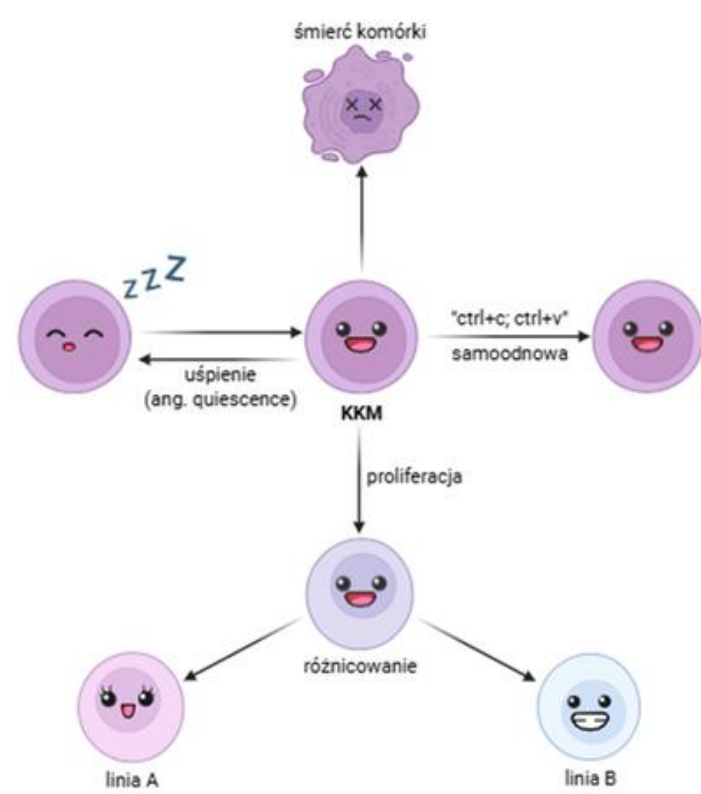


Transkryptom krwiotwórczych komórek macierzystych pod kątem sygnałowania purynergicznego z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji

Małgorzata Sitek

Praca magisterska wykonana w Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej, Centrum Badań Przedklinicznych WUM
Promotor pracy: dr Justyna Jarczak

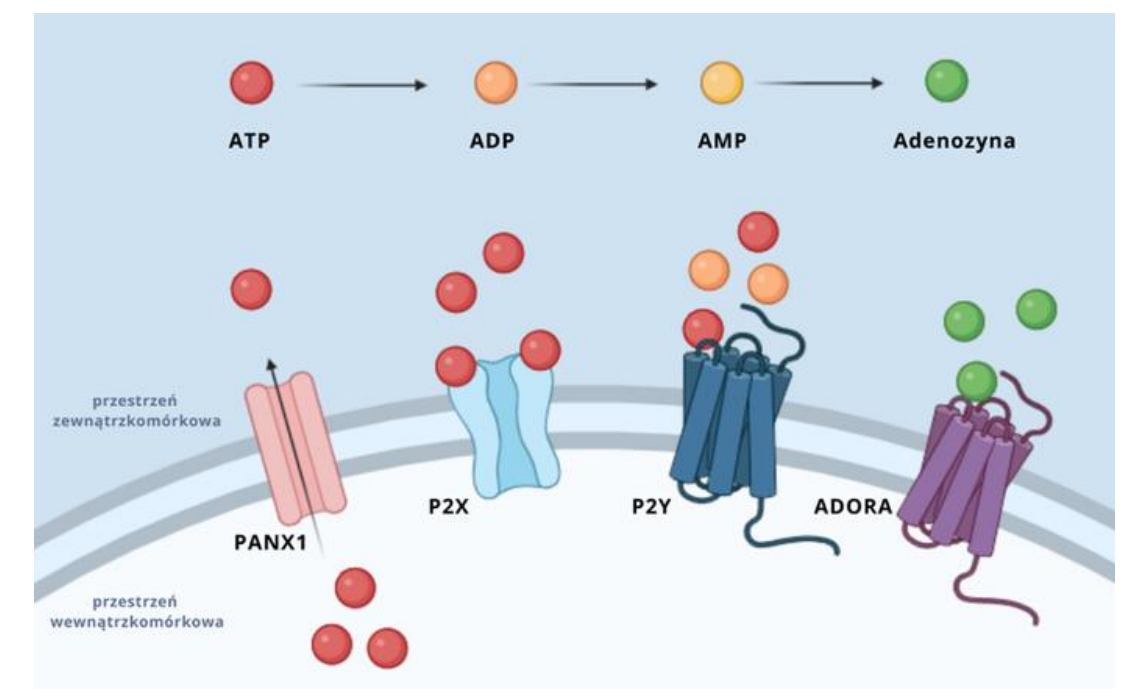
WSTĘP



Rycina 1. Zdolności funkcjonalne komórek macierzystych: samoodnowa, pozwalająca na utrzymanie puli komórek macierzystych oraz różnicowanie w kierunku wyspecjalizowanych komórek potomnych.

Krwiotwórcze komórki macierzyste (KMK) stanowią podstawę hematopoezy, zapewniając stałą produkcję komórek krwi dzięki zdolności do samoodnowy i różnicowania (Rycina 1). Ich aktywność jest ściśle regulowana przez mikrośrodowisko szpiku kostnego, a zaburzenia tej kontroli mogą prowadzić do rozwoju chorób hematologicznych.

Jednym z potencjalnych mechanizmów regulacyjnych jest sygnałowanie purynergiczne, oparte na działaniu **nukleotydów (ATP, ADP)** i **adenozyny** poprzez **receptory P2X, P2Y** oraz **ADORA** (Rycina 2.). Zastosowanie **sekwencjonowania następnej generacji (NGS) "single-cell" (scRNA-seq)** umożliwia analizę transkryptomu KMK z rozdzielczością pojedynczej komórki oraz identyfikację aktywnych szlaków sygnałowych. Zrozumienie roli sygnałowania purynergicznego w KMK może dostarczyć nowych informacji na temat regulacji hematopoezy i potencjalnych celów terapeutycznych.



Rycina 2. Uproszczony schemat cząsteczek biologicznych będących ligandami dla receptorów purynergicznym

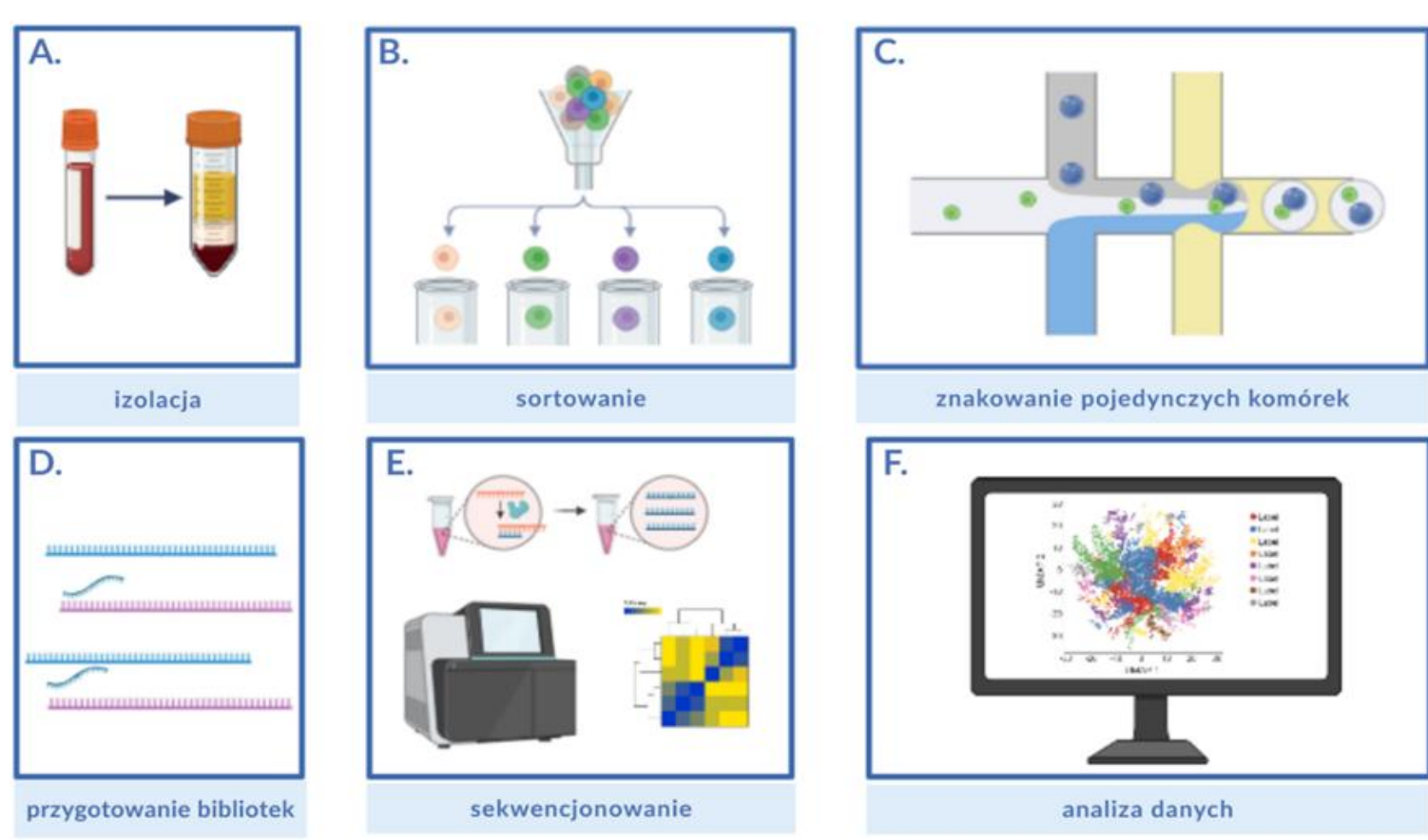
CEL PRACY

Celem pracy jest charakterystyka transkryptomu krwiotwórczych komórek macierzystych $CD34^{lin^-}CD45^+$ z podziałem na subpopulacje oraz ocena ekspresji genów receptorów zaangażowanych w sygnałowanie purynergiczne.

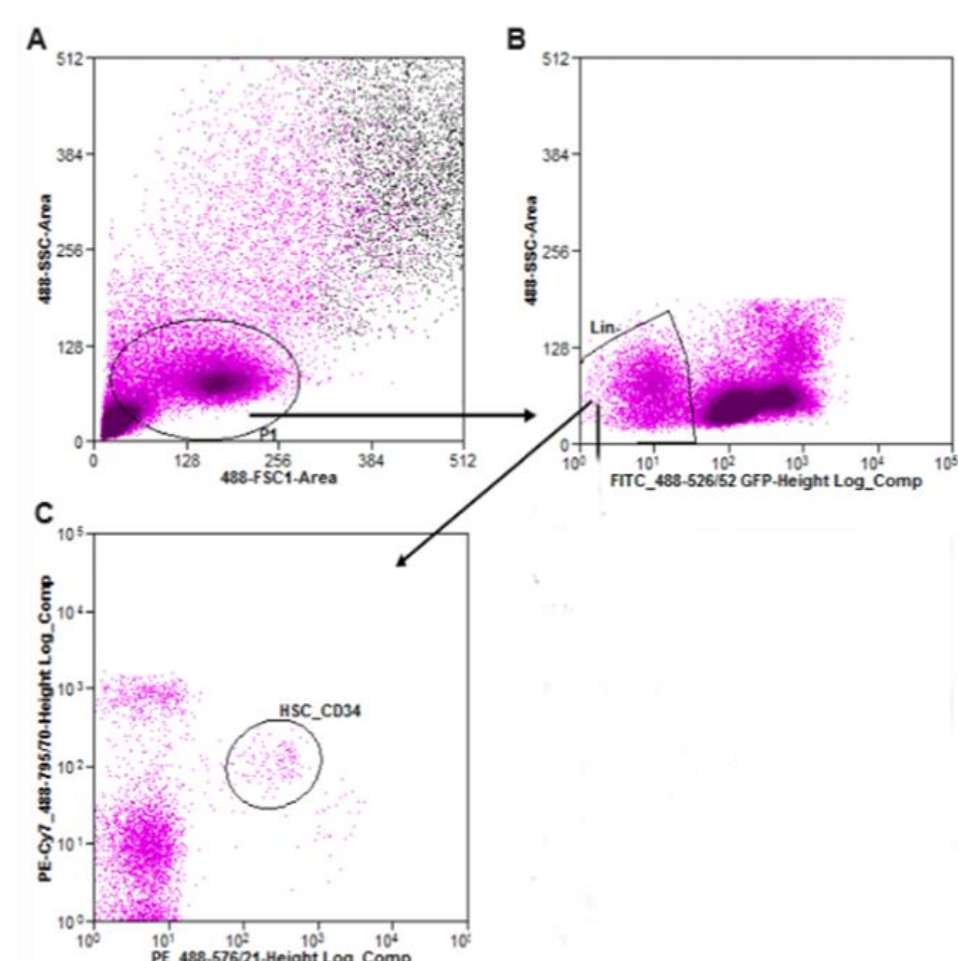
MATERIAŁY I METODY

Materiał: ludzka krew pępowinowa
Eksperyment przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej WUM (KB/3/2018) oraz zgodnie z Deklaracją Helsińską.

Izolacja komórek:



Rycina 3. Schemat przebiegu eksperymentu, w którym wyróżniono następujące etapy: izolacja komórek z krwi pępowinowej (A), sortowanie KMK o fenotypie $CD34^{lin^-}CD45^+$ (B), znakowanie komórek (C), przygotowywanie bibliotek (D), sekwencjonowanie NGS typu "single-cell" (E) oraz analiza danych (F).



Rycina 4. Strategia sortowania krwiotwórczych komórek macierzystych o fenotypie $CD34^{lin^-}CD45^+$ z jednojądrzastych komórek pozyskanych z ludzkiej krwi pępowinowej.

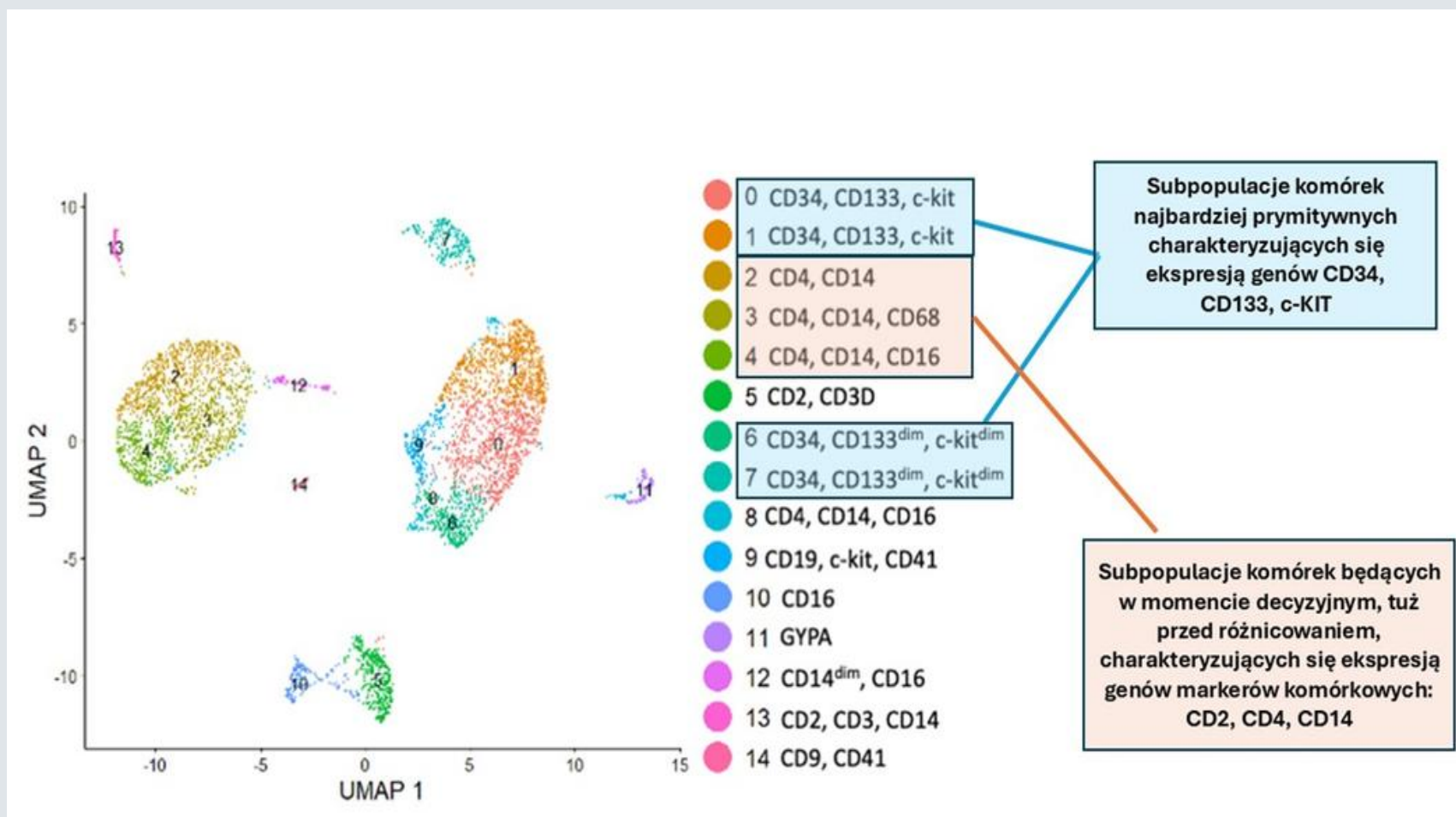
Sekwencjonowanie pojedynczych komórek

- scRNA-seq (10x Genomics, Chromium X)
- Sekwencjonowanie: Illumina NextSeq 1000/2000 (odczyty paired-end)
- ~25 000 odczytów/komórkę

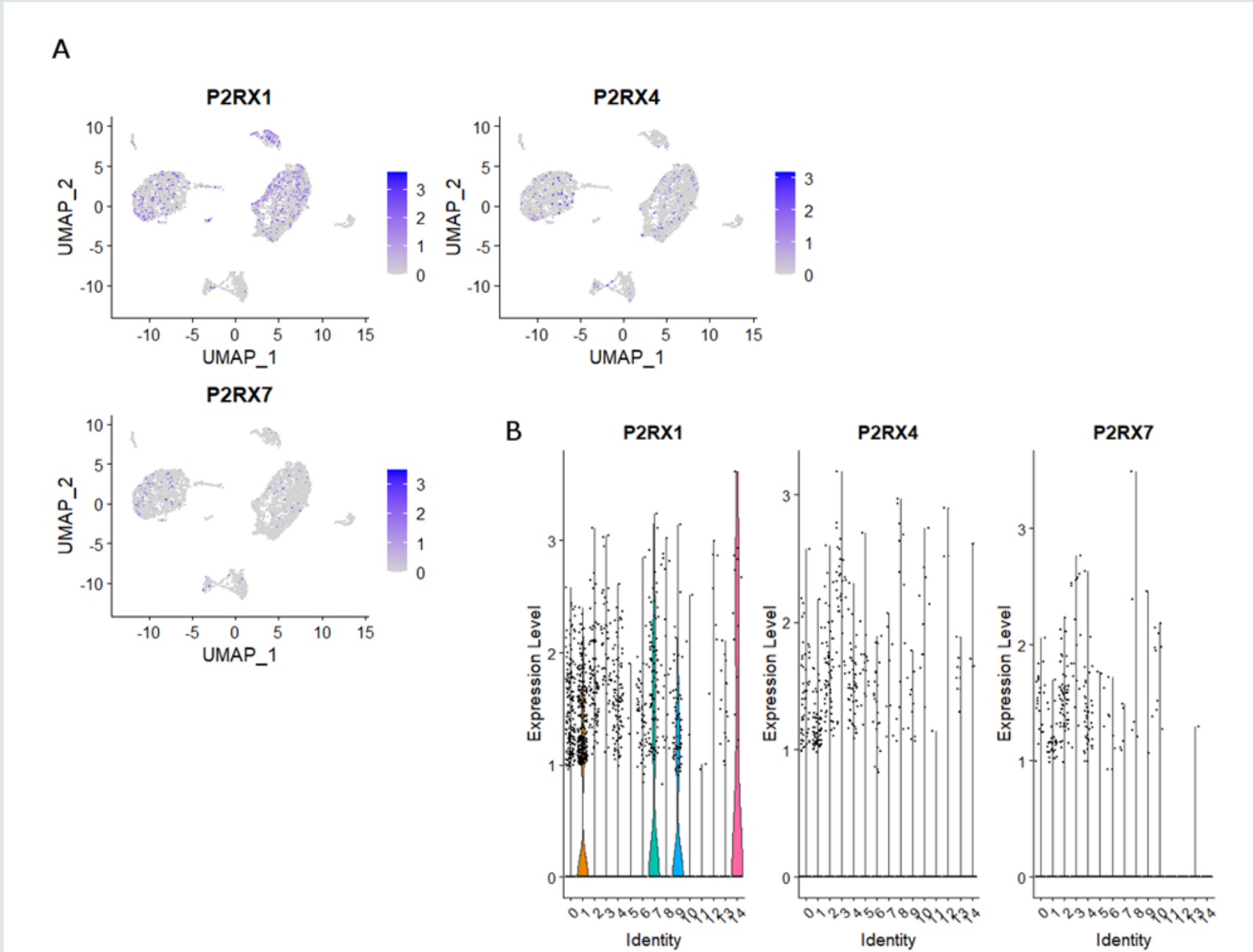
Analiza bioinformatyczna

1. Mapowanie odczytów do GRCh38 (Cell Ranger)
2. Kontrola jakości
 - wyłączenie z analiz komórek z liczbą transkryptów <200 oraz >2500
 - odrzucenie komórek posiadających >5% mitochondrialnych transkryptów
3. Normalizacja danych (LogNormalize)
4. Wybór 2000 genów o najbardziej zróżnicowanej ekspresji
5. Klasteryzacja i wizualizacja danych (Seurat – analiza UMAP)
6. Wybór genów różnicujących ($p < 0,05$; $\log_2FC > 1$)
7. Analiza szlaków biologicznych: baza Reactome

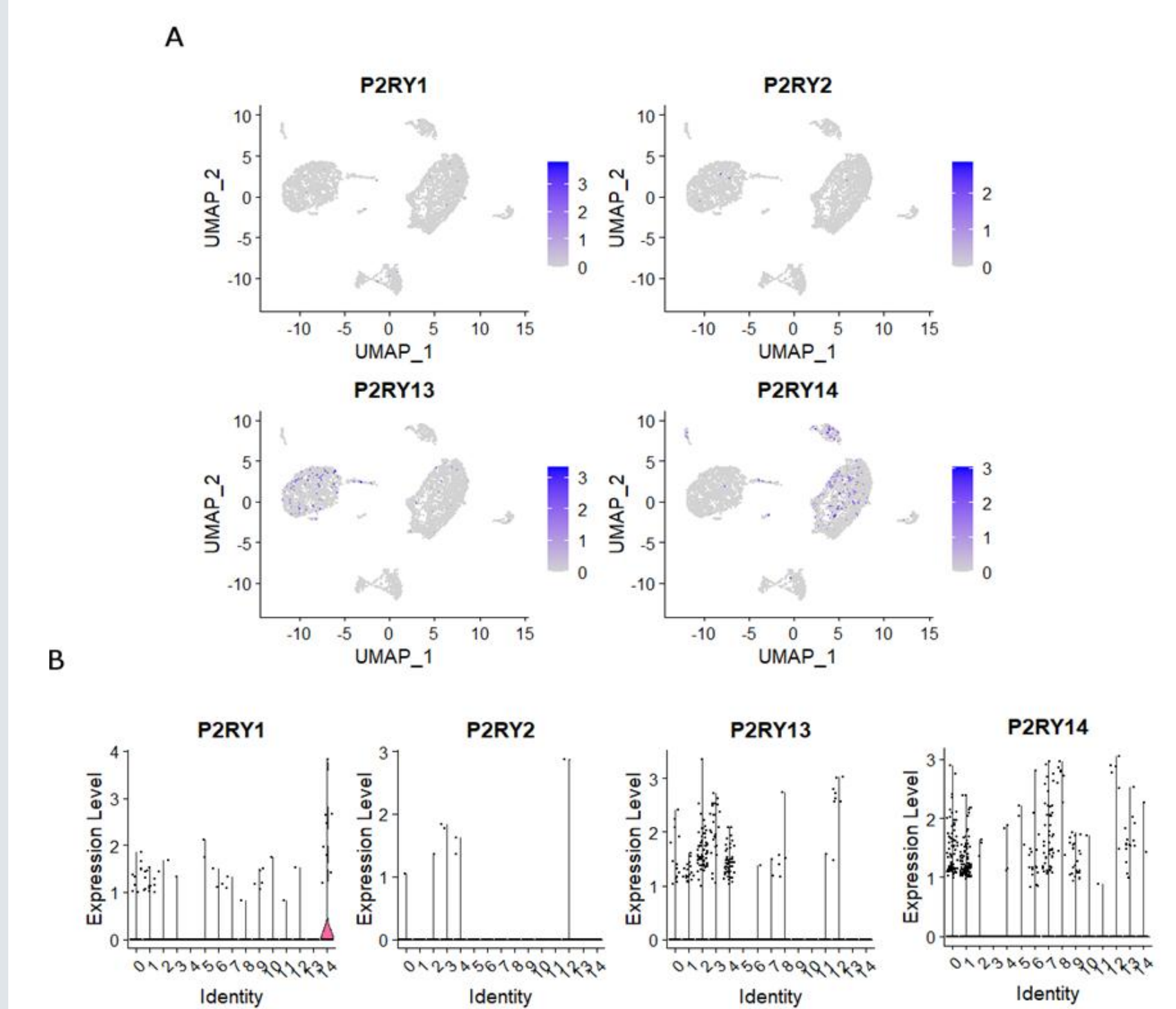
WYNIKI



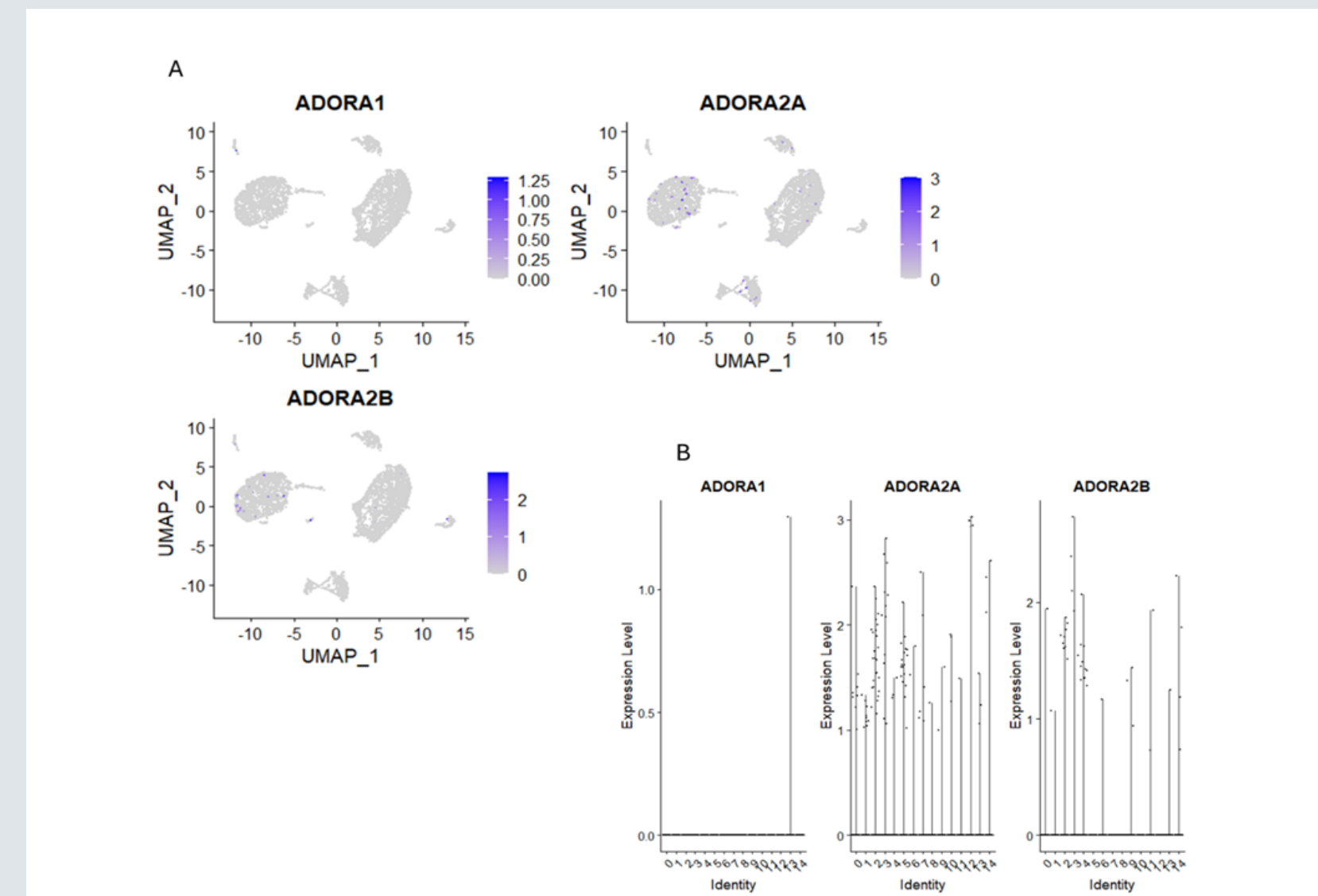
Rycina 5. Populacja krwiotwórczych komórek macierzystych o fenotypie $CD34^{lin^-}CD45^+$ z uwzględnieniem podziału na subpopulacje (klastry).



Rycina 6. Ekspresja genów receptorów P2RX1, P2RX4 oraz P2RX7 w krwiotwórczych komórkach macierzystych o fenotypie $CD34^{lin^-}CD45^+$ prezentowana w postaci intensywności ekspresji na tle całej populacji komórek (A) oraz w odniesieniu do poszczególnej subpopulacji komórek (B).



Rycina 7. Ekspresja genów receptorów P2RY1, P2RY2, P2RY13 oraz P2RY14 w krwiotwórczych komórkach macierzystych o fenotypie $CD34^{lin^-}CD45^+$ prezentowana w postaci intensywności ekspresji na tle całej populacji komórek (A) oraz w odniesieniu do poszczególnej subpopulacji komórek (B).



Rycina 8. Ekspresja genów receptorów ADORA1, ADORA2A oraz ADORA2B w krwiotwórczych komórkach macierzystych o fenotypie $CD34^{lin^-}CD45^+$ prezentowana w postaci intensywności ekspresji na tle całej populacji komórek (A) oraz w odniesieniu do poszczególnej subpopulacji komórek (B).

Podsumowanie wyników:

1. Analiza transkryptomu za pomocą scRNA-seq komórek pozwoliła na identyfikację 14 subpopulacji w obrębie wysortowanej populacji KMK o fenotypie $CD34^{lin^-}CD45^+$ (Rycina 5).
2. Wyodrębniono **dwie główne** subpopulacje KMK: (a) komórki najbardziej prymitywne, znajdujące się w stanie spoczynku oraz (b) komórki będących w momencie decyzyjnym, prawdopodobnie znajdujące się tuż przed różnicowaniem (Rycina 5).
3. Ekspresja genów receptorów P2RX1, P2RX4 oraz P2RX7 była obserwowana we wszystkich subpopulacjach, a jej najwyższy poziom zaobserwowano w klastrach komórek prymitywnych, znajdujących się w stanie spoczynku (Rycina 6).
4. Ekspresję genów receptorów P2RY1 oraz P2RY13 zaobserwowano w klastrach komórek znajdujących się przed różnicowaniem. Natomiast ekspresję P2RY14 obserwowano w klastrze komórek prymitywnych, pozostających w stanie spoczynku (Rycina 7).
5. Dla genów receptorów ADORA zaobserwowano niski poziom ekspresji bez istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi klastrami (Rycina 8.).

WNIOSKI

1. Obecność ekspresji markerów takich jak CD4, CD14 i CD16 w badanej populacji KMK a także niska ekspresja genów receptorów ADORA może świadczyć o tym, że część komórek znajduje się tuż przed wejściem w szlak różnicowania, mimo że nadal pozostają w stanie względnego spoczynku.
2. Komórki KMK wykazują zwiększoną ekspresję receptora P2RX1, co sugeruje ich wysoką wrażliwość na ATP jako sygnał z otoczenia. Może to świadczyć o udziale ATP w mobilizacji KMK w niszy szpikowej.
3. Ekspresja P2RX4 i P2RX7 w subpopulacji komórek prymitywnych wskazuje na ich rolę w utrzymywaniu równowagi między samoodnową a różnicowaniem komórek macierzystych.
4. Niska ekspresja P2RY1 a jednocześnie zwiększona ekspresja P2RY13 mogą wskazywać na to, że to szlak sygnałowania purynergicznego wpływa na brak aktywacji ścieżek różnicowania i utrzymanie komórek w stanie spoczynku.