138760		SCARB2	19.0	434.0	511.0	34.0	29.0	21.0	8.0	8.0	5.0
4.0	16.0	9.0	432.0	8.0	5.0	5.0	7.0	6.0	7.0	9.0	5.0
8.0	1.0	8.0	12.0	179.0	181.0						
ENSG00000138834		MAPK8IP3		27.0	11.0	6.0	21.0	39.0	34.0	39.0	
18.0	14.0	8.0	22.0	11.0	10.0	11.0	5.0	5.0	15.0	7.0	
11.0	10.0	14.0	141.0	18.0	17.0	9.0	12.0	18.0			
ENSG00000139318		DUSP6	85.0	52.0	68.0	2.0	31.0	12.0	48.0	2.0	0.6
0.4	0.5	4.0	26.0	0.7	1.0	0.7	1.0	3.0	7.0	9.0	
33.0	79.0	16.0	140.0	229.0	114.0	70.0					
ENSG00000139625		MAP3K12	1.0	7.0	3.0	4.0	13.0	13.0	7.0	2.0	1.0
0.9	6.0	4.0	4.0	5.0	4.0	3.0	6.0	4.0	3.0	2.0	7.0
0.7	1.0	0.7	0.2	9.0	13.0						
ENSG00000140044		JDP2	31.0	14.0	5.0	6.0	1.0	0.5	0.4	1.0	2.0
1.0	0.3	3.0	3.0	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	4.0	7.0
48.0	38.0	33.0	33.0	4.0	3.0						
ENSG00000141655		TNFRSF11A		0.1	7.0	2.0	137.0	0.8	0.1	0.3	0.1
		0.2	0.1	30.0	1.0	0.3	0.1		0.4	0.9	0.4
8.0			0.1		4.0	11.0					
ENSG00000142192		APP	41.0	138.0	97.0	80.0	48.0	25.0	37.0	15.0	
15.0	6.0	19.0	20.0	130.0	17.0	9.0	3.0	2.0	5.0	0.6	
31.0	55.0	15.0	5.0	12.0	58.0	433.0	518.0				
ENSG00000142733		MAP3K6	3.0	7.0	6.0	17.0	2.0	1.0	1.0	0.3	0.5
0.4	2.0	0.4	3.0	1.0	1.0	0.9	2.0	0.9	1.0	2.0	2.0
9.0	2.0	2.0	0.2	4.0	5.0						
ENSG00000143507		DUSP10	47.0	33.0	31.0	12.0	28.0	21.0	63.0	21.0	3.0
2.0	9.0	78.0	23.0	8.0	6.0	6.0	8.0	33.0	13.0	14.0	
12.0	3.0	2.0	2.0	2.0	8.0	3.0					

ENSG00000143674		MAP3K21	2.0	2.0	1.0	6.0	0.2	0.2	0.1	0.6	0.3
0.4	0.5	0.1	2.0	0.7	0.4	0.4	0.5	0.2		2.0	1.0
2.0	0.4	0.9	1.0	0.7	1.0						
ENSG00000143947		RPS27A	248.0	214.0	252.0	284.0	558.0	708.0	336.0	499.0	
544.0	443.0	1301.0	843.0	204.0	721.0	659.0	574.0	554.0	454.0	339.0	
363.0	318.0	78.0	29.0	51.0	134.0	535.0	572.0				
ENSG00000145423		SFRP2									
										0.1	
	0.1										
ENSG00000146192		FGD2	25.0	7.0	4.0	78.0	0.2	0.2	0.1	30.0	
24.0	16.0	0.2	0.1	25.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	3.0
0.1	29.0	0.2	2.0	0.3		0.1					
ENSG00000149269		PAK1	30.0	23.0	19.0	29.0	26.0	33.0	14.0	3.0	3.0
3.0	6.0	21.0	6.0	2.0	2.0	3.0	4.0	2.0	4.0	43.0	7.0
85.0	74.0	129.0	96.0	3.0	6.0						
ENSG00000149273		RPS3	162.0	118.0	138.0	124.0	244.0	390.0	177.0	260.0	
308.0	192.0	576.0	524.0	87.0	511.0	462.0	412.0	375.0	372.0	192.0	
319.0	229.0	55.0	20.0	28.0	60.0	436.0	384.0				
ENSG00000150593		PDCD4	86.0	55.0	24.0	72.0	243.0	213.0	136.0	71.0	
82.0	50.0	201.0	197.0	85.0	101.0	76.0	93.0	137.0	52.0	67.0	
85.0	51.0	121.0	183.0	70.0	36.0	33.0	56.0				
ENSG00000150991		UBC	1305.0	766.0	811.0	1046.0	308.0	320.0	429.0	280.0	
325.0	244.0	386.0	502.0	714.0	346.0	333.0	294.0	369.0	411.0	403.0	
375.0	573.0	492.0	604.0	618.0	429.0	711.0	596.0				
ENSG00000154589		LY96	50.0	272.0	172.0	72.0	16.0	10.0	8.0	6.0	
13.0	13.0	9.0	5.0	231.0	13.0	9.0	2.0	1.0	11.0	0.1	
12.0	0.3	0.6	177.0	165.0	2.0	34.0	41.0				
ENSG00000155903		RASA2	34.0	19.0	14.0	33.0	136.0	124.0	74.0	37.0	
15.0	15.0	119.0	100.0	16.0	40.0	23.0	32.0	44.0	52.0	65.0	
11.0	15.0	14.0	77.0	73.0	39.0	37.0	34.0				
ENSG00000156194		PPEF2	0.2			0.1	0.6	0.3	0.3	0.2	0.1
0.1	0.3	0.2		0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1						
ENSG00000156299		TIAM1	17.0	44.0	33.0	96.0	62.0	64.0	62.0	0.1	
	38.0	12.0	65.0	31.0	19.0	4.0	2.0	31.0	2.0	3.0	1.0
2.0	0.2	1.0	0.3	0.5	0.6						
ENSG00000157625		TAB3	6.0	7.0	7.0	11.0	19.0	10.0	11.0	4.0	3.0
3.0	7.0	5.0	7.0	5.0	3.0	3.0	6.0	5.0	4.0	16.0	
15.0	11.0	11.0	10.0	6.0	8.0	9.0					
ENSG00000159593		NAE1	3.0	19.0	23.0	20.0	33.0	36.0	30.0	9.0	
10.0	9.0	38.0	21.0	21.0	19.0	15.0	16.0	21.0	16.0	17.0	
26.0	35.0	7.0	0.8	3.0	7.0	42.0	45.0				
ENSG00000160255		ITGB2	373.0	1035.0	829.0	133.0	134.0	112.0	104.0	26.0	
16.0	13.0	85.0	63.0	512.0	113.0	115.0	138.0	181.0	123.0	364.0	
19.0	2.0	816.0	333.0	476.0	406.0	0.1	0.2				
ENSG00000160307		S100B	0.3	0.2	0.2	1.0	2.0	18.0	0.7		
	2.0	39.0	0.1	0.3	0.1	9.0	11.0		16.0	7.0	0.5
	0.1	0.1	0.2								
ENSG00000160551		TAOK1	15.0	48.0	38.0	68.0	62.0	44.0	44.0	18.0	
10.0	8.0	33.0	20.0	48.0	20.0	12.0	14.0	23.0	16.0	20.0	
25.0	73.0	26.0	31.0	49.0	41.0	71.0	60.0				
ENSG00000161202		DVL3	13.0	11.0	12.0	17.0	13.0	10.0	8.0	5.0	4.0
2.0	5.0	4.0	12.0	4.0	3.0	3.0	5.0	4.0	7.0	19.0	
18.0	30.0	9.0	11.0	8.0	17.0	17.0					
ENSG00000162188		GNG3	0.1	0.2	0.2	0.3	0.1	0.5	1.0	3.0	1.0
1.0		0.4		0.3	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.6	0.2
0.5	0.1			0.1	0.1						

ENSG00000162738		VANGL2			0.1	0.1	4.0	3.0	4.0	0.3	
		0.1								0.6	6.0
ENSG00000162889		MAPKAPK2		139.0	49.0	59.0	30.0	33.0	31.0	28.0	
24.0	21.0	13.0	24.0	35.0	33.0	24.0	24.0	28.0	40.0	30.0	
50.0	27.0	59.0	102.0	213.0	98.0	54.0	49.0	39.0			
ENSG00000162999		DUSP19	0.3	3.0	3.0	1.0	4.0	3.0	5.0	0.4	0.5
0.4	1.0	0.4	3.0	0.9	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	3.0	9.0
0.6	0.4	0.4	0.6	2.0	3.0						
ENSG00000163221		S100A12	811.0	0.1	4.0	0.1		0.1		0.3	
		98.0	0.2						0.3	5.0	0.1
41.0	1857.0	8421.0	8330.0								
ENSG00000163251		FZD5	1.0	3.0	4.0	14.0	0.3	0.1	0.1	0.3	0.1
0.1	0.1	0.2	5.0	0.1	0.1	0.1	0.2		0.1	20.0	3.0
1.0	0.9	0.7	2.0	4.0	4.0						
ENSG00000164086		DUSP7	5.0	8.0	8.0	1.0	4.0	3.0	3.0	0.4	0.8
0.7	4.0	1.0	3.0	7.0	5.0	4.0	6.0	5.0	5.0	4.0	
26.0	5.0	1.0	1.0	0.9	6.0	6.0					
ENSG00000165025		SYK	84.0	162.0	124.0	52.0	9.0	3.0	44.0	84.0	
129.0	53.0	0.7	13.0	123.0	0.1				0.1	63.0	
40.0	169.0	181.0	63.0	187.0	142.0	0.1	0.1				
ENSG00000165197		VEGFD		0.2	0.1	0.4					
			1.0							0.2	0.2
				2.0	2.0						
ENSG00000166167		BTRC	1.0	13.0	11.0	11.0	22.0	14.0	12.0	4.0	3.0
3.0	11.0	4.0	9.0	6.0	3.0	5.0	6.0	4.0	5.0	40.0	
11.0	7.0	0.7	2.0	5.0	17.0	19.0					
ENSG00000166484		MAPK7	21.0	4.0	3.0	4.0	4.0	6.0	5.0	1.0	2.0
2.0	2.0	1.0	3.0	3.0	2.0	2.0	3.0	2.0	4.0	3.0	2.0
31.0	4.0	5.0	4.0	6.0	5.0						
ENSG00000167083		GNGT2	2.0	5.0	3.0	2.0	4.0	11.0	2.0	1.0	1.0
0.3	1.0	1.0	0.9	0.5	0.9	6.0	7.0	0.9	22.0	2.0	
5.0	3.0	3.0		3.0	2.0						
ENSG00000167207		NOD2	85.0	1.0	3.0	5.0	0.3	0.1	0.1	0.1	0.4
0.3	0.4	0.2	0.1	5.0	4.0	3.0	4.0	3.0	0.4	6.0	0.3
47.0	41.0	30.0	5.0	0.1	0.1						
ENSG00000167414		GNG8	0.5			9.0	112.0	32.0	28.0	3.0	0.4
0.3	5.0	2.0			0.2			2.0		2.0	
16.0					0.8	0.2					
ENSG00000168040		FADD	6.0	33.0	36.0	17.0	20.0	21.0	24.0	3.0	5.0
4.0	10.0	5.0	28.0	10.0	8.0	9.0	12.0	11.0	10.0	13.0	
15.0	11.0	13.0	35.0	14.0	40.0	38.0					
ENSG00000168067		MAP4K2	8.0	13.0	11.0	13.0	31.0	26.0	19.0	15.0	
13.0	9.0	27.0	19.0	14.0	16.0	11.0	8.0	11.0	14.0	5.0	7.0
29.0	41.0	19.0	21.0	17.0	15.0	16.0					
ENSG00000168243		GNG4	0.6	0.2	0.1	0.3	3.0	4.0	3.0	0.3	0.3
0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.1	0.1	0.3	0.3	0.2	0.3	0.4
0.1	0.9	0.6	0.3	0.3	0.4						
ENSG00000168256		NKIRAS2	21.0	26.0	21.0	17.0	10.0	10.0	10.0	4.0	3.0
2.0	5.0	6.0	18.0	4.0	3.0	4.0	4.0	4.0	5.0	11.0	
17.0	13.0	5.0	6.0	8.0	24.0	21.0					
ENSG00000168884		TNIP2	19.0	24.0	57.0	42.0	16.0	15.0	13.0	11.0	
14.0	11.0	19.0	11.0	17.0	20.0	18.0	20.0	26.0	20.0	20.0	
11.0	17.0	30.0	12.0	16.0	13.0	33.0	30.0				
ENSG00000169032		MAP2K1	107.0	63.0	62.0	49.0	50.0	38.0	27.0	15.0	
14.0	10.0	27.0	23.0	71.0	32.0	30.0	26.0	29.0	29.0	27.0	
20.0	17.0	35.0	37.0	28.0	53.0	46.0	37.0				

ENSG00000169071		ROR2			0.1	0.2		0.1			
							0.5			0.4	
0.1											
ENSG00000169398		PTK2	2.0	10.0	6.0	3.0	35.0	6.0	4.0	6.0	6.0
3.0	5.0	0.6	8.0	0.9	0.1	0.2	0.1	0.2	0.5	15.0	
30.0	0.6	0.3	0.4	0.2	68.0	62.0					
ENSG00000169554		ZEB2	168.0	63.0	59.0	64.0	0.4	0.6	1.0	14.0	
10.0	5.0	0.4	1.0	38.0	0.6	1.0	7.0	21.0	0.3	34.0	
30.0	76.0	26.0	45.0	18.0	10.0	7.0	14.0				
ENSG00000169896		ITGAM	120.0	525.0	313.0	103.0	0.2	0.3	0.5	5.0	
16.0	17.0	1.0	22.0	449.0	3.0	6.0	18.0	26.0	4.0	160.0	2.0
0.6	434.0	153.0	500.0	675.0							
ENSG00000169967		MAP3K2	99.0	54.0	51.0	36.0	59.0	52.0	50.0	28.0	
15.0	16.0	43.0	29.0	38.0	20.0	14.0	14.0	22.0	17.0	20.0	
31.0	22.0	24.0	219.0	125.0	54.0	17.0	18.0				
ENSG00000170315		UBB	340.0	543.0	618.0	1657.0	387.0	506.0	587.0	287.0	
307.0	183.0	289.0	454.0	1209.0	332.0	349.0	380.0	415.0	364.0	621.0	
957.0	703.0	251.0	105.0	130.0	237.0	673.0	729.0				
ENSG00000170345		FOS	1968.0	18.0	24.0	52.0	953.0	967.0	1963.0	216.0	
32.0	19.0	69.0	301.0	65.0	223.0	274.0	61.0	83.0	50.0	179.0	
66.0	184.0	217.0	633.0	4836.0	383.0	85.0	9.0				
ENSG00000170458		CD14	150.0	216.0	229.0	1.0	0.1	0.3	0.2	0.1	
	0.1	0.1	3.0	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1		7.0	0.8
24.0	65.0	144.0	4.0	0.2	0.2						
ENSG00000170667		RASA4B	0.3	1.0	0.6	1.0	2.0	2.0	0.9	0.4	0.2
0.1	2.0	0.7	0.6	0.4	0.2	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2	0.1
0.2	0.1	0.1		0.2	0.3						
ENSG00000170759		KIF5B	111.0	132.0	134.0	227.0	108.0	89.0	121.0	33.0	
25.0	23.0	84.0	78.0	134.0	53.0	41.0	35.0	53.0	58.0	50.0	
70.0	160.0	56.0	88.0	120.0	148.0	335.0	281.0				
ENSG00000171223		JUNB	774.0	162.0	263.0	288.0	171.0	154.0	226.0	493.0	
454.0	217.0	553.0	729.0	54.0	1104.0	773.0	261.0	312.0	590.0	304.0	
150.0	133.0	591.0	1284.0	949.0	202.0	40.0	17.0				
ENSG00000172354		GNB2	75.0	58.0	70.0	67.0	31.0	27.0	31.0	19.0	
19.0	15.0	29.0	40.0	61.0	25.0	23.0	23.0	28.0	42.0	43.0	
80.0	62.0	339.0	205.0	175.0	104.0	94.0	77.0				
ENSG00000172380		GNG12		5.0	5.0	0.3		0.1			
		0.1	1.0		0.1						0.1
		0.1	0.1	223.0	285.0						
ENSG00000172724		CCL19	0.1		42.0	35.0	0.1	0.1	0.7		
	0.2										
ENSG00000173039		RELA	42.0	13.0	15.0	28.0	19.0	15.0	14.0	18.0	
11.0	7.0	27.0	29.0	12.0	18.0	13.0	13.0	21.0	15.0	19.0	
18.0	18.0	39.0	57.0	23.0	12.0	25.0	23.0				
ENSG00000173327		MAP3K11	14.0	22.0	33.0	20.0	13.0	10.0	12.0	5.0	5.0
3.0	6.0	5.0	19.0	6.0	5.0	5.0	7.0	6.0	9.0	9.0	
17.0	81.0	63.0	29.0	13.0	26.0	27.0					
ENSG00000173432		SAA1				0.2					
0.1											
ENSG00000174021		GNG5	81.0	157.0	146.0	213.0	48.0	50.0	54.0	14.0	
10.0	8.0	20.0	26.0	179.0	8.0	6.0	7.0	8.0	12.0	15.0	
94.0	84.0	42.0	78.0	94.0	121.0	190.0	165.0				
ENSG00000174130		TLR6	10.0	31.0	17.0	2.0	0.9	0.7	0.7	9.0	
12.0	12.0	0.5	0.4	14.0	0.9	0.9	0.7	0.7	1.0	2.0	4.0
2.0	3.0	53.0	80.0	3.0	2.0	2.0					

ENSG00000174516		PELI3	3.0	9.0	4.0	6.0	2.0	0.5	0.9	2.0	3.0
1.0	5.0	0.3	16.0	4.0	3.0	2.0	2.0	3.0	0.7	2.0	1.0
9.0	0.4	0.5	0.3	2.0	3.0						
ENSG00000174804		FZD4	0.5	0.5	1.0	0.2	0.4	0.3	0.2	0.2	0.1
0.1	0.3	0.2	0.4	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	1.0	5.0
0.1	0.5	0.3	0.2	178.0	157.0						
ENSG00000175104		TRAF6	31.0	14.0	10.0	46.0	20.0	15.0	21.0	11.0	8.0
6.0	21.0	10.0	13.0	12.0	9.0	8.0	15.0	11.0	13.0	15.0	
27.0	21.0	21.0	14.0	14.0	31.0	19.0					
ENSG00000175206		NPPA	0.1							0.2	0.1
										0.2	0.2
		0.1									
ENSG00000175592		FOSL1	15.0	1.0	3.0	0.9	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
		0.3	2.0	0.1	0.1				0.1	5.0	9.0
0.4	2.0	6.0	3.0	7.0	9.0						
ENSG00000176533		GNG7	0.8	1.0	0.1	0.6	3.0	2.0	0.7	17.0	
19.0	13.0	2.0	1.0	3.0	0.9	0.4	0.3	0.2	0.5	0.1	1.0
7.0	6.0	3.0	3.0	5.0	1.0	0.6					
ENSG00000177189		RPS6KA3	34.0	67.0	51.0	45.0	120.0	133.0	63.0	25.0	
13.0	8.0	61.0	62.0	62.0	65.0	59.0	40.0	55.0	41.0	39.0	
37.0	48.0	69.0	68.0	55.0	22.0	106.0	94.0				
ENSG00000177283		FZD8	0.3	0.3	0.3	0.6	0.1	0.2	0.2	0.2	0.5
0.3	0.3	0.1	0.2	1.0	0.8	0.2	0.4		1.0	0.6	0.2
0.2			0.1	3.0	5.0						
ENSG00000177606		JUN	271.0	89.0	62.0	60.0	384.0	430.0	693.0	218.0	
96.0	53.0	115.0	335.0	66.0	142.0	153.0	60.0	78.0	144.0	41.0	
55.0	20.0	7.0	18.0	26.0	6.0	116.0	45.0				
ENSG00000177889		UBE2N	18.0	22.0	32.0	27.0	38.0	30.0	29.0	15.0	
14.0	18.0	31.0	30.0	25.0	21.0	17.0	15.0	20.0	23.0	16.0	
21.0	25.0	8.0	4.0	7.0	14.0	42.0	39.0				
ENSG00000178607		ERN1	16.0	8.0	5.0	23.0	18.0	9.0	11.0	0.9	0.9
0.5	9.0	5.0	6.0	43.0	39.0	14.0	25.0	13.0	18.0	12.0	
12.0	18.0	18.0	21.0	3.0	6.0	8.0					
ENSG00000179295		PTPN11	25.0	60.0	60.0	49.0	60.0	58.0	60.0	14.0	
14.0	9.0	38.0	29.0	81.0	29.0	23.0	24.0	31.0	28.0	32.0	
58.0	128.0	23.0	11.0	17.0	31.0	110.0	103.0				
ENSG00000182240		BACE2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.5	0.3	0.2	5.0	8.0
4.0	0.3	0.2	0.1	0.1		0.1	0.1	0.1	0.1	2.0	5.0
44.0	0.2	0.4	0.3	84.0	76.0						
ENSG00000183735		TBK1	76.0	32.0	39.0	47.0	2.0	1.0	2.0	10.0	8.0
10.0	6.0	3.0	37.0	11.0	10.0	14.0	21.0	15.0	27.0	28.0	
49.0	24.0	42.0	34.0	22.0	37.0	41.0					
ENSG00000184216		IRAK1	94.0	93.0	109.0	39.0	23.0	24.0	19.0	26.0	
31.0	16.0	18.0	15.0	102.0	23.0	20.0	26.0	31.0	21.0	28.0	
42.0	62.0	81.0	15.0	21.0	19.0	59.0	56.0				
ENSG00000184459		BPIFC									
										0.1	
ENSG00000185338		SOCS1	0.7	0.6	3.0	65.0	49.0	40.0	43.0	4.0	1.0
1.0	5.0	3.0	8.0	6.0	4.0	3.0	4.0	2.0	3.0	7.0	3.0
28.0	1.0	1.0	0.2	0.4	0.2						
ENSG00000185386		MAPK11	0.4	0.6	1.0	33.0	14.0	6.0	4.0	1.0	1.0
3.0	4.0	3.0	0.2	4.0	4.0	2.0	3.0	3.0	0.8	0.3	4.0
0.7		0.1	0.1	21.0	24.0						
ENSG00000185507		IRF7	64.0	12.0	14.0	49.0	44.0	30.0	14.0	16.0	
16.0	11.0	11.0	9.0	9.0	13.0	9.0	9.0	12.0	14.0	18.0	7.0
8.0	107.0	38.0	30.0	7.0	6.0	6.0					

ENSG00000185989		RASA3	24.0	36.0	32.0	4.0	34.0	34.0	20.0	18.0	
15.0	12.0	103.0	58.0	20.0	57.0	41.0	48.0	61.0	67.0	72.0	
16.0	113.0	74.0	10.0	16.0	15.0	42.0	39.0				
ENSG00000186063		AIDA	6.0	39.0	36.0	59.0	26.0	21.0	20.0	47.0	
27.0	25.0	30.0	19.0	24.0	25.0	19.0	20.0	23.0	31.0	17.0	
52.0	35.0	14.0	4.0	8.0	6.0	112.0	82.0				
ENSG00000186190		BPIFB3									3.0
0.2											
ENSG00000186191		BPIFB4									2.0
ENSG00000186318		BACE1	2.0	16.0	6.0	13.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.1	0.1	0.2	23.0	0.5	0.4	0.5	0.6	0.5	0.1	2.0	8.0
0.4	0.1	0.4	0.3	16.0	15.0						
ENSG00000186469		GNG2	42.0	5.0	1.0	16.0	86.0	78.0	62.0	24.0	
11.0	9.0	46.0	58.0	0.3	40.0	36.0	44.0	69.0	49.0	148.0	
19.0	0.4	42.0	149.0	157.0	44.0	0.7	0.1				
ENSG00000188064		WNT7B	0.4	0.2	0.1	0.2	0.8	0.5	0.4	0.5	0.3
0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1	0.2	0.3	0.4
3.0	0.7	0.4	0.3	0.2	0.4						
ENSG00000189403		HMGB1	82.0	54.0	59.0	80.0	146.0	166.0	239.0	64.0	
47.0	50.0	143.0	106.0	55.0	80.0	63.0	58.0	93.0	72.0	80.0	
166.0	182.0	46.0	65.0	59.0	89.0	202.0	199.0				
ENSG00000196396		PTPN1	110.0	82.0	139.0	260.0	45.0	38.0	40.0	52.0	
66.0	38.0	64.0	36.0	157.0	44.0	33.0	34.0	46.0	39.0	40.0	
26.0	55.0	128.0	58.0	29.0	49.0	45.0	64.0				
ENSG00000196850		PPTC7	25.0	15.0	15.0	58.0	33.0	18.0	17.0	22.0	8.0
8.0	24.0	22.0	18.0	11.0	7.0	9.0	12.0	11.0	17.0	13.0	
27.0	11.0	42.0	26.0	8.0	22.0	17.0					
ENSG00000197329		PELI1	210.0	19.0	14.0	48.0	104.0	59.0	72.0	53.0	
36.0	35.0	65.0	88.0	8.0	28.0	13.0	6.0	9.0	46.0	4.0	
10.0	26.0	53.0	1044.0	396.0	51.0	35.0	36.0				
ENSG00000197372		ZNF675	2.0	8.0	6.0	10.0	21.0	21.0	15.0	7.0	4.0
5.0	17.0	6.0	8.0	7.0	5.0	4.0	7.0	6.0	4.0	5.0	7.0
8.0	0.6	2.0	3.0	5.0	6.0						
ENSG00000197442		MAP3K5	21.0	91.0	50.0	19.0	8.0	4.0	9.0	20.0	
16.0	8.0	23.0	8.0	61.0	31.0	21.0	16.0	35.0	36.0	29.0	
21.0	146.0	79.0	72.0	109.0	27.0	12.0	12.0				
ENSG00000197885		NKIRAS1	1.0	8.0	8.0	7.0	3.0	4.0	2.0	2.0	1.0
0.6	3.0	2.0	8.0	1.0	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0	2.0	2.0
2.0	1.0	1.0	3.0	4.0	5.0						
ENSG00000197943		PLCG2	13.0	18.0	10.0	20.0	0.8	0.8	4.0	43.0	
38.0	26.0	0.3	2.0	27.0	0.1	0.1	3.0	5.0	0.1	24.0	5.0
21.0	120.0	58.0	75.0	43.0	5.0	8.0					
ENSG00000197959		DNM3	0.5	2.0	0.2	0.5	5.0	1.0	3.0	0.3	0.1
0.4	1.0	0.5	2.0	0.6	0.3	0.3	0.4	0.7	0.3	8.0	
168.0	2.0	0.2	0.6	0.2	2.0	2.0					
ENSG00000204209		DAXX	5.0	22.0	36.0	35.0	37.0	44.0	36.0	13.0	
18.0	13.0	23.0	16.0	20.0	19.0	15.0	25.0	30.0	19.0	37.0	
30.0	41.0	33.0	14.0	18.0	19.0	34.0	33.0				
ENSG00000204305		AGER	11.0	2.0	1.0	4.0	17.0	13.0	14.0	4.0	3.0
2.0	10.0	8.0	1.0	5.0	3.0	2.0	4.0	4.0	4.0	5.0	6.0
102.0	40.0	22.0	9.0	4.0	6.0						
ENSG00000213341		CHUK	14.0	23.0	31.0	33.0	24.0	25.0	24.0	8.0	5.0
4.0	12.0	11.0	29.0	7.0	5.0	6.0	10.0	7.0	11.0	22.0	
21.0	9.0	21.0	24.0	15.0	20.0	21.0					

ENSG00000216863		LY86-AS1		0.1	2.0	0.3	0.2	0.8	0.4	0.3	0.4
	0.9	0.8		0.4	5.0						0.1
	0.3		0.4	0.1	0.1						
ENSG00000221983		UBA52	183.0	171.0	158.0	112.0	162.0	204.0	119.0	148.0	
	163.0	108.0	303.0	274.0	166.0	214.0	181.0	152.0	159.0	169.0	123.0
	164.0	123.0	54.0	46.0	67.0	81.0	184.0	180.0			
ENSG00000225830		ERCC6	3.0	3.0	2.0	4.0	12.0	9.0	7.0	3.0	2.0
	2.0	6.0	2.0	4.0	3.0	2.0	2.0	4.0	4.0	3.0	3.0
	10.0	10.0	0.9	4.0	4.0	7.0	15.0				
ENSG00000225889		AC012368.1		16.0	3.0	2.0	5.0	19.0	9.0	9.0	5.0
	7.0	7.0	12.0	4.0	5.0	3.0	1.0	1.0	2.0	5.0	2.0	2.0
	5.0	27.0	73.0	90.0	23.0	4.0	5.0				
ENSG00000227039		ITGB2-AS1		28.0	13.0	10.0	8.0	86.0	65.0	70.0	
	13.0	3.0	6.0	80.0	51.0	2.0	26.0	14.0	16.0	38.0	10.0	
	14.0	0.6		166.0	38.0	98.0	107.0	0.1				
ENSG00000230630		DNM3OS									
											0.4
					8.0	9.0					
ENSG00000231654		RPS6KA2-AS1									0.1
	0.1					0.1					
ENSG00000231767		AL136454.1								0.1	0.1
	0.3	0.1	0.3	0.2		0.1	0.2	0.1	0.5	0.1		0.4
	0.1				0.1	0.1	0.1				
ENSG00000232082		RPS6KA2-IT1		0.5	6.0	1.0	2.0	6.0	0.7	1.0	0.4
	0.9		1.0	0.2	1.0	0.5						0.6
	0.2	22.0	0.6	2.0	11.0	12.0	14.0				
ENSG00000232810		TNF	16.0	2.0	11.0	32.0	5.0	0.6	3.0	7.0	4.0
	3.0	1.0	22.0	0.4	6.0	6.0	2.0	6.0	4.0	2.0	0.8
	13.0	4.0	32.0	9.0	3.0						
ENSG00000233540		DNM3-IT1		0.2	0.6	0.2	0.8	4.0	1.0	2.0	0.3
	0.1	0.2	0.8	0.5	1.0	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1		0.8
	12.0				0.1	0.8	1.0				
ENSG00000239732		TLR9	0.2				0.3	0.3	0.4		
	0.1	0.1	0.1								
	0.3	0.7	0.6	0.1							
ENSG00000242616		GNG10	9.0	39.0	56.0	17.0	10.0	6.0	8.0	2.0	2.0
	1.0	4.0	5.0	42.0	4.0	3.0	4.0	4.0	6.0	3.0	5.0	6.0
	12.0	70.0	47.0	32.0	17.0	18.0						
ENSG00000243414		TICAM2	2.0	1.0	2.0	2.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3
	0.3		0.1	0.3			0.1	0.2	0.1		0.6	0.2
	1.0	0.4	0.5	0.1	0.4	0.4						
ENSG00000244687		UBE2V1	8.0	6.0	5.0	9.0	22.0	14.0	12.0	7.0	4.0
	4.0	13.0	9.0	6.0	5.0	2.0	3.0	6.0	3.0	5.0	13.0	
	12.0	9.0	3.0	4.0	5.0	12.0	12.0					
ENSG00000245864		MEF2C-AS2		0.6	0.2	0.2					7.0
	4.0	3.0								0.1	0.3
	7.0		0.1	0.2							
ENSG00000246560		UBE2D3-AS1		1.0	3.0	1.0	1.0	4.0	4.0	4.0	0.8
	0.6	0.4	1.0	1.0	4.0	0.3	0.5	0.7	2.0	0.2	2.0	3.0
	3.0	6.0	1.0	4.0	2.0	3.0	3.0					
ENSG00000248309		MEF2C-AS1		0.4	0.1		0.1			0.1	6.0
	3.0	3.0									0.4
	3.0		0.6	2.0	0.1	0.5	1.0					
ENSG00000250062		MAPK10-AS1									0.1
						0.2					

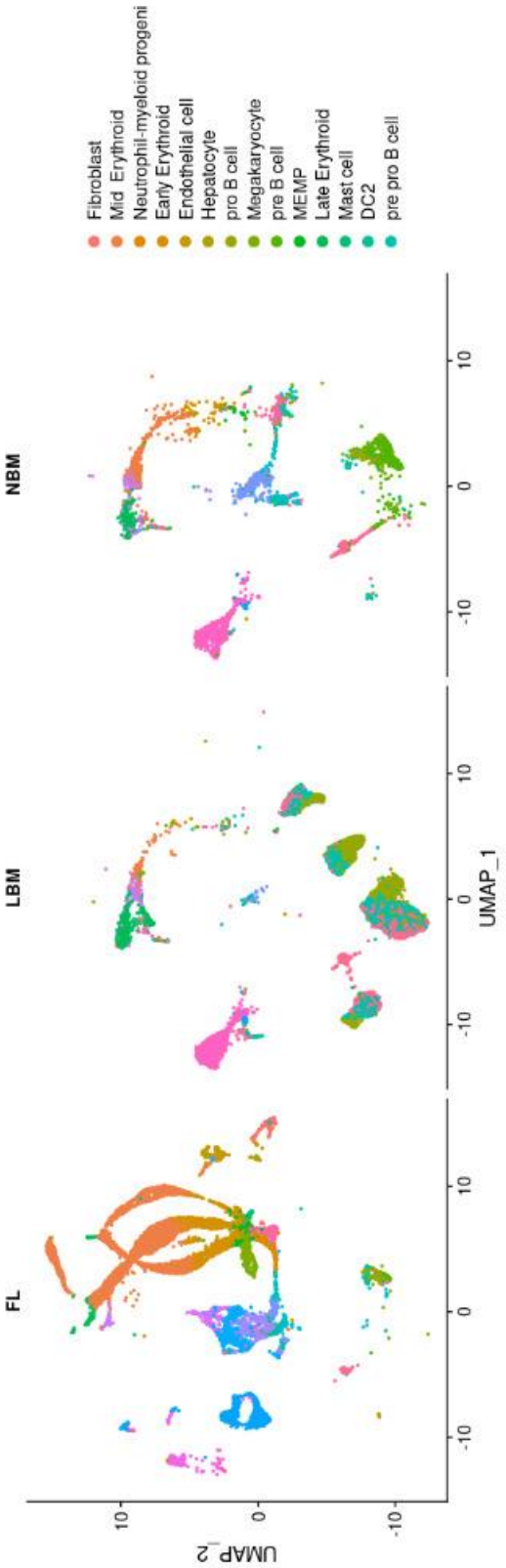
```
ENSG00000255690       TRIL                                  0.2                 0.1

                                          0.9     0.5

ENSG00000258111       AC079316.1      13.0    10.0    8.0     24.0    23.0    8.0     13.0    7.0
        5.0     2.0     3.0     2.0     11.0    4.0     2.0     3.0     8.0     5.0     4.0
        11.0    6.0     157.0   72.0    46.0    0.9     3.0     4.0

ENSG00000258924       AC002094.1              0.1
        0.1                                   0.1             0.1     0.1             0.1
        0.1                     0.1

ENSG00000260253       AC084262.1                                      0.3     0.1     0.1     0.3
                                                                      0.1             0.1


ENSG00000261644       AC007728.2      3.0     0.7     0.7     2.0     3.0     2.0     1.0     4.0
        2.0     2.0     3.0     1.0     0.2     0.6     0.5     0.5     0.8     2.0     1.0     0.1
                13.0    5.0     4.0     1.0             0.1

ENSG00000263001       GTF2I   4.0     20.0    25.0    12.0    52.0    43.0    31.0    9.0     8.0
        5.0     12.0    12.0    16.0    5.0     3.0     5.0     7.0     5.0     8.0     15.0
        22.0    14.0    6.0     9.0     10.0    26.0    28.0

ENSG00000263528       IKBKE   6.0     38.0    59.0    20.0    55.0    75.0    47.0    6.0     8.0
        6.0     25.0    21.0    35.0    21.0    14.0    17.0    21.0    26.0    9.0     2.0     4.0
        3.0     1.0     2.0     5.0     17.0    13.0

ENSG00000267487       AC100843.3                                                      0.4

                                                      0.1

ENSG00000269335       IKBKG   7.0     13.0    14.0    17.0    9.0     9.0     8.0     4.0     4.0
        2.0     7.0     4.0     13.0    5.0     5.0     5.0     8.0     6.0     11.0    9.0
        15.0    35.0    11.0    17.0    10.0    9.0     8.0

ENSG00000270249       AC093668.1      0.3     0.1                     0.3     0.3     0.3     0.1
                        0.3     0.6     0.3             0.1     0.1     0.1     0.1     0.1
                                                0.2

ENSG00000270880       AC128687.1                              0.1     0.4     0.2             2.0
        1.0     3.0     0.2                     0.3     0.1     0.1     0.1     0.2
        0.2             0.1     0.1     0.1

ENSG00000271267       AL353807.4      0.1                                                     0.2
                                                0.2
        0.1

ENSG00000271332       AC023206.1                                                              0.1

                                                0.1

ENSG00000271483       AC108676.2      2.0                                                     0.3
                                0.2
                        1.0

ENSG00000273027       AL844908.2              0.5     0.2     0.2     2.0     1.0     1.0
                0.1     0.4     0.1     0.2             0.1     0.3     0.3     0.3     0.3     0.3
        0.4             0.7     0.2     0.3     0.4     0.2

ENSG00000273372       SFTPD-AS1       0.8     0.4     0.2     0.4     2.0     1.0     1.0     0.5
        0.3     0.2     0.6     0.5     0.4     0.5     0.3     0.3     0.4     0.3     0.3     0.5
        0.7     3.0     2.0     0.9     0.5     0.6     1.0

ENSG00000274021       AC024909.1      3.0     3.0     4.0     0.1     2.0     1.0     3.0     0.5
        0.2     0.1             0.1     0.6     0.1     0.3     0.3     0.4     0.4     2.0     0.3
        2.0     2.0     2.0     3.0     2.0     0.6     0.9

ENSG00000277450       AC002094.4      0.9     0.6     0.4     1.0     6.0     4.0     3.0     2.0
        1.0     0.8     6.0     0.8     1.0     2.0     1.0     2.0     3.0     2.0     2.0     0.9
        0.7     2.0     1.0     0.6     0.8     2.0     2.0
```

Archivo suplementario 6

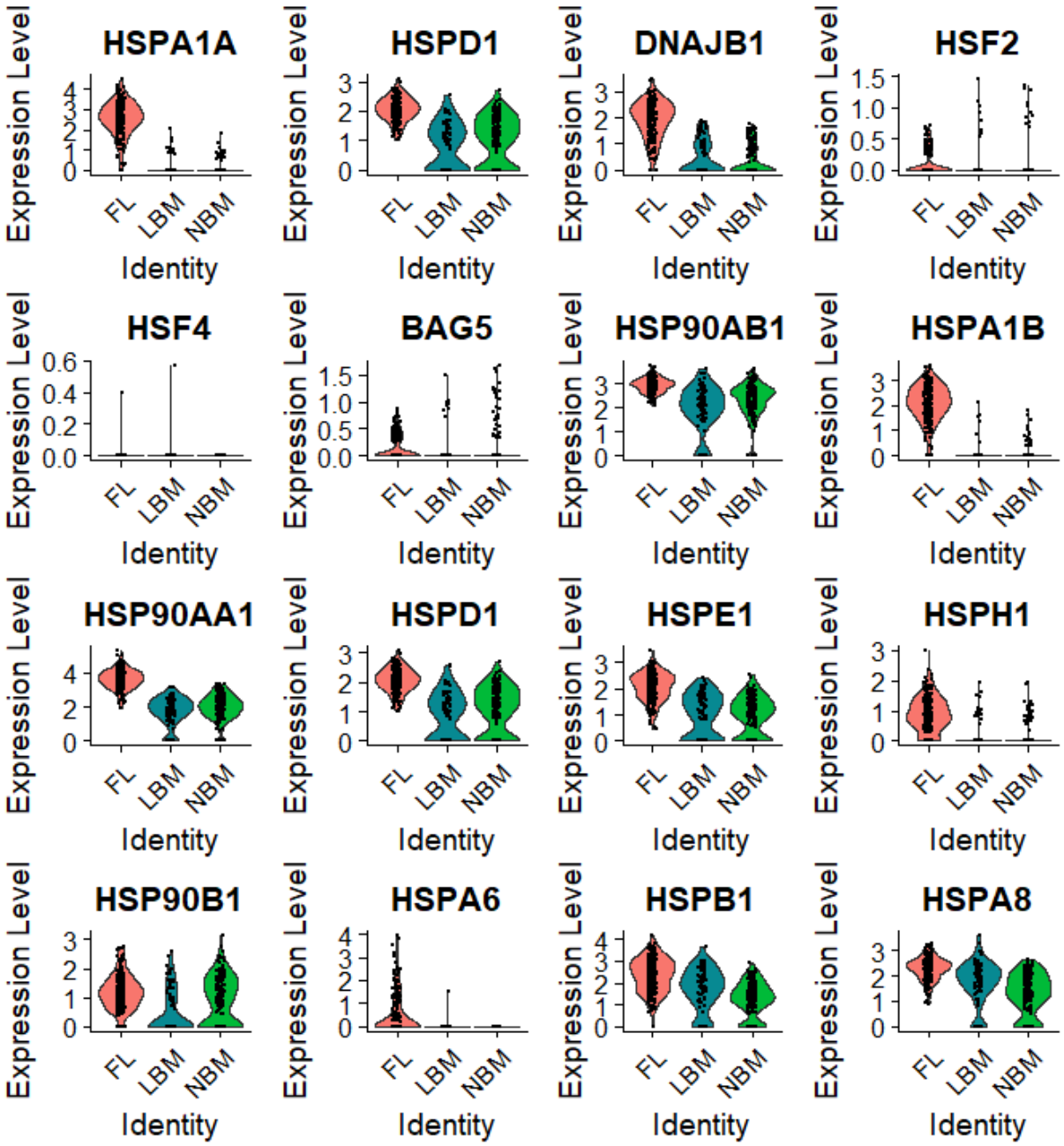
```
"","Var1","Var2","Freq"
"1","FL","B cell",35
"2","LBM","B cell",2360
"3","NBM","B cell",232
"4","FL","DC1",35
"5","LBM","DC1",0
"6","NBM","DC1",0
"7","FL","DC2",118
"8","LBM","DC2",16
"9","NBM","DC2",67
"10","FL","Early Erythroid",1543
"11","LBM","Early Erythroid",5
"12","NBM","Early Erythroid",66
"13","FL","Early lymphoid/T lymphocyte",46
"14","LBM","Early lymphoid/T lymphocyte",1554
"15","NBM","Early lymphoid/T lymphocyte",802
"16","FL","Endothelial cell",399
"17","LBM","Endothelial cell",0
"18","NBM","Endothelial cell",0
"19","FL","Erythroblastic Island Macrophage",101
"20","LBM","Erythroblastic Island Macrophage",143
"21","NBM","Erythroblastic Island Macrophage",119
"22","FL","Fibroblast",326
"23","LBM","Fibroblast",1
"24","NBM","Fibroblast",0
"25","FL","Hepatocyte",81
"26","LBM","Hepatocyte",0
"27","NBM","Hepatocyte",0
"28","FL","HSC/MPP",204
"29","LBM","HSC/MPP",80
"30","NBM","HSC/MPP",169
"31","FL","ILC precursor",211
"32","LBM","ILC precursor",11
"33","NBM","ILC precursor",4
```

"34","FL","Kupffer Cell",1197
"35","LBM","Kupffer Cell",1
"36","NBM","Kupffer Cell",0
"37","FL","Late Erythroid",199
"38","LBM","Late Erythroid",629
"39","NBM","Late Erythroid",415
"40","FL","Mast cell",77
"41","LBM","Mast cell",0
"42","NBM","Mast cell",3
"43","FL","Megakaryocyte",546
"44","LBM","Megakaryocyte",1
"45","NBM","Megakaryocyte",2
"46","FL","MEMP",221
"47","LBM","MEMP",2
"48","NBM","MEMP",26
"49","FL","Mid Erythroid",4140
"50","LBM","Mid Erythroid",124
"51","NBM","Mid Erythroid",505
"52","FL","Mono-Mac",483
"53","LBM","Mono-Mac",1
"54","NBM","Mono-Mac",2

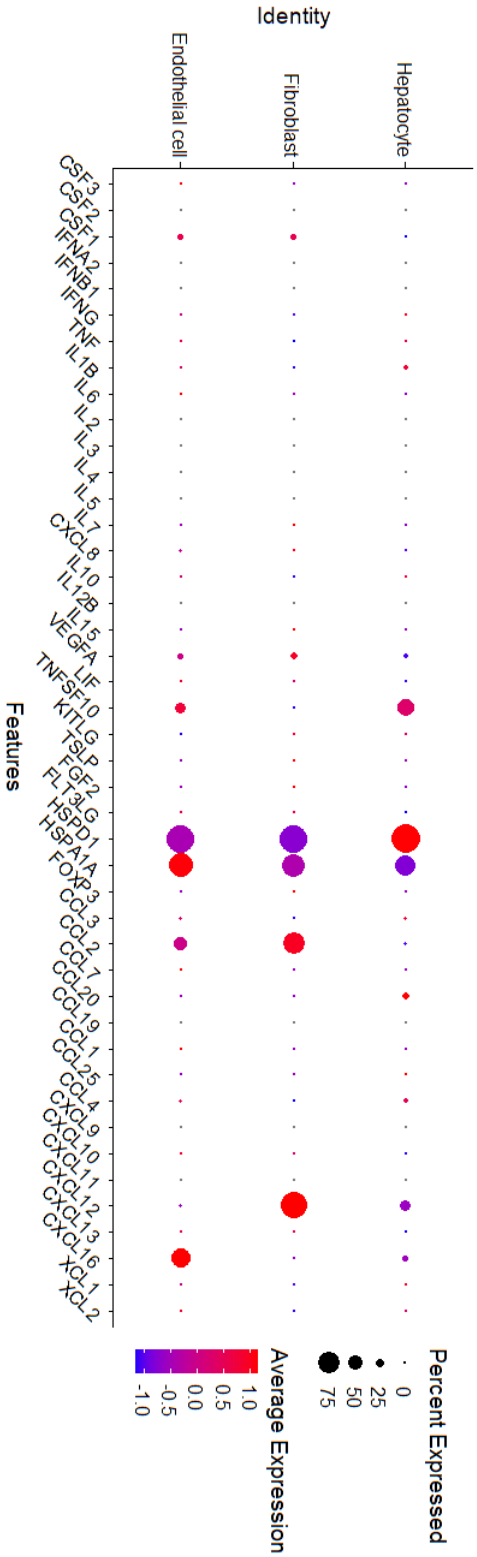
Archivo suplementario 7



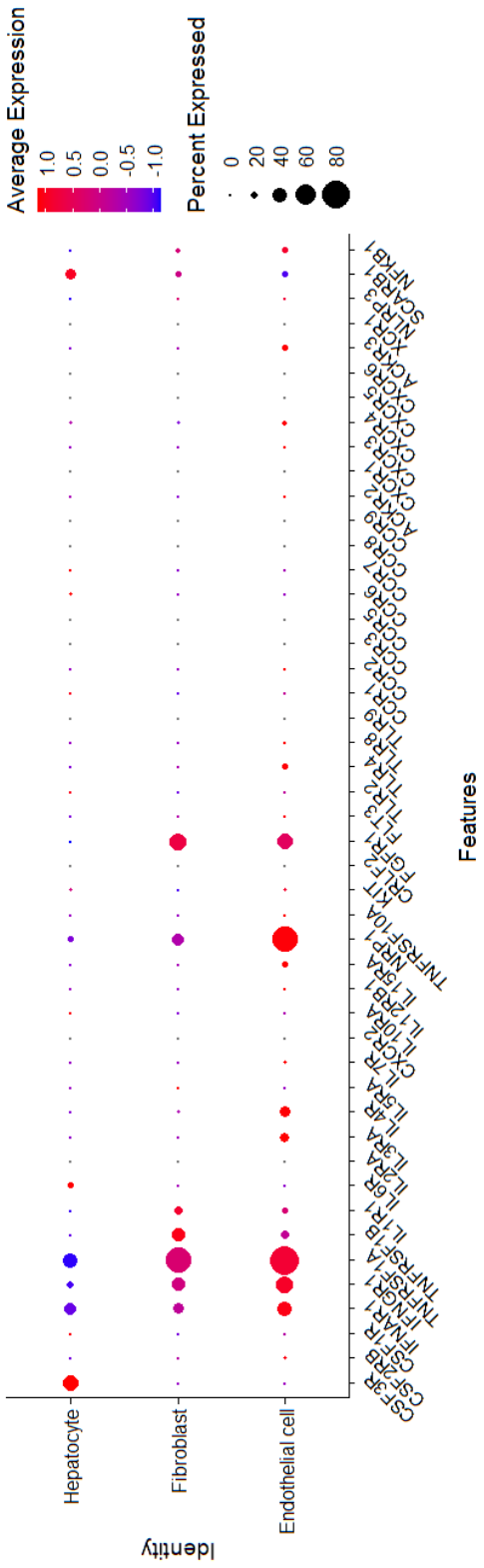
Archivo suplementario 8



Archivo suplementario 9



Archivo suplementario 10



Archivo suplementario 11

FL vs LBM HSC/MPP	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
DNTT	3.42E-54	-4.51053056	0.083	1	1.15E-49
TCL1A	3.32E-50	-3.87496925	0.015	0.875	1.12E-45
RPS4Y2	1.21E-40	-2.55449496	0	0.713	4.07E-36
RPS4Y1	8.30E-40	-2.14951396	0.025	0.787	2.80E-35
HBG2	5.78E-39	3.74806098	1	0.2	1.95E-34
RPL7A	2.15E-38	1.53593759	1	0.988	7.26E-34
B2M	9.86E-38	-2.23193621	1	1	3.32E-33
EEF1B2	1.00E-37	1.69702917	1	0.887	3.38E-33
RPS3	1.14E-37	1.15762187	1	1	3.84E-33
HLA-DRA	1.19E-37	-3.10335948	0.75	1	3.99E-33
HSPA1A	2.18E-37	3.68392699	0.985	0.138	7.36E-33
RPS4X	4.10E-37	1.16302999	1	1	1.38E-32
HSPA1B	1.47E-36	3.02701547	0.98	0.075	4.94E-32
HSP90AA1	1.52E-36	2.51192238	1	0.875	5.11E-32
CD74	1.98E-36	-2.99925085	0.98	1	6.68E-32
HLA-C	2.44E-36	-2.84912075	0.887	0.988	8.22E-32
RPL29	2.69E-36	1.12863839	1	0.975	9.07E-32
RPS23	6.06E-36	0.99213317	1	1	2.04E-31
RPL9	8.37E-36	1.05235569	1	1	2.82E-31
HLA-DQA1	9.29E-36	-2.16168087	0.039	0.713	3.13E-31
LAPTM5	3.62E-35	-2.44751754	0.912	0.988	1.22E-30
RPL24	3.63E-35	1.1583769	1	1	1.22E-30
HMGA1	8.60E-35	1.55748284	1	0.725	2.90E-30
RPL37	2.01E-34	1.05912794	1	1	6.77E-30
RPS17	2.01E-34	0.97698529	1	1	6.77E-30
RPL4	2.26E-34	0.89229112	1	0.963	7.62E-30
RPL14	2.31E-34	0.99328327	1	1	7.78E-30
HLA-DPB1	6.94E-34	-3.00871783	0.647	0.975	2.34E-29
RPS7	9.33E-34	0.92351577	1	0.988	3.14E-29
RPL8	1.01E-33	0.85921066	1	1	3.40E-29
RPS14	1.43E-33	0.91441604	1	1	4.83E-29
HLA-DQB1	5.18E-33	-2.54245947	0.098	0.75	1.74E-28
HLA-DRB5	5.49E-33	-2.41352887	0.054	0.7	1.85E-28
RPS18	1.04E-32	0.92186241	1	1	3.49E-28
H3F3B	1.99E-32	-1.59755435	0.995	1	6.72E-28
RPL12	4.37E-32	0.99993294	1	1	1.47E-27
RPL10A	1.56E-31	0.89109215	1	0.988	5.25E-27
TMSB4X	2.03E-31	-1.55438657	1	1	6.84E-27

NAP1L1	4.89E-31	1.19378625	1	0.85	1.65E-26
RPL23A	5.20E-31	0.82756648	1	0.988	1.75E-26
HLA-DPA1	7.59E-31	-2.70605717	0.52	0.925	2.56E-26
HLA-B	9.87E-31	-3.49759129	0.711	0.938	3.33E-26
RPS3A	1.18E-30	0.73749951	1	1	3.98E-26
RPL19	1.32E-30	0.7271883	1	1	4.45E-26
RPS11	2.53E-30	0.80462958	1	0.988	8.53E-26
ENO1	3.80E-30	1.62098227	1	0.662	1.28E-25
TPT1	5.70E-30	0.97085787	1	0.988	1.92E-25
LSP1	6.20E-30	1.86197195	0.931	0.112	2.09E-25
LDHB	6.60E-30	1.42155142	1	0.762	2.22E-25
CD27	8.74E-30	-1.83741219	0.02	0.588	2.94E-25
CD24	1.16E-29	-2.68459198	0.054	0.65	3.92E-25
RPS20	1.17E-29	0.84000783	1	1	3.93E-25
MATK	6.36E-29	1.02235809	0.853	0.025	2.14E-24
HLA-A	7.56E-29	-1.75573764	0.956	0.975	2.55E-24
XIST	9.51E-29	1.0024957	0.819	0	3.20E-24
DNAJB1	9.81E-29	2.05806605	0.99	0.425	3.31E-24
RPL5	1.50E-28	0.86978053	1	1	5.07E-24
RPLP1	1.67E-28	0.79485349	1	1	5.64E-24
RPL28	1.83E-28	0.76961454	1	1	6.17E-24
HINT1	2.06E-28	1.21716192	1	0.812	6.93E-24
NGFRAP1	2.29E-28	1.50748653	0.975	0.125	7.70E-24
RCSD1	2.36E-28	-2.43445787	0.593	0.912	7.96E-24
TMSB10	2.40E-28	-1.33636194	1	1	8.07E-24
HSPD1	4.25E-28	1.45711703	1	0.6	1.43E-23
CXCR4	1.80E-27	-2.45151229	0.181	0.762	6.07E-23
RPL18	2.08E-27	0.71469882	1	1	7.01E-23
RPL38	2.27E-27	0.89903281	1	0.975	7.66E-23
CTSC	1.10E-26	1.05890987	0.877	0.062	3.72E-22
ALOX5	1.16E-26	-1.42990423	0.02	0.537	3.90E-22
HLA-DRB1	1.76E-26	-2.04959888	0.735	0.95	5.94E-22
RPL30	2.59E-26	0.75721525	1	0.975	8.72E-22
CD19	3.07E-26	-1.60442066	0.029	0.55	1.03E-21
SPINK2	3.84E-26	1.75221382	0.966	0.162	1.29E-21
PRSS57	8.65E-26	1.68580575	0.961	0.162	2.91E-21
AC104389.1	1.26E-25	0.91318905	0.779	0.013	4.23E-21
CD52	1.38E-25	-1.92149964	0.824	0.975	4.66E-21
VPREB3	2.34E-25	-2.03016965	0.02	0.525	7.88E-21
RPL37A	2.80E-25	0.75524564	1	1	9.44E-21

NACA	2.85E-25	0.81770891	1	0.975	9.60E-21
SOCS2	4.44E-25	-2.31071273	0.51	0.85	1.50E-20
ZFAS1	1.68E-24	1.12436605	1	0.7	5.65E-20
RP11-301G19.1	2.40E-24	-2.32730256	0.015	0.488	8.10E-20
ISG20	2.66E-24	-1.6177658	0.039	0.537	8.96E-20
DONSON	2.99E-24	0.9399803	0.814	0.05	1.01E-19
STAG3	4.56E-24	-1.70038944	0.034	0.525	1.54E-19
DLK1	9.74E-24	1.52309236	0.745	0.013	3.28E-19
AC008060.7	1.00E-23	-1.39077384	0	0.438	3.38E-19
HLA-DQA2	1.35E-23	-1.33744813	0.01	0.462	4.55E-19
HBZ	3.60E-23	0.85399442	0.711	0	1.21E-18
MALAT1	4.16E-23	-1.46543879	1	0.988	1.40E-18
EIF1AY	5.11E-23	-1.36128693	0.025	0.5	1.72E-18
RP11-620J15.3	7.16E-23	1.29827503	0.956	0.25	2.41E-18
BASP1	9.92E-23	0.77439093	0.721	0.013	3.34E-18
CRYGD	1.25E-22	0.76164102	0.716	0.013	4.21E-18
HSPE1	1.55E-22	1.37868239	1	0.625	5.22E-18
MZB1	2.11E-22	-2.00554643	0.456	0.875	7.11E-18
BTF3	2.76E-22	0.7841492	1	0.912	9.31E-18
BIRC7	3.34E-22	-1.29342312	0.005	0.425	1.12E-17
HBG1	4.16E-22	0.86284167	0.819	0.062	1.40E-17
HSP90AB1	4.93E-22	0.99956409	1	0.863	1.66E-17
MT-ND3	6.06E-22	-1.22745483	1	0.988	2.04E-17
GYPC	1.02E-21	1.24228937	0.975	0.3	3.44E-17
DPEP1	1.79E-21	-1.33376396	0.02	0.45	6.03E-17
RPL22L1	2.15E-21	1.27102283	0.995	0.475	7.26E-17
C1orf228	2.47E-21	-1.90712946	0.559	0.838	8.31E-17
LAPTM4B	4.29E-21	0.86691601	0.858	0.1	1.44E-16
SRI	4.81E-21	0.87463138	0.951	0.238	1.62E-16
ISYNA1	4.83E-21	0.96088778	0.779	0.075	1.63E-16
MME	9.79E-21	-1.67406996	0.025	0.45	3.30E-16
LINC00958	1.24E-20	-1.35453841	0.015	0.425	4.18E-16
TRH	1.36E-20	0.85019755	0.775	0.062	4.59E-16
SRGN	1.53E-20	1.11746188	0.912	0.138	5.16E-16
YBX3	1.54E-20	-2.10851205	0.426	0.775	5.18E-16
IQGAP2	1.75E-20	0.82718409	0.892	0.125	5.88E-16
PPIA	2.74E-20	0.79561806	1	0.9	9.23E-16
AHSP	3.00E-20	0.74270564	0.912	0.138	1.01E-15
SMIM24	3.16E-20	1.13147128	0.966	0.325	1.07E-15
NRN1	3.21E-20	-1.30403089	0	0.375	1.08E-15

GNG7	3.93E-20	-1.68656449	0.289	0.713	1.32E-15
HLA-DMA	4.48E-20	-1.86535375	0.529	0.812	1.51E-15
CD79A	4.87E-20	-2.33345404	0.25	0.7	1.64E-15
NME1	4.97E-20	1.10240839	0.951	0.338	1.67E-15
PRDX4	5.91E-20	0.8302251	0.833	0.125	1.99E-15
GSTP1	6.58E-20	0.93255214	1	0.825	2.22E-15
NPM1	7.33E-20	0.72338327	1	0.975	2.47E-15
RP3-380B8.4	1.56E-19	-1.47208789	0	0.362	5.27E-15
MT-ND2	3.01E-19	-1.41274363	1	1	1.01E-14
NEAT1	4.75E-19	-1.8251169	0.402	0.75	1.60E-14
DDX5	7.03E-19	-1.18918031	0.995	0.988	2.37E-14
AP005530.2	7.53E-19	-1.15028281	0	0.35	2.54E-14
WBP5	8.97E-19	0.73700791	0.696	0.05	3.02E-14
HSPH1	9.40E-19	1.04925384	0.853	0.175	3.17E-14
RAMP1	1.05E-18	0.72228065	0.657	0.025	3.53E-14
FTH1	1.56E-18	-0.71595808	1	1	5.26E-14
TAOK3	1.58E-18	0.93491035	0.907	0.25	5.32E-14
COX5A	1.66E-18	0.89839932	1	0.65	5.59E-14
TSC22D3	1.92E-18	-2.49647662	0.186	0.625	6.45E-14
PTRHD1	2.18E-18	0.72618794	0.912	0.2	7.35E-14
MEF2C	2.65E-18	-1.99418519	0.75	0.838	8.94E-14
PCBD1	2.70E-18	0.69492003	0.73	0.062	9.09E-14
RP11-231E4.2	3.59E-18	-1.07082274	0	0.338	1.21E-13
LINC01013	5.20E-18	-1.12212725	0.005	0.35	1.75E-13
AC090498.1	5.87E-18	-1.11196766	0.995	0.938	1.98E-13
S100A11	6.13E-18	0.77779704	0.657	0.038	2.06E-13
CCT2	6.25E-18	0.96205808	0.985	0.375	2.11E-13
SNHG8	7.59E-18	0.81099781	0.995	0.713	2.56E-13
CTGF	9.25E-18	-1.26000087	0.015	0.375	3.12E-13
SNHG25	1.28E-17	0.77223918	0.848	0.162	4.30E-13
ACTG1	1.68E-17	0.83142379	1	0.975	5.67E-13
LGALS1	1.73E-17	1.19939888	0.681	0.062	5.83E-13
RGS10	1.86E-17	0.99970307	0.946	0.325	6.26E-13
SDC2	2.57E-17	-0.99598589	0.005	0.338	8.65E-13
C1QBP	4.52E-17	0.9399019	1	0.525	1.52E-12
LYZ	5.84E-17	1.7126474	0.569	0	1.97E-12
HLA-E	5.86E-17	-1.55795219	0.912	0.887	1.97E-12
IER2	7.33E-17	-1.66475859	0.716	0.875	2.47E-12
HOPX	9.00E-17	0.97779076	0.77	0.112	3.03E-12
ZFP36L2	9.47E-17	-1.65052571	0.922	0.912	3.19E-12

ZFP36L1	1.25E-16	-1.62029815	0.186	0.6	4.22E-12
ECM1	1.25E-16	-1.01949026	0.029	0.388	4.22E-12
F8A1	1.52E-16	-0.79574621	0.01	0.338	5.13E-12
KIAA0226L	1.52E-16	-1.04553041	0.01	0.338	5.13E-12
FABP5	2.06E-16	0.95755193	0.99	0.412	6.94E-12
CKS2	2.07E-16	1.06142388	0.917	0.288	6.96E-12
MACROD2	3.65E-16	-0.86286254	0	0.3	1.23E-11
HPGDS	4.12E-16	0.77357177	0.569	0.013	1.39E-11
NPY	5.61E-16	-1.3561813	0.005	0.312	1.89E-11
HPS4	6.01E-16	-1.64703774	0.348	0.688	2.03E-11
HLA-F	7.28E-16	-1.05444004	0.01	0.325	2.45E-11
TPGS1	7.48E-16	-0.79549578	0.025	0.362	2.52E-11
CLNS1A	8.02E-16	0.82664336	0.98	0.425	2.70E-11
KIAA0101	1.56E-15	1.13547025	0.858	0.288	5.25E-11
AHCY	1.66E-15	0.69694765	0.853	0.225	5.59E-11
NAA38	2.52E-15	0.82182711	0.941	0.338	8.50E-11
LEF1	4.50E-15	-1.75062464	0.172	0.55	1.51E-10
CACYBP	4.82E-15	0.89030652	0.946	0.375	1.62E-10
H1F0	1.09E-14	-1.77591679	0.515	0.762	3.66E-10
HBA2	1.11E-14	-1.03525058	1	0.425	3.75E-10
UHRF1	1.21E-14	-1.93338165	0.583	0.762	4.06E-10
TYMS	1.34E-14	0.94717885	0.838	0.225	4.51E-10
TCF4	1.37E-14	-1.47242852	0.539	0.75	4.63E-10
EBF1	1.53E-14	-1.0218698	0.029	0.35	5.16E-10
CDK4	1.78E-14	0.78888533	0.951	0.388	6.00E-10
PCLO	1.85E-14	-1.02938768	0.015	0.312	6.24E-10
CLEC11A	1.93E-14	1.46234396	0.843	0.3	6.50E-10
ANP32B	2.56E-14	0.76890949	1	0.75	8.62E-10
TERF2	2.82E-14	-1.89000047	0.132	0.5	9.49E-10
SH3GLB2	5.45E-14	-0.97771288	0.034	0.35	1.84E-09
ITM2A	6.30E-14	0.7887105	0.882	0.25	2.12E-09
IGHM	7.86E-14	-1.26750137	0.088	0.45	2.65E-09
HBA1	1.72E-13	-1.00292325	1	0.412	5.78E-09
EIF1AX	1.91E-13	0.70480532	0.971	0.35	6.43E-09
MPO	1.92E-13	3.29286546	0.49	0.013	6.47E-09
IGLL1	2.07E-13	2.03053858	0.716	0.225	6.97E-09
CCT3	2.33E-13	0.72557314	0.99	0.512	7.86E-09
SMAD1	3.50E-13	-1.65939448	0.118	0.462	1.18E-08
NEIL1	3.86E-13	-1.01193875	0.01	0.275	1.30E-08
KCNN1	3.98E-13	-0.7868857	0.015	0.288	1.34E-08

SNRPF	4.00E-13	0.75752879	0.995	0.562	1.35E-08
PCDH9	4.36E-13	-1.34981034	0.025	0.312	1.47E-08
FOS	6.16E-13	-3.35444547	0.49	0.725	2.08E-08
HSP90B1	6.57E-13	0.79215723	0.956	0.362	2.21E-08
CYGB	1.54E-12	-1.06014041	0.01	0.262	5.20E-08
HSPA6	1.55E-12	1.57585311	0.471	0.013	5.23E-08
CALR	1.77E-12	1.14362431	0.971	0.512	5.95E-08
HIST2H2BE	1.82E-12	-1.42665775	0.118	0.45	6.12E-08
FAM107B	1.90E-12	-1.27767359	0.167	0.5	6.41E-08
CCT4	2.23E-12	0.71912172	0.995	0.475	7.51E-08
HLA-DMB	3.57E-12	-1.45630498	0.216	0.537	1.20E-07
MYL6	3.59E-12	-0.73137621	1	0.963	1.21E-07
VAMP2	3.65E-12	-1.15253228	0.676	0.75	1.23E-07
TXN	3.69E-12	0.69637884	1	0.588	1.24E-07
CMPK1	4.04E-12	-1.34254759	0.275	0.575	1.36E-07
HBB	7.29E-12	-4.39224849	0.623	0.725	2.46E-07
RPL36A	7.48E-12	-0.70855614	1	0.988	2.52E-07
CD22	7.64E-12	-0.72544336	0.029	0.3	2.57E-07
FHL1	9.58E-12	-1.01297025	0.142	0.462	3.23E-07
FBL	9.89E-12	0.69564655	0.971	0.5	3.33E-07
HIST1H1C	1.10E-11	-1.70559086	0.422	0.662	3.71E-07
IL7R	1.15E-11	-0.85590043	0.02	0.275	3.89E-07
ZCCHC7	1.19E-11	-1.85884185	0.402	0.637	4.02E-07
PAG1	1.21E-11	-1.43165925	0.206	0.525	4.08E-07
NEGR1	1.27E-11	-0.73829616	0	0.212	4.27E-07
IDI1	1.35E-11	-1.50746952	0.613	0.713	4.54E-07
CRIP1	1.77E-11	-1.33834018	0.039	0.312	5.96E-07
H2AFZ	1.90E-11	0.85349012	0.995	0.8	6.42E-07
DUSP1	2.24E-11	-2.00616175	0.725	0.825	7.54E-07
SH3BGRL3	2.50E-11	-1.11019266	0.99	0.938	8.44E-07
UBE2D3	3.16E-11	-0.8193353	0.936	0.9	1.06E-06
FKBP1A	3.20E-11	-0.80102174	0.985	0.912	1.08E-06
PRKCB	3.33E-11	-1.40649619	0.348	0.6	1.12E-06
KLF2	5.45E-11	-1.08716161	0.044	0.312	1.84E-06
SRSF5	5.81E-11	-1.17615494	0.922	0.85	1.96E-06
ID2	7.26E-11	-1.54559605	0.27	0.562	2.45E-06
MT-ND5	7.54E-11	-0.82167222	0.99	0.875	2.54E-06
TUBB4B	7.68E-11	0.88352546	0.907	0.388	2.59E-06
EIF4A2	1.18E-10	-0.89516055	0.995	0.875	3.97E-06

PTTG1	1.23E-10	0.69646669	0.74	0.212	4.15E-06
CD72	1.31E-10	-0.86156189	0.029	0.275	4.41E-06
WASF2	1.70E-10	-1.29317705	0.76	0.738	5.73E-06
PSMB9	3.42E-10	-1.50963258	0.662	0.7	1.15E-05
ZFAND2A	3.43E-10	0.83937831	0.559	0.112	1.16E-05
LTB	3.47E-10	-1.21754309	0.333	0.625	1.17E-05
YPEL5	5.14E-10	-1.41064306	0.5	0.662	1.73E-05
FADS3	6.69E-10	-0.98116255	0.064	0.325	2.26E-05
CD99	7.23E-10	-1.2477182	0.966	0.838	2.44E-05
ARPP21	7.62E-10	-1.15945722	0.025	0.25	2.57E-05
PTPRE	7.92E-10	-1.43681563	0.225	0.5	2.67E-05
TUBA1A	9.34E-10	-1.17952756	0.873	0.825	3.15E-05
TCL1B	9.82E-10	-1.67581771	0	0.175	3.31E-05
HIST1H4C	1.32E-09	2.30340874	0.99	0.512	4.43E-05
BANK1	1.53E-09	-1.16387231	0.137	0.412	5.15E-05
CSRP2	1.87E-09	-0.78492003	0.034	0.262	6.31E-05
RP1-34B20.21	3.13E-09	-1.07669956	0.049	0.288	0.00010556
HIST1H2AC	3.70E-09	-1.56424002	0.25	0.512	0.00012453
IGLC3	4.12E-09	-0.91404415	0	0.162	0.00013879
CENPF	4.43E-09	0.72017278	0.471	0.075	0.0001493
RPL17	5.13E-09	-0.81792147	0.99	0.863	0.0001728
HLA-DOA	5.94E-09	-0.76392547	0.039	0.262	0.0002001
MT-ND6	6.30E-09	-1.79625011	0.26	0.5	0.00021238
YWHAZ	6.65E-09	-0.93298586	0.799	0.775	0.00022391
DDX3Y	1.29E-08	-0.7328441	0.015	0.2	0.00043503
H1FX	1.43E-08	-1.42296503	0.711	0.7	0.00048193
SOX11	1.72E-08	-0.73449916	0	0.15	0.00057822
PDLIM1	1.89E-08	-1.37550522	0.431	0.588	0.00063631
SERINC5	1.98E-08	-1.05842491	0.172	0.425	0.00066865
TOP2A	2.26E-08	0.70205645	0.451	0.075	0.0007623
GIMAP4	2.56E-08	-0.81416008	0.039	0.25	0.00086261
NBEAL1	2.75E-08	-0.71227104	0.877	0.787	0.0009252
TSPAN14	3.22E-08	-1.14377472	0.196	0.438	0.0010859
TSPAN7	3.30E-08	-0.8408827	0.118	0.362	0.0011132
MLXIP	3.66E-08	-1.12856137	0.314	0.525	0.00123229
GADD45B	4.14E-08	-1.37235867	0.299	0.512	0.0013965
NARFL	4.25E-08	-1.07012949	0.279	0.5	0.00143175
TRPM4	5.26E-08	-1.14128431	0.123	0.362	0.00177202
RNASET2	6.43E-08	-1.09922924	0.76	0.725	0.00216659

PTMS	6.95E-08	-0.94893966	0.083	0.312	0.00234264
RP11-356I2.4	7.05E-08	-1.07251024	0.083	0.312	0.0023768
FOSB	7.15E-08	-1.14139083	0.196	0.45	0.00240783
CXCL3	9.03E-08	0.99118983	0.289	0	0.00304412
MS4A3	9.03E-08	0.89466565	0.289	0	0.00304412
PTP4A3	1.20E-07	-1.02778445	0.078	0.3	0.00403034
HSPB1	1.22E-07	0.82565182	0.995	0.825	0.00410982
ERG	1.59E-07	-1.4195823	0.392	0.55	0.00534717
PRSS2	1.74E-07	1.36646557	0.426	0.075	0.0058661
RAC1	2.18E-07	-1.09831715	0.701	0.675	0.00733082
TUSC3	2.48E-07	-0.7086739	0.059	0.262	0.00833992
PNISR	2.85E-07	-0.73547358	0.98	0.863	0.00960363
HIST1H2BG	3.05E-07	-1.17766942	0.162	0.388	0.01027706
UBE2I	3.20E-07	-0.72305325	0.931	0.825	0.01079376
KMT2E	3.45E-07	-0.97476322	0.706	0.688	0.01162153
PSMB10	3.45E-07	-1.04438703	0.495	0.588	0.01162417
JUN	3.47E-07	-1.60485425	0.892	0.812	0.01170213
CIITA	3.51E-07	-0.7667429	0.039	0.225	0.01182587
SUN2	4.02E-07	-0.8285318	0.127	0.35	0.01353427
CFD	5.46E-07	1.03040714	0.26	0	0.01840719
PPDPF	5.64E-07	-0.70177597	0.98	0.838	0.0190045
SOX4	7.09E-07	-1.13242918	0.961	0.825	0.02390115
STMN1	8.08E-07	-0.72312714	1	0.963	0.02720841
NPDC1	9.44E-07	-0.80547705	0.137	0.35	0.03179876
CIRBP	9.73E-07	-0.80792126	0.985	0.825	0.03276793
LINC00426	9.90E-07	-0.84595675	0.059	0.25	0.03337245
WBP1L	9.94E-07	-0.81997814	0.103	0.312	0.03347713
TUBA1B	1.14E-06	0.76637418	1	0.938	0.03835295
CMTM2	1.43E-06	-0.72400371	0.054	0.238	0.04829053
RBM39	1.53E-06	-0.82784966	0.98	0.8	0.05149821
CMTM7	1.69E-06	-1.25391735	0.647	0.625	0.05700415
NMT2	2.21E-06	-0.78285947	0.147	0.35	0.07445438
AZU1	2.33E-06	1.99920832	0.235	0	0.07837006
LPAR6	2.99E-06	-0.93055495	0.147	0.35	0.10067021
FYB	3.13E-06	-1.23511341	0.294	0.462	0.10544639
ABHD3	4.79E-06	-1.13290558	0.23	0.412	0.16145145
MIF	4.88E-06	-0.78180318	0.936	0.8	0.16453027
HACD1	5.12E-06	-1.15688135	0.485	0.55	0.17245789
UBE2C	5.14E-06	0.74323201	0.451	0.15	0.17319812

SSBP2	5.58E-06	-1.30835972	0.608	0.6	0.18797956
MT-ND4L	6.29E-06	-1.00022156	0.745	0.675	0.21197511
BTK	7.11E-06	-0.79298861	0.426	0.537	0.23967983
VAMP5	1.02E-05	-0.96321249	0.725	0.65	0.34389507
PIK3IP1	1.37E-05	-0.72073502	0.069	0.238	0.46191297
HNRNPA0	1.50E-05	-0.84841842	0.975	0.875	0.50628216
sep-15	1.60E-05	-0.93270467	0.863	0.675	0.53841629
FBXW7	1.64E-05	-0.93231193	0.142	0.325	0.55164938
DCK	1.87E-05	-1.23198212	0.559	0.575	0.62888081
PPP1R15A	1.89E-05	-1.28137108	0.686	0.7	0.63756448
CALM1	2.09E-05	-0.84493439	0.975	0.75	0.70263013
C5orf56	2.43E-05	-1.2829305	0.309	0.45	0.81876719
SIAH2	2.51E-05	-0.79134581	0.147	0.325	0.84540313
PSMA6	2.52E-05	-0.81010248	0.348	0.475	0.85020349
PRTN3	2.83E-05	2.78053125	0.191	0	0.954247
GUK1	3.31E-05	-0.89789499	0.868	0.688	1
LST1	3.52E-05	-1.06054109	0.902	0.725	1
FO538757.2	4.57E-05	-0.83512772	0.157	0.325	1
CHD9	4.61E-05	-0.99778341	0.74	0.637	1
ID3	4.87E-05	-0.78917011	0.137	0.325	1
TSPO	5.10E-05	-1.02750308	0.549	0.575	1
ERGIC1	5.14E-05	-1.06906575	0.525	0.55	1
ARF6	5.95E-05	-0.92493297	0.578	0.575	1
TRAM1	7.24E-05	-1.15969655	0.613	0.575	1
EIF4G2	7.25E-05	-0.89889597	0.824	0.675	1
SRP9	9.93E-05	-0.80650128	0.848	0.7	1
KLF6	0.00011971	-1.18430961	0.549	0.588	1
SON	0.00013299	-0.69473505	0.936	0.8	1
JMJD1C	0.00017581	-0.9679195	0.466	0.512	1
SLC27A3	0.00018371	-0.69941552	0.147	0.3	1
TAP1	0.00021522	-0.75037649	0.191	0.338	1
sep-09	0.00026124	-1.09289349	0.559	0.55	1
PET100	0.0002831	-0.85517538	0.765	0.637	1
PSMB8-AS1	0.0003107	-1.11656387	0.275	0.4	1
CD79B	0.00033661	-1.38942857	0.618	0.588	1
SPCS2	0.00051154	-0.82645646	0.877	0.713	1
CPNE2	0.00052936	-0.84853855	0.113	0.25	1
CA1	0.00056971	-0.82336936	0.039	0.15	1

MAP2K2	0.00060521	-0.75182242	0.162	0.3	1
JUNB	0.00066339	-1.02309546	0.574	0.613	1
TGIF1	0.00086695	-0.82428312	0.142	0.275	1
IRF7	0.00096193	-1.02438493	0.245	0.362	1
PPP1R18	0.00102552	-0.69381618	0.843	0.662	1
MGMT	0.00109019	-0.89786056	0.74	0.588	1
UBA7	0.00116401	-0.6971446	0.25	0.362	1
POLR2J3	0.00121979	-1.01449863	0.5	0.5	1
DDAH2	0.00130107	-0.76946544	0.833	0.7	1
PPP3CC	0.00132976	-0.77351353	0.137	0.262	1
SELT	0.00145086	-0.90739168	0.529	0.512	1
GLRX	0.00154396	-0.84543798	0.74	0.625	1
HMHA1	0.00179428	-0.82119428	0.304	0.388	1
CCND3	0.00188107	-1.13719337	0.559	0.525	1
PTOV1	0.0019535	-0.74936896	0.387	0.438	1
IFI16	0.00250822	-0.70398438	0.873	0.7	1
TMEM248	0.00253996	-0.7211568	0.333	0.4	1
NCF4	0.00295866	-0.9370211	0.461	0.462	1
DCLRE1C	0.00307476	-0.72430101	0.24	0.338	1
ING4	0.00311992	-0.77369243	0.534	0.5	1
DAZAP2	0.00364535	-0.87443641	0.721	0.562	1
SSU72	0.00376371	-0.73574484	0.691	0.575	1
ADGRE5	0.00406713	-0.86745528	0.167	0.275	1
IFITM3	0.00408268	-0.83061273	0.417	0.45	1
CARHSP1	0.0041626	-0.72228835	0.691	0.562	1
KLF4	0.00449051	-0.77074571	0.064	0.162	1
GNB2	0.00453285	-0.8493588	0.618	0.537	1
RPS26	0.00483019	-0.87881642	1	0.925	1
YWHAH	0.0049909	-0.76668399	0.667	0.55	1
WSB1	0.00507007	-0.93019508	0.775	0.625	1
HHEX	0.00538447	-0.85639036	0.779	0.613	1
INSR	0.00544439	-0.81737227	0.132	0.238	1
CD47	0.00734356	-0.82301555	0.701	0.575	1
TMEM243	0.00771237	-1.14572361	0.387	0.412	1
CBFA2T3	0.00826363	-0.86725616	0.338	0.388	1
LAT2	0.00843643	-0.94183669	0.623	0.537	1
TRABD	0.00843823	-0.76730042	0.623	0.525	1
NDUFA13	0.00886899	-0.84088228	0.858	0.625	1
STT3B	0.00890902	-0.77980921	0.426	0.438	1

LAMP1	0.00892665	-0.85190008	0.304	0.362	1
BAX	0.01011492	-0.77272047	0.838	0.613	1
GGNBP2	0.01015971	-0.71168702	0.593	0.512	1
ACSS1	0.01385886	-0.73905213	0.363	0.388	1
SNRPN	0.01467879	-0.71454997	0.784	0.588	1
EPC1	0.01624145	-0.83302576	0.578	0.5	1
ATP6V0D1	0.01659768	-0.70068687	0.485	0.45	1
RP11-251M1.1	0.01708845	-0.92736387	0.284	0.338	1
ERV3-1	0.01772762	-0.82864852	0.304	0.35	1
TLE4	0.01790508	-1.07475581	0.348	0.375	1
VPS4B	0.01848832	-0.72203418	0.304	0.35	1
SLC35E3	0.02118936	-0.84491002	0.235	0.3	1
RHOC	0.02127057	-0.71136534	0.304	0.35	1
GABPB1	0.02220632	-0.72314089	0.716	0.562	1
AES	0.02371378	-0.79056139	0.569	0.488	1
TMBIM4	0.02499194	-0.71535744	0.652	0.525	1
ITM2B	0.02793852	-0.72947827	0.951	0.662	1
TMEM170A	0.02802398	-0.69763855	0.358	0.375	1
TGFB1	0.02915392	-0.73822621	0.623	0.512	1
RHOH	0.03252918	-0.69874859	0.471	0.438	1
APBB1IP	0.0328721	-0.86013906	0.632	0.5	1
DDX3X	0.03389616	-0.83957767	0.515	0.45	1
SELL	0.03448182	-0.79271297	0.77	0.4	1
UCP2	0.03576741	-0.72057964	0.681	0.537	1
BTG1	0.04050361	-0.7656533	0.902	0.662	1
GSN	0.04195576	-0.84824575	0.574	0.475	1
MAP1LC3B	0.04795468	-0.94108935	0.657	0.512	1
RBM5	0.05728927	-0.69811097	0.407	0.388	1
ITGB1	0.06549693	-0.72125665	0.422	0.388	1
RNF213	0.06925019	-0.76199771	0.324	0.338	1
UPF2	0.07552816	-0.76708351	0.706	0.525	1
EMP3	0.08360545	-0.76631856	0.75	0.537	1
SLC38A2	0.08404204	-0.71485682	0.485	0.425	1
TAPBP	0.08438167	-0.88898172	0.534	0.45	1
DBN1	0.08847778	-0.72281708	0.319	0.325	1
PBXIP1	0.09305611	-0.83383566	0.338	0.338	1
SLC44A2	0.09499707	-0.69391073	0.162	0.212	1
RBBP6	0.10857899	-0.8252908	0.627	0.475	1

TM9SF3	0.11231464	-0.77673653	0.373	0.35	1
MYADM	0.1162608	-0.89550011	0.495	0.425	1
JUP	0.13258828	-0.80379323	0.608	0.462	1
ELAVL1	0.13452124	-0.95809992	0.613	0.462	1
PCNP	0.13461768	-0.82293234	0.755	0.525	1
ARL2BP	0.13973487	-0.74201883	0.485	0.412	1
EMC10	0.14116208	-0.70087065	0.637	0.462	1
TNRC6B	0.16214536	-0.74269611	0.588	0.45	1
PSMA3-AS1	0.16235771	-0.7106851	0.48	0.4	1
MDM4	0.17147076	-1.08929336	0.5	0.412	1
ABI1	0.18383894	-0.78183445	0.441	0.375	1
CD200	0.1867471	-0.77994165	0.495	0.412	1
TMED2	0.1915758	-0.86352523	0.75	0.512	1
SMARCA4	0.19232085	-0.70260692	0.686	0.5	1
ANKRD28	0.2043612	-0.72510982	0.304	0.3	1
ZMYM2	0.21176087	-0.71368134	0.333	0.312	1
PFKL	0.2916179	-0.73397996	0.716	0.488	1
SMIM3	0.33520989	-0.79756645	0.377	0.325	1
MED10	0.36959331	-0.72164212	0.623	0.438	1
BCL11A	0.41059781	-0.69665441	0.554	0.412	1
TBCC	0.44505391	-0.70850043	0.324	0.288	1
HBD	0.45456797	-1.53055117	0.181	0.188	1
CHMP1B	0.45675324	-0.71574984	0.52	0.388	1
PLSCR1	0.45691956	-0.75238516	0.412	0.262	1
NR3C1	0.54294887	-0.70160456	0.387	0.312	1
DOCK8	0.55989596	-0.72259565	0.412	0.325	1
MYO1G	0.67509891	-0.81752455	0.461	0.35	1
IFI6	0.78667094	-0.9284183	0.328	0.238	1
ANXA1	0.8345106	-1.00613273	0.147	0.138	1
HNRNPH1	0.95106246	-0.69755649	0.863	0.562	1
DUSP6	0.97439031	-0.70083904	0.279	0.225	1

NBM vs LBM HSC/MPP	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
DNTT	2.67E-33	-2.7319352	0.645	1	8.98E-29
RPS4Y2	2.69E-32	-2.50037337	0.024	0.713	9.06E-28
TCL1A	3.52E-32	-3.4761299	0.207	0.875	1.19E-27
NBEAL1	6.43E-31	2.34816306	0.994	0.787	2.17E-26

HLA-DRA	1.08E-30	-1.99758014	0.982	1	3.64E-26
LAPTM5	1.79E-30	-2.25512	0.692	0.988	6.02E-26
RPL12	7.06E-30	1.26063236	1	1	2.38E-25
RPS29	2.27E-29	0.88633114	1	1	7.66E-25
RPS18	3.27E-29	0.98953936	1	1	1.10E-24
RPL37	8.17E-28	1.03489638	1	1	2.75E-23
CD74	1.23E-26	-1.67424905	1	1	4.14E-22
RPL32	4.47E-26	0.78212307	1	1	1.51E-21
RPL36	8.15E-26	0.84088566	1	1	2.75E-21
HINT1	2.24E-25	1.3521147	0.994	0.812	7.54E-21
RPS21	8.07E-25	0.97303505	1	0.95	2.72E-20
ALOX5	1.45E-24	-1.43907747	0.006	0.537	4.89E-20
AC090498.1	3.53E-24	1.40263761	0.988	0.938	1.19E-19
RPLP1	2.39E-23	0.80529841	1	1	8.06E-19
MARCKSL1	3.47E-23	-1.87252189	0.296	0.85	1.17E-18
HLA-C	4.17E-23	-1.58565886	0.917	0.988	1.40E-18
RPL31	4.72E-23	0.87358006	1	1	1.59E-18
RCSD1	6.36E-23	-2.06110311	0.497	0.912	2.14E-18
RPL35	6.87E-23	0.83965156	1	0.988	2.31E-18
RP11-301G19.1	9.71E-23	-2.34338912	0	0.488	3.27E-18
RPS8	1.20E-22	0.79363245	1	1	4.06E-18
TMSB4X	1.45E-22	-1.05825945	1	1	4.89E-18
RPL26	2.22E-22	0.75403455	1	0.988	7.49E-18
SPINK2	2.75E-22	1.92944199	0.893	0.162	9.26E-18
HLA-DPB1	5.61E-22	-1.82619364	0.852	0.975	1.89E-17
CD79A	7.25E-22	-2.33921804	0.16	0.7	2.44E-17
RPS17	7.70E-22	0.81857417	1	1	2.59E-17
CD24	1.11E-21	-2.53464346	0.112	0.65	3.76E-17
CD19	1.15E-21	-1.57665508	0.041	0.55	3.88E-17
CD27	1.23E-21	-1.72863265	0.059	0.588	4.14E-17
RPL34	3.90E-21	0.79295815	1	1	1.31E-16
DPEP1	7.23E-21	-1.3531568	0	0.45	2.44E-16
HLA-DQA2	8.88E-21	-1.34147753	0.006	0.462	2.99E-16
SOCS2	1.05E-20	-1.83069148	0.337	0.85	3.52E-16
GNG7	1.68E-20	-1.55821694	0.166	0.713	5.65E-16
S100A9	2.35E-20	1.76267329	0.663	0	7.90E-16
AC008060.7	2.98E-20	-1.39077384	0	0.438	1.00E-15
BIRC7	1.21E-19	-1.29825919	0	0.425	4.08E-15
LYZ	2.33E-19	1.73075839	0.639	0	7.85E-15
RPL36A	6.95E-19	1.10769095	1	0.988	2.34E-14
LEF1	1.41E-18	-1.73776625	0.071	0.55	4.77E-14

S100A8	2.16E-18	1.93322559	0.615	0	7.27E-14
MME	4.92E-18	-1.65442712	0.024	0.45	1.66E-13
HLA-DQA1	7.35E-18	-1.68766928	0.249	0.713	2.48E-13
ECM1	7.68E-18	-1.040239	0	0.388	2.59E-13
SRGN	8.52E-18	1.95464463	0.775	0.138	2.87E-13
ZFAS1	1.14E-17	1.0309024	0.982	0.7	3.84E-13
SNHG25	1.19E-17	1.74522243	0.781	0.162	4.03E-13
MZB1	1.30E-17	-1.72851404	0.509	0.875	4.39E-13
RPL17	1.41E-17	1.25068837	1	0.863	4.76E-13
HLA-DPA1	2.03E-17	-1.44199954	0.817	0.925	6.84E-13
LINC00958	2.44E-17	-1.33335942	0.018	0.425	8.23E-13
NRN1	3.00E-17	-1.30403089	0	0.375	1.01E-12
CTGF	3.00E-17	-1.28019465	0	0.375	1.01E-12
RPL38	6.11E-17	0.72594874	1	0.975	2.06E-12
MEF2C	6.50E-17	-1.74499867	0.527	0.838	2.19E-12
RP3-380B8.4	1.16E-16	-1.47208789	0	0.362	3.90E-12
HIST1H1C	3.11E-16	-1.70960743	0.195	0.662	1.05E-11
PDLIM1	3.57E-16	-1.59403032	0.148	0.588	1.20E-11
LINC01013	4.43E-16	-1.12540323	0	0.35	1.49E-11
AP005530.2	4.43E-16	-1.15028281	0	0.35	1.49E-11
IGKC	4.58E-16	1.68002959	0.746	0.188	1.54E-11
TRPM4	6.47E-16	-1.22846814	0.006	0.362	2.18E-11
TERF2	7.66E-16	-1.8613042	0.077	0.5	2.58E-11
PRSS57	1.42E-15	1.32369712	0.781	0.162	4.77E-11
UHRF1	1.50E-15	-1.81446213	0.331	0.762	5.05E-11
SDC2	1.68E-15	-1.00194958	0	0.338	5.65E-11
RP11-231E4.2	1.68E-15	-1.07082274	0	0.338	5.65E-11
VPREB3	3.22E-15	-1.9037708	0.101	0.525	1.08E-10
STAG3	3.42E-15	-1.53135275	0.101	0.525	1.15E-10
C1orf228	9.26E-15	-1.42081968	0.509	0.838	3.12E-10
H1F0	1.49E-14	-1.63107432	0.367	0.762	5.01E-10
HPS4	2.07E-14	-1.44764264	0.278	0.688	6.98E-10
NAP1L1	2.17E-14	0.90443468	0.982	0.85	7.30E-10
NPY	2.34E-14	-1.36304903	0	0.312	7.87E-10
PCLO	2.34E-14	-1.03831603	0	0.312	7.87E-10
KIAA0125	2.96E-14	1.66168076	0.663	0.125	9.96E-10
NARFL	3.66E-14	-1.14386451	0.101	0.5	1.23E-09
ZCCHC7	3.80E-14	-1.68870064	0.237	0.637	1.28E-09
ZFP36L1	5.69E-14	-1.44239155	0.178	0.6	1.92E-09
ANKRD28	6.93E-14	1.43246432	0.822	0.3	2.33E-09

ACTB	8.02E-14	-0.77601374	1	1	2.70E-09
SMAD1	8.43E-14	-1.63754215	0.083	0.462	2.84E-09
IDI1	8.56E-14	-1.46022036	0.331	0.713	2.88E-09
MACROD2	8.59E-14	-0.86286254	0	0.3	2.90E-09
HIST1H2AC	1.22E-13	-1.66804589	0.118	0.512	4.10E-09
MYL6	1.29E-13	-0.90683844	0.905	0.963	4.33E-09
UBE2I	2.05E-13	-1.18471815	0.562	0.825	6.90E-09
CFL1	2.09E-13	-0.88981248	0.959	0.988	7.04E-09
PAG1	2.59E-13	-1.36580594	0.124	0.525	8.71E-09
STMN1	3.36E-13	-1.16409211	0.864	0.963	1.13E-08
NGFRAP1	3.78E-13	1.18542578	0.663	0.125	1.27E-08
RPS26	5.40E-13	1.25363114	0.982	0.925	1.82E-08
APLP2	1.50E-12	1.07123427	0.609	0.138	5.05E-08
FADS3	1.61E-12	-0.98281421	0.018	0.325	5.43E-08
H3F3B	1.72E-12	-0.81733064	0.982	1	5.80E-08
KCNN1	1.85E-12	-0.78940899	0.006	0.288	6.25E-08
LGALS1	1.95E-12	1.87725087	0.538	0.062	6.56E-08
PPP4C	2.27E-12	-1.1057174	0.385	0.713	7.66E-08
GNG11	3.77E-12	-1.26256889	0.278	0.65	1.27E-07
ISG20	4.66E-12	-1.29940855	0.166	0.537	1.57E-07
CD52	5.49E-12	-1.20789774	0.852	0.975	1.85E-07
IGLC2	5.82E-12	1.06623967	0.574	0.075	1.96E-07
MGST1	6.27E-12	1.12994133	0.55	0.062	2.11E-07
RP11-620J15.3	7.67E-12	1.11703802	0.704	0.25	2.58E-07
TSPAN14	7.83E-12	-1.11173471	0.089	0.438	2.64E-07
SH3BGRL3	8.50E-12	-1.19454918	0.834	0.938	2.87E-07
CHD7	9.49E-12	-0.70600763	0.012	0.288	3.20E-07
HIST2H2BE	1.03E-11	-1.24117382	0.089	0.45	3.48E-07
HLA-DMA	1.07E-11	-1.18277063	0.58	0.812	3.61E-07
CLIC1	1.32E-11	-1.02855451	0.828	0.887	4.46E-07
EGFL7	1.91E-11	-1.05765547	0.556	0.8	6.44E-07
DBN1	2.49E-11	-0.94629698	0.03	0.325	8.38E-07
GYPC	3.82E-11	1.02479963	0.763	0.3	1.29E-06
FKBP1A	4.55E-11	-0.87564329	0.811	0.912	1.53E-06
CD99	4.59E-11	-1.37357653	0.74	0.838	1.55E-06
CMTM2	5.04E-11	-0.77717026	0	0.238	1.70E-06
PPP1R18	5.14E-11	-1.08376387	0.308	0.662	1.73E-06
TSPAN7	6.98E-11	-0.83582287	0.053	0.362	2.35E-06
ARPP21	8.70E-11	-1.18340019	0.006	0.25	2.93E-06
MGMT	8.80E-11	-1.19294757	0.254	0.588	2.97E-06

SH3GLB2	8.87E-11	-0.94498611	0.053	0.35	2.99E-06
ARHGDIB	9.77E-11	-0.69756242	0.964	0.988	3.29E-06
TAOK3	9.97E-11	1.01610568	0.663	0.25	3.36E-06
MCL1	1.04E-10	0.98910502	0.68	0.212	3.49E-06
CSRP2	1.25E-10	-0.79941222	0.012	0.262	4.21E-06
TUSC3	1.34E-10	-0.74142988	0.012	0.262	4.53E-06
HIST1H2BG	1.35E-10	-1.20726663	0.077	0.388	4.56E-06
MPO	1.38E-10	2.84159547	0.408	0.013	4.64E-06
AVP	1.38E-10	1.68623939	0.509	0.075	4.65E-06
CALM1	1.51E-10	-1.25244761	0.55	0.75	5.10E-06
PTPRE	1.74E-10	-1.31556523	0.16	0.5	5.87E-06
HLA-DRB5	1.76E-10	-1.26565508	0.373	0.7	5.92E-06
EBF1	2.01E-10	-0.89886123	0.047	0.35	6.78E-06
LSP1	2.20E-10	1.05229306	0.544	0.112	7.40E-06
TUBB	2.36E-10	-1.00264534	0.858	0.9	7.95E-06
LPAR6	2.56E-10	-0.96127196	0.053	0.35	8.61E-06
CD44	3.39E-10	0.78625759	0.698	0.2	1.14E-05
PTP4A3	3.39E-10	-1.02195062	0.03	0.3	1.14E-05
GIMAP4	4.68E-10	-0.84139009	0.012	0.25	1.58E-05
UBC	5.09E-10	-0.86782123	0.87	0.938	1.72E-05
ID3	6.06E-10	-0.78278003	0.041	0.325	2.04E-05
AHSP	6.86E-10	1.09448861	0.568	0.138	2.31E-05
CYGB	6.86E-10	-1.03345165	0.018	0.262	2.31E-05
WBP5	7.06E-10	0.90012108	0.444	0.05	2.38E-05
HBD	7.41E-10	0.78071822	0.657	0.188	2.50E-05
HLA-DMB	7.98E-10	-1.20467621	0.213	0.537	2.69E-05
RSL24D1	8.02E-10	0.75825214	0.923	0.613	2.70E-05
CMTM7	8.51E-10	-1.28061192	0.331	0.625	2.87E-05
RP1-34B20.21	8.58E-10	-1.06598188	0.03	0.288	2.89E-05
PSMB9	9.17E-10	-1.24683305	0.462	0.7	3.09E-05
MDK	1.04E-09	-1.40980309	0.314	0.662	3.49E-05
WASF2	1.04E-09	-1.11088839	0.497	0.738	3.51E-05
HOPX	1.16E-09	1.03346734	0.556	0.112	3.91E-05
MALAT1	1.22E-09	-0.70761794	1	0.988	4.11E-05
CXCR4	1.27E-09	-1.49458176	0.533	0.762	4.27E-05
TNFSF13B	1.52E-09	0.79889913	0.444	0.05	5.11E-05
IGLL1	1.76E-09	1.35204328	0.645	0.225	5.93E-05
CST3	1.87E-09	0.9938664	0.609	0.188	6.31E-05
ZNF90	1.98E-09	1.71714045	0.757	0.388	6.67E-05
CD72	2.56E-09	-0.84108385	0.03	0.275	8.63E-05

BANK1	2.80E-09	-1.03949551	0.107	0.412	9.43E-05
C5orf56	3.00E-09	-1.25682561	0.142	0.45	0.00010099
CD200	4.78E-09	-1.08338614	0.118	0.412	0.00016093
CD53	5.02E-09	-0.8959594	0.544	0.8	0.00016908
TCF4	5.12E-09	-0.90497551	0.467	0.75	0.00017241
GSN	5.40E-09	-1.05436424	0.16	0.475	0.00018185
KIAA0226L	6.82E-09	-0.92025883	0.065	0.338	0.00022984
NACA2	7.06E-09	1.2326748	0.609	0.238	0.00023797
MRPL28	7.07E-09	-0.86052164	0.29	0.6	0.0002383
HACD1	7.09E-09	-1.07572403	0.249	0.55	0.00023872
TSC22D4	7.15E-09	-0.92213821	0.225	0.525	0.00024081
PPA1	8.47E-09	0.89318487	0.669	0.3	0.00028527
IGFBP7	1.17E-08	0.85241036	0.538	0.125	0.00039534
AMD1	1.19E-08	0.87327731	0.663	0.262	0.00039959
DONSON	1.25E-08	1.30285079	0.402	0.05	0.00042156
PFKL	1.36E-08	-1.12718088	0.195	0.488	0.00045788
IGHA1	1.45E-08	0.83510585	0.491	0.1	0.0004873
NPR3	1.47E-08	0.87202915	0.396	0.05	0.00049366
CH17-373J23.1	1.49E-08	1.05268328	0.544	0.162	0.00050265
ABHD3	1.58E-08	-1.06951372	0.13	0.412	0.00053208
HBB	1.65E-08	0.90997893	0.846	0.725	0.00055463
NCL	1.69E-08	0.87853241	0.923	0.713	0.00056829
NEIL1	1.74E-08	-0.93703101	0.036	0.275	0.00058775
EIF3F	1.75E-08	-0.81414152	0.775	0.863	0.00058796
HBA2	1.79E-08	0.71504583	0.746	0.425	0.00060353
RNPS1	1.90E-08	-0.81939354	0.544	0.75	0.00064097
VAMP5	2.20E-08	-0.98311738	0.426	0.65	0.00074096
SMIM24	2.56E-08	0.7533845	0.746	0.325	0.00086237
TYROBP	2.99E-08	0.75291605	0.402	0.05	0.00100778
WBP1L	3.18E-08	-0.79153149	0.059	0.312	0.00107128
SLC27A3	3.20E-08	-0.71773981	0.053	0.3	0.00107744
SRSF6	3.92E-08	0.69900765	0.763	0.362	0.00132024
PRMT1	5.66E-08	-1.02172357	0.414	0.65	0.00190633
HBM	6.15E-08	0.99284224	0.485	0.125	0.00207107
HLA-B	6.52E-08	-0.981832	0.994	0.938	0.00219602
BTK	7.24E-08	-0.74257042	0.243	0.537	0.00244105
ERGIC1	7.72E-08	-0.99263531	0.29	0.55	0.00260196
TMED9	8.98E-08	-0.86378773	0.414	0.65	0.00302404
MSI2	9.00E-08	0.80749453	0.675	0.288	0.00303219
IL7R	9.79E-08	-0.79872223	0.047	0.275	0.00329761
sep-09	1.23E-07	-1.08996231	0.278	0.55	0.00414508

FOSB	1.28E-07	0.97767984	0.746	0.45	0.00432123
CAP1	1.34E-07	-0.86961029	0.503	0.688	0.00452519
HLA-DRB1	1.51E-07	-0.81806956	0.917	0.95	0.00508669
TGFB1	1.51E-07	-0.90810799	0.231	0.512	0.00509492
PTPRC	1.54E-07	0.89651	0.509	0.15	0.00518694
MT-ND5	1.59E-07	0.70852767	0.97	0.875	0.0053656
TCL1B	1.66E-07	-1.65228458	0.006	0.175	0.00559019
ECHS1	2.04E-07	-0.904442	0.32	0.562	0.00687272
DDAH2	2.12E-07	-1.0249109	0.497	0.7	0.0071535
FAM107B	2.39E-07	-0.98949169	0.225	0.5	0.00805005
ERG	2.39E-07	-1.14337501	0.302	0.55	0.00806411
ACSS1	2.62E-07	-0.77008473	0.124	0.388	0.00882661
SOX11	2.66E-07	-0.73449916	0	0.15	0.00897652
HNRNPA0	2.77E-07	-0.95535841	0.757	0.875	0.00932008
RP11-251M1.1	2.83E-07	-0.92216047	0.089	0.338	0.00952748
LTB	2.84E-07	-0.80112146	0.367	0.625	0.00955723
HHEX	2.84E-07	-1.04011145	0.367	0.613	0.00955843
KMT2E	3.35E-07	-0.82220915	0.438	0.688	0.01129071
CRIP1	3.51E-07	-1.21988644	0.077	0.312	0.01183568
COPE	3.64E-07	-0.90003803	0.598	0.75	0.01226122
RGS19	3.92E-07	-0.81217361	0.278	0.55	0.01321088
GNA15	4.43E-07	-0.86944542	0.296	0.55	0.0149113
RAB5C	5.04E-07	-0.94630049	0.284	0.525	0.01697665
BEX2	6.20E-07	0.7086484	0.42	0.1	0.02087727
PRKCB	6.25E-07	-0.93900133	0.379	0.6	0.02105805
FYB	6.44E-07	-1.10954633	0.219	0.462	0.02169195
TIPIN	6.88E-07	0.95610733	0.58	0.25	0.02318414
JUND	7.55E-07	0.7256661	0.698	0.312	0.02544157
HLA-DQB1	7.94E-07	-1.06107712	0.657	0.75	0.02675676
PTOV1	8.12E-07	-0.73234089	0.172	0.438	0.0273738
CBFA2T3	8.17E-07	-0.90067311	0.142	0.388	0.02753406
RNASET2	8.24E-07	-0.89643493	0.521	0.725	0.02775466
LRRC75A	8.47E-07	0.82601734	0.302	0.025	0.0285436
HMCES	9.37E-07	-0.69574227	0.077	0.3	0.03156522
LINC00426	1.01E-06	-0.80383235	0.047	0.25	0.03394951
IFI16	1.05E-06	-0.94003856	0.527	0.7	0.03549588
CARHSP1	1.10E-06	-0.8369807	0.343	0.562	0.03719077
ERV3-1	1.13E-06	-0.84896057	0.112	0.35	0.03817148
KIAA0101	1.17E-06	0.97549284	0.609	0.288	0.03950395
CALM3	1.24E-06	-0.90089807	0.544	0.7	0.04165568

GLRX	1.39E-06	-0.89877267	0.391	0.625	0.04672408
TRABD	1.52E-06	-0.81037982	0.278	0.525	0.05118543
JUP	1.52E-06	-0.99432353	0.231	0.462	0.0512302
SSBP2	1.66E-06	-1.01171403	0.391	0.6	0.05580173
ING4	1.87E-06	-0.75602583	0.249	0.5	0.06312718
MRPL33	1.88E-06	0.73904328	0.586	0.275	0.06323162
SMARCB1	1.89E-06	-0.89056091	0.385	0.588	0.06377182
PSME2	1.94E-06	-0.74603593	0.669	0.787	0.0653613
GNB2	2.02E-06	-0.93559105	0.302	0.537	0.06814144
CAT	2.04E-06	0.7054876	0.657	0.338	0.06866584
CMTM3	2.14E-06	-0.84206919	0.213	0.45	0.07224988
NCF4	2.32E-06	-0.87268457	0.219	0.462	0.07814409
CFD	2.42E-06	1.01936096	0.237	0	0.08164111
EIF2S3	2.53E-06	0.71517668	0.651	0.325	0.08512789
RP11-356I2.4	3.27E-06	-0.90215452	0.095	0.312	0.11001923
CD164	3.34E-06	0.73121442	0.87	0.55	0.11258451
TAX1BP3	4.72E-06	-0.69933159	0.101	0.312	0.15887402
SNRPN	5.27E-06	-0.86099235	0.373	0.588	0.17763312
HSPA8	5.49E-06	-0.69893033	0.799	0.875	0.18505636
IER2	5.67E-06	-0.82517547	0.71	0.875	0.19109251
PDLIM7	5.97E-06	-0.73474944	0.059	0.25	0.20114477
SMARCA4	6.01E-06	-0.93266878	0.272	0.5	0.20249327
ECH1	6.41E-06	-0.81103349	0.485	0.637	0.21607222
SERINC5	6.95E-06	-0.82635731	0.195	0.425	0.2343124
UCP2	8.50E-06	-0.89503314	0.337	0.537	0.28638866
GGNBP2	9.16E-06	-0.75671967	0.284	0.512	0.30865198
CPNE2	1.13E-05	-0.85106623	0.065	0.25	0.38039109
PCDH9	1.17E-05	-1.1301105	0.107	0.312	0.39450546
ZNF428	1.26E-05	-0.83090873	0.42	0.6	0.42614965
CCND3	1.34E-05	-1.05229201	0.308	0.525	0.45211104
HLA-E	1.34E-05	-0.69398991	0.781	0.887	0.4522516
AREG	1.48E-05	0.94504118	0.249	0.025	0.49753745
IRF7	1.49E-05	-0.97044424	0.142	0.362	0.50117421
MT-ND6	1.58E-05	-1.33865308	0.343	0.5	0.53325779
SLC35E3	1.63E-05	-0.84379426	0.101	0.3	0.54861971
TSNAX	1.91E-05	-0.77586647	0.13	0.338	0.64292892
CD79B	1.94E-05	-1.27057936	0.402	0.588	0.65332824
GUK1	2.52E-05	-0.79599826	0.538	0.688	0.84805719
XBP1	2.94E-05	-0.8390489	0.627	0.75	0.99017563
FBXW7	3.36E-05	-0.84100092	0.13	0.325	1

SHISA5	3.39E-05	-0.74530779	0.178	0.375	1
TMEM243	3.52E-05	-1.02863103	0.213	0.412	1
PKM	4.19E-05	-0.73719646	0.639	0.75	1
SF3B4	4.29E-05	-0.74366017	0.213	0.425	1
CHD9	4.43E-05	-0.74494707	0.479	0.637	1
EMC10	4.46E-05	-0.76806619	0.284	0.462	1
ARF1	5.03E-05	-0.75788201	0.533	0.65	1
ACO2	5.30E-05	-0.70761533	0.195	0.388	1
MLXIP	5.37E-05	-0.75184503	0.331	0.525	1
HSPB1	7.07E-05	-0.78976995	0.799	0.825	1
H1FX	7.30E-05	-0.96619734	0.604	0.7	1
NUDT1	9.87E-05	-0.94655734	0.385	0.537	1
SNRNP70	9.93E-05	-0.88979299	0.391	0.55	1
TKT	0.0001075	-0.74016353	0.686	0.762	1
ZFP36L2	0.00011338	-0.79228596	0.828	0.912	1
CSNK1D	0.00012249	-0.69675574	0.172	0.362	1
PLIN3	0.00012305	-0.83982828	0.385	0.55	1
RP11-386I14.4	0.00013253	0.84459473	0.467	0.212	1
MYO1G	0.00020718	-0.98209056	0.172	0.35	1
S1PR4	0.00025326	-0.78403047	0.231	0.412	1
PIM3	0.00025849	-0.69539262	0.13	0.3	1
CHCHD10	0.00026596	-0.69424565	0.29	0.462	1
MED10	0.00028245	-0.75675672	0.254	0.438	1
TBCB	0.00028366	-0.76493916	0.408	0.55	1
BAX	0.0003457	-0.71210869	0.479	0.613	1
MLF2	0.00041739	-0.72089438	0.367	0.537	1
IMP3	0.00055342	-0.71023256	0.308	0.462	1
ELANE	0.00056217	1.34373188	0.136	0	1
APBB1IP	0.00060541	-0.79071014	0.385	0.5	1
DCK	0.0006638	-0.76956666	0.462	0.575	1
ID2	0.00086044	-0.74375221	0.385	0.562	1
JMJD1C	0.00086299	-0.71177806	0.367	0.512	1
YBX3	0.00100355	-0.80320798	0.716	0.775	1
AZU1	0.0010304	1.13542447	0.124	0	1
LYRM4	0.00107776	-0.77044453	0.391	0.512	1
MPP1	0.00155224	-0.77337637	0.278	0.412	1
GADD45B	0.00155732	-0.82606813	0.379	0.512	1
FCGRT	0.00159196	-0.76958857	0.296	0.425	1
TPM4	0.001615	-0.73355245	0.491	0.588	1
ANXA11	0.00194341	-0.75632958	0.373	0.5	1

IDH2	0.00209661	-0.71390813	0.568	0.637	1
PBXIP1	0.00289732	-0.70861528	0.201	0.338	1
PRTN3	0.0034073	1.59249622	0.101	0	1
WSB1	0.00350318	-0.75500474	0.485	0.625	1
MAP1LC3B	0.00514051	-0.71835486	0.385	0.512	1
TSC22D3	0.00684096	-1.05859942	0.592	0.625	1
PSMB8-AS1	0.03660926	-0.75694792	0.314	0.4	1
ISG15	0.35571405	-0.71482676	0.32	0.338	1
HIST1H4C	0.37222187	1.19054298	0.633	0.512	1
HBG2	0.59322	0.88406603	0.278	0.2	1

NBM vs FL HSC/MPP	p_val	avg_log2FC	pct.1	pct.2	p_val_adj
HSPA1A	2.00E-63	-3.86939188	0.118	0.985	6.72E-59
HBG2	8.25E-63	-2.86399495	0.278	1	2.78E-58
HSPA1B	3.78E-62	-3.12486307	0.118	0.98	1.28E-57
RPS4Y1	7.04E-61	2.65363522	0.923	0.025	2.37E-56
TPT1	1.77E-58	-1.35782179	1	1	5.95E-54
HMGA1	4.18E-58	-1.78816268	0.775	1	1.41E-53
B2M	1.13E-57	1.79069469	1	1	3.79E-53
HLA-B	1.33E-57	2.51575929	0.994	0.711	4.49E-53
AC090498.1	2.14E-56	2.51460527	0.988	0.995	7.20E-52
NBEAL1	1.65E-55	3.0604341	0.994	0.877	5.55E-51
RPS3	4.71E-55	-0.73566027	1	1	1.59E-50
HSP90AA1	7.30E-55	-2.22457407	0.964	1	2.46E-50
RPL7A	1.36E-54	-0.97260517	1	1	4.57E-50
RPL36A	1.97E-54	1.81624709	1	1	6.65E-50
RPL17	8.21E-54	2.06860984	1	0.99	2.77E-49
EEF1A1	2.63E-53	-0.80289787	1	1	8.87E-49
RPL34	1.02E-52	0.97843083	1	1	3.42E-48
RPSA	1.21E-52	-0.85535661	1	1	4.09E-48
DNAJB1	2.51E-52	-2.36920801	0.343	0.99	8.45E-48
RPL4	1.76E-51	-0.8356874	1	1	5.95E-47
RPS27	6.37E-51	0.70458686	1	1	2.15E-46
XIST	2.16E-50	-1.0024957	0	0.819	7.27E-46
RPL41	2.49E-50	0.80343792	1	1	8.39E-46
EEF1B2	3.40E-50	-1.00956748	0.994	1	1.14E-45
AC104389.1	1.31E-45	-0.92103949	0.012	0.779	4.43E-41
HBG1	4.86E-44	-0.91308183	0.041	0.819	1.64E-39
ENO1	5.00E-44	-1.23210009	0.911	1	1.69E-39

DLK1	1.10E-42	-1.56029082	0.012	0.745	3.71E-38
IGKC	6.81E-42	2.31422858	0.746	0.093	2.30E-37
HBZ	2.85E-41	-0.85399442	0	0.711	9.61E-37
ACTG1	8.66E-41	-1.18818724	0.97	1	2.92E-36
RPL39	9.61E-41	0.82145821	1	1	3.24E-36
NACA	5.21E-40	-0.73080628	1	1	1.76E-35
FOS	9.34E-40	3.58763389	0.888	0.49	3.15E-35
HSPE1	2.32E-39	-1.45487566	0.704	1	7.80E-35
TRH	3.75E-39	-1.01958007	0.053	0.775	1.26E-34
ANKRD28	9.18E-39	2.15757414	0.822	0.304	3.09E-34
MARCKSL1	3.90E-37	-1.24978683	0.296	0.936	1.31E-32
PSMB5	1.36E-36	-1.04220654	0.396	0.98	4.59E-32
HSPD1	1.39E-36	-1.19172106	0.698	1	4.67E-32
GAPDH	3.79E-36	-0.8108658	1	1	1.28E-31
HSPA8	1.01E-35	-1.21808971	0.799	1	3.40E-31
MAGED2	1.27E-35	-1.00221009	0.195	0.926	4.29E-31
MT-ND5	1.87E-35	1.53019989	0.97	0.99	6.29E-31
FOSB	2.84E-35	2.11907067	0.746	0.196	9.56E-31
HBB	2.99E-35	5.30222741	0.846	0.623	1.01E-30
MT-ND3	3.99E-35	1.21402631	1	1	1.34E-30
SLC25A6	7.70E-35	-0.82610557	0.953	1	2.59E-30
NEAT1	1.01E-34	1.76168822	0.817	0.402	3.40E-30
KIAA0125	2.20E-34	2.05130155	0.663	0.074	7.42E-30
RPS26	2.22E-34	2.13244756	0.982	1	7.50E-30
LDHB	2.46E-34	-0.81387281	0.905	1	8.29E-30
S100A9	9.16E-34	1.51848052	0.663	0.093	3.09E-29
IGLC2	1.41E-33	1.42077497	0.574	0.01	4.75E-29
HLA-DQB1	4.12E-33	1.48138234	0.657	0.098	1.39E-28
DNTT	5.84E-33	1.77859537	0.645	0.083	1.97E-28
EIF3F	3.67E-32	-0.86546643	0.775	1	1.24E-27
HSPH1	6.07E-32	-1.10058048	0.201	0.853	2.04E-27
TKT	8.75E-32	-1.00002595	0.686	0.99	2.95E-27
S100A8	9.16E-32	1.71583121	0.615	0.069	3.09E-27
CD33	2.20E-31	-0.73120797	0.101	0.75	7.41E-27
HSPB1	9.46E-31	-1.61542176	0.799	0.995	3.19E-26
TUBB	3.66E-30	-1.14055361	0.858	1	1.23E-25
CCT5	4.88E-30	-0.96676785	0.379	0.941	1.64E-25
MT-ND2	1.28E-29	0.90794314	0.994	1	4.32E-25
HLA-C	1.29E-29	1.26346189	0.917	0.887	4.33E-25
RAN	1.38E-29	-0.95859597	0.763	1	4.65E-25
IGHA1	3.35E-29	1.20413174	0.491	0	1.13E-24

CD74	3.87E-29	1.32500179	1	0.98	1.30E-24
FKBP4	1.11E-28	-0.98433445	0.367	0.926	3.74E-24
PGAM1	1.40E-28	-0.95227264	0.379	0.926	4.71E-24
HBD	3.97E-28	2.31126939	0.657	0.181	1.34E-23
CCT7	4.41E-28	-0.88107203	0.473	0.971	1.49E-23
APEX1	4.59E-28	-0.84805764	0.704	1	1.55E-23
CLTA	5.69E-28	-0.80819278	0.58	0.99	1.92E-23
CCT3	9.05E-28	-0.8682489	0.538	0.99	3.05E-23
SLC25A3	1.27E-27	-0.71064605	0.846	1	4.26E-23
IGHM	1.65E-27	1.28286722	0.592	0.088	5.56E-23
HLA-A	7.79E-27	1.06474277	0.923	0.956	2.62E-22
PHB2	1.27E-26	-0.82372125	0.538	0.985	4.27E-22
EIF1AY	2.97E-26	0.94824869	0.503	0.025	1.00E-21
ATP5A1	2.48E-25	-0.72647654	0.787	1	8.36E-21
SRSF5	2.90E-25	1.08729687	0.905	0.922	9.78E-21
DYNLL1	4.32E-25	-0.84042073	0.728	1	1.45E-20
PRMT1	1.49E-24	-0.80851883	0.414	0.941	5.01E-20
ZNF90	2.17E-24	2.39899799	0.757	0.515	7.31E-20
PSMB1	2.19E-24	-0.75493942	0.592	0.995	7.39E-20
HSPA6	2.34E-24	-1.63678679	0	0.471	7.90E-20
ZFAND2A	4.08E-24	-0.98952594	0.047	0.559	1.37E-19
NME1	8.90E-24	-0.87474413	0.497	0.951	3.00E-19
PARK7	9.79E-24	-0.73759465	0.669	1	3.30E-19
CDK4	1.53E-23	-0.83117904	0.426	0.951	5.15E-19
MDK	3.85E-23	-1.12066104	0.314	0.838	1.30E-18
EGFL7	4.17E-23	-0.86113651	0.556	0.98	1.41E-18
SNRNP70	4.29E-23	-0.6974222	0.391	0.912	1.44E-18
SRSF6	4.32E-23	1.22521708	0.763	0.549	1.45E-18
MIF	7.70E-23	1.14481543	0.888	0.936	2.59E-18
YBX3	8.54E-23	1.30530406	0.716	0.426	2.88E-18
HLA-DRA	1.59E-22	1.10577933	0.982	0.75	5.35E-18
DNAJA1	2.45E-22	-0.84575399	0.527	0.966	8.27E-18
ANXA1	2.54E-22	1.34485271	0.574	0.147	8.54E-18
CH17-373J23.1	4.11E-22	1.54320494	0.544	0.132	1.39E-17
UBB	4.89E-22	-0.73822104	0.982	1	1.65E-17
CACYBP	9.59E-22	-0.8396675	0.515	0.946	3.23E-17
SNRPC	1.41E-21	-0.698385	0.426	0.941	4.74E-17
MRPL18	1.75E-21	-0.71053488	0.355	0.917	5.90E-17
HLA-DRB1	2.14E-21	1.23152932	0.917	0.735	7.22E-17
CCT2	2.45E-21	-0.71990102	0.527	0.985	8.26E-17
TSC22D3	3.12E-21	1.4378772	0.592	0.186	1.05E-16

ILF2	7.24E-21	-0.71840474	0.592	0.99	2.44E-16
RGS10	8.08E-21	-0.84395896	0.503	0.946	2.72E-16
COX5A	2.03E-20	-0.70286813	0.698	1	6.86E-16
HLA-DPA1	3.08E-20	1.26405763	0.817	0.52	1.04E-15
HLA-DPB1	3.81E-20	1.1825242	0.852	0.647	1.28E-15
AKR1C3	8.58E-20	0.85423392	0.414	0.039	2.89E-15
NACA2	2.04E-19	1.34060363	0.609	0.216	6.88E-15
IDH2	1.23E-18	-0.71784159	0.568	0.971	4.16E-14
HNRNPA1L2	1.24E-18	1.05579765	0.781	0.725	4.17E-14
TMSB10	2.83E-18	0.708754	1	1	9.53E-14
PRDX1	4.18E-18	-0.8896347	0.852	0.99	1.41E-13
MCM7	6.80E-18	-0.75269801	0.402	0.873	2.29E-13
AVP	7.01E-18	2.21782755	0.509	0.152	2.36E-13
DDX5	8.04E-18	0.75085083	0.953	0.995	2.71E-13
IFITM1	9.91E-18	0.92109242	0.467	0.103	3.34E-13
CMPK1	3.19E-17	1.04657074	0.586	0.275	1.07E-12
TUBA1B	3.71E-17	-1.04875641	0.917	1	1.25E-12
CA1	6.84E-17	1.09424627	0.367	0.039	2.30E-12
RSL24D1	8.65E-17	0.77675686	0.923	0.975	2.91E-12
STK17B	1.97E-16	1.00692842	0.473	0.127	6.64E-12
MCL1	4.54E-16	1.13398284	0.68	0.466	1.53E-11
CXCR4	5.12E-16	0.95693053	0.533	0.181	1.73E-11
CIRBP	7.24E-16	0.840719	0.911	0.985	2.44E-11
DUSP1	8.14E-16	1.49236598	0.817	0.725	2.74E-11
SRP9	8.21E-16	0.85000268	0.799	0.848	2.77E-11
HLA-DRB5	2.00E-15	1.14787379	0.373	0.054	6.72E-11
NDUFA13	2.87E-15	0.8036964	0.811	0.858	9.66E-11
LSP1	6.48E-15	-0.80967888	0.544	0.931	2.18E-10
IFI44L	1.54E-14	0.83145208	0.32	0.029	5.20E-10
H3F3B	1.64E-14	0.78022371	0.982	0.995	5.52E-10
NDUFB1	1.96E-14	0.77542658	0.899	0.956	6.60E-10
RP11-347P5.1	4.63E-14	0.79304441	0.331	0.044	1.56E-09
UQCRHL	8.56E-14	1.1306583	0.562	0.309	2.88E-09
NME2	8.98E-14	0.88801922	0.544	0.279	3.03E-09
TUBB4B	1.03E-13	-0.85137336	0.491	0.907	3.47E-09
JUND	1.26E-13	1.10367909	0.698	0.583	4.24E-09
KLF2	2.22E-13	0.84153239	0.32	0.044	7.49E-09
MALAT1	5.11E-13	0.75782084	1	1	1.72E-08
HIST1H4C	1.26E-12	-1.11286576	0.633	0.99	4.25E-08
SELL	1.41E-12	1.04580342	0.775	0.77	4.75E-08
PAN3	2.69E-12	0.92787903	0.473	0.206	9.05E-08
PTMS	1.08E-11	0.70895133	0.349	0.083	3.65E-07

TRA2B	1.18E-11	0.72404147	0.811	0.936	3.98E-07
DDX3X	1.56E-11	0.97108824	0.651	0.515	5.26E-07
VAMP2	2.81E-11	0.93572087	0.716	0.676	9.47E-07
UBC	3.29E-11	-0.70598164	0.87	1	1.11E-06
RAC1	5.15E-11	0.88261219	0.686	0.701	1.73E-06
UBE2J1	5.74E-11	0.88080137	0.556	0.353	1.93E-06
CLEC11A	7.93E-11	-0.81793523	0.438	0.843	2.67E-06
KLF4	8.03E-11	0.83928981	0.308	0.064	2.71E-06
CLEC2B	9.52E-11	0.78405204	0.426	0.162	3.21E-06
PRSS2	2.88E-10	-1.27178102	0.107	0.426	9.69E-06
MT-ND4L	3.80E-10	0.89985986	0.698	0.745	1.28E-05
MSI2	5.65E-10	0.92737339	0.675	0.613	1.90E-05
ZFP36L2	7.37E-10	0.85823975	0.828	0.922	2.48E-05
ATP5EP2	1.30E-09	0.78374096	0.361	0.132	4.40E-05
STT3B	1.71E-09	0.76031251	0.562	0.426	5.75E-05
IDS	2.17E-09	0.88871301	0.45	0.23	7.32E-05
IFI6	2.72E-09	1.17294914	0.503	0.328	9.18E-05
ITM2B	2.93E-09	0.73062488	0.834	0.951	9.86E-05
NPDC1	2.98E-09	0.71552265	0.367	0.137	0.00010031
CXCL3	1.09E-08	-0.81610353	0.053	0.289	0.00036624
HLA-E	1.64E-08	0.86396228	0.781	0.912	0.00055226
CDC42	2.49E-08	0.72063305	0.811	0.917	0.00083817
SNHG9	3.26E-08	0.80386982	0.568	0.49	0.00109731
ARF6	3.87E-08	0.85457928	0.621	0.578	0.00130306
CBX3	4.58E-08	0.70456389	0.817	0.941	0.00154351
HNRNPH1	4.72E-08	1.13665932	0.751	0.863	0.00159127
JCHAIN	6.73E-08	0.7274806	0.373	0.132	0.00226906
TRAM1	7.09E-08	0.78697716	0.615	0.613	0.00238798
TMED2	8.12E-08	0.83885724	0.686	0.75	0.00273732
TIPIN	1.33E-07	1.02842929	0.58	0.529	0.0044815
EGR1	1.34E-07	1.00678888	0.467	0.275	0.00449874
YPEL5	1.45E-07	0.92742855	0.58	0.5	0.00490183
KLF6	1.53E-07	0.93742896	0.651	0.549	0.00515097
SBDS	1.74E-07	0.86841732	0.586	0.564	0.00585713
ETV6	2.22E-07	0.69451287	0.485	0.353	0.00747305
RP11-386I14.4	2.38E-07	1.17221844	0.467	0.328	0.00803483
IFITM3	2.85E-07	0.85623005	0.533	0.417	0.00959409
PPP1CB	2.85E-07	0.82074163	0.645	0.627	0.00959431
SRGN	4.92E-07	0.83718275	0.775	0.912	0.01658293
CDK6	5.89E-07	0.92214346	0.675	0.804	0.01985224
ARL4A	8.38E-07	0.7331944	0.402	0.255	0.02823042
ELANE	1.03E-06	1.33530494	0.136	0.01	0.0346418

TMEM107	1.15E-06	0.79575494	0.402	0.25	0.03866848
JUNB	1.38E-06	0.87930906	0.675	0.574	0.04637544
AMD1	1.95E-06	0.74921215	0.663	0.711	0.06566237
IER2	2.27E-06	0.83958312	0.71	0.716	0.07649848
RP11-255M2.3	2.69E-06	0.73140298	0.402	0.24	0.09061265
ATF7IP2	6.42E-06	0.78055882	0.497	0.407	0.21636056
TUBA1A	6.44E-06	0.71089003	0.811	0.873	0.21713042
EPSTI1	7.46E-06	0.779171	0.467	0.368	0.25137041
CD52	9.62E-06	0.71360191	0.852	0.824	0.3239867
PTPRC	1.04E-05	0.87690092	0.509	0.431	0.3490673
SNHG25	1.17E-05	0.97298325	0.781	0.848	0.39538502
BCL11A	1.36E-05	0.75166405	0.562	0.554	0.45883221
JUN	2.01E-05	0.95301732	0.811	0.892	0.67591923
MYB	4.14E-05	0.73942392	0.598	0.667	1
PTP4A2	9.11E-05	0.89353166	0.586	0.657	1
CRHBP	0.00011304	0.84583477	0.296	0.172	1
ID2	0.0001213	0.80184383	0.385	0.27	1
HBA1	0.00013555	1.61900054	0.74	1	1
HBA2	0.00018007	1.7502964	0.746	1	1
ARL6IP1	0.00329937	0.69453692	0.627	0.735	1
ID1	0.00459872	0.80217346	0.243	0.152	1
AZU1	0.0087101	-0.86378385	0.124	0.235	1
PRTN3	0.01581167	-1.18803503	0.101	0.191	1