

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Klemen ZUPANČIČ

ANALIZA GLIOBLASTOMA S PRISTOPI SISTEMSKE BIOLOGIJE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Klemen ZUPANČIČ

ANALIZA GLIOBLASTOMA S PRISTOPI SISTEMSKE BIOLOGIJE
DOKTORSKA DISERTACIJA

GLIOBLASTOMA ANALYSIS USING SYSTEMS BIOLOGY APPROACHES
DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Doktorska disertacija predstavlja zaključek podiplomskega študija Biomedicine, smeri Genetika. Študij se je izvajal v sodelovanju Medicinske fakultete in Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Večina dela je bila opravljena na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v sodelovanju s podjetjem Omega d.o.o. Skeniranje mikromrež je bilo opravljeno v Centru za funkcionalno genomiko in biočipe na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij z dne 12. 10. 2011 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Univerzitetni podiplomski študij Biomedicine ter opravljanje doktorata znanosti s področja genetike. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Kristina Gruden.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Radovan KOMEL
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Član: prof. dr. Simon HORVAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko animalno biotehnologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Kristina GRUDEN
Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora: 16. 6. 2014

Podpisani izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Klemen Zupančič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK 632.23:577(043.3)=163.6
KG glioblastom/mikromreže s protitelesi/proteomika/plazma/biološki označevalci/bioinformatika/sistemska/biologija
AV ZUPANČIČ, Klemen, univ. dipl. bioteh.
SA GRUDEN, Kristina (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicina, področje genetika
LI 2014
IN ANALIZA GLIOBLASTOMA S PRISTOPI SISTEMSKE BIOLOGIJE
TD Doktorska disertacija
OP XV, 119 str., 14 pregl., 36 sl., 2 pril., 158 vir.
IJ Sl
JI sl / en
AI *Glioblastoma multiforme* (GBM) so tumorji, ki za bolnike predstavljajo najslabšo prognozo. Glavna razloga za visoko smrtnost bolnikov sta visoka infiltrativna sposobnost GBM celic, ki lahko migrirajo v različne dele možgan, ter omejeno tkivo, ki ga lahko kirurško odstranimo. Operacija in obsevanje možganskega tkiva ne dosežeta migrirajočih celic, zaradi česar se tumor pogosto ponovno pojavi. Če želimo razviti učinkovito terapijo za GBM, je potrebno bolezen diagnosticirati preden se uspe zelo razrasti. Hkrati moramo razviti učinkovite terapije, ki bodo delovale tudi na invazivne celice. Zato potrebujemo odkriti nove biološke označevalce, povezane z GBM, ki smo jih v naših eksperimentih tudi odkrili. Na količine krvnih označevalcev lahko poleg prisotnosti GBM vpliva še veliko drugih dejavnikov, zaradi česar je ključnega pomena, da dobljene rezultate primerjamo s kontrolnimi vzorci, ki dobro predstavljajo zdravo populacijo. Pokazali smo, da lahko človeške mezenhimske matične celice služijo kot alternativna metoda zaviranja tumorja, saj je njihova prisotnost povzročila sistemsko utišanje velikega števila genov v GBM celicah. S tehniko mikromrež s protitelesi smo analizirali plazemske koncentracije 656 proteinov v 17 vzorcih zdravih prostovoljcev in 17 vzorcih bolnikov z GBM. Dobili smo 11 potencialnih bioloških označevalcev, njihovo tehnično validacijo pa potrdili z encimsko imunskim testom ter prenosom western. Rezultate smo za boljšo interpretacijo obdelali z uporabo bioinformatskih orodij. Ugotovili smo, da obstajajo različni tumorski tipi GBM glede na anatomske lokacije v možganih, ki pogojujejo tudi prognozo bolezni, za kar smo identificirali potencialne biološke označevalce. Rezultati, dobljeni z analizo izražanja genov celičnih linij so pokazali velik učinek, ki ga je imela prisotnost matičnih celic na izražanje genov celic GBM. Na ta način smo potrdili potencial uporabe matičnih celic v terapevtske namene.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC 632.23:577(043.3)=163.6
CX glioblastoma/antibody arrays/proteomics/plasma/biomarkers/bioinformatics/systems biology
AU ZUPANČIČ Klemen
AA GRUDEN, Kristina (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, scientific field Genetics
PY 2014
TI GLIOBLASTOMA ANALYSIS USING SYSTEMS BIOLOGY APPROACHES
DT Doctoral dissertation
NO XV, 119 p., 14 tab., 36 fig., 2 ann., 158 ref.
LA Sl
AL sl / en
AB *Glioblastoma multiforme* (GBM) are tumours with the worst prognosis for GBM patients. The main reasons for high mortality are the high infiltrative ability of GBM cells, that were shown to migrate to other parts of the brain and the limited amount of tissue we can surgically remove. The surgery and radiation do not reach migratory GBM cells which causes GBM to recur often. To develop effective therapy for GBM patients it is necessary to diagnose the disease earlier, before GBM cells have the time to overgrow the brain, as well as to discover targeting methods that are also affecting migratory GBM cells. It is therefore necessary to discover new biomarkers associated with GBM. The levels of plasma biomarkers can be affected by numerous factors; having good control samples that represent the population well is the key to relevant biomarker discovery. We have shown that human mesenchymal stem cells can be potentially used as alternative method for tumour suppression as their presence was associated with down-regulation of many genes. We used antibody array technology to analyse 17 plasma samples of healthy volunteers and 17 plasma samples of GBM patients to measure levels of 656 proteins. This way 11 potential biomarkers were identified and their technical validity confirmed with enzyme-linked immunosorbent assay and western blot. Results were analyzed using bioinformatic tools to produce better interpretation. Different GBM tumour types were identified, showing different plasma protein profiles depending on anatomic location of the tumour. These tumour types correlated with prognosis for which we also identified potential biomarkers. Results, obtained by analysing gene expression of cell lines showed great effect that presence of stem cells has had on gene expression in GBM cells. This way the use of stem cells was confirmed as a potential future therapeutic strategy.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key Words Documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XIII
Okrajšave in simboli	XIV
1 UVOD	1
1.1 CILJI.....	2
1.2 HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VPOGLEJ V STANJE TELESA Z ANALIZO PERIFERNE KRVI.....	3
2.2 VPLIV RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA VSEBINO PERIFERNE KRVI.....	4
2.3 SPLOŠNO O GLIOBLASTOMA MULTIFORME	4
2.4 DIAGNOSTIKA GLIOMSKIH TUMORJEV.....	7
2.5 BIOLOŠKI OZNAČEVALCI GLIOBLASTOMA MULTIFORME V TELESNIH TEKOČINAH.....	9
2.6 MATIČNE CELICE ZA ZDRAVLJENJE RAKA	10
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 IZBOR VZORCEV	12
3.1.1 Etična izjava.....	12
3.1.2 Zdravi prostovoljci	12
3.1.2.1 Izolacija RNA iz krvnih celic zdravih prostovoljcev	13
3.1.3 Bolniki z glioblastoma multiforme.....	14
3.1.4 Izolacija krvne plazme iz vzorcev zdravih prostovoljcev in bolnikov z glioblastoma multiforme	16
3.1.5 Celične linije.....	16
3.2 PROGRAMSKO STATISTIČNO OKOLJE R.....	18
3.3 MIKROMREŽE S PROTITELESI	18
3.3.1 Tip in postavitev mikromreže s protitelesi.....	18
3.3.2 Princip delovanja mikromrež s protitelesi.....	18
3.3.3 Priprava plazemskih vzorcev za hibridizacijo.....	19
3.3.4 Aktivacija mikromreže s protitelesi in hibridizacija.....	20
3.3.5 Analiza slik mikromrež s protitelesi	20
3.3.6 Statistična obdelava podatkov.....	21
3.3.6.1 Kontrola kakovosti	21
3.3.6.2 Normalizacija	21
3.3.6.3 Imputacija vrednosti praznih točk	21
3.3.7 Proteinska sestava plazme zdravih prostovoljcev	22
3.3.8 Iskanje proteinov s spremenjenimi nivoji v plazmi bolnikov z glioblastoma multiforme.....	22
3.3.9 Iskanje robustnih bioloških označevalcev	22
3.3.10 Iskanje proteinov, povezanih z anatomsko lokacijo tumorja.....	23

3.3.11	Iskanje proteinov, povezanih s preživetjem GB po diagnozi, z metodo Kaplan-Meier	23
3.3.12	Analiza Biomine.....	24
3.4	ENCIMSKI IMUNSKI TEST	24
3.4.1	Izbor proteinov	24
3.4.2	Določanje optimalne redčitve	24
3.4.3	Inkubacija	24
3.4.4	Detekcija in obdelava podatkov	25
3.4.5	Bradfordova reakcija	25
3.5	PRENOS WESTERN	25
3.5.1	Deplecija in redčenje vzorcev	26
3.5.2	Priprava vzorcev.....	26
3.5.3	Prenos na membrano	26
3.5.4	Detekcija in analiza slike	27
3.6	PCR V REALNEM ČASU.....	27
3.6.1	Priprava vzorcev in reverzna transkripcija.....	27
3.6.2	Izbor genov.....	28
3.6.2.1	Redčitvena vrsta	29
3.6.3	Reakcija.....	29
3.6.4	Statistična obdelava pridobljenih podatkov	30
3.6.5	Primerjava rezultatov poskusa z DNA-mikromrežami	31
3.7	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV DNA-MIKROMREŽ	31
3.7.1	Iskanje genov, povezanih z različnimi razmerami gojenja celičnih kultur .	31
3.7.1.1	Analiza grobih podatkov in kontrola kakovosti	31
3.7.1.2	Normalizacija robustnega zlepiljenja	32
3.7.1.3	Iskanje diferencialno izraženih genov	32
3.7.2	Obogatitev z uporabo genskih ontologij.....	32
4	REZULTATI	34
4.1	PREGLED OPRAVLJENEGA DELA	34
4.2	TRANSKRIPTOMSKA ANALIZA IMUNSKIH CELIC.....	35
4.2.1	Stabilni in variabilni geni.....	36
4.2.2	Geni, povezani z indeksom telesne mase	38
4.3	NETARČNA ANALIZA PROTEOMA KRVNE PLAZME ZDRAVIH PROSTOVOLJCEV IN BOLNIKOV Z glioblastoma multiforme.....	40
4.3.1	Proteini, stabilni v krvi zdravih prostovoljcev	47
4.3.2	Proteini, variabilni v plazmi zdravih prostovoljcev	48
4.3.3	Proteini, katerih plazemska koncentracija se spreminja s starostjo zdravih prostovoljcev	48
4.3.4	Proteini, katerih plazemska koncentracija je povezana s spolom zdravih prostovoljcev	50
4.3.5	Proteini, katerih plazemska koncentracija je povezana s prekomerno telesno maso zdravih prostovoljcev	50
4.3.6	Vpliv starosti na detekcijo proteinov v krvni plazmi.....	51
4.3.7	Proteini, povezani z glioblastoma multiforme	52
4.3.8	Ožji izbor potencialnih plazemskih bioloških označevalcev glioblastoma multiforme.....	57
4.3.9	Funkcionalne asociacije med potencialnimi bio-označevalci	61

4.3.10	Vpliv anatomske lokacije tumorja na proteinsko sestavo plazme bolnikov z GBM	62
4.3.11	Proteini, povezani s preživetjem po diagnozi glioblastoma multiforme.....	66
4.3.12	Kaplan-Meierjeva analiza preživetja	67
4.4	ENCIMSKOIMUNSKI TEST PETIH PROTEINOV	69
4.5	DODATNA ANALIZA S PRENOSOM WESTERN	70
4.5.1	Določitev optimalne redčitve vzorcev in test odstranitve albumina	70
4.5.2	Validacija mikromrež s protitelesi.....	71
4.5.3	Validacija encimskega imunskega testa	72
4.6	VPLIV MATIČNIH CELIC NA CELICE GLIOBLASTOMA MULTIFORME	73
4.6.1	Celične komponente	76
4.6.2	Molekulske funkcije	78
4.6.3	Biološki procesi	81
4.6.4	KEGG metabolne poti.....	84
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	86
5.1	STABILNOST KRVNIH BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV	86
5.1.1	Pomen analize vzorcev zdravih prostovoljcev	86
5.1.2	Stabilnost genov v krvi zdravih prostovoljcev.....	86
5.1.3	Stabilnost proteinov v krvi zdravih prostovoljcev	87
5.2	VPLIV RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA KRVNO SLIKO ZDRAVIH LJUDI	87
5.2.1	Vpliv telesne mase na biološke označevalce	87
5.2.2	Vpliv spola in starosti na biološke označevalce	88
5.3	PROTEOMIKA BOLNIKOV Z GLIOBLASTOMA MULTIFORME	89
5.3.1	Prednosti in slabosti tehnologije mikromrež s protitelesi za iskanje potencialnih bioloških označevalcev v plazmi.....	89
5.4	PREGLED PROTEINOV, SPECIFIČNIH ZA BOLNIKE Z GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	91
5.4.1	Prisotnost proteinov v krvni plazmi	91
5.4.1.1	Izvor potencialnih bioloških označevalcev v krvi	91
5.4.1.2	Matriks metaloproteinaze kot potencialni biološki označevalci	91
5.4.1.3	Identifikacija proteinov v krvni plazmi, povezanih z glioblastoma multiforme .92	
5.4.1.4	Metabolne poti, v katere so vpleteni proteini, povezani z glioblastoma multiforme	93
5.4.2	Identifikacija potencialnih robustnih označevalcev	93
5.4.2.1	Povezava glioblastoma multiforme in proteina S100A9	94
5.4.2.2	Povezava glioblastoma multiforme in proteina CDKN1B	95
5.4.2.3	Iskanje funkcionalnih povezav med 11 robustnimi potencialnimi biološkimi označevalci	95
5.5	VPLIV ANATOMSKE LOKACIJE IN PREŽIVETJA NA KRVNE PROTEINE	96
5.5.1	Vpliv anatomske lokacije GBM na ravni plazemskih proteinov	96
5.5.2	Identifikacija potencialnih bioloških označevalcev preživetja pri bolnikih z GBM	97
5.5.3	Vpliv anatomske lokacije GBM na preživetje bolnikov z GBM	98
5.6	SKLEPI	100

6	POVZETEK.....	101
6.1	POVZETEK	101
6.2	SUMMARY	103
7	VIRI	105

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Podatki o zdravih prostovoljcih, vključenih v študijo.....	13
Pregl. 2: Podatki o bolnikih z GBM, vključenih v študijo.....	15
Pregl. 3: Geni, izbrani za potrditveno analizo z RT-qPCR na podlagi rezultatov iz DNA-mikromrež.....	29
Pregl. 4: Količniki variance izražanja genov v celicah NK glede na podatke iz RT-qPCR ter DNA-mikromrež.....	36
Pregl. 5: Količniki variance izražanja genov v celicah CD4 ⁺ glede na podatke iz RT-qPCR in DNA-mikromrež.....	37
Pregl. 6: Rezultati t-testa povezanosti izražanja genov IL7R ter HLA-DOB v celicah NK in celicah CD4+ z indeksom telesne mase (BMI).....	39
Pregl. 7: Seznam 42 proteinov s spremenjenimi nivoji v plazmi v GB v primerjavi s ZP. Proteini so označeni s simbolom gena, UniProt kodo in sortirani po log ₂ FC....	54
Pregl. 8: Seznam 11 robustnih potencialnih bioloških označevalcev s spremenjenimi koncentracijami v plazmi pri primerjavah GB proti ZP ter GB proti ZPs.....	59
Pregl. 9: Plazemski proteini (26), povezani z lokacijo tumorja v možganih, s prikazanimi Log ₂ FC vrednostmi za posamezno lokacijo.....	64
Pregl. 10: Seznam 16 proteinov, povezanih s preživetjem bolnikov z GBM, ki so bili identificirani z analizo log-rank. Proteini z rdeče označenimi imeni so bili asocirani tudi s pozicijo tumorja v možganih, z modro pa z diagnozo GBM. GB _D so bolniki z GBM, ki so preživeli več kot eno leto po diagnozi.....	67
Pregl. 11: Skupine celičnih komponent, specifičnih za posamezne primerjave.....	77
Pregl. 12: Skupine molekulskih funkcij, specifičnih za posamezne primerjave.....	79
Pregl. 13: Skupine bioloških procesov, specifičnih za posamezne primerjave.....	82
Pregl. 14: Skupine KEGG metabolnih poti, specifičnih za posamezne primerjave.....	84

KAZALO SLIK

Sl. 1: Shematski prikaz različnih tipov gliomskih tumorjev glede na celični tip, iz katerega izhajajo. Vsi izvirajo iz progenitorjev glia celic (Rao, 2003).	5
Sl. 2: Barvanje s protitelesi proti HES6, ki kaže razlike med različnimi gliomskimi tipi in normalnim možganskim tkivom (a): oligodendrogiom druge stopnje (b), oligodendrogiom tretje stopnje (c), astrocitom druge stopnje (d) astrocitom tretje stopnje (e) ter glioblastom četrte stopnje (f). Puščice označujejo endoteljske celice, originalna povečava je bila 400-kratna (Haapa-Paananan in sod., 2012).	6
Sl. 3: Rentgenske slike možganov bolnika z GBM pred operacijo ter v časovnih razmakih po operaciji (PO). Nastanek novega GBM tkiva je viden že po 12 mesecih po operaciji (Sl. pridobljena v okviru raziskovalnega projekta INREMOŠ / Systher)...	7
Sl. 4: Proteini z najvišjimi koncentracijami v plazmi (povzeto po izbraževalnem materialu proizvajalca proteomskih reagentov Sigma Aldrich).....	10
Sl. 5: Shematski prikaz različnih načinov gojenja celičnih linij U-87MG in hMSC, uporabljenih v študiji. V direktnih in indirektnih kokulturah lahko celični liniji vplivata ena na drugo le preko parakrine komunikacije z različnimi vodotopnimi dejavniki.....	17
Sl. 6: Shematski prikaz mikromreže s protitelesi ter razporeditev posameznih sklopov protiteles na mikromrežnem stekelcu.....	18
Sl. 7: Shematski prikaz postopka detekcije proteinov s tehnologijo mikromrež s protitelesi (Sl. povzeta iz protokola proizvajalca mikromrež s protitelesi FullMoon Biosystems).....	19
Sl. 8: Shema vseh eksperimentov in analiz v okviru projekta Systher, ki se navezujejo na doktorsko delo. Analize v rdečih pravokotnikih so bile opravljene v okviru tega doktorskega dela.....	34
Sl. 9: Količniki variance (CV) izražanja genov iz analize RT-qPCR v primerjavi s količniki variance iz analize z DNA-mikromrežami na celicah naravnih ubijalkah. Premico smo izrisali po metodi najmanjših kvadratov; izračunan je količnik determinacije R^2	37
Sl. 10: Količniki variance (CV) genske eskopresije iz analize RT-qPCR v primerjavi s količniki variance iz analize z DNA-mikromrežami na celicah $CD4^+$. Premico smo izrisali po metodi najmanjših kvadratov; izračunan je količnik determinacije R^2 ...	38
Sl. 11: Izražanje gena IL7R v celicah $CD4^+$ v odvisnosti od indeksa telesne mase (BMI), na podlagi izmerjenih vrednosti z metodo RT-qPCR	39
Sl. 12: Izražanje gena HLA-DOB v celicah $CD4^+$ v odvisnosti od indeksa telesne mase (BMI), na podlagi izmerjenih vrednosti z metodo RT-qPCR.....	40
Sl. 13: Grafikon kvantilov porazdelitvev izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih pred obdelavo podatkov. Posamezne barve predstavljajo različne šarže....	42
Sl. 14: Grafikon kvantilov porazdelitvev izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih po normalizaciji z algoritmom GeNorm. Posamezne barve predstavljajo različne šarže. Sklenjene vertikalne črte predstavljajo nivoje stabilnih proteinov v plazmi.....	43
Sl. 15: Grafikon kvantilov porazdelitvev izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih po kvantilni normalizaciji. Posamezne barve predstavljajo različne šarže. Sklenjene vertikalne črte predstavljajo nivoje stabilnih proteinov v plazmi, določenih z analizo GeNorm.....	44

- Sl. 16: Grafikon kvantilov porazdelitve izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih po normalizaciji z izenačenim povprečjem. Posamezne barve predstavljajo različne šarže. Sklenjene vertikalne črte predstavljajo nivoje stabilnih proteinov v plazmi, določenih z analizo GeNorm45
- Sl. 17: Grafikon kvantilov porazdelitve izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih po normalizaciji z izenačenimi medianami. Posamezne barve predstavljajo različne šarže. Sklenjene vertikalne črte predstavljajo nivoje stabilnih proteinov v plazmi, določenih z analizo GeNorm46
- Sl. 18: Stabilni proteini v plazmi zdravih prostovoljcev, s količnikom variance mikromrežnih signalov, manjšim od 0,25. Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Vrstice so označene s simboli genov (NA označujejo različne kontrole na čipih, ki imajo pričakovano stabilen signal med vzorci). Nad stolpci je starost posameznega zdravega prostovoljca (v letih); kot kaže, stabilni proteini niso povezani s starostjo. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.47
- Sl. 19: Variabilni proteini v plazmi zdravih prostovoljcev s količnikom variance mikromrežnih signalov, večjim od 0,75. Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Vrstice so označene s simboli genov. Nad stolpci je starost posameznega zdravega prostovoljca (v letih); kot kaže, starost ni glavni razlog za variabilnost proteinov. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.48
- Sl. 20: Plazemski proteini, povezani s starostjo (p -vrednost < 0,05); vrstice so označene s simboli genov, nad stolpci je starost posameznega zdravega prostovoljca (v letih). Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Z NA je označen signal protiteles proti adenovirusnim vlaknom. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.49
- Sl. 21: Plazemski proteini, povezani s spolom (p -vrednost < 0,05); vrstice so označene s simboli genov, nad stolpci je spol posameznega zdravega prostovoljca (F – ženske, M - moški). Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.50
- Sl. 22: Plazemski proteini, povezani z indeksom telesne mase (p -vrednost < 0,05); vrstice so označene s simboli genov, nad stolpci je spol posameznega zdravega prostovoljca (F – ženske, M - moški). Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Z NA je označena kontrola mišij antigenov. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.51
- Sl. 23: Primerjava števila pozitivnih signalov na posamezni mikromreži s protitelesi, inkubiranimi z vzorci plazme zdravih prostovoljcev in bolnikov z GBM. Na vsaki mikromreži je bilo 1312 točk, od katerih so bile nekatere pozitivne; primerjali smo število pozitivnih točk med ZP (17 vzorcev) in GB (17 vzorcev), horizontalne črtice predstavljajo mediane (A). Venn-ov diagram prikazuje prekrivanje proteinov, ki smo jih našli pozitivne v različnih skupinah (B). Protein smo upoštevali kot za pozitiven, če je imel pozitiven signal na vsaj 75 % pripadajočih točkah na vseh mikromrežah v isti skupini. HV označuje zdrave prostovoljce, Y oz. O pa znotraj zdravih prostovoljcev mlajše oz. starejše od 40 let, GP označuje bolnike z GBM. 52
- Sl. 24: Toplotni diagram izražanja 42 proteinov, povezanih z GBM, predhodno hierarhično razporejenih po relativnih vrednostih v plazmi in z opaznim razvrščanjem v tri večje skupine, kar označujejo vodoravne črtkane črte. Intenziteta zelene barve je sorazmerna z jakostjo signala iz mikromrež s protitelesi, bela polja predstavljajo vrednosti pod mejo detekcije.57

Sl. 25: Graf, ki prikazuje koncentracije 11 plazemskih robustnih potencialnih bioloških označevalcev (proteinov) za GBM v posameznih vzorcih na mikromrežah s protitelesi. Horizontalne črtice predstavljajo povprečne vrednosti koncentracije proteinov v zdravih prostovoljcih (HV) ter bolnikov z GBM (GP).....	61
Sl. 26: Funkcionalne povezave med identificiranimi robustnimi potencialnimi plazemskimi biološkimi označevalci za GBM	62
Sl. 27: Združevanje vzorcev bolnikov z GBM glede na podobnosti v plazemskih ravneh proteinov, ki so imeli izmerjene plazemske vrednosti značilno različne (p-vrednost < 0,05) med zdravimi prostovoljci in bolniki z GBM. Hierarhično razvrščanje (A) in analiza glavne komponente (B); izris je bil narejen s pomočjo programa MEV.	63
Sl. 28: Hierarhično razvrščanje vzorcev bolnikov z GBM in proteinov glede na izražanje proteinov, specifičnih za lokacijo tumorja v možganih. Intenziteta zelene barve je sorazmerna z izražanjem posameznega proteina v krvni plazmi posameznega bolnika z GBM. Sivi kvadratki predstavljajo »NA« vrednosti.	65
Sl. 29: Kaplan-Meier grafi preživetja 16 proteinov, povezanih s preživetjem GB po diagnozi, s p-vrednostjo, manjšo 0,05. Rdeče krivulje predstavljajo skupine s signalom večjim od kritične vrednosti (GV), črne krivulje pa skupine z nižjim signalom. Črtkane krivulje predstavljajo intervale zaupanja.	68
Sl. 30: Funkcionalne povezave med proteini, ki so bili povezani tako s preživetjem (prognozo) kot tudi z anatomske lokacijo GBM tumorja v možganih, glede na analizo z orodjem Biomine.	69
Sl. 31: Porazdelitvi izmerjenih signalov proteina vinkulin (VCL) v plazmi z imunskim encimskim testom (ELISA) pri zdravih prostovoljcih in bolnikih z GBM; rdeče črtice predstavljajo mediane.....	70
Sl. 32: Rezultat prenosa western, kjer smo testirali redčine (1:50 in 1:200) združenega vzorca vseh GB in vpliv deplecije albumina na detekcijo VEGF; BD – brez deplecije, FD – frakcija deplecije.....	71
Sl. 33: Porazdelitve izmerjenih signalov proteinov CDKN1B in GNAO1 v plazmi z prenosom western pri zdravih prostovoljcih in bolnikih z GBM. Rdeči križci predstavljajo meritve bolnikov z GBM s preživetjem po diagnozi, daljšim od enega leta.....	72
Sl. 34: Porazdelitvi izmerjenih signalov proteina vinkulin (VCL) v plazmi s prenosom western pri zdravih prostovoljcih in bolnikih z GBM ob dveh različnih normalizacijah. X predstavljajo vrednosti, normalizirane glede na IgM, + predstavljajo vrednosti, normalizirane glede na reakcijo po Bradfordu.	73
Sl. 35: Rezultat hierarhičnega razvrščanja vzorcev iz celičnih linij glede na celotne profile izražanja genov. Vzorci so se razvrstili v tri ločene skupine glede na celični tip (hMSC, U-87MG ter direktne kokulture - DK).	74
Sl. 36: Shematski prikaz opravljenih statističnih primerjav. Rdeče so označene primerjave, ki smo jih iz nadaljnjih analiz izločili; kondicionirani medij (KM), monokultura (MO), indirektna kokultura (IK), direktna kokultura (DK).	75

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Primer obrazca o soglasju, uporabljenega v študiji na ZP

Priloga 2: Podrobnejši rezultati Kaplan-Meier analize z razdelitvami pri različnih mejnih vrednostih za 16 proteinov, povezanih s preživetjem GBM bolnikov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BMI	Indeks telesne mase (angl. <i>body mass index</i>)
CD4+	Celice, ki so na površju izražale označevalec pripadnosti 4 (angl. cluster of differentiation 4), ki ga pri ljudeh izražajo celice pomagalke, monociti, makrofagi in dendritične celice
cDNA	Klonirana DNA (angl. <i>cloned DNA</i>)
Ct	Pražni cikel (angl. <i>threshold cycle</i>) pri qPCR
CV	Količnik variance (angl. <i>coefficient of variance</i>)
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina (angl. etilendiaminetetraacetic acid)
EGF	Epidermalni rastni faktor (angl. <i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	Encimski imunski test (angl. <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>)
GB	Bolniki z glioblastoma multiforme, bolniki z GBM
GB _d	Bolniki z GBM, ki so po diagnozi preživeli več kot eno leto
GB _k	Bolniki z GBM, ki so umrli znotraj enega leta po diagnozi
GBM	Glioblastoma multiforme, po svetovni zdravstveni organizaciji gliomski tumor, klasificiran v razred IV
GO	Genska ontologija (angl. <i>Gene Ontology</i>)
hMSC	Človeške mezenhimske matične celice (angl. <i>human mesenchymal stem cells</i>)
HRP	Hrenova peroksidaza (angl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IB	Imunski prenos (angl. <i>immune blotting</i>)
IGF2	Inzulinu podoben rastni faktor 2 (angl. <i>insulin-like growth factor 2</i>)
IHK	Imunohistokemija
KEGG	Ontologija enciklopedije genov in genomov Univerze v Kyoto (angl. <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
KV	Kritična vrednost, vrednost izražanja proteina, na podlagi katere razdelimo vzorce v skupine pri log-rank analizi
MEV	Program MultiExperiment Viewer
mRNA	Informacijska RNA (angl. <i>messenger RNA</i>)
MS	Masna spektrometrija
NA	Neuporabna vrednost (angl. <i>not applicable</i>)
NK	Celice naravne ubijalke (angl. natural killer cells; NK)
NMT	Normalno možgansko tkivo

PCR	Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PDGF	Rastni faktor iz trombocitov (angl. <i>platelet-derived growth factor</i>)
Plazma	Človeška krvna plazma
RT-qPCR	Kvantitativni PCR v realnem času
RIHK	Radioimunohistokemija
RNA	Ribonukleinska kislina
TBM	Tetrametilbenzimid
U-87MG	Ime človeške glioblastomske celične linije
VEGF	Rastni faktor žilnega endotelija (angl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WB	Prenos western
WHO	Svetovna zdravstevna organizacija (angl. World Health Organization)
ZP	Zdravi prostovoljci
ZPm	Zdravi prostovoljci, mlajši od 40 let
ZPs	Zdravi prostovoljci, starejši od 40 let

1 UVOD

Nove tehnologije na področju molekularne biologije omogočajo pridobivanje čedalje večje količine informacij iz bioloških eksperimentov, kar pomeni, da se veča tudi število kliničnih študij kompleksnih bolezni, kot je npr. rak. Večina takih študij med sabo primerja vzorce bolnikov z različnimi načini zdravljenja določene bolezni, ali pa jih primerja z zgodovinskimi podatki. Le redko in le v omejenem obsegu pa take študije uporabljajo kot kontrolne subjekte vzorce zdrave populacije (Cai in sod., 2011; Takahashi in sod., 2010). Slednja je še posebno pomembna pri analizi bolezni, kjer ima imunski sistem velik vpliv na njen potek.

Periferna kri je razmeroma enostavno dostopno človeško tkivo in je v stiku z vsemi drugimi tkivi. Z merjenjem celičnih komponent ter številnih vodotopnih dejavnikov nam lahko veliko pove o stanju celega organizma. Zato je koristen vzorec pri tehnologijah, s katerimi opravimo veliko število meritev hkrati in s katerimi želimo dobiti vpogled v splošno stanje telesa.

V sklopu tega doktorskega dela smo z analizo vzorcev zdravih prostovoljcev (ZP) z uporabo transkriptomskih in proteomskih tehnologij žeeli najprej postaviti bazno linijo sestavin v krvi. Iz vzorcev njihove krvi smo izolirali dva tipa celic:

- celice, ki so na površju izražale označevalce pripadnosti 4 (angl. *cluster of differentiation 4*; CD4⁺), ki ga pri ljudeh izražajo celice pomagalke, monociti, makrofagi in dendritične celice;
- celice naravne ubijalke (angl. *natural killer cells*; NK).

Z uporabo tehnologije DNA mikromrež smo obema skupinama izoliranih celic analizirali transkriptom. Nato smo z uporabo mikromrež s protitelesi izmerili relativne koncentracije 656 vodotopnih proteinov v krvni plazmi. Rezultate smo validirali z uporabo različnih drugih tehnik molekularne biologije:

- kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. *real time quantitative polymerase chain reaction*; RT-qPCR);
- prenos western (angl. *western blot*; WB);
- encimski imunski test (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA).

Glioblastoma multiforme (GBM) je nabolj agresiven in za zdaj neozdravljin tumor z ekstremno visoko smrtnostjo (Van Meir in sod., 2010), anatomska lokacija tega tumorja pa še dodatno otežuje kakršnokoli zdravljenje, saj prizadene centralni živčni sistem. Odkrivaje novih krvnih bioloških označevalcev je ključnega pomena, tako znanilcev bolezni, kot tudi bioloških označevalcev, s katerimi lahko napovedujemo potek in prognozo bolezni. Zato smo uporabili meritve pri zdravih prostovoljcih (ZP) in jih primerjali z meritvami pri bolnikih z diagnozo GBM (GB). Na ta način nismo samo iskali razlik med ZP in GB, temveč tudi razlike, ki so posledica različnega tipa tumorja GBM (anatomska lokacija v možganih), kar je povezano s krajšim oz. daljšim preživetjem po postavljeni diagnozi.

Hkrati smo z razumevanjem povezav med potencialnimi biološkimi označevalci dobili podrobnejši vpogled v mehanizme, ki potekajo v GBM in telesu GB.

Poleg tega smo tudi preverili, če bi lahko matične celice uporabili pri zdravljenju GBM, kot mediator, ki preprečuje nenadzorovano delitev rakavih celic. Da bi preučili medsebojni vpliv matičnih in rakavih celic, smo analizirali izražanje genov posamezne skupine celic, glede na različne razmere gojenja:

- v monokulturi,
- v kondicioniranem mediju,
- v indirektni kokulturi (Boyden-ove komore) ter
- v direktni kokulturi.

Dobljene podatke smo primerjali med sabo in na ta način dobili pregled nad potencialno rabo matičnih celic za terapijo GBM v prihodnosti.

1.1 CILJI

- Določiti bazno linijo različnih komponent krvne plazme z analizo vzorcev zdravih ljudi.
- Postaviti protokol za uporabo mikromrež s protitelesi za analizo krvne plazme ter obdelavo dobljenih podatkov.
- Razumeti, kako različni fenotipi GBM tumorja vplivajo na proteinsko sestavo krvi.
- Najti označevalce, ki lahko pomagajo pri diagnozi in prognozi GBM, in jih potrditi z alternativno metodo.
- Raziskati medsebojni vpliv matičnih ter GBM celic *in-vitro*.

1.2 HIPOTEZE

- Izmed številnih bioloških molekul, ki jih lahko izmerimo v krvi s pomočjo »omskih« tehnologij, bo na podlagi študije zdravih prostovoljcev možno izločiti visoko variabilne molekule – tiste, ki so neuporabne kot molekulski označevalci za katerokoli bolezen.
- S primerjavo bolnikov in zdravih prostovoljcev bo možno poiskati potencialne označevalce bolezni v krvi.
- Na osnovi *in-vitro* študije interakcije med celicami GBM in mezenhimskimi matičnimi celicami bo možno oceniti potencial matičnih celic za zdravljenje bolezni.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VPOGLED V STANJE TELESA Z ANALIZO PERIFERNE KRVI

Napredne terapije kompleksnih bolezni, kot so rak in avtoimunska obolenja, so predmet raziskav in številnih kliničnih študij po vsem svetu. Večina slednjih pri analizi podatkov kot kontrolne subjekte upošteva bolnike z npr. drugačnimi protokoli zdravljenja ali z drugačnimi obolenji. Pogosto uporabljajo tudi zgodovinske prostodostopne podakte, le redko in le v omejenem obsegu pa se v takih študijah uporablja neposredna navezava na zdravo populacijo (Cai in sod., 2011; Takahashi in sod., 2010). Vse to lahko privede do napačnih sklepanj, kar pride še posebno do izraza, ko gre za raziskave vpliva imunskega sistema na stanje telesa. Zato je pomembno, da so izmerjeni podrobni parametri zdravih prostovoljcev na voljo vsem raziskovalcem.

Periferna kri je človeško tkivo, dostopno na razmeroma neinvaziven način, še posebno v primerjavi z uporabo biopsij kot alternativne tehnike diagnosticiranja. Ker kroži po celiem telesu, je v stiku z vsemi tkivi; s pomočjo celičnih in molekularnih analiz krvi je mogoče veliko povedati o fiziološkem in patofiziološkem stanju telesa. Tehnologije »omik« (genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika itd.) (Andersson in sod., 2009) so za analizo krvi zdravih prostovoljcev zelo primerne, ker omogočajo hkraten vpogled v ogromno število dejavnikov, kar pa zahteva kompleksnejšo obdelavo podatkov ter jasna znanstvena vprašanja. Metabolomske študije krvi so bile že večkrat uporabljene pri raziskovanju različnih fizioloških stanj, za pomoč pri diagnozi bolezni ter pri odzivu na terapije (Atzori in sod., 2009; Gwinner, 2007; MacIntyre in sod., 2010; Ritchie in sod., 2010; Yu in sod., 2011). Prav tako so transkriptomiko že večkrat uporabili za analizo krvi, bodisi za analizo izražanja genov enojedrnih celic (Cobb in sod., 2005; Eady in sod., 2005; Radich in sod., 2004; Whitney in sod., 2003), bodisi za analizo izražanja genov različnih subpopulacij celic imunskega sistema (Critchley-Thorne in sod., 2007; Le Dieu in sod., 2009; Palmer in sod., 2006; Xu in sod., 2004), ki so jih pred analizo izolirali. Če celic ne bi izolirali in bi analizo opravili na celokupni mRNA v krvi, bi bilo rezultate zelo težko biološko interpretirati, saj ne bi vedeli, katere celice so prispevale izmerjeno mRNA in koliko. Izražanje genov krvnih celic je tudi zelo občutljivo na postopke izolacije in se lahko spremeni *ex-vivo*, kar pomeni, da je nujna uporaba enakih postopkov manipulacije vzorcev krvi ter njihovo čimprejšnje procesiranje (Baechler in sod., 2004; Debey in sod., 2004; Härtel in sod., 2001; Tanner in sod., 2002).

Če želimo imeti celosten vpogled v fiziološko stanje človeka, moramo izmeriti čim večje število dejavnikov, ki so posledica tega stanja. To zahteva kompleksno obdelavo podatkov in je že implementirano na določenih področjih (npr. metabolomika). Kljub temu pa so zelo redke študije, ki bi združevale podatke iz različnih sodobnih metod (npr. transkriptomika, genomika, proteomika, ...), saj skupna interpretacija združenih podatkov je in ostaja izziv (Huzarewicz in sod., 2010).

2.2 VPLIV RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA VSEBINO PERIFERNE KRVI

Številne raziskave kažejo na to, da imajo dejavniki, kot so starost, spol, etično poreklo, prehrana ter stres, vpliv na število in delovanje krvnih celic. Od tega so odvisne tudi koncentracije protiteles in ostalih biološko aktivnih dejavnikov v periferni krvi. Ženske se na infekcije običajno odzovejo intenzivneje kot moški in so posledično bolj nagnjene k avtoimunskim obolenjem kot so multipla skleroza, reumatoidni arthritis in sistemski lupus eritematozus (McCombe in sod., 2009). Po drugi strani pa je staranje fiziološki proces, ki počasi zmanjšuje količino celic imunskega sistema in zavira njihove funkcije; te spremembe so tudi odvisne od spola subjekta (Dorshkind in Swain, 2009; Linton in Dorshkind, 2004; Yan in sod., 2010).

Tudi prehrana ima pomemben vpliv na imunski sistem. Primernost telesne mase ocenjujemo glede na razmerje med telesno maso in kvadratom telesne višine, kar imenujemo indeks telesne mase (angl. *body mass index*; BMI). Prehrambene motnje kot so po eni strani anoreksija in bulimija ter po drugi prekomerna telesna masa ($BMI = 25 - 30$) in debelost ($BMI > 30$), lahko vplivajo tako na celične, kot tudi na humoralne imunske odzive (Martí in sod., 2001).

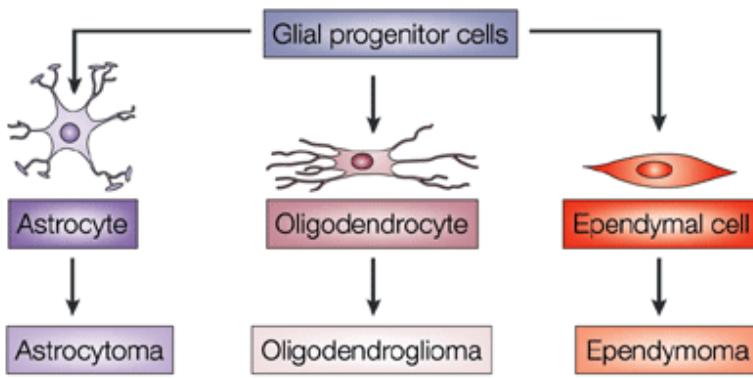
Zaradi vseh dejavnikov, ki lahko vplivajo na krvno sestavo (tako celično, kot molekularno), je za klinične študije nujno dobro poznavanje variabilnosti potencialnih bioloških označevalcev. V naši raziskavi smo tako najprej analizirali vzorce krvi zdravih prostovoljcev, in sicer ekspresijo genov krvnih celic ($CD4^+$ in NK) ter analizirali proteinsko sestavo krvne plazme. $CD4^+$ celice so bile izbrane, ker igrajo ključno vlogo pri indukciji in uravnavanju antigen-specifičnih celičnih in humoralnih prilagoditvenih imunskega odziva, NK pa zaradi njihove citolitične funkcije v sklopu prirojene imunosti.

2.3 SPLOŠNO O GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Glioma je ime za skupino možganskih ali hrbtenjačnih tumorjev. Ime so dobili po glia celicah, saj vsi gliomski tumorji izvirajo iz progenitorjev glia celic. Glede na tip glia celice, iz katerega nastanejo, jih delimo na (Slika 1):

- astrocitome: nastanejo iz astrocitov,
- oligodendrome: nastanejo iz oligodendrocytov,
- ependimome: nastanejo iz ependimskih celic.

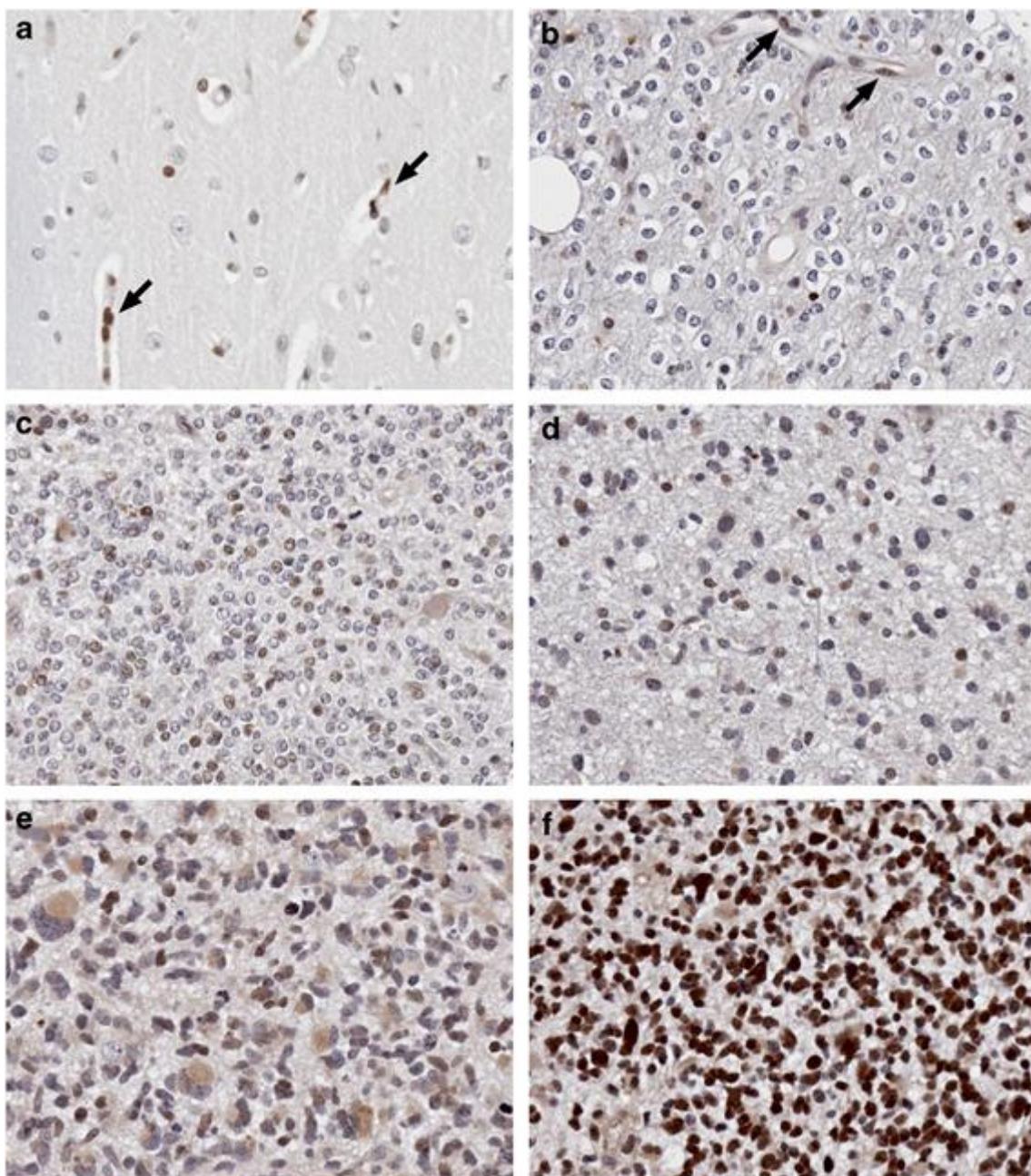
Gliomi predstavljajo 30 % vseh tumorjev centralnega živčnega sistema in 80 % vseh malignih možganskih tumorjev (Goodenberger in Jenkins, 2012).



Slika 1: Shematski prikaz različnih tipov gliomskih tumorjev glede na celični tip, iz katerega izhajajo. Vsi izvirajo iz progenitorjev glia celic (Rao, 2003).

Figure 1: Schematic illustration of different types of glioma tumours according to cell type of tumour origin. All tumours originate from glia cell progenitors (Rao, 2003).

Tumorje iz skupine gliomskih najpogosteje razlikujemo glede na stopnjo od I – IV. To delitev je priporočila Svetovna zdravstvena organizacija (angl. *World Health Organization*; WHO), kjer I označuje skupino tumorjev z najboljšo prognozo za bolnike, IV pa skupino z najslabšo. V skupinah I in II so tumorji nizke stopnje invazivnosti. Za njih je značilna dobra diferenciacija celic ter ostali benigni znaki. Kljub temu pa jih smatramo za maligne tumorje, saj se konsistentno ponovno pojavljajo po prvi kirurški odstranitvi in lahko preidejo v tumorje visoke stopnje invazivnosti (skupina III in IV). Za slednje je značilna nediferencirana anaplastična rast celic in posledično najslabša prognoza za bolnika (Slika 2). V naši raziskavi smo se osredotočili zgolj na tumorje IV stopnje, t.j. tumorje GBM.

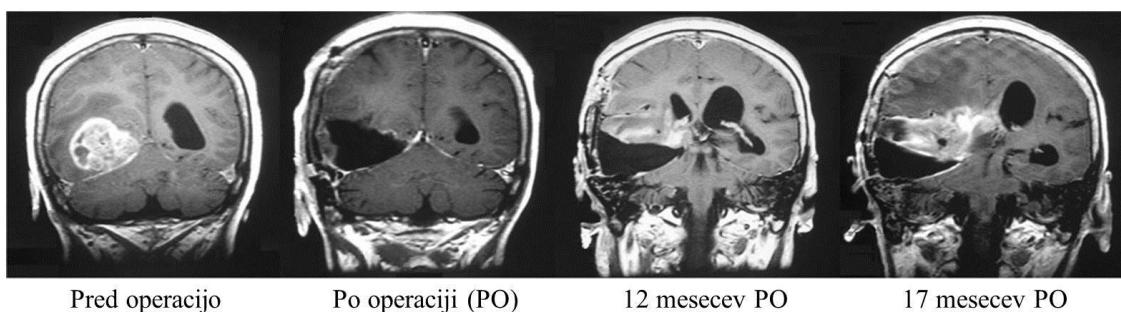


Slika 2: Barvanje s protitelesi proti HES6, ki kaže razlike med različnimi gliomskimi tipi in normalnim možganskim tkivom (a): oligodendrogliom druge stopnje (b), oligodendrogliom tretje stopnje (c), astrocitom druge stopnje (d) astrocitom tretje stopnje (e) ter glioblastom četrte stopnje (f). Puščice označujejo endotelijalne celice, originalna povečava je bila 400-kratna (Haapa-Paaninen et sod., 2012).

Figure 2: Staining with antibodies against HES6 discriminating different glioma types and normal brain tissue (a); second grade oligodendroma (b), third grade oligodendrogloma (c), second grade astrocytoma (d), third grade astrocytoma (e) and glioblastoma (f). Arrows display endothelial cells, original magnification was 400x (Haapa-Paaninen et alii, 2012).

GBM je skupina najbolj agresivnih primarnih možganskih tumorjev, ki se jih po kirurški odstranitvi tumorske mase običajno zdravi z ionizirajočim sevanjem in kemoterapijo.

Predstavljajo 20 % vseh tumorjev znotraj lobanje. Operacija je najbolj pogosta izbira zdravljenja, ki jo spremljajo pomožne terapije in obsevanja. Kljub temu pa je učinkovitost operacije kontroverzna tema, ker do zdaj še ni bilo narejenih randomiziranih kontrolnih študij (Van Meir in sod., 2010), ki bi to učinkovitost določile. Na visoko smrtnost tega tumorja kažeta tudi mediana preživetja 47 tednov (brez zdravljenja je mediana preživetja le 20 tednov) ter dejstvo, da le redki GB preživijo več kot 3 leta. K temu prispevajo posamezne tumorske celice, ki s svojo visoko infiltrativno invazivnostjo prodirajo v okoliški možganski parenhim. Obstojče tehnike zdravljenja namreč ciljajo le veliko tumorsko maso, posamezne invazivne celice pa že pred terapijo migrirajo v druge dele možganskega tkiva, kar pojasnjuje tudi ponovno pojavljanje tumorja po operaciji, pogosto tudi v drugih anatomskeh lokacijah v možganih (Slika 3).



Slika 3: Rentgenske slike možganov bolnika z GBM pred operacijo ter v časovnih razmakih po operaciji (PO). Nastanek novega GBM tkiva je viden že po 12 mesecih po operaciji (slika pridobljena v okviru raziskovalnega projekta INREMOŠ / Systher).

Figure 3: X-ray images of brain of GBM patient before surgery and in time intervals after surgery (PO). The start of new GBM tissue is visible already after 12 months after surgery (image was obtained during the research project INREMOŠ / Systher).

Preden se lahko odločimo za alternativni ali dodatni protokol zdravljenja GBM, bi morali preveriti prisotnost odpornih matičnim celicam podobnih GBM celic (Z. Huang in sod., 2010), genetsko heterogenost tumorja in razvoj tumorske rezistence zaradi uporabljenih proti-angiogenih terapij (Cruceru in sod., 2013). Zato je obvezna ugotovitev novih bioloških označevalcev, ki jih lahko spremljamo pred in po operaciji. Biološke označevalce je tudi najenostavnije spremljati v bioloških tekočinah bolnikov z manj invazivnimi tehnikami (npr. jemanje krvi ali drugih telesnih tekočin) in brez opravljanja biopsij. To nam omogoča spremeljanje stanja telesa skozi čas tudi na molekularnem nivoju, zaradi česar lahko lažje spremljamo bolezen ter odzive telesa na proteine, kar ni mogoče, če naše informacije temeljijo le na biopsijah možganov.

2.4 DIAGNOSTIKA GLIOMSKIH TUMORJEV

Boljše diagnostične in prognostične metode, ki bi lahko pomagale pri odločitvah o najustreznejši terapiji in pri ocenitvi odziva na terapijo GBM, so ključnega pomena za boj proti tej bolezni. Trenutno najbolj uporabljene diagnostične metode GBM temeljijo na histopatološki analizi rakavega tkiva, ki ima številne omejitve glede spremeljanja bolezni ter

določanja podtipov GBM. Prav tako so rezultati histopatoloških analiz vedno subjektivni, saj jih delajo na podlagi vizualne ocene vzorca zdravniki, ki niso vedno specialisti nevropatologije. Posledično obstaja velika potreba po odkrivanju novih, robustnih molekularnih označevalcev te bolezni in njihovi validaciji v večjih kliničnih študijah (Niclou in sod., 2010). Že pri določanju razreda gliomskih neoplazem se je izkazalo, da lahko rezultati odstopajo od 23 % do 43 % (Aldape in sod., 2000; Bruner in sod., 1997), odvisno od tega ali je bil zdravnik specializiran za nevropatologijo. To se vsekakor pozna na izzidu bolezni pri številnih bolnikih in igra vlogo pri interpretacijah rezultatov kliničnih študij. Kljub hitremu razvoju molekularne diagnostike in prognostike pa napredovanje tumorja še vedno v večini primerov spremljajo z neinvazivnimi tehnikami, kot je npr. magnetna resonanca. Ravno pri teh tehnikah je največji problem razločevati majhne razlike v spremembah tumorja (Cha, 2006), saj lahko izgled nastajajočega tumorja zlahka pripisemo poškodbam tkiva zaradi radiološkega obsevanja. Nedavno pa je z uporabo novih proti-angiogenskih zdravil zaradi manjšega področja kontrastiranja postalo tudi težje oceniti realen volumen tumorja (Verhoeff in sod., 2009).

Za natančnejše spremeljanje bolezni je potrebno razviti metode, ki temeljijo na molekularnih označevalcih; proteinih, ki so v periferni krvi ali biopsiji bodisi specifični za določeno bolezensko stanje, bodisi v kombinaciji z drugimi proteini tvorijo »molekularni podpis« določenega stanja. Na ta način lahko spremljamo tudi različne podtipe rakov, ki na prvi pogled izgledajo podobno, vendar pri razmnoževanju in invaziji uporabljajo različne molekulske strategije. Ravno poznavanje in razumevanje slednjih lahko privede do odkrivanja tarčnih pristopov zdravljenja GBM. K odkrivanju takih bioloških molekularnih označevalcev običajno pristopimo v treh korakih:

- Presejalni testi: pogosto jih izvajamo na manjšem številu vzorcev, pregledamo pa velike količine meritev posameznega vzorca. Glede na rezultate nato izberemo enega ali kombinacijo več potencialnih bioloških označevalcev, ki jih nato preverimo na večjem vzorcu.
- Validacija metode: najprej na vzorcih, uporabljenih v presejalnem testu, naredimo validacijo nove metode, ki bo uporabljena za klinično validacijo. Običajno to niso enake metode kot pri presejalnih testih, saj bolj ciljano analizirajo le enega ali manjšo skupino bioloških označevalcev. Ta metoda mora ponoviti rezultate presejalnih testov.
- Klinična validacija: v klinični študiji na velikem številu novih vzorcev validiramo natančno metodo za detekcijo bioloških označevalcev ter način obdelave rezultatov z določitvami kritičnih vrednosti testa. Po uspešni klinični študiji se tako dobljeni molekularni biološki označevalci lahko začnejo uporabljati v rutinski diagnostiki. Taki biološki označevalci lahko nato pomagajo pri identifikaciji bolezni, pri določitvi podtipa bolezni ter pri izbiri in spremeljanju ustrezne terapije.

Za odkrivanje novih potencialnih proteinskih bioloških označevalcev, ki kasneje vstopajo v korake validacije, so najbolj primerne nove metode na področju sistemске biologije, kot so genomika, metabolomika, transkriptomika ter druge omike. Mednje spadajo tudi metode proteomike, ki lahko v enem poskusu ugotovijo in izmerijo koncentracijo več sto do več tisoč proteinov hkrati. Med glavne metode proteomike štejemo številne pristope masne spektrometrije, dvodimenzionalno elektroforezo ter mikromreže s protitelesi. Te metode se

običajno ne uporabljajo v rutinski diagnostiki, saj so novejše in njihova natančnost še ni bila dobro ovrednotena. Vsekakor pa so primerne za presejalne teste pri identifikaciji novih potencialnih bioloških označevalcev, saj lahko v enem eksperimentu hkrati spremljamo veliko število različnih peptidov oz. proteinov (Niclou in sod., 2010).

2.5 BIOLOŠKI OZNAČEVALCI GLIOBLASTOMA MULTIFORME V TELESNIH TEKOČINAH

Do zdaj je bilo izvedeno malo raziskav, ki so se ukvarjale z iskanjem bioloških označevalcev v telesnih tekočinah GB, saj GBM le redko metastazira v druge dele telesa (Martens in sod., 2013). A vendar je bilo za identifikacijo GBM bioloških označevalcev uporabljenih nekaj različnih proteomskeh pristopov:

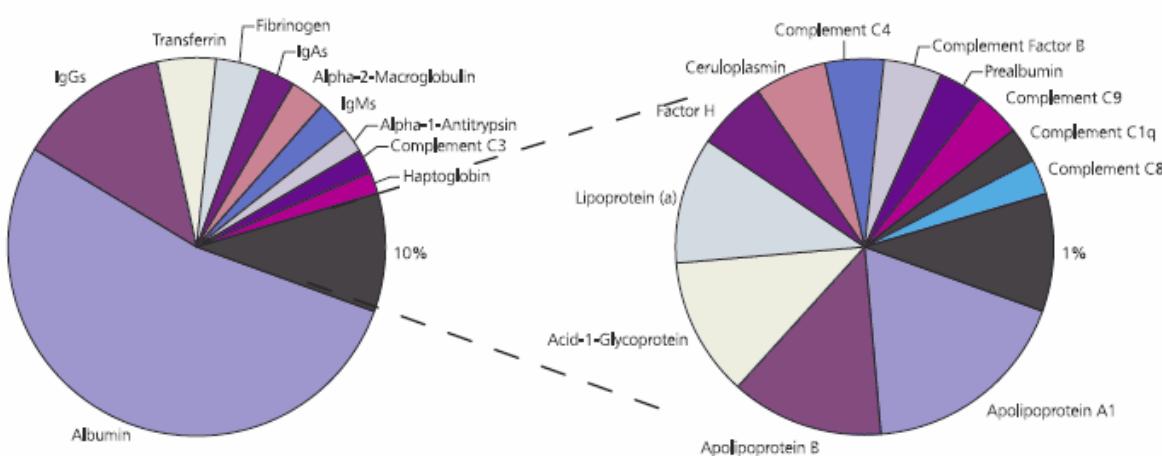
- analiza cerebrospinalne tekočine GB (Com in sod., 2012; Fang in sod., 2012; Sato in sod., 1998),
- analiza krvne plazme GB (Carlsson in sod., 2010; Gautam in sod., 2012),
- analiza krvnega seruma GB (Elstner in sod., 2011; Gollapalli in sod., 2012).

Poleg tega so tudi *in-vitro* študije GBM celičnih kultur pokazale, da GBM celice izločajo vrsto potencialnih bioloških označevalcev, od metabolitov (Desoubz danne in sod., 2010) do proteinov (Gupta in sod., 2013). Na ta način so z diagnozo GBM in tumorsko angiogenezo povezali rastni faktor žilnega endotelija (angl. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), enega najbolj raziskanih kemokinov (Takano in sod., 1996). Da bi lahko VEGF uporabili v kliničnih aplikacijah, bi ga bilo potrebno potrditi v večjih kliničnih študijah, kar pa jim ni uspelo (Lu in Bergers, 2013).

V telesne tekočine bolnika lahko potencialne biološke označevalce izločajo tudi stromalne celice, ki sestavljajo GBM mikrookolje. Kot uporabni biološki označevalci lahko služijo nekateri izmed obilice citokinov, ki jih izločajo celice imunskega sistema, saj te celice prihajajo v stik s tumorsko maso in zavirajoče vplivajo na tumor. Pred kratkim je bil tako odkrit kemokin CCL2/MCP-1, modulator imunskega sistema, ki so ga izločale mezenhimske matične celice, gojene v kokulturi z GBM celicami *in-vitro*, in z njim zavirale invazivnost GBM celic (Motaln in sod., 2012). To kaže na pomembnost prispevka mikrookolja GBM tumorja, katerega je potrebno imeti v mislih, ko se sprašujemo o izvoru plazemskih bioloških označevlancev. Poleg tega je bilo pokazano, da celične kulture možganskih celic izločajo mikrovezikel, bogate s proteinimi, ki jih najdemo tudi v plazmi bolnikov (Graner in sod., 2009), kar je za nas predstavljalо utemeljitev za iskanje bioloških označevalcev za GBM v plazmi človeške krvi.

Proteinske pestrosti plazme pa ne opazimo zgolj kot raznolikost v proteinih, temveč tudi kot raznolikost velikostnih razredov koncentracij proteinov. Več kot polovico vseh proteinov v plazmi predstavlja albumin, deset proteinov z najvišjimi koncentracijami pa predstavlja 90 % vseh proteinov v plazmi (Slika 4). Zato so nedavno za namen iskanja bioloških označevalcev GBM izvedli poskus, v katerem so s tekočinsko kromatografijo in masno spektrometrijo analizirali krvno plazmo GB, ki so jo predhodno osiromašili 16

proteinov z najvišjimi koncentracijami v plazmi (Gautam in sod., 2012). Masno sprekrometrijo sicer pogosto uporabljamo za iskanje potencialnih bioloških označevalcev za rakava obolenja, vendar tako zasnovano presejalno analizo moti nekaj proteinov, ki so v plazmi prisotnih v zelo visokih koncentracijah (Diamandis, 2004). Za uspešno presejalno analizo je tako potrebno vzorce osiromašiti najbolj pogostih proteinov, bodisi s precipitacijo, bodisi z adsorpcijo. Ker pa lahko kolone za siromašenje vežejo proteine tudi nespecifično (T. Liu in sod., 2006), lahko tako siromašenje vpliva na končne izmerjene vrednosti koncentracij proteinov v vzorcu. V naši študiji smo se zato odločili uporabiti neosiromašeno plazmo in smo na ta način obdržali celotno pestrost vzorca in kvantitativnost pridobljenih podatkov.



Slika 4: Proteini z najvišjimi koncentracijami v plazmi (povzeto po izbraževalnem materialu proizvajalca proteomskega reagenta Sigma Aldrich).

Figure 4: Proteins with highest abundance in plasma (image was obtained from information sheets of proteomic reagents manufacturer Sigma Aldrich).

2.6 MATIČNE CELICE ZA ZDRAVLJENJE RAKA

Za učinkovit boj proti GBM je potrebno ciljano ustaviti rast rakavih celic, saj so posamezne celice razpršene po veliki prostornini možganskega parenhima (Louis in sod., 2007; Ohgaki in Kleihues, 2007). V preteklosti so bili odkriti številni mediatorji, ki pospešujejo invazivnost različnih tipov raka. Med njimi so tudi:

- epidermalni rastni faktor (angl. *epidermal growth factor*; EGF),
- inzulinu podoben rastni faktor 2 (angl. *insulin-like growth factor*; IGF2),
- rastni faktor iz trombocitov (angl. *platelet derived growth factor*; PDGF).

Ti mediatorji spodbujajo celično mobilizacijo (Wu in sod., 2008), njihovi geni pa imajo povečano izražanje tako v primarnih kot sekundarnih gliomih. Signalne poti teh mediatorjev bodisi aktivirajo, bodisi inhibirajo gene povezane s proliferacijo, migracijo in adhezijo (Demuth in sod., 2008; Lah in sod., 2006; Mariani in sod., 2001). Iz tega sledi, da

bi lahko z aktivacijo genov v GBM, ki delujejo proti migraciji tumorskih celic, znižali malignost GBM, kar bi lahko postalo zelo uporabno orodje v kliniki.

Da bi na ta razmeroma neinvazivni način lahko zdravili GBM, so v preteklosti že opravili študije, ki so preučevale, kako bi lahko vplivali na izražanje genov v GBM celicah. Preiskovali so, kako z različnimi ligandi (protitelesa, nanodelci, liposomi z zdravilnimi učinkovinami ter virusnimi vektorji) vplivajo na malignost tumorja, z vbrizgavanjem na mesto tumorja. Na ta način so bili uspešni na ravni celičnih kultur (Bexell in sod., 2010), vendar pa rezultatov niso mogli reproducirati *in vivo* (Pulkkanen in Yla-Herttuala, 2005).

Bistveno bolje pa so se kot vektor vnosa aktivnih učinkovin v nekaterih raziskavah izkazale multipotentne humane mezenhimske celice (hMSC) (Bexell in sod., 2010) ter dendritične celice (Cho in sod., 2009). Razlog za to je tumor-tropična narava hMSC celic, zaradi katere se celice enostavno vdrejo v celično maso tumorja, kamor nato dostavijo želene aktivne učinkovine. Ker tudi te celice migrirajo po možganih, lahko dosežejo predele, ki jih s kirurško operacijo ni mogoče doseči (Blandini in sod., 2010; Hong in sod., 2009).

Pri uporabi matičnih celic kot vektorjev vnosa obstaja tudi vrsta tveganj. Matične celice lahko ob stiku z dejavniki v tumorskem mikrookolju začnejo stimulativno vplivati na tumorske celice. Pokazali so, da lahko naivne, genetsko nespremenjene hMSC spodbujajo rast nekaterih tumorjev (Coffelt in sod., 2009; Karnoub in sod., 2007; Zhu in sod., 2006). Kljub temu obstajajo študije, kjer hMSC zavirajo rast določenih tumorjev, med drugim tudi GBM (Khakoo in sod., 2006; Maestroni in sod., 1999; Nakamura in sod., 2004; Otsu in sod., 2009). Za klinično uporabo hMSC celic v terapevtske namene GMB je zato ključnega pomena razumevanje načina komunikacije med hMSC in GBM celicami in kako ta vpliva na oba tipa celic.

Terapija s hMSC se v kliniki ne uporablja zaradi nerazumevanja vplivov med hMSC in GBM celicami. Zato smo se odločili, da bomo preučili kako te celice medsebojno vplivajo na izražanje genov *in vitro*.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZBOR VZORCEV

3.1.1 Etična izjava

Naše raziskovalno delo je potekalo tudi na človeških vzorcih krvne plazme, za kar smo pridobili dovoljenje državne etične komisije. Študija na zdravih prostovoljcih (ZP) je bila registrirana v dokumentu št. 149/05/08, študija na bolnikih z GBM (GB) pa v dokumentu št. 90/01/11. Slednja je registrirana tudi pri ClinicalTrials.gov (identifikacijska koda: NCT01525459). Vsi subjekti, udeleženi v študijah, so podpisali obrazec za soglasje (Priloga 1).

3.1.2 Zdravi prostovoljci

ZP so bili izbrani tako, da so predstavljal popolnomsko porazdelitev glede na starost, spol in indeks telesne mase in so bili natančneje okarakterizirani v študiji zdravih prostovoljcev (Gruden in sod., 2012). Vključitveni kriterij, na podlagi katerega so bili ZP sprejeti v študijo, je bila starost (20 – 60 let). Izključitveni kriteriji so bili zgodovina akutnih ali kroničnih obolenj, nosečnost, kajenje in oralna uporaba kontracepcijskih sredstev ali drugih zdravil. Vsak potencialni ZP je bil tudi pregledan za znake virusne ali bakterijske okužbe bolezni, prenosljivih s krvjo (sifilis, HIV, hepatitis B in hepatitis C). Noben ZP ni bil nikoli diagnosticiran z neoplastično boleznijo. Zgornjo starostno mejo 60 let smo izbrali, ker le redki prostovoljci, starejši od 60 let, ustrezajo merilom za izbor v študijo na podlagi izključitvenih kriterijev.

Vsi ZP ($n = 17$) so bili belci in so bili dobrega zdravja v času vzorčenja. Vsakemu ZP smo odvzeli kri trikrat v enem tednu, samo enemu je bila kri odvzeta le enkrat, skupno torej 49 vzorcev po 8 mL. Krvne vzorce smo pobirali na tešče med 7:00 in 9:00 uro. Vsakemu ZP smo ob prvem odvzemenu krvi zabeležili BMI, spol in starost (Preglednica 1).

Preglednica 1: Podatki o zdravih prostovoljcih, vključenih v študijo.

Table 1: Information about the healthy volunteers, included in the study.

Št. vzorca	BMI	Spol	Starost [leta]
194	23,3	M	24
199	24,4	F	25
263	23,5	F	26
201	22,8	F	27
256	21,2	F	27
251	24,5	F	28
211	22,5	M	30
237	27,2	M	30
234	22,5	F	43
236	22,6	F	45
203	28,1	M	48
206	21,6	F	48
205	30,0	M	50
198	24,6	M	53
200	30,1	F	54
209	23,5	M	57
235	/	M	> 40

3.1.2.1 Izolacija RNA iz krvnih celic zdravih prostovoljcev

Za analizo izražanja genov krvnih celic ZP smo izolirali RNA iz celičnih populacij NK ter CD4+. Periferno kri ZP smo zbirali v 8 ml centrifugirke Vacutainer® CPT™, ki so predhodno vsebovale 1,0 mL 0,1 M natrijevega citrata za preprečevanje strjevanja krvi ter gel za ločevanje različnih populacij krvnih celic (Beckton, Dickinson and Company, kataloška št. 362782). Za ločitev populacij krvnih celic smo kri centrifugirali 20 min pri 1800 g in pri sobni temperaturi. Po centrifugi smo sloj mono-jedrnih celic nad gelom odstranili in ga suspendirali v fosfatnem pufru v novi mikrocentrifugirki. To smo nato centrifugirali 10 minut pri 300 g, celični sediment pa smo nato resuspendirali v 200 ml fosfatnega pufra z 2% govejim albuminom in 1 mM etilendiaminetetraocetno kislino (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*; EDTA).

Za izolacijo posameznih celičnih tipov smo najprej uporabili komplet EasySep Human CD4 Positive Selection Kit (Stemcell Technologies), da smo ločili celice CD4+, iz preostanka celic pa smo nato izolirali še celice NK z uporabo kompleta EasySep Human CD56 Positive Selection Kit (Stemcell Technologies). Izolanim celicam smo odstranili majhno frakcijo, s katero smo ocenili število in živost celic, ostale pa smo nemudoma zamrznili pri -80°C do ekstrakcije RNA. Vsi vzorci so bili obdelani znotraj ene ure od odvzema krvi ZP.

Iz celic smo nato izolirali RNA z uporabo kompleta RNeasy Mini (Qiagen). Genomsko DNA smo odstranili z dodatkom DNaze I (Invitrogen), vzorce RNA pa smo nato koncentrirali z uporabo kompleta RNeasy miniElute Cleanup Kit (Qiagen).

Podrobneje so bili ti protokoli objavljeni v študiji zdravih prostovoljcev (Gruden in sod., 2012).

3.1.3 Bolniki z glioblastoma multiforme

Vključitvena kriterija, na podlagi katerih so bili GB vključeni v študijo, sta bila prva diagnoza primarnega malignega glioma (WHO grade IV, GBM) in starost (20 – 80 let). Diagnoza je bila opravljena po kirurški operaciji po standardnih kliničnih in histopatoloških analizah tumorskega tkiva na Oddelku za nevrokirurgijo v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana ter na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete. Izključitvena kriterija sta bila nosečnost in metastaze. Nihče od GB ni kadil ali jemal kontracepcijskih sredstev vsaj en mesec pred vzorčenjem.

Vsi udeleženci študije so bili belci. Vsakemu smo kri odvzeli na dan operacije, dan po operaciji in en teden po operaciji na rednem pregledu, skupaj torej 51 vzorcev. Krvne vzorce smo pobirali na tešče med 7:00 in 9:00 uro po 8 mL.

Vsakemu GB smo ob prvem odvzemenu krvi zabeležili BMI, spol, starost in fiziološke simptome. Kasneje smo spremljali tudi anatomska lokacijo tumorja ter preživetje posameznikov (Preglednica 2).

Preglednica 2: Podatki o bolnikih z GBM, vključenih v študijo.

Table 2: Information about the GBM patients, included in the study.

Vzorec	BMI	Spol	Starost	Prež.	Lokacija	Simptomi pred operacijo
258	25.2	M	46	13	Frontalno (L), temporalno (D)	Disfazija in levostranska hemipareza.
233	27.0	M	51	18	Frontalno (D)	Levostranska hemipareza, psihoorganska prizadetost.
240	26.3	F	51	414	Temporalno (L)	Afazija in desnostranska hemipareza.
202	29.8	F	53	137	Temporalno (D)	Glavobol, bruhanje, psihoorganska spremenjenost, levostranska hemipareza.
257	30.3	M	53	832	Frontalno (L)	Glavobol, disfazija in psihoorganska spremenjenost.
207	23.5	M	57	293	Frontalno- temporalno (L)	Glavobol, vrtoglavice.
262	28.3	F	57	461	Frontalno (D)	Motorična afazija, desnostranska hemipareza, delen epi-napad.
227	23.7	F	61	110	Okcipitalno (D)	Levostranska homonimna hemianopsija, levostranska hemipareza.
229	27.8	M	61	61	Okcipitalno- parietalno (L)	Afazija, desnostranska hemipareza, psihoorganski sindrom.
196	26.1	M	62	442	Frontalno (D)	Levostranska hemipareza, glavobol.
259	26.3	M	63	312	Temporalno (D)	Glavogol, psihoorganska spremenjenost, levostranska hemipareza.
210	/	M	64	379	Frontalno- temporalno (D)	Epileptični napad, levostranska hemipareza.
231	29.4	M	67	274	Okcipitalno- parietalno (L)	Psihoorganska spremenjenost.
241	20.0	F	67	76	Temporalno- parietalno (L)	Psihoorganska spremenjenost, desnostranska hemipareza, disfazija.
208	21.1	M	68	207	Frontalno (D)	Glavobol, psihoorganska spremenjenost, disfazija.
250	27.6	F	68	22	Temporalno (D)	Glavobol, levostranska hemipareza.
228	26.1	M	72	312	Frontalno- temporalno- parietalno (L)	Psihoorganska spremenjenost, desnostranska hemipareza, disfazija.

Starost je v letih, prež. je preživetje v dnevih od prve diagnoze z GBM do smrti bolnika. Lokacija predstavlja anatomske lokacije tumorja GBM glede na možganski reženj, v katerem se je razrasel, velika začetnica v oklepaju pa pomeni levo (L) ali desno (D) možgansko hemisfero.

3.1.4 Izolacija krvne plazme iz vzorcev zdravih prostovoljev in bolnikov z glioblastoma multiforme

Vsem ZP in GB smo izolirali in shranili plazmo, skupaj torej 34 vzorcev. Po centrifugiranju 8 mL zbrane periferne krvi v centrifugirkah Vacutainer® CPT™ smo nad slojem eno-jedrnih celic odstranili plazmo, jo alikvotirali v več 2-mL mikrocentrifugirk in shranili vse vzorce pri -80°C do analize. Vsi vzorci so bili procesirani v roku ene ure od odvzema.

3.1.5 Celične linije

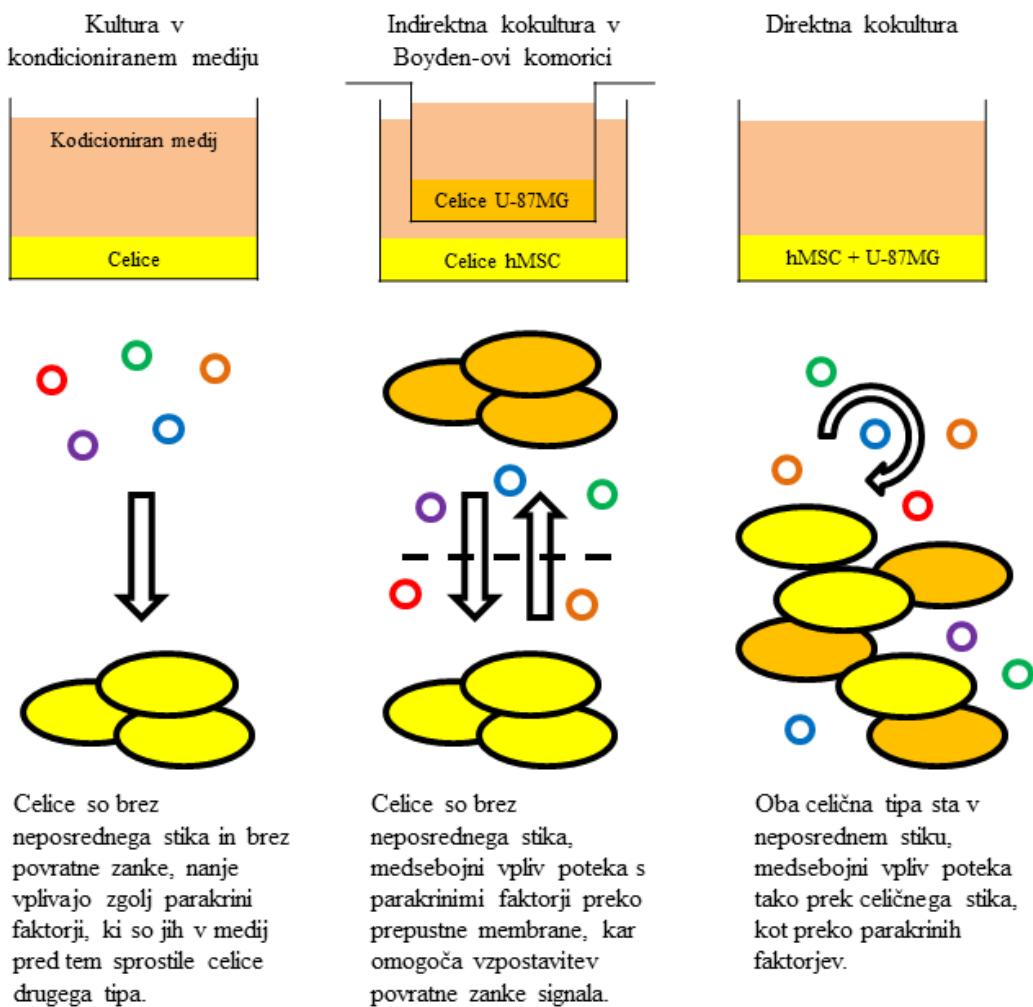
Želeli smo preučiti medsebojni vpliv na izražanje genov človeških matičnih celic in rakavih celic, če te celice živijo v posrednem ali neposrednem stiku v primerjavi z gojenjem v monokulturi. Za to smo uporabili komercialno dostopni celični liniji:

- linijo človeških mezenhimskih matičnih celic (angl. human mesenchymal stem cells; hMSC), ki je pripadala 33 let staremu moškemu (Lonza Bioscience, kataloška št. 6F4085);
- linijo človeških celic možganskega tumorja (ime celične linije: U-87MG, American Type Culture Collection).

Gojenje celic in izolacija RNA sta bila izvedena na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo s strani dr. Helene Motaln. Izražanje genov smo preverili z uporabo DNA-mikromrež. Obe celični liniji smo do eksperimentov gojili v istem mediju in presadili pri 75% konfluenci. Celice smo vedno nasajevali z gostoto 15.000 celic / cm². Za eksperimente smo uporabili hMSC sedme pasaže ter U-87MG 40. pasaže.

V eksperimentih smo U-87MG in hMSC gojili na štiri različne načine (Slika 5):

- kot monokulture (služile so kot kontrolne celične linije, brez vpliva drugih celičnih linij),
- kot monokulture v kondicioniranem mediju (celična linija je rastla v mediju, v kateremu je pred tem rastla druga celična linija),
- kot indirektne kokulture (za gojenje so bile uporabljene Boyden-ove komorice; celični liniji rasteta v istem prostoru in mediju, med sabo sta ločeni le s prepustno membrano, katere pore so premajhne, da bi lahko celice migrirale skozi),
- kot direktne kokulture (skupaj smo zmešali enako število U-87MG kot hMSC, in sicer v dveh začetnih skupnih gostotah; eni, ki je bila enaka kot v ostalih razmerah gojenja ter drugi, ki je bila dvakrat večja).



Slika 5: Shematski prikaz različnih načinov gojenja celičnih linij U-87MG in hMSC, uporabljenih v študiji. V direktnih in indirektnih kokulturah lahko celični liniji vplivata ena na drugo le preko parakrine komunikacije z različnimi vodotopnimi dejavniki.

Figure 5: Schematic illustration of different culture conditions of cell lines U-87MG and hMSC, used in the study. In direct and indirect cocultures cell lines can affect each other only by parakrine communication with various water soluble factors.

Vse celične linije so bile gojene v treh bioloških ponovitvah za vsak način gojenja. Izražanje genov smo preverili z uporabo DNA-mikromrež Human WG-6 v3 Expression BeadChip (Illumina). Hibridizacija in zajem grobih podatkov sta bila narejena v Cluster in Biomedicine Centre v Bazovici, Italija, ki je uradni zastopnik za opravljanje storitev podjetja Illumina.

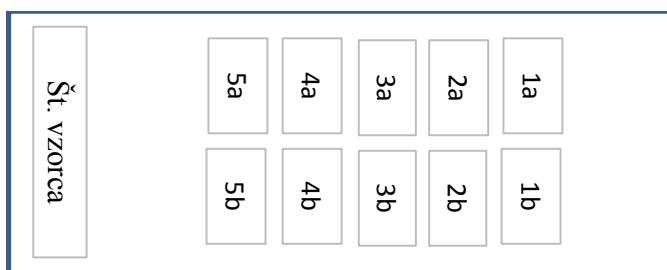
3.2 PROGRAMSKO STATISTIČNO OKOLJE R

Za namene analiz bioinformatike smo uporabljali programsko statistično okolje R, verzija 2.15.1, s prednaloženimi osnovnimi knjižnicami. V tekstu je navedeno, kdaj smo okolje R uporabili in v koliko so bile za opravljeno analizo potrebne dodatne knjižnice.

3.3 MIKROMREŽE S PROTITELESI

3.3.1 Tip in postavitev mikromreže s protitelesi

Za analizo proteinske sestave krvne plazme ZP in GB smo uporabili mikromreže s protitelesi tipa Explorer antibody array (Full Moon BioSystems). Vsaka mikromreža je bila sestavljena iz 10 sklopov točk s protitelesi, ki so bila na stekelce nanešena v formatu 5x2 (Slika 6). Stolpec A in stolpec B, vsak vsebujoč po pet sklopov točk s protitelesi, sta bila enaka in tako predstavljala tehnični ponovitvi (vsaka točka v stolpcu A je vsebovala enako protitelo kot pripadajoča točka v stolpcu B). Prvi štirje sklopi (1 - 4) so vsebovali vsak po 128 točk s protitelesi (matrika 8 x 16 točk), peti sklop pa je vseboval 144 točk s protitelesi (matrika 9 x 16 točk), skupaj torej 656 različnih točk s protitelesi, vsaka podvojena (1312 vseh točk protiteles na posamezni mikromreži).



Slika 6: Shematski prikaz mikromreže s protitelesi ter razporeditev posameznih sklopov protiteles na mikromrežnem stekelcu.

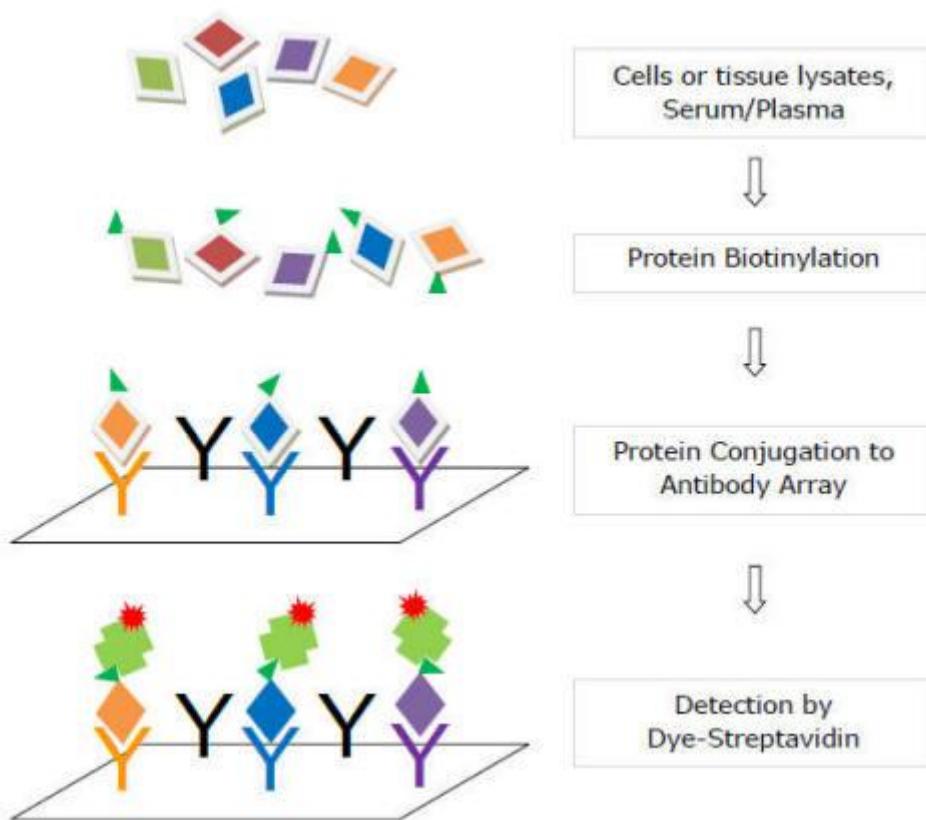
Figure 6: Shematic illustration of antibody array and distribution of individual sectors of antibody spots on antibody array slide.

Stekelce je bilo veliko 76 x 25 x 1 mm, točke s protitelesi na njem pa so imele premer 220 do 250 µm. Točke znotraj istega sklopa so bile med seboj oddaljene 450 µm. Protitelesa so bila mišjega ($n = 409$), zajčjega ($n = 223$) ali podganjega ($n = 24$) izvora, nekatera so bila monoklonska ($n = 476$), nekatera poliklonska ($n = 180$).

3.3.2 Princip delovanja mikromrež s protitelesi

V tipičnem eksperimentu z mikromrežami s protitelesi proteine v vzorcu najprej nespecifično označimo z biotinom in dodamo mleko v prahu. Nato v postopku hibridizacije s takimi proteinskimi vzorci prelijemo stekelca z nanešenimi protitelesi. Proteini se vežejo na pripadajoča protitelesa, število zasedenih vezavnih mest pa je

sorazmerno količini specifičnega proteina v vzorcu. Območje linearnosti sicer ni veliko (2-3 velikostne razrede), vendar je dovolj veliko za relativno kvantifikacijo. Vse nevezane proteine nato speremo iz stekelca. Na vezane proteine vežemo barvilo, ki je kovalentno vezano na streptavidin. Zaradi močne vezi biotin-streptavidin se barvilo veže le na proteine iz vzorca. Z optičnim meritvom nato izmerimo intenziteto barvila, ki je prav tako sorazmerna količini proteina na posamezni točki ter posledično količini proteina v prvotnem vzorcu (Slika 7).



Slika 7: Shematski prikaz postopka detekcije proteinov s tehnologijo mikromrež s protitelesi (slika povzeta iz protokola proizvajalca mikromrež s protitelesi FullMoon Biosystems).

Figure 7: Schematic illustration of process of protein detection with antibody array technology (image obtained from protocol of antibody array manufacturer FullMoon Biosystems).

3.3.3 Priprava plazemskih vzorcev za hibridizacijo

V analizi s protitelesi smo od vseh vzorcev uporabili le vzorce, zbrane prvi dan v primeru ZP (17) ter na dan operacije pri GB (17). Vseh 34 vzorcev krvne plazme od ZP in GB je bilo analiziranih z mikromrežami s protitelesi. Vsak vzorec (800 µL) smo odtajali v centrifugi 10 min pri 20817 g in 4°C, kot je to priporočil proizvajalec. Potem smo 400 µl srednjega čistega sloja prenesli v novo mikrocentrifugirko, s čimer smo se znebili večjih nečistoč v vzorcu. Vzorce smo nato analizirali s tehniko mikrovolumske spektroskopije s

spektrofotometrom NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), s čimer smo potrdili čistočo vzorca, ter ocenili celokupno koncentracijo proteinov z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm. Dvema μl vsakega vzorca smo izmerili UV absorbanco, pri čemer smo iskali dva ločena vrhova pri valovnih dolžinah 200 - 230 nm ter 240 - 280 nm.

Naš poskus smo zasnovali tako, da smo vsak vzorec analizirali na eni mikromrežni ploščici s protitelesi, po navodilih proizvajalca. Vzorci so bili analizirani v petih šaržah. Da bi se znebili šaržnega efekta, je bilo v vsaki šarži enako število naključnih ZP in GB vzorcev. Na proteine v vzorcih ($20 \mu\text{l}$) smo vezali biotin; v vsak vzorec smo dodali 3 μl biotina v N,N-dimetil formamidu s koncentracijo 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Oboje je bilo del kompleta, ki smo ga dobili skupaj z mikromrežami s protitelesi od proizvajalca.

3.3.4 Aktivacija mikromreže s protitelesi in hibridizacija

Mikromrežnim stekelcem s protitelesi smo najprej blokirali mesta, na katera bi se lahko proteini vezali nespecifično. V ta namen smo jih inkubirali z raztopino mleka v prahu v čisti vodi (3 % teže na volumen), pri čemer so se proteini iz mleka vezali na morebitna nespecifična vezavna mesta na stekelcih. Zatem je sledil proces hibridizacije (združevanje mikromrežnih stekelc ter vzorcev); s pripravljenimi raztopinami vzorcev smo prekrili pripadajoča mikromrežna stekelca in jih pustili v temi za 2 uri. Stekelca smo desetkrat intenzivno sprali v destilirani vodi, jih potopili v Cy3-Streptavidin raztopino (GE Healthcare) in pustili za 20 minut v temi.

Nato smo mikromrežna stekelca ponovno desetkrat sprali z destilirano vodo. Po spiranju smo jih nemudoma posušili s centrifugiranjem pri 142 g za 2 minuti. Tako pripravljena stekelca smo skenirali z laserjem LS200 Scanner (Tecan), pri čemer smo uporabljali laser valovne dolžine 543nm, filter senzorja pa je prepuščal le svetlobo valovne dolžine 590 nm z resolucijo 10 μm .

3.3.5 Analiza slik mikromrež s protitelesi

Grobe slike mikromrežnih ploščic smo bile analizirali s programsko opremo ImaGene (BioDiscovery). Točke slabe kvalitete, kot so točke z nehomogenim signalom, artefakti, kometnimi repi ipd., so bile s privzetimi nastavtvami programske opreme avtomatsko označene kot »točke slabe kakovosti«. Nato smo slike pregledali tudi ročno in dodatno označili točke, ki jih je programska oprema spregledala.

Če povprečen signal točke na mikromreži s protitelesi ni bil višji od dvojnega standardnega odklona ozadja okoli te točke, je program s privzetimi nastavtvami to točko označil kot »prazno točko«.

3.3.6 Statistična obdelava podatkov

3.3.6.1 Kontrola kakovosti

Po odčitavanju vrednosti ter po avtomatski in ročni kontroli kakovosti smo iz programa ImaGene (BioDiscovery) izvozili tabelo rezultatov, v kateri smo za vsako točko s protitelesi dobili dve meritvi. Vsaka točka s protitelesi je bila na mikromrežnem stekelcu natisnjena dvakrat (replikat). Za vsako od meritov smo imeli v ločenih tabelah tudi informacijo o avtomatskemu nadzoru kakovosti; točka je bodisi prešla nadzor kakovosti, bodisi je bila označena kot prazna točka ali točka slabe kakovosti. Tako j zatem smo vsem točкам, označenim kot »točke slabe kakovosti«, pripisali vrednost NA (angl. *not applicable*; NA), kar pomeni, da meritve teh točk niso bile upoštevane v nadaljnjih korakih analize.

3.3.6.2 Normalizacija

Glede na to, da smo želeli čim bolj poustvariti klinične razmere, smo želeli čim manjšo obdelavo vzorcev pred analizo. Ker so se vzorci razlikovali po sestavi in koncentraciji proteinov med subjekti, smo morali rezultate normalizirati. Preizkusili smo različne type normalizacije:

- GeNorm normalizacija: pri tej normalizaciji smo uporabili algoritem GeNorm (Vandesompele in sod., 2002) za določitev proteinov z najbolj stabilnimi koncentracijami v vseh vzorcih. Izmed štirih najbolj stabilnih proteinov smo izračunali geometrijsko sredino vrednosti izražanja med vsemi mikromrežnimi stekelci. Obratna vrednost te vrednosti je predstavljala faktor normalizacije, s katerim smo pomnožili vsako vrednost pripadajoče mikromreže.
- Normalizacija glede na srednjo vrednost: meritve smo normalizirali tudi z normalizacijo izravnovanja srednjih vrednosti, in sicer tako, da smo dobili poravnane povprečne vrednosti ali mediane posameznih mikromrežnih ploščic. Izračunali smo srednjo vrednost meritve med vsemi ploščicami in jo nato delili s srednjo vrednostjo posamezne mikromrežne ploščice. Dobavljeni količnik je predstavljal faktor normalizacije, s katerim smo množili vse meritve na pripadajoči mikromrežni ploščici. Za srednjo vrednost smo vzeli tako povprečje kot mediano.
- Kvantilna normalizacija: s to normalizacijo smo izenačili vse kvantile med različnimi mikromrežnimi ploščicami (Bolstad in sod., 2003). Izvedli smo jo v programskem okolju R z uporabo knjižnice *lumi* iz spletnega portala Bioconductor (Du in sod., 2008).

Vse nadaljnje obdelave so potekale na meritvah, normaliziranih s kvantilno normalizacijo.

3.3.6.3 Imputacija vrednosti praznih točk

Med dvema replikatoma z istim protitelesom na enem mikromrežnem stekelcu smo izračunali geometrijsko sredino. Če je bil eden od replikatov označen kot prazna točka ali

točka slabe kvalitete, je bil upoštevan le drugi replikat. V kolikor je bila absolutna razlika med dvema replikatoma večja od njune geometrijske sredine, je bila točka označena z NA vrednostjo. Nato smo vsem praznim točkam priredili polovično vrednost globalne (prek vseh mikromrež) minimalne vrednosti.

3.3.7 Proteinska sestava plazme zdravih prostovoljcev

Glede na nabor vzorcev ZP smo preverili, kateri proteini so bili stabilni (količnik variance; $CV < 0,25$) in kateri variabilni ($CV > 0,75$). Prav tako smo pregledali, kateri od proteinov so bili povezani s spolom, starostjo (kritična vrednost 40 let) in BMI (kritična vrednost 25) posameznih ZP. Za izračun statistične signifikance smo uporabili Wilcoxon, Mann-Whitney neparametrični statistični test, za statistično -značilne rezultate pa smo upoštevali p -vrednost $< 0,05$. S programom MultiExperiment Viewer (MEV) smo izdelali vse nadaljnje toplotne diagrame in razvrščanja (A I Saeed in sod., 2003; Alexander I Saeed in sod., 2006), z uporabljeno metriko Pearsonove korelacije.

3.3.8 Iskanje proteinov s spremenjenimi nivoji v plazmi bolnikov z glioblastoma multiforme

Za vse analize statistične značilnosti spremenjenih nivojev proteinov v plazmi smo uporabili Wilcoxon, Mann-Whitney neparametrični statistični test s kritično p -vrednostjo 0,05. Da bi izračunali faktor razlike nivojev proteinov v plazmi med skupinama vzorcev ZP in GB, smo za vsak protein izračunali povprečno vrednost izražanja v posamezni skupini. Povprečno vrednost skupine GB smo delili s povprečno vrednostjo skupine ZP ter izračunali logaritem druge stopnje te vrednosti. To vrednost smo poimenovali logaritmiran faktor spremembe (angl. \log_2 fold change; \log_2 FC).

Da bi našli proteine, ki imajo spremenjeno izražanje v plazmi v GB, smo za vsak protein izračunali, kako statistično značilno je njegovo izražanje povečano oz. znižano pri GB v primerjavi z ZP. Na ta način smo dobili seznam 42 proteinov, ki smo jih anotirali z uporabo podatkovne baze Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org>). Funkcionalne in signalne poti, ki so skupne tem proteinom, so bile določene z uporabo DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (D. W. Huang in sod., 2009).

Nato smo na podlagi vrednosti 42 proteinov, povezanih z GBM, izrisali diagram hierarhične razvrstitev ter diagram glavnih komponent samo za vzorce GB, s čimer smo gledali za variabilnosti glede na lokacijo v možganih. Metoda združevanja je bila Pearsonova necentrirana metrika in optimiziran red listov. Diagram glavnih komponent je bil izrisan s centriranim povprečjem in privzetimi nastavtvami programa.

3.3.9 Iskanje robustnih bioloških označevalcev

Da bi preverili vpliv, ki ga ima starost na nivoje proteinov v plazmi, smo ZP razdelili na mlajše (ZP_m , starost < 40 let) ter starejše (ZP_s , starost > 40 let). Primerjali smo jih med seboj ter z GB. Da bi med 42 proteini, katerih nivoji so bili spremenjeni pri GB v

primerjavi z ZP, našli tiste, ki niso le posledica procesov staranja, smo za seznam potencialnih bioloških označevalcev upoštevali le proteine, ki so bili statistično značilni (p-vrednost < 0,05) tako pri primerjavi GB proti ZP, kot GB proti ZPs, hkrati pa niso smeli biti statistično značilni v primerjavi ZPs proti ZPm (niso smeli biti povezani s starostjo). Na ta način smo dobili seznam 11 proteinov, za katere smo preverili predhodno povezanost z GBM v znanstveni literaturi. S pomočjo Human Protein Atlas Database (<http://www.proteinatlas.org>) smo preverili, če so ti proteini normalno prisotni v možganskem tkivu in v tkivu gliomskih tumorjev.

3.3.10 Iskanje proteinov, povezanih z anatomsko lokacijo tumorja

Vsakemu GB smo pripisali informacijo o lokaciji njegovega tumorja v možganih; na frontalni, temporalni, okcipitalni ali parietalni reženj. Pri nekaterih GB se je tumor raztezel prek več lokacij, en GB je imel dva tumorja na ločenih lokacijah. Dodatno smo pripisali tudi informacijo o hemisferi (levi ali desni), v kateri so GB imeli tumor.

Vzorce smo za vsak reženj porazdelili v dve skupini, glede na prisotnost/odsotnost tumorja na tem režnju. Z uporabo Wilcoxon, Mann-Whitney neparametričnega statističnega testa smo za vsak protein izračunali p-vrednost za razlikovanje med skupinama za vsak tak reženj. Izbrali smo proteine, specifične za določeno pozicijo (p-vrednost < 0,01), ali pa za vsaj dve poziciji (p-vrednost < 0,05).

Preverili smo, kako učinkovito izbrani proteini razlikujejo vzorce glede na svoje profile izražanja. Vrednosti proteinov so bile najprej povprečno centrirane, nato pa smo GB hierarhično razvrstili s popolno povezavo in Pearsonovo necentrirano metriko.

3.3.11 Iskanje proteinov, povezanih s preživetjem GB po diagnozi, z metodo Kaplan-Meier

GB smo razdelili v dve skupini glede na čas preživetja po prvi diagnozi, in sicer v GB s krajšim preživetjem (GB_k, preživetje < 365 dni) ter GB z daljšim preživetjem (GB_d, preživetje > 365 dni). Mejne vrednosti za tako ločitev so v predhodnih raziskavah izbrali med 6 meseci (Kraus in sod., 2002) in 36 meseci (Sonoda in sod., 2009). Mi smo se odločili za razmejitev enega leta, ker je taka razmejitev prikazala najbolj značilne razlike v ravneh proteinov v krvni plazmi. Z uporabo Wilcoxon, Mann Whitney neparametričnega statističnega testa smo namreč dobili 23 proteinov, katerih ravni v krvi so spremenjene glede na preživetje. Te proteine smo nato analizirali z log-rank funkcijo preživetja v programskev okolju R (knjižnice: KMSurv 0.1-5, knitr 1.2.10, patchDVI 1.9, survival 2.37-4). Za vsak protein smo glede na vrednost njegovega izražanja vzorce razdelili v dve skupini; v tisto z izražanjem tega proteina pod kritično vrednostjo in drugo z izražanjem tega proteina nad kritično vrednostjo (KV). Za vsak protein smo arbitrarno izbrali več različnih kritičnih vrednosti tako, da so bile razdelitve vzorcev v skupine vedno v vnaprej določenih razmerjih (0,25 : 0,75, 0,35 : 0,65, 0,45 : 0,55, 0,55 : 0,45, 0,65 : 0,35, 0,75 : 0,25). Za vsako KV smo izrisali svoj Kaplan-Meier graf in z log-rank funkcijo določili p-

vrednost, ki je bila pokazatelj kako dobro je določena kritična vrednost razlikovala GB glede na preživetje.

3.3.12 Analiza Biomine

Za iskanje in vizualizacijo funkcionalnih povezav med proteini smo uporabili orodje Biomine (<http://biomine.cs.helsinki.fi>) (Eronen in Toivonen, 2012). Z njim smo opravili dve analizi, in sicer:

- analizo povezav med 11 potencialnimi bio-označevalci GBM,
- analizo povezav med 8 proteini, povezanimi tako z anatomske lokacijo, kot s preživetjem.

Preverili smo povezave tako med proteini, kot med geni, ki kodirajo te proteine. Kadar smo primerjali proteine, smo za identifikacijski simbol uporabili nomenklaturo UniProtID, pri genih pa smo uporabili uradne genske simbole.

3.4 ENCIMSKI IMUNSKI TEST

3.4.1 Izbor proteinov

Za analizo smo izbrali naključne proteine iz nabora proteinov iz mikromrež s protitelesi. Izbirali smo le med proteini, ki so imeli pozitiven signal pri vsaj 75 % vzorcev. Izbrali smo:

- vinkulin (VCL),
- član družine receptorjev dejavnika nekroze tumorjev 25 (TNFRSF25),
- sintaza dušikovega oksida 1 (NOS1),
- E2F dejavnik transkripcije 1 (E2F1), ter
- matriks metaloproteinaza 15 (MMP15).

3.4.2 Določanje optimalne redčitve

Za določitev optimalne redčitve smo za vsak protein izbrali vzorec, ki je imel najvišji signal in vzorec, ki je imel najnižji signal, glede na rezultate mikromrež s protitelesi. Te vzorce smo potem redčili 5x, 25x ter 125x, in jih analizirali po protokolu, opisanim v nadaljevanju. Ker smo dobili pozitiven signal le pri NOS1 in VCL (in še to le pri neredčenih vzorcih), smo nadaljevali analizo le s temo dvema proteinoma.

3.4.3 Inkubacija

Za analizo smo uporabili komercialne komplete reagentov za encimskoimunski test; ELISA (Cusabio Biotech). Ustrezno redčen vzorec plazme smo v dveh replikatih (2x 100

μL) nanesli v vdolbinice mikrotitrski ELISA ploščice, ki je imela površino prevlečeno s primarnim protitelesom. Nanesli smo tudi dva replikata redčitvene vrste standarda, ki smo ga redčili 1x, 5x ter 25x, v dve vdolbinici pa smo dali le čisto vodo. Nato smo ploščico inkubirali 2 uri pri 37°C . Vzorce smo nato iz vdolbinic odstarnili brez spiranja, dodali 100 μl sekundarnega protitelesa, združenega z biotinom ter inkubirali 1 uro pri 37°C . Vdolbinice smo nato sprali z 200 μl priloženega pufra za spiranje trikrat po 2 minut. Sledila je inkubacija s streptavidinom, vezanim s hrenovo peroksidazo (angl. horseraddish peroxidase; HRP) 1 uro pri 37°C , med katero se je HRP vezala na biotin na sekundarnih protitelesih. Vdolbinice smo ponovno trikrat sprali in dodali 90 μl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) substrata ter ploščico inkubirali 30 min pri 37°C . TBM deluje kot donor vodikovih protonov pri redukciji s HRP, zaradi česar raztopina dobi modro barvo (650 nm). Pred detekcijo smo dodali še 50 μl priložene »stop« raztopine žveplove kisline, ki je ustavila reakcijo in raztopino pobarvala rumeno zaradi spremembe pH.

3.4.4 Detekcija in obdelava podatkov

Kot rezultat smo odčitali optično gostoto tekočine v vdolbinicah. Meritve smo opravili pri 450 nm za signal in 540 nm za ozadje na čitalcu mikrotitrskih ploščic Synergy MX (BioTek). Vsako meritev smo popravili tudi glede na velikost vodnega stolpca (privzeta nastavitev programa čitalca).

Pridobljene rezultate smo najprej kvantificirali glede na umeritveno krivuljo standarda. Nato smo jih normalizirali glede na celokupno koncentracijo proteinov v vzorcu, ki smo jo izmerili z Bradfordovo reakcijo. Za primerjave različnih skupin smo uporabili navaden dvostranski neparni t-test, pri čemer smo za statistično značilen rezultat upoštevali rezultat s p-vrednostjo, manjšo od 0,05.

3.4.5 Bradfordova reakcija

Koncentracijo celokupnih proteinov v vzorcih smo izmerili z Bradfordovim reagentom (Bradford, 1976). Vzorec plazme smo najprej tisočkrat razredčili in ga nato 50 μl zmešali z 200 μl reagenta Roti®-Quant universal (Carl Roth), ki je bil predhodno razredčen v čisti vodi (1:5). Optimalno redčitev vzorcev smo izračunali tako, da smo dobili priližno 3 - 6 mg/ml celokupnih proteinov v vsakem vzorcu.

3.5 PRENOS WESTERN

Da bi določili optimalno redčitev vzorcev in da bi preverili vpliv, ki ga ima afinitetna odstranitev plazemskega albumina na detekcijo proteinov z nizkimi plazemskimi koncentracijami, smo združili vse vzorce GB in jih ob različnih redčinah ter afinitetnih frakcijah analizirali s prenosom western (angl. western blot; WB). V tako združenem vzorcu smo iskali protein VEGF.

WB smo naredili tudi z uporabo primarnih protiteles, ki se vežejo na od ciklina odvisen kinazni inhibitor 1B (CDKN1B) ter na gvanin nukleotid vezni protein alfa (GNAO1). Na

ta način smo želeli z neodvisno metodo potrditi rezultate, dobljene z metodo mikromrež s protitelesi.

Obenem smo želeli preveriti tudi uspešnost rezultatov, dobljenih s tehniko ELISA. V ta namen smo izvedli WB tudi z uporabo protiteles, ki se vežejo na VCL.

3.5.1 Deplecija in redčenje vzorcev

Da bi določili optimalno redčitev za analizo z WB, smo vse vzorce GB združili v en skupen vzorec in analizirali detekcijo VEGF. Vzorce smo redčili 1:50 ter 1:200 v fosfatnem pufru in analizirali, kot je opisano spodaj.

Vzorec smo spustili tudi čez kolono SwellGel® Blue Albumin Removal Disc (Pierce Biotechnology), ki smo jo vstavili v mikrocentrifugirko, in s tem odstranili albumin iz vzorca. Vsak vzorec smo skozi kolono filtrirali trikrat pri 12.000 g in ga zbrali v treh frakcijah. Vsako od teh frakcij smo pri različnih redčinah nato analizirali z WB.

3.5.2 Priprava vzorcev

Vzorce plazme smo združili v 7 skupin ZP (3 skupine ZP mlajših od 40 let ter 4 skupine ZP starejših od 40 let) in 7 skupin GB (4 skupine GB s preživetjem, krajšim od enega leta, ter 3 skupine GB s preživetjem daljšim od enega leta). Vzorce smo združili v skupine, da smo lahko analizo izvedli na eni membrani, saj je na ta način medsebojna primerjava bolj zanesljiva. Vsak tako združen vzorec smo nato razredčili 1:50 v fosfatnem pufru in naložili na gel (15 µl). Sledila je elektroforeza na predhodno vitem gradientnem (4 % do 15 % akrilamida) Mini-PROTEAN TGX gelu (#456-1086, BioRad) tri ure pri sobni temperaturi in konstantnem toku 25 mA.

3.5.3 Prenos na membrano

Proteini so bili po ločitvi na elektroforezi prenešeni na Immun-Blot PVDF membrano (BioRad, kataloška št. 162-0174) s ponovno elektroforezo 18 ur pri konstantnem toku 45 mA. Pripravili smo tri membrane ter jih inkubirali 18 ur pri 4°C z naslednjimi primarnimi protitelesi:

- anti-CDKN1B mišje monoklonsko protitelo (Spring Bioscience; #E6764; redčitev 1:100),
- anti-GNAO1 zajčje poliklonsko protitelo (Antibodies Online; #ABIN406520, 1:50 redčitev),
- anti-VCL mišje mnoklonsko protitelo (Thermo Scientific; #MS-1209-P0; 1:50 redčitev),
- anti-VEGF zajčje monoklonsko protitelo (Thermo Scientific; #P931; 1:50 in 1:200 redčitev).

Po spiranju s pufrom? Tween v PBS (0,1%) smo membrane inkubirali 3 ure s sekundarnimi protitelesi, ki so imela konjugirano HRP in so bila redčena 1:2500. Anti-rabbit IgG protitelo je bilo uporabljeno za GNAO1 in VEGF (W4011, Promega), anti-mouse IgG protitelo pa je bilo uporabljeno za CDKN1B in VCL (Promega, #W4021). Sledila je detekcija na fotografiskem filmu, kot je opisana v nadaljevanju.

Membrane smo po prvi detekciji spirali 18 ur pri 4°C, nato pa inkubirali z Goat anti-Human IgM protitelesom s konjugirano HRP (Antibodies Online, #ABIN102628), redčenim 1:20.000. Sledila je ponovna detekcija.

3.5.4 Detekcija in analiza slike

Po inkubaciji s protitelesi smo membrane inkubirali z Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham, #RPN2232) in nemudoma izpostavili Amersham Hyperfilm MP (GE Healthcare, #28-9068-42) za 5 sekund.

WB slike smo optično odčitali s standardnim pisarniškim optičnim čitalcem pri ločljivosti 600 dpi. Lise smo kvantificirali s programom ImageJ z uporabo privzetih nastavitev. Izmerjene vrednosti so bile nato normalizirane na dva načina:

- glede na koncentracijo IgM v plazmi, kot je bilo to pokazano prej (Hamelinck in sod., 2005) ter
- glede na celokupno koncentracijo proteinov, zmerjeno z Bradfordovo reakcijo, ki smo jo izvedli že v okviru imunskega encimskega testa.

Za primerjave različnih skupin smo uporabili navaden, dvostranski neparni t-test, pri čemer smo za statistično značilen upoštevali rezultat s p-vrednostjo, manjšo od 0,05.

3.6 PCR V REALNEM ČASU

3.6.1 Priprava vzorcev in reverzna transkripcija

V študiji ZP je bilo vključenih le tistih 16 subjektov, ki so imeli vzorce pobrane v treh bioloških ponovitvah (v treh različnih dneh znotraj enega tedna), skupaj torej 48 vzorcev (16 x 3). Iz celic NK in CD4⁺ smo izolirali RNA z uporabo kompleta Rneasy Mini Kit (Qiagen), po navodilih proizvajalca. Genomsko DNA smo odstranili z dodatkom DNase I (Life Technologies), RNA pa skoncentrirali z uporabo kompleta Rneasy miniElute Cleanup Kit (Qiagen), prav tako po navodilih proizvajalca. Kvaliteto in kvantiteto vsakega vzorca RNA smo analizirali s tehniko mikrovolumske spektroskopije s spektrofotometrom NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) ter z instrumentom Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Vseh 48 vzorcev smo najprej prenesli v mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami ter jih denaturirali 5 minut pri 80°C. Vzorce smo nato pripravili za reverzno transkripcijo RNA v

cDNA, kar smo v celoti izvedli z uporabo kompleta High Capacity cDNA Archive Kit (Applied BioSystems). K 12,5 μl vskega vzorca smo dodali 12,5 μl osnovne zmesi (angl. *master mix*) za reverzno transkripcijo, ki je vseboval:

- 2,5 μl pufra za reverzno transkripcijo,
- 1 μl mešanice posameznih nukleotidov,
- 2,5 μl naključnih začetnih oligonukleotidov (heksameri),
- 1 μl inhibitorja RNaz 20 U / μL ,
- 1,25 μl encima reverzna transkriptaza MultiScribe RT 50 U / mL in
- 4,25 μl čiste vode.

Reakcija je potekala najprej 10 minut pri 25°C, nato pa 2 uri pri 37°C. Vzorci so bili po reaciji ohlajeni in shranjeni na -20°C.

3.6.2 Izbor genov

Za potrditveno analizo z RT-qPCR smo izbrali 13 različnih genov glede na stabilnost oz. variabilnost njihovega izražanja glede na podatke DNA-mikromrež ter druge parametre. Vsem vzorcem smo analizirali izražanje 13 genov (Preglednica 3). Na mikrotitrsko ploščico smo vsak vzorec nanesli v treh ponovitvah.

Preglednica 3: Geni, izbrani za potrditveno analizo z RT-qPCR na podlagi rezultatov iz DNA-mikromrež.

Table 3: Genes, selected for confirmation analysis with RT-qPCR according to DNA-microarray results.

Ime gena	Simbol gena	GC id*	Rezultat DNA-mikromrež
Gama 1 aktin	<i>ACTG1</i>	GC17M079476	Stabilen
Protein 1, povezan z adenilat ciklazo domena 2	<i>CAP1</i>	GC01P040505	Stabilen
Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix	<i>CHCHD2</i>	GC07M056136	Stabilen
DR beta 1 kompleks človeškega levkocitnega antiga (HLA), razred II	<i>HLA-DRB1</i>	GC06M032546	Variabilen
Glutationska S-transferaza, theta 1	<i>GSTTI</i>	GC22M024952	Variabilen
Evkarionski faktor iniciacije translacije 1A, Y-vezan	<i>EIF1AY</i>	GC0YP022737	Variabilen
Član družine IMAP GTPaz 7	<i>GIMAP7</i>	GC07P150211	Stabilen pri CD4+
Granulizin	<i>GNLY</i>	GC02P085912	Stabilen pri NK
Receptor za interlevkin 7	<i>IL7R</i>	GC05P035892	Povišan pri BMI > 25
DO beta kompleks človeškega levkocitnega antiga (HLA), razred II	<i>HLA-DOB</i>	GC06M032780	Znižan pri BMI > 25
Beta aktin	<i>ACTB</i>	GC07M005566	Standardna referenca
18s ribosomalni RNA gen	<i>18S</i>	GC00P6C0110	Standardna referenca

* Identifikacijska koda sistema GeneCards (www.genecards.org).

3.6.2.1 Redčitvena vrsta

Za izračun učinkovitosti in nadaljnjo kvantifikacijo smo morali kvantificirati redčitveno vrsto, ki smo jo naredili z združevanjem 10 naključnih vzorcev. Skupni vzorec smo redčili 3-krat, 9-krat, 27-krat in 81-krat ter ga nanesli na mikrotitrsko ploščico v duplikatih za vsako redčino.

3.6.3 Reakcija

Vzorce smo pred reakcijo redčili (vzorce NK petkrat, vzorce CD4⁺ desetkrat, za analizo z 18S pa so bili oboji redčeni 50 x). Reakcije so potekale v mikrotitrski ploščici s 384 vdolbinicami. Vsaka reakcija je potekala v 5 µl volumnu, in sicer:

- 2 µl redčenega vzorca,

- 2,5 µl Universal Master Mix (Applied Biosystems)
- 0,25 µl TaqMan MGB™ sonde (AssayOnDemand)
- 0,25 µl čiste vode.

Vsak vzorec smo analizirali v triplikatih, poleg tega pa smo analizirali še redčitveno vrsto v duplikatih ter dve vdolbinici, v katerih je bila namesto vzorca čista voda. Za vsak analiziran gen smo tako izvedli 154 reakcij (48 x 3 + 5 x 2). Na isti mikrotitrski ploščici smo tako istočasno lahko analizirali dva različna gena.

Za pomnoževanje in detekcijo smo uporabili dvojno označene sonde TaqMan MGB™ (AssayOnDemand), specifične za vsakega od izbranih genov. Sonde smo izbrali tako, da so se prilegale istim sekvencam genov kot oligonukleotidi na pripadajočih točkah na DNAmikromrežah. S tem smo zagotovili kompatibilnost obeh platform. Pri vseh genih to ni bilo mogoče, ker takih sond ni bilo komercialno na voljo, zato smo v takih primerih izbrali sondi, ki je bila najbližje željeni sekvenci.

Vse RT-qPCR reakcije so bile izvedene na sistemu za detekcijo sekvenc ABI PRISM® 7900 HT (Applied Biosystems), kot je to opisano v drugih študijah (Hren in sod., 2009).

3.6.4 Statistična obdelava pridobljenih podatkov

Za pridobitev meritev fluorescence smo uporabili programsko orodje SDS 2.1 (Applied Biosystems), s katerim smo izračunali pražne cikle (angl. *quantification cycle; Cq*), tj. vrednosti, pri katerih krivulje pomnoževanja sekajo prag. Tako bazna linija kot prag sta bila določena avtomatsko s privzetimi nastavitevami programa SDS.

Za vsak gen smo med ponovitvama redčin pri umeritveni krivulji izračunali povprečje ter absolutno razliko med njunima Cq vrednostima. Meritve, ki so med sabo odstopale za več kot 0,5 cikla, smo izločili iz nadaljne analize. Preostale meritve smo uporabili za izračun umeritvene krivulje, ki je predstavljala odvisnost Cq vrednosti od desetiškega logaritma koncentracije in je teoretično linearна. Ker točne koncentracije nismo poznali, smo najbolj redčenemu vzorcu (81x) pripisali koncentracijo 1 in na podlagi tega ostalim vzorcem redčitvene vrste pripisali koncentracijo 3 (27x), 9 (9x) ter 27 (3x). Z regresijsko metodo najmanjših kvadratov smo za vsako umeritveno krivuljo izračunali naslednje vrednosti:

- k: strmina premice skozi točke,
- n: začetna vrednost premice skozi točke,
- R²: faktor prileganja premice na točke ter
- E: učinkovitost pomnoževanja, ki je faktor povečanja koncentracije cDNA v enem ciklu rekacije in ima teoretično vrednost 2.

Pri vsakem genu smo trem tehničnim ponovitvam vsakega vzorca izračunali povprečje ter razliko med najvišjo in najnižjo izmerjeno vrednostjo med ponovitvami. Za vsako meritev smo tudi glede na umeritveno krivuljo izračunali relativno število kopij RNA v vzorcu ob

predpostavki, da je bila v najbolj redčenem vzorcu umeritvene krivulje (81x) ena sama kopija RNA. Izračunali smo tudi povprečje števila kopij med tremi ponovitvami ter CV. Vse triplikate vzorcev, ki so imeli CV večji od 0,25 smo izločili iz nadaljne analize.

Vzorce smo nato normalizirali na geometrijsko sredino izražanja referenčnih genov 18S, ACTB ter ACTG1 pri 9x redčenem vzorcu. Slednji geni so kazali tudi najbolj stabilno izražanje po analizi GeNorm (Vandesompele in sod., 2002). V izračunu smo upoštevali tudi predhodno izračunane učinkovitosti reakcij. Zgoraj opisano metodo obdelave podatkov RT-qPCR imenujemo tudi modificiran $\Delta\Delta C_q$ in je bila podrobnejše opisana s strani njenih izumiteljev (Pfaffl, 2001; Vandesompele in sod., 2002).

3.6.5 Primerjava rezultatov poskusa z DNA-mikromrežami

V okviru analize s RT-qPCR smo želeli preveriti tehnično zanesljivost meritev poskusa z DNA-mikromrežami, ki ga je na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo opravil dr. Matjaž Hren s sodelavci, katerega rezultati so bili predhodno objavljeni (Gruden in sod., 2012). Predhodno normalizirane podatke o izražanju genov iz poskusa z DNA mikromrežami smo nato primerjali z vrednostmi izražanja genov, ki smo jih izmerili z metodo RT-qPCR. Med podatki smo izvedli sledeče primerjave:

- Primerjava absolutnega izražanja: naredili smo primerjavo, kjer smo na graf izrisali odvisnost absolutnih vrednosti po normalizaciji pri DNA-mikromrežah ter pri RT-qPCR.
- Primerjava CV vrednosti: za vsak gen smo izračunali CV vrednosti, tako za podatke iz DNA-mikromrež, kot za RT-qPCR podatke, in jih primerjali med sabo. Na ta način smo ocenili stabilnost oz. variabilnost genov. Za vsak gen smo izrisali njegovo CV vrednost pri RT-qPCR analizi na x-os, njegovo CV vrednost pri analizi z DNA-mikromrežami pa na y-os. Narisali smo regresijsko premico po metodi najmanjših kvadratov ter izračunali količnik determinacije (R^2).
- Povezava z BMI: za IL7R ter HLA-DOB smo v poskusu z DNA-mikromrežami ugotovili, da sta imela znižano izražanje v osebah z večjim BMI, kar smo preverili z navadnim, dvostranskim t-testom (p-vrednost < 0,05).

3.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV DNA-MIKROMREŽ

3.7.1 Iskanje genov, povezanih z različnimi razmerami gojenja celičnih kultur

3.7.1.1 Analiza grobih podatkov in kontrola kakovosti

DNA mikromreže so bile narejene s tehnologijo Illumina (Human WG 6, verzija V3.0 R3) in anotirane s podatkovne baze na proizvajalčevi spletni strani (<http://www.switchtoi.com/pdf/Annotation%20Files/Human>).

Po analizi smo dobili grobe rezultate meritev posameznih DNA-mikromrež in jih v tej obliki združili z anotacijami. Te grobe podatke smo uvozili v programsko statistično okolje R, kjer smo jih logaritmirali z logaritmom druge stopnje (\log_2). Izrisali smo grafikone kvantilov (angl. *box plots*), ki so prikazali variabilnosti genskega izražanja znotraj vzorcev. Na ta način smo preverili, ali kakšna mikromreža bistveno odstopa od ostalih zaradi tehničnih napak in ali je prišlo do šaržnega efekta (angl. *batch effect*).

3.7.1.2 Normalizacija robustnega zlepljenja

Logaritmirane vrednosti smo nato normalizirali z uporabo normalizacije robustnega zlepljenja (angl. robust spline normalization) in s tem popravili morebitne tehnične variacije, variacije med posameznimi DNA-mikromrežami ter variacije med posameznimi dnevi izvedbe analiz. Po normalizaciji smo ponovno izrisali škatelne diagrame in preverili kakovost podatkov. Izrisali smo tudi hierarhično razvrščanje in na ta način pregledali, kako so si vzorci med seboj podobni glede na profil genskega izražanja. Za uvoz podatkov, kontrolo kakovosti, logaritmiranje ter normalizacijo smo uporabili R knjižnico *lumi* iz spletnega portala Bioconductor (Du in sod., 2008).

3.7.1.3 Iskanje diferencialno izraženih genov

Pri iskanju diferencialno izraženih genov glede na različne razmere gojenja celičnih linij smo uporabili linearni model eBayes, ki smo ga prilagodili na normalizirane vrednosti. Na ta način smo določili diferencialno izražene gene za vsako primerjavo posebej. Da bi se znebili lažno pozitivnih rezultatov, smo upoštevali tudi stopnjo lažnega odkrivanja za večkratno testiranje (angl. false discovery rate for multiple testing), kot statistično značilen rezultat pa smo upoštevali gene s p-vrednostjo $< 0,01$. Za iskanje diferencialno izraženih genov smo uporabili R knjižnico *limma* iz spletnega portala Bioconductor (Smyth, 2004).

3.7.2 Obogatitev z uporabo genskih ontologij

Najprej smo vzorce hierarhično razvrstili glede na celoten izmerjen profil izražanja genov. Na ta način smo preverili, če med vzorci prihaja do šaržnega efekta.

Da bi videli, če so diferencialno izraženi geni med sabo funkcionalno povezani, smo seznam diferencialno izraženih genov vsake primerjave analizirali z genskimi ontologijami (angl. *gene ontology*; GO):

- ontologija celične komponente (angl. *cell component*; CC)
- ontologija biološkega procesa (angl. *biological process*; BP)
- ontologijo molekulske funkcije (angl. *molecular function*; MF) ter
- ontologijo enciklopedije genov in genomov Univerze v Kyotu (angl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; KEGG).

Vsaka ontologija vsebuje mnoge skupine genov, ki so na tak ali drugačen način med sabo povezani, bodisi po funkciji, procesu ali lokaciji v celici. S hipergeometričnim testom smo za vsako skupino analizirali, koliko je v njej najdenih diferencialno izraženih genov ter primerjali, koliko bi jih odkrili naključno. Tako analizo smo naredili tako za vse diferencialno izražene gene, kot tudi ločeno samo za gene, ki so imeli povečano ali znižano izražanje v enem od načinov gojenja celic. Za vse omenjene funkcionalne analize smo uporabili knjižnico R *GOStats* iz spletnega portala Bioconductor (Falcon in Gentleman, 2007).

Pri vsaki primerjavi smo dobili sklop diferencialno izraženih proteinov. Za vsako ontologijo in metabolno pot smo izračunali, koliko vsebuje diferencialno izraženih proteinov glede na to, koliko bi jih pričakovali slučajno. Glede na rezultate smo s hipergeometričnim testom izračunali p-vrednosti in upoštevali tiste ontologije, ki so imele p-vrednost $< 0,01$. To smo naredili tako za vse diferencialno izražene gene kot tudi samo za gene z zvišanim izražanjem in ločeno za gene z znižanim izražanjem.

Iz nadaljnje analize smo izločili primerjave hMSC ter U-87MG s celicami, gojenimi v direktni kokulturi, saj gre pri direktnih kokulturah za mešanico dveh različnih celičnih tipov, katerih skupno izražanje ni primerljivo z izražanjem genov v čistih kulturah.

Za vsako od ontologij smo preverili, katere so bile glavne celične komponente, molekulske funkcije, procesi in metabolne poti, značilne za posamezne primerjave. Za vsako tako ontološko skupino smo preverili, koliko je bilo značilnih genov iz te skupine v primerjavi z vsemi geni skupine, ter če so imeli ti geni izražanje pretežno povišano ali znižano v posamezni primerjavi. To smo določili tako, da smo preverili, če je posamezna skupina vsebovala značilno veliko samo tistih genov, katerih izražanje je bilo bodisi povišano bodisi znižano. Enako smo storili tudi za vse gene skupaj. Če je bilo izražanje te ontološke skupine zvišano oz. znižano, smo primerjavi pripisali pretežno zvišano oz. znižano izražanje genov. Če pa so bili za določeno primerjavo značilni tako geni z zvišanim izražanjem kot geni z znižanim, smo tako ontološko skupino označili kot mešano.

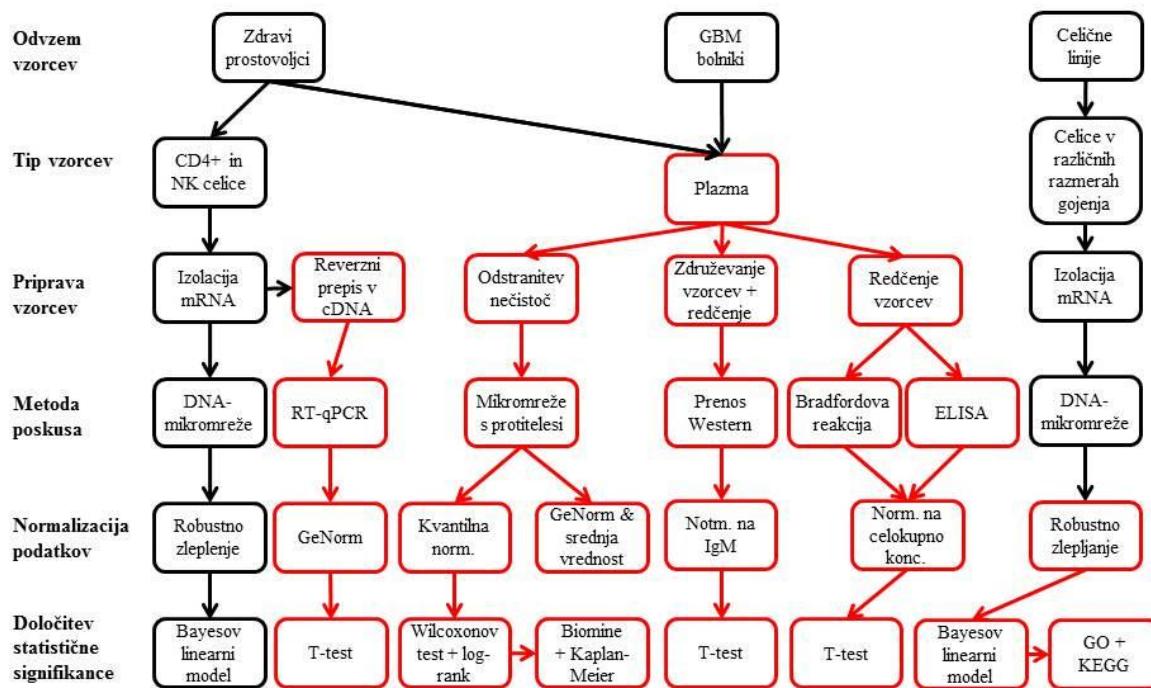
4 REZULTATI

4.1 PREGLED OPRAVLJENEGA DELA

Rezultati v tem doktorskem delu so del raziskav, ki so potekale v okviru projekta Systher. Več informacij o projektu je na voljo na spletni strani projekta (<http://systher.biologie.hu-berlin.de/>). Analizirali smo tri tipe vzorcev:

- zdravi prostovoljci,
- bolniki z glioblastoma multiforme,
- celične linije (hMSC ter U-87MG), gojene v kokulturah.

Iz vzorcev krvi ZP in GB smo izolirali krvno plazmo. Iz krvi ZP smo poleg plazme izolirali še celice CD4⁺ ter NK. Poleg tega smo izolirali mRNA iz celičnih linij, gojenih v različnih pogojih (Slika 8). Na vseh vzorcih plazme, ki so bili zbrani le prvi dan, smo opravili Bradfordovo reakcijo, proteomske analize s tehnikami mikromreže s protitelesi, prenos western, ELISA ter pripadajočo obdelavo podatkov in interpretacijo. Iz celic CD4⁺ in NK smo izolirali celokupno RNA, transkriptom analizirali z DNA-mikromrežami in nato potrditev rezultatov opravili s RT-qPCR izbranih genov. mRNA iz celičnih linij smo analizirali z DNA-mikromrežami..



Slika 8: Shema vseh eksperimentov in analiz v okviru projekta Systher, ki se navezujejo na doktorsko delo. Analize v rdečih pravokotnikih so bile opravljene v okviru tega doktorskega dela.

Figure 8: Schematic illustration of all experiments and analyses as part of the Systher project, related to dissertation. Analyses in red were done as part of this doctoral thesis.

4.2 TRANSKRIPTOMSKA ANALIZA IMUNSKIH CELIC

S podatki iz poskusa z DNA-mikromrežami na zdravih prostovoljcih, ki smo ga podrobnejše opisali v študiji na ZP (Gruden in sod., 2012), smo izračunali količnik variance (CV = standardni odklon / povprečna vrednost) za vsak gen na mikromreži v celotni skupini. Kot stabilne smo upoštevali gene, ki so imeli CV manjši od 0,1, za variabilne pa tiste, ki so imeli CV večji od 0,5. Ti dve vrednosti sta bili določeni na podlagi pregleda škatelnih diagramov CV vrednosti vseh genov na mikromrežah in približno opredeljujeta 1. in 3. kvartil (Gruden in sod., 2012). Variabilnih genov je bilo v celicah CD4⁺ 4,1 % (povprečna variabilnost za isto osebo je bila 1,8 %), v celicah NK pa 7,5 % (povprečna variabilnost za isto osebo je bila 2,3 %).

Na podlagi analize variabilnosti smo izbrali dva stabilna, dva variabilna gena ter dva gena, stabilna pri enem celičnem tipu in variabilna pri drugem (v oklepaju uradni simbol gena):

Stabilni geni:

- gama 1 aktin (*ACTG1*),
- z adenilat ciklazo povezani protein 1 (*CAP1*),
- obvito-obvito vijačnico vsebujoča domena 2 (*CHCHD2*).

Variabilni geni:

- DR beta 1 poglavitni histokompatibilnostni kompleks, razred II (*HLA-DRB1*),
- glutationska S-transferaza theta 1 (*GSTT1*),
- evkariotski dejavnik iniciacije translacije 1A, Y-vezan (*EIF1AY*).

Gena, stabilna pri enem tipu celic in variabilna pri drugem:

- GTPaza IMAP, član družine 7 (*GIMAP7*) – stabilen pri CD4⁺,
- granulizin (*GNLY*) – stabilen pri NK.

Poleg tega smo z navadnim, dvostranskim t-testom preverili, kateri geni so povezani z debelostjo. Vzorce smo razdelili glede na BMI, in sicer na osebe z normalno telesno maso (BMI < 25, n = 12) ter na osebe s povečano telesno maso (BMI > 25, n = 4). Za mejno p-vrednost smo izbrali p-vrednost, manjšo od 0,01.

Gena, povezana z BMI:

- interlevkin 7 receptor (*IL7R*),
- DO beta poglavitni histokompatibilnostni kompleks, razred II (*HLA-DOB*).

Količine transkriptov izbranih genov v vseh vzorcih ZP smo nato analizirali s RT-qPCR. Rezultate teh meritev smo nato primerjali z vrednostmi teh genov v poskusu z DNA-mikromrežami.

4.2.1 Stabilni in variabilni geni

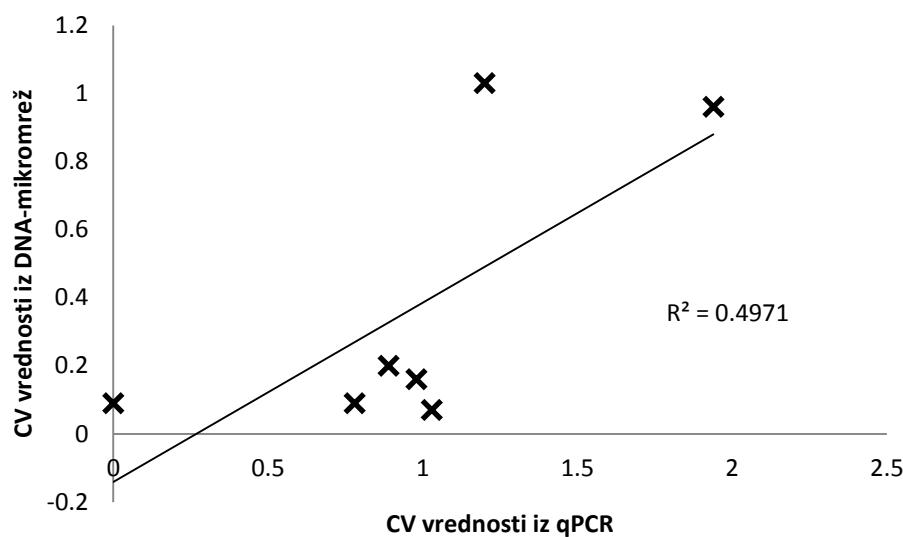
CV smo izračunali za izražanje vsakega gena glede na normalizirane podatke analize RT-qPCR ter glede na normalizirane podatke analize z DNA-mikromrežami. To smo naredili tako za vzorce celic NK (Preglednica 4), kot tudi za vzorce celic CD4⁺ (Preglednica 5). Prav tako smo za oba celična tipa te podatke izrisali tudi na graf in jim izračunali količnik determinacije R², ki je predstavljal linearno odvisnost na podlagi metode najmanjših kvadratov (Slika 9 in Slika 10).

Preglednica 4: Količniki variance izražanja genov v celicah NK glede na podatke iz RT-qPCR ter DNA-mikromrež.

Table 4: Coeficients of variance of gene expression in NK cells according to RT-qPCR and DNA-microarray data.

NK	<i>ACTG1</i>	<i>IL7R</i>	<i>GIMAP7</i>	<i>GSTT1</i>	<i>GNLY</i>	<i>CAP1</i>	<i>CHCHD2</i>
Povezava	Stabilen	BMI	Variabilen	Variabilen	Stabilen*	Stabilen	Stabilen
qPCR	0,00	1,94	0,98	1,20	0,89	0,78	1,03
DNA-mikromreže	0,09	0,96	0,16	1,03	0,20	0,09	0,07

*GNLY smo smatrali za stabilnega, kljub temu da je imel CV 0,20, kar je več kot mejna vrednost, saj je bil najbolj stabilen pri celicah naravnih ubijalkah od genov, ki so bili variabilni pri celicah CD4⁺.



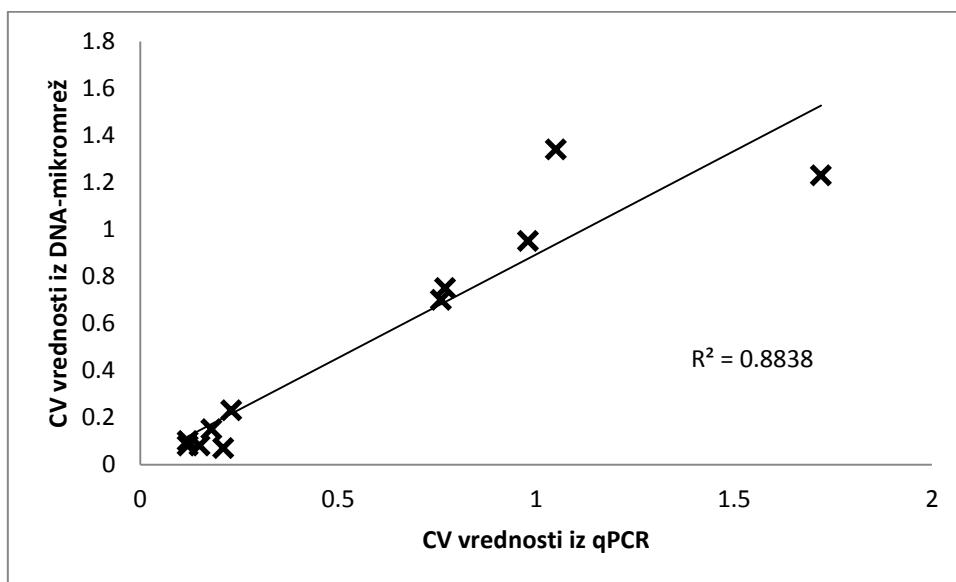
Slika 9: Količniki variance (CV) izražanja genov iz analize RT-qPCR v primerjavi s količniki variance iz analize z DNA-mikromrežami na celicah naravnih ubijalkah. Premico smo izrisali po metodi najmanjših kvadratov; izračunan je količnik determinacije R^2 .

Figure 9: Coeficients of variance (CV) of gene expression from RT-qPCR analysis compared to coeficients of variance from DNA-microarray analysis on natural killer cells. The line was drawn by method of least squares; coefficient of determination R^2 was calculated.

Preglednica 5: Količniki variance izražanja genov v celicah CD4⁺ glede na podatke iz RT-qPCR in DNA-mikromrež.

Table 5: Coeficients of variance of gene expression of CD4⁺ cells according to RT-qPCR and DNA-microarray data.

CD4 ⁺ T	<i>ACTB</i>	<i>ACTG1</i>	<i>CAP1</i>	<i>CHCHD2</i>	<i>HLA-DRB1</i>	<i>GIMAP7</i>
Povezava	Referenca	Stabilen	Stabilen	Stabilen	Variabilen	Stabilen
RT-qPCR	0,12	0,12	0,15	0,21	1,72	0,18
DNA-mikromreže	0,10	0,08	0,08	0,07	1,23	0,15
	<i>GNLY</i>	<i>GSTT</i>	<i>EIF1AY</i>	<i>IL7R</i>	<i>HLA-DOB</i>	
Povezava	Variabilen	Variabilen	Variabilen	BMI	BMI	
RT-qPCR	1,05	0,76	0,98	0,23	0,77	
DNA-mikromreže	1,34	0,70	0,95	0,23	0,75	



Slika 10: Količniki variance (CV) genske ekspresije iz analize RT-qPCR v primerjavi s količniki variance iz analize z DNA-mikromrežami na celicah CD4⁺. Premico smo izrisali po metodi najmanjših kvadratov; izračunan je količnik determinacije R^2 .

Figure 10: Coefficients of variance (CV) of gene expression from RT-qPCR analysis compared to coefficients of variance from DNA-microarray analysis on CD4⁺ cells. The line was drawn by method of least squares; coefficient of determination R^2 was calculated.

Variabilnost izražanja genov v celicah NK je bila 1,8-krat večja od variabilnosti celic CD4⁺, kljub temu pa je bila variabilnost izražanja genov znotraj iste osebe v obeh celičnih tipih podobna (le 1,3-krat večja pri celicah NK). Na splošno smo ugotovili, da je bila variabilnost izražanja genov med različnimi osebami (inter-variabilnost) bistveno večja od povprečne variabilnosti izražanja genov ene in iste osebe na različne dni (intra-variabilnost). To je veljalo tako za celice CD4+ (inter-variabilnost večja 2,3-krat), kot tudi za celice NK (inter-variabilnost večja 3,3-krat). Zelo podobno smo odkrili tudi za plazemske metabolite v okviru študije ZP (Gruden in sod., 2012).

4.2.2 Geni, povezani z indeksom telesne mase

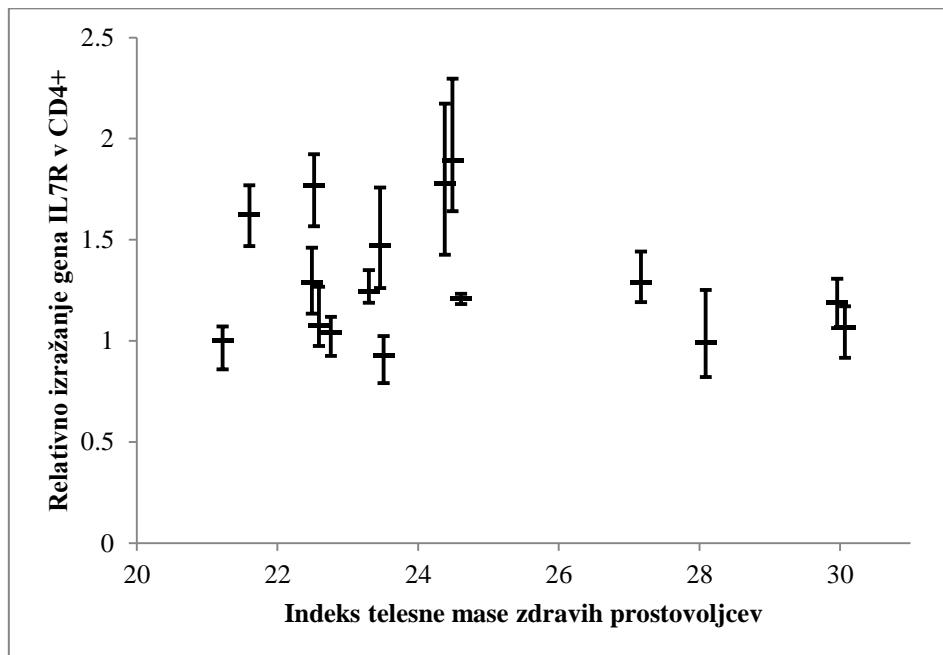
Za izražanje genov *IL7R* in *HLA-DOB* smo v poskusu z DNA-mikromrežami ugotovili, da imata znižano izražanje pri osebah z večjim BMI. Dobljeni rezultati smo preverili na podatkih, pridobljenih s RT-qPCR z navadnim, dvostranskim t-testom (p-vrednost).

Z uporabo t-testa smo izračunali p-vrednosti za podatke o izražanju genov *IL7R* in *HLA-DOB* med skupinama ZP s primerno ($BMI < 25$) ter prekomerno telesno maso ($BMI > 25$). Izražanje gena *IL7R* smo preverili pri obeh tipih celic, izražanje gena *HLA-DOB* pa le pri celicah CD4⁺ (Preglednica 6). Relativno izražanje genov *IL7R* in *HLA-DOB* v CD4⁺ v odvisnosti od BMI smo predstavili tudi na grafu (Slika 11 in Slika 12).

Preglednica 6: Rezultati t-testa povezanosti izražanja genov *IL7R* ter *HLA-DOB* v celicah NK in celicah CD4+ z indeksom telesne mase (BMI).

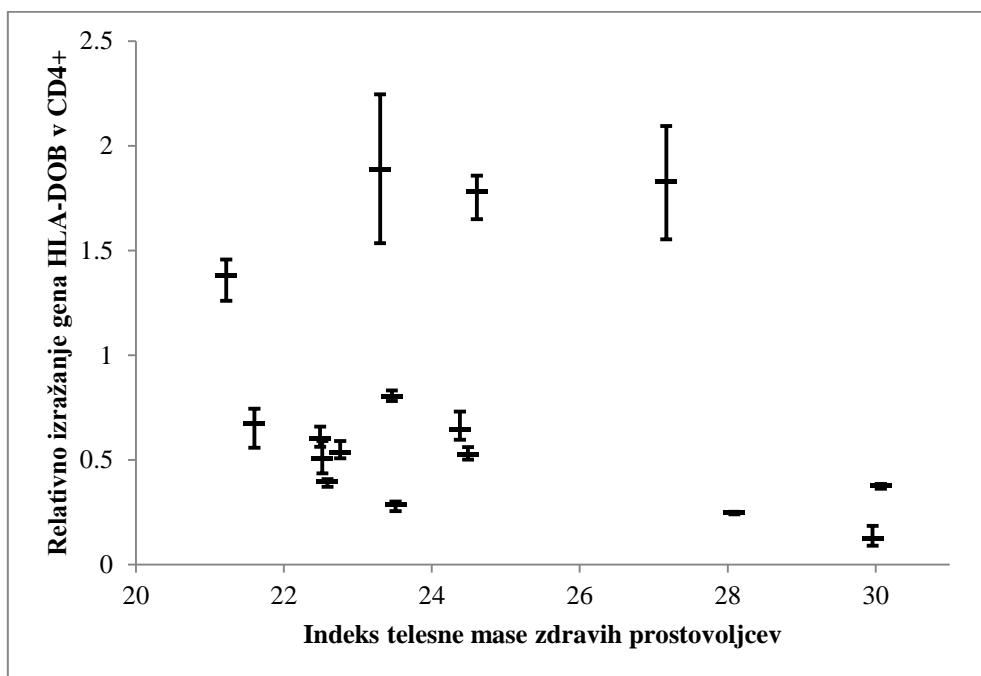
Table 6: Results of t-test for association of gene expression of *IL7R* and *HLA-DOB* genes in NK and CD4⁺ cells and body mass index (BMI).

p-vrednost	<i>IL7R</i>	<i>HLA-DOB</i>
CD4 ⁺	0,035	0,0023
NK	0,068	NA



Slika 11: Izražanje gena *IL7R* v celicah CD4⁺ v odvisnosti od indeksa telesne mase (BMI), na podlagi izmerjenih vrednosti z metodo RT-qPCR.

Figure 11: Expression of gene *IL7R* in CD4⁺ cells in relation to body mass index (BMI), according to RT-qPCR data.



Slika 12: Izražanje gena *HLA-DOB* v celicah CD4⁺ v odvisnosti od indeksa telesne mase (BMI), na podlagi izmerjenih vrednosti z metodo RT-qPCR.

Figure 12. Expression of *HLA-DOB* gene in CD4⁺ cells in relation to body mass index (BMI), according to RT-qPCR data.

4.3 NETARČNA ANALIZA PROTEOMA KRVNE PLAZME ZDRAVIH PROSTOVLJCEV IN BOLNIKOV Z GLIOBLASTOMA MULTIFOMRE

Z metodo mikromrež s protitelesi smo relativno kvantificirali ravnini 656 proteinov v 34 vzorcih človeške plazme, na podlagi katerih smo poskušali odkriti potencialne diagnostične in prognostične bio-označevalce. Analizirali smo plazmo dveh različnih skupin ljudi; ZP in GB. V ta namen smo uporabili komercialne mikromreže s protitelesi (Explorer antibody array, Full Moon BioSystems). Na ta način smo želeli preveriti tudi uporabnost tehnologije mikromrež s protitelesi, ki so komercialno na voljo za širok spekter aplikacij.

Ker lahko koncentracije plazemskih proteinov variirajo zaradi različnih dejavnikov, med drugim zaradi starosti subjektov, hidracije telesa ob odvzetju krvi itd., smo podatke normalizirali. Uporabili smo tri različne principe normalizacije:

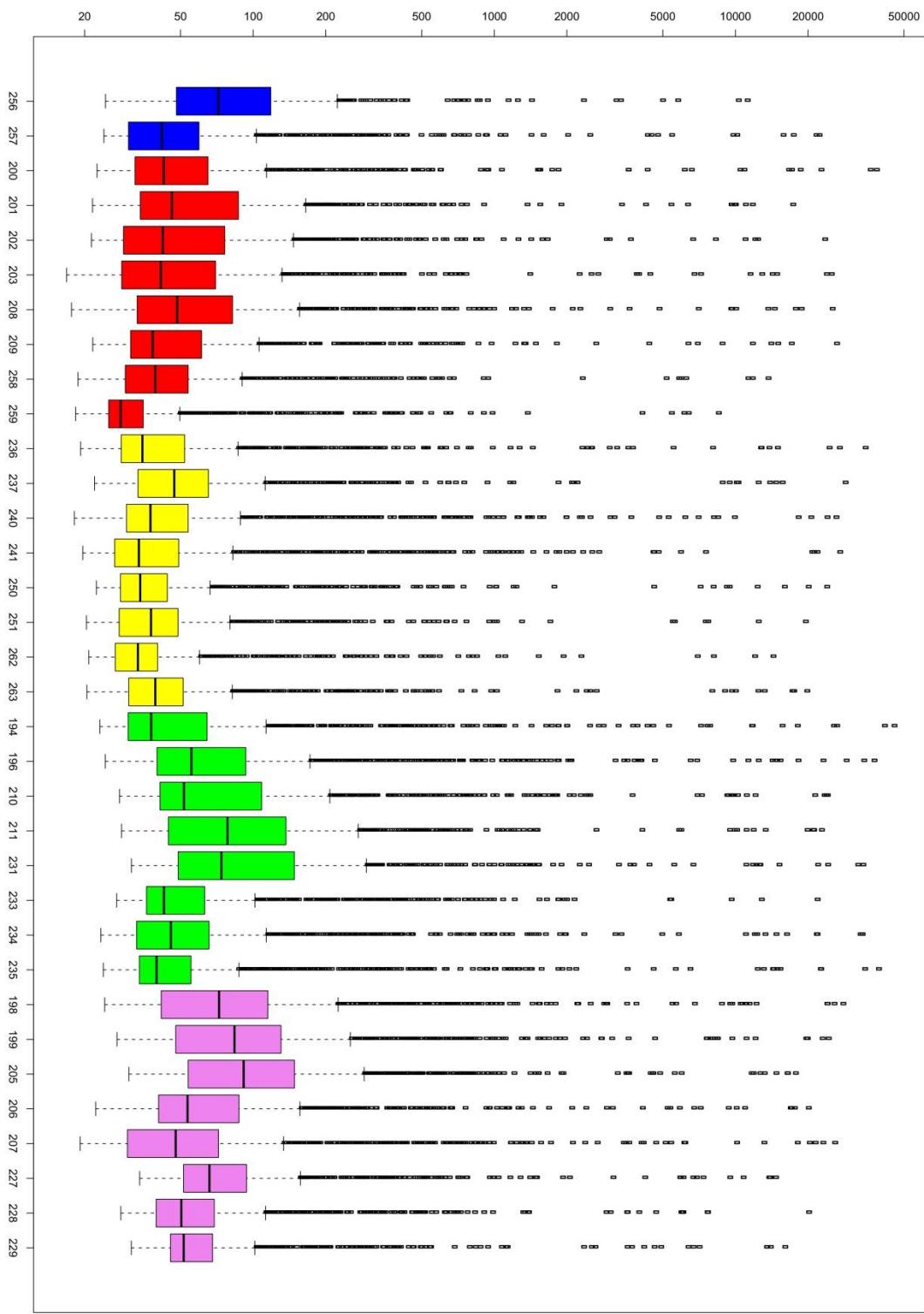
- stabilni hišni proteini (Slika 14),
- kvantilna normalizacija (Slika 15) ter
- izenačena povprečja (Slika 16) in mediane (Slika 17).

Za določitev stabilnih hišnih proteinov smo uporabili metodo GeNorm (Vandesompele in sod., 2002), ki temelji na primerjavi profilov izmerjenih vrednosti za vsak protein. Vsakega od teh proteinskih profilov smo primerjali z vsakim drugim in na podlagi geometrijske sredine izražanja določili najbolj stabilne proteine v plazmi. Izračunali smo geometrijsko sredino profilov izmerjenih vrednosti štirih najstabilnejših proteinov in na podlagi te vrednosti normalizirali rezultate vseh proteinov. Najstabilnejši so bili naslednji proteini:

- receptor trombocit-izvirajočega rastnega dejavnika beta (PDGFRB),
- receptor vitamina D3 (VDR),
- kaspaza 1 (CASP1),
- protein B-celičnega limfoma/levkemije 10 (BCL10).

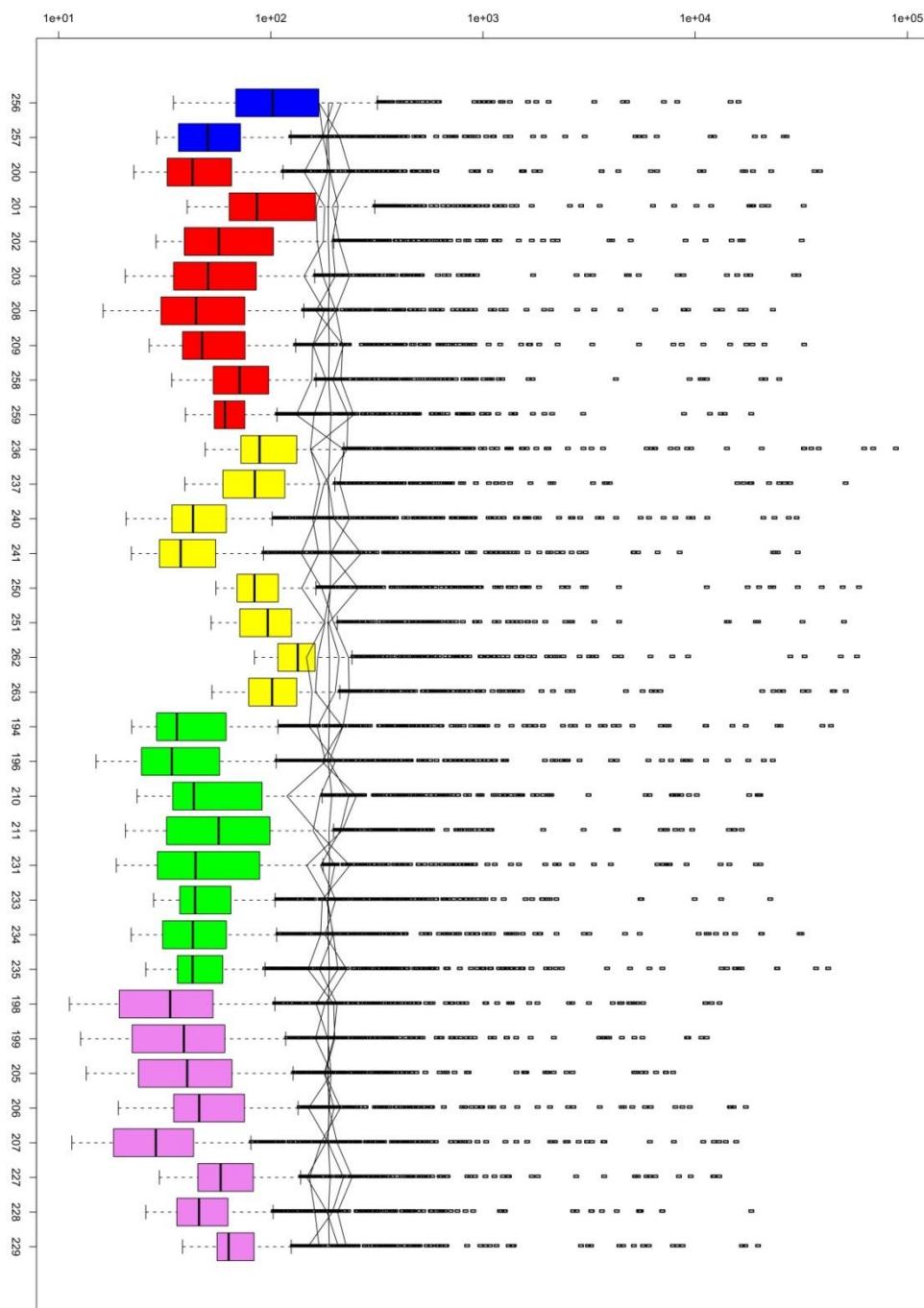
Po pregledu grafih porazdelitve signala smo se odločili za kvantilno normalizacijo, saj je najbolje popravila celokupno porazdelitev signalov in v rezultate izražanja stabilnih genov vnesla minimalno variabilnosti.

Večina proteinov, katerih točke niso bile označene kot prazne, je bilo z intenziteto signala zelo blizu spodnje meje detekcije, kar je imelo za posledico zelo asimetrično in ne-normalno porazdelitev signala v posamezni mikromreži. Zato smo za test signifikance izbrali Wilcoxonov, Mann-Whitneyev neparametrični test rangov.



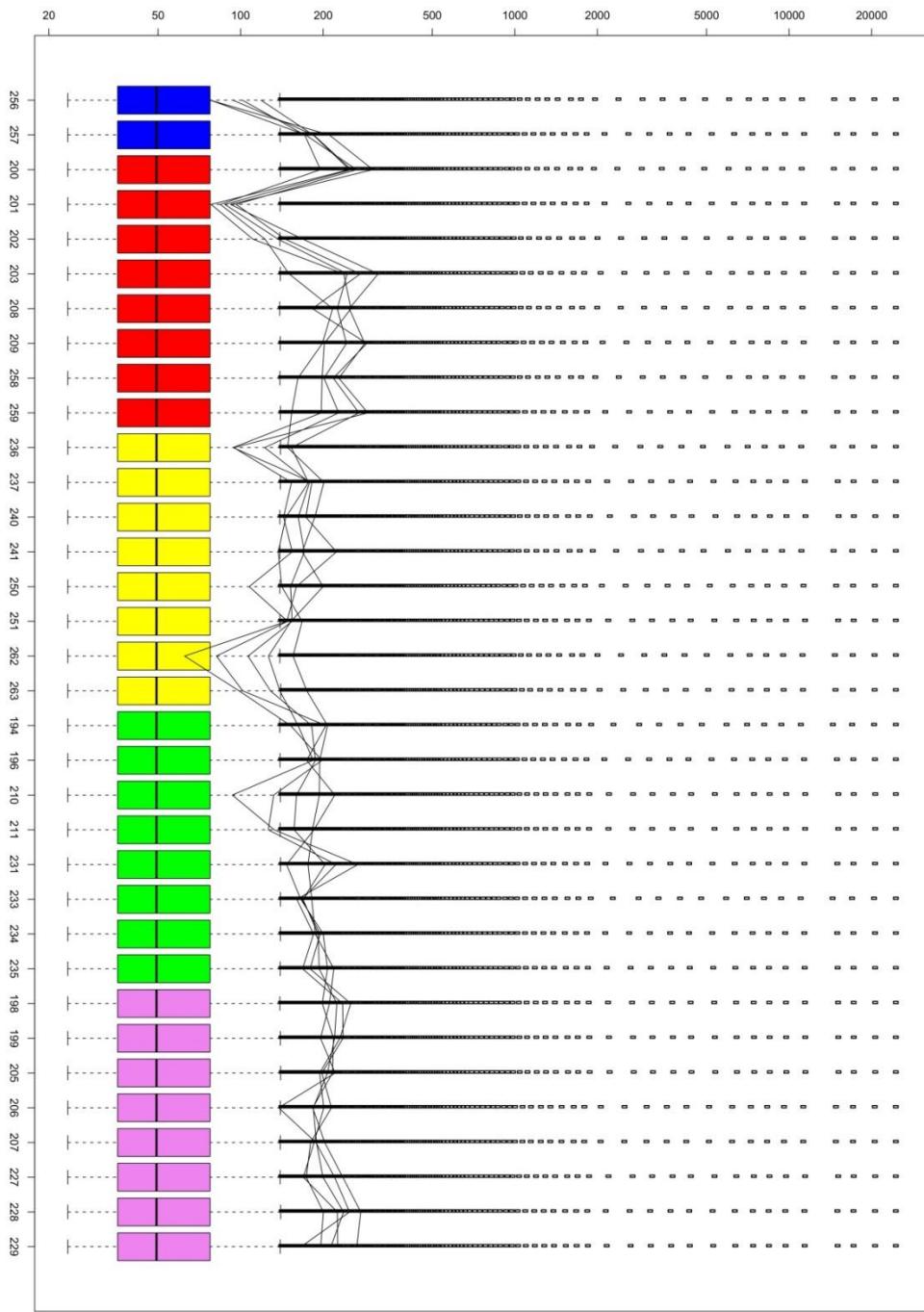
Slika 13: Grafikon kvantilov porazdelitve izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih pred obdelavo podatkov. Posamezne barve predstavljajo različne šarže.

Figure 13: Boxplot of distribution of measured protein signals before data analysis. Individual colours represent different batches.



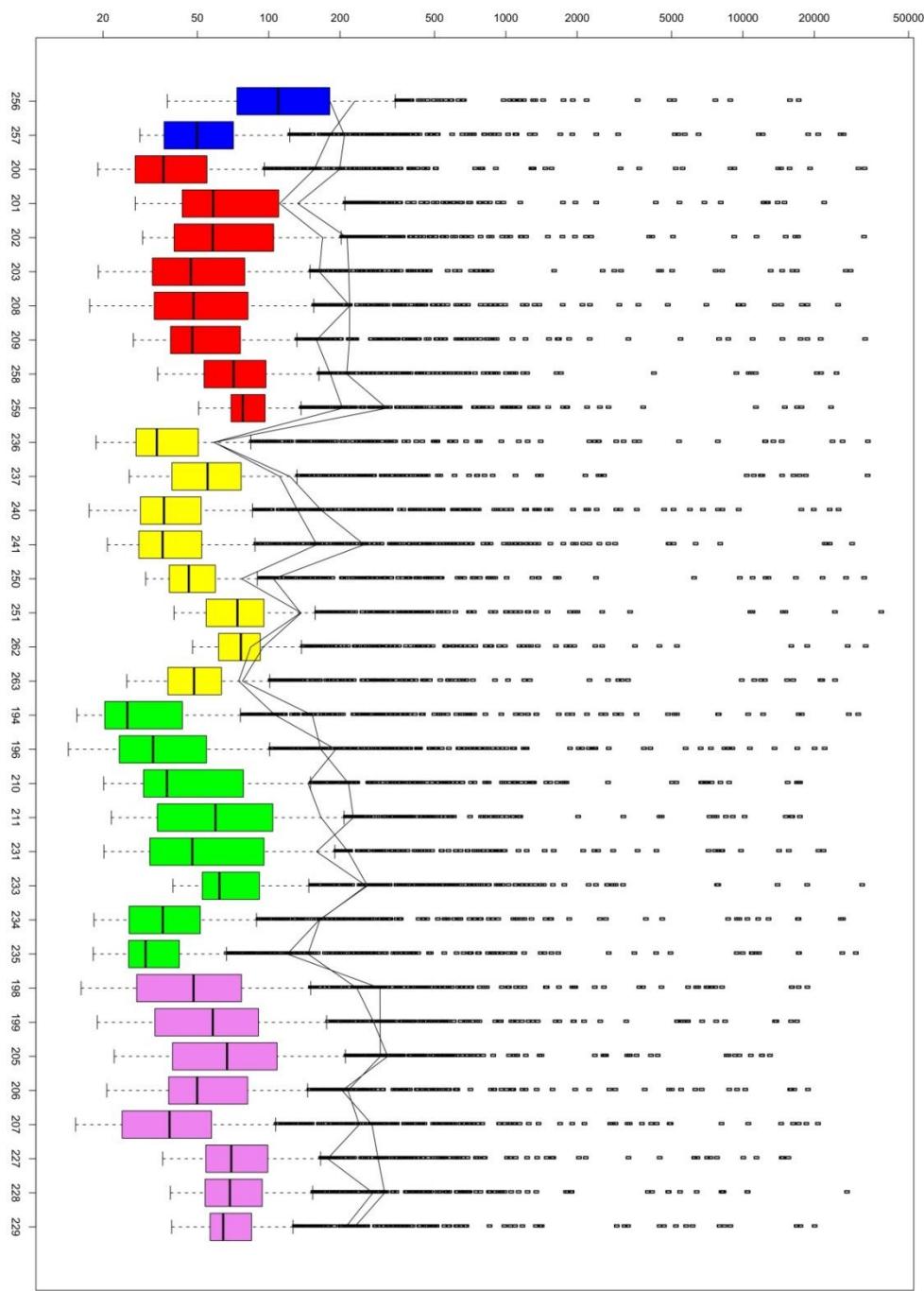
Slika 14: Grafikon kvantilov porazdelitve izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih po normalizaciji z algoritmom GeNorm. Posamezne barve predstavljajo različne šarže. Sklenjene vertikalne črte predstavljajo nivoje stabilnih proteinov v plazmi.

Figure 14: Boxplot of distribution of measured protein signals in individual samples after using GeNorm algorithm for normalization. Individual colours represent different batches. Vertical lines represent proteins with stable plasma levels.



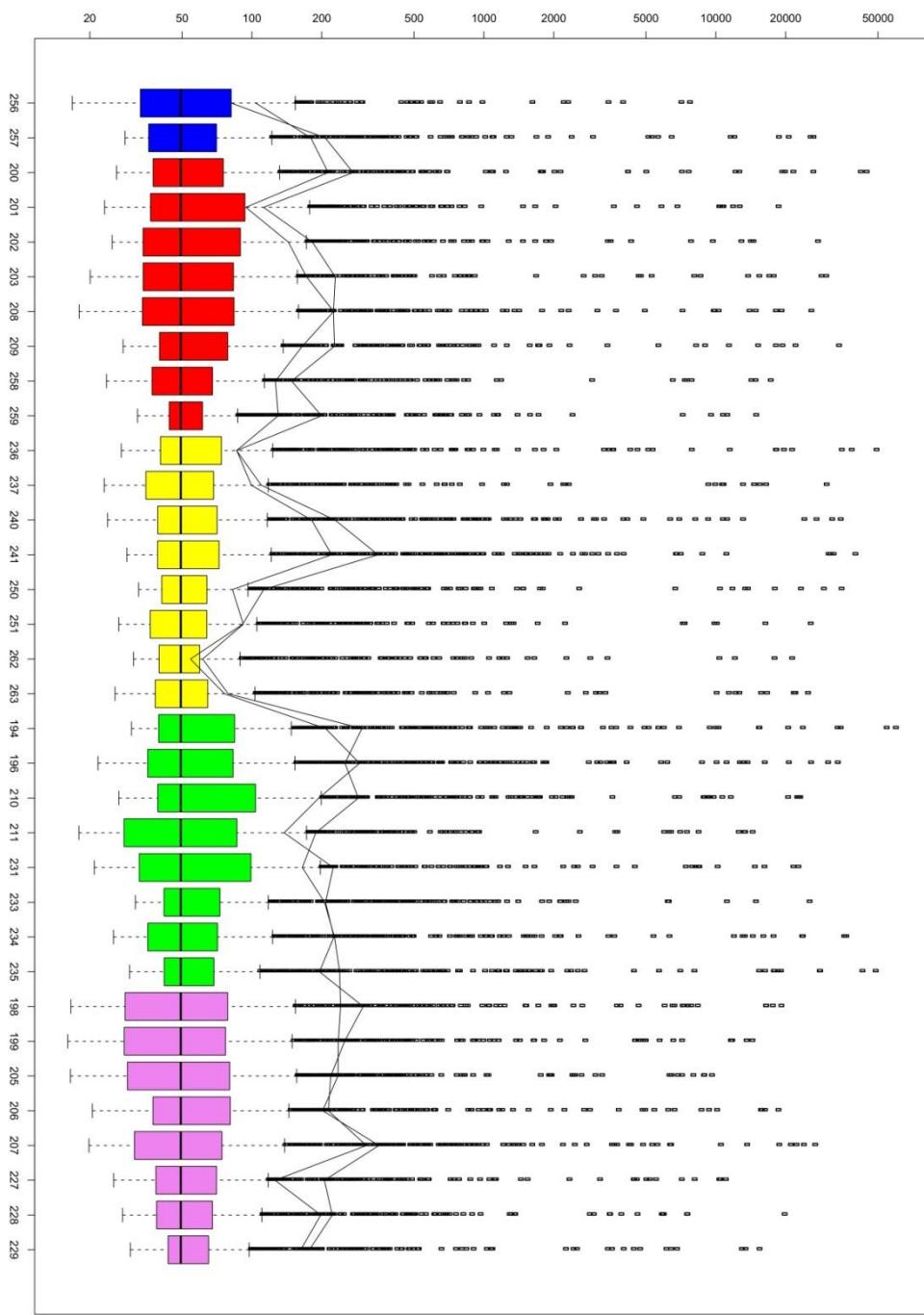
Slika 15: Grafikon kvantilov porazdelitve izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih po kvantilni normalizaciji. Posamezne barve predstavljajo različne šarže. Sklenjene vertikalne črte predstavljajo nivoje stabilnih proteinov v plazmi, določenih z analizo GeNorm.

Figure 15: Boxplot of distribution of measured protein signals in individual samples after quantile normalization. Individual colours represent different batches. Vertical lines represent proteins with stable plasma levels according to GeNorm analysis.



Slika 16: Grafikon kvantilov porazdelitve izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih po normalizaciji z izenačenim povprečjem. Posamezne barve predstavljajo različne šarže. Sklenjene vertikalne črte predstavljajo nivoje stabilnih proteinov v plazmi, določenih z analizo GeNorm.

Figure 16: Boxplot of distribution of measured protein signals in individual samples after using normalization of equalized means. Individual colours represent different batches. Vertical lines represent proteins with stable plasma levels according to GeNorm analysis.

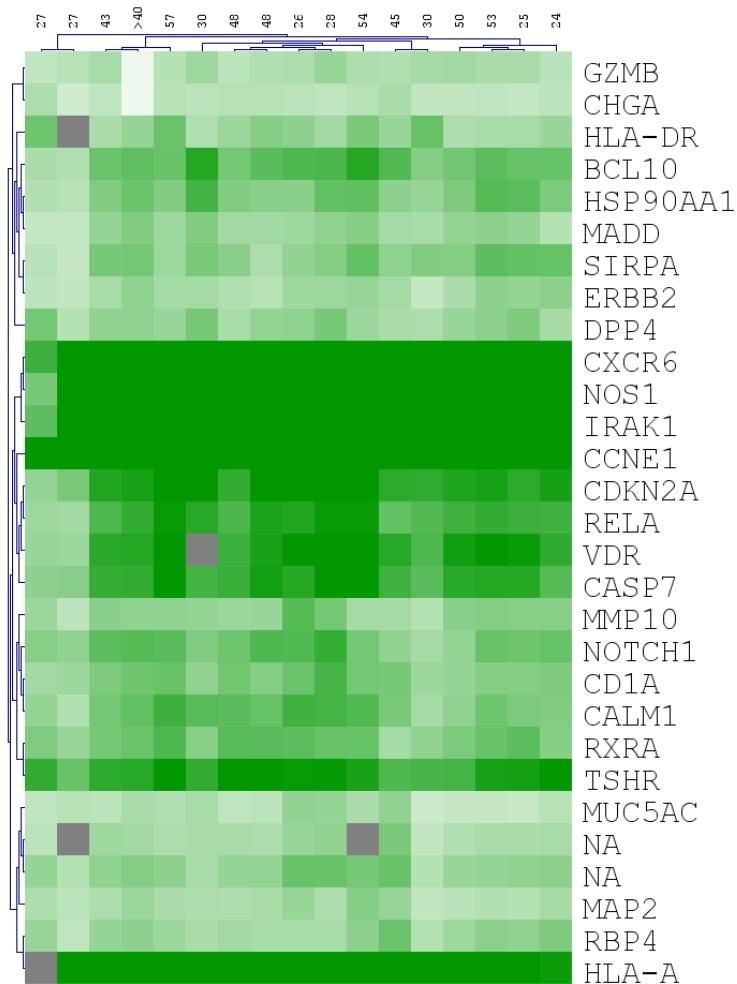


Slika 17: Grafikon kvantilov porazdelitve izmerjenih signalov proteinov v posameznih vzorcih po normalizaciji z izenačenimi medianami. Posamezne barve predstavljajo različne šarže. Sklenjene vertikalne črte predstavljajo nivoje stabilnih proteinov v plazmi, določenih z analizo GeNorm.

Figure 17: Boxplot of distribution of measured protein signals in individual samples after normalization of equalized medians. Individual colours represent different batches. Vertical lines represent proteins with stable plasma levels according to GeNorm analysis.

4.3.1 Proteini, stabilni v krvi zdravih prostovoljev

Kot stabilne proteine smo identificirali tiste, ki so imeli CV signalov mikromrež s protitelesi med vsemi ZP manjši od 0,25. Našli smo jih 28, ki smo jih razvrstili v tri glavne skupine (Slika 18). Ker so bili omenjeni proteini med posamezniki stabilni, so primerni kot potencialni biološki označevalci za katerokoli bolezensko stanje. Med temi proteini sta bila tudi BCL10 in VDR, ki smo ju našli kot stabilna tudi z analizo GeNorm.

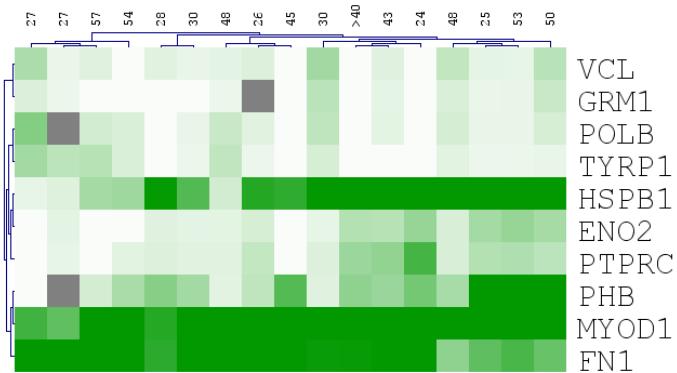


Slika 18: Stabilni proteini v plazmi zdravih prostovoljev, s količnikom variance mikromrežnih signalov, manjšim od 0,25. Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Vrstice so označene s simboli genov (NA označujejo različne kontrole na čipih, ki imajo pričakovano stabilen signal med vzorci). Nad stolcji je starost posameznega zdravega prostovoljca (v letih); kot kaže, stabilni proteini niso povezani s starostjo. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.

Figure 18: Stable proteins in plasma of healthy volunteers, with coefficient of variance of antibody array signal smaller than 0.25. Green colour is in proportion to the protein plasma level. Rows are marked with gene symbols (NA values mark various control spots on arrays with expectedly stable signal). Column names represent age of individual (years); it seems stable proteins are not correlated with age. Grey squares represent empty values.

4.3.2 Proteini, variabilni v plazmi zdravih prostovoljcev

Kot variabilne proteine smo identificirali tiste, ki so imeli CV signalov mikromrež s protitelesi med vsemi ZP večji od 0,75. Dobili smo le 8 proteinov, med katerimi je imel najvišji CV protein MYOD1 (1,2), kar kaže na natančno uravnavana homeostatska ravnovesja plazemskih proteinov. Kljub temu, da smo med temi proteini identificirali tudi VCL (potencialni biološki označevalec za GBM), ga lahko še vedno upoštevamo kot razmeroma stabilnega, saj je njegov CV le 0,77.

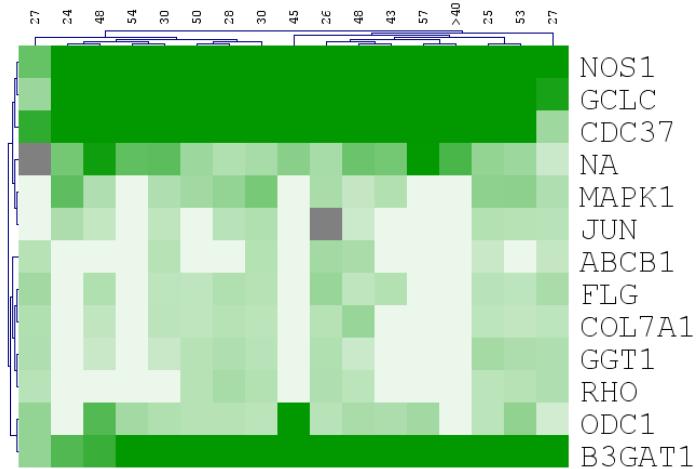


Slika 19: Variabilni proteini v plazmi zdravih prostovoljcev s količnikom variance mikromrežnih signalov, večjim od 0,75. Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Vrstice so označene s simboli genov. Nad stolci je starost posameznega zdravega prostovoljca (v letih); kot kaže, starost ni glavni razlog za variabilnost proteinov. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.

Figure 19: Variable proteins in plasma of healthy volunteers with coefficient of variance of antibody array signal higher than 0.75. Green colour is in proportion to protein plasma level. Rows are marked with gene symbols. Column names represent age of individuals (years); it seems age is not the main reason for protein variability. Grey squares represent empty values.

4.3.3 Proteini, katerih plazemska koncentracija se spreminja s starostjo zdravih prostovoljcev

Odkrili smo 13 proteinov, ki so se po statistični analizi izkazali za značilno povezane s starostjo, s p-vrednostjo manjšo od 0,05. Primerjali smo skupini ZP glede na kritično starost 40 let.

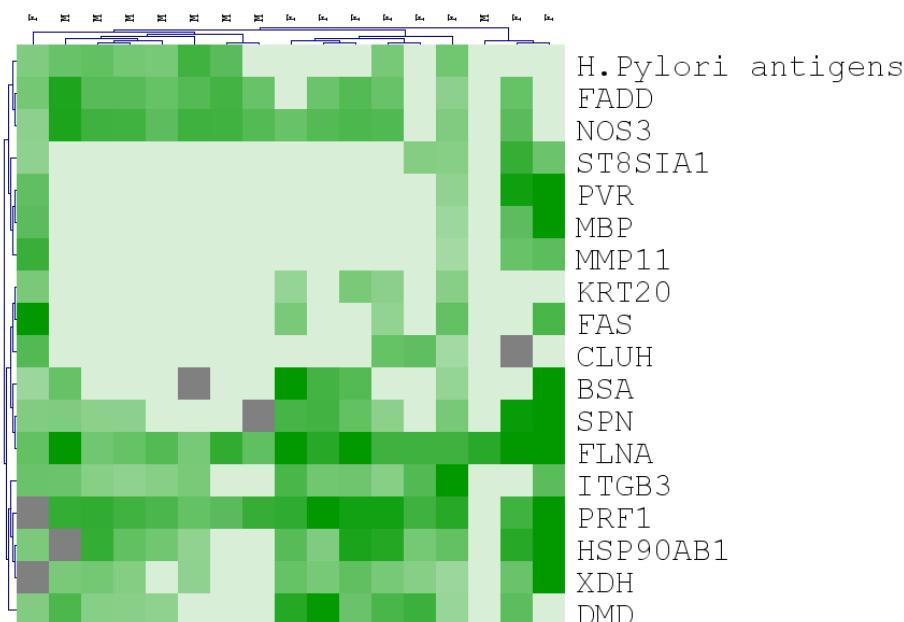


Slika 20: Plazemski proteini, povezani s starostjo (p -vrednost $< 0,05$); vrstice so označene s simboli genov, nad stolci je starost posameznega zdravega prostovoljca (v letih). Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Z NA je označen signal protiteles proti adenovirusnim vlaknom. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.

Figure 20: Plasma proteins, associated with age (p -value < 0.05); rows are marked with gene symbols, column names represent age of individual (years). Green colour is in proportion to protein plasma level. Adenovirus fibers signal is marked with NA. Grey squares represent empty values.

4.3.4 Proteini, katerih plazemska koncentracija je povezana s spolom zdravih prostovoljev

Odkrili smo 13 proteinov, ki so se po statistični analizi izkazali za značilno povezane s spolom ZP, s p-vrednostjo, manjšo od 0,05. Razvidno je (Slika 21), da se proteini delijo v dve skupini, s zaznanimi višjimi koncentracijami bodisi pri moških, bodisi pri ženskah. To nakazuje, da so tudi v normalnih stanjih razlike v proteinski sestavi krvi med spoloma.

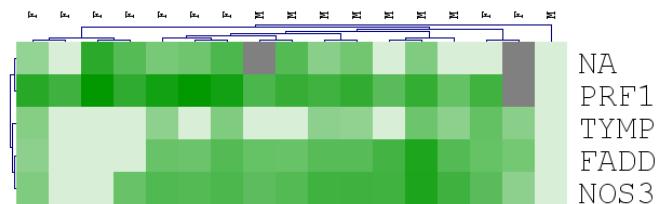


Slika 21: Plazemski proteini, povezani s spolom (p -vrednost $< 0,05$); vrstice so označene s simboli genov, nad stolpci je spol posameznega zdravega prostovoljca (F – ženske, M - moški). Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.

Figure 21: Plasma proteins, associated with gender (p -value < 0.05); rows are marked with gene symbols, column names represent gender of individual (F – female, M - male). Green colour is in proportion to protein plasma level. Grey squares represent empty values.

4.3.5 Proteini, katerih plazemska koncentracija je povezana s prekomerno telesno maso zdravih prostovoljev

Vrednosti mikromrežni signalov ZP smo primerjali med skupinama glede na BMI (kritična vrednost 25). Odkrili smo le 5 proteinov, ki so se po statistični analizi izkazali za značilno povezane z BMI, eden od njih je bil tudi interna kontrola (mišji antigeni). Tudi vizualizacija koncentracij identificiranih proteinov (Slika 22) kaže na to, da proteinska sestava plazme ni odvisna od telesne mase posameznika. Med temi petimi proteini so trije (PRF1, FADD, NOS3), ki smo jih identificirali kot povezane tudi s spolom ZP. To je posledica tega, da je le en ZP ženskega spola imel povišano telesno maso, ostali širje so bili moškega spola.

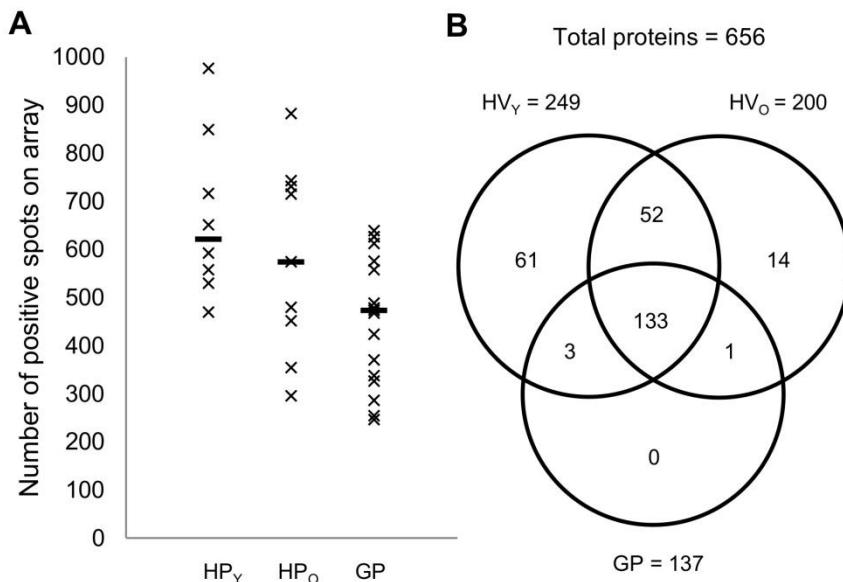


Slika 22: Plazemski proteini, povezani z indeksom telesne mase (p -vrednost $< 0,05$); vrstice so označene s simboli genov, nad stolpci je spol posameznega zdravega prostovoljca (F – ženske, M - moški). Zelena barva je sorazmerna z nivojem proteina v plazmi. Z NA je označena kontrola mišjih antigenov. Sivi kvadratki predstavljajo prazne vrednosti.

Figure 22: Plasma proteins, associated with body mass index (p -value < 0.05); rows are marked with gene symbols, column names represent gender of individual (F – female, M - male). Green colour is in proportion to protein plasma level. Control (mouse antigens) is marked with NA. Grey squares represent empty values.

4.3.6 Vpliv starosti na detekcijo proteinov v krvni plazmi

Kljud temu, da predhodno nismo identificirali značilnega vpliva starosti niti na izražanje genov krvnih celic, niti na metabolno sestavo krvi pri ZP (Gruden in sod., 2012), smo pri proteinškem profilu zaznali večje razlike. Med seboj smo primerjali rezultate med mlajšim ZP, starejšimi ZP (starejši od 40 let) in GB, ter iskali razlike med njimi. Prva razlika se je pokazala že pri kvalitativni analizi rezultatov. Pri starejših ljudeh smo celokupno zaznali manj proteinov (Slika 23).



Slika 23: Primerjava števila pozitivnih signalov na posamezni mikromreži s protitelesi, inkubiranimi z vzorci plazme zdravih prostovoljcev in bolnikov z GBM. Na vsaki mikromreži je bilo 1312 točk, od katerih so bile nekatere pozitivne; primerjali smo število pozitivnih točk med ZP (17 vzorcev) in GB (17 vzorcev), horizontalne črtice predstavljajo mediane (A). Venn-ov diagram prikazuje prekrivanje proteinov, ki smo jih našli pozitivne v različnih skupinah (B). Protein smo upoštevali kot za pozitiven, če je imel pozitiven signal na vsaj 75 % pripadajočih točkah na vseh mikromrežah v isti skupini. HV označuje zdrave prostovoljce, Y oz. O pa znotraj zdravih prostovoljcev mlajše oz. starejše od 40 let, GP označuje bolnike z GBM.

Figure 23: Comparison of number of positive spots on individual antibody array slide, incubated with plasma samples of healthy volunteers and GBM patients. There were 1312 spots on each slide, of which some were positive; we compared the number of positive spots between HV (17 samples) and GP (17 samples), horizontal lines represent median values (A). Venn diagram demonstrating overlap of proteins, which we found positive in different groups (B). Protein was considered positive, if it had a signal in at least 75% of spots on all microarrays in a group. HV marks healthy volunteers Y/O marks healthy volunteers younger/older than 40, GP marks GBM patients.

4.3.7 Proteini, povezani z glioblastoma multiforme

S statistično analizo smo primerjali tudi proteinsko sestavo krvne plazme med GB in ZP. Dobili smo 42 proteinov, ki so imeli spremenjene ravni v krvni plazmi GB v primerjavi z ZP, s p-vrednostjo, manjšo od 0,05. Od tega je imelo 5 povišane ravni v vzorcih GB, 37 pa povišane ravni v vzorcih ZP. V podatkovnih bazah smo za vsakega izmed teh proteinov preverili tudi tkivno izražanje (v plazmi, PL; krvnih celicah, KC; ali možganskem tkivu, MT) in tudi njihovo primarno celično lokalizacijo (Preglednica 7).

S100 kalcij vezujoči protein A9 (S100A9) je kazal največje povečanje pri GB (logaritmiran faktor spremembe $\log_2 FC = 0,73$), *H. pylori* antigeni pa največje zmanjšanje ($\log_2 FC = -1,08$). Od vseh 42 proteinov le DNA primaza (PRIM1) in E2F transkripcijski dejavnik 3 (E2F3) nista bila primarno izražena v nobenem od pričakovanih tkiv (PL, KC ali MT). Kar 31 od 42 proteinov je bilo izraženih v krvnih celicah, kar kaže na spremembe, povezane s telesnim odzivom na GBM. Pregledali smo tudi, kje so proteini primarno

lokalizirani v celici. Od najdenih 42 proteinov se jih 16 akumulira v plazemski membrani (M), 7 v citoplazmi (C), 5 v zunajceličnih tekočinah (Z), 11 v jedru (J) in le sialiltransferaza 8 (ST8SIA1) v Golgijevem aparatu (G). Tirozinska-proteinska kinaza ABL1 (ABL1) je imela primarno izražanje tako v citoplazmi kot v jedru, *H. pylori* antigeni pa so bili bakterijskega izvora.

Preglednica 7: Seznam 42 proteinov s spremenjenimi nivoji v plazmi v GB v primerjavi s ZP. Proteini so označeni s simbolom gena, UniProt kodo in sortirani po log₂ FC.

Table 7: List of 42 proteins with altered plasma levels in GB when compared to ZP. Proteins are marked with gene symbol, UniProt code and are sorted by log₂ FC value.

Ime proteina (angl.)	Simbol gena	UniProt koda	Log ₂ FC	Molekulski razred (angl.)	Tkivo izražanja	CL
Povišani v plazmi bolnikov z GBM						
S100 calcium binding protein A9	S100A9	P06702	0.73	Calcium binding protein	PL, KC, MT	C
Guanine nucleotide binding protein, alpha	GNAO1	P09471	0.72	G protein	KC, MT	M
Ferritin light chain	FTL	P02792	0.72	Storage protein	PL, KC, MT	C
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 25	TNFRSF25	Q93038	0.38	Cell surface receptor	PL, KC	M
Chromogranin A	CHGA	P10645	0.19	Defense/immunity protein	KC, MT	Z
Znižani v plazmi bolnikov z GBM						
Dipeptidyl peptidase IV	DPP4	P27487	-0.31	Protease	PL, KC, MT	M
CD19	CD19	P15391	-0.43	Cell surface receptor	KC	M
Nitric oxide synthase 3	NOS3	P29474	-0.45	Oxidoreductase	PL, KC, MT	M
Thioredoxin reductase 2	TXNRD2	Q9NNW7	-0.46	Reductase	KC, MT	M
Caspase 6	CASP6	P55212	-0.47	Cysteine-type endopeptidase	KC	C
T cell antigen receptor, zeta	CD247	P20963	-0.49	T cell antigen receptor	KC, MT	M
Endoglin	ENG	P17813	-0.49	Cell surface receptor	PL, KC, MT	M
DNA primase	PRIM1	P49642	-0.52	RNA polymerase		J
Interleukin 8	IL8	P10145	-0.54	Cytokine	KC	Z
Transferrin receptor	TFRC	P02786	-0.55	Membrane transporter	PL, KC, MT	M
Signal transducer and activator of transcription 5B	STAT5B	P51692	-0.56	Transcription factor	PL, KC	C
E2F transcription factor 3	E2F3	O00716	-0.56	Transcription factor		J

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 7: Seznam 42 proteinov s spremenjenimi nivoji v plazmi v GB v primerjavi s ZP. Proteini so označeni s simbolom gena, UniProt kodo in sortirani po log₂ FC.

Ime proteina (angl.)	Simbol gena	UniProt koda	Log ₂ FC	Molekulski razred (angl.)	Tkivo izražanja	CL
Tyrosine-protein kinase Lck	LCK	P06239	-0.57	Tyrosine kinase	PL, KC, MT	M
VEGF receptor 1	FLT1	P17948	-0.57	Transmembrane receptor	PL, KC, MT	M
Parathyroid hormone	PTH	P01270	-0.59	Peptide hormone	KC	Z
DNA replication licensing factor MCM2	MCM2	P49736	-0.59	DNA binding protein	PL, KC, MT	J
Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	P05362	-0.59	Adhesion molecule	PL, KC, MT	M
GluR delta 2	GRID2	Q4KKU8	-0.62	Membrane transporter	MT	M
Death adaptor molecule RAIDD	CRADD	P78560	-0.62	Adapter molecule	MT	C
Proto-oncogene c-Fos	FOS	P01100	-0.62	Transcription factor	KC, MT	J
DNA replication licensing factor MCM5	MCM5	P33992	-0.65	DNA binding protein	KC, MT	J
Claudin 5	CLDN5	O00501	-0.66	Adhesion molecule	KC, MT	M
Transcription factor AP-1	JUN	P05412	-0.66	Transcription factor	KC	J
DNA dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	P78527	-0.68	Serine/threonine kinase	PL, KC, MT	J
Junction plakoglobin	JUP	P14923	-0.69	Adhesion molecule	PL	C
Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	CDKN1B	P46527	-0.69	Cell cycle protein	KC, MT	J
Matrix metalloproteinase 11	MMP11	P24347	-0.70	Metalloprotease	KC, MT	Z
Calcitonin	CALCA	P01258	-0.70	Peptide hormone	MT	Z
S phase kinase associated protein 1A (p19A)	SKP1	P63208	-0.74	Ubiquitin proteasome protein	MT	J
Amyloid beta A4 protein	APP	P05067	-0.74	Cell surface receptor	KC, MT	M

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 7: Seznam 42 proteinov s spremenjenimi nivoji v plazmi v GB v primerjavi s ZP. Proteini so označeni s simbolom gena, UniProt kodo in sortirani po log₂ FC.

Ime proteina (angl.)	Simbol gena	UniProt koda	Log ₂ FC	Molekulski razred (angl.)	Tkivo izražanja	CL
DNA repair protein XRCC2	XRCC2	O43543	-0.77	DNA binding protein	MT	J
Sialyltransferase 8	ST8SIA1	Q92185	-0.77	Sialyltransferase	PL, KC	G
DNA mismatch repair protein Mlh1	MLH1	P40692	-0.81	DNA repair protein	PL	J
DNA polymerase, gamma	POLG	P54098	-0.88	DNA polymerase	KC	M
Tyrosine-protein kinase ABL1	ABL1	P00519	-0.95	Tyrosine kinase	KC	C, J
FAS-associated death domain protein	FADD	Q13158	-0.95	Adapter molecule	MT	C
<i>H. pylori</i> antigens			-1.08	<i>H. pylori</i> antigens		

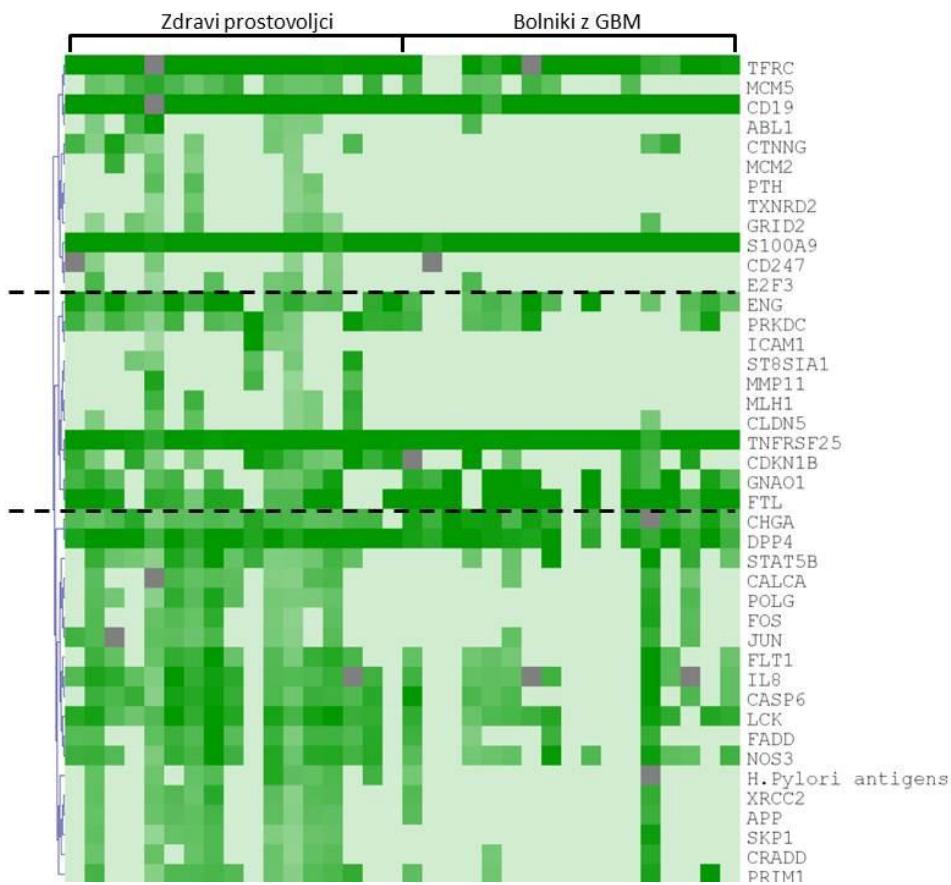
Ime proteina je tako, kot je definiral proizvajalec mikromrež s protitelesi (FullMoon Biosystems). Log2 FC: logaritmirani faktor spremembe pri GBM bolnikih v primerjavi z zdravimi prostovoljci. Molekulski razred je anotiran po bazi podatkov Human Genome Reference Database (www.hprd.org). Tkivo izražanja proteina: plazma, PL; krvne celice, KC; možgansko tkivo, MT. Celična lokalizacija, CL: plazemska membrana, M; citoplazma, C; zunajcelični matriks, Z; jedro, J; Golgijski aparat, G.

Proteini, primarno lokalizirani v M, C in Z, so bili tako zvišani kot znižani v plazmi GB, medtem ko so bili proteini, primarno lokalizirani v J in G, v plazmi GB izključno znižani (Preglednica 7). Od 42 proteinov jih 14 ni bilo značilnih za normalno ali tumorsko tkivo, kar lahko pomeni, da ne pridejo vsi potencialni biološki označevlaci v kri neposredno iz tumorja oz. okoliškega tkiva. Sistemski odziv na nekroze GBM in drugi procesi, povezani z GBM, lahko vplivajo na izločanje proteinov v kri iz drugih celic ali tkiv kot so jetra ali organi imunskega sistema (bezgavke, vranica, timus).

Vseh 42 proteinov s spremenjenimi nivoji v plazmi GB smo analizirali za morebitne medsebojne asociacije, z uporabo podatkovne baze DAVID. Tako smo odkrili tri glavne skupine funkcionalnih in signalnih poti:

- T-celična signalizacija in imunski odziv,
- celična adhezija in migracija,
- nadzor celičnega cikla in apoptoza.

Ko smo proteine hierarhično razvrstili glede na profil prisotnosti v plazmi, smo dobili tri glavne skupine, ki so sovpadale s tremi skupinami funkcionalnih in signalnih poti glede na rezultate iz podatkovne baze DAVID (Slika 24).



Slika 24: Toplotni diagram izražanja 42 proteinov, povezanih z GBM, predhodno hierarhično razporejenih po relativnih vrednostih v plazmi in z opaznim razvrščanjem v tri večje skupine, kar označujejo vodoravne črtkane črte. Intenziteta zelene barve je sorazmerna z jakostjo signala iz mikromrež s protitelesi, bela polja predstavljajo vrednosti pod mejo detekcije.

Figure 24: Heatmap of plasma levels of 42 proteins, associated with GBM, hierarchically clustered according to relative plasma values, grouping in three distinguished groups, marked by dashed horizontal lines. Green colour is in proportion to signal from antibody arrays, white squares represent values below limit of detection.

Glede na to, da smo odkrili tudi skupino proteinov, ki so del T-celične signalizacije in imunskega odziva, gre sklepati, da so vsaj nekateri med njimi prišli v kri iz krvnih celic. Najverjetneje so bili v krvi kot posledica odziva imunskih krvnih celic na tumorsko parakrino in endokrino signalizacijo s kemokini.

4.3.8 Ožji izbor potencialnih plazemskih bioloških označevalcev glioblastoma multiforme

Da bi lahko izmed nabora 42 proteinov povezanih z GBM (Preglednica 7) izbrali tiste, ki so najbolj robustni in neodvisni od starosti, smo po pregledu vpliva starosti na rezultate primerjali rezultate med vsemi proteini, povezanimi z GB, in tistimi, povezanimi s starostjo. Tako skupino vzorcev Z_P kot Z_M smo najprej med sabo in nato še ločeno

primerjali s skupino GB, saj so bili vsi GB starejši od 40 let. Proteini, ki smo jih upoštevali kot robustne potencialne biološke označevalce, so morali biti statistično značilni ($p < 0,05$) tako pri primerjavi GB proti ZP, kot pri primerjavi GB proti ZPs, in niso bili značili pri primerjavi ZPS proti ZPM. Tem kriterjem je zadoščalo 11 proteinov (Preglednica 8).

Pregled javno dostopnih podatkovnih baz in literature je pokazal, da je bilo 8 od 11 proteinov že predhodno povezanih z boleznijo GBM. A vendar so le Feritin (FTL) in S100 kalcij vezajoči protein A9 (S100A9) predhodno odkrili s spremenjenimi nivoji v plazmi, obenem pa sta imela tudi povišane nivoje v plazmi GB. Protein S100A9 smo v naših analizah identificirali kot najbolj povišanega v plazmi GB z $\log_2 FC = 0,73$. Poleg tega smo odkrili le še protein GNAO1 s povišanim nivojem v plazmi GB, vsi ostali proteini pa so imeli plazemske nivoje v GB znižane. Med njimi je imel protein FAS-povezane smrtne domene (FADD) največji faktor zmanjšanja koncentracije v plazmi ($\log_2 FC = -0,95$). Z analizo baz podatkov smo ugotovili, da so imeli vsi proteini z zvišanimi nivoji v GB za primarno tkivo izražanja tako krvne celice, kot možgansko tkivo.

Preglednica 8: Seznam 11 robustnih potencialnih bioloških označevalcev s spremenjenimi koncentracijami v plazmi pri primerjavah GB proti ZP ter GB proti ZPs.

Table 8: List of 11 robust biomarkers with altered plasma levels comparing GB to ZP and GB to ZPs.

Ime proteina (angl.)	Simbol gena	Log2 FC	Molekulski razred	Tkivo izražanja	CL	N M T	G M B M	Predhodne povezave z GBM
Povišani v plazmi GB								
Ferritin light chain	FTL	0.72	Storage protein	PL, KC, MT	C	3	1.4	Increased in plasma (MS, ELISA) and in CSF (RIHK) of GPs (Gautam in sod., 2012; Sato in sod., 1998)
Guanine nucleotide binding protein, alpha	GNAO1	0.72	G protein	KC, MT	M	0	0.4	Decreased in high-grade glioma brain tissue of GPs (IB, IHK) (Takenaka in sod., 1990)
S100 calcium binding protein A9	S100A9	0.73	Calcium binding protein	PL, KC, MT	C	0	0.3	Increased in plasma of GPs (MS, ELISA) (Gautam in sod., 2012)
Znižani v plazmi GB								
Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	CDKN1B	-0.69	Cell cycle protein	KC, MT	J	2	2	Decreased in brain tissue in GPs with poor prognosis (IHK) (Kirila in sod., 2003)
FAS-associated death domain protein	FADD	-0.95	Adapter molecule	MT	C	0	1.1	Up-regulation of TNFR1 through FADD induces apoptosis in GBM cells (RT-PCR, IHK, IB) [52]
Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	-0.59	Adhesion molecule	PL, KC, MT	M	0	0.9	Increased in tumour tissue of GPs (RT-PCR) (Berindan-Neagoe in sod., 2012)
DNA mismatch repair protein	MLH1	-0.81	DNA repair protein	PL	J	2	2.4	Decreased in recurrent tumour tissue of GPs (IHK) (Stark in sod., 2010)
Matrix metalloproteinase 11	MMP11	-0.7	Metalloprotease	KC, MT	Z	0	0.4	Increased in tumour tissue of GPs (RT-PCR, IHK, IB) (Stojic in sod., 2008)

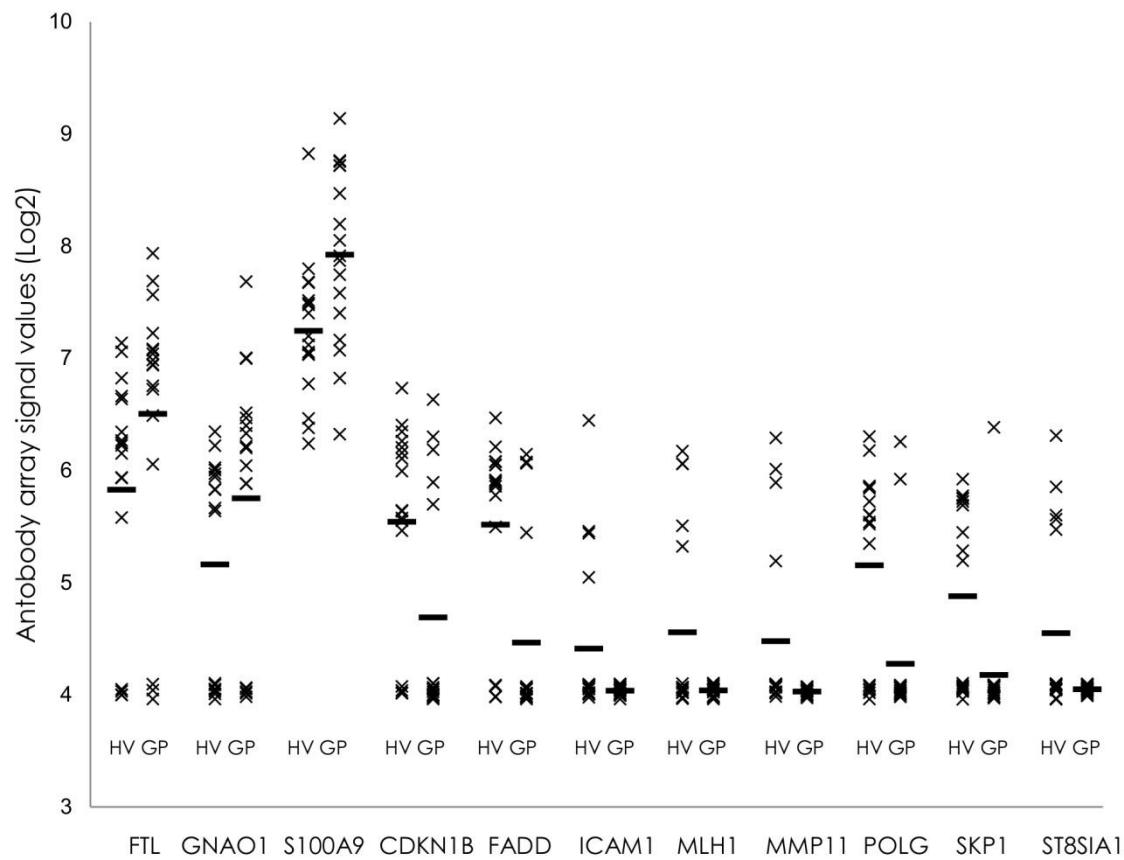
Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 8: Seznam 11 robustnih potencialnih bioloških označevalcev s spremenjenimi koncentracijami v plazmi pri primerjavah GB proti ZP ter GB proti ZPs.

Ime proteina (angl.)	Simbol gena	Log2 FC	Molekulski razred	Tkivo izražanja	CL	N M T	G B M	Predhodne povezave z GBM
DNA polymerase, gamma	POLG	-0.88	DNA polymerase	KC		M	2	0.7 /
S phase kinase associated protein 1A (p19A)	SKP1	-0.74	Ubiquitin proteasome protein	MT		J	3	2.7 /
Sialyltransferase 8	ST8SIA1	-0.77	Sialyltransferase	PL, KC		G	1	1.5 /

Log₂ FC: logaritmirani faktor spremembe pri GBM bolnikih v primerjavi z zdravimi prostovoljci. Tkivo izražanja proteina: plazma, PL; krvne celice, KC; možgansko tkivo, MT. Celična lokalizacija, CL: plazemska membrana, M; citoplazma, C; zunajcelični matriks, Z; jedro, J; Golgijev aparat, G. Povprečno izražanje posameznega proteina v normalnem možganskem tkivu (NMT) ter gliomskem tkivu (GBM), opredeljeno po Human Protein Atlas Database (<http://www.proteinatlas.org>): 0, ni izražanja; 1, nizko izražanje; 2, srednje izražanje; 3, visoko izražanje. Metode: masna spektrometrija, MS; encimski imunski test, ELISA;(radio) imunohistokemija, (R)IHK; imunski prenos (angl. *immune blotting*), IB; PCR v realnem času, RT-PCR.

Na grafu (Slika 25) smo izrisali vrednosti izražanja 11 robustnih potencialnih bioloških označevalcev v posameznih vzorcih, da bi bolje videli dejanske porazdelitve signalov med vzorci. Opazili smo, da so pri večini proteinov signali pri nekaterih vzorcih iz obeh skupin pod mejo detekcije. Samo S100A9 je imel na vseh mikromrežah vsaj eno pozitivno točko. Proteinov ICAM1 MLH1, MMP11 ter ST8SIA1 sploh nismo zaznali v nobenem vzorcu GB. Zaznali smo jih le pri ZP in še to le v določenih vzorcih. Zanimivo je, da smo MMP11 (4 od 9) in ST8SIA1 (5 od 9) zaznali le pri zdravih ženskih prostovoljkah.

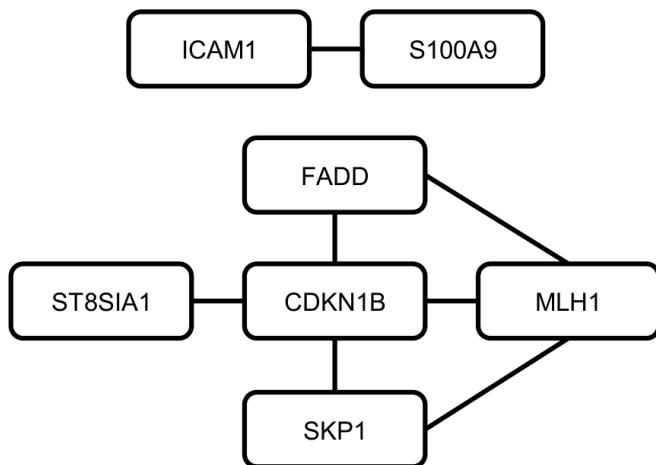


Slika 25: Graf, ki prikazuje koncentracije 11 plazemskih robustnih potencialnih bioloških označevalcev (proteinov) za GBM v posameznih vzorcih na mikromrežah s protitelesi. Horizontalne črtice predstavljajo povprečne vrednosti koncentracije proteinov v zdravih prostovoljcih (HV) ter bolnikov z GBM (GP).

Figure 25: Graph representing concentrations of 11 robust potential biomarkers (proteins) for GBM in individual samples on antibody arrays. Horizontal bars represent average values of protein concentrations in healthy volunteers (HV) and GBM patients (GP).

4.3.9 Funkcionalne asociacije med potencialnimi bio-označevalci

Da bi preverili ali med posameznimi identificiranimi biološkimi označevalci obstajajo funkcionalne povezave, smo 11 robustnih potencialnih bioloških označevalcev analizirali z orodjem Biomine (Preglednica 8). Odkrili smo, da med njimi obstaja 7 različnih povezav. Največ povezav (4) je imel protein CDKN1B, ki je bil povezan s proteini FADD, MLH1, SKP1 ter ST8SIA1 (Slika 26).



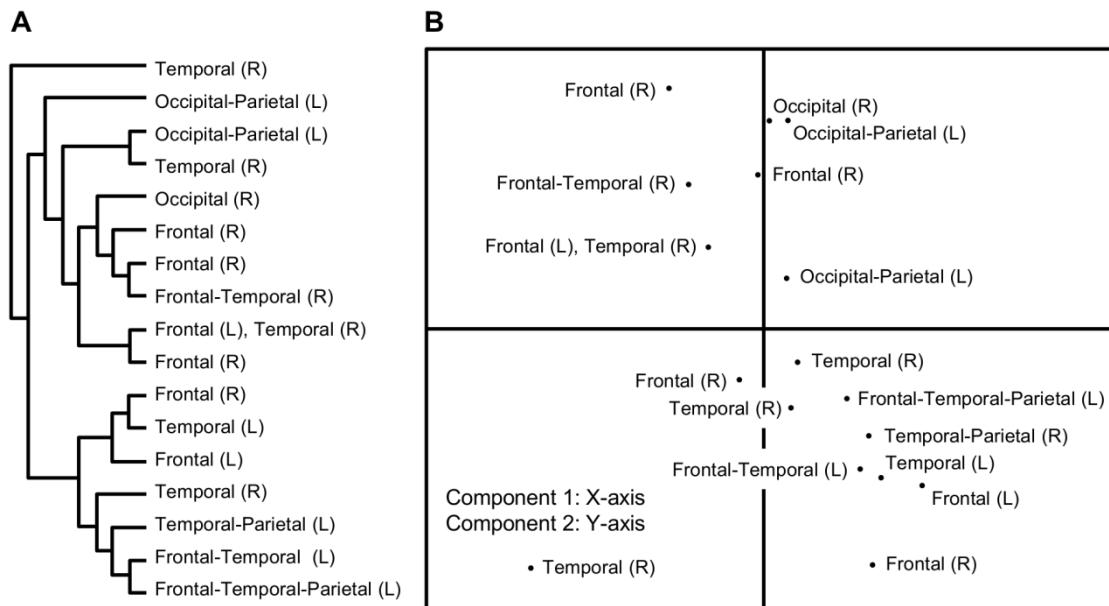
Slika 26: Funkcionalne povezave med identificiranimi robustnimi potencialnimi plazemskimi biološkimi označevalci za GBM.

Figure 26: Functional associations between identified robust potential plasma biomarkers for GBM.

4.3.10 Vpliv anatomske lokacije tumorja na proteinsko sestavo plazme bolnikov z GBM

Da bi preverili ali je prisotnost teh 42 proteinov pogojena z lokacijo GBM tumorja v možganih, smo vzorce GB hierarhično razvrstili glede na izražanje teh 42 proteinov v GB. Opazili smo, da so se vzorci porazdelili v dve glavni skupini, in sicer glede na lokacijo tumorja v levi (L) oz. desni (D) hemisferi možganov. V skupini z osmimi D tumorji sta bila le dva L tumorja, bila pa sta tudi edina okcipitalno-parietalna tumorja. V drugi skupini je bilo 5 L tumorjev in 2 D tumorja (Slika 27, A).

Glede na izražanje 42 proteinov smo izrisali tudi graf analize glavne komponente (PCA). Komponenta 1 ločuje lokacijo hemisfere GBM (levo oz. desno), komponenta 2 ločuje med frontalnimi in okcipitalnimi lokacijami (prvi in drugi kvadrant) ter temporalnimi lokacijami GBM (tretji in četrti kvadrant) (Slika 27, B).



Slika 27: Združevanje vzorcev bolnikov z GBM glede na podobnosti v plazemskih ravneh 42 proteinov, ki so imeli izmerjene plazemske vrednosti značilno različne (p -vrednost $< 0,05$) med zdravimi prostovoljci in bolniki z GBM. Hierarhično razvrščanje (A) in analiza glavne komponente (B); izris je bil narejen s pomočjo programa MEV.

Figure 27: Grouping of GBM patients according to similarities in levels of 42 proteins, which had significantly different (p -value < 0.05) plasma levels between healthy volunteers and GBM patients. Hierarchical clustering (A) and principal component analysis (B); image was created using MEV software.

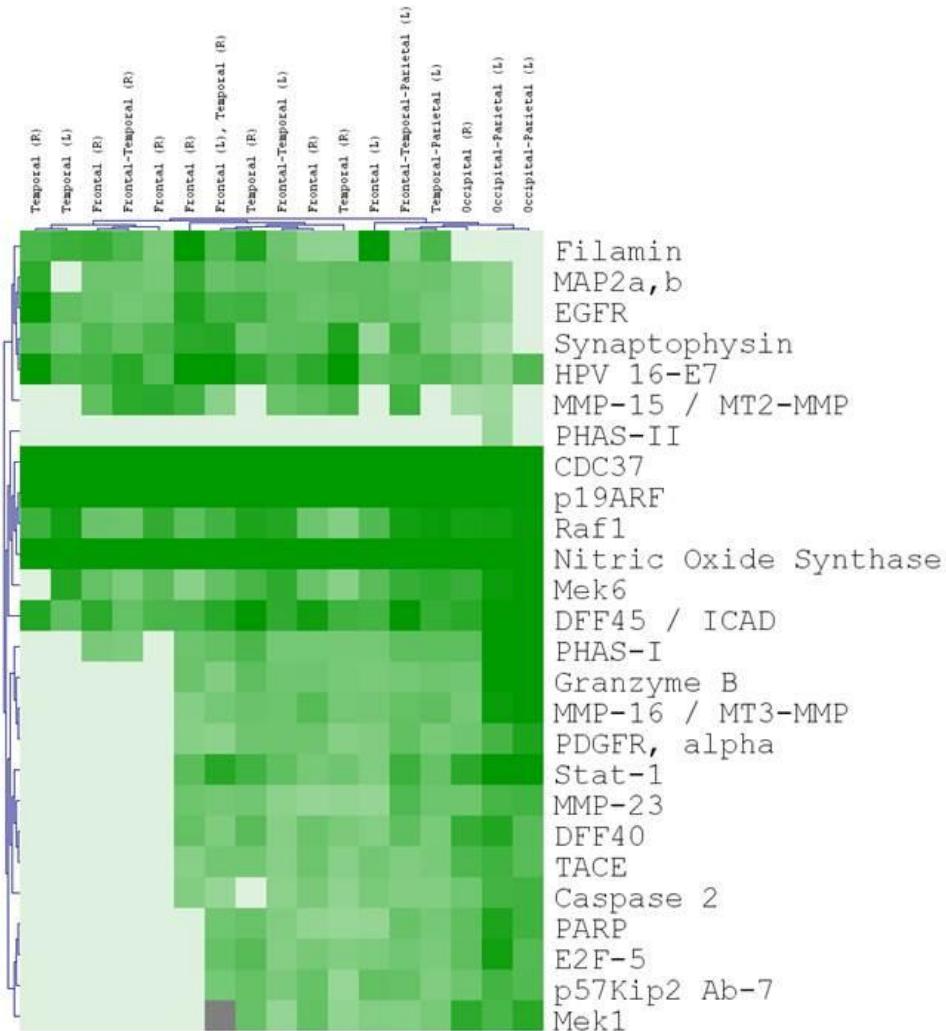
Iz rezultatov smo sklepal, da je prihajalo do razlik v ravneh plazemskih proteinov glede na položaj tumorja v možganih. Zato smo za vsako lokacijo za vsak protein izračunali, kako dobro lahko razlikuje med vzorci ki imajo tumor na določeni anatomski lokaciji, proti vzorcem, ki tumorja na tej lokaciji nimajo. V nadaljnjo analizo smo vzeli proteine, visoko specifične za eno lokacijo (p -vrednost $< 0,01$), ter proteine, specifične za več lokacij (p -vrednost $< 0,05$). Na ta način smo prišli do seznama 26 proteinov (Preglednica 9).

Preglednica 9: Plazemski proteini (26), povezani z lokacijo tumorja v možganih, s prikazanimi Log₂ FC vrednostmi za posamezno lokacijo.

Table 9: Plasma proteins (26), associated with tumour location, with Log₂ FC value for individual location.

Ime proteina	Simbol gena	Frontalna lokacija	Temporalna lokacija	Okipitalna lokacija	Parietalna lokacija
ADAM17	ADAM17	-0,33	-0,37	0,89	0,67
Glutamine dependent carbamoyl phosphate synthase	CAD	-0,39	-0,38	0,95	0,72
Caspase 2	CASP2	-0,21	-0,63	1,06	0,94
CDC37	CDC37	-0,37	0,08	0,42	0,35
Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	CDKN1C	-0,32	-0,18	0,84	0,81
Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	CDKN2A	-0,24	-0,02	0,30	0,40
DNA fragmentation factor 45	DFFA	-0,66	-0,63	1,34	1,15
E2F transcription factor 5	E2F5	-0,55	-0,16	1,02	0,89
EGF receptor	EGFR	0,13	0,33	-0,90	-0,64
Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	EIF4EBP1	-0,34	-0,45	1,08	0,97
Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	EIF4EBP2	-0,33	-0,33	0,75	0,59
Filamin A, alpha	FLNA	0,65	0,13	-2,51	-0,98
Granzyme B	GZMB	-0,63	-0,58	1,32	1,19
Microtubule associated protein 2	MAP2	0,33	0,12	-0,74	-0,44
MEK1	MAP2K1	-0,74	-0,44	1,25	0,89
MAP2K6	MAP2K6	-0,18	-0,15	0,55	0,56
Matrix metalloproteinase 15	MMP15	1,24	-0,17	-0,74	-0,47
Matrix metalloproteinase 16	MMP16	-0,45	-0,41	1,06	1,06
Matrix metalloproteinase 23	MMP23	-0,33	-0,20	0,85	0,95
Nitric oxide synthase 1	NOS1	-0,20	-0,05	0,41	0,52
ADP ribosyl transferase	PARP1	-0,61	-0,14	1,14	1,07
Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA	-0,34	-0,32	0,92	0,90
RAF1	RAF1	-0,28	0,06	0,35	0,39
STAT1	STAT1	-0,53	-0,40	1,28	1,09
Synaptophysin	SYP	0,38	0,36	-1,11	-0,57
TCFL5	TCFL5	0,05	0,22	-0,56	-0,49

Da bi preverili, kako dobro lahko vzorce razlikujemo glede na seznam 26 statistično značilnih proteinov (Preglednica 9), smo na podlagi izmerjenih plazemskih vrednosti teh proteinov vzorce GB hierarhično razvrstili. Vzorci so se razvrstili v dva večja razreda (Slika 28). V enem so bili le vzorci GB, ki so imeli tumorje v okcipitalnem ali parietalnem režnju. V drugem razredu so bili le vzorci bolnikov s temporalnim ali frontalnim tumorjem. Na podlagi tega lahko sklepamo, da gre pri GB za več podtipov tumorjev, odvisnih tudi od anatomske lokacije; verjetno gre pri GBM v okcipitalnih in parietalnih lokacijah za tumorje sorodnega izvora, enako pa verjetno velja tudi za GBM v frontalnih in temporalnih lokacijah.



Slika 28: Hierarhično razvrščanje vzorcev bolnikov z GBM in proteinov glede na izražanje proteinov, specifičnih za lokacijo tumorja v možganih. Intenziteta zelene barve je sorazmerna z izražanjem posameznega proteina v krvni plazmi posameznega bolnika z GBM. Sivi kvadratki predstavljajo »NA« vrednosti.

Figure 28: Hierarchical clustering of samples of GBM patients and proteins according to levels of proteins, specific for tumour location in the brain. Intensity of green colour is in proportion to plasma levels of proteins. Grey squares represent NA values.

4.3.11 Proteini, povezani s preživetjem po diagnozi glioblastoma multiforme

Preverili smo tudi, če so izmerjene plazemske vrednosti proteinov odvisne od izzida bolezni, kar smo ovrednotili s preživetjem bolnikov po prvi diagnozi. Najprej smo vzorce razdelili v dve skupini glede na preživetje GB (več ali manj od enega leta po diagnozi). Z Wilcoxonovim Mann-Whitneyevim neparametričnim statističnim testom smo nato identificirali 23 proteinov, z različnimi koncentracijami v krvni plazmi v izbranih skupinah (p-vrednost < 0,05).

Identificiranim 23 proteinom smo določili kritične vrednosti plazemskih koncentracij, na podlagi katerih smo najbolje razlikovali GB glede na preživetje po diagnozi. To smo naredili tako, da smo vzorce za vsak protein šestkrat razdelili v dve skupini glede na šest različnih kritičnih vrednosti koncentracije proteina; vzorci so bili razvrščeni na tiste z manjšo oz. večjo koncentracijo od kritične. Šest kritičnih vrednosti smo določili tako, da so vzorce ločile v dve skupini, število vzorcev med skupinama pa je bilo v šestih vnaprej določenih razmerjih (0,25 : 0,75; 0,35 : 0,65; 0,45 : 0,55; 0,55 : 0,45; 0,65 : 0,35; 0,75 : 0,25) . Vsak tak par skupin smo analizirali z analizo log-rank in izračunali p-vrednost glede na razlike v preživetju med analiziranim skupinama. Po analizi log-rank je ostalo značilnih le še 16 proteinov (Preglednica 10), ki so imeli vsaj pri eni mejni vrednosti značilno povezavo s preživetjem (p-vrednost < 0,05). Od tega jih je imelo pet povišane ravni v plazmi GB z daljšim preživetjem, 11 pa znižane. Zanimivo je, da je kar 8 od teh 16 proteinov značilnih tudi za anatomsko lokacijo GBM tumorja (Preglednica 9), le GNAO1 pa smo našli tudi značilnega v primerjavi ZP proti GB (Preglednica 8).

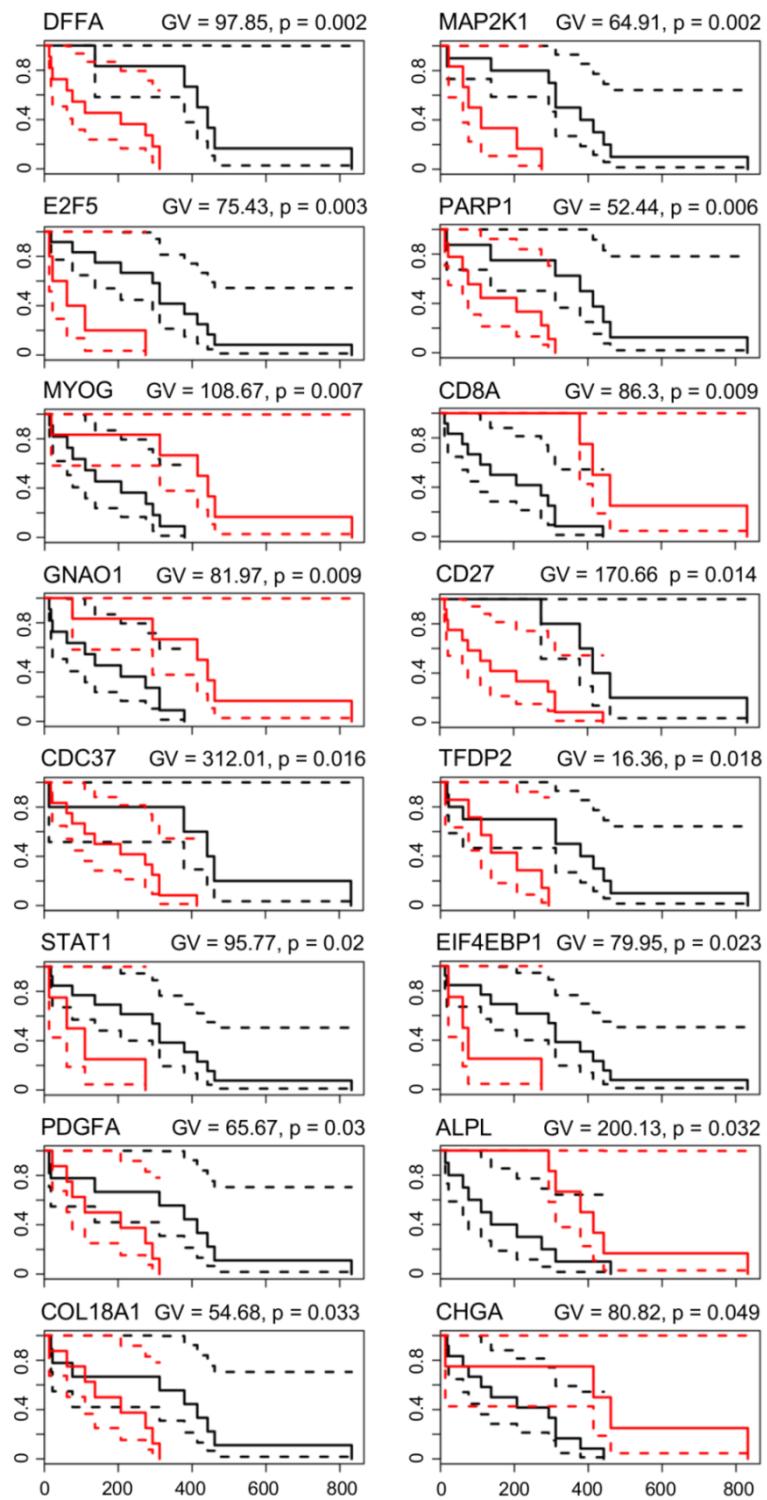
Preglednica 10: Seznam 16 proteinov, povezanih s preživetjem bolnikov z GBM, ki so bili identificirani z analizo log-rank. Proteini z rdeče označenimi imeni so bili asocirani tudi s pozicijo tumorja v možganih, z modro pa z diagnozo GBM. GB_D so bolniki z GBM, ki so preživeli več kot eno leto po diagnozi.

Table 10: List of 16 proteins, associated with survival of GBM patients, identified with log-rank analysis. Proteins marked with red names were also associated with position of the tumour in the brain, proteins marked with blue were associated with GBM diagnosis. GB_D are GBM patients, that survived more than one year after diagnosis.

Ime proteina, kot ga je definiral proizvajalec mikromrež s protitelesi (FullMoon Biosystems)	Simbol gena	p-vrednost	Kritična vrednost	Nivo pri GB_D
DNA fragmentation factor 45	DFFA	0,002	97,85	Znižan
MEK1	MAP2K1	0,002	64,91	Znižan
E2F transcription factor 5	E2F5	0,003	75,43	Znižan
ADP ribosyl transferase	PARP1	0,006	52,44	Znižan
Myogenic factor 4	MYOG	0,007	108,67	Zvišan
CD8 Antigen, alpha polypeptide	CD8A	0,009	86,3	Zvišan
Guanine nucleotide binding protein, alpha	GNAO1	0,009	81,97	Zvišan
CD27	CD27	0,014	170,66	Znižan
CDC37	CDC37	0,016	312,01	Znižan
Transcription factor DP2	TFDP2	0,018	16,36	Znižan
STAT1	STAT1	0,02	95,77	Znižan
Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	EIF4EBP1	0,023	79,95	Znižan
Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA	0,03	65,67	Znižan
Alkaline phosphatase, liver	ALPL	0,032	200,13	Zvišan
Collagen type XVIII alpha 1	COL18A1	0,033	54,68	Znižan
Chromogranin A	CHGA	0,049	80,82	Zvišan

4.3.12 Kaplan-Meierjeva analiza preživetja

Za vsakega od 16 proteinov, ki smo jih odkrili povezane s preživetjem po analizi log-rank, smo za vse mejne vrednosti izrisali Kaplan-Meier grafe. Na ta način smo pregledali, kako dobro omenjenih 16 proteinov razlikuje med GB, ki preživijo kratek oz. dolg čas po diagnozi. Skupaj smo zbrali grafe za vsak protein pri mejnih vrednostih, za katere smo izračunali najnižje p-vrednosti (Slika 29). Rezultati analize log-rank so kazali zelo različne vrednosti razlikovanja pri različnih KV, prikazali pa smo le najbolj značilne. Za boljši pregled ločitvenega profila je potrebno analizirati Kaplan-Meierjeve grafe pri vseh KV hkrati. V tem pogledu sta bila najbolj neodvisna od KV miogeni faktor 4 (MYOG) in transkripcijski faktor D2 (TFDP2), saj sta med vzorci statistično značilno razlikovala pri štirih KV od šestih (Priloga 2).

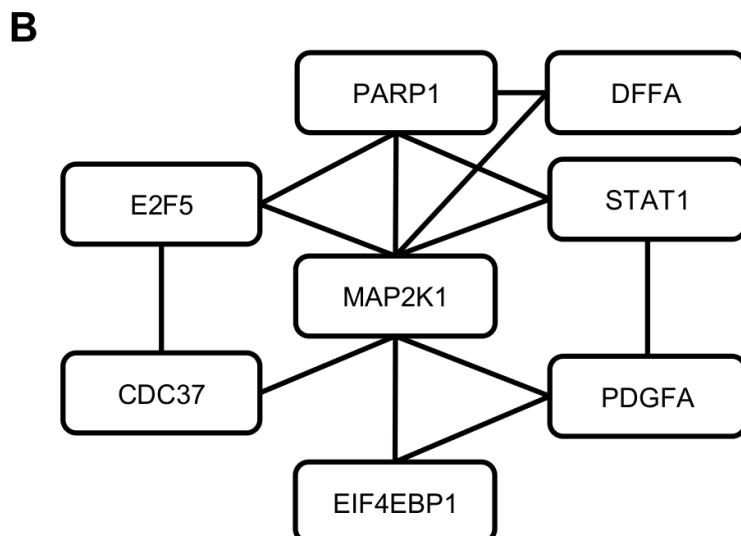


Slika 29: Kaplan-Meier grafi preživetja 16 proteinov, povezanih s preživetjem GB po diagnozi, s p-vrednostjo, manjšo 0,05. Rdeče krivulje predstavljajo skupine s signalom večjim od kritične vrednosti (GV), črne krivulje pa skupine z nižjim signalom. Črtkane krivulje predstavljajo intervale zaupanja.

Figure 29: Kaplan-Meier survival graphs for 16 proteins, associated with survival of GB after diagnosis with p -value < 0.05 . Red lines represent groups with signal higher than grouping value (GV), black lines represent groups with lower signal. Dashed lines represent confidence intervals.

V preseku med skupinama proteinov, povzanih z anatomske lokacijo tumorja ($n = 26$, Preglednica 9) ter proteinov, povezanih s preživetjem ($n = 16$, Preglednica 10), smo našli 8 proteinov (FDDA, MAP2K1, CDC37, E2F5, EIF4EBP1, PARP1, PDGFA ter STAT1). Glede na to lahko sklepamo, da je tumorska lokacija vplivala na prognozo bolnika, konkretno na preživetje po diagnozi. Ko smo pregledali podakte, smo ugotovili, da so GB, ki so imeli tumor v frontalnem možganskem režnju, preživeli 2,2-krat dlje (povprečje preživetja = 392 dni) kot tisti GB, ki so imeli tumorje v katerem koli od ostalih treh režnjev (povprečje preživetja = 176 dni), vendar pa je bila ta povezava zaradi malega števila vzorcev le šibkeje statistično značilna (p -vrednost = 0,11).

S primerjavo teh presečnih proteinov z orodjem Biomine smo ugotovili, da obstaja med omenjenimi osmimi proteini kar 11 funkcionalnih povezav. Zanimivo je tudi, da je protein MAP2K1 funkcionalno povezan z vsemi ostalimi sedmimi proteini (Slika 30).



Slika 30: Funkcionalne povezave med proteini, ki so bili povezani tako s preživetjem (prognozo) kot tudi z anatomsko lokacijo GBM tumorja v možganih, glede na analizo z orodjem Biomine.

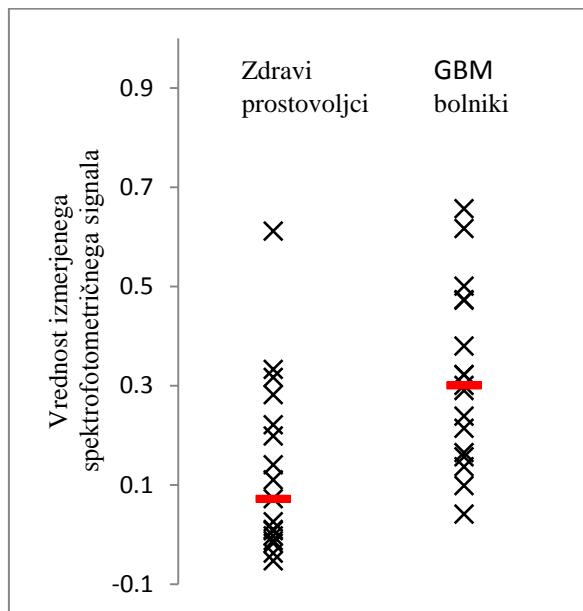
Figure 30: Functional associations between proteins, associated with survival (prognosis) as well as anatomic location of GBM tumour in the brain, according to Biomine analysis.

4.4 ENCIMSKOIMUNSKI TEST PETIH PROTEINOV

Z encimskoimunskim testom (ELISA) smo analizirali sledečih pet proteinov:

- Vinkulin (VCL).
- Član družine receptorjev dejavnikov nekroze tumorjev 25 (TNFRSF25).
- Sintaza dušikovega oksida 1 (NOS1).
- E2F dejavnik transkripcije 1 (E2F1).
- Metaloproteinaza matriksa 15 (MMP15).

Od teh smo signal zaznali le pri analizi proteinov VCL in NOS1, in to le pri neredčenih vzorcih. Po analizi signalov smo za ta dva proteina preverili, kako dobro lahko na podlagi izmerjenih vrednosti razlikujemo vzorce glede na ZP in GB. Po opravljenem dvostranskem t-testu smo za protein NOS1 ugotovili, da ni povezan s prisotnostjo GBM, VCL pa je bil pri GB povečan za 2,5 krat, s p-vrednostjo 0,0046. Porazdelitvi posameznih meritev koncentracije proteina VCL smo izrisali tudi na grafu (Slika 31).



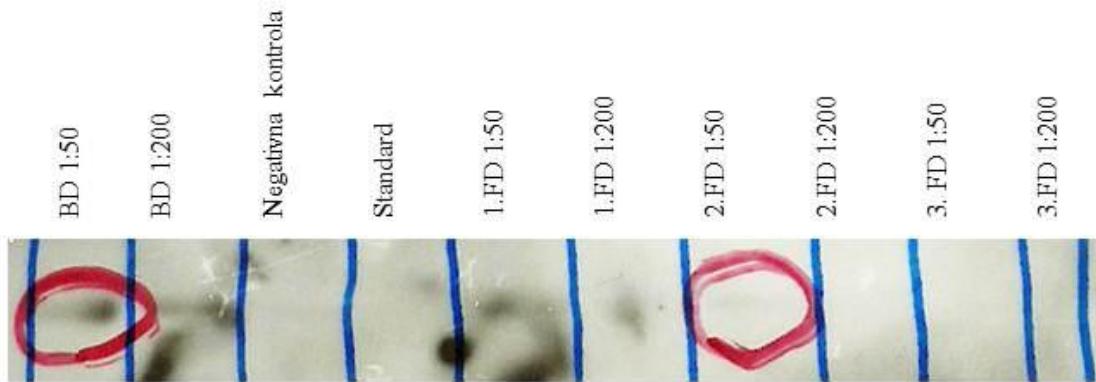
Slika 31: Porazdelitvi izmerjenih signalov proteina vinkulin (VCL) v plazmi z imunskim encimskim testom (ELISA) pri zdravih prostovoljcih in bolnikih z GBM; rdeče črtice predstavljajo mediane.

Figure 31: Distributions of measured signals of protein vinculin (VCL) in plasma with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in healthy volunteers and GBM patients; red bars represent median values.

4.5 DODATNA ANALIZA S PRENOSOM WESTERN

4.5.1 Določitev optimalne redčitve vzorcev in test odstranitve albumina

Za določitev optimalne redčine za analizo z WB smo testirali 1:50 in 1:200 redčitvi skupnega vzorca GB, iskali VEGF in identificirali lise pri obeh redčitvah. Prav tako smo analizirali vpliv, ki ga ima deplecija albumina na detekcijo VEGF. Po depleciji smo identificirali rahlo liso le v prvi frakciji redčitve 1:50, v vseh drugih frakcijah in redčinah pa ne (Slika 32). Zato smo se odločili, da nadaljnje analize opravimo z redčitvijo 1:50 in brez deplecije.



Slika 32: Rezultat prenosa western, kjer smo testirali redčine (1:50 in 1:200) združenega vzorca vseh GB in vpliv deplecije albumina na detekcijo VEGF; BD – brez deplecije, FD – frakcija deplecije.

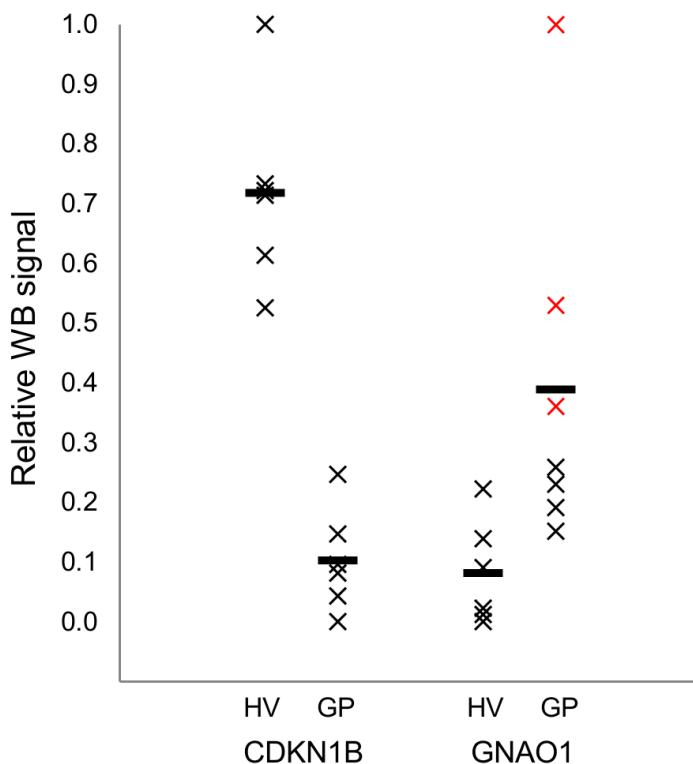
Figure 32: Western blot result, where two dilutions were tested (1:50 and 1:200) of pooled sample of all GB and the effect of depletion of albumin on detection of VEGF; BD – no depletion, FD – fraction of depletion.

4.5.2 Validacija mikromrež s protitelesi

Da bi preverili zanesljivost meritev mikromrež s protitelesi, smo želeli izmeriti ravni proteinov v krvi z neodvisno metodo prenosa western. Analizo smo izvedli za proteina od ciklina odvisni kinazni inhibitor 1B (CDKN1B) ter za gvanin nukleotid vezni protein alfa (GNAO1). Po kvantifikaciji lis in normalizaciji glede na IgM, smo rezultate meritev primerjali med GB in ZP ter GB z daljšim preživetjem po diagnozi proti GB s krajskim (v primeru proteina GNAO1, saj smo GNAO1 odkrili povezanega tudi s preživetjem). Rezultate smo tudi vizualizirali na grafu v obliki porazdelitev izmerjenih in normaliziranih signalov (Slika 33).

Z navadnim dvostranskim t-testom smo preverili razlike v izmerjenih plazemskih vrednostih CDKN1B in GNAO1. CDKN1B je kazal 5,9-krat znižane ravni v plazmi GB v primerjavi z ZP. GNAO1 je kazal 1,8-krat povečane ravni v GB v primerjavi z ZP s p-vrednostjo ($p = 0,033$).

GNAO1 je prav tako pokazal povečano prisotnost, 1,9-krat v plazmi GB_d (4 vzorci) v primerjavi z GB_k (3 vzorci) s p-vrednostjo 0,048. Kljub temu, da je bila ta povezava izračunana na majhnem številu vzorcev, so vsi rezultati, vključno s slednjim, konsistentni z izmerjenimi rezultati iz mikromrež s protitelesi. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da so rezultati, dobljeni iz mikromrež s protitelesi, dovolj natančni za presejalne teste pri iskanju potencialnih bioloških značevalcev.

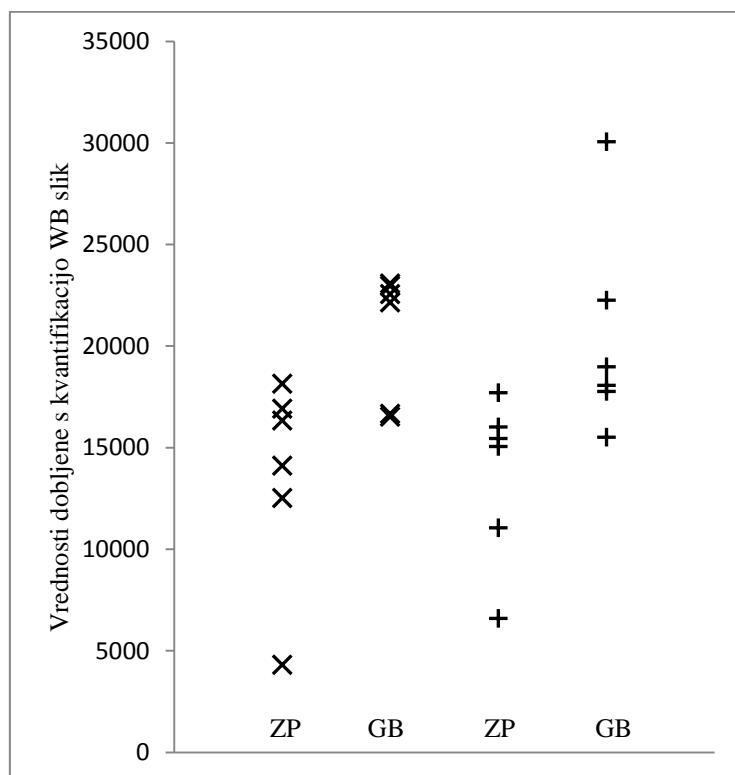


Slika 33: Porazdelitve izmerjenih signalov proteinov CDKN1B in GNAO1 v plazmi z prenosom western pri zdravih prostovoljcih in bolnikih z GBM. Rdeči križci predstavljajo meritve bolnikov z GBM s preživetjem po diagnozi, daljšim od enega leta.

Figure 33: Distributions of measured signals of proteins CDKN1B and GNAO1 in plasma with western blot in healthy volunteers and GBM patients. Red crosses represent measurements of GBM patients with survival longer than one year after diagnosis.

4.5.3 Validacija encimskega imunskega testa

Ker smo s testom ELISA dobili povezavo med ravnijo VCL v krvi ter prisotnostjo GBM tumorja, smo želeli rezultate tega testa potrditi z neodvisno metodo, za kar smo izbrali WB, ki smo ga izvedli na 14 združenih vzorcih GB (7 vzorcev) in ZP (7 vzorcev). Po kvantifikaciji lis in normalizaciji (normalizacija glede na celokupno koncentracijo proteina v plazmi izmerjeni z Bradfordovim testom, ter normalizacija glede na IgM), smo z dvostranskim t-testom izračunali p-vrednosti ločitve. Pri normalizaciji glede na celokupno koncentracijo je bil VCL povišan pri GB, s p-vrednostjo 0,0040, pri normalizaciji glede na IgM pa s p-vrednostjo 0,019. Porazdelitve meritev smo narisali na graf (Slika 34).

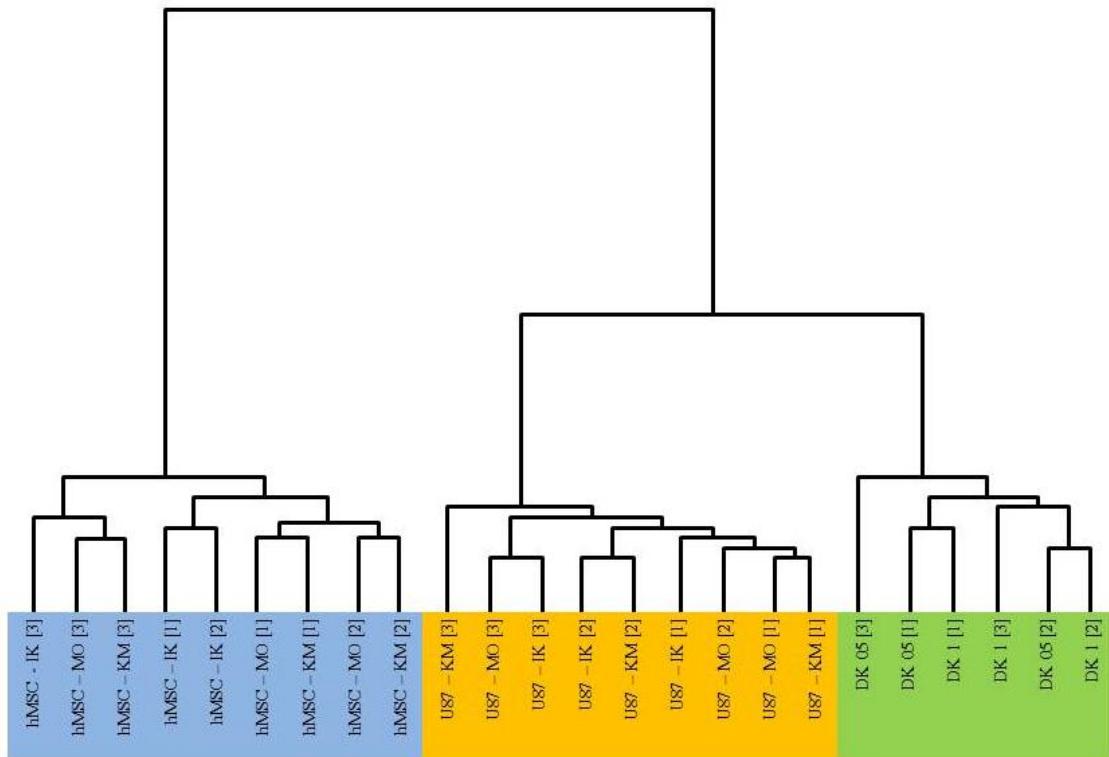


Slika 34: Porazdelitvi izmerjenih signalov proteina vinkulin (VCL) v plazmi s prenosom western pri zdravih prostovoljcih in bolnikih z GBM ob dveh različnih normalizacijah. X predstavljajo vrednosti, normalizirane glede na IgM, + predstavljajo vrednosti, normalizirane glede na reakcijo po Bradfordu.

Figure 34: Distribution of measured signals for vinculin protein (VCL) in plasma with western blot in healthy volunteers and GBM patients using two different normalizations. X represent values, normalized according to IgM values, + represent values, normalized according to Bradford reaction.

4.6 VPLIV MATIČNIH CELIC NA CELICE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Vzorce celičnih linij smo najprej hierarhično razvrstili glede na rezultate meritev izražanja genov z DNA-mikromrežami po normalizaciji (Slika 35). Opazili smo, da se enaki celični tipi (hMSC, U-87MG, direktna kokultura) razvrščajo skupaj, kar kaže na to, da imajo podobne profile izražanja genov.



Slika 35: Rezultat hierarhičnega razvrščanja vzorcev iz celičnih linij glede na celotne profile izražanja genov. Vzorci so se razvrstili v tri ločene skupine glede na celični tip (hMSC, U-87MG ter direktne kokulture - DK).

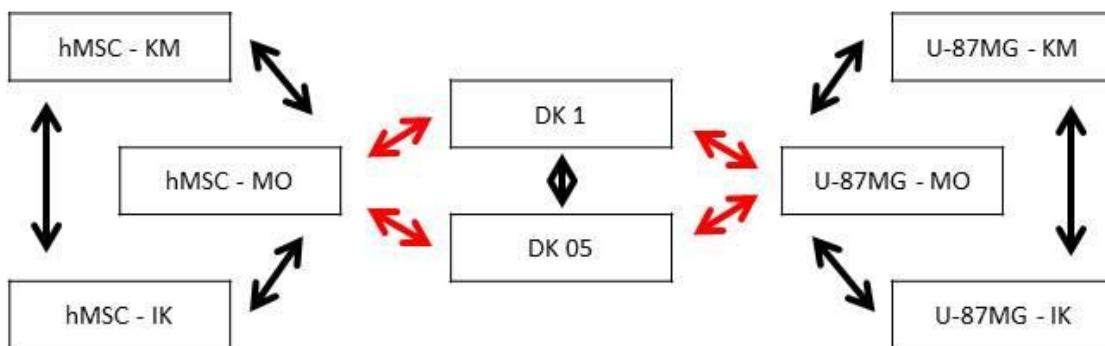
Figure 35: Results of hierarchical clustering of samples of different cell lines according to complete gene expression profile. Samples have clustered in three distinguish groups according to their cell type (hMSC, U-87MG and direct cocultures – DK).

Želeli smo preveriti, kako matične celice hMSC vplivajo na GBM celice U-87MG in obratno. Izvedli smo niz primerjav, kjer smo iskali gene, ki se bodisi aktivirajo, bodisi utišajo ob prisotnosti signalov drugega celičnega tipa. Izražanje genov celic direktne kokulture smo primerjali tako z hMSC, kot z U-87MG monokulturo, vendar ker je šlo po podatkih hierarhičnega razvrščanja (Slika 35) za raznovrstne profile izražanja zaradi prisotnosti dveh tipov celic, te primerjave niso bile informativne in so bile izključene iz prikaza v nadaljnjih rezultatih.

S statističnimi analizami smo tako izvedli devet primerjav (Slika 36), od katerih smo izločili štiri (označene rdeče), kot je opisano spodaj:

- hMSC, gojene v monokulturi proti hMSC, gojenimi v kondicioniranemu mediju.
- hMSC, gojene v monokulturi proti hMSC, gojenimi v indirektni kokulturi.
- **hMSC, gojene v monokulturi proti direktni kokulturi (gostota = 1).**
- **hMSC, gojene v monokulturi proti direktni kokulturi (gostota = 2).**

- hMSC, gojene v kondicionrianemu mediju, proti hMSC gojenimi v indirektni kokulturi.
- U-87MG, gojene v monokulturi proti U-87MG, gojenimi v kondicioniranemu mediju.
- U-87MG, gojene v monokulturi proti U-87MG, gojenimi v indirektni kokulturi.
- **U-87MG, gojene v monokulturi proti direktni kokulturi (gostota = 1).**
- **U-87MG, gojene v monokulturi proti direktni kokulturi (gostota = 2).**
- U-87MG, gojene v kondicionrianemu mediju, proti U-87MG, gojenimi v indirektni kokulturi.
- Direktna kokultura (gostota = 0,5) proti direktni kokulturi (gostota = 1).



Slika 36: Shematski prikaz opravljenih statističnih primerjav. Rdeče so označene primerjave, ki smo jih iz nadaljnjih analiz izločili; kondicionirani medij (KM), monokultura (MO), indirektna kokultura (IK), direktna kokultura (DK).

Figure 36: Schematic illustration of performed statistical comparisons. Comparisons, removed from further analyses are marked with red; conditioned medium (KM), monoculture (MO), indirect coculture (IK), direct coculture (DK).

Celice hMSC so izražale skoraj dvakrat več (519) značilno diferencialno izraženih genov (p -vrednost < 0,01) kot U-87MG celice v kokulturah, kar kaže na večji učinek rakavih celic na matične kot obratno. To je v skladu s spremembami izražanja genov, ki so bile prav tako večje v hMSC (največja sprememba izražanja genov je bila 4,8-krat). V obeh celičnih linijah smo odkrili več genov s povišanim izražanjem genov kot z znižanim, ko smo jih gojili v kokulturah.

Geni, ki so kazali največje spremembe izražanja pri U-87MG, so spadali v naslednje procese:

- razmnoževanje in rast (*PRNEPA-1, FAP, EREG*),
- adhezija in migracija (*EPHB2, PRSS35, SERPINB2*),
- senescenca in apoptoza (*KIAA1199, SOD2, IL24*).

Geni, ki so kazali največje spremembe izražanja pri hMSC, so spadali v naslednje procese:

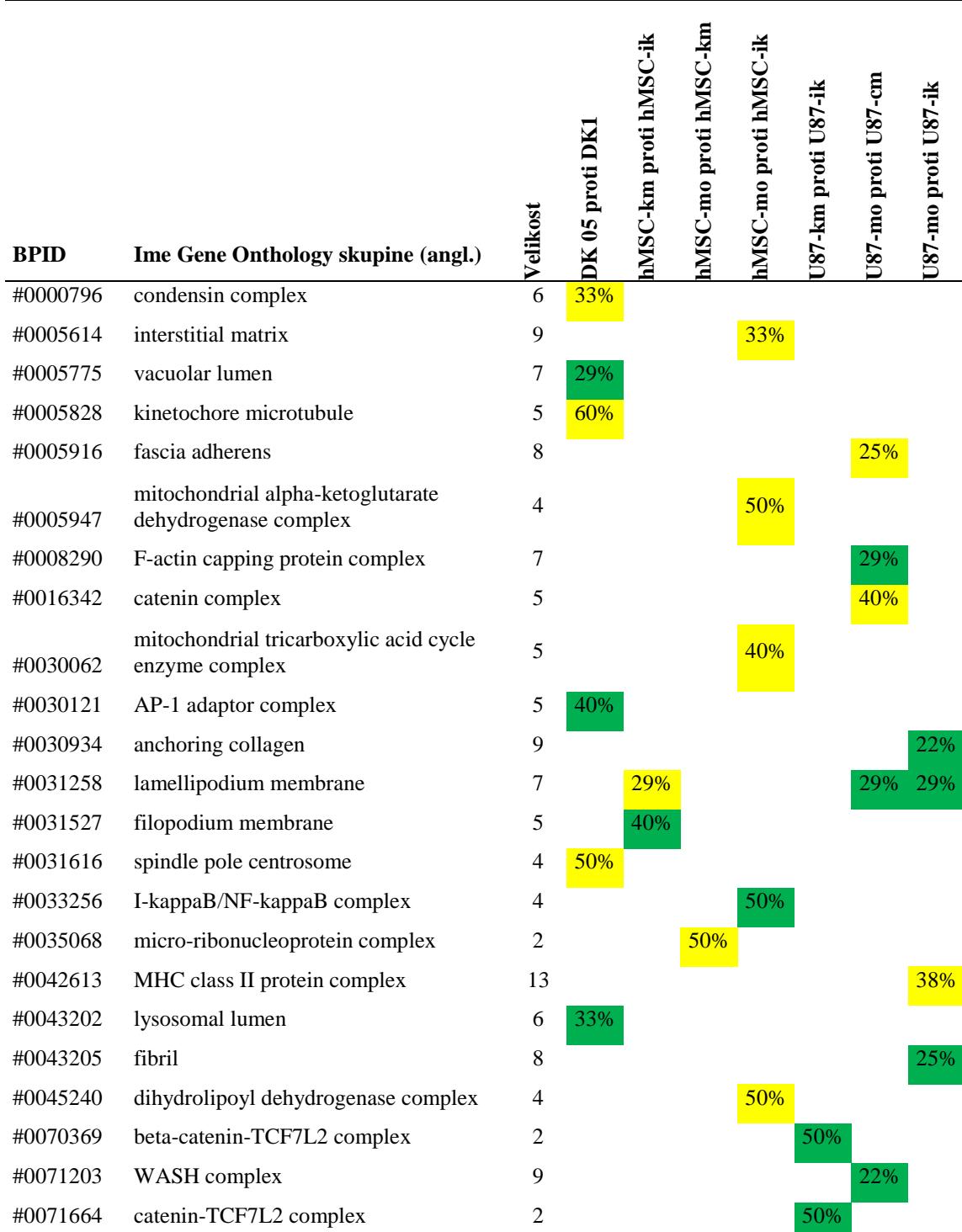
- imunomodulacija (*IL6, IL8, CCL, IL1B, CXCL6, LIF, CFB, TIPARP, TNFAIP3, CXCL2*),
- adhezija in migracija (*PLAT, ITGA2, MATN2, ACAN, GAP43*),
- angiogeneza (*APOLD1, LYPD1, ID3*),
- apoptoza in autofagija (*TGM2, IER3, ZC3H12A, DRAM, AKR1B10*).

4.6.1 Celične komponente

Primerjava izražanja genov direktne kokulture hMSC in U-87MG v različnih začetnih gostotah je pokazala večje razlike v šestih skupinah celičnih komponent, med katerimi so bile te skupine večinoma povezane s procesi delitve DNA in posledično celično delitvijo. hMSC celice v monokulturi (MO) so se najbolj razlikovale od hMSC v direktni kokulturi (DK), razlikovale pa so se tudi celice U-87MG, gojene v MO, v primerjavi tako s tistimi, gojenimi v DK kot v kondicioniranem mediu (KM), kar kaže na to, da lahko s parakrinim delovanjem celice vplivajo na medsebojno izražanje genov.

Preglednica 11: Skupine celičnih komponent, specifičnih za posamezne primerjave.

Table 11: Groups of cellular components, specific for individual comparisons.



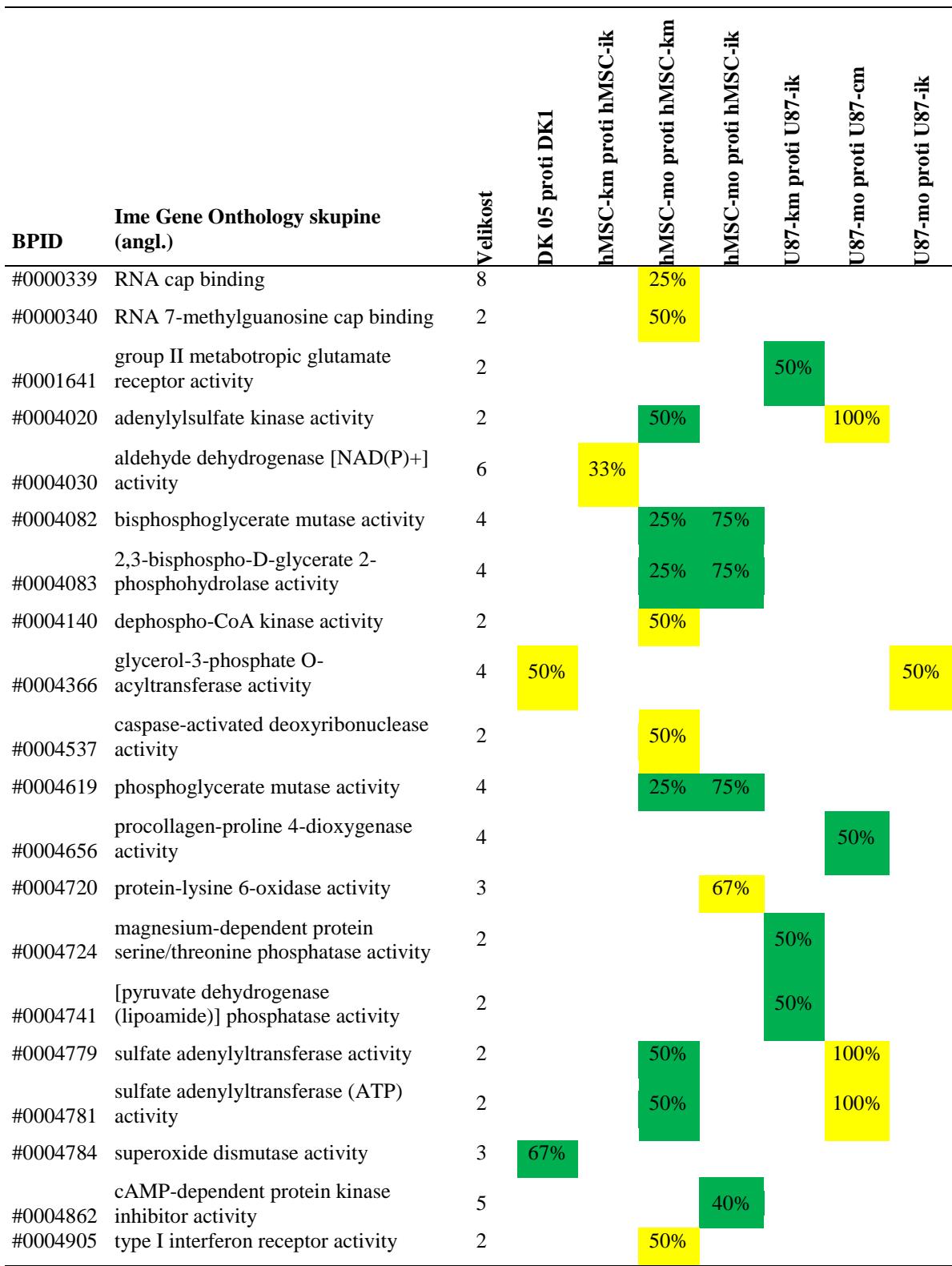
Izbrane so bile tiste skupine, ki so kazale 20 ali več odstotno sprememb genov v vsaj eni od primerjav. Upoštevali smo zgolj skupine, ki so vsebovale vsaj dva gena (velikost). Vrednosti, označene zeleno predstavljajo le povišano izražanje genov, z rumeno pa tam, kjer je bilo izražanje nekaterih genov zvišano in nekaterih znižano.

4.6.2 Molekulske funkcije

Pri pregledu molekulskih funkcij genov, ki so kazali spremenjeno izražanje po primerjovah, smo opazili, da je do največjih sprememb v izražanju genov prihajalo v hMCS, gojenimi v DK in KM, v primerjavi s hMSC, gojenimi v MO. Predvsem je šlo za utišanje genov v hMSC ob prisotnosti parakrinega delovanja celic U-87MG. V primerjanih U-87MG celicah v različnih razmerah smo vsakič dobili popolnoma ločen odziv, saj se je spremenilo izražanje predstavnikov različnih molekulskih funkcij.

Preglednica 12: Skupine molekulskih funkcij, specifičnih za posamezne primerjave.

Table 12: Groups of molecular functions, specific for individual comparisons.



Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 12: Skupine molekulskeih funkcij, specifičnih za posamezne primerjave.

BPID	Ime Gene Ontology skupine (angl.)	Velikost	DK 05 proti DK1	hMSC-km proti hMSC-ik	hMSC-mo proti hMSC-ik	U87-km proti U87-ik	U87-mo proti U87-cm	U87-mo proti U87-ik
#0004953	icosanoid receptor activity	10		30%	30%			
#0004954	prostanoid receptor activity	10		30%	30%			
#0004957	prostaglandin E receptor activity	5		40%	40%			
#0005149	interleukin-1 receptor binding	11		27%	27%			
#0005161	platelet-derived growth factor receptor binding	11			36%			
#0005375	copper ion transmembrane transporter activity	6					33%	
#0008268	receptor signaling protein tyrosine kinase signaling protein activity	4		50%	50%			
#0008476	protein-tyrosine sulfotransferase activity	2				50%		100%
#0008518	reduced folate carrier activity	4			25%			
#0008526	phosphatidylinositol transporter activity	5						40%
#0010698	acetyltransferase activator activity	2				100%		
#0016308	1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activity	7			29%			
#0016721	oxidoreductase activity, acting on superoxide radicals as acceptor	3	67%					
#0016868	intramolecular transferase activity, phosphotransferases	10			30%			
#0019798	procollagen-proline dioxygenase activity	7					29%	
#0019962	type I interferon binding	2		50%				
#0030675	Rac GTPase activator activity	8	25%					

Izbrane so bile tiste skupine, ki so kazale 25 ali več odstotno spremembo genov v vsaj eni od primerjav. Upoštevali smo zgolj skupine, ki so vsebovale vsaj dva gena (velikost). Vrednosti označene z zeleno predstavljajo le povišano izražanje genov, z rdečo le znižano, rumena pa predstavlja kombinacijo genov z znižanim in znižanim izražajem.

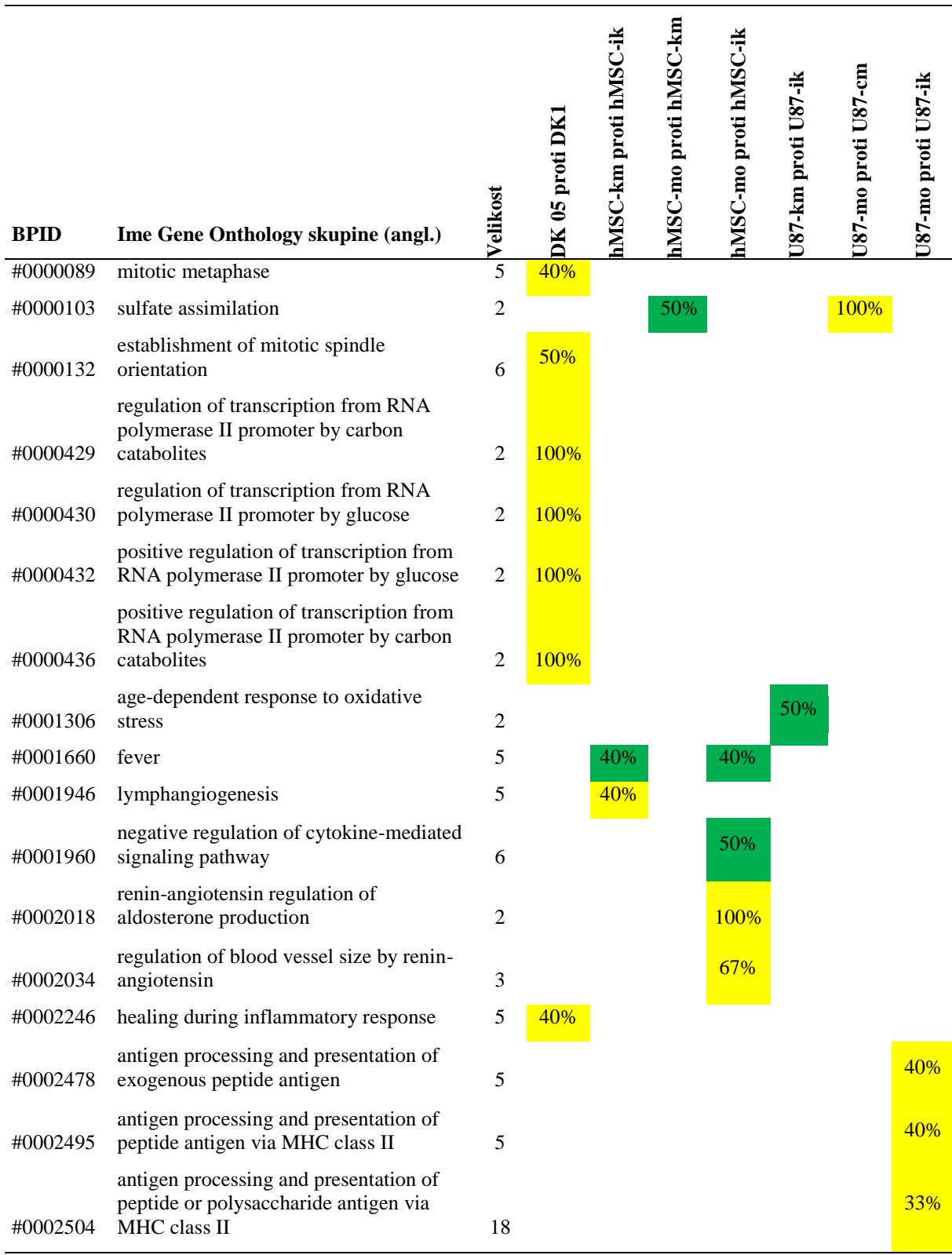
4.6.3 Biološki procesi

Najprej smo opazili, da je do velikih sprememb prihajalo med direktnima kokulturama hMSC in U-87MG, gojenima z različno začetno gostoto. Predvsem smo opazili spremembe v pomnoževanju DNA in razmnoževanju, ki jih v drugih primerjovah nismo opazili.

Največ skupin, katerih geni so kazali največje spremembe v izražanju, je bilo v primerjovah celic, gojenih v MO, ter celic, gojenih v IK, tako za hMSC kot U-87MG. V obeh primerih je šlo za utišanje izražanja genov, vezanih na imunski odziv.

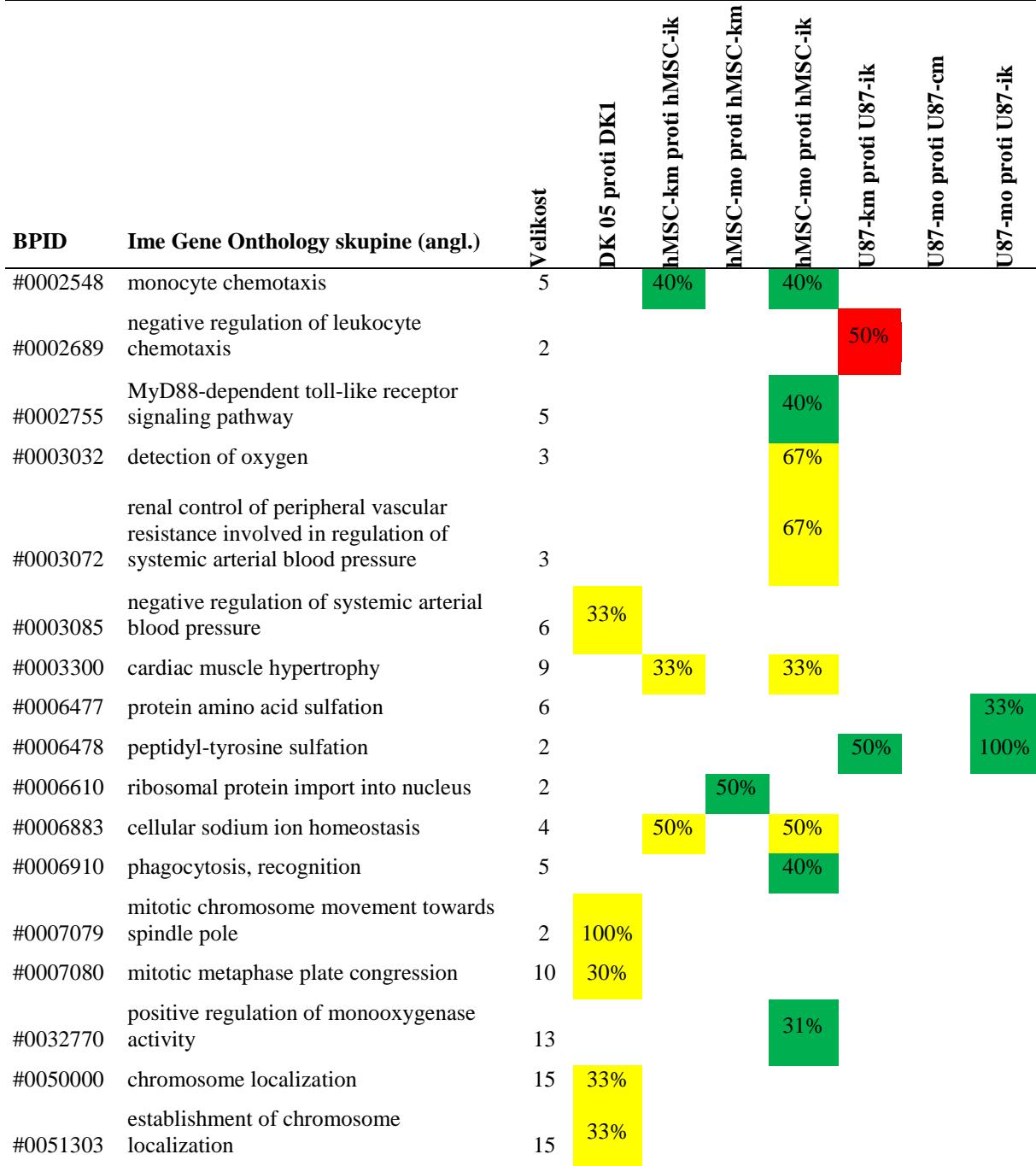
Preglednica 13: Skupine bioloških procesov, specifičnih za posamezne primerjave.

Table 13: Gropus of biological processes, specific for individual comparisons.



Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 13: Skupine bioloških procesov, specifičnih za posamezne primerjave.



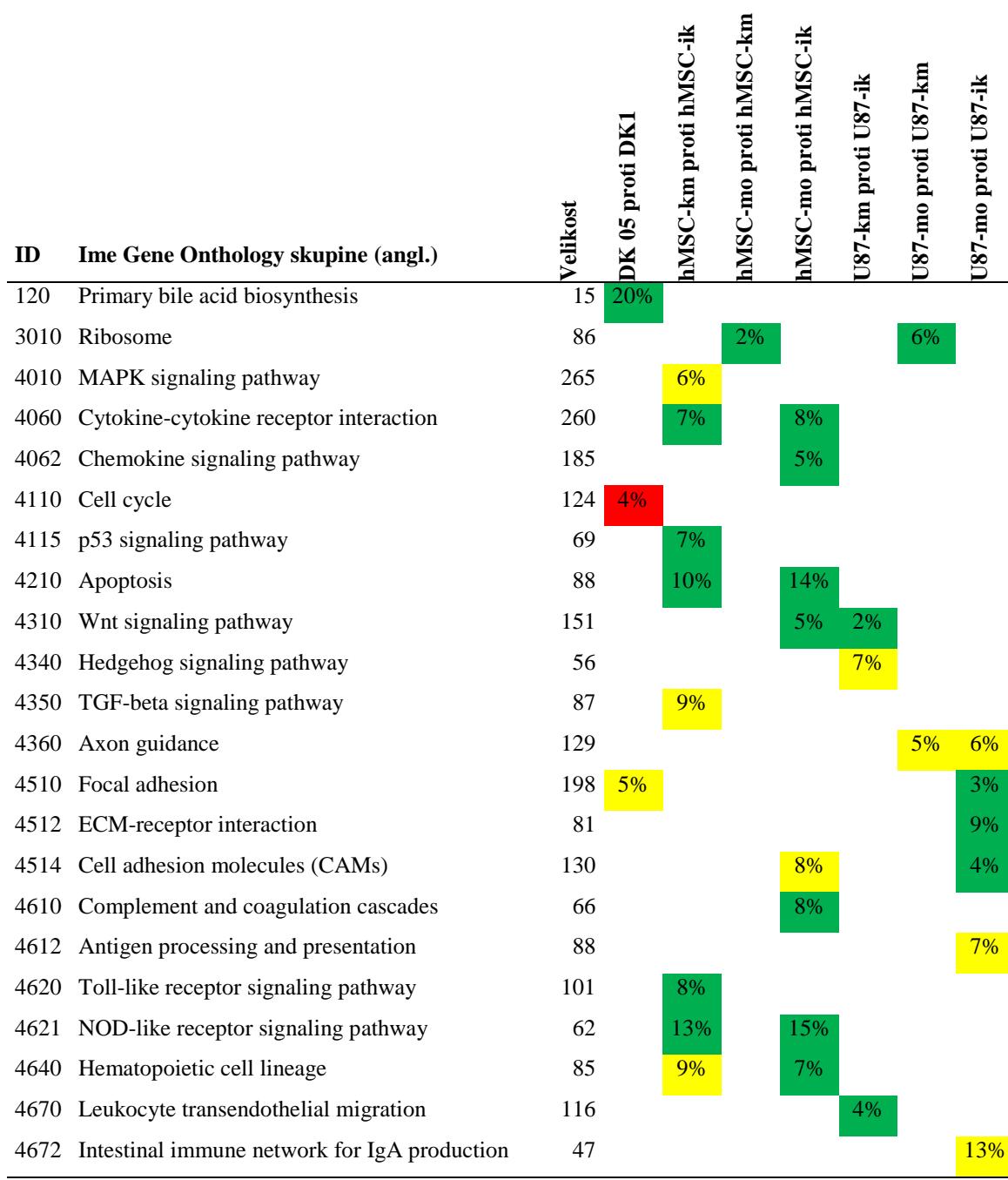
Izbrane so bile tiste skupnine, ki so kazale 30 ali več odstotno spremembo genov v vsaj eni od primerjav. Upoštevali smo zgolj skupnine, ki so vsebovale vsaj dva gena (velikost). Vrednosti označene z zeleno predstavljajo le povišano izražanje genov, z rdečo le znižano, rumena pa predstavlja kombinacijo genov z znižanim in znižanim izražajem.

4.6.4 KEGG metabolne poti

Tudi v primeru KEGG metabolnih poti smo največjo spremembo v izražanju genov dobili, ko smo primerjali tako celice hMSC in celice U-87MG, gojene v IK z drugima oblikama gojenja (KM in MO).

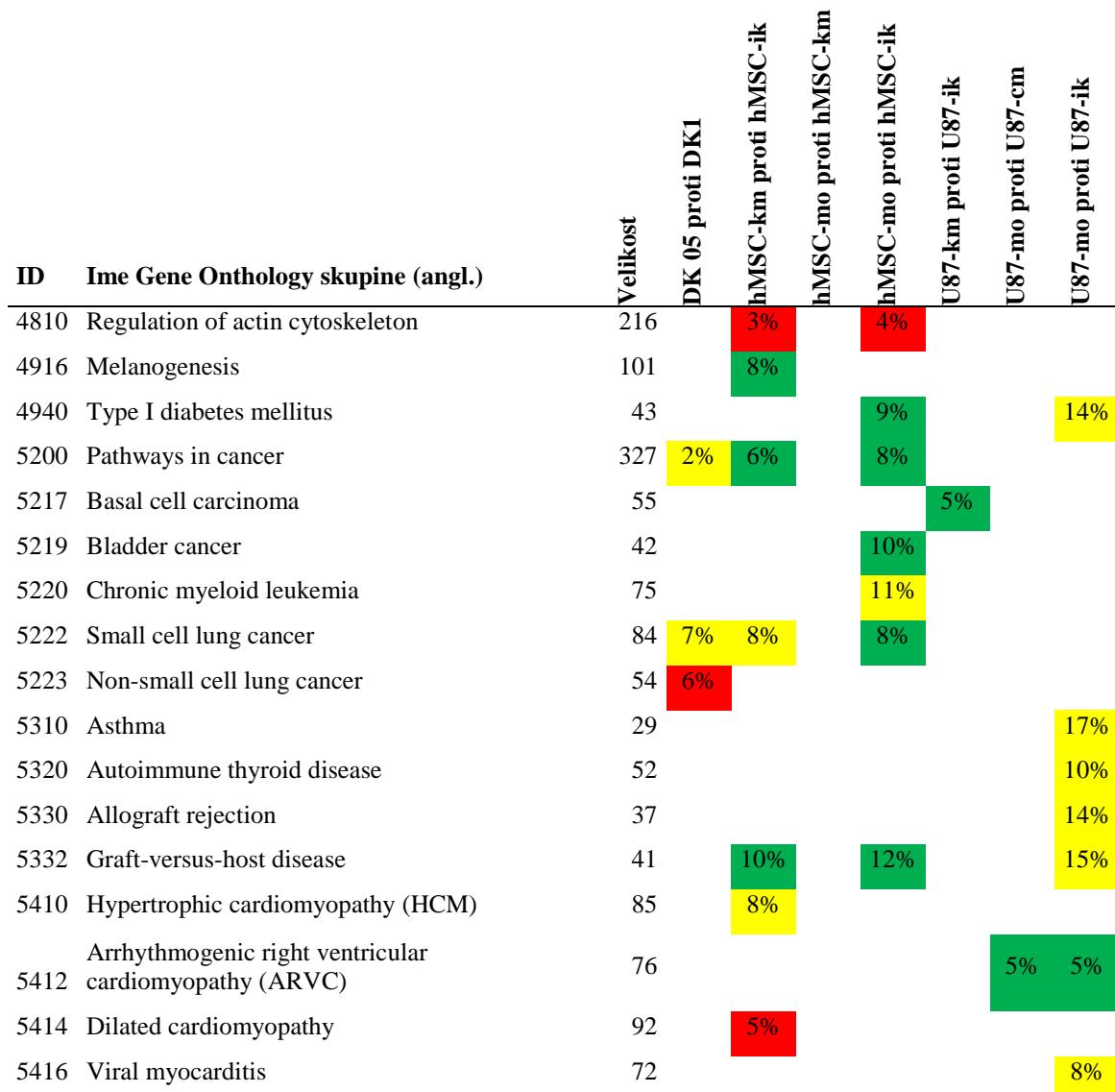
Preglednica 14: Skupine KEGG metabolnih poti, specifičnih za posamezne primerjave.

Table 14: KEGG groups of metabolic pathways, specific for individual comparisons.



Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 14: Skupine KEGG metabolnih poti, specifičnih za posamezne primerjave.



Izbrane so bile tiste skupine, ki so kazale značilno spremembo genov v vsaj eni od primerjav. Upoštevali smo zgolj skupine, ki so vsebovale vsaj dva gena (velikost). Vrednosti označene z zeleno predstavljajo le povišano izražanje genov, z rdečo pa znižano, rumena pa predstavlja kombinacijo genov z znižanim in znižanim izražajem.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 STABILNOST KRVNIH BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV

5.1.1 Pomen analize vzorcev zdravih prostovoljcev

Pri odkrivanju novih zdravil in terapij v kliničnih študijah preverjamo učinkovitost in uspešnost zdravljenja. Za kvalitetne rezultate teh študij pa je ključnega pomena dobro postavljena bazna linija, ki pa ni vedno pravilno zastavljena (Altman in Doré, 1990). V kliničnih študijah pogosto kot kontrolne vzorce uporabljajo zgodovinske podatke o ZP ali bolnikih z drugimi obolenji, ki ne predstavljajo zdrave populacije najbolje, uporaba ZP pa je redka (Cai in sod., 2011; Takahashi in sod., 2010). Za kvalitetne rezultate takih študij je ključnega pomena nabor ZP, ki niso le dobrega zdravja, temveč kar se da natančno predstavljajo populacijo, saj smo ugotovili, da lahko prihaja do sprememb v sestavi krvne plazme, ki so povezane s spolom (Slika 21), starostjo (Slika 20) in BMI (Slika 11, Slika 12 in Slika 22). Med take dejavnike verjetno sodijo še številni drugi (npr. stres, fizična aktivnost, prehrana, ...), ki pa jih v naših študijah nismo upoštevali.

Naredili smo študijo na ZP, ki je spremljala veliko število podatkov (Slika 8); slednji so bili večinoma v skladu z že obstoječo literaturo, kar pomeni, da so naši rezultati zanesljivi kljub razmeroma majhnemu številu vzorcev. V krvi smo določili stabilne biološke označevalce, take, ki so se le malo razlikovali med ZP (Preglednica 3 in Slika 18). Na ta način smo določili bazno linijo vrednosti stabilnih krvnih komponent, ki lahko pomaga pri odkrivanju učinkovitejših bioloških označevalcev ter posledično boljše diagnoze in prognoze številnih bolezni. Pridobljeni podatki so uporabni tudi za pomoč pri zasnovi in spremeljanju kliničnih študij, kjer se lahko poleg sledenja posameznim dejavnikom sledi tudi specifičnim profilom kompleksne kombinacije vseh podatkov, t.i. molekularnim »prstnim odtisom« (Xiao in sod., 2005).

Omembe vredno je, da 656 proteinov, proti katerim so bila protitelesa imobilizirana v točkah na mikromreži, ni bilo posebno povezanih s krvnimi raziskavami ali s tumorji na splošno, zaradi česar je bilo v povprečju več kot polovica točk na posamezni mikromreži označenih kot prazne točke (intenziteta signala točke je bila manjša kot dvakratnik standardnega odklona ozadja (Slika 23).

5.1.2 Stabilnost genov v krvi zdravih prostovoljcev

Ugotovili smo tudi, da so bile razlike v izražanju genov krvnih celic med posameznimi ZP bistveno večje kot razlike med vzorci iz različnih dni od istega posameznika, kar je bilo pričakovano. Sklepamo lahko, da je zaradi homeostatskih procesov krvna sestava posameznika stabilna, vendar bistveno različna med različnimi ljudmi, kar v novi luči kaže na pomembnost razvoja strategij personalizirane medicine. Kljub temu pa smo okviru širšega raziskovalnega dela naše skupine ugotovili, da nekateri metaboliti, kot so spolni hormoni, kateholamini, glukokortikoidi in nekateri lipidi, bistveno variirajo v krvi istega ZP v različnih dneh (Gruden in sod., 2012). Ta fenomen lahko pripisemo bodisi specifični

dieti posameznikov v času vzorčenja, bodisi specifičnemu hormonskemu anabolizmu oz. katabolizmu posameznika, ki ni le cirkadialni temveč tudi mesečni. Na slednja lahko vplivajo tudi fiziološki in psihološki stresorji, med katere lahko spada tudi sam postopek vzorčenja. Pričakovano smo odkrili, da so bili različni ksenobiotiki, vezani na specifično dieto posameznika (npr. kofein), izrazito variabilni med posamezniki (Gruden in sod., 2012).

Z našimi rezultati smo potrdili meritve izražanja genov z DNA-mikromrežami v celicah CD4⁺ in NK. Kljub temu da smo imeli za izbor statistično značilnih genov stroge kriterije, lahko pri eksperimentih z veliko hkrati merjenimi geni prihaja do lažno pozitivnih rezultatov (Nuzzo, 2014). Iz tega razloga je potrebno meritve takih eksperimentov ponoviti z bolj tarčno in občutljivo metodo, v našem primeru RT-qPCR, katere rezultati analiziranih genov so se skladali z rezultati iz DNA-mikromrež, tako po variabilnosti (Slika 9 in Slika 10) kot po povezanosti z BMI (Slika 11 in Slika 12).

5.1.3 Stabilnost proteinov v krvi zdravih prostovoljcev

Naši rezultati so pokazali, da so ravni proteinov bolj variabilne med ZP kot izražanje genov krvnih celic ali krvnih metabolitov (Slika 18). Kljub temu pa smo zaznali le malo proteinov z izredno visokimi variabilnostmi koncentracije (Slika 19). Velika večina proteinov je imela izračunane CV med 25 % in 75 %. Iz tega lahko sklepamo, da je večja variabilnost proteinov pomembna za uravnavanje natančnih procesov v telesu, obenem pa je natančno uravnavana z mehanizmi homeostaze, da ne bi prihajalo do večjih sprememb v uravnavanju telesa.

5.2 VPLIV RAZLIČNIH DEJAVNIKOV NA KRVNO SLIKO ZDRAVIH LJUDI

5.2.1 Vpliv telesne mase na biološke označevalce

Znano je, da posamezniki s prekomerno telesno maso doživljajo kronično in sistemsko aktivacijo imunskega sistema (Brandacher in sod., 2007). Aktivacija je nizko-nivojska in jo gre pripisati interakcijam med adipoznim tkivom ter imuno-kompetentnih celicami. Do nasprotnih problemov prihaja pri posameznikih s prenizko telesno maso, za katere so ugotovili, da imajo povečano pojavnost in resnost nekaterih nalezljivih bolezni, med drugim pa kažejo slabšo odzivnost protiteles na antigene v primerjavi s posamezniki z normalno telesno maso (Marcos in sod., 2003; Martí in sod., 2001).

Po podatkih WHO je bilo leta 2008 kar 1,5 milijarde odraslih (starost > 20 let) posameznikov s prekomerno telesno maso ($BMI > 25$), od česar jih je bilo 500 milijonov predebelih ($BMI > 30$). Od tega je bilo 200 milijonov moških in 300 milijonov žensk. Zaradi tega je ključnega pomena, da ljudi s prekomerno telesno maso sistematično upoštevamo v kliničnih študijah, saj predstavljajo velik delež zdrave populacije. Poleg tega raziskave, ki se ukvarjajo s preiskovanjem vpliva prekomerne telesne mase, pogosto analizirajo morbidno predebele posameznike ($BMI > 50$), ki ravno tako niso reprezentativni za povprečno populacijo, poleg tega pa je vprašljivo, če jih lahko

obravnavamo kot zdrave. Zato smo v naši študiji analizirali vzorce štirih ZP s prekomerno telesno maso (BMI med 27 in 30), z namenom zajetja čim bolj povprečne zdrave populacije.

Za nekatere citokine, kot sta interlevkin 6 (IL-6) in faktor tumorske nekroze alfa (TNF- α), je že bilo dokazano, da so njihove ravni v plazmi povečane pri pozameznikih z višjimi vrednostmi BMI (Manci in sod., 2007). Mi sicer nismo merili vrednosti izražanja posameznih citokinov, smo pa opazili znižano izražanje gena za receptor interlevkina 7 (IL7R) v NK celicah. *IL7R* je bil predhodno povezan s preživetjem NK celic in njihovim dozorevanjem (Michaud in sod., 2010), genetske napake v genu *IL7R* pa so povzročale večjo dovzetnost za avtoimunska obolenja, še posebno za multiplo sklerozo (Xuebin Liu in sod., 2010). Povezavo izražanja *IL7R* z BMI smo v okviru te disertacije tudi potrdili z alternativno metodo RT-qPCR (Slika 11). IL7R je bil do sedaj le bežno povezani z BMI (Y. Chen in sod., 2011), kljub temu da so številni vnetni procesi povezani s prekomerno telesno maso. Razumevanje procesov, v katerih sodeluje *IL7R*, lahko razkrije nova razumevanja molekularnih in celičnih procesov, ki sodelujejo pri ljudeh s prekomerno telesno maso.

V celicah CD4+ je bil pri ZP s prekomerno telesno maso najbolj znižan gen *HLA-DOB*. To je presentljivo, saj je le malo obstoječe literature, ki sploh govori o izražanju *HLA-DO* v T celicah; *HLA-DO* naj bi imel le šibko izražanje mRNA transkriptov (Douek in Altmann, 1997). Molekule *HLA-DO* naj bi se v celicah izražale v pre-lizosomskih ter lizosomskih predelih, ki vsebujejo *HLA-DR*, predvsem v B limfocitih in dendritičnih celicah (Douek in Altmann, 1997).

Med drugim smo odkrili, da so imeli ZP s prekomerno telesno maso povišano izražanje genov za defenzin, kar je potrdilo hipotezo, da posamezniki s prekomerno telesno maso doživljajo kronično nizko-nivojsko aktivacijo imunskega sistema (Brandacher in sod., 2007).

Odkrili smo le štiri z BMI povezane proteine (Slika 22), kar je precej manj, kot bi pričakovali iz rezultatov mikromrež. Med njimi so bili tudi trije, ki smo jih odkrili povezane s spolom (Slika 21), saj so med vzorci ljudi s prekomerno telesno maso ($n = 5$; $BMI > 25$) kar štirje pripadali moškim. Iz tega gre sklepati, da ima BMI le manjši vpliv na proteinsko sestavo plazme pri ljudeh; spol ima bistveno večji pomen.

Ob teh rezultatih je pomembno poudariti, da obstaja visoka verjetnost za lažno pozitivne rezultate, saj smo imeli nizko število vzorcev od ZP z BMI večjim od 25 (zgolj 4 vzorci). Kljub temu, da lahko v literaturi najdemo rezultate, ki prav tako povezujejo najdene gene in proteine z debelostjo, ostajamo previdni pri interpretaciji; za natančnejši vpliv in vlogo, ki jo imajo najdeni geni in proteini v osebah s povišanim BMI bi potrebovali študijo na bistveno večjem vzorcu.

5.2.2 Vpliv spola in starosti na biološke označevalce

Pri štetju celic NK, CD4⁺ in CD8⁺ ter njihovih aktiviranih različic po izolaciji iz krvi ZP je prihajalo do razlik, povezanih s spolom in starostjo. Pri ženskah smo odkrili večje število aktiviranih tako NK kot tudi CD4⁺ celic, obe obliki celic CD8⁺ pa sta bili manj številčni pri starejših ZP, kar je v skladu z obstoječo literaturo (DelaRosa in sod., 2006). Zanimivo pa je, da praktično ni prihajalo do razlik v izražanju genov v celicah NK in CD4⁺, ki bi bile povezane s spolom ali starostjo.

Našli smo dva gena, inzulinu podoben rastni hormon 3 (*IGFBP3*) in urotenzin 2 (*UTS2*), ki sta bila bolj izražena pri starejših ZP. Spremembe v izražanju obeh genov so odkrili pri obolelih z diabetesom (Jiang in sod., 2008; Nedić in sod., 2012) kar kaže na to, da so morda nekateri starejši ZP bolj nagnjeni k diabetusu tipa 2. To je ključnega pomena za veljavnost rezultatov naše študije in ostalih kliničnih študij, ki temeljijo na analizah izražanja genov.

Poleg tega, da je imela starost ZP velik vpliv na spremembe proteinske sestave plazme (Slika 23), smo odkrili le 12 proteinov, katerih koncentracije so bile značilno različne v plazmi mlajših ZP v primerjavi s starejšimi. Do bistveno večjih razlik v krvi pa je prihajalo, kadar smo ZP primerjali med sabo po spolih (Slika 21). Odkrili smo 13 proteinov, ki so se jasno ločili v dve skupini glede na koncentracijo v plazmi po spolu. Ko smo hierarhično razvrstili vzorce glede na izražanje teh proteinov, smo dobili zelo dobro ločbo v dve jasni skupini, v katerih sta bila le dva vzorca nepravilno razvrščena (Slika 21), kar kaže na specifičnost proteinske prisotnosti glede na spol.

5.3 PROTEOMIKA BOLNIKOV Z GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Glioblastoma multiforme (GBM) spada med najbolj agresivna tumorska obolenja pri človeku. S svojim delovanjem namreč nadzoruje in zavira imunski sistem, obenem pa povzroča nekrozo v obdajajočem tkivu v možganih. Tumorske celice nato preoblikujejo lokalno tkivo s specifičnim matriksom. Ta proces med drugim preprečuje normalno delovanje krvno-možganske pregrade (Somasundaram in sod., 2009), ki ima posledično večjo prepustnost in s tem omogoča večji prehod krvnih metabolitov in proteinov v tumorsko maso. Istočasno se zaradi povečane prepustnosti krvno-možganske pregrade v kri iz tumorskega tkiva izločajo metaboliti in蛋白, ki izvirajo iz tumorja in ostalih kancerogenih procesov (Schneider in sod., 2004). Poleg tega se lahko v kri izločajo tudi dejavniki, ki izvirajo iz lokalnega zdravega možganskega tkiva v neposredni bližini tumorja in so posledica telesnega odgovora na prisotnost tumorja. Iz tega razloga lahko med ZP ter GB prihaja do razlik v proteinski sestavi in v koncentracijah določenih proteinov v krvni plazmi (Kalinina in sod., 2011).

5.3.1 Prednosti in slabosti tehnologije mikromrež s protitelesi za iskanje potencialnih bioloških označevalcev v plazmi

S tehnologijo mikromrež s protitelesi smo preverili prisotnost in koncentracije 656 različnih proteinov v krvni plazmi 17 ZP ter 17 GB. Tehnologija mikromrež s protitelesi se hitro razvija in omogoča vpogled v čedalje večje število proteinov hkrati. Večje kot je število hkratno analiziranih proteinov, bolj celosten pogled dobimo v proteom krvne plazme. Mikromreže s protitelesi se v posebni različici uporabljajo tudi rutinsko v kliničnih laboratorijih, saj so priročnejše in preprostejše za uporabo in analizo od ostalih proteomskeh tehnik. V taki izvedbi analiziramo manj proteinov hkrati, uporabljamo pa dobro karakterizirana in specifična protitelesa.

S pomočjo tehnologije mikromrež odkriti potencialni biološki označevalci v naši raziskavi imajo lahko po ustrezeni klinični validaciji tri pomembne klinične aplikacije:

- pomagajo lahko pri hitrejšem odkrivanju in diagnozi GBM,
- lahko dajo vpogled o tipu tumorja, predvsem glede na njegovo anatomsko lokacijo in s tem pomagajo pri histološkem in kliničnem vrednotenju ter kategorizaciji tumorja,
- pomagajo lahko pri predvidevanju o prognozi (preživetju) GB.

Če je prav število proteinov, ki jih lahko hkrati pregledamo v vzorcu, glavni adut tehnologije mikromrež s protitelesi, sta glavni pomanjkljivosti nizka občutljivost in dinamični razpon v primerjavi z drugimi metodami za analizo proteinov. Zato so mikromreže s protitelesi primerne za presejalne teste pri iskanju potencialnih bioloških označevalcev na manjšem številu vzorcev. Preden lahko rezultate, dobljene na ta način, uporabimo v kakršni koli klinični aplikaciji, pa je potrebno narediti validacijsko klinično študijo na veliko večjem številu vzorcev (od nekaj 100 do nekaj 1000) z metodo, ki jo bomo kasneje tudi rutinsko uporabljali v diagnostične namene in ki ni nujno enaka, kot metoda, uporabljenha v presejalnih testih.

Večina metod, ki omogoča netarčne analize proteoma, je neprimerna za analizo plazme. Plazma je namreč zelo kompleksen proteinski vzorec, v katerem so proteini prisotni v zelo različnih velikostnih razredih. Deset vodotopnih proteinov, ki predstavljajo glavno proteinsko komponento v krvni plazmi, prispeva 90 % celokupne proteinske koncentracije (Liumbruno in sod., 2010), koncentracije določenih drugih proteinov pa so lahko manjše tudi za 9 velikostnih razredov. Zaradi tovrstne koncentracijske raznolikosti plazme je pogosto težje zaznati proteine nižjih koncentracij, saj jih zaradi obilice drugih proteinov težko razlikujemo od šuma. V ta namen so bile razvite številne tehnike za deplecijo plazme (Echan in sod., 2005; Tu in sod., 2010), ki temeljijo na principu odstranjevanja specifičnih proteinov iz plazme za izboljšanje detekcije. Te tehnike sicer povečajo občutljivost nadaljnjih metod detekcije, vendar z njimi nikoli ne odstranimo celotnih količin motečih proteinov (Tu in sod., 2010), obenem pa lahko deplecija nespecifično spremeni razmerja ostalih proteinov, kar smo odkrili tudi v naši raziskavi (Slika 32). Še posebej to predstavlja problem pri tehnologiji masne spektrometrije, ki se sicer uporablja tudi za analizo vzorcev plazme brez deplecije, vendar le za zelo tarčno iskanje proteinov in ne za presejalne študije (Keshishian in sod., 2009). Zato se na trgu pojavlja tudi čedalje več proizvajalcev različnih

kolon za deplecijo plazme (Polaskova in sod., 2010). Pri nadalnjih analizah smo se zato odločili za uporabo krvne plazme brez predhodne deplecije, kar naše izbrane tehnologije ni motilo.

5.4 PREGLED PROTEINOV, SPECIFIČNIH ZA BOLNIKE Z GLIOBLASTOMA MULTIFORME

5.4.1 Prisotnost proteinov v krvni plazmi

5.4.1.1 Izvor potencialnih bioloških označevalcev v krvi

Proteine, ki smo jih mi našli tako ali drugače povezane z GBM, delimo glede na izvor na tiste, ki so se v krvno plazmo izločili iz tumorskega tkiva oz. iz neposredne tumorske okolice, in na tiste, ki so v plazmi prisotni kot posledica odziva organizma na GBM. V prvem primeru so se proteini v kri izločali bodisi iz malignih celic GBM bodisi iz okolišnjega stromalnega tkiva, ki je bilo v neposredni interakciji s tumorjem. Tumorski proteini izvirajo tudi iz parakrinega delovanja GBM celic, ki je glavni način medcelične komunikacije v tumorju (Rak in sod., 1996). Na tak način povečujejo razmnoževanje, angiogenezo ter invazivnost bližnjih GBM celic. Na srednje-dolge ter dolge razdalje celice komunicirajo predvsem z gradienti vodotopnih proteinskih ligandov, ki jih druge celice prepoznajo z ustreznimi membranskimi receptorji (Motaln in sod., 2012; Rak in sod., 1996).

Celice GBM lahko med sabo komunicirajo tudi s pomočjo eksosomov. Eksosomi so mikrovezikli, ki jih celice izločajo in vsebujejo kopico proteinov in molekul RNA. Primer takega komuniciranja so vezikli, ki vsebujejo receptorje tirozinskih kinaz (EGFR in EGFRvIII), poleg njih pa še različne vodotopne citokine (Graner in sod., 2009). Z vezikli se lahko med celicami GBM horizontalno prenašajo tudi onkogeni (Al-Nedawi in sod., 2009). S pomočjo izločanja takih eksosomov si tumor ustvarja okolje, ki mu omogoča lažjo rast. GBM celice lahko eksosome izločajo tudi v krvno plazmo, njihova posamezna detekcija pa je zahteven proces (Shao in sod., 2012). Kljub temu pa lahko določeni proteini eksosome zapustijo (npr. ko membrana eksosoma poči) in tako postanejo del proteoma krvne plazme.

Telo se na prisotnost tumorja ne odzove burno z imunskim sistemom, saj je GBM dober imunomodulator; še največ k imunskemu odzivu prispevajo T regulatorne celice, ki predstavljajo tudi potencial za nove terapevtske pristope (Ooi in sod., 2014). Vendar pa so ravno imunomodulatorne lastnosti tega tumorja tiste, ki mu omogočajo veliko invazivnost. GBM namreč izkorišča telesu lastne mehanizme za utišanje imunskih odzivov (Friese in sod., 2004) in na površini svojih celic izraža specifične proteine. Če bi lahko na GBM celice vplivali tako, da bi izražale bolj imunogene proteine, bi to predstavljal potencialno možnost za terapijo GBM.

5.4.1.2 Matriks metaloproteinaze kot potencialni biološki označevalci

Izvor proteinov v krvi je lahko posledica tudi različnih katabolnih procesov, saj gre pri GBM za izredno agresiven tumor; tumorske celice neprestano migirajo v obdajajoče zdravo tkivo, za sabo pa puščajo večje predele nekroze možganov in razgrajenega tkiva. Nekroza okoliškega tkiva omogoča tumorskim celicam večjo invazivnost in migracijo, kar ima za posledico pogosto pojavljanje sekundarnih tumorjev na drugih delih možganov po operativni odstranitvi primarnega GBM. Za take razgradne procese so značilni encimi matriks metaloproteinaze, ki so jih pogosto smatrali kot biološke označevalce za možganske tumorje (Lukaszewicz-Zajac in sod., 2013). Tudi mi smo odkrili matriks metaloproteinaze, specifične za GB (Preglednica 9):

- matriks metaloproteinaza 11 (MMP11): plazemski nivoji znižani v GB v primerjavi z ZP,
- matriks metaloproteinaza 15 (MMP15): plazemski nivoji povišani v GB s tumorjem v frontalnem režnju,
- matriks metaloproteinaza 16 (MMP16): plazemski nivoji povišani v GB s tumorjem v okcipitalno-parietalnem režnju,
- matriks metaloproteinaza 23 (MMP23): plazemski nivoji povišani v GB s tumorjem v okcipitalno-parietalnem režnju.

Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da različne metaloproteinaze sodelujejo pri razgradnji različnih delov možganskega tkiva. Na ta način smo potrdili spremeljanje matriks metaloproteinaz kot potencialnih bioloških označevalcev ne le za diagnostiko bolezni, temveč tudi za spremeljanje in določanje podtipov GBM.

5.4.1.3 Identifikacija proteinov v krvni plazmi, povezanih z glioblastoma multiforme

Ko smo primerjali ravni proteinov v krvi vseh GB proti vsem ZP, smo odkrili 42 proteinov, povezanih z GBM. Za vsak protein izmed teh 42 smo pregledali, če je normalno prisoten v:

- krvni plazmi,
- krvnih celicah,
- možganskem tkivu.

Od vseh 42 proteinov le DNA primaza (PRIM1) ter E2F transkripcijski faktor 3 (E2F3) nista normalno prisotna v nobenem od zgoraj naštetih tkiv in njuna prisotnost v krvi nejasna. Njuno predhodno odkrito izražanje v GBM celičnih linijah (Saigusa in sod., 2005) kaže na to, da verjetno GBM celice neposredno vplivajo na njune koncentracije v krvni plazmi.

Poleg tega je vredno omembe, da je imela večina od identificiranih proteinov (37 od 42) znižane koncentracije v krvni plazmi GB, samo 5 proteinov pa je imelo izražanje zvišano v primerjavi z vsemi ZP. Iz tega gre sklepati da do glavnih razlik v koncentraciji plazemskih

proteinov med GB in ZP pride zaradi posrednega vpliva, ki ga ima GBM na telo, le manjši prispevek (v našem primeru 5 proteinov) pa je posledica neposrednega vpliva GBM celic, ki lahko take proteine izločajo tudi v kri (Skog in sod., 2008).

5.4.1.4 Metabolne poti, v katere so vpleteni proteini, povezani z glioblastoma multiforme

Z uporabo orodja DAVID smo umestili v metabolne oz. regulatorne procese vseh 42 proteinov, ki so imeli spremenjene koncentracije pri GB v primerjavi z ZP, ter odkrili tri splošne metabolne poti, v katere so bili proteini udeleženi:

- T-celične signalne poti ter imunski odziv,
- celična adhezija in migracija,
- nadzor celičnega cikla in apoptoza.

Enake metabolne poti so odkrili tudi v drugi študiji na krvni plazmi (Gautam in sod., 2012), v študiji tkivne ekspresije GBM pa le celično adhezijo in migracijo ter nadzor celičnega cikla in apoptozo (Fang in sod., 2012). To kaže na vpletjenost teh dveh poti v procese znotraj tumorja oz. iz neposredne okolice tumorja, obenem pa lahko sklepamo, da so proteini, udeleženi v T-celični signalni poti ter imunskega odziva posledica interakcij med GBM in imunskim odzivom bolnika.

5.4.2 Identifikacija potencialnih robustnih označevalcev

GBM pogosteje prizadene starejšo populacijo, incidenca pa se viša s starostjo s povprečjem pri 64 letih (Louis in sod., 2007). Glede na podatke Ameriške zveze nevrokirurgov večina GB umre prej kot v 15 mesecih po diagnozi. Kljub temu, da smo pri študiji ZP ugotovili, da starost ni bistveno vplivala na izražanje genov krvnih celic ali prisotnost metabolitov v krvi, smo tokrat ugotovili, da ima starost pomemben vpliv na nivoje plazemskih proteinov. Ker je povprečna starost GB višja od povprečne starosti celotne populacije, ki jo ZP predstavljajo, smo želeli ugotoviti, kateri so tisti proteini, katerih nivoji v krvi so posledica zgolj prisotnosti GBM in ne posledica procesov staranja. Zato smo preverili, kateri izmed odkritih proteinov imajo nivoje v plazmi značilno spremenjene v GB tudi po primerjavi z ZP, starejšimi od 40 let.

Izmed 42 proteinov, katerih plazemske koncentracije so bile spremenjene v GB v primerjavi z ZP, je po primerjavi GB proti samo starejšim ZP ostalo statistično značilnih le še 11 proteinov. Kot kaže je večina najdenih proteinov povezanih poleg GBM tudi z določenimi starostnimi procesi v posameznikih. Tak primer so antigeni *H. pylori*, ki so imeli v prvi primerjavi najbolj znižano koncentracijo pri GB, v primerjavi GB proti starejšim ZP pa niso bili značilno različni. Na to kaže tudi predhodna študija (Sörberg in sod., 2003), kjer so analizirali kri zdravih darovalcev. Ugotovili so, da so bile ravni antigenov *H. pylori* za 73 % zmanjšane v krvni plazmi darovalcev, starejših od 50 let. Ko smo primerjali koncentracije proteinov krvne plazme mlajših ZP (mlajši od 40 let) proti starejšim ZP (starejši od 40 let), je bila raven antigenov *H. pylori* sicer zmanjšana pri

starejših ZP, vendar ne statistično značilno (p -vrednost = 0,31), to pa je lahko le posledica nižje pražne vrednosti za ločitev v skupine glede na starost.

Z izločitvijo proteinov povezanih s starostjo, smo dobili 11 potencialnih bioloških označevalcev, ki so bili od starosti neodvisni. Te smo upoštevali kot robustne potencialne plazemske biološke označevalce GBM, med katerimi so bili le trije s povišanimi koncentracijami v GB (FTL, GNAO1 in S100A9), 8 pa jih je imelo ravni znižane. Od teh 8 POLG (normalno izražen v krvnih celicah) in SKP1 (normalno izražen v možganskem tkivu) nismo uspeli zaznati v nobenem vzorcu plazme GB, kar je verjetno posledica tako lokalne kot sistemski supresije telesnih proteinov, ki jo izvaja GBM.

Zanimivo je, da sta bila ST8 alfa-N-acetil-neuraminid-alfa-2,8-sialiltransferaza 1 (ST8SIA1) in matriks metalloproteinaza 1 (MMP11) pozitivna le pri ZP ženskega spola. ST8SIA1 je bil pred tem že povezan s povečanim tveganjem za raka na dojki in njegovo rastjo pri ženskah (Cazet in sod., 2010), MMP11 pa je normalno prisoten v placenti (Su in sod., 2004), kar lahko razloži, zakaj smo ju našli pozitivna le pri ženskah.

V skladu z našimi rezultati so v predhodni raziskavi z uporabo tehnologije masne spektrometrije prepoznali feritin (FTL) ter S100 kalcij vezajoč protein A9 (S100A9) kot potencialna označevalca GBM v krvni plazmi (Gautam in sod., 2012). Rezultate so potrdili tudi z uporabo tehnike ELISA. Prav tako so odkrili povečane količine proteina FTL v cerebrospinalni tekočini GB z uporabo radioimunskega testa (Sato in sod., 1998). Ker sta proteina FTL in S100A9 bila predhodno že odkrita, smo se mi osredotočili na potrditev rezultata dveh, do sedaj z GBM še nepovezanih proteinov. Za to tehnično validacijo metode smo izbrali proteina CDKN1B ter GNAO1. S prenosom western, kot alternativno metodo kvantifikacije proteinov, smo uspešno potrdili rezultate, dobljene z mikromrežami. Na ta način smo preverili tako natančnost laboratorijskega dela in zbiranja vzorcev, kot tudi same statistične obdelave in orodja za selekcijo potencialnih bioloških označevalcev. Zato verjamemo, da identificiranih 11 proteinov (Preglednica 8) predstavlja nove potencialne biološke označevalce z diagnostičnim potencialom za zgodnjo detekcijo GBM.

5.4.2.1 Povezava glioblastoma multiforme in proteina S100A9

S100A9 je bil predhodno že povezan s procesi imunskega odziva v kombinaciji z znotrajcelično pritrditveno molekulo 1 (ICAM1) (Alexiou in sod., 2001; Banks in sod., 1993). Odkrili so, da so ob ponovitvi GBM po operaciji celice imunskega odziva (makrofagi, mikroglia) povečale sintezo in izločanje proteina S100A9, s čimer so deloma zavrle razrast sekundarnega GBM tumorja (Deininger in sod., 2001). Sklepamo lahko, da so nekatere signalne poti, v katerih je S100A9 udeležen, vpletene v procese imunskega odziva telesa na GBM, saj so odkrili, da eozinofilci izločajo protein S100A9 *in-vitro*, ko so jih gojili z GBM celicami (Curran in sod., 2011). V *in-vivo* študijah so odkrili, da je protein S100A9 v živalih izločala specifična sub-populacija CD11b⁺ (Björk in sod., 2013).

Prav tako so S100A9 odkrili 5x povišanega v GBM matičnih celicah v primerjavi z diferenciranimi GBM celicami. Mutacija, ki je onesposobila S100A9 gen v GBM matičnih

celicah, je prispevala k manjši proliferaciji teh celic tako *in vitro* kot *in vivo* v obliki ksenografta v poskusih z živalmi (S. Chen in sod., 2013). Iz tega lahko sklepamo, da protein S100A9 sodeluje tako pri imunskem odzivu kot v procesih proliferacije GBM. Poleg tega, da je protein S100A9 zaradi svoje tesne povezave z GBM dober biološki označevalec te bolezni, je primeren tudi kot tarča bodočih terapij.

5.4.2.2 Povezava glioblastoma multiforme in proteina CDKN1B

Izražanje gena *CDKN1B*, ki kodira protein p27/Kip1, so predhodno že našli značilno znižanega v tumorskem tkivu GB (Okamoto in sod., 2013). Gre za protein, ki sodeluje v nadzoru celičnega cikla, natančneje prehoda iz G₁ v S fazo in s tem deluje kot tumorski supresor. Deregulacija G₁ faze celičnega cikla preko mutacij ali znižanega izražanja gena *CDKN1B* je značilnost številnih rakavih obolenj (Catzavelos in sod., 1997; Guo in sod., 1997; Kibel in sod., 2003). Poleg vpletosti v celični cikel je p27/Kip1 vpletten tudi v procese celične migracije. Vpliva namreč na aktivacijo majhne GTPaze RhoA (Wendy L See in sod., 2010), neaktivnost tega gena pa je bila povezana s povečanim nastajanjem PDGF induciranih oligodendromov v miših z onesposobljenim genom *CDKN1B* (Wendy L See in sod., 2010). Celice teh miši so imele zaradi odsotnosti p27/Kip nedelujoče popravljalne mehanizme preloma obeh verig DNA, kar je značilnost številnih rakavih obolenj s slabo prognozo (W L See in sod., 2010), med drugim tudi GBM. Poleg proliferativne prednosti progenitorskih nevronskeh celic je bilo nedelovanje gena *CDKN1B* povezano tudi s hitrim napredovanjem meduloblastoma (Ayrault in sod., 2009).

V naših eksperimentih smo odkrili znižanje koncentracije p27/Kip1 v krvni plazmi GB, kar je v skladu s kratkim prezvetjem GB v primerjavi z drugimi rakavimi obolenji. Visok potencial invazije GBM je povezan s povisanim izražanjem proteaze katepsin B (Strojnik in sod., 2005). Pokazali so, da znižano izražanje katepsina B povira izražanje p27/Kip1 prek deregulacije p-ERK/c-Myc/FOXO3a metabolne poti (Gopinath in sod., 2011), kar ustavi prehod celičnega cikla iz faze G₀ v fazo G₁ in posledično zmanjša tumorsko rast *in vivo* (Gopinath in sod., 2010).

S prehodnim povečanjem izražanja gena *CDKN1B* in posledično proteina p27/Kip1 v T98 gliomskih celičnih linijah so uspeli inhibirati migracijo celic GBM (D. Wang in sod., 2011), obenem pa so s povečanim izražanjem p27/Kip1, induciranim s proteinom kostne morfogeneze, podenota IB (BMPR-IB), inducirali diferenciacijo številnih GBM celičnih linij (S. Liu in sod., 2012). Sentezo p27/Kip1 so lahko inducirali tudi s povečanjem ekspresije gena *TRIP6*, kar je upočasnilo rast ksenograftov *in-vivo* (Lin in sod., 2013). Ugotovili so tudi, da so GBM celične linije s povečanim izražanjem p27/Kip1 postale bolj občutljive na obsevanje (Zhang in sod., 2009), kar je verjento najenostavnejša strategija za izboljšanje terapije GBM. Sklepamo lahko, da gre pri p27/Kip1 za pomemben mediator v telesnih procesih, ki zavirajo razrsast in invazivnost celic GBM, kar pomeni, da gre po eni strani za potencialni biološki označevalec bolezni in njene prognoze, po drugi strani pa za potencialno terapevtsko tarčo.

5.4.2.3 Iskanje funkcionalnih povezav med 11 robustnimi potencialnimi biološkimi označevalci

Z orodjem BioMine smo po obstoječih podatkovnih bazah iskali, ali obstajajo kakšne funkcionalne povezave med 11 proteini (Slika 26), ki smo jih obravnavali kot robustne potencialne označevalce GBM (Preglednica 8). Poznavanje tovrstnih povezav pogosto pove veliko o specifičnih metabolnih poteh, s katerimi so povezani tumorski procesi v telesu. Take metabolne poti lahko predstavljajo potencialne tarče za ciljane pristope terapij v boju prti raku.

Odkrili smo, da je protein p27/Kip1 (CDKN1B) funkcionalno povezan s štirimi drugimi proteini, in sicer s smrtno domeno FAS-povezanega proteina (FADD), MBD4-povezujoč dejavnik popravljanja neujemanja (MLH1), protein S-fazne kinaze 1 (SKP1) ter ST8SIA1. Nivoji v krvni plazmi vseh petih povezanih proteinov so bili v naši raziskavi znižani pri GB v primerjavi z ZP, kar lahko pomeni, da so udeležni v istih celičnih procesih, na katere vpliva GBM. FADD je udeležen v apoptočni poti dejavniku tumorske nekroze (TNF), odkrili pa so tudi, da lahko FADD inducira apoptozo v GBM celičnih linijah preko aktivacije TNF receptorja 1 (P. Huang in sod., 2012). FADD in MLH1 sta proteina istega kompleksa (Screaton in sod., 2003), MLH1 pa je povezan s SKP1, ki spada v Skp1-Cullin-F-Box-E3 ubikvitin protein ligazni kompleks. Ta kompleks sodeluje v procesu razgradnje proteinov s proti-proliferativno funkcijo, med katere spada tudi CDKN1B (S. Wang in sod., 2010).

Opazili so, da ST8SIA1 spodbuja proliferacijo HEK AD293 celic (Z. Wang in sod., 2006) in zavira izražaje genov za *CDKN1B* ter *FADD*, oba zaviralca razrasta GBM celic. Z njunim utišanjem celice GBM dobijo boljše pogoje za nekontrolirano razmnoževanje. Sklepamo lahko, da potencialni biološki označevalci, ki smo jih v naši študiji odkrili, služijo lahko tako kot diagnostični/prognostični biološki označevalci in v nekaj primerih tudi kot potencialne tarče za terapijo GBM. Seveda pa bi bilo potrebno vse potencialne tarče ustrezno validirati s kliničnimi študijami na večjem številu bolnikov za uporabo v klinične in terapevtske namene.

5.5 VPLIV ANATOMSKE LOKACIJE IN PREŽIVETJA NA KRVNE PROTEINE

5.5.1 Vpliv anatomske lokacije GBM na ravni plazemskih proteinov

Kot prvi smo uspeli povezati različne proteinske profile v krvni plazmi z anatomsko lokacijo GBM tumorja v možganih, kar lahko v bodočnosti izboljša razumevanje različnih podskupin GBM tumorjev. Z multivariatno analizo smo prepoznali 26 plazemskih proteinov, katerih koncentracije so bile odvisne od anatomske lokacije GBM pri 17 GB (Preglednica 9). Nobenega od teh 26 proteinov nismo našli v primerjavi GB proti ZP, ko smo odkrili 42 potencialnih označevalcev (Preglednica 7). To pomeni, da teh 26 proteinov ni specifičnih le za GB, temveč je njihova variabilnost pri GB verjetno posledica razlik med različnimi tipi tumorjev, ki so specifični za določene anatomske lokacije v možganih.

Ko smo vzorce GB hierarhično razvrstili glede na profile izražanja 26 proteinov, povezanih z anatomske lokacijo, smo dobili dve glavni skupini GB:

- skupina, ki vsebuje vzorce GB s tumorjem v frontalnem in temporalnem režnju ter
- skupina, ki vsebuje vzorce GB s tumorjem v okcipitalnem in parietalnem režnju.

Poleg tega so se vzorci iz iste hemisfere (leve oz. desne) združevali skupaj. Iz tega gre sklepati na sorodnost med GBM iz frontalnega in temporalnega režnja, ter na sorodnost med GBM iz okcipitalnega in parietalnega režnja, kar kaže na dva glavna tipa tumorjev GBM.

Sklepamo lahko tudi, da razvoj GBM, ki poteka v različnih hemisferah in predelih možganov, kjer je povezan z različnimi topološkimi strukturami (Briganti in sod., 2012; Suarez in sod., 2012), za sabo pušča različne »prstne odtise«, ki se poznajo tudi na nivojih proteinov v krvni plazmi.

Subventrikularna cona je niša v možganih, kjer se nahajajo matične celice, ki skrbijo za rast in obnovo možganskega tkiva. GBM, ki so v kontaktu s to nišo ter matičnimi celicami v njej, so pogosto multifokalni (imajo več žarišč razrasta) ob diagnozi in se pogosto ponovijo po operaciji, tudi na oddaljenih mestih od primarnega tumorja. GBM, ki nastanejo ločeno od subventrikularne cone, imajo običajno eno mesto razrasta in se redkeje pojavljajo po operaciji oz. se pojavijo v bližini primarnega GBM, iz česar gre sklepati, da nastanejo iz progenitorjev možganske beline (Lim in sod., 2007). To kaže na vpliv, ki ga ima lokacija žarišča tumorja za nadaljnji razvoj bolezni in posledično tudi različno prognozo pri GB.

Prav tako lahko na razlike med lokacijami vplivajo različne mutacije. Odkrili so, da so mutacije nekaterih genov v GBM specifične samo za določene lokacije. Dve H3F3A mutaciji sta bili povezani z razvojem GBM v specifičnih anatomskej regijah, zaradi spremenjenega izražanja transkripcijskih faktorjev OLIG1, OLIG2 ter FOXG1 (Sturm in sod., 2012). V isti raziskavi so odkrili tudi mutacijo K27M, ki se je pojavljala samo v tumorjih, ležečih na sredinski liniji, vključno z redkimi tumorji bazalnih ganglijev v hrbtenjači. Avtorji so razpravljali tudi o povezavi med mutacijami, specifičnimi za GBM lokacijo, ter izražanjem bioloških označevalcev nevronske celične linije, iz česar so sklepali, da so lahko GBM različnega celičnega izvora glede na lokacijo, kjer nastanejo. Naši rezultati potrjujejo to hipotezo, vendar bi jo bilo potrebno dodatno, neposredno potrditi.

Na podlagi naših rezultatov gre torej sklepati, da lahko tudi izmed GBM tumorjev pričakujemo različne tipe teh tumorjev, ki so vezani tudi na lokacijo razrasta in mesto izvora v možganih. Boljše razumevanje teh tipov tumorja lahko pomaga pri prognozi bolezni, obenem pa omogoča razvoj boljših metod terapij, vezanih na mehanizme specifičnega tipa bolezni.

5.5.2 Identifikacija potencialnih bioloških označevalcev preživetja pri bolnikih z GBM

Z uporabo analize Log-rank smo odkrili 16 plazemskih proteinov, katerih ravni so bili odvisni od preživetja GB. Glede na prognozo smo izrisali Kaplan-Meierjeve grafe preživetja kot funkcijo časa (Slika 29). Analizo log-rank smo uporabili zato, da smo s pomočjo korelacije med plazemsko koncentracijo testiranega proteina in preživetjem GB določili kritične vrednosti izmerjenega signala iz mikromrež s protitelesi, ki so najbolje razlikovale vzorce glede na preživetje.

Izmed 16 proteinov smo le protein GNAO1 identificirali kot potencialni biološki označevalci v primerjavi GB in ZP, zato smo ga izbrali tudi za potrditveno analizo s prenosom western, kjer je protein GNAO1 pokazal 2,9-kratno povečanje plazemske koncentracije v GB z daljšim preživetjem. Kljub temu, da so protein GNAO1 že dokazali kot del človeškega proteoma (Xiaoyun Liu in sod., 2007), je njegova lokacija v celični membrani različnih tipov celic običajna. Nekatere mutacije v genu *GNAO1* pa lahko povzročijo njegovo nenormalno izražanje in izločanje iz celic, kar so povezali z epileptično encefalopatijo in motenim tokom kalcija v nevronskih celicah (Kazuyuki Nakamura in sod., 2013). Uravnavanje kalcijevega toka je pomembno pri razmnoževanja nevronskih celic (Galli in sod., 1995), moten tok kalcija pa lahko inducira apoptozo v GBM celicah (Valerie in sod., 2013), kar bi lahko obrazložilo povišane koncentracije proteina GNAO1 v GB z daljšim preživetjem. Kljub temu da do sedaj še niso odkrili povezave med plazemsko koncentracijo proteina GNAO1 in GBM, so odkrili njegovo koncentracijo povečano v plazmi bolnikov z rakom na želodcu. V tkivu naj bi protein GNAO1 preko pre-apoptotične proteinske interference vplival na boljše preživetje rakavih celic (Z. Liu in sod., 2013). Mi smo odkrili značilno nižje koncentracije proteina GNAO1 pri GB s krajšim preživetjem, kar je skladno z že odkritim, saj znižanje koncentracije proteina GNAO1 zviša razmnoževanje celic raka na jetrih preko zaviranja senescence (Pei in sod., 2013). Ravno zaradi te povezave smo ocenili protein GNAO1 kot najboljši potencialni biološki označevalci za GBM, ki smo ga odkrili na novo v okviru te študije.

5.5.3 Vpliv anatomske lokacije GBM na preživetje bolnikov z GBM

Zanimivo je, da smo našli med temi proteini in med proteini, specifičnimi za anatomsko lokacijo GBM ($n = 26$, Preglednica 9), 8 takih, ki so prisotni v obeh seznamih. Na podlagi tega gre sklepati, da je prognoza GB pogojena z anatomsko lokacijo GBM. Z uporabo orodja Biomine smo analizirali funkcionalne povezave med temi 8 proteini in ugotovili, da so vsi proteini funkcionalno povezani z mitogen-aktivirana proteinska kinaza 1 (MAP2K1; Slika 30). Kot kaže so vpleteni v SRC – MEK 1/2 – ERK 1/2 metabolno pot, ki je sodeluje pri nadzoru celičnega cikla ter razmnoževanja celic in ima pomembno funkcijo tudi pri GBM (Tang in sod., 2012). Vseh 8 proteinov je imelo zvišane ravni v plazmi GB s tumorjem v okcipitalnem režnju in parietalnem režnju v primerjavi s tisitimi GB, ki so imeli tumorje v frontalnem režnju. To je bilo tudi konsistentno z našimi izračuni, ki so pokazali, da so GB, ki so imeli tumorje v frontalnem delu, preživelici 2,2-krat dlje, kot tisti s tumorji v drugih režnjih, vendar je bila pri tej povezavi statistična značilnost šibkejša (p-vrednost = 0,11). Ta povezava je lahko tudi posledica uspešnejših operacij, saj so tumorji v

frontalnem režnju kirurgom lažje dostopni in posledično operativni posegi uspešnejši, kar so že pokazali v prejšnjih raziskavah (Mineo in sod., 2007; Sturm in sod., 2012). Prav tako so odkrili, da je bližina tumorja periventrikularni coni vplivala na preživetje GB (Chaichana in sod., 2010), verjetno zaradi olajšane tumorske rasti in migracije GBM celic (Lim in sod., 2007).

Zanimivo je, da je bil protein GNAO1 edini protein, ki smo ga našli med robustnimi biološkimi označevalci in med proteini, povezanimi s preživetjem GB. Protein GNAO1 smo odkrili povišanega v plazmi vseh GB v primerjavi z ZP. Pri tem je bil protein GNAO1 pri GB z daljšim preživetjem od enega leta povišan za 2,9-krat, medtem ko je bil pri GB s krajšim preživetjem povišan le 1,2-krat v primerjavi z ZP. O sami funkciji proteina GNAO1 ter njegovi morebitni povezavi z GBM ni veliko znanega, odkrili pa so povezavo med povišanimi nivoji proteina GNAO1 v plazmi bolnikov z rakom na želodcu (Z. Liu in sod., 2013), kjer je protein GNAO1 deloval kot telesni zaviralec raknih celic z indukcijo apoptoze. Mi smo odkrili povišane ravni proteina GNAO1 v GB z daljšim preživetjem, kar kaže na to, da je neaktivnost proteina GNAO1 povezana večjo invazivnostjo tumorja. Ti izsledki so konsistentni s predhodnimi raziskavami na celicah raka na jetrih (Pei in sod., 2013). Kot kaže so povišani nivoji proteina GNAO1 v krvi posledica odziva telesa na GBM. Možno je, da prisotnost proteina GNAO1 ugodno vpliva na zdravje GB in posledično na njihovo daljše preživetje.

Možno je, da so tudi nekateri ostali potencialni robustni markerji povezani s preživetjem, vendar jih v naši raziskavi nismo našli kot statistično značilne zaradi premalega števila vzorcev ($n = 17$). Tak primer je p27/Kip1, ki so ga številne študije že potrdile kot prognostični marker kratkega preživetja ter stopnje GBM (Nabika in sod., 2010; Shen in sod., 2009). Tudi mi smo ga našli zvišanega v GB s krajšim preživetjem, vendar povezava ni bila statistično značilna.

Nivoji naših potencialnih prognostičnih označevalcev lahko zdravnikom doprinesajo dodatne diagnostične in prognostične informacije, ki lahko pomagajo usmerjati terapijo že pred kiruruškim posegom.

5.6 SKLEPI

Odkrivanje novih bioloških označevalcev je za GBM ključnega pomena, tako za boljšo diagnostiko in prognostiko, kot tudi za nove potencialne terapevtske tarče. Obenem nam je sistemski analiza skupin bioloških označevalcev omogočila vpogled v povezave, ki so jih imeli biološki označevalci med sabo, kar nam je dalo nov vpogled v procese, povezane z boleznijo GBM.

Odkrivanje bioloških označevalcev poteka v več korakih preden lahko postanejo uporabni v kliniki. Korake lahko na grobo razdelimo v presejalne študije in študije klinične validacije. V presejalnih študijah iščemo nove kandidate, ki še niso bili povezani z določeno boleznijo. Študije običajno potekajo na malem številu vzorcev, ki jim izmerimo veliko parametrov (npr. veliko proteinom izmerimo ravni v plazmi). Pogosto preizkušamo tudi različne tipe normalizacij in statistične obdelave podatkov in glede na različne načine izberemo najbolj merodajne. V tem procesu se predvsem zaradi manjšega števila vzorcev generira veliko napačno pozitivnih rezultatov, a kljub temu so med njimi tudi dobri kandidati za biološke označevalce.

Nato potencialni biološki označevalci, ki so pokazali dobre rezultate v presejalnih testih, vstopijo v študije klinične validacije. V okviru teh študij se zelo ciljano analizira izbrane biološke označevalce na velikem številu vzorcev. Uporablja se manj kompleksne, natančnejše metode, ki niso primerne za sistemski analize (presejalne teste), se pa uporablja v klinične namene.

V tem sklopu smo prišli do več pomemnih novih dognanj:

- Profili koncentracij plazemskih proteinov so odvisni od starosti človeka.
- Prisotnost GBM vpliva na spremembe v proteinski sestavi krvne plazme bolnika, ki so rezultat tako proteinov, ki jih izloča GBM, kot tudi proteinov, ki se izločajo zaradi telesnega odziva na GBM.
- Bolniki z različnimi tipi GBM (glede na anatomske lokacije v možganih ter glede na preživetje bolnika) imajo specifične profile koncentracij plazemskih proteinov.
- Protein GNAO1 smo odkrili kot najbolj kvaliteten potencialni biološki označevalec, saj rezultati kažejo na njegov diagnostični kot prognostični potencial.

Glede na naše rezultate lahko druge klinične raziskovalne skupine opravijo nove klinične študije, obenem pa lahko metode mikromrež po istem principu uporabimo za iskanje potencialnih bioloških označevalcev številnih drugih bolezni. Na ta način smo opravili enega od mnogih pomembnih korakov v smer boljšega razumevanja in zdravljenja bolezni GBM. Pot do dobrih bioloških označevalcev je dolga in kompleksna, zato je pomembno, da se združuje znanja različnih raziskav.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Glioblastoma multiforme (GBM) so tumorji, ki po definiciji klasifikacije Svetovne zdravstvene organizacije pomenijo najslabšo prognozo za bolnikov z GBM (GP). Tega tipa je 20 % možganskih tumorjev, zaradi česar spadajo v skupino najbolj smrtnih tumorjev z mediano preživetja le 47 tednov (GB brez zdravljenja imajo mediano preživetja 20 tednov). Najpogostejsa terapija je takojšnja operacija in kasnejše obsevanje, vendar kljub temu le redki GB preživijo dalj kot tri leta. Glavna razloga za visoko smrtnost sta visoka infiltrativna sposobnost GBM celic, ki lahko migrirajo v različne dele možgan, ter omejeno tkivo, ki ga lahko kirurško odstranimo. Operacije na možganih so vedno povezane s tveganji za bolnika, hkrati pa odstranjevanje možganskega tkiva vpliva na kognitivne sposobnosti in posledično na kvaliteto življenja bolnika. Poleg tega ne operacija, ne obsevanje možganskega tkiva ne dosežeta migrirajočih celic, ki so ob času operacije že v mnogih drugih predelih možgan, zaradi česar se tumor pogosto ponovno pojavi, lahko tudi v drugem delu možgan.

Če želimo razviti učinkovito terapijo za GBM, je potrebno bolezen diagnosticirati preden se uspe zelo razrasti. Obenem moramo razviti učinkovite terapije, ki bodo delovale tudi na invazivne celice. Zato potrebujemo biološke označevalce, povezane z GBM, ki nam pomagajo pri detekciji in spremljanju bolezni, obenem pa nam lahko v kombinacijami z drugimi podatki omogočijo novo razumevanje GBM procesov. Možnost odkritja bioloških označevalcev GBM je sicer boljša na samem mestu tumorja, vendar pa je bistveno enostavnejše spremljati biološke označevalce v bolj dostopnih tkivih. Uporaba periferne krvi v diagnostične in prognostične namene ni le ena manj invazivnih metod; zaradi svoje kompleksnosti nosi veliko informacij o dogajanju iz prav vseh delov telesa. V krvi lahko tako spremljamo koncentracije različnih preprostih molekul oz. metabolitov, število različnih tipov celic ter njihov profil izražanja genov. Z novo razvitimi proteomskimi pristopi lahko hkrati merimo tudi koncentracije velikega števila proteinov, topnih v plazmi. Te metode so postale dovolj občutljive, da se jih lahko uporablja tudi na kompleksnih tkivih, kot je periferna kri. V naši raziskavi smo se zato odločili iskati potencialne proteinske biološke označevalce v krvi. Vendar pa lahko na količine vseh krvnih komponent poleg prisotnosti GBM vpliva še veliko drugih dejavnikov kot so spol, starost in telesna masa. Zaradi tega je ključnega pomena, da se dobljene rezultate primerja s kontrolnimi vzorci, ki dobro predstavljajo populacijo ne le po povprečju, temveč tudi po naboru možnih vrednosti.

V okviru te disertacije smo iz vzorcev zdravih prostovoljcev (ZP) izolirali CD4⁺ in NK celice ter jim glede na rezultate mikromrež preverili stabilnost oz. variabilnost izražanja genov z metodo RT-qPCR z namenom iskanja genov s stabilnim izražanjem med posamezniki. Poznavanje takšne bazne linije je ključnega pomena, kadar iščemo robustne biološke označevalce, saj želimo, da bi se ti le malo spremunjali znotraj ZP in ne bi bili odvisni od dejavnikov kot so spol, starost in BMI.

Nato smo z uporabo mikromrež s protitelesi analizirali 34 vzorcev plazme, 17 ZP in 17 GB, za 656 različnih proteinov in pri obdelavi podatkov kot prvi vpeljali metodo kvantilne normalizacije. V okviru primerjave ravni plazemskih proteinov GB in ZP smo odkrili 42 potencialnih bioloških označevalcev, od katerih smo po popravku glede na starost dobili 11 robustnejših. Za slednje smo pregledali, kakšne so obstoječe povezave z GBM v okviru drugih raziskav ter podatke obogatili z informacijami iz prosto dostopnih podatkovnih baz. Poleg tega smo preverili tudi kako je izražanje proteinov povezano s preživetjem GB po diagnozi ter z lokacijo tumorja v lobanji. Odkrili smo 16 proteinov, povezanih s preživetjem ter 26 proteinov, povezanih z anatomsko lokacijo tumorja, izmed katerih smo identificirali 8 proteinov v obeh skupinah. Izkazalo se je, da so tumorji, ki so se pojavljali v različnih delih možganov, kazali različne profile nivojev plazemskih proteinov, različne GBM podtipe pa smo odkrili povezane tudi s prognozo GBM po metabolni poti p27/Kip1. Tehnično veljavnost rezultatov mikromrež s protitelesi smo potrdili z dvema alternativnima metodama, ELISA in prenosom western. Na ta način smo potrdili upotabo metode mikromrež s protitelesi za namene presejalnega testa za odkrivanje bioloških označevalcev, potrdili nekatere že predhodno odkrite biološke označevalce, odkrili pa smo tudi nekaj novih.

Za izboljšanje prognoze GBM je potrebno odkriti nove metode, s katerimi bomo bolj ciljano zavirali uničajoče učinke GBM. V ta namen čedalje več raziskovalcev preverja možnosti uporabe matičnih celic kot mediatorjev pri nadzoru GBM, njihov potencial pa so pokazali tudi rezultati naše raziskave. Ugotovili smo, da prisotnost hMSC celic povzroči sistemsko utišanje izražanja genov U-87MG celic, kar je v skladu z že objavljeno literaturo. Prisotnost živih hMSC celic je imela bistveno večji vpliv kot le prisotnost dejavnikov, ki jih hMSC izločajo. Podobno so U-87MG delovale večinoma zaviralno na izražanje genov hMSC, kljub temu pa so imele hMSC povečano izražanje genov povezanih z imunskim odzivom. Ti rezultati kažejo na to, da bi lahko bile matične celice v prihodnosti uporabljene kot alternativa ali dopolnilo obstoječim invazivnim in netarčnim terapijam GBM.

V sklopu te disertacije smo prispevali enega od zgodnjih korakov v poti odkrivanja novih klinično uporabnih bioloških označevalcev ter terapij. Namen je bil poglobiti naše razumevanje bolezni GBM in hkrati priporočiti nove potencialne biološke označevalce in terapije za nadaljne študje klinične validacije. V procesu smo vpeljali tudi nove metode obdelave in interpretacije podatkov, ki lahko služijo v bodočih raziskavah z istimi tehnikami.

6.2 SUMMARY

According to WHO definition of glioma tumour classification, GBM represents 20 % of brain tumours with the poorest prognosis for the patient. Therefore they are considered tumour with one of the highest mortality rates with median of survival of 47 weeks (GBM patients without proper treatment have median of survival of 20 weeks). The most common therapy is immediate surgical removal of the tumour mass when possible and radiation. Despite these radical measures only rare patients survive longer than three years. The main reasons for this high mortality are high infiltrative potential of GBM cells which are capable of migrating to various other parts of the brain and the fact, that there is limited, if any tissue that a surgeon can remove. Brain surgeries are always associated with risks of having an effect on cognitive function of the patient and therefore impairing patient's quality of life. However neither surgical removal of tumour mass, nor radiation can stop the migratory tumour cells, that can be present in other parts of the brain already at the time of surgery. Therefore it is very common that GBM reappears shortly after the surgery, sometimes in a completely different part of the brain.

To develop effective strategies against GBM disease, it is necessary that the disease is diagnosed earlier, before migratory GMB cells have had the chance to infiltrate healthy tissue. At the same time new, more targeted therapies should be developed that preserve as much healthy tissue as possible. Therefore it is necessary to discover new biomarkers associated with GBM that can help us to discover and monitor the disease early on. The combination of them also reveals the understanding of the processes, involved in GMB cancerogenesis. The chance of discovering GBM biomarkers is greater directly in the tissue, however it is much more convenient to monitor the biomarkers in other, more accessible tissues. The use of peripheral blood in diagnostic and prognostic purposes is one of the less invasive methods; due to its complexity blood carries high quantity of information basically from all parts of the body. One can monitor several different metabolites, number of cell populations and their gene expression. With newly developed proteomic approaches we can simultaneously measure a great number of plasma soluble proteins. Such methods became sensitive enough to be used on complex tissues such as peripheral blood. However, other factors than presence of GBM can affect the levels of before mentioned three blood components, such as gender, age and body weight index. Therefore it is necessary to compare measurements on samples of GBM patients to control samples that well represent the healthy population, not only by average values, but also by variation.

As part of this dissertation CD4⁺ and natural killer cells were isolated and the stability of gene expression of selected genes was tested using quantitative real-time polymerase chain reaction. Our results were used to determine the baseline values for CD⁺ and natural killer cells gene expression. Knowing such baseline is key to finding robust biomarkers, as they are required to be stable in healthy population as well as be independent of factors such as gender, age or body mass index.

Using antibody arrays, 34 plasma samples were analysed for 656 different proteins; 17 of these samples were from healthy volunteers and 17 from GBM patients. We were the first

to use the method of quantile normalization as part of the data analysis. When comparing plasma protein levels of GBM patients to levels in healthy volunteers we discovered 42 potential biomarkers, of which only 11 remained significant after being corrected for the age difference between the two groups of subjects. For these 11 the literature was reviewed for known associations with GBM and enrichment analysis, for which publicly accessible databases were used. We also analysed the survival of GBM patients and anatomic location of the tumour associated with plasma levels of certain proteins. We identified 16 proteins, associated with survival and 26 proteins associated with anatomic location of GBM, of which 8 proteins were identified in both groups. Identified proteins showed expression profiles depending on the anatomic location of GBM in the brain which also correlated with prognosis of GBM patients, probably via p27/Kip1 metabolic pathway. We confirmed the technical validity of results by re-analysing them with alternative methods, for which enzyme-linked immunosorbent assay and western blot were used. Therefore we confirmed the use of antibody arrays as a screening method for biomarker candidates discovery, confirmed some of the already discovered biomarkers as well as provide us with new potential biomarkers and therapeutic targets.

Successfully treating GBM requires new methods with more targeted effects that trigger slower growth in tumour cells. More and more research is being done on use of stem cells as mediators regarding GBM control; this potential was also observed with our results. A systemic silencing of the genes was observed in U-87MG GBM cell line, when grown in close proximity to human mesenchymal stem cells (hMSC), which is in accordance with existing knowledge. However we also discovered that the presence of living hMSC cells had a much greater impact on gene expression compared to presence of just their paracrine factors. U-87MG cells have had a similar effect on hMSC, although in some cases they activated certain pathways associated with immune response. These results suggest that stem cells could become the future alternative or additive to existing invasive and non-targeted therapy approaches against GBM.

As part of this dissertation we have contributed one of the early steps in the long way of discovery of clinical biomarkers. The purpose was to deepen the understanding of GBM disease and to recommend new potential biomarkers and therapies for further studies of clinical validation. We have developed novel methods for data analysis and interpretation, that can be used for future research using these techniques.

7 VIRI

- Aldape K., Simmons M. L., Davis R. L., Miike R., Wiencke J., Barger G., Lee M., Chen P., Wrensch M. 2000. Discrepancies in diagnoses of neuroepithelial neoplasms: the San Francisco Bay Area Adult Glioma Study. *Cancer*, 88, 10: 2342–2349
- Alexiou D., Karayiannakis A. J., Syrigos K. N., Zbar A., Kremmyda A., Bramis I., Tsigris C. 2001. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *European journal of cancer*, 37, 18: 2392–2397
- Al-Nedawi K., Meehan B., Kerbel R. S., Allison A. C., Rak J. 2009. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 10: 3794–3799
- Altman D. G., Doré C. J. 1990. Randomisation and baseline comparisons in clinical trials. *Lancet*, 335, 8682: 149–153
- Andersson U., Lindberg J., Wang S., Balasubramanian R., Marcusson-Ståhl M., Hannula M., Zeng C., Juhasz P. J., Kolmert J., Bäckström J., Nord L., Nilsson K., Martin S., Glinghammar B., Cederbrant K., Schuppe-Koistinen I. 2009. A systems biology approach to understanding elevated serum alanine transaminase levels in a clinical trial with ximelagatran. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 14, 8: 572–586
- Atzori L., Antonucci R., Barberini L., Griffin J. L., Fanos V. 2009. Metabolomics: a new tool for the neonatologist. *The journal of maternal-fetal and neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 22: 350–353
- Ayrault O., Zindy F., Rehg J., Sherr C. J., Roussel M. F. 2009. Two tumor suppressors, p27Kip1 and patched-1, collaborate to prevent medulloblastoma. *Molecular cancer research*, 7, 1: 33–40
- Baechler E. C., Batliwalla F. M., Karypis G., Gaffney P. M., Moser K., Ortmann W. A., Espe K. J., Balasubramanian S., Hughes K. M., Chan J. P., Begovich A., Chang S.-Y. P., Gregersen P. K., Behrens T. W. 2004. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes and immunity*, 5, 5: 347–353
- Banks R. E., Gearing A. J., Hemingway I. K., Norfolk D. R., Perren T. J., Selby P. J. 1993. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *British journal of cancer*, 68, 1: 122–124

- Bexell D., Scheding S., Bengzon J. 2010. Toward brain tumor gene therapy using multipotent mesenchymal stromal cell vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18, 6: 1067–1075
- Björk P., Källberg E., Wellmar U., Riva M., Olsson A., He Z., Törngren M., Liberg D., Ivars F., Leanderson T. 2013. Common interactions between S100A4 and S100A9 defined by a novel chemical probe. *PLoS one*, 8, 5: e63012, doi: 10.1371/journal.pone.0063012: 12 str.
- Blandini F., Cova L., Armentero M.-T., Zennaro E., Levandis G., Bossolasco P., Calzarossa C., Mellone M., Giuseppe B., Deliliers G. L., Polli E., Nappi G., Silani V. 2010. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Cell transplantation*, 19, 2: 203–217
- Bolstad B. M., Irizarry R. a, Åstrand M., Speed T. P., Astrand M. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19, 2: 185–193
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72248–72254
- Brandacher G., Hoeller E., Fuchs D., Weiss H. G. 2007. Chronic immune activation underlies morbid obesity: is IDO a key player? *Current drug metabolism*, 8, 3: 289–295
- Briganti C., Sestieri C., Mattei P. A., Esposito R., Galzio R. J., Tartaro A., Romani G. L., Caulo M. 2012. Reorganization of functional connectivity of the language network in patients with brain gliomas. *American journal of neuroradiology*, 33, 10: 1983–1990
- Bruner J. M., Inouye L., Fuller G. N., Langford L. A. 1997. Diagnostic discrepancies and their clinical impact in a neuropathology referral practice. *Cancer*, 79, 4: 796–803
- Cai M.-Y., Hou J.-H., Rao H.-L., Luo R.-Z., Li M., Pei X.-Q., Lin M. C., Guan X.-Y., Kung H.-F., Zeng Y.-X., Xie D. 2011. High expression of H3K27me3 in human hepatocellular carcinomas correlates closely with vascular invasion and predicts worse prognosis in patients. *Molecular medicine*, 17, 1-2: 12–20
- Carlsson A., Persson O., Ingvarsson J., Widegren B., Salford L., Borrebaeck C. A. K., Wingren C. 2010. Plasma proteome profiling reveals biomarker patterns associated with prognosis and therapy selection in glioblastoma multiforme patients. *Proteomics. Clinical applications*, 4, 6-7: 591–602
- Catzavelos C., Bhattacharya N., Ung Y. C., Wilson J. A., Roncari L., Sandhu C., Shaw P., Yeger H., Morava-Protzner I., Kapusta L., Franssen E., Pritchard K. I., Slingerland J.

- M. 1997. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature medicine*, 3, 2: 227–230
- Cazet A., Lefebvre J., Adriaenssens E., Julien S., Bobowski M., Grigoriadis A., Tutt A., Tulasne D., Bourhis X. Le, Delannoy P. 2010. GD₃ synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. *Molecular cancer research*, 8, 11: 1526–1535
- Cha S. 2006. CNS tumors: monitoring therapeutic response and outcome prediction. *Topics in magnetic resonance imaging*, 17, 2: 63–68
- Chaichana K., Parker S., Olivi A., Quiñones-Hinojosa A. 2010. A proposed classification system that projects outcomes based on preoperative variables for adult patients with glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery*, 112, 5: 997–1004
- Chen S., Zhao H., Deng J., Liao P., Xu Z., Cheng Y. 2013. Comparative proteomics of glioma stem cells and differentiated tumor cells identifies S100A9 as a potential therapeutic target. *Journal of cellular biochemistry*, 114, 12: 2795–2808
- Chen Y., Zheng T., Lan Q., Foss F., Kim C., Chen X., Dai M., Li Y., Holford T., Leaderer B., Boyle P., Chanock S. J., Rothman N., Zhang Y. 2011. Cytokine polymorphisms in Th1/Th2 pathway genes, body mass index, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 117, 2: 585–590
- Cho D.-Y., Lin S.-Z., Yang W.-K., Hsu D.-M., Lee H.-C., Lee W.-Y., Liu S.-P. 2009. Recent advances of dendritic cells (DCs)-based immunotherapy for malignant gliomas. *Cell transplantation*, 18, 9: 977–983
- Cobb J. P., Mindrinos M. N., Miller-Graziano C., Calvano S. E., Baker H. V., Xiao W., Laudanski K., Brownstein B. H., Elson C. M., Hayden D. L., Herndon D. N., Lowry S. F., Maier R. V., Schoenfeld D. A., Moldawer L. L., Davis R. W., Tompkins R. G., Bankey P., Billiar T., Camp D., Chaudry I., Freeman B., Gamelli R., Gibran N., Harbrecht B., Heagy W., Heimbach D., Horton J., Hunt J., Lederer J., Mannick J., McKinley B., Minei J., Moore E., Moore F., Munford R., Nathens A., O'keefe G., Purdue G., Rahme L., Remick D., Sailors M., Shapiro M., Silver G., Smith R., Stephanopoulos G., Stormo G., Toner M., Warren S., West M., Wolfe S., Young V. 2005. Application of genome-wide expression analysis to human health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 13: 4801–4816
- Coffelt S. B., Marini F. C., Watson K., Zwezdaryk K. J., Dembinski J. L., LaMarca H. L., Tomchuck S. L., Honer zu Bentrup K., Danka E. S., Henkle S. L., Scandurro A. B. 2009. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 10: 3806–3811

- Com E., Clavreul A., Lagarrigue M., Michalak S., Menei P., Pineau C. 2012. Quantitative proteomic Isotope-Coded Protein Label (ICPL) analysis reveals alteration of several functional processes in the glioblastoma. *Journal of proteomics*, 75, 13: 3898–3913
- Critchley-Thorne R. J., Yan N., Nacu S., Weber J., Holmes S. P., Lee P. P. 2007. Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. *PLoS medicine*, 4, 5: e176, doi: 1371/journal.pmed.0040176: 15 str.
- Cruceru M. L., Neagu M., Demoulin J.-B., Constantinescu S. N. 2013. Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17, 10: 1218-1235
- Curran C. S., Evans M. D., Bertics P. J. 2011. GM-CSF production by glioblastoma cells has a functional role in eosinophil survival, activation, and growth factor production for enhanced tumor cell proliferation. *Journal of immunology*, 187, 3: 1254–1263
- Debey S., Schoenbeck U., Hellmich M., Gathof B. S., Pillai R., Zander T., Schultze J. L. 2004. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *The pharmacogenomics journal*, 4, 3: 193–207
- Deininger M. H., Pater S., Strik H., Meyermann R. 2001. Macrophage/microglial cell subpopulations in glioblastoma multiforme relapses are differentially altered by radiochemotherapy. *Journal of neuro-oncology*, 55, 3: 141–147
- DelaRosa O., Pawelec G., Peralbo E., Wikby A., Mariani E., Mocchegiani E., Tarazona R., Solana R. 2006. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology*, 7, 5-6: 471–481
- Demuth T., Rennert J. L., Hoelzinger D. B., Reavie L. B., Nakada M., Beaudry C., Nakada S., Anderson E. M., Henrichs A. N., McDonough W. S., Holz D., Joy A., Lin R., Pan K. H., Lih C. J., Cohen S. N., Berens M. E. 2008. Glioma cells on the run - the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines. *BMC genomics*, 9, 54: doi: 10.1186/1471-2164-9-54: 15 str.
- Desoubzdanne D., Claparols C., Martins-Froment N., Zedde C., Balayssac S., Gilard V., Tercé F., Martino R., Malet-Martino M. 2010. Analysis of hydrophilic and lipophilic choline compounds in radioresistant and radiosensitive glioblastoma cell lines by HILIC-ESI-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398, 6: 2723–2730
- Diamandis E. P. 2004. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. *Molecular in cellular proteomics*, 3, 4: 367–378

- Dieu R. Le, Taussig D. C., Ramsay A. G., Mitter R., Miraki-Moud F., Fatah R., Lee A. M., Lister T. A., Gribben J. G. 2009. Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood*, 114, 18: 3909–3916
- Dorshkind K., Swain S. 2009. Age-associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal. *Current opinion in immunology*, 21, 4: 404–407
- Douek D. C., Altmann D. M. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *International immunology*, 9, 3: 355–364
- Du P., Kibbe W. A., Lin S. M. 2008. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics* (Oxford, England), 24, 13: 1547–1548
- Eady J. J., Wortley G. M., Wormstone Y. M., Hughes J. C., Astley S. B., Foxall R. J., Doleman J. F., Elliott R. M. 2005. Variation in gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers. *Physiological genomics*, 22, 3: 402–411
- Echan L. A., Tang H.-Y., Ali-Khan N., Lee K., Speicher D. W. 2005. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics*, 5, 13: 3292–3303
- Elstner A., Stockhammer F., Nguyen-Dobinsky T.-N., Nguyen Q. L., Pilgermann I., Gill A., Guhr A., Zhang T., Eckardstein K. Von, Picht T., Veelken J., Martuza R. L., Deimling A. Von, Kurtz A. 2011. Identification of diagnostic serum protein profiles of glioblastoma patients. *Journal of neurooncology*, 102, 1: 71–80
- Eronen L., Toivonen H. 2012. Biomine: predicting links between biological entities using network models of heterogeneous databases. *BMC bioinformatics*, 6, 13: doi: 10.1186/1471-2105-13-119: 21 str.
- Falcon S., Gentleman R. 2007. Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* (Oxford, England), 23, 2: 257–258
- Fang X., Wang C., Balgley B. M., Zhao K., Wang W., He F., Weil R. J., Lee C. S. 2012. Targeted Tissue Proteomic Analysis of Human Astrocytomas. *Journal of Proteome Research*, 11, 8: 3937–3946
- Friese M. A., Steinle A., Weller M. 2004. The innate immune response in the central nervous system and its role in glioma immune surveillance. *Onkologie*, 27, 5: 487–491
- Galli C., Meucci O., Scorziello A., Werge T. M., Calissano P., Schettini G. 1995. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and

RNA synthesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15, 2: 1172–1179

Gautam P., Nair S. C., Gupta M. K., Sharma R., Polisetty R. V., Uppin M. S., Sundaram C., Puligopu A. K., Ankathi P., Purohit A. K., Chandak G. R., Harsha H. C., Sirdeshmukh R. 2012. Proteins with altered levels in plasma from glioblastoma patients as revealed by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis. *PloS one*, 7, 9: e46153, doi: 10.1371/journal.pone.0046153: 11 str.

Gollapalli K., Ray S., Srivastava R., Renu D., Singh P., Dhali S., Bajpai Dikshit J., Srikanth R., Moiyadi A., Srivastava S. 2012. Investigation of serum proteome alterations in human glioblastoma multiforme. *Proteomics*, 12, 14: 2378–2390

Goodenberger M. L., Jenkins R. B. 2012. Genetics of adult glioma. *Cancer genetics*, 205, 12: 613–621

Gopinath S., Alapati K., Malla R. R., Gondi C. S., Mohanam S., Dinh D. H., Rao J. S. 2011. Mechanism of p27 upregulation induced by downregulation of cathepsin B and uPAR in glioma. *Molecular oncology*, 5, 5: 426–437

Gopinath S., Malla R. R., Gondi C. S., Alapati K., Fassett D., Klopfenstein J. D., Dinh D. H., Gujrati M., Rao J. S. 2010. Co-depletion of cathepsin B and uPAR induces G0/G1 arrest in glioma via FOXO3a mediated p27 upregulation. *PloS one*, 5, 7: e11668, doi: 10.1371/journal.pone.0011668: 12 str.

Graner M. W., Alzate O., Dechkovskaia A. M., Keene J. D., Sampson J. H., Mitchell D. A., Bigner D. D. 2009. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23, 5: 1541–1557

Gruden K., Hren M., Herman A., Blejec A., Albrecht T., Selbig J., Bauer C., Schuchardt J., Or-Guil M., Zupančič K., Svajger U., Stabuc B., Ihan A., Kopitar A. N., Ravnikar M., Knežević M., Rožman P., Jeras M. 2012. A “crossomics” study analysing variability of different components in peripheral blood of healthy caucasoid individuals. *PloS one*, 7, 1: e28761, doi: 10.1371/journal.pone.0028761: 12 str.

Guo Y., Sklar G. N., Borkowski A., Kyprianou N. 1997. Loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) protein in human prostate cancer correlates with tumor grade. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3, 12: 2269–2274

Gupta M. K., Polisetty R. V., Ramamoorthy K., Tiwary S., Kaur N., Uppin M. S., Shiras a, Sirdeshmukh R. 2013. Secretome analysis of Glioblastoma cell line - HNGC-2. *Mol Biosyst*, 9, 6: 1390–1400

Gwinner W. 2007. Renal transplant rejection markers. *World journal of urology*, 25, 5: 445–455

- Haapa-Paananen S., Kiviluoto S., Waltari M., Puputti M., Mpindi J. P., Kohonen P., Tynnin O., Haapasalo H., Joensuu H., Perälä M., Kallioniemi O. 2012. HES6 gene is selectively overexpressed in glioma and represents an important transcriptional regulator of glioma proliferation. *Oncogene*, 31, 10: 1299–1310
- Hamelinck D., Zhou H., Li L., Verweij C., Dillon D., Feng Z., Costa J., Haab B. B. 2005. Optimized normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling. *Molecular cellular proteomics*, 4, 6: 773–784
- Härtel C., Bein G., Müller-Steinhardt M., Klüter H. 2001. Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. *Journal of immunological methods*, 249, 1-2: 63–71
- Hong X., Miller C., Savant-Bhonsale S., Kalkanis S. N. 2009. Antitumor treatment using interleukin- 12-secreting marrow stromal cells in an invasive glioma model. *Neurosurgery*, 64, 6: 1139–1147
- Hren M., Ravnikar M., Brzin J., Ermacora P., Carraro L., Bianco P. a., Casati P., Borgo M., Angelini E., Rotter a., Gruden K. 2009. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathology*, 58, 1: 170–180
- Huang D. W., Sherman B. T., Lempicki R. A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4, 1: 44–57
- Huang P., Rani M. R. S., Ahluwalia M. S., Bae E., Prayson R. A., Weil R. J., Nowacki A. S., Hedayat H., Sloan A. E., Lathia J. D., Rich J. N., Tipps R., Gladson C. L. 2012. Endothelial expression of TNF receptor-1 generates a proapoptotic signal inhibited by integrin $\alpha 6\beta 1$ in glioblastoma. *Cancer research*, 72, 6: 1428–1437
- Huang Z., Cheng L., Guryanova O. A., Wu Q., Bao S. 2010. Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein in cell*, 1, 7: 638–655
- Huzarewich R. L. C. H., Siemens C. G., Booth S. A. 2010. Application of “omics” to prion biomarker discovery. *Journal of biomedicine in biotechnology*, 2010: doi: 10.1155/2010/613504: 15 str.
- Jiang Z., Michal J. J., Tobey D. J., Wang Z., Macneil M. D., Magnuson N. S. 2008. Comparative understanding of UTS2 and UTS2R genes for their involvement in type 2 diabetes mellitus. *International journal of biological sciences*, 4, 2: 96–102
- Kalinina J., Peng J., Ritchie J. C., Meir E. G. Van 2011. Proteomics of gliomas: initial biomarker discovery and evolution of technology. *Neuro-oncology*, 13, 9: 926–942

- Karnoub A. E., Dash A. B., Vo A. P., Sullivan A., Brooks M. W., Bell G. W., Richardson A. L., Polyak K., Tubo R., Weinberg R. A. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449, 7162: 557–563
- Keshishian H., Addona T., Burgess M., Mani D. R., Shi X., Kuhn E., Sabatine M. S., Gerszten R. E., Carr S. A. 2009. Quantification of cardiovascular biomarkers in patient plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Molecular cellular proteomics*, 8, 10: 2339–2349
- Khakoo A. Y., Pati S., Anderson S. A., Reid W., Elshal M. F., Rovira I. I., Nguyen A. T., Malide D., Combs C. A., Hall G., Zhang J., Raffeld M., Rogers T. B., Stetler-Stevenson W., Frank J. A., Reitz M., Finkel T. 2006. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The Journal of experimental medicine*, 203, 5: 1235–1247
- Kibel A. S., Suarez B. K., Belani J., Oh J., Webster R., Brophy-Ebbers M., Guo C., Catalona W. J., Picus J., Goodfellow P. J. 2003. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer research*, 63, 9: 2033–2036
- Kraus J. A., Felsberg J., Tonn J. C., Reifenberger G., Pietsch T. 2002. Molecular genetic analysis of the TP53, PTEN, CDKN2A, EGFR, CDK4 and MDM2 tumour-associated genes in supratentorial primitive neuroectodermal tumours and glioblastomas of childhood. *Neuropathology and applied neurobiology*, 28, 4: 325–333
- Lah T. T., Durán Alonso M. B., Noorden C. J. F. Van 2006. Antiprotease therapy in cancer: hot or not? *Expert opinion on biological therapy*, 6, 3: 257–279
- Lim D. A., Cha S., Mayo M. C., Chen M.-H., Keles E., VandenBerg S., Berger M. S. 2007. Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. *Neuro-oncology*, 9, 4: 424–429
- Lin V. T. G., Lin V. Y., Lai Y.-J., Chen C.-S., Liu K., Lin W.-C., Lin F.-T. 2013. TRIP6 regulates p27 KIP1 to promote tumorigenesis. *Molecular and cellular biology*, 33, 7: 1394–1409
- Linton P. J., Dorshkind K. 2004. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature immunology*, 5, 2: 133–139
- Liu S., Yin F., Fan W., Wang S., Guo X., Zhang J., Tian Z., Fan M. 2012. Over-expression of BMPR-IB reduces the malignancy of glioblastoma cells by upregulation of p21 and p27kip1. *Journal of experimental and clinical cancer research*, 31, 52: doi: 10.1186/1756-9966-31-52: 11 str.
- Liu T., Qian W.-J., Mottaz H. M., Gritsenko M. A., Norbeck A. D., Moore R. J., Purvine S. O., Camp D. G., Smith R. D. 2006. Evaluation of multiprotein immunoaffinity

- subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Molecular in cellular proteomics*: 5, 11: 2167–2174
- Liu X., Leung S., Wang C., Tan Z., Wang J., Guo T. B., Fang L., Zhao Y., Wan B., Qin X., Lu L., Li R., Pan H., Song M., Liu A., Hong J., Lu H., Zhang J. Z. 2010. Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. *Nature medicine*, 16, 2: 191–197
- Liu X., Valentine S. J., Plasencia M. D., Trimpin S., Naylor S., Clemmer D. E. 2007. Mapping the human plasma proteome by SCX-LC-IMS-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18, 7: 1249–1264
- Liu Z., Zhang J., Wu L., Liu J., Zhang M. 2013. Overexpression of GNAO1 correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer and plays a role in gastric cancer cell proliferation and apoptosis. *International journal of molecular medicine*, 33, 3: 589–596
- Liumbruno G., D'Alessandro A., Grazzini G., Zolla L. 2010. Blood-related proteomics. *Journal of proteomics*, 73, 3: 483–507
- Louis D. N., Ohgaki H., Wiestler O. D., Cavenee W. K., Burger P. C., Jouvet A., Scheithauer B. W., Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114, 2: 97–109
- Lu K. V., Bergers G. 2013. Mechanisms of evasive resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma. *CNS oncology*, 2, 1: 49–65
- Lukaszewicz-Zajac M., Mroczko B., Kornhuber J., Lewczuk P. 2013. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in the tumors of central nervous system (CNS). *Journal of neural transmission*, 121, 5: 469–477
- MacIntyre D. A., Jiménez B., Lewintre E. J., Martín C. R., Schäfer H., Ballesteros C. G., Mayans J. R., Spraul M., García-Conde J., Pineda-Lucena A. 2010. Serum metabolome analysis by ¹H-NMR reveals differences between chronic lymphocytic leukaemia molecular subgroups. *Leukemia*, 24, 4: 788–797
- Maestroni G. J., Hertens E., Galli P. 1999. Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cellular and molecular life sciences*, 55, 4: 663–637
- Manco M., Fernandez-Real J. M., Equitani F., Vendrell J., Valera Mora M. E., Nanni G., Tondolo V., Calvani M., Ricart W., Castagneto M., Mingrone G. 2007. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92, 2: 483–490

- Marcos A., Nova E., Montero A. 2003. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *European journal of clinical nutrition*, 57, Suppl: 1, 66–69
- Mariani L., Beaudry C., McDonough W. S., Hoelzinger D. B., Demuth T., Ross K. R., Berens T., Coons S. W., Watts G., Trent J. M., Wei J. S., Giese A., Berens M. E. 2001. Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: a cDNA microarray analysis. *Journal of neuro-oncology*, 53, 2: 161–176
- Martens T., Matschke J., Müller C., Riethdorf S., Balabanov S., Westphal M., Heese O. 2013. Skeletal spread of an anaplastic astrocytoma (WHO grade III) and preservation of histopathological properties within metastases. *Clinical neurology and neurosurgery*, 115, 3: 323–328
- Martí A., Marcos A., Martínez J. A. 2001. Obesity and immune function relationships. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 2, 2: 131–140
- McCombe P. A., Greer J. M., Mackay I. R. 2009. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Current molecular medicine*, 9, 9: 1058–1079
- Meir E. G. Van, Hadjipanayis C. G., Norden A. D., Shu H.-K., Wen P. Y., Olson J. J. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60, 3: 166–193
- Michaud A., Dardari R., Charrier E., Cordeiro P., Herblot S., Duval M. 2010. IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells. *Journal of immunotherapy*, 33, 4: 382–390
- Mineo J.-F., Bordron A., Baroncini M., Ramirez C., Maurage C.-A., Blond S., Dam-Hieu P. 2007. Prognosis factors of survival time in patients with glioblastoma multiforme: a multivariate analysis of 340 patients. *Acta neurochirurgica*, 149, 3: 245–253
- Motaln H., Gruden K., Hren M., Schichor C., Primon M., Rotter A., Lah T. T. 2012. Human mesenchymal stem cells exploit the immune response mediating chemokines to impact the phenotype of glioblastoma. *Cell transplantation*, 21, 7: 1529–1545
- Nabika S., Kiya K., Satoh H., Mizoue T., Kondo H., Katagiri M., Nishisaka T., Sugiyama K., Kurisu K. 2010. Prognostic significance of expression patterns of EGFR family, p21 and p27 in high-grade astrocytoma. *Hiroshima journal of medical sciences*, 59, 4: 65–70
- Nakamura K., Ito Y., Kawano Y., Kurozumi K., Kobune M., Tsuda H., Bizen A., Honmou O., Niitsu Y., Hamada H. 2004. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene therapy*, 11, 14: 1155–1164

- Nakamura K., Kodera H., Akita T., Shiina M., Kato M., Hoshino H., Terashima H., Osaka H., Nakamura S., Tohyama J., Kumada T., Furukawa T., Iwata S., Shiihara T., Kubota M., Miyatake S., Koshimizu E., Nishiyama K., Nakashima M., Tsurusaki Y., Miyake N., Hayasaka K., Ogata K., Fukuda A., Matsumoto N., Saitsu H. 2013. De Novo mutations in GNAO1, encoding a G_αo subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *American journal of human genetics*, 93, 3: 496–505
- Nedić O., Lagundžin D., Masnikosa R. 2012. Posttranslational modifications of the insulin-like growth factor-binding protein 3 in patients with type 2 diabetes mellitus assessed by affinity chromatography. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1, 904: 93–98
- Nicolou S. P., Fack F., Rajcevic U. 2010. Glioma proteomics: status and perspectives. *Journal of proteomics*, 73, 10: 1823–1838
- Nuzzo R. 2014. Scientific method: Statistical errors. *Nature*, 506, 7487: 150–152
- Ohgaki H., Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*, 170, 5: 1445–1453
- Okamoto H., Fujishima F., Nakamura Y., Zuguchi M., Ozawa Y., Takahashi Y., Miyata G., Kamei T., Nakano T., Taniyama Y., Teshima J., Watanabe M., Sato A., Ohuchi N., Sasano H. 2013. Significance of CD133 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *World journal of surgical oncology*, 1151
- Ooi Y. C., Tran P., Ung N., Thill K., Trang A., Fong B. M., Nagasawa D. T., Lim M., Yang I. 2014. The role of regulatory T-cells in glioma immunology. *Clinical neurology and neurosurgery*, 119: 125–132
- Otsu K., Das S., Houser S. D., Quadri S. K., Bhattacharya S., Bhattacharya J. 2009. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood*, 113, 18: 4197–205
- Palmer C., Diehn M., Alizadeh A. A., Brown P. O. 2006. Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC genomics*, 7, 115: doi: 10.1186/1471-2164-7-115: 15 str.
- Pei X., Zhang J., Wu L., Lü B., Zhang X., Yang D., Liu J. 2013. The down-regulation of GNAO1 and its promoting role in hepatocellular carcinoma. *Bioscience reports*, 33, 5: e00069, Pei X., Zhang J., Wu L., Lü B., Zhang X., Yang D., Liu J. 2013. The down-regulation of GNAO1 and its promoting role in hepatocellular carcinoma. *Bioscience reports*, 33, 5: e00069, doi: 10.1042/BSR20130001: 6 str.
- Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29, 9: e45, doi: 10.1093/nar/29.9.e45: 6 str.

- Polaskova V., Kapur A., Khan A., Molloy M. P., Baker M. S. 2010. High-abundance protein depletion: comparison of methods for human plasma biomarker discovery. *Electrophoresis*, 31, 3: 471–482
- Pulkkanen K. J., Yla-Herttula S. 2005. Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 12, 4: 585–598
- Radich J. P., Mao M., Stepaniants S., Biery M., Castle J., Ward T., Schimmack G., Kobayashi S., Carleton M., Lampe J., Linsley P. S. 2004. Individual-specific variation of gene expression in peripheral blood leukocytes. *Genomics*, 83, 6: 980–988
- Rak J., Filmus J., Kerbel R. S. 1996. Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the “angiogenesis progression” hypothesis. *European journal of cancer*, 32A, 14: 2438–2450
- Rao J. S. 2003. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature reviews. Cancer*, 3, 7: 489–501
- Ritchie S. A., Ahiahonu P. W. K., Jayasinghe D., Heath D., Liu J., Lu Y., Jin W., Kavianpour A., Yamazaki Y., Khan A. M., Hossain M., Su-Myat K. K., Wood P. L., Krenitsky K., Takemasa I., Miyake M., Sekimoto M., Monden M., Matsubara H., Nomura F., Goodenowe D. B. 2010. Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients: implications for early screening and detection. *BMC medicine*, 15, 8: doi: 10.1186/1741-7015-8-13: 20 str.
- Saeed A. I., Bhagabati N. K., Braisted J. C., Liang W., Sharov V., Howe E. A., Li J., Thiagarajan M., White J. A., Quackenbush J. 2006. TM4 microarray software suite. *Methods in enzymology*, 411: 134–193
- Saeed A. I., Sharov V., White J., Li J., Liang W., Bhagabati N., Braisted J., Klapa M., Currier T., Thiagarajan M., Storn A., Snuffin M., Rezantsev A., Popov D., Ryltsov A., Kostukovich E., Borisovsky I., Liu Z., Vinsavich A., Trush V., Quackenbush J. 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*, 34, 2: 374–378
- Saigusa K., Hashimoto N., Tsuda H., Yokoi S., Maruno M., Yoshimine T., Aoyagi M., Ohno K., Imoto I., Inazawa J. 2005. Overexpressed Skp2 within 5p amplification detected by array-based comparative genomic hybridization is associated with poor prognosis of glioblastomas. *Cancer science*, 96, 10: 676–683
- Sato Y., Honda Y., Asoh T., Oizumi K., Ohshima Y., Honda E. 1998. Cerebrospinal fluid ferritin in glioblastoma: evidence for tumor synthesis. *Journal of neuro-oncology*, 40, 1: 47–50

- Schneider S. W., Ludwig T., Tatenhorst L., Braune S., Oberleithner H., Senner V., Paulus W. 2004. Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta neuropathologica*, 107, 3: 272–276
- Screaton R. A., Kiessling S., Sansom O. J., Millar C. B., Maddison K., Bird A., Clarke A. R., Frisch S. M. 2003. Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4: a potential link between genome surveillance and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9: 5211–5216
- See W. L., Heinberg A. R., Holland E. C., Resh M. D. 2010. p27 deficiency is associated with migration defects in PDGF-expressing gliomas in vivo. *Cell cycle*, 9, 8: 1562–1567
- See W. L., Miller J. P., Squatrito M., Holland E., Resh M. D., Koff A. 2010. Defective DNA double-strand break repair underlies enhanced tumorigenesis and chromosomal instability in p27-deficient mice with growth factor-induced oligodendrogiomas. *Oncogene*, 29, 12: 1720–1731
- Shao H., Chung J., Balaj L., Charest A., Bigner D. D., Carter B. S., Hochberg F. H., Breakefield X. O., Weissleder R., Lee H. 2012. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nature medicine*, 18, 12: 1835–1840
- Shen A., Wang Y., Zhao Y., Zou L., Sun L., Cheng C. 2009. Expression of CRM1 in human gliomas and its significance in p27 expression and clinical prognosis. *Neurosurgery*, 65, 1: 153–160
- Skog J., Würdinger T., Rijn S. van, Meijer D. H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W. T., Carter B. S., Krichevsky A. M., Breakefield X. O. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10, 12: 1470–1476
- Smyth G. K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 3, 1: 1544-6115
- Somasundaram K., Nijaguna M. B., Kumar D. M. 2009. Serum proteomics of glioma: methods and applications. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9, 7: 695–707
- Sonoda Y., Kumabe T., Watanabe M., Nakazato Y., Inoue T., Kanamori M., Tominaga T. 2009. Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. *Acta neurochirurgica*, 151, 11: 1349–1358
- Sörberg M., Nyrén O., Granström M. 2003. Unexpected decrease with age of Helicobacter pylori seroprevalence among Swedish blood donors. *Journal of clinical microbiology*, 41, 9: 4038–4042

Strojnik T., Kavalar R., Trinkaus M., Lah T. T. 2005. Cathepsin L in glioma progression: comparison with cathepsin B. *Cancer detection and prevention*, 29, 5: 448–455

Sturm D., Witt H., Hovestadt V., Khuong-Quang D.-A., Jones D. T. W., Konermann C., Pfaff E., Tönjes M., Sill M., Bender S., Kool M., Zapata M., Becker N., Zucknick M., Hielscher T., Liu X.-Y., Fontebasso A. M., Ryzhova M., Albrecht S., Jacob K., Wolter M., Ebinger M., Schuhmann M. U., Meter T. van, Frühwald M. C., Hauch H., Pekrun A., Radlwimmer B., Niehues T., Komorowski G. von, Dürken M., Kulozik A. E., Madden J., Donson A., Foreman N. K., Drissi R., Fouladi M., Scheurlen W., Deimling A. von, Monoranu C., Roggendorf W., Herold-Mende C., Unterberg A., Kramm C. M., Felsberg J., Hartmann C., Wiestler B., Wick W., Milde T., Witt O., Lindroth A. M., Schwartzenbacher J., Faury D., Fleming A., Zakrzewska M., Liberski P. P., Zakrzewski K., Hauser P., Garami M., Klekner A., Bognar L., Morrissey S., Cavalli F., Taylor M. D., Sluis P. van, Koster J., Versteeg R., Volckmann R., Mikkelsen T., Aldape K., Reifenberger G., Collins V. P., Majewski J., Korshunov A., Lichter P., Plass C., Jabado N., Pfister S. M. 2012. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer cell*, 22, 4: 425–437

Su A. I., Wiltshire T., Batalov S., Lapp H., Ching K. A., Block D., Zhang J., Soden R., Hayakawa M., Kreiman G., Cooke M. P., Walker J. R., Hogenesch J. B. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 16: 6062–6067

Suarez C., Maglietti F., Colonna M., Breitburd K., Marshall G. 2012. Mathematical modeling of human glioma growth based on brain topological structures: study of two clinical cases. *PloS one*, 7, 6: e39616, doi: 10.1371/journal.pone.0039616: 11 str.

Takahashi S., Miura N., Harada T., Wang Z., Wang X., Tsubokura H., Oshima Y., Hasegawa J., Inagaki Y., Shiota G. 2010. Prognostic impact of clinical course-specific mRNA expression profiles in the serum of perioperative patients with esophageal cancer in the ICU: a case control study. *Journal of translational medicine*, 8, 103: doi: 10.1186/1479-5876-8-103: 11 str.

Takano S., Yoshii Y., Kondo S., Suzuki H., Maruno T., Shirai S., Nose T. 1996. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer research*, 56, 9: 2185–2190

Tang Y., Dai Y., Grant S., Dent P. 2012. Enhancing CHK1 inhibitor lethality in glioblastoma. *Cancer biology in therapy*, 13, 6: 379–388

Tanner M. A., Berk L. S., Felten D. L., Blidy A. D., Bit S. L., Ruff D. W. 2002. Substantial changes in gene expression level due to the storage temperature and storage duration of human whole blood. *Clinical and laboratory haematology*, 24, 6: 337–341

- Tu C., Rudnick P. A., Martinez M. Y., Cheek K. L., Stein S. E., Slebos R. J. C., Liebler D. C. 2010. Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *Journal of proteome research*, 9, 10: 4982–4991
- Valerie N. C. K., Dziegielewska B., Hosing A. S., Augustin E., Gray L. S., Brautigan D. L., Larner J. M., Dziegielewski J. 2013. Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochemical pharmacology*, 85, 7: 888–897
- Vandesompele J., Preter K. De, Pattyn F., Poppe B., Roy N. Van, Paepe A. De, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034: 12 str.
- Verhoeff J. J. C., Tellingen O. van, Claes A., Stalpers L. J. A., Linde M. E. van, Richel D. J., Leenders W. P. J., Furth W. R. van 2009. Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. *BMC cancer*, 9, 444: doi: 10.1186/1471-2407-9-444: 9 str.
- Wang D., He F., Zhang L., Zhang F., Wang Q., Qian X., Pan X., Meng J., Peng C., Shen A., Chen J. 2011. The role of p27(Kip1) phosphorylation at serine 10 in the migration of malignant glioma cells in vitro. *Neoplasma*, 58, 1: 65–73
- Wang S., Raven J. F., Koromilas A. E. 2010. STAT1 represses Skp2 gene transcription to promote p27Kip1 stabilization in Ras-transformed cells. *Molecular cancer research : MCR*, 8, 5: 798–805
- Wang Z., Sun Z., Li A. V., Yarema K. J. 2006. Roles for UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc 6-kinase outside of sialic acid biosynthesis: modulation of sialyltransferase and BiP expression, GM3 and GD3 biosynthesis, proliferation, and apoptosis, and ERK1/2 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 281, 37: 27016–27028
- Whitney A. R., Diehn M., Popper S. J., Alizadeh A. A., Boldrick J. C., Relman D. A., Brown P. O. 2003. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 4: 1896–1901
- Wu M., Huang C., Li X., Li X., Gan K., Chen Q., Tang Y., Tang K., Shen S., Li G. 2008. LRRC4 inhibits glioblastoma cell proliferation, migration, and angiogenesis by downregulating pleiotropic cytokine expression and responses. *Journal of cellular physiology*, 214, 1: 65–74
- Xiao Z., Prieto D., Conrads T. P., Veenstra T. D., Issaq H. J. 2005. Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 230, 1-2: 95–106

- Xu T., Shu C.-T., Purdom E., Dang D., Ilsley D., Guo Y., Weber J., Holmes S. P., Lee P. P. 2004. Microarray analysis reveals differences in gene expression of circulating CD8(+) T cells in melanoma patients and healthy donors. *Cancer research*, 64, 10: 3661–3667
- Yan J., Greer J. M., Hull R., O'Sullivan J. D., Henderson R. D., Read S. J., McCombe P. A. 2010. The effect of ageing on human lymphocyte subsets: comparison of males and females. *Immunity in ageing*, 7, 4: doi: 10.1186/1742-4933-7-4: 10 str.
- Yu Z., Kastenmüller G., He Y., Belcredi P., Möller G., Prehn C., Mendes J., Wahl S., Roemisch-Margl W., Ceglarek U., Polonikov A., Dahmen N., Prokisch H., Xie L., Li Y., Wichmann H.-E., Peters A., Kronenberg F., Suhre K., Adamski J., Illig T., Wang-Sattler R. 2011. Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PloS one*, 6, 7: e21230, doi: 10.1371/journal.pone.0021230: 6 str.
- Zhang C., Wang G., Kang C., Du Y., Pu P. 2009. [Up-regulation of p27(kip1) by miR-221/222 antisense oligonucleotides enhances the radiosensitivity of U251 glioblastoma]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*, 26, 6: 634–638
- Zhu W., Xu W., Jiang R., Qian H., Chen M., Hu J., Cao W., Han C., Chen Y. 2006. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Experimental and molecular pathology*, 80, 3: 267–274

ZAHVALA

V prvi vrsti gre zahvala mentoricama prof. dr. Kristini Gruden in dr. Minki Kovač ter prof. dr. Heleni Motaln za ki so s svojim znanjem in izkušnjami dodale ključen doprinos pri izvedbi eksperimentalnega dela, pri pripravi znanstvenih člankov ter pri pripravi te disertacije. Hkrati se vam zahvaljujem za vodstvo skozi svet znanosti ter za močne živce, ki ste jih včasih potrebovale.

Zahvalil bi se tudi prof. dr. Simonu Horvatu in prof. dr. Radovanu Komelu za hitro odzivnost pri popravljanju dela in za zelo konstruktivne in podrobne popravke.

Zahvala gre tudi prof. dr. Maji Ravnikar ter prof. dr. Tamari Lah Turnšek, ki sta mi omogočili delo na Nacionalnem inštitutu za biologijo ter da sta si kljub zasedenosti vzeli čas za moje težave in se zavzeli za moje delo. Hvala tudi mentorju za diplomo doc. dr. Miomirju Kneževiću, ki me je spoznal z zaposlenimi iz Nacionalnega inštituta za biologijo in me priporočil za delo.

Posebej bi se rad zahvalil tudi vsem, ki ste mi pomagali pri sami izvedbi raziskovalnega dela, in sicer:

- Petri Konečnik in dr. Mojca Jež za pripravo vzorcev,
- Andreju Porčniku dr. med. in prof. dr. Marjanu Koršiču dr. med. za vestno zbiranje vzorcev pacientov ter angažma pri raziskavi,
- Živi Ramšak ter dr. Ani Rotter za pomoč pri obdelavi podaktov,
- prof. dr. Andreju Blejcu za pomoč in za njegovo delo pri vse statističnih problemih ter težavah v R-ju.

Obenem bi se rad zahvalil vsem sodelavcem na Nacionalnem inštitutu za biologijo, predvsem iz Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo ter Oddelka za biologijo raka za super vzdušje in za pomoč pri mojem delu. Predvsem bi izpostavil punce iz skupnih služb za pomoč pri naročanju reagentov ter pri ostalih birokratskih obveznostih.

Rad bi se zahvalil tudi vsem v podjetju Omega d.o.o., predvsem dr. Minki Kovač in Antonu Kovaču, ki so mi omogočili prijavo na razpis mladih raziskovalcev iz gospodarstva, zaposlitev v podjetju ter dobre delovne pogoje. Zahvalil bi se tudi Gregorju Kovaču, ki mi je pomagal pri vseh poročanjih v okviru razpisa.

Zahvalil bi se zaposlenim na CFGBC, predvsem Heleni Klavžar za pomoč pri izvajanju meritev na mikromrežah.

Zahvalil bi se tudi sodelavcem na BioSistemiki d.o.o, ki so mi v zadnjih štirih letih stali ob strani in poprijeli za marsikakšno delo, da sem se jaz lahko posvečal znanosti.

Delo v okviru te disertacije je bilo financirano iz:

- evropskega projekta SYSTHER / INREMOs (Systems Biology Tools Development for Cell Therapy and Drug Development), št. pogodbe: 3211-06-000539 2006-2011,
- Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (program P1-0245)
- Javne agencije Republike Slovenije za spodbujanje podjetništva, inovativnosti, razvoja, investicij in turizma v okviru projekta mladi raziskovalci (št. pogodbe MR-09/27).

Zahvaljujem se zgoraj navedenim agencijam za podporo in financiranje naših raziskovalnih projektov.

Nazadnje bi se rad zahvalil bratu Luki Zupančiču za pregled naloge in popravke ter mami in punci za njihovo podporo in za dobro mero potrpežljivosti.

PRILOGE

Priloga 1: Primer obrazca o soglasju, uporabljenega v študiji na ZP

IZJAVA O ZAVESTNI IN SVOBODNI PRIVOLITVI BOLNIKA Z RAZLAGO ZDRAVNIKA

Podpisani(a).....,
rojen(a).....,
Stanujoč(a).....

sem bil(a) seznanjen(a) in sem razumel(a) način in namen klinične raziskave Spremljanje izražanja genov v subpopulacijah mononuklearnih celic periferne krvi pri zdravih posameznikih.

Vem, da mi bodo po začetnem pregledu tri zaporedne dni odvzeli vzorce krvi, v skupnem volumnu približno 165 ml (55 ml vsak dan).

Na navedene preiskave pristajam zato, da bi pridobili nova vedenja o izražanju genov v različnih subpopulacijah mononuklearnih celic pri zdravi populaciji, kar bo omogočilo razlago rezultatov genskih analiz pri drugih kliničnih študijah.

Razumem tudi, da bodo v delu krvi, ki mi jo bodo odvzeli ob vstopu v klinično raziskavo, izolirali genski material, to je RNA in analizirali izražanje genskega zapisa.

Tako seznanjen(a) prostovoljno pristajam na sodelovanje v raziskavi.

Pregledi in preiskave bodo potekali v skladu s stališči stroke. Moje sodelovanje je prostovoljno in ga lahko odklonim kadarkoli, tudi po predhodni privolitvi. Obvestili so me, da bodo rezultati služili napredku medicinskega znanja. Vem, da je metodologijo raziskave pregledala in odobrila državna strokovna komisija pri Ministrstvu za zdravje.

Podatke in rezultate pridobljene med raziskavo bodo uporabljali le v namen raziskave, sicer pa bodo podatki o meni in o mojem zdravju zaupne narave.

Datum: Podpis preiskovanca:

Na sodelovanje v raziskavi ne pristajam oziroma sodelovanje v raziskavi prekinjam.

Datum: Podpis preiskovanca:

Podpisani sem razumljivo razložil preiskovancu dobrobiti, tveganja in nevšečnosti sodelovanja v klinični raziskavi.

Datum: Podpis raziskovalca:

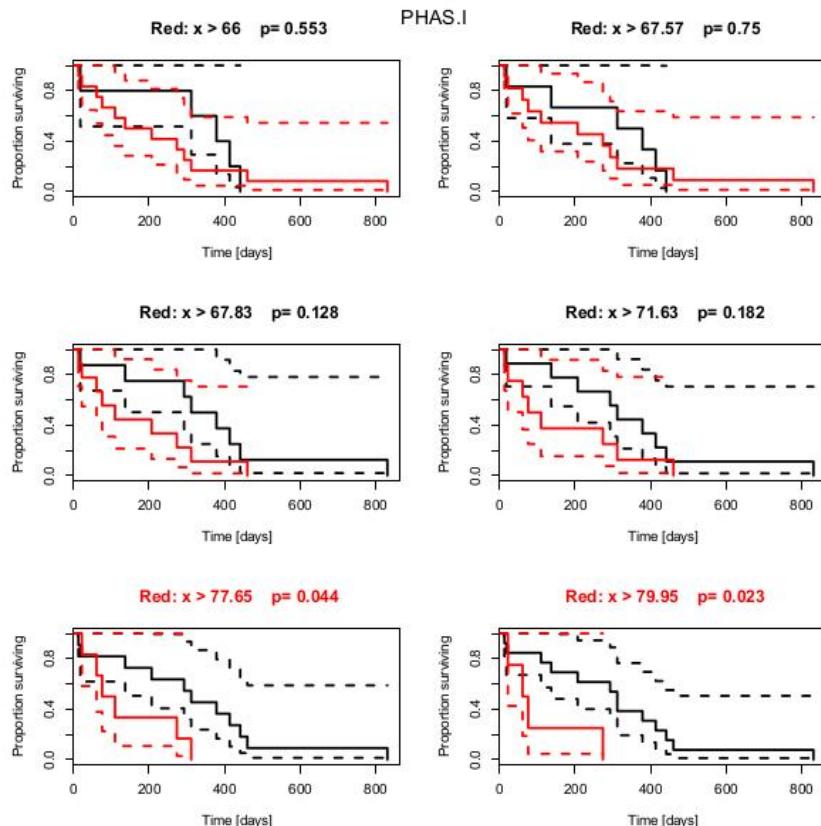
Priloga 2: Podrobnejši rezultati Kaplan-Meier analize z razdelitvami pri različnih mejnih vrednostih za 16 proteinov, povezanih s preživetjem bolnikov z GBM

PHAS.I

Analysis

```
my.cut.plot(id)

##      25%      p
## 66.000  0.553
##      35%      p
## 67.57   0.75
##      45%      p
## 67.830  0.128
##      55%      p
## 71.630  0.182
##      65%      p
## 77.650  0.044
```



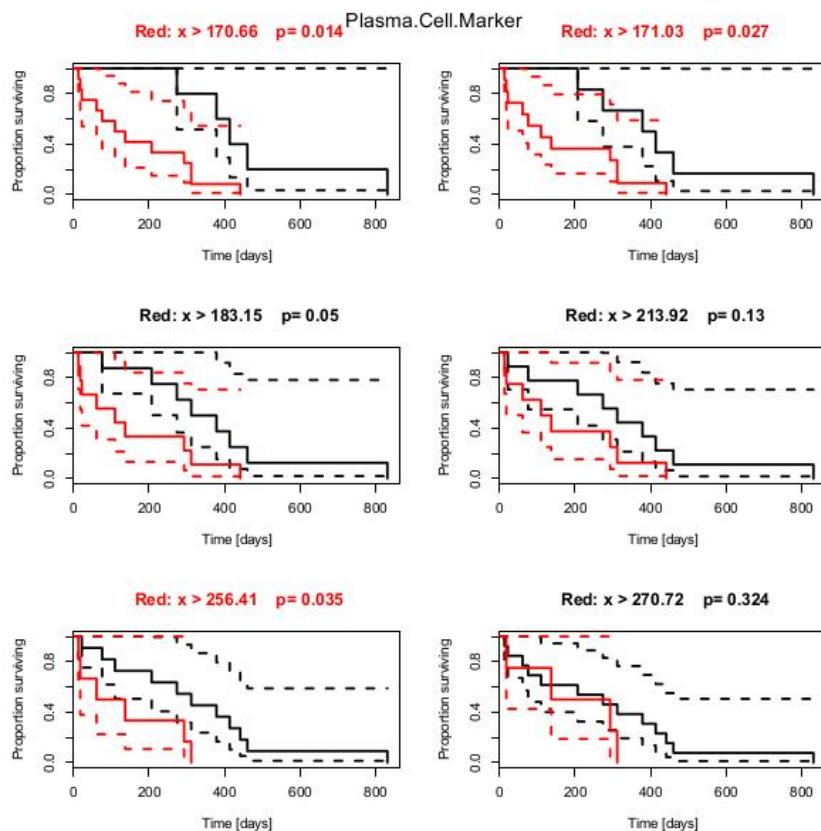
```
##      75%      p
## 79.950  0.023
```

Plasma.Cell.Marker

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##      25%      p
## 170.660  0.014
##      35%      p
## 171.030  0.027
##      45%      p
## 183.15   0.05
##      55%      p
## 213.92   0.13
##      65%      p
## 256.410  0.035
```



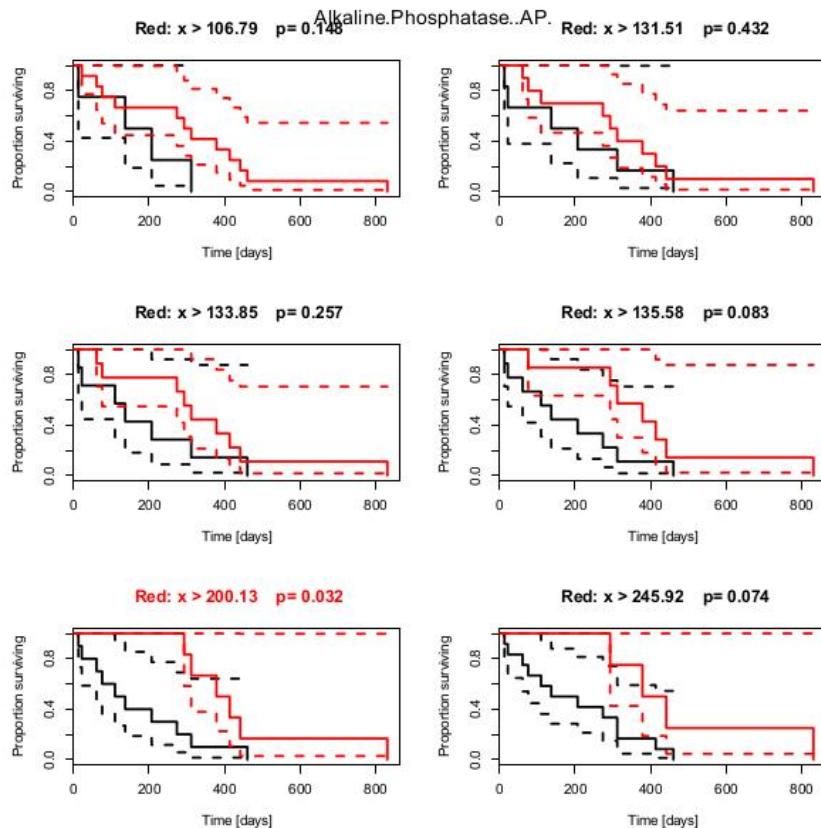
```
##      75%      p
## 270.720  0.324
```

Alkaline.Phosphatase..AP.

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##      25%      p
## 106.790  0.148
##      35%      p
## 131.510  0.432
##      45%      p
## 133.850  0.257
##      55%      p
## 135.580  0.083
##      65%      p
## 200.130  0.032
```



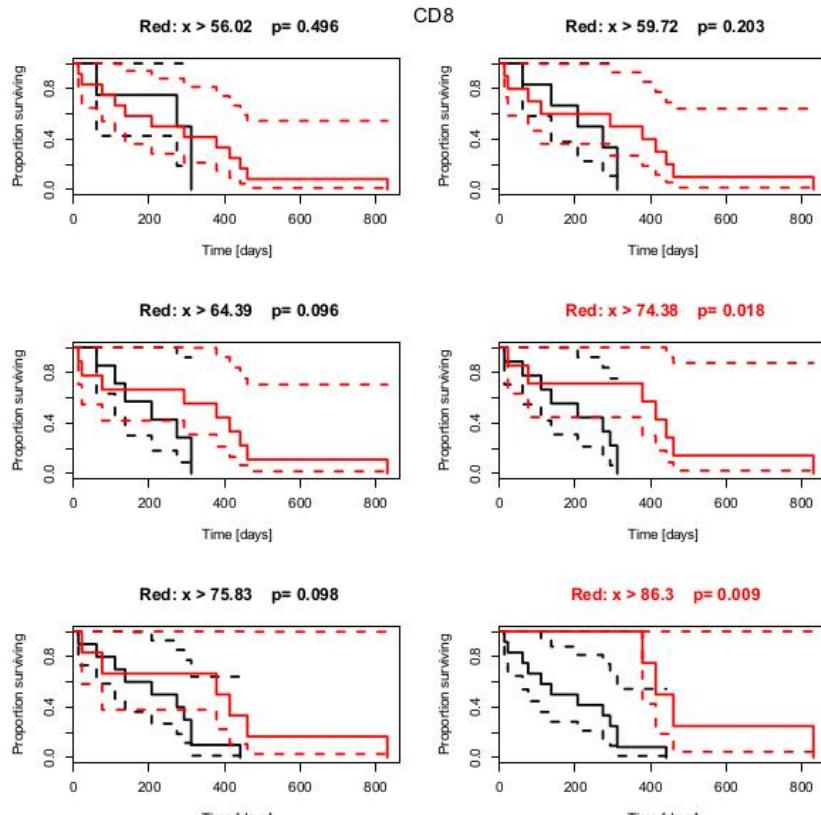
```
##      75%      p
## 245.920  0.074
```

CD8

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##    25%      p
## 56.020  0.496
##    35%      p
## 59.720  0.203
##    45%      p
## 64.390  0.096
##    55%      p
## 74.380  0.018
##    65%      p
## 75.830  0.098
```



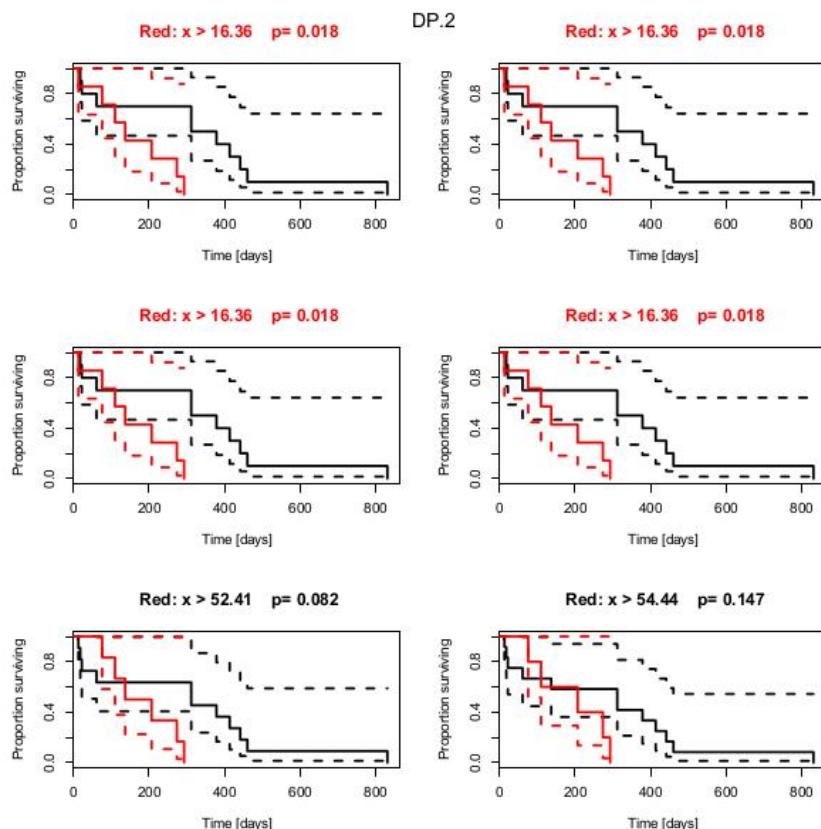
```
##    75%      p
## 86.300  0.009
```

DP.2

Analysis

```
my.cut.plot(id)

##    25%      p
## 16.360  0.018
##    35%      p
## 16.360  0.018
##    45%      p
## 16.360  0.018
##    55%      p
## 16.360  0.018
##    65%      p
## 52.410  0.082
```



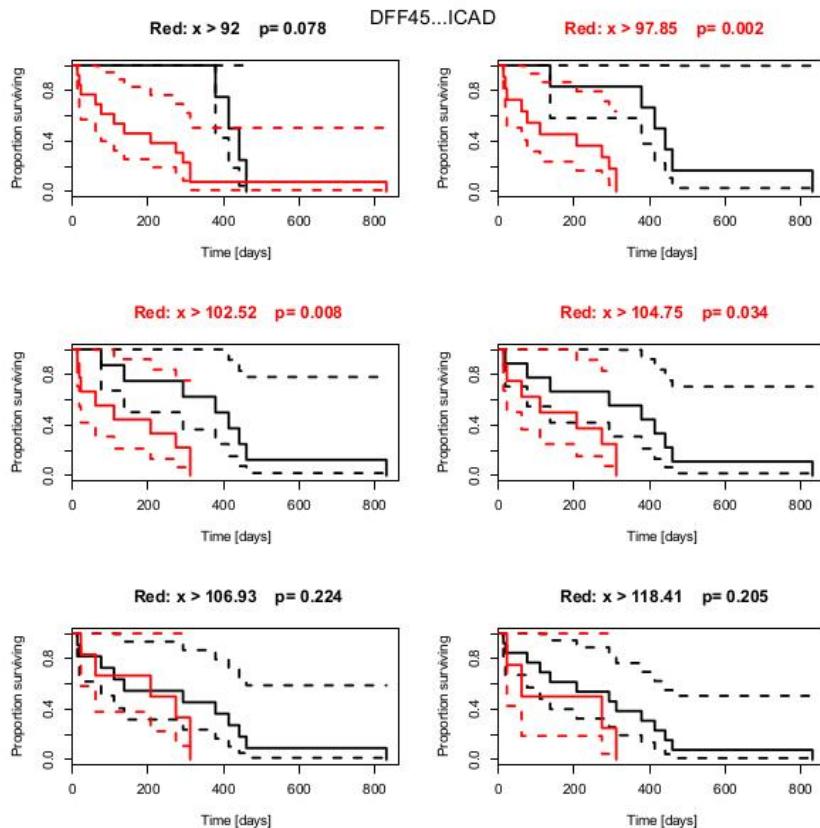
```
##    75%      p
## 54.440  0.147
```

DFF45...ICAD

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##      25%          p
## 92.000  0.078
##      35%          p
## 97.850  0.002
##      45%          p
## 102.520  0.008
##      55%          p
## 104.750  0.034
##      65%          p
## 106.930  0.224
```



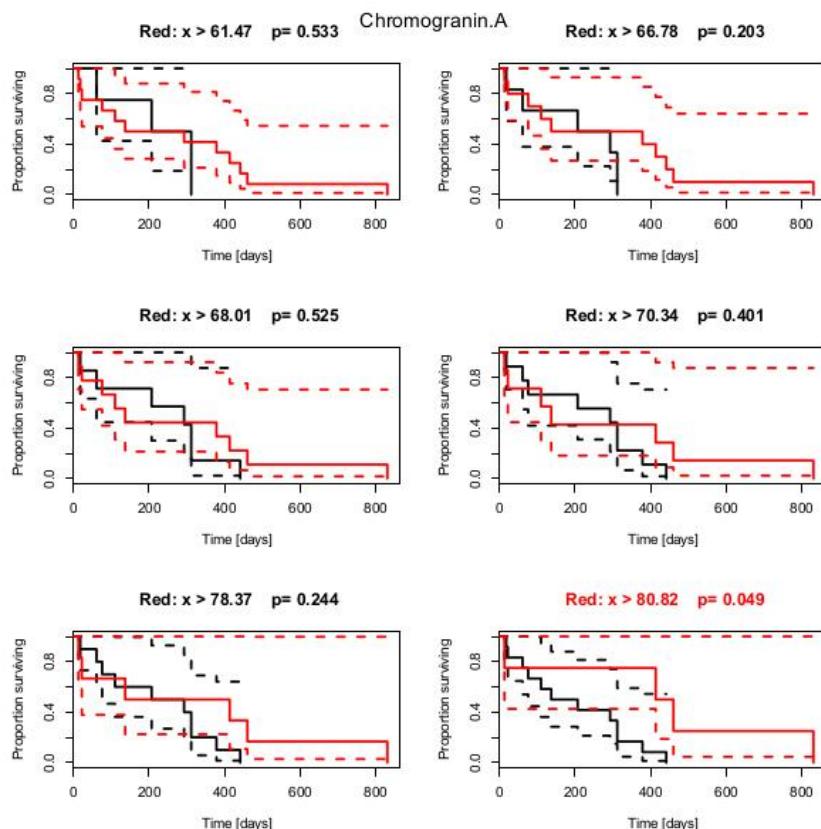
```
##      75%          p
## 118.410  0.205
```

Chromogranin.A

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##      25%      p
## 61.470  0.533
##      35%      p
## 66.780  0.203
##      45%      p
## 68.010  0.525
##      55%      p
## 70.340  0.401
##      65%      p
## 78.370  0.244
```



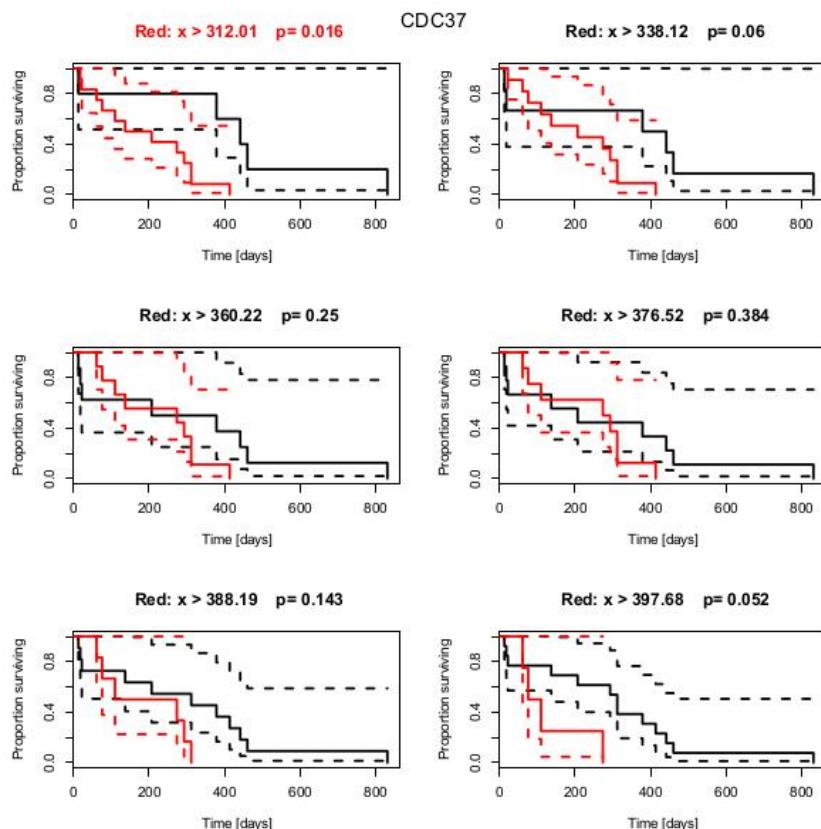
```
##      75%      p
## 80.820  0.049
```

CDC37

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##      25%      p
## 312.010  0.016
##      35%      p
## 338.12   0.06
##      45%      p
## 360.22   0.25
##      55%      p
## 376.520  0.384
##      65%      p
## 388.190  0.143
```



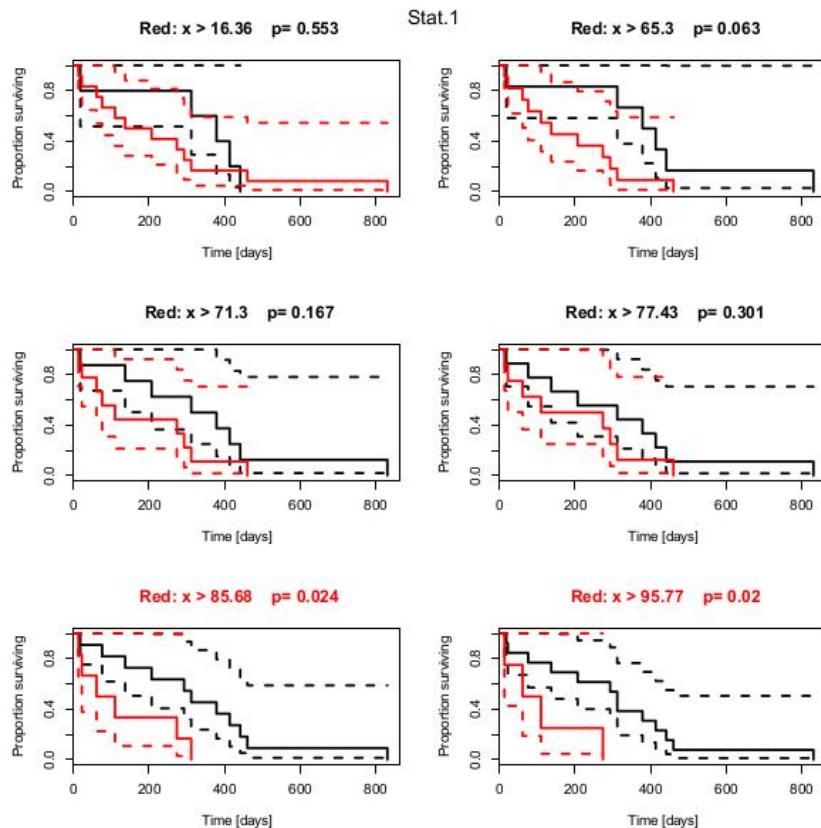
```
##      75%      p
## 397.680  0.052
```

Stat.1

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##    25%      p
## 16.360  0.553
##    35%      p
## 65.300  0.063
##    45%      p
## 71.300  0.167
##    55%      p
## 77.430  0.301
##    65%      p
## 85.680  0.024
```



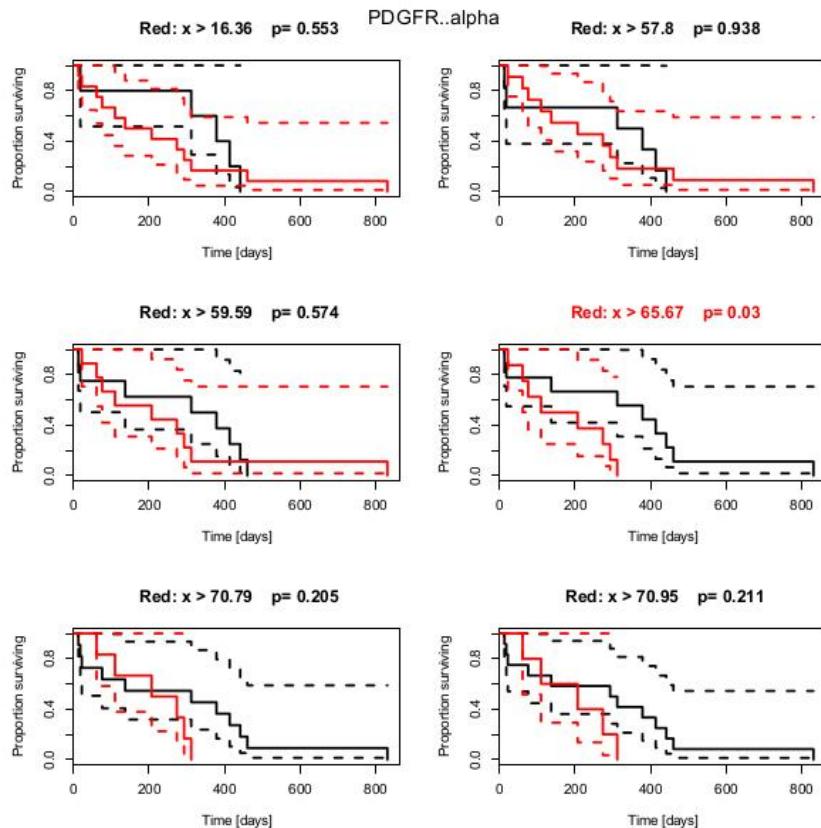
```
##    75%      p
## 95.77   0.02
```

PDGFR..alpha

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##    25%      p
## 16.360  0.553
##    35%      p
## 57.800  0.938
##    45%      p
## 59.590  0.574
##    55%      p
## 65.67   0.03
##    65%      p
## 70.790  0.205
```



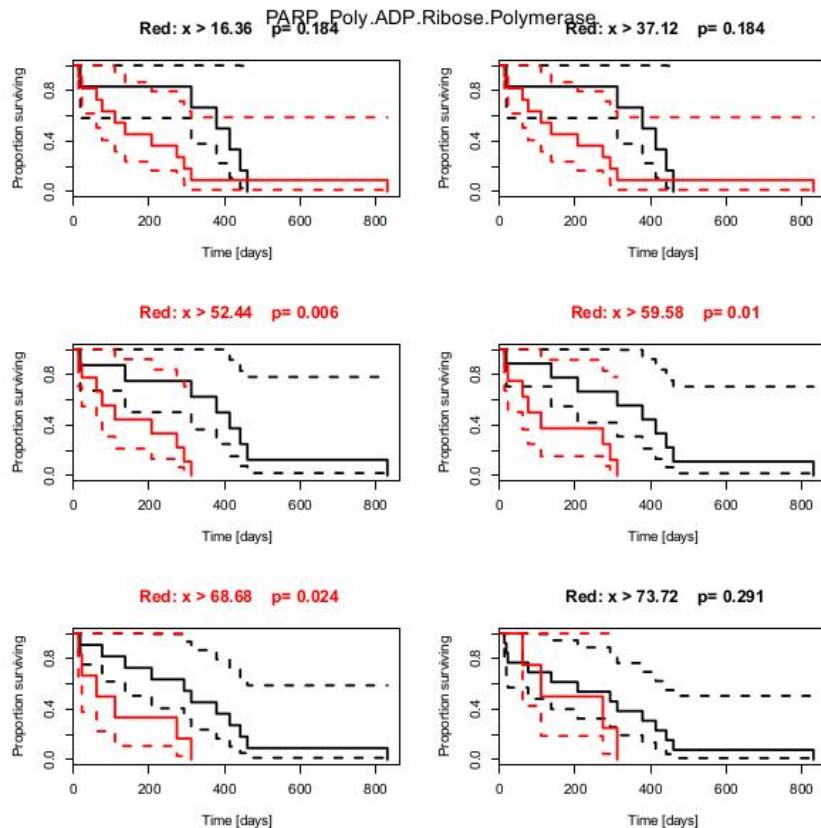
```
##    75%      p
## 70.950  0.211
```

PARP..Poly.ADP.Ribose.Polymerase.

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##    25%      p
## 16.360  0.184
##    35%      p
## 37.120  0.184
##    45%      p
## 52.440  0.006
##    55%      p
## 59.58   0.01
##    65%      p
## 68.680  0.024
```



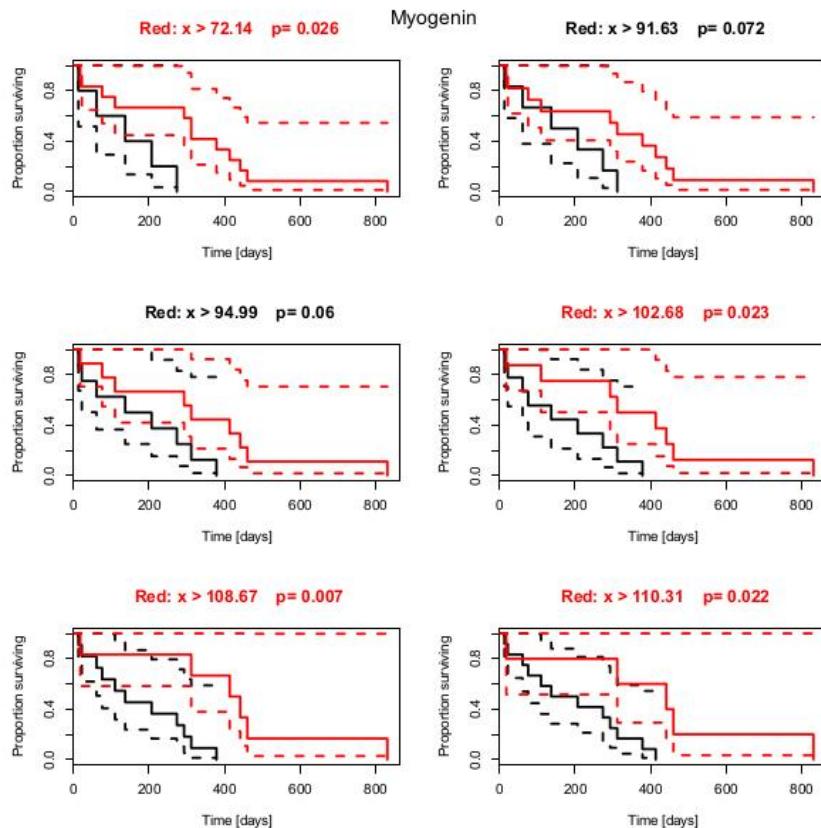
```
##    75%      p
## 73.720  0.291
```

Myogenin

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##      25%      p
## 72.140  0.026
##      35%      p
## 91.630  0.072
##      45%      p
## 94.99   0.06
##      55%      p
## 102.680 0.023
##      65%      p
## 108.670 0.007
```



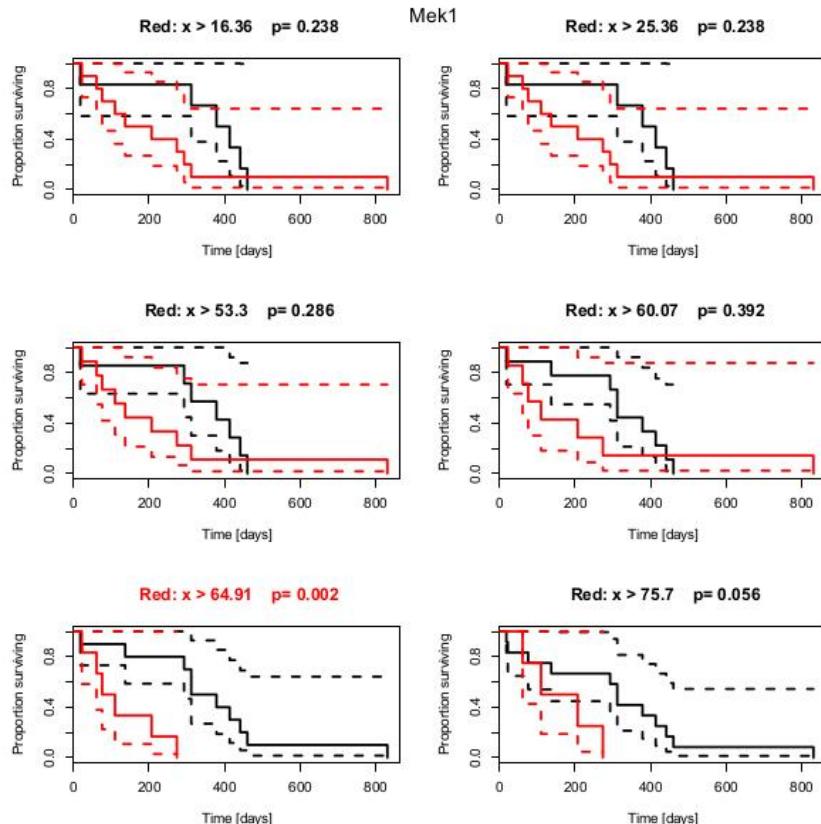
```
##      75%      p
## 110.310 0.022
```

Mek1

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##    25%      p
## 16.360  0.238
##    35%      p
## 25.360  0.238
##    45%      p
## 53.300  0.286
##    55%      p
## 60.070  0.392
##    65%      p
## 64.910  0.002
```



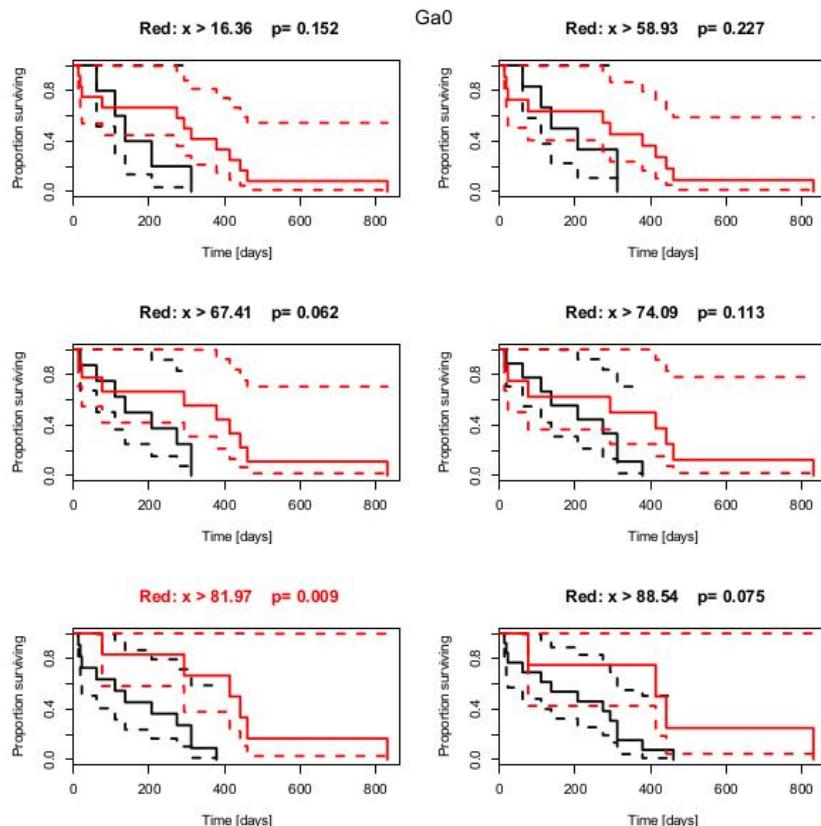
```
##    75%      p
## 75.700  0.056
```

Ga0

Analysis

```
my.cut.plot(id)
```

```
##    25%      p
## 16.360  0.152
##    35%      p
## 58.930  0.227
##    45%      p
## 67.410  0.062
##    55%      p
## 74.090  0.113
##    65%      p
## 81.970  0.009
```



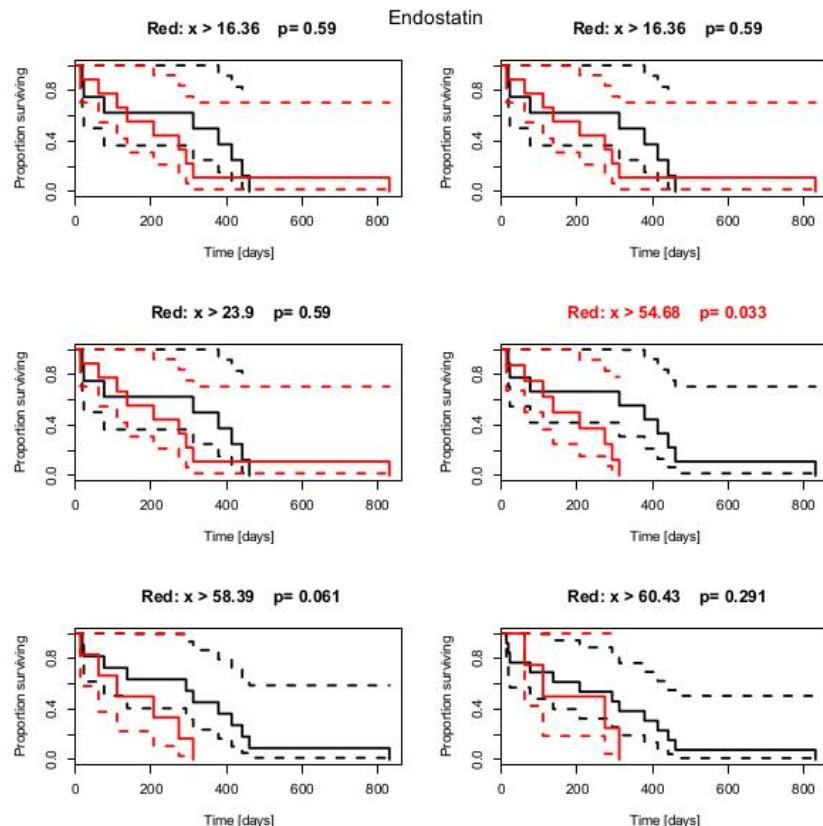
```
##    75%      p
## 88.540  0.075
```

Endostatin

Analysis

```
my.cut.plot(id)

## 25%      p
## 16.36  0.59
## 35%      p
## 16.36  0.59
## 45%      p
## 23.90  0.59
## 55%      p
## 54.680 0.033
## 65%      p
## 58.390 0.061
```



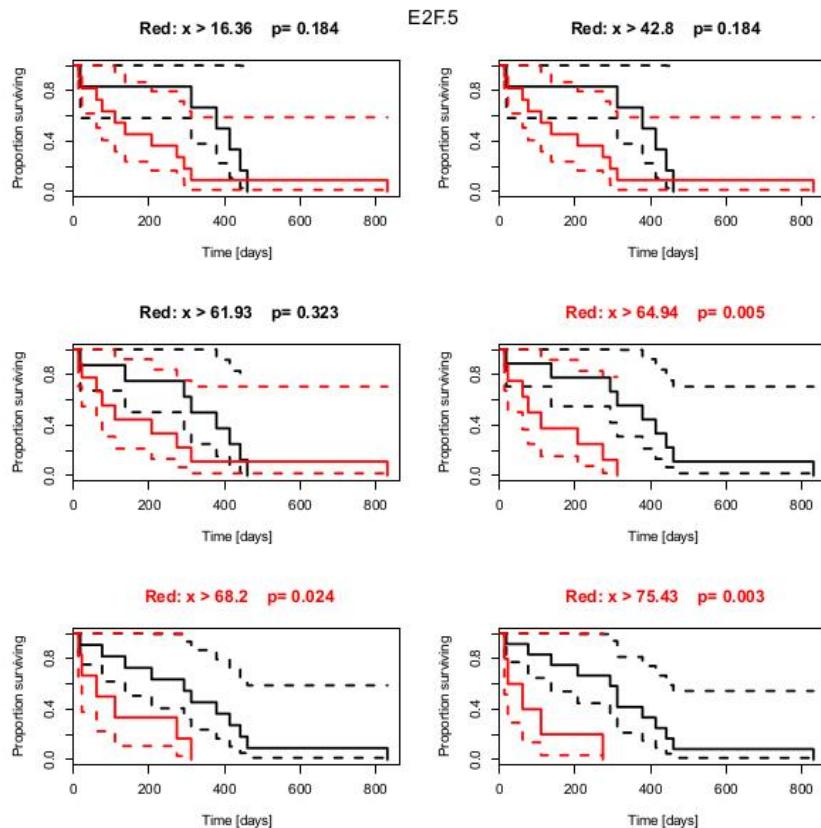
```
## 75%      p
## 60.430 0.291
```

E2F.5

Analysis

```
my.cut.plot(id)

##      25%      p
## 16.360  0.184
##      35%      p
## 42.800  0.184
##      45%      p
## 61.930  0.323
##      55%      p
## 64.940  0.005
##      65%      p
## 68.200  0.024
```



```
##      75%      p
## 75.430  0.003
```