**The impact of aging specific differentially expressed genes on immuno-pathological regulations**

Emine Güvena\*, Sevinc Akcay*b*

aDüzce Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği, Mühendislik Fakültesi, Düzce/Türkiye.

bAhi Evran University, Department of Molecular Biology and Genetics, Kirsehir/ Turkey

**\*Sorumlu Yazar:** [**emine.guven@duzce.edu.tr**](mailto:emine.guven@duzce.edu.tr)

ABSTRACT

Aging is defined as an increase in failure (mortality) rate that is irreversible and in biological mechanisms leading to functional decline and increased risk for disease and death. By profiling gene expression levels, we intend to study aging with the pathological regulations of myeloid malignancies. We characterized aging at the gene expression level using GSE32719 data set publicly available at gene expression omnibus (GEO) and ArrayExpress. Using Biobase, GEOquery, doMC, and Limma packages, top 579 genes that shows up and down regulation (p < 0.05 and fold change > 2.5) out of which 117 genes were chosen in the intersection of gene ontology (GO) analysis. Similar to previous research, the increase in hematopoietic stem cell population and functional decline in age-related hematopoietic pathologies have contributed significantly. Our results further enabled identification of candidate genes that are associated with aging such as negative regulation of cellular process such protein modification and protein phosphorylation processes. A majority of the top GO genes encoded proteins function intracellularly and also provide insights into plasma membrane. Gene expression profile with GO enrichment further reveals a metabolic process of the immunopathological basis of aging that are associated with several signaling cascades which plays an important role of the family of ATP-binding cassette (ABC) transporters.

\*\*\*The GO term sphingolipid translocation is known to play a role in cell death, survival, and therapy resistance in cancer.

*Introduction*: Aging is a complex biological process that brings about a gradual decline of physiological and metabolic machineries as a result of maturity. Also, aging is irreversible and leads ultimately to death in biological organisms.

*Methods*: We intend to characterize aging at the gene expression level using publicly available human gene expression arrays obtained from gene expression omnibus (GEO) and ArrayExpress. Candidate genes were identified by rigorous screening using filtered data sets, i.e., GSE11882, GSE47881, and GSE32719. Using Aroma and Limma packages, we selected the top 200 genes showing up and down regulation (p < 0.05 and fold change >2.5) out of which 185 were chosen for further comparative analysis.

*Results*: This investigation enabled identification of candidate genes involved in aging that are associated with several signaling cascades demonstrating strong correlation with ATP binding and protease functions.

*Conclusion*: A majority of these gene encoded proteins function extracellularly, and also provide insights into the immunopathological basis of aging.

**Keywords:** *aging, gene expression profiling, hematopoiesis, and myeloid*

ÖZET

İnsan hematopoetik sisteminin yaşa bağlı olarak değişmesi, kemik iliği kök hücrelerinin artması fakat fonksiyonel işlevlerinin azalması, akut miyeloid lösemi ve diğer hemotolojik bozukluluklar ile ilişkilendirilebilir. Yapılan son araştırmalarda hematopoetik kök hücre popülasyonundaki artış ve işlevsel azalışın, yaşa bağlı hematopoetik patolojilerin ortaya çıkarılmasında önemli katkı sağlamıştır. Araştırmaların sonucunda yaş artışı ile birlikte Hematopeotik Kök Hücre (HKH) popülasyonunun kantitatif ve fonksiyonel olarak değişim içerisinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada yaşlı hücrelerin özelliklerinin değerlendirilmiştir. Yaşa bağlı hematopoetik fonksiyon bozukluğu göstermeye yatkın olabilecek insan hematopoetik sistemi sağlıklı genç, orta yaşlı ve yaşlı insan kemik iliği örnekleri kullanılarak immünofenotipik HKH ve diğer progenitör popülasyonlar değerlendirilmiştir. Yaşlı bireylerde HKH sıklığının arttığı, daha pasif özellikte olduğu ve genç bireylerin HKH’si ile karşılaştırıldığında miyeloid yanlılık olduğu gözlemlenmiştir. Gen ekspresyon profili, yaşlı bireylerin HKH’sinin miyeloide yatkın olduğunu ve miyeloid malignitelere yönelimin olduğu ortaya koyulmuştur.

**Keywords:**  *gen ekspresyonu profillemesi, hematoloji, miyeloid, ve yaşlanma*

I.Gİrİş

The process of aging is characterized by a degeneration in the maintenance of homeostatic processes over time, leading to functional decline and increased risk for disease and ultimately death. Aging decreases an organism’s ability to handle environmental and physiological disturbance which also another cause that increases the probability of death [1]. Further, it involves exponential increase in mortality rate, broad range of physiological changes and increased susceptibility to disease that ultimately leads to death [1]. Thus, aging is defined as an association of structural and functional decline over the course of time [2]. These functional changes may also be susceptive for a number of diseases with the passage of time [3]. The result of complex interaction of environmen- tal, genetic, epigenetic and environmental factors have an impact on survival [4]. Out of 300+ aging theories, a few notable ones are based on genetics, immune, telomere, mitochondria, and free radicals [5]. To date, several hundred genes have been associated with aging.

Bone marrow is a special site where blood cells are covered with structural stromal cells. It is a spongy adipose tissue found in the bones such as femurs, rib cage, ribs, pelvis and human skull.

Bone marrow is fed with specialized blood vessels and contributes to circulation. The specialized phenestra capillary, called sinusoid, penetrates the extracellular / extracellular matrix (ECM), and ECMs are sponge-like matrices produced by reticular fibroblasts.

These proteins and cells place the hematopoietic cells in separate compartments. Similarly, hematopoietic cells, bidothelial cells, stromal cells, ECM, cytokines, growth factors, and chemokines contain special microenvironment in the bone marrow. Bone marrow microenvironment plays an important role in the development and progression of leukemia and other types of cancer [1].

Recent advances include new markers for HSCs and niche stem cells, systematic analysis of expression patterns of niche factors, genetic tools for functional in vivo identification of niche cells, and improved imaging techniques [2].

Stem cells have the ability to divide for a long time in the living body, to be able to regenerateand transforminto other tissue cells by differentiating according to the needs of the body [3]. Various criteria have been determined to define a cell as a stem cell. For example, stem cells can contribute to undifferentiated lines even in vivo without tissue damage [4,5]. Understanding of the properties of hematopoietic cells was made 40 years ago by a series of seminal experiments demonstrating the ability to form macroscopic colonies on a subset of cells on the bone marrow [5]. Hematopeotic Stem Cells (HSCs) are specific stem cells that are prospectively isolated into tissue and are also the only stem cells in routine clinical use [6]. Grafts commonly used in the treatment of various diseases such as leukemia and autoimmune cause this condition. A detailed examination of the cellular and molecular properties of HSCs has made studies in clinical use, stem cell identification and use highly effective [8, 9]. Bone marrow microenvironment is an ideal place to support healthy and malignant hematopoiesis [1, 10].

In acute myeloid leukemia (AML), blast cells, which deteriorate during normal maturation, begin to accumulate in the blood together with the bone marrow. The body remains vulnerable because white blood cells cannot form. Erythrocyte and platelet production are disrupted in the bone marrow due to abnormal proliferation of myeloblasts. As a result, anemia infection and platelet count decrease. Bleeding in AML occurs as the first onset symptoms. AML is not limited to a particular part of the body since its onset, but can spread to the blood, lymphatic tissue and all other organ systems from the bone marrow. As with many other leukemia diseases, it is defined as a malignant systemic disease.

Previous studies addressing age-related changes in human HSC [10, 11], due to the indirect evaluation of root and progenitor populations, need to support experimental studies with numerical analysis and statistical methods in addition to previous HSC studies in mice. In our study, Pang et al. In addition to the clinical results obtained in 2007, gene expressions were analyzed by various and different tools and methods [9].

To describe the characteristics of the elderly human hematopoietic system, which may be prone to age-related hematopoietic function disorders, from healthy, hematologically normal young and old human bone marrow samples [9].   
HSC and other hemotopoietic progenitor populations were evaluated and it was found that the elderly HSC increased frequently.

II. MATERIALS AND METHODS

2.1. Microarray data

Expression data from human bone marrow hematopoietic stem cells were downloaded from the gene expression omnibus (GEO) database with GSE32719 was used [12-14].

Genomic information ranging from gene sequences to protein structure predictions were obtained. As described by Pang et al, these data sets contain a total of 50,000 gene expression of human bone marrow hematopoietic stem cells in groups of 14 young (20–31 years), 5 middle age (42–61), 8 old (65–85) groups [11, 13].

NCBI-GEO ara yüzünden indirilen GSE32719 veri setini matrix.txt uzantılı formati R studio Bioconductor’daki GEOquery paketi kullanılarak, içeriğindeki gset() fonksiyonu yardımıyla veri analizine hazır hale getirildi. Analizlerimizde kullandığımız R studio’daki gerekli başlıca paketler; Biobase, GEOquery, limma, foreach ve doMC şeklindedir.

Gruplara bağlı kalarak veri seti içindeki veriler ve gen değerleri arasında gen ekspresyonu (ifadesi) profilindeki seviye kontrolü, varyans analizi (F-test), regresyon analizi ve yaşlanmaya bağlı genlerdeki değişikleri ortaya koyduk.

Varyans analizi (ANOVA, Analysis Of Variance) iki ya da daha fazla gruba ait ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı ile ilgili hipotezleri test etmek için kullanılmaktadır. Genç, orta yaşlı ve yaşlı sınıflar olarak ayırılan gen bilgileri arasındaki ilişki ANOVA test ile tespit edilmektedir. ANOVA gruplar arasında farkın anlamlı olup olmadığını tespit ederken, anlamlı genlere ulaşmak için de Benjamini Hochberg yöntemini kullandık. Yanlış keşif oranını 0,05 ile sınırlamak için, p değeri 0,05'ten küçük olan tüm genler seçildi. Bu yöntem, Yanlış Keşif Hızı (FDR) olarak adlandırılan hata payını azaltmayı amaçlar ve amaç, yanlış pozitiflerin sayısını azaltmak ve diferansiyel olarak ifade edilen tüm genleri tanımlama şansını artırmaktır.

Regresyon analizi ise değişkenler arasındaki ilişkiyi fonksiyonel olarak açıklamak ve bu ilişkiyi bir modelle tanımlayabilmek amacıyla yapıldı. P- değerlerinin dağılımı ve görülme sıklığı ifade edildi.

III. SONUÇLAR

Yaşa bağlı hematopoetik fonksiyon bozukluklarına yatkın olabilecek yaşlı insan hematopoetik sisteminin özelliklerini açıklamak için sağlıklı, hemotolojik olarak normal genç ve yaşlı insan kemik iliği örneklerinden HKH ve diğer hemotopoetik progenitör popülasyonlar değerlendirilerek yaşlı HKH’nin sıklıkla arttığını tespit ettik.

Veri setine uyguladığımız regresyon analizleri sonucunda 50.000 genden (p < 0.05) değerleri aldığımız takdirde gen sayımız 579 tane örnekleme kadar indirgendi. Çalışmamızdaki veri havuzunda kullandığımız p < 0.05 değerine denk gelen 579 bireyin datası kullanılmıştır.

Ayrıca yaşlı HKH’nin çoğunluğu miyeloid yanlılık gösterirken, genç HKH’nin çoğunluğu lenfopoez ve miyelopoezde dengeli olduğunu ve yaşlılarda miyeloid malignitelere yatkınlığı gösterdiğini ortaya koyduk.

Yapılan testlerin ardından gen örneklemimizdeki anlamlı olarak nitelendirdiğimiz genleri ele aldığımızda HKH artışının orta yaşlı bireylerde belirgin artışını görmekteyiz. Şekil 1’de orta yaşlı grubun gen ekspresyon profili incelendiğinde HKH değerlerinin arttığı görülmektedir. Yaşlı grup için ise bu değerler genç gruba yakın değerler seyretmekle beraber artış miktarı daha azdır.



GEN EKSPRESYONLARI

**HASTALAR**

Şekil 1. Gen Ekspresyon Değerlerinin p< 0.05 için Kutu Grafiği

**Gene Ontology Analysis of DEGs**

Next, we performed Gene Ontology (GO) classification and functional enrichment for DEGs. GO has three ontologies: molecular function, cellular component and biological process (Table S1). The GO classification results are showed in Figs 5-10. After detecting the statistically significant differentially expressed genes between conditions including high and low groups**, GOrilla** is used to identify and visualize enriched GO terms in ranked lists of genes [3,4]. We do the enrichment analyses for genes in the p<0.05 differantially experessed genes.

As a result of the regression analysis we applied to the differentially expressed gene set, the gene sample count was reduced to 579 (p< 0.05) samples among 50.000 genes. Thus, GO enrichment is investigated on the pooled 579 differentially expressed genes correspond to p <0.05 value were used. Further, those 50.000 genes were used as a background gene reference with two-rank listed analyses in Gorilla.

***Gorilla* has calculated the *'P-value'***which is the enrichment p-value computed according to the mHG or HG model. This p-value is not corrected for multiple testing of 14548 GO terms.  
  
**The calculated q-value is called 'FDR q-value'** which is the correction of the above p-value for multiple testing using the Benjamini and Hochberg (1995) method [5].

For the ith term (ranked according to p-value) the FDR q-value is,

**The value for Enrichment (N, B, n, b)** is defined as follows:

,

where N is the total number of genes, B is the total number of genes associated with a specific GO term, n is the number of genes in the top of the user's input list or in the target set when appropriate, b is the number of genes in the intersection.

**Figure 5: Gene Ontology (GO) pathways of all down-regulated genes.** *30 genes in total from the intersection of conditions between Ctrl-VS-high, Ctrl-VS-middle, Ctrl-VS-low.medium and Ctrl-VS-low conditions are analyzed.*

**Table 6: Summary of Gene Ontology GO pathways analyzed in Fig 5**

## *A. Miyeloid Özellikli Genetik Sonuçlar*

Şekil 2’de gösterildiği gibi ısı haritasındaki renkler ışık spektrumundaki dalga boyu değerleri ile nitelendirilmiştir. Maviden sarıya doğru giden renk değişimi gen ekspresyonundaki azalmayı ifade eder. Grafiklerin analizi sonucunda yaşa bağlı olarak artan miyeloid yanlılık gözlemlenebilmektedir. Isı haritasındaki y eksenindeki genler sırasıyla; CSF2RB, MLF2, MLLT10, HOXA9, F2RL1, FUT1, USP46, CCDC88A şeklindedir.

Bu bulgular, insan HKH’sinde miyeloid spesifikasyon genleri ifade etmektedir. Belirgin şekilde USP46, CCDC88A ve FUT1 sembolleri ile gösterilen gen ekspresyonlarının yaşla beraber arttığını söyleyebiliriz.

**GenEks**



Şekil 2. Miyeloid Yanlılık Gösteren Hasta ve Genlerin İlişkisini Gösteren Isı Haritası

## *B. Lenfoid Özellikli Genetik Sonuçlar*

Şekil 3’de Lenfoid yanlılık gösteren genlerin ısı haritasında renkler ışık spektrumundaki dalga boyu değerleri ile nitelendirilmiştir. Maviden sarıya doğru giden renk değisimi gen ekspresyonundaki azalmayı ifade eder. Grafiklerin analizi sonucunda yaşa bağlı olarak azalan lenfoid yanlılık gözlemlenebilmektedir. HKH’nin yaşlı kemik iliğinde miyeloid farklılaşma kapasitesi ile beraber genç kemik iliğine oranla azalma gözlenmektedir.

Isı haritasında genler y ekseninde sırasıyla, VPREB1, LTBR, LY6H, LY6D, FLT3LG, LCP1, EMP1, SOX4 şeklindedir. Bu bulgular, insan HKH’sinde lenfoid spesifikasyon genleri ifade etmektedir. Belirgin şekilde EMP1 ve SOX4 sembolleri ile gösterilen gen ekspresyonlarının yaşla beraber arttığını söyleyebiliriz.

IV. tartışma

Yaşlı insan hematopoetik sisteminin özelliklerinin anlaşılması ve değerlendirilmesi için hemotolojik olarak sağlıklı genç, orta yaşlı ve yaşlı bireylerin kemik iliği örneklerinden HKH ve belirli bazı hematopoetik progenitör popülasyonları değerlendirdik. Bu araştırma sonucunda yaş artışı ile birlikte HKH sıklığının arttığı fakat daha pasif, fonksiyonel işlevi azalmış hücreler oluştuğunu gösterılmıs oldu. Yaşlı insan HKH’si miyeloid yanlılık gösterirken, genç insan HKH’sinde bu durumun miyeloid ve lenfoidde dengeli bir şekilde olduğunu belirtmeyi bır kez daha gormus olduk [1, 15]. Kemik iliği hematopoetik hücreler, bidotelyal hücreler, stromal hücreler, ECM, sitokinler, büyüme faktörleri, kemokinleri içeren özel mikroçevreleri bulundurmaktadır. Bu mikroçevrede gelişmekte olan hematopoetik hücreler hayatta kalmak, farklılaşmak ve çoğalmak için sinyal alırlar. Kemik iliği mikroçevresi löseminin ve diğer kanser türlerinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır [1].

**GenEks**





Şekil 3. Lenfoid Yanlılık Gösteren Hasta ve Genlerin İlişkisini Gösteren Isı Haritası

V. çıkarım

İlgili veri seti üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda yaşlı ve genç kemik iliği HKH’nin gen ekspresyon profilinde yaşlı HKH’nin miyeloid soy yanlılığı gösterdiğini tespit ettik. Ayrıca lenfoid spesifik, örneklemde yaşa bağlı olarak azaldığı da görülmektedir.

Çalışmada yaşa bağlı hematolojik fonksiyon bozukluklarına yatkın olabilecek yaşlı insan hematopoetik sistemin özelliklerini açıklamak için sağlıklı, hemotolojik olarak genç, orta yaşlı ve yaşlı insan kemik iliği örneklerinden HKH ekspresyon profillerini değerlendirdik.

Hücrelerin bölünebilme özelliği yaşa bağlı olarak farklılık göstermektedir. Yaşamın ilk yıllarında hücrelerin bölünme hızları daha fazla iken, yaşa bağlı olarak bir düşüş meydana gelmektedir. Ayrıca hücrelerin bölünebilme yetenekleri de sınırlıdır. Hücrelerin bir bölünebilme sayıları vardır ve gerektiği zaman programlı ölüm gerçekleştirirler. Bu olaya apoptosis adı verilmektedir. Sağlıklı bir bireyde yaşamın devamı için hücrelerin kontrollü bir şekilde bölünmesi, büyümesi ve hücre ürettikten bir süre sonra apoptosis olması beklenir. Fakat bazen süreç mutasyonlar sonucunda bilincini kaybetmiş kanser hücreleri kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Fazla hücrelerin sayısı arttıkça bu hücrelerin kütleleri bir büyüklük veya tümör oluşturabilir.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda (p<0.05) anlamlı genleri incelediğimizde orta yaşlı bireylerin HKH ekspresyon değerlerinin yüksek frekansını karakterize ettik.

Üç grupta sınıflandırdığımız örneklem üzerinden miyeloid ve lenfoid yanlılık gösteren genlerin ifadelerinin yaşa bağlı olarak değiştiğini, yaşlı bireylerin miyeloid yanlılık gösteren gen ifadelerinin artışını gözlemlerken lenfoid yanlılık gösteren genlerde negatif regüle olduğunu ortaya koyduk.

CSF2RB, MLF2, MLLT10, HOXA9, F2RL1, FUT1, USP46, CCDC88A sembolleri ile ifade edilen genler miyeloid yanlılık gösteren genleri ifade etmektedir. Bu genlerin yaşa bağlı olarak pozitif regülasyonu, VPREB1, LTBR, LY6H, LY6D, FLT3LG, LCP1, EMP1, SOX4 sembolleri ile ifade edilen genler lenfoid yanlılık gösteren genlerin yaşın ilerlemesiyle negatif regüle olduklarını ifade ettik.

kaynaklar

[1] A. Karadağ, B. Altinok, T. Özkan, ve Y. Hekmatshoar, “Kemik İliği Stroması: Hücreleri ve Mikroçevresi”, s. 12.

[2] J. M. Perry ve L. Li, “Disrupting the Stem Cell Niche: Good Seeds in Bad Soil”, *Cell*, c. 129, sy 6, ss. 1045-1047, Haz. 2007.

[3] S. Inan ve K. Ozbilgin, “Kök hücre: biyolojik ve klinik yaklaşım”, *Sağlıkta Birikim*, c. 1, sy 5, ss. 1-10, 2009.

[4] E. Karaöz ve E. Ovalı, “Kök hücreler”, *Celepler Matbaası Trabzon*, ss. 17-63, 2004.

[5] E. Karaöz, “Ovalı E”, *Kök Hücreler Derya Kitabevi Trabzon*, 2004.

[6] J. E. Till ve E. A. McCulloch, “A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells”, *Radiat. Res.*, c. 14, sy 2, ss. 213-222, 1961.

[7] A. U. Ural, “Hematopoetik Kök Hücre”, *Turk. Klin. J. Surg. Med. Sci.*, c. 2, sy 43, ss. 5-10, 2006.

[8] G. Aydın, “Değişik Kaynaklı MKH’lerin Detaylı Karakterizasyonu, Lenfohematopoezi Destekleyici Özellikleri ve İzolasyonunda CD271 Antijeninin Önemi”, 2018.

[9] G. Gürhan, “Deneysel Balb/C Ova Akut Astim Modelinde Fare Kemik İliği Kaynakli Mezenkimal Kök Hücrelerin Farkli Uygulama Yollarinin Astim Modeli Üzerine Etkisinin Araştirilmasi”.

[10] A. S. Çakmak, “Biyofiziksel ve Biyokimyasal Uyaranlarla Desteklenmiş Doku İskeleleri ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının İncelenmesi”, 2014.

[11] D. J. Rossi *vd.*, “Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, c. 102, sy 26, ss. 9194-9199, Haz. 2005.

[12] W. W. Pang *vd.*, “Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, c. 108, sy 50, ss. 20012-20017, 2011.

[13] S. Davis ve P. S. Meltzer, “GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor”, *Bioinformatics*, c. 23, sy 14, ss. 1846-1847, 2007.

[14] R. Edgar, M. Domrachev, ve A. E. Lash, “Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository”, *Nucleic Acids Res.*, c. 30, sy 1, ss. 207-210, 2002.

[15] R. H. Cho, H. B. Sieburg, ve C. E. Muller- Sieburg, “A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells”, *Blood*, c. 111, sy 12, ss. 5553- 5561, Haz. 2008.