

## ***Studie van de cellulaire differentiatie en proliferatie***

**J.-F. Collard, M. Hinsenkamp**

Belgian  
BioElectroMagnetics Group



Laboratoire de Recherche en  
Orthopédie-Traumatologie  
Université Libre de Bruxelles  
Hôpital Erasme



### **Vragen**

- Welke zijn de receptoren en mechanismen waarop elektrische stimulatie inwerkt?
- Welke biologische processen worden door deze receptoren (proliferatie, differentiatie, fysiologische of pathologische) geactiveerd?
- Welke zijn de kenmerken van stimulatie die een cellulaire reactie teweegbrengen?

## Literatuuroverzicht

### Wat zegt de literatuur hierover?

- Gebrek aan kennis van de cellulaire mechanismen die door ELF stimulatie geactiveerd worden
- Belang van hun identificaties voor alle ELF-blootstellingsstudies
- Doeltreffendheid van de omische technieken voor het onderzoek naar cellulaire mechanismen (voordelen van grote screening)

## Literatuuroverzicht

### Wat zegt de literatuur hierover?

- Belang van de keuze van het experimentele model voor extrapolatie van resultaten naar de mens
- Het enige pathologische effect dat in sommige epidemiologische studies controversieel blijft, is leukemie bij kinderen.

## Huidige ontwikkelingen

### Doel

- De biologische processen identificeren die betrokken zijn in de cellulaire respons na ELF stimulatie
- Het isoleren van een lijst van "marker" genen die specifiek betrokken zijn in deze mechanismen

## Huidige ontwikkelingen

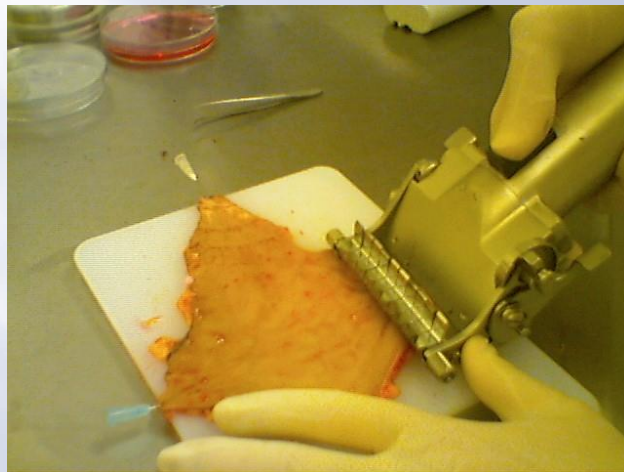
### Doel

- Testen van de hypothese dat ELF stimulatie het optreden van verschijnselen versnelt die van nature zouden zijn ontstaan, maar met een langere latentieperiode.
- Het controleren van de coherentie van nieuwe resultaten in vergelijking met historische studieresultaten.

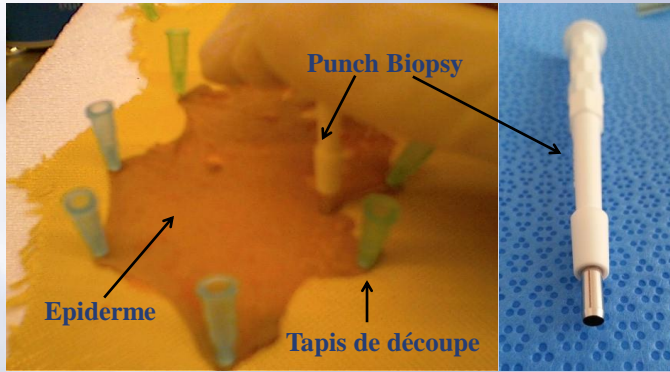
## Experimenteel model



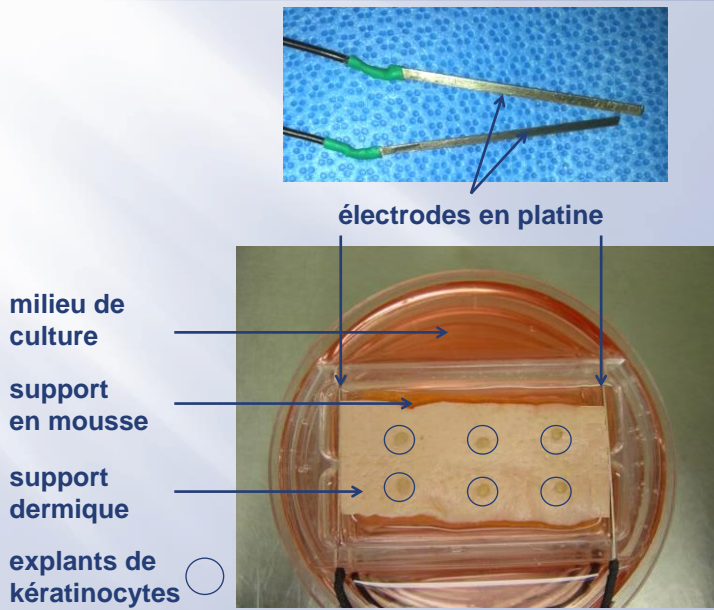
## Experimenteel model



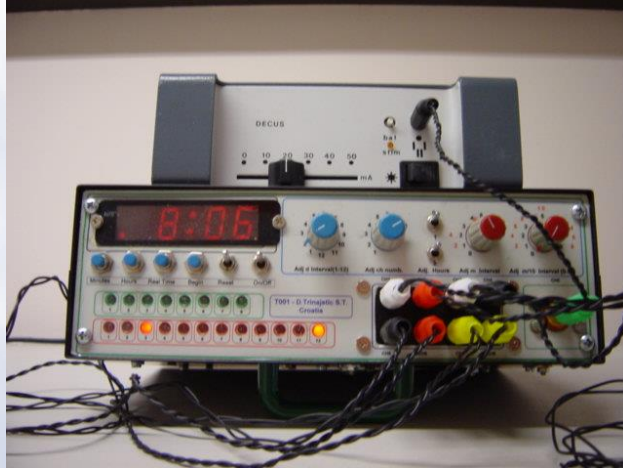
## Experimenteel model



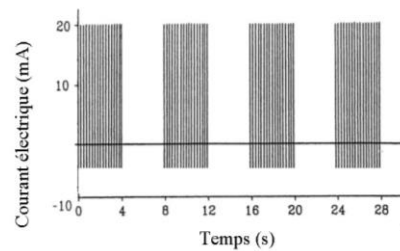
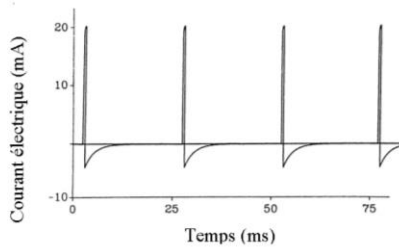
## Experimenteel model



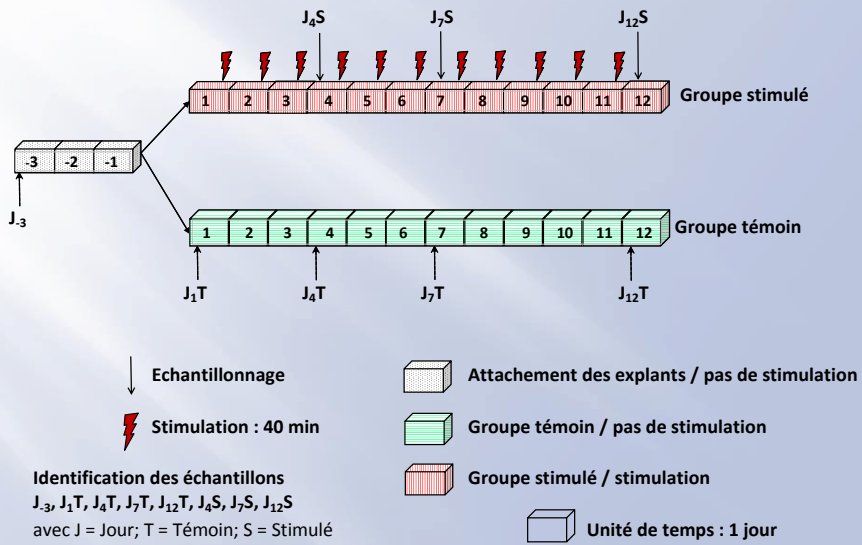
## Experimenteel model



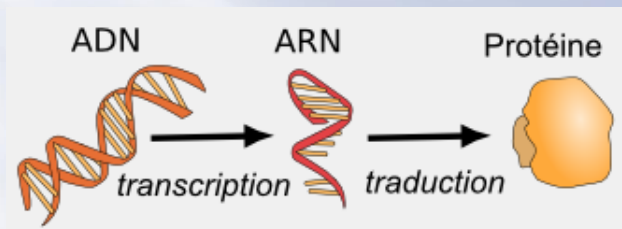
## Experimenteel model



## Experimenteel model: staalname



## Experimenteel model: Microarray



## Resultaten: Manuele analyse van microarray resultaten

### Eerste waarnemingen

- Verandering in de expressie van bepaalde genen

$J_x$	$J_x$ Témoin/ $J_1$		$J_x$ Stimulé/ $J_1$	
	Sur-exprimé	Sous-exprimé	Sur-exprimé	Sous-exprimé
$J_4$	93	203	315	626
$J_7$	389	313	228	397
$J_{12}$	397	609	441	505

Stimulé/Témoin	$J_4$	$J_7$	$J_{12}$
Sur-exprimé	39	30	237
Sous-exprimé	265	190	259

## Resultaten: Manuele analyse van microarray resultaten

### Analyse van de resultaten op korte termijn ( $J_x$ vs $J_1$ )

- De stimulatie verhoogt of verlaagt de regulatie van sommige genen t.o.v.  $J_1$  (controle)

maar

in het merendeel van de gevallen wordt de natuurlijke 'richting' van de regulatie niet omgekeerd

- Enkel 3 genen (EPS8, ADAMTS1, NOS1) gedragen zich anders : ze worden meer tot expressie gebracht bij  $J_4$ S en minder bij  $J_{12}$ T



## Resultaten: Manuele analyse van microarray resultaten

### Eerste waarnemingen

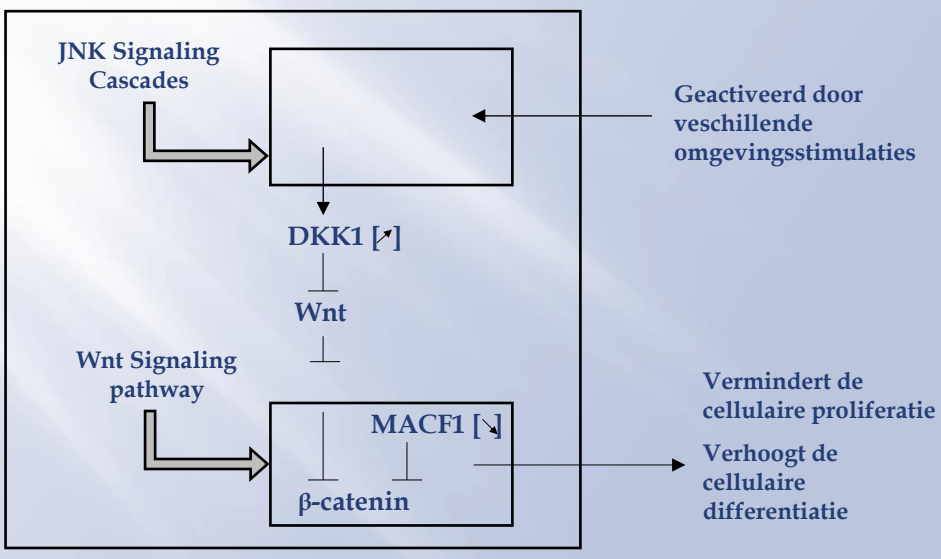
- Lijst van genen waarvan de expressie is gewijzigd voor het geheel van de bemonsteringstijden

Stimulé/Témoin	J <sub>4</sub>	J <sub>7</sub>	J <sub>12</sub>
Sur-exprimé	39	30	237
Sous-exprimé	265	190	259

- Activating transcription factor 3 (ATF3) :	FC	J <sub>4</sub> 2.49	J <sub>7</sub> 13.41	J <sub>12</sub> 9.28
	p	0.03	0.05	0.03
- Membrane metallo-endopeptidase (MME) :	FC	3.02	5.53	20.28
	p	0.005	0.005	0.04
- Thioredoxin reductase 1 (TXNRD1) :	FC	2.02	3.22	2.34
	p	0.05	0.05	0.02

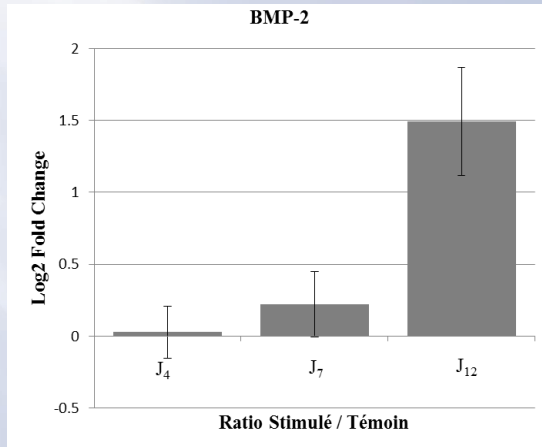
## Resultaten: Manuele analyse van microarray resultaten

### Eerste waarnemingen : Expressie van DKK1 en MACF1

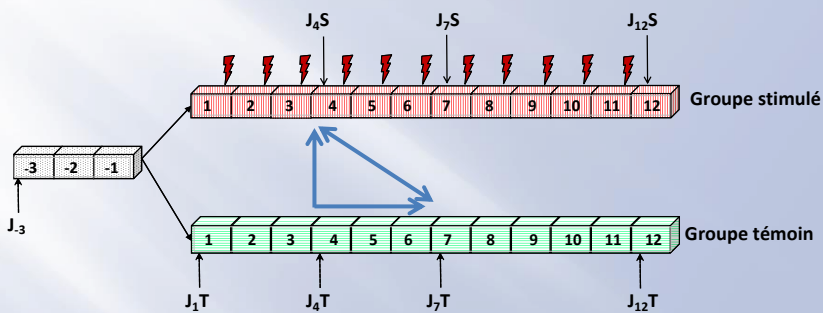


## Resultaten: Manuele analyse van microarray resultaten

### Eerste waarnemingen : Expressie van BMP-2

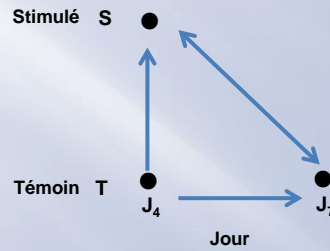


## Resultaten: analyse door triangulatie



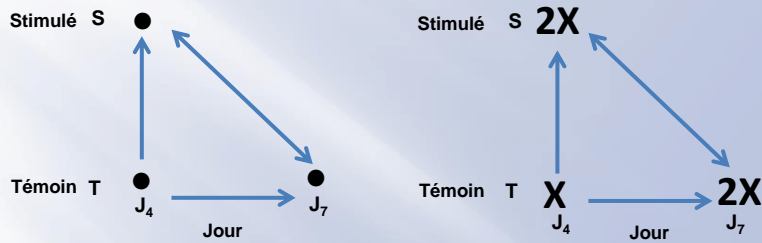
De bemonstering in de tijd maakt het mogelijk om de effecten van stimulatie op een bepaald moment te vergelijken met de natuurlijke evolutie van de controlegroep.

## Resultaten: analyse door triangulatie



Heeft ELF stimulatie hetzelfde effect op de cel als de natuurlijke evolutie van de celcultuur in de tijd?

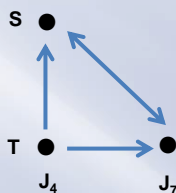
## Resultaten: analyse door triangulatie



Heeft ELF stimulatie hetzelfde effect op de cel als de natuurlijke evolutie van de celcultuur in de tijd?

## Resultaten: analyse door triangulatie

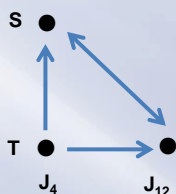
- Driehoek  $J_4S-J_4C-J_7C$



- Er zijn 319 genen die voldoen aan de 3 voorwaarden voor de p-waarde in de driehoek  $J_4s-J_4t-J_7C$ .
- In deze lijst zijn er 271 onderdrukt door stimulatie en 48 zijn meer tot expressie gebracht.
- De lijst wordt teruggebracht tot 33 als we een  $FC = 2$  ( $\log_2FC = 1$ ) toepassen.

## Resultaten: analyse door triangulatie

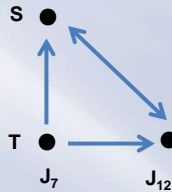
- Driehoek  $J_4S-J_4C-J_{12}C$



- 183 genen voldoen aan de drie voorwaarden voor de p-waarde in de driehoek  $J_4S-J_4C-J_{12}C$
- In deze lijst, zijn 159 genen onderdrukt door stimulatie en 24 komen meer tot expressie
- De lijst wordt teruggebracht tot 25 als we een  $FC = 2$  ( $\log_2FC = 1$ ) toepassen.

## Resultaten: analyse door triangulatie

- **Driehoek J<sub>7</sub>S-J<sub>7</sub>C-J<sub>12</sub>C**



- 329 genen voldoen aan de drie voorwaarden voor de p-waarde in de driehoek J<sub>7</sub>S-J<sub>7</sub>C-J<sub>12</sub>C
- In deze lijst, zijn 301 genen onderdrukt door stimulatie en 28 komen meer tot expressie
- De lijst wordt teruggebracht tot 65 als we een FC = 2 (log<sub>2</sub>FC = 1) toepassen.

## Resultaten: analyse door triangulatie

### Eerste waarnemingen

- CHEK1, DKK1, NDRG4, SPRR3
  - Bekend om hun rol in celproliferatie en – differentiatie
- UBE2D3
  - Actief in het signaalweg BMP
- Verschillende andere genen
  - Actief in mitose, de cellulaire ontwikkeling en DNA replicatie

## Resultaten: bioinformaticamiddelen

### GeneOntology (GO)

gestructureerde voorstelling van een reeks concepten en hun relaties met "termen" (celfuncties) die overeenkomen met de eigenschappen van genen

### FatiGO

Onderzoek van zinvolle associaties tussen een genengroep en de termen "GO".

### WebGestalt (WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit)

interface voor functionele analyse met GO en KEGG

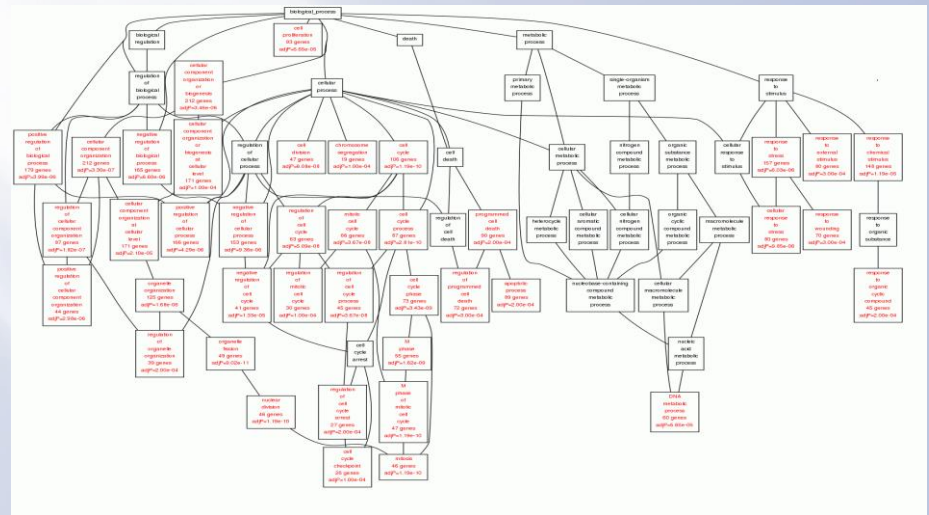
### Pathway Studio

integreert gegevens uit de Medline-literatuur met experimentele data en realiseert interactienetwerken.

## Resultaten: bioinformatische analyse

### GeneOntology module van de internetsite WebGestalt

- Acyclisch georiënteerde grafiek



## Resultaten : bioinformatische analyse

### GeneOntology module van de internetsite WebGestalt

- Acyclisch georiënteerde grafiek
  - Meer dan toevallige identificatie van actieve biologische processen
    - Positieve (of negatieve) regulatie van biologische processen
    - Celproliferatie
    - Regulatie van celsterfte
    - Regulatie van metabole DNA processen
    - Stressrespons

## Resultaten : bioinformatische analyse

### KEGG module van de internetsite WebGestalt

- Zoekt naar signalisatie pathways die een significant aantal genen gebruiken die in onze microarray resultaten voorkomen
  - « celcyclus"  
Gebruikt 16 genen
  - « p53 signalisatiepathway"  
Gebruikt 11 genen

## Resultaten : bioinformatische analyse

### internetsite KEGG

- Zoekt trajecten met betrekking tot de processen "celcyclus" en "p53 signalisatie", inclusief de in onze resultaten aanwezige genen.

## Resultaten : bioinformatische analyse

### internetsite KEGG

KEGG Nom de la voie de signalisation	Nombre de gènes de la "Liste A" inclus dans la voie	KEGG Nom de la voie de signalisation	Nombre de gènes de la "Liste A" inclus dans la voie
Cell cycle	16	Tight junction	6
FoxO signaling pathway	13	Complement and coagulation cascades	5
MAPK signaling pathway	12	Adherens junction	4
Cytokine-cytokine receptor interaction	12	B Cell receptor signaling pathway	4
p53 signaling pathway	11	ErbB signaling pathway	4
PI3K/Akt signaling pathway	11	T-cell receptor signaling pathway	4
Regulation of Actin cytoskeleton	11	ECM-Receptor Interaction	3
Focal adhesion	9	mTOR signaling pathway	3
Wnt signaling pathway	9	NF-Kappa B signaling Pathway	3
Apoptosis	7	Phosphatidylinositol signaling system	3
Calcium signaling pathway	6	TGF- $\beta$ signaling pathway	3
Jak-STAT signaling pathway	6		



## Resultaten : bioinformatische analyse

### internetsite KEGG

Nom de la voie de signalisation	Symbole du gène	Nom de la voie de signalisation	Symbole du gène
Regulation of actin cytoskeleton	ARHGEF7	FoxO	PRMT1
	SSH1		PLK4
	ENAH	MAPK	DUSP4
	IQGAP3		MAP4K4
Wnt signaling pathway	DKK1	Adherens junction	SSX2IP
	TBL1XR1	Calcium signaling pathway	TMEM142B
	DAAM1	ECM-Receptor Interaction	HMMR
	SFRP1	ErbB signaling pathway	NRG1
Complement and coagulation cascades	F12	Focal adhesion	PARVA
	KNG1	Jak-STAT signaling pathway	SPRY4
	THBD	TGF-beta signaling pathway	FST
Cell Cycle	CDC6	Tight junction	EPB41L3
	TTK		

## Resultaten : bioinformatische analyse

### Pathway Studio

- Zoekt cellulaire processen die gebruik maken van :
  - Het groots aantal genen (resultaten)
  - De genene waarvan de expressie het meest gewijzigd werd
  - De genen die onderling interageren
  - De functie van geïsoleerde genen door de triangulatiemethode

## Resultaten : bioinformatische analyse

### Pathway Studio

- Zoekt naar de locatie in de cel van eiwitten die gekoppeld zijn aan genen met gewijzigde expressie
- Onderzoekt eiwitten die betrokken zijn in het grootste aantal interacties

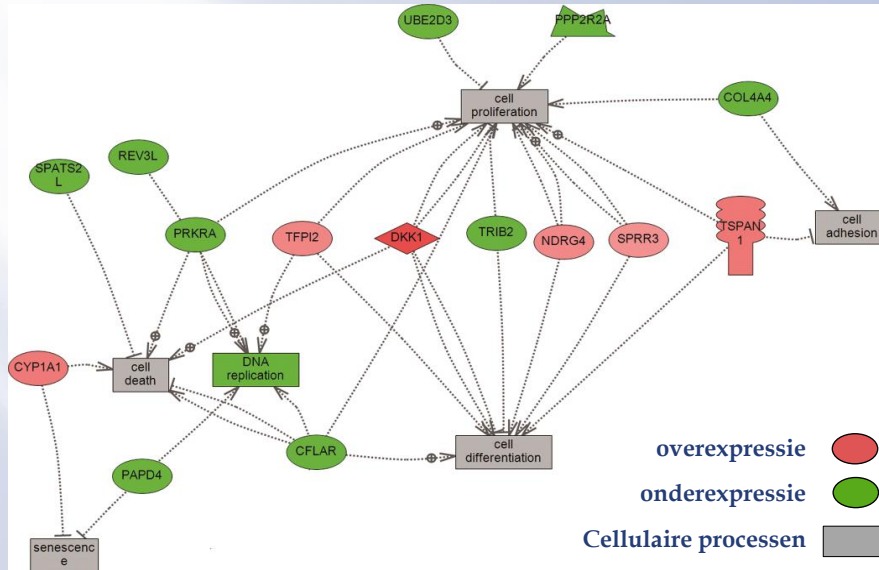
## Resultaten : bioinformatische analyse

### Pathway Studio

- Bevestigt de belangrijkste cellulaire processen verkregen met de GO module op de WebGestalt website.
- Resultaten in overeenstemming met onze eerdere waarnemingen m.b.t. :
  - De vermindering van de celproliferatie
  - De activering van celdifferentiatie
  - De celgroei
  - Wondgenezing
  - ...

## Resultaten : bioinformatische analyse

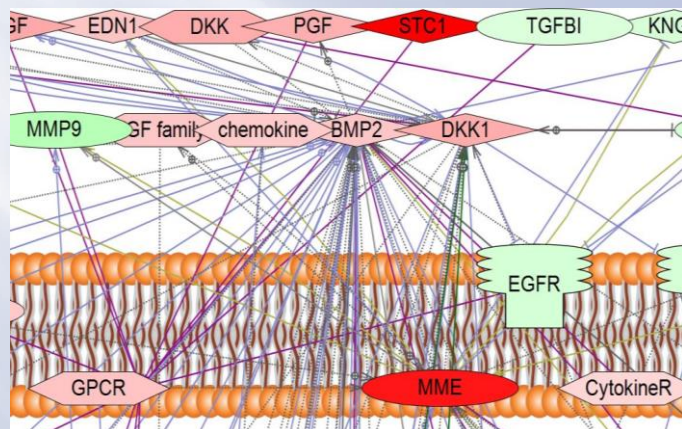
### Pathway Studio : analyse door triangulatie



## Resultaten : bioinformatische analyse

### Pathway Studio

- Localisatie en interactie van proteïnen



## Discussie

### Genen gedetecteerd door handmatige analyse

ADAMTS1

ATF3

BMP-2

DKK1

MACF1

MME

TXNRD1

### GGenen gedetecteerd door bioinformatische analyse

ADAMTS1

ATF3

BMP-2

DKK1

DUSP4

MACF1

MME

PDGFRA

SFRP1

TXNRD1

WNT

...

## Discussie

### Belangrijkste geïdentificeerde cellulaire mechanismen

- Apoptosis
- Cell Cycle
- FoxO
- Jak/STAT
- MAPK
- mTOR
- p53
- PI3K/Akt
- Regulation of actin cytoskeleton
- SAPK/JNK
- TGF-  $\beta$
- Wnt
- ...

## Discussie

### Belangrijkste geïdentificeerde cellulaire processen

- celadhesie
- apoptose
- celcyclus
- celgroei
- celdifferentiatie
- celmigratie
- celsterfte
- celproliferatie
- vascularisatie
- ...

## Besluiten

### We hebben met betrekking tot de doelstelling :

- De consistentie aangetoond tussen genexpressiemodificatie en historische onderzoeksresultaten
- Verschillende cellulaire processen geïsoleerd en voorgesteld die aan de oorsprong kunnen zijn van de macroscopische waarnemingen

## Besluiten

### We hebben met betrekking tot de doelstelling :

- Verschillende genen geïsoleerd die goede "merker kandidaten" zijn voor ELF-geactiveerde cellulaire processen.
- Aangevoerd dat de stimulatie de over- of onderregulering van bepaalde genen versnelt die onder normale omstandigheden (niet-gestimuleerde controlegroep) dezelfde trend (over- of onderregulering) zouden hebben gevolgd, maar in een langzamer tempo.

## Besluiten

### Nieuwe onderzoeksperspectieven

- Vergelijken en groeperen van de resultaten van de literatuur die gelijkaardige effecten laten zien, zelfs als het stimulatie- of cultuurmodel verschillend is
- Ontwikkeling van elektrische microdosimetrie technieken om nauwkeurig de stimulatie ontvangen door de cel te bepalen
- Verbeteren van signaalstudies om de actieve component te ontdekken die de reactie van de cel teweegbrengt

## Besluiten

### Nieuwe onderzoeksperspectieven

- Het bewijzen van de activering van eiwitten betrokken in de reacties als gevolg van resultaten bekomen op niveau van het RNA.