

EXPRESIA DIFERENȚIATĂ A GENELOR EVIDENȚIAZĂ PROCESE BIOLOGICE DISTINCTE ÎN CELULELE STEM HEMATOPOIETICE PROVENITE DIN SURSE DIFERITE

Valentina Stratan – dr. biol., conf. cercet.,
Nacu N., Munteanu Viorel cercet. șt.,
Țuțuianu Valeriu cercet. șt.*, Lozovanu Ana cercet. șt.

Rezumat

Transplantul de celule stem hematopoietice (CSH) este un act medical prin care sunt transferate prin perfuzia intra-venoasă celule stem autoloage sau alogene colectate din măduva osoasă, din sângele periferic sau sângele din cordonul ombilical. Transplantul CSH reprezintă o opțiune de tratament pentru numeroase afecțiuni maligne, aici incluse leucemiile maligne acute și cronice, leucemia limfoblastică acută, limfoamele Hodgkin și non-Hodgkin și altele, pentru recompensarea funcțiilor diminuate sau pierdute a măduvei osoase de a produce CSH în urma chimio- și/sau radio-terapiilor. Pentru a explora potențialul de utilizare a CSH, în contextul medicinei regenerative și a terapiei celulare, ne-am propus să determinăm identitatea moleculară prin determinarea genelor cu expresie diferențiată (GED) în CSH din măduva osoasă (MO), cordonul ombilical (CO) și sângele periferic (SP).

Cuvinte cheie: transplant, celule stem hematopoietice, leucemii, limfoame, măduva osoasă, cordon ombilical, sânge periferic, tratament.

Summary: Differential gene expression reveals distinct biological processes in hematopoietic stem cells from different sources

Hematopoietic stem cell transplantation is a medical act by which autologous or allogeneic stem cells are transferred by intravenous perfusion collected from bone marrow, peripheral blood or umbilical cord blood. Hematopoietic stem cell transplantation is a treatment option for many malignancies, including acute and chronic malignant leukemia, acute lymphoblastic leukemia, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas, and others, to reward the diminished or lost bone marrow function to produce hematopoietic stem cells following chemistry and / or radio-therapies. To explore the potential of hematopoietic stem cells in the context of regenerative medicine and cell therapy, we intend to determine molecular identity by determining differentiated expression genes in bone marrow stem cells, umbilical cord blood, and peripheral blood.

Key words: transplant, hematopoietic stem cells, leukemias, lymphomas, bone marrow, umbilical cord, peripheral blood, treatment

Резюме: Дифференцированная экспрессия генов выявляет различные биологические процессы в гемопоэтических стволовых клетках из разных источников.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток является медицинским действием, посредством которо-

го аутологичные или аллогенные стволовые клетки переносятся внутривенным вливанием, собранным из костного мозга, периферической крови или пуповинной крови. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток является вариантом лечения многих злокачественных новообразований, включая острый и хронический злокачественный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, лимфому Ходжкина и неходжкинскую и др., Чтобы вознаградить ослабленную или потерянную функцию костного мозга для продуцирования гемопоэтических стволовых клеток после хими и / или радиотерапии. Чтобы исследовать потенциал гемопоэтических стволовых клеток в контексте регенеративной медицины и клеточной терапии, мы намерены определить молекулярную идентичность путем определения дифференцированных экспрессирующих генов в стволовых клетках костного мозга, пуповинной крови и периферической крови.

Ключевые слова: трансплантация, гемопоэтические стволовые клетки, лейкозы, лимфомы, костный мозг, пуповина, периферическая кровь, лечение

Introducere

Transplantul de celule stem obținute din sângele periferic, măduva osoasă și sângele ombilical poate fi utilizat pentru tratamentul leucemiilor. Acesta este mai des utilizat pentru cancerul care afectează sistemul sanguin sau sistemul imun, precum leucemiile, limfoamele și mielomele multiple. CSH reprezintă celule sanguine imature din măduva osoasă și sângele periferic și sunt capabile să diferențieze în toate tipurile de celule sanguine. Pacienții cu unele tipuri de cancer pot fi deseori ajutați prin transplant de celule stem pentru a trata sau vindeca cancerul. Transplantul de CSH este utilizat pentru a recompensa funcțiile diminuate sau pierdute a măduvei osoase de a produce celulele stem hematopoietice în urma evoluției progresiei cancerului sau în decursul chimio- și/sau radio-terapiilor [1,2,3].

Transplantul de celule stem poate fi de 3 tipuri: (I) autolog - implică utilizarea celulelor stem proprii ale unei persoane; (II) alogen - implică utilizarea celulelor stem prelevate și apoi cultivate de la un donator; și (III) singeneic - bolnavul primește celule stem de la un geaman identic. Adesea, o rudă compatibilă este cea mai bună alegere, dar compatibilitate genetică pot fi găsite și de la un registru al donatorilor [4,5,6].

Transplanturile de celule stem sunt utilizate pentru a repopula nișa de celule stem din măduva osoasă distrusă în urma patologiei, chemoterapiei sau radio-terapii. În dependență de sursa celulelor stem, transplantul poate fi: (I) transplant de celule stem din măduva osoasă; (II) transplant de celule stem din sângele periferic; (III) transplant de celule stem din cordul ombilico-placentar [1,5,7].

Materiale și metode

Cultivarea celulelor stem hematopoietice (CSH).

Probele proaspăt colectate, de sânge ombilical, aspirat din măduva osoasă și sânge periferic, au fost stocate pe gheață și diluate cu D-PBS (Dulbecco's phosphate – buffer saline) ce conține 2mM EDTA. Izolarea fracției mononucleare de celule s-a efectuat prin centrifugarea în gradient de densitate, cu utilizarea soluției Ficoll Hypaque – Plus (GE Healthcare). Celulele mononucleare proaspăt izolate au fost sus-

pendate în mediu DMEM – LG (Dulbecco's modified Eagle's medium – low glucose) (Wako) ce conține 10% de ser fetal bovin (Hyclone Laboratories, Inc.) și 1% penicilină/streptomycină (Life Technologies) și apoi însemănțate în vase de cultură T-75 cu densitatea de $8.0 - 10 \times 10^5$ celule/cm². Culturile au fost incubate la 37°C la 5% CO₂ timp de 5 zile.

Izolarea ARN-ului, prepararea bibliotecilor ADNc și secvențierea

ARN-ul din celulele stem a fost izolat utilizând kit-ul de izolare RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Invitrogen) cu cuantificarea lui ulterioară prin metoda fluorometrică utilizând instrumentul Qubit 3.0 Fluorometer și kit-ul Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen). S-au utilizat câte 10 ng de ARN pentru prepararea bibliotecilor genomice ADNc (Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit, Ion Torrent). AmpliSeq este conceput pentru a crea un profil cu o capacitate de >20000 secvențe ARN distincte folosind o metodă de amplificare extrem de multiplexată. Fiecare amplicon reprezintă o genă vizată unică. Dimensiunea medie a fiecărui amplicon este de ~150 bp. Pentru prepararea bibliotecilor, a fost utilizat inițial kit-ul SuperScript VILO™ cDNA Synthesis kit, apoi ADNc este amplificat folosind tehnologia Ion AmpliSeq pentru a menține cu exactitate nivelurile de expresie ale tuturor genelor de interes. Bibliotecile ADNc amplificate au fost cuantificate utilizând kit-ul Qubit dsDNA HS Assay Kit (In-

Tabelul 1.

Sumarul rezultatelor testului de expresie diferențiată a genelor

	MO – CO	MO - SP	CO – SP
Numărul total GED	181	177	40
GED mărită	59	60	22
GED micșorată	122	117	18
FT expresia mărită	8	8	4
FT expresia micșorată	39	33	5
Markeri de diferențiere	4	1	2
Markeri de pluripotență	4	4	1

Tabelul 2.

Termenii GO pentru GED în MO, CO și SP

Cele mai reprezentative procese biologice care includ GED în contrastul MO - CO			
Micșorarea expresiei		Mărirea expresiei	
Termen GO	Procesul Biologic	Termen GO	Procesul Biologic
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
GO:0008380	RNA splicing	GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay
GO:0006334	nucleosome assembly	GO:0006413	translational initiation
GO:0009725	response to hormone	GO:0006508	Proteolysis
GO:0000122	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	GO:0022617	extracellular matrix disassembly
GO:0050821	protein stabilization	GO:0008284	positive regulation of cell proliferation
GO:0098609	cell-cell adhesion	GO:0000082	G1/S transition of mitotic cell cycle
GO:0006351	transcription, DNA-templated	GO:0006955	immune response
GO:0001649	osteoblast differentiation	GO:0006364	rRNA processing
GO:0050900	leukocyte migration	GO:0000028	ribosomal small subunit assembly
Cele mai reprezentative procese biologice care includ GED în contrastul MO - SP			
Micșorarea expresiei		Mărirea expresiei	
Termen GO	Procesul Biologic	Termen GO	Procesul Biologic
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	GO:0045653	negative regulation of megakaryocyte differentiation
GO:0050821	protein stabilization	GO:0016233	telomere capping
GO:0006338	chromatin remodeling	GO:0006336	DNA replication-independent nucleosome assembly
GO:0043065	positive regulation of apoptotic process	GO:0000183	chromatin silencing at rDNA
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated	GO:0034080	CENP-A containing nucleosome assembly
GO:0098609	cell-cell adhesion	GO:1904837	beta-catenin-TCF complex assembly
GO:0006405	RNA export from nucleus	GO:0045814	negative regulation of gene expression, epigenetic
GO:0017148	negative regulation of translation	GO:0045815	positive regulation of gene expression, epigenetic
GO:0016925	protein sumoylation	GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
GO:0048010	vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	GO:0022617	extracellular matrix disassembly
GO:0032212	positive regulation of telomere maintenance via telomerase	GO:0007184	SMAD protein import into nucleus
Cele mai reprezentative procese biologice care includ GED în contrastul CO - SP			
Micșorarea expresiei		Mărirea expresiei	
Termen GO	Procesul Biologic	Termen GO	Procesul Biologic
GO:0050821	protein stabilization	GO:0006342	chromatin silencing
GO:2001022	positive regulation of response to DNA damage stimulus	GO:0002125	maternal aggressive behavior
GO:0051131	chaperone-mediated protein complex assembly	GO:0006334	nucleosome assembly
GO:0042744	hydrogen peroxide catabolic process	GO:0007204	positive regulation of cytosolic calcium ion concentration
GO:0010942	positive regulation of cell death	GO:0050852	T cell receptor signaling pathway
GO:0051973	positive regulation of telomerase activity	GO:0070371	ERK1 and ERK2 cascade
GO:0015671	oxygen transport	GO:0002227	innate immune response in mucosa
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	GO:0071392	cellular response to estradiol stimulus
GO:0051291	protein heterooligomerization	GO:0019731	antibacterial humoral response
GO:0098869	cellular oxidant detoxification	GO:0071277	cellular response to calcium ion
GO:0015701	bicarbonate transport	GO:0035690	cellular response to drug

vitrogen). Bibliotecile au fost apoi diluate la 100 pM și amplificate utilizând emPCR la instrumentul Ion One Touch 2 System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) și îmbogățit în conformitate cu instrucțiunile producătorului la instrumentul Ion ES System. Secvențierea bibliotecilor genomice a fost realizată utilizând platforma de secvențiere Ion PGM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) în complex cu kit-ul Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 (Ion Torrent) și chip-ul Ion 318 Chip Kit v2 (Ion Torrent).

Analiza bioinformatică a datelor

Analiza rezultatelor de secvențiere a fost efectuată cu utilizarea Torrent Suite™ Software în cinci etape: (1) planificarea experienței de secvențiere; (2) monitorizarea secvențierii; (3) explorarea statisticilor datelor brute; (4) exportul datelor. Testele de expresie diferențiată au fost efectuate cu Deseq din R/Bioconductor [8,9]. Genele cu expresia diferențiată au fost selectate cu utilizarea p-value ajustat la testul multiplu. Determinarea ontologiilor genelor pentru procesele biologice a fost efectuată cu aplicarea testului hipergeometric și utilizarea instrumentului DAVID [10].

Rezultate și discuții

Rezultatele analizelor sunt sumate în tabelul 1, iar sumarul de expresie pentru fiecare contrast specific este prezentat în figurile 1-3 și adnotarea pentru procesele biologice (PB) în tabelele 1-3. Rezultatele obținute demonstrează diferențele moleculare la nivel de expresie a genelor în CSH din cele trei surse a organismului uman (MO, SP și CO). După numărul de GED, CHS-SP și CSH-CO prezintă diferențe majore cu CHS-MO (177 și respectiv 181 GED) și un număr mai mic de gene între ele (40 GED). Rezultatele mai indică la fel că în determinarea acestor paterne de expresie diferențiată se pot afla factori de transcripție specifici: 47 pentru condiția MO-CO, 41 pentru MO-SP și numai nouă pentru contrastul CO-SP. În continuare este prevăzută analiza detaliată a listelor de gene obținute pentru căile de semnalizare, funcțiile moleculare ale genelor și caracteristica ulterioară în baza rezultatelor a fiecărei surse de CSH.

Din analiza profilelor de expresie ale genelor din celulele stem hematopoietice din SP, MO, CO, se observă că numărul de gene cu o expresie diferențiată este mic: (i) pentru condiția MO-CO 181 gene, (II) MO-SP 177 gene și (II) CO-SP 40 gene, ceea ce indică că celulele stem indiferent de sursă își păstrează pluripotența, expresând un număr neînsemnat de gene asociate cu programele de diferențiere. Rezultatele testelor de expresie diferențiată a genelor indică faptul că celulele stem hematopoietice din măduva osoasă (CSH-MO) dețin cea mai mare capacitate de diferențiere, aceste celule au expresia mărită a genelor care

codifică proteinele responsabile de următoarele procese biologice specifice celulelor stem pluripotenete: (1) asamblare nucleosomului, (2) reglarea negativă a transcripției, (3) adeziunea celulă-celulă, procese care sunt asociate cu păstrarea pluripotenței și repressia programelor transcripționale care pot duce la diferențieri celulare. Paternele de expresie a genelor în celulele stem hematopoietice din cordonul ombilical indică procese biologice active asemănătoare celor din celulele stem hematopoietice din sângele periferic. Gradul mai pronunțat de pierdere a pluripotenței se explică prin expresia mărită a genelor care asigură următoarele procese biologice: (1) reglarea pozitivă a expresiei genelor, (2) dezasamblarea matricei extracelulare la celulele stem din sângele periferic. Totuși activitatea pluripotentă este prezentă prin activitatea pozitivă a telomerazei.

Bibliografie

1. Drenka T et al. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Peripheral Blood and Umbilical Cord Wharton's Jelly (2013) *Srp Arh Celok Lek* 141:178-186
2. Juhyun Oh1, Yang David Lee, and Amy J Wagers1 Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities National Institute of Health 2014 doi:10.1038/nm.3651.
3. Richard E et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation, European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), *BLOOD*, 15 JUNE 2000 x VOLUME 95, NUMBER 1
3. Takanse Y et al. Isolation and Storage of Peripheral Blood Haematopoietic Stem Cells for Autotransplantation into Children with Cancer (1989) *Blood* 74:1245-1251
4. Ruzanna A K et al. Molecular characterisation of human peripheral blood stem cells (2012) *S Afr J Sci* 108 (5/6) 939
5. William I B. Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Patients with Advanced Haematologic Malignancies: A Retrospective Comparison with Marrow Transplantation (1996) *Blood* 88:2794-2800
6. Holtick U et al. Bone marrow versus peripheral blood allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for haematological malignancies in adults (2014) *The Cochrane library*, Issue 4, John & Sons, Ltd.
7. Boujtia N. Separation of PBMCs from Blood Samples Using New ThermoScientific Benchtop 1-Liter Centrifuge. Application Note: ANCFGGP1PM
8. Anders S and Huber W (2010). "Differential expression analysis for sequence count data." *Genome Biology*, **11**, pp. R106.
9. R. Ihaka and R. Gentleman (1996), R: A Language for Data Analysis and Graphics, *Journal of Computational and Graphical Statistics*, Vol 5, No 3, 299-314
10. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Collins JR, Alvord WG, Roayaei J, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA (2007). „The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists”. *Genome Biol.* **8** (9): R183