

Academia Română  
Institutul de Biologie și Patologie Celulară “Nicolae Simionescu”

## TEZĂ DE DOCTORAT

### **Mecanisme epigenetice implicate în diferențierea celulelor stem**

#### **Rezumat**

Conducător științific:  
Acad. Maya Simionescu

Doctorand  
Iordache Florin

**București  
2013**

# Cuprins

## INTRODUCERE

## PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTIȚELOR

<b>CAPITOLUL I.1</b> Celule progenitoare endoteliale.....	6
I.1.1 Definiția și caracteristicile celulelor stem.....	6
I.1.2 Clasificare și tipuri de celule stem.....	8
I.1.3 Celulele progenitoare endoteliale prezente în sângele din cordon ombilical.....	18
I.1.4 Aplicațiile clinice ale celulelor progenitoare endoteliale în patologia cardiovasculară.....	22
<b>CAPITOLUL I.2</b> Mecanisme epigenetice și rolul lor în diferențierea celulelor stem.....	26
I.2.1 Definiția și caracteristicile modificărilor epigenetice.....	31
I.2.2 Clasificarea și tipurile de modificări epigenetice.....	32
I.2.2.1 Metilarea ADN.....	32
I.2.2.2 Modificări ale histonelor.....	34
a. Metilarea	
b. Acetilarea	
c. Fosforilarea	
d. Sumoilarea	
e. Ubiquitinilarea	
f. Izomerizarea prolinei	
g. ADP-ribozilarea	
h. Deiminarea	
I.2.2.3 microARN.....	47

<b>CAPITOLUL I.3</b> Mecanismele acetilării histonelor și rolul lor în diferențierea celulelor stem.....	57
I.3.1 Definiția și caracteristicile acetilării.....	57
I.3.2 Clasificarea enzimelor implicate în acetilare: .....	59
I.3.2.1 Histon-acetiltransferaze (HAT).....	60
I.3.2.2 Histon-deacetilaze (HDAC).....	65
I.3.3 Mecanismele de acțiune ale acetilării proteinelor histonice și nonhistonice.....	72
I.3.4 Rolul acetilării în diferențierea celulelor stem.....	78
<b>PARTEA a II-a CONTRIBUȚII ORIGINALE.....</b>	<b>84</b>
II.1 Scop și obiective.....	84
II.2 Materiale și metode.....	86
II.3 Rezultate și discuții.....	106
II.3.1 Izolarea și caracterizarea celulelor progenitoare endoteliale din sângele din cordon ombilical.....	106
II.3.2 Investigarea nivelului de acetilare al histonelor din celulele progenitoare endoteliale.....	119
II.3.3 Efectul acetilării histonelor asupra diferențierii celulelor progenitoare endoteliale.....	125
II.3.4 Analiza acetilării unor factori transcripționali implicați în morfogeneza cardiovasculară.....	129
II.3.5 Influența acetilării histonelor asupra procesului de neovascularizație <i>in vitro</i> .....	131
II. 4. Concluzii generale.....	145
Bibliografie.....	148
Diseminarea rezultatelor obținute în cadrul tezei de doctorat.....	172
Finanțarea cercetărilor.....	178

## **Cuvinte cheie**

Acetilare

Histone

Cromatină

Epigenetică

Celule stem

Celule progenitoare endoteliale

Celule stem fetale

Diferențiere

Neovascularizație

Boli cardiovasculare

## Importanța studiului

Înțelegerea mecanismelor care conduc la diferențierea celulelor stem este scopul principal al numeroaselor studii. Accesibilitatea ADN-ului pentru factorii de transcripție depinde de structura cromatinei și gradul său de compactare. Analizele recente ale modificărilor epigenetice de la nivelul celulelor stem umane și murine au furnizat noi date despre proprietățile de pluripotență ale celulelor stem și a capacității lor de diferențiere. Aceste mecanisme determină o ierarhie a transcrierii, sunt mediate de factori de transcripție și sunt menite să controleze expresia genelor fără să altereze structura ADN. Capacitatea de multipotență a celulelor stem se reduce în timp, datorită represiei anumitor gene care prezintă o ”semnătură” epigenetică. Genele active la nivelul celulelor stem sunt silențiate gradat pe măsura trecerii lor în celule progenitoare, iar un alt subset de gene țesut-specifice sunt activate. Această progresie este realizată prin expresia selectivă a factorilor de transcripție care recunosc și interacționează cu diferitele modificări epigenetice de la nivelul cromatinei. Ca rezultat al acestor evenimente, cromatina devine accesibilă pentru transcriere la nivelul anumitor regiuni, permițând un control spațial și temporal necesar diferențierii celulelor stem. De exemplu, proteina HP1 (heterochromatine protein 1) își schimbă distribuția, de la o localizare dispersată la nivelul celulelor stem embrionare la o acumulare mult mai concentrată în loci distincți în timpul diferențierii celulare. Acetilarea histonelor era văzută ca un fenomen corelat cu o conformație deschisă a cromatinei, ce permitea exprimarea diferitelor gene implicate în diferențiere. În prezent s-a observat că, în stare acetilată, numeroase gene sunt represate și astfel, diferențierea spre o anumită linie celulară este blocată, menținându-se starea de pluripotență. Manipularea activității histon-deacetilazelor ar putea deveni un instrument util pentru a genera populații de celulele specifice în scopul utilizării lor în transplant. Descoperirea modelelor de acetilare („*acetylation signature*”) implicate în diferențierea celulelor stem către diferitele tipuri celulare, deschide noi oportunități la interfața dintre chimie și biologia celulei stem, și poate oferi informații valoroase pentru a îmbunătăți aplicațiile celulelor stem în ingineria tisulară și medicina regenerativă.

În acest context, **scopul tezei** este investigarea rolului acetilării histonelor în diferențierea celulelor progenitoare endoteliale prin analiza expresiei diferiților markeri genetici și a factorilor de transcripție care reglează activitatea acestor gene. De asemenea, studiile investighează efectul acetilării celulelor progenitoare endoteliale asupra procesului de neovascularizație *in vitro*.

Teza este structurată în două părți principale: partea I – Stadiul actual al cunoștințelor și partea a II-a - Contribuții originale.

Prima parte prezintă stadiul actual al cunoștințelor și este organizată în 3 subcapitole.

**Subcapitolul I** prezintă noțiuni legate de caracteristicile și proprietățile celulelor stem. În acest subcapitol este prezentat modelul celular utilizat, reprezentat de celulele progenitoare endoteliale și posibilele aplicații clinice ale acestora.

**Subcapitolul II** face o trecere în revistă a principalelor modificări epigenetice. Sunt descrise mecanismele de acțiune a acestor modificări și enzimele implicate în realizarea lor. Tot în acest subcapitol este descris și rolul modificărilor epigenetice în diferențierea celulelor stem către diferite linii celulare.

**Subcapitolul III** descrie mecanismele acetilării histonelor și rolul lor în diferențierea celulelor stem. În acest subcapitol sunt prezentate principalele clase de histon-acetiltransferaze și histon-deacetilaze, mecanismele de acțiune ale acetilării histonelor, precum și influența acetilării în diferențierea celulelor progenitoare endoteliale.

În Partea a II a - "Contribuții originale", sunt prezentate rezultatele obținute din experimentele care au avut ca scop investigarea rolului acetilării histonelor în diferențierea celulelor progenitoare endoteliale și asupra capacitații de neovascularizație *in vitro*.

Capitolul II.2 - "Materiale și Metode" descrie principalele materiale și tehnici utilizate în experimente, incluzând numeroase tehnici noi de biologie celulară și moleculară: Real-Time PCR, Western-Blot, citometrie în flux, microscopie electronică de transmisie și de baleaj, imunocitochimie și imunohistochimie, metode colorimetrice și fluorimetrice.

Capitolul II.3 - "Rezultate și discuții" prezintă principalele rezultate originale, obținute în cadrul studiilor efectuate.

## **Rezultate și discuții**

Înțelegerea mecanismelor care conduc la diferențierea celulelor stem este scopul principal al numeroaselor studii. Analizele recente ale modificărilor epigenetice de la nivelul celulelor stem umane și murine au furnizat noi date despre proprietățile de pluripotență ale celulelor stem și a capacitații lor de diferențiere. Aceste mecanisme determină o ierarhie a transcrierii, sunt mediate de factori de transcripție și sunt menite să controleze expresia genelor fără să altereze structura ADN-ului. Acetilarea histonelor era văzută ca un fenomen corelat cu o conformație deschisă a cromatinei, care permitea o exprimare a diferitelor gene implicate în diferențiere.

În prezent s-a observat că, în stare acetilată, numeroase gene sunt repressate și astfel diferențierea spre o anumită linie celulară este blocată, menținându-se starea de pluripotență.

În lucrarea de față am demonstrat că sângele din cordon ombilical conține o populație bogată de celule progenitoare endoteliale, având un profil imunofenotipic caracteristic: CD31, CD34, CD133, CD144, CD146, VEGFR2. Analiza moleculară a celulelor obținute din sânge din cordon ombilical a arătat faptul că sunt exprimate la nivel genic atât gene implicate în morfogeneza cardiovasculară, ca genele pentru factorii de transcripție GATA2, GATA3, GATA4, cât și gene caracteristice celulelor endoteliale: CD31, VE-cadherin, VEGFR1, VEGFR2, vWF, CXCR4, Tie-2. Totodată, am arătat că celulele progenitoare endoteliale prezintă o capacitate de proliferare și migrare superioară în comparație cu alte tipuri de celule stem. Aceste celule pot prelua LDL acetilat și lectina *Ulex europaeus*, pot forma rețele vasculare, fapt ce demonstrează potențialul lor în angiogeneză și repararea vasculară. Acest lucru a fost confirmat folosind secțiuni ventriculare embrionare murine viabile sau supuse ischemiei, în care am arătat că celulele progenitoare endoteliale au capacitatea de a se integra și a forma rețele vasculare. Rezultatele noastre au arătat că celulele progenitoare endoteliale formează structuri vasculare doar la nivelul secțiunilor ventriculare embrionare murine viabile, în timp ce cele ischemice aceste celule doar se integrează, fapt ce demonstrează o comunicare directă intercelulară.

Rezultatele obținute au arătat că acetilarea inhibă diferențierea celulelor progenitoare endoteliale. Inhibitorii deacetilării (VPA, TSA, BuA) mențin cromatina într-o stare acetilată, corespunzătoare unei forme decondensate. Nivelul histon-deacetilazelor a fost semnificativ scăzut în prezența acestor inhibitori, iar nivelul histonei H3 acetilate a crescut, aceste modificări fiind corelate cu expresia markerilor implicați în diferențierea celulelor progenitoare endoteliale. Datele de biologie moleculară și imunofenotipare au arătat că inhibitorii HDAC scad expresia pentru VWF, VEGFR2, eNOS, CD117, CD133, CD144, CXCR4 și Tie-2, în timp ce expresia CD34 și CD45 rămâne neschimbată demonstrând că histon-deacetilazele sunt implicate în diferențierea endotelială. Expresia VE-caderin a fost inhibată semnificativ atât la nivelul ARNm cât și la nivel proteic. Mecanismul care stă la baza modificării expresiei VE-caderin poate fi explicat prin imposibilitatea factorilor de transcripție de tipul HoxC6, să interacționeze cu histonele acetilate pentru a activa promotorul VE-caderin. Expresia genică a CXCR4, Tie-2 și VEGFR2 a scăzut semnificativ în urma tratamentului cu TSA, mecanismul implicat fiind controlat de factorii de transcripție Hox a căror expresie este modulată în prezența acestor inhibitori. Rezultatele noastre au arătat că, în

stare acetilată, expresia HoxD9 este crescută în celulele progenitoare endoteliale atât la nivel genic cât și proteic.

Procesul de neovascularizație este un proces complex care implică o serie de etape interconectate ducând la formarea de noi vase de sânge atunci când au loc leziuni vasculare în organismele adulte. Spre deosebire de angiogeneză, care reprezintă formarea de vase de sânge din unele pre-existente, neovascularizația are loc prin intermediul celulelor progenitoare endoteliale. Acestea sunt mobilizate să migreze, prolifereze și diferențieze la locul țintă, sub acțiunea citochinelor și a micromediului. Rezultatele noastre au arătat că acetilarea inhibă procesul de neovascularizație *in vitro*, acționând la nivelul proceselor de proliferare, aderare, migrare și diferențiere a celulelor progenitoare endoteliale. Celulele progenitoare endoteliale au prezentat un nivel semnificativ scăzut al activității telomerazei în comparație cu controlul, sugerând o scădere a proliferării celulare.

Motilitatea celulară, evaluată folosind metoda “ *wound-healing assay*” și prin măsurarea impedanței celulare, a demonstrat faptul că inhibitorii HDAC folosiți scad motilitatea celulară la 24 de ore de la stimulare. În schimb, chemotaxia celulelor progenitoare endoteliale a crescut în urma tratamentului cu inhibitori HDAC, fapt ce poate fi explicat prin menținerea fenotipului circulant al acestor celule progenitoare. În prezența VPA 3mM s-a observat o stimulare semnificativă a chemotaxiei celulelor progenitoare endoteliale către angiopoietina, VEGF și SDF. După proliferarea, mobilizarea, migrarea și aderarea celulelor endoteliale către situsul țintă, ultima etapă constă în organizarea lor în rețele vasculare. Am urmărit și această etapă în condiții de acetilare. Cultivarea pe Matrigel, în prezența de inhibitori HDAC a celulelor progenitoare endoteliale, a arătat că acestea nu pot forma rețele vasculare. Pentru a confirma aceste rezultate am folosit și alte matrice pe bază de collagen. Rezultatele au arătat că celulele progenitoare endoteliale izolate din sângele de cordon ombilical au avut capacitatea de a supraviețui și adera la aceste matrice de collagen. Mai mult, aceste celule emit prelungiri, interacționează între ele și cu matricea, formând rețele în aceste structuri. În stare acetilată, celulele progenitoare endoteliale își pierd această capacitate, fapt ce demonstrează că acetilarea inhibă neovascularizația celulelor endoteliale *in vitro*.

Manipularea activității histon-deacetilazelor ar putea deveni un instrument util pentru a genera populații de celulele specifice în scopuri de transplant. Descoperirea modelelor de acetilare („*acetylation signature*”) implicate în diferențierea celulelor stem către diferitele tipurile celulare, deschide noi oportunități la interfața dintre chimie și biologia celulei stem, și poate oferi informații valoroase pentru a îmbunătăți aplicațiile celulelor stem în ingineria tisulară și medicina regenerativă.



Număr de figuri în prima parte –32

Număr de figuri în partea originală (Partea a II-a) – 40

Indicații bibliografice – 251

Lucrări publicate în reviste internaționale cotate ISI – 4

Lucrări publicate în reviste naționale recunoscute CNCSIS B+ 1

Comunicări orale: 2

Rezumate ale lucrărilor prezentate la manifestări științifice internaționale – 11

Rezumate ale lucrărilor prezentate la manifestări științifice naționale - 25

Participarea la proiecte de cercetare – 2 naționale, 1 internațional.