

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva REŠEK

**PROTEOMSKA ANALIZA SEKRETOMA
MAKROFAGOV STIMULIRANIH S CITOKINI
IL-4, IL-10 IN IL-13**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva REŠEK

**PROTEOMSKA ANALIZA SEKRETOMA MAKROFAGOV
STIMULIRANIH S CITOKINI IL-4, IL-10 IN IL-13**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PROTEOMIC SECRETOME ANALYSIS OF MACROPHAGES
STIMULATED BY CITOKYNES IL-4, IL-10 AND IL-13**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2015

Rešek E. Proteomska analiza sekretoma ... s citokini IL-4, IL-10 in IL-13.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2015

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na oddelku za Biokemijo, molekularno in strukturno biologijo Instituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je potrdila temo in naslov diplomskega dela in za mentorja imenovala prof. dr. Borisa Turka, za somentorja prof. dr. Gregorja Anderluha ter za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Boris TURK

Institut Jožef Stefan, Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH

Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Član: prof. dr. Peter MAČEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 22. 6. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega 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.

Eva Rešek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 577(043.2)=163.6

KG proteomika/sekretom/makrofagi

AV REŠEK, Eva

SA TURK, Boris (mentor)/ ANDERLUH, Gregor (somentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2015

IN PROTEOMSKA ANALIZA SEKRETOMA MAKROFAGOV STIMULIRANIH S CITOKINI IL-4, IL-10 IN IL-13

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XIII, 43 str., 12 pregl., 13 sl., 1 pril., 39 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI V diplomski nalogi sem želela proteomsko analizirati sekretom človeških makrofagov in tako določiti kvalitativne in kvantitativne spremembe v njem po predhodni stimulaciji s citokini IL-4, IL-10 in IL-13. Predhodno sem makrofage stimulirala z izbranimi citokini Th2, saj sem želela preveriti, če po stimulaciji makrofagi res povečano izločajo nekatere proteaze, predvsem katepsine. S tumorji povezani makrofagi (TAM) so pomemben vir proteaz v raku in potencialni markerji za razvoj in metastaziranje tumorjev. Makrofage U-937 smo gojili v celičnem laboratoriju in jim po stimulaciji z izbranimi interlevkini odvzeli sekretom za nadaljno analizo, ki smo jo opravili na masnem spektrometru Orbitrap LTQ Velos. V naših vzorcih smo skupno identificirali 482 proteinov. Po primerjavi profila proteinov v posameznih vzorcih, smo ugotovili, da se največ identificiranih proteinov prekriva v vzorcih IL-10 in IL-13, kjer smo našli 34 enakih proteinov. Glede na profil analiziranih proteinov so si makrofagi po stimulaciji z IL-10 in IL-13 bolj podobni kot v primerjavi z IL-4. Stimulacija celic z interlevkini predvsem povzroči povišano izločanje proteinov imunskega sistema. V naših vzorcih so se pojavili trije cisteinski katepsini: katepsin C (CTSC), katepsin K (CTSK) in katepsin L (CTSL). Tako smo potrdili našo hipotezo, da je stimulacija z interlevkini povzročila izločanje katepsinov in ostalih proteaz.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn

DC UDC 577(043.2)=163.6

CX proteomics/secretome/macrophages

AU REŠEK, Eva

AA TURK, Boris (supervisor)/ ANDERLUH, Gregor (co-advisor)

PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

PY 2015

TI PROTEOMIC SECRETOME ANALYSIS OF MACROPHAGES STIMULATED BY CITOKYNES IL-4, IL-10 AND IL-13

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XIII, 43 p., 12 tab., 13. fig., 1 ann., 39 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In this diploma thesis, the proteomic analysis is used to evaluate the secretome of human macrophage cells and to determine qualitative and quantitative changes in it after stimulation with cytokines IL-4, IL-10 and IL-13. The macrophage cells were previously stimulated with selected Th2 cytokines in order to determine if the excretion of some types of proteases, in particular cathepsins, is elevated in macrophage cells after the stimulation. Tumor-associated macrophages (TAMs) are an important source of proteases in cancer and they are potential markers for the development and metastasis of tumors. The macrophages U-937 were grown in a cellular laboratory. After the stimulation with the selected interleukins, the secretome was extracted from them for further analysis, which was carried out with the mass spectrometer Orbitrap LTQ Velos. Based on the profile of the analyzed proteins, the similarity between the macrophages after the stimulation with IL-10 and IL-13 is greater than the similarity between the macrophages after the stimulation with IL-4. The cell stimulation with interleukins causes an elevated protein excretion in the immune system. In the analyzed samples, three cysteine cathepsins were found: cathepsin C (CTSC), cathepsin K (CTSK) in cathepsin L (CTSL) which confirmed the hypothesis that the stimulation with interleukins causes the excretion of cathepsins and other proteases.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO PRILOG.....	X
SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC.....	XI
1 UVOD	1
1.1 MAKROFAGI.....	1
1.1.1 Klasično in alternativno aktivirani makrofagi	2
1.1.2 Citokini	5
1.1.2.1 Interlevkin 4 (IL-4).....	5
1.1.2.2 Interlevkin 10 (IL-10).....	5
1.1.2.3 Interlevkin 13 (IL-13).....	6
1.1.3 Mikrookolje tumorja in TAM	6
1.2 PROTEAZE.....	8
1.2.1 Pomen proteaz v raku	8
1.2.1.1 Katepsini	8
1.3 MASNA SPEKTROMETRIJA V PROTEOMIKI	10
1.3.1 Sestava masnega spektrometra	10
1.3.1.1 Ionizacija z elektrosprejem	10
1.3.1.2 Masni analizator	10
1.3.1.3 Detektor	11
1.3.2 Orbitrap LTQ Velos masni spektrometer	11

2	NAMEN DELA IN HIPOTEZA	12
2.1	NAMEN DELA.....	12
2.2	HIPOTEZA.....	12
3	MATERIAL IN METODE	13
3.1	MATERIAL	13
3.1.3	Pufri in ostale delovne raztopine.....	15
3.1.4	Gojišče	16
3.1.5	Celična linija	16
3.2	METODE:	17
3.2.1	Celični laboratorij.....	17
3.2.1.1	Odmrzovanje celic U-937.....	17
3.2.1.2	Gojenje celic U-937.....	17
3.2.1.3	Štetje celic	17
3.2.1.4	Diferenciacija monocitov v makrofage	18
3.2.1.5	Regeneracija in stimulacija.....	18
3.2.1.6	Stimulacija z interlevkini.....	18
3.2.1.7	Sekretom	18
3.2.2	Predprprava sekretomov	19
3.2.2.1	Koncentriranje	19
3.2.2.2	Določanje koncentracije proteinov v vzorcu z metodo po Bradfordu.....	19
3.2.2.3	Poliakrilamidna gelska elektroforeza	19
3.2.2.4	Barvanje gelov s Coomassie brilliant blue in razbarvanje	19
3.2.3	Priprava vzorcev za analizo z masnim spektrometrom	20
3.2.3.1	Redukcija in alkilacija	20
3.2.3.2	Tripsinizacija	20

3.2.3.3	Ekstrakcija peptidov	21
3.2.3	Proteomska analiza	22
3.2.3.1	Nano-HPLC ali visokotlačna tekočinska kromatografija.....	22
3.2.3.2	Analiza na masnem spektrometru LTQ Orbitrap Velos	23
3.2.3.3	Analiza podatkov z masnega spektrometra: iskanje po bazah podatkov, obdelava in analiza podatkov s bioinformatskimi proteomskimi programi	23
4	REZULTATI.....	25
4.1	SEKRETORNI (IZVENCELIČNI) PROTEINI, S POVEČANIM IZLOČANJEM GLEDE NA POSAMEZEN INTERLEVKIN	27
4.1.1	Seznam identificiranih SEKRETORNIH proteinov s signifikantno povišanim izražanjem po stimulaciji makrofagov U-937 z interlevkini	27
4.1.2	Identificirani sekretorni proteini s signifikantno povišanim izražanjem glede na biološko funkcijo po stimulaciji celic U-937 z interlevkini IL-4, IL-10 in IL-13	31
4.2	PROTEAZE S POVIŠANIM IZLOČANJEM	33
4.2.1	Proteaze s povišanim izločanjem po stimulaciji z IL-4, IL-10 in IL-13.....	33
5.	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	35
5.1	RAZPRAVA.....	35
5.1.1	Identificirane proteaze s povišanim izločanjem.....	36
5.1.2	Proteaze in vnetje.....	36
5.1.3	Vpliv na tumorigenezo	36
5.2	SKLEPI.....	37
6	VIRI	38

ZAHVALA

PRILOGA

KAZALO SLIK

Sl. 1: Razvoj in diferenciacija makrofagov iz mieloidne predniške celice	1
Sl. 2: Alternativna (M2) in klasična (M1) aktivacija makrofagov.	2
Sl. 3: M1 in M2 makrofagi..	4
Sl. 4: Rakave celice primarnega tumorja.....	7
Sl. 5: Shema Orbitrap LTQ Velos masnega spektrometra	11
Sl. 6: Neubauer-jev hemocitometer	17
Sl. 7: Proces priprave sekretomskih vzorcev za analizo na masnem spektrometru	21
Sl. 8: Shema tandemske masne spektrometrije	23
Sl. 9: Delež detektiranih proteinov po stimulaciji z interlevkini.....	25
Sl. 10: Ravni izločanja proteinov po stimulaciji.....	26
Sl. 11: Funkcije izločenih proteinov po stimulaciji z IL-4	31
Sl. 12: Funkcije izločenih proteinov po stimulaciji z IL-10	32
Sl. 13: Funkcije izločenih proteinov po stimulaciji z IL-13.....	32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemikalije	13
Preglednica 2: Laboratorijska oprema	14
Preglednica 3: Parametri analize z nano-LC	22
Preglednica 4: Parametri iskanja s programom MaxQuant	24
Preglednica 5: Število identificiranih enakih proteinov v vzorcih	26
Preglednica 6: Število proteinov s signifikatno povečanim izražanjem	27
Preglednica 7: Identificirani sekretorni proteini po stimulaciji z IL-4	28
Preglednica 8: Identificirani sekretorni proteini po stimulaciji z IL-10	29
Preglednica 9: Identificirani sekretorni proteini po stimulaciji z IL-13	30
Preglednica 10: Proteaze s povečanim izločanjem po stimulaciji z IL-4	33
Preglednica 11: Proteaze s povečanim izločanjem po stimulaciji z IL-10	34
Preglednica 12: Proteaze s povečanim izločanjem po stimulaciji z IL-13	34

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Seznam vseh proteinov s povečanim izločanjem po stimulaciji z interlevkini.....42

SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC

µg/ml	mikrogram na mililiter
µM	mikromolarno
ACN	acetonitril
ATCC	Ameriška zbirka tipskih kultur (angl. <i>American Type Culture Collection</i>)
BSA	goveji serumski albumin (angl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CID	s trkom povzročena disociacija (angl. <i>Collision-Induced Dissociation</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid
DTT	ditiotreitol (angl. <i>Dithiothreitol</i>)
FA	mravljinčna kislina (Formic acid)
FBS	fetalni goveji serum (angl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
G-CSF	stimulirajoči dejavnik granulocitnih kolonij (angl. <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>)
GM-CSF	stimulirajoči dejavnik granulocitno-makrofagnih kolonij (angl. <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)

HCD	višje energijska s trkom povzročena disociacija (angl. <i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>)
IAA	jodoacetamid
IFN- γ /- β	interferon γ /- β
II MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks II
IL	interlevkin
LPS	lipopolisaharidi
MEROPS	spletna baza peptidaz in njihovih inhibitorjev
MWCO	izključitvena/mejna molekulska masa (angl. <i>Molecular Weight CutOff</i>)
NCBI	Nacionalni center za biotehnološke informacije (angl. <i>The National Center for Biotechnology Information</i>)
nl/min	nanoliter na minuto
NO	dušikov oksid (angl. <i>Nitric oxide</i>)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl. <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PEP	verjetnost posteriorne napake (angl. <i>Posterior Error Probability</i>)

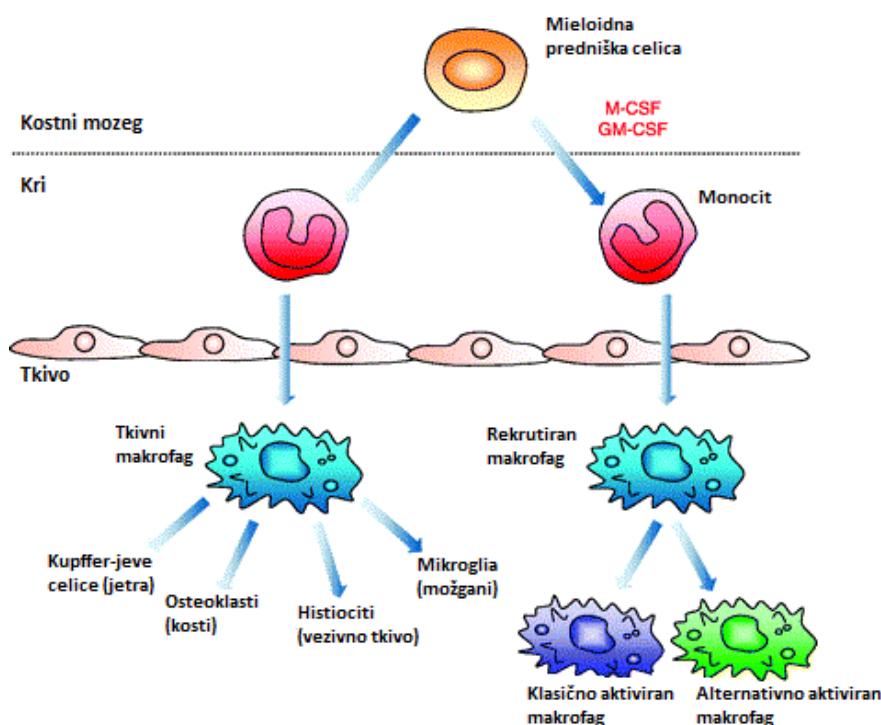
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat (angl. <i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>)
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute cell culture medium
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
TAM	s tumorji asociirani makrofagi (angl. <i>Tumor Associated Macrophages</i>)
TNF-α	tumorski nekrozni dejavnik α (angl. <i>Tumor necrosis factor α</i>)
WB	prenos po Westernu (angl. <i>Western blot</i>)

1 UVOD

1.1 MAKROFAGI

Monociti so bele krvne celice, ki izvirajo iz kostnega mozga, kjer nastanejo iz mieloidnih predniških celic. Te predniške celice se diferencirajo preko monocitov v subpopulacije tkivnih makrofagov, ki se nato, odvisno od tkiva v katerem se nahajajo, razvijejo v različne subpopulacije (slika 1). Rezidentni (tkivni) makrofagi so v večini organov redno prisotni in pomagajo vzdrževati ravnotesje organizma, tako da fagocitirajo ostarele eritrocite, apoptotične celice in ostale celične ostanke (Mosser in Edwards, 2008). Fenotip in morfologija makrofagov se razlikujeta med različnimi organi.

Makrofagi pa lahko v določena tkiva potujejo tudi zaradi vpliva različnih okoljskih dražljajev. Take makrofage imenujemo aktivirani makrofagi. Diferenciacija in aktivacija makrofagov je odvisna od širokega spektra okoljskih dejavnikov (citokini, kemokini, rastni in diferencijski faktorji, njihovi receptorji), ki različno regulirajo odzive makrofagov in inducirajo razvoj mnogih funkcionalnih fenotipov (Stout in Suttles, 2004).

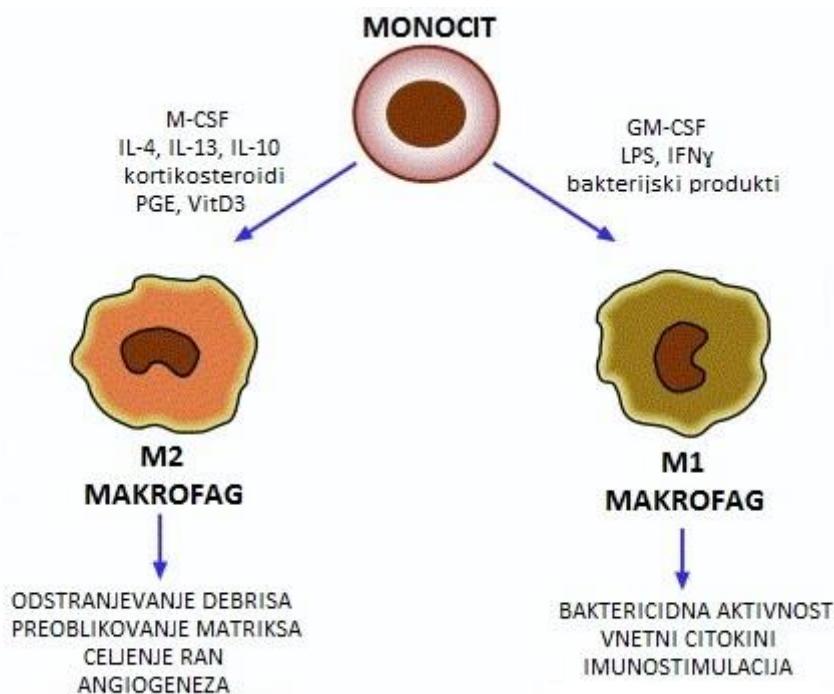


Slika 1: Razvoj in diferenciacija makrofagov iz mieloidne predniške celice.
Prirejeno po Rickard and Young, 2009

Ob diferenciaciji se jim ojačata citotoksična in antimikrobnna aktivnost (Gordon in Martinez, 2010). Celica se poveča, zveča se število znotrajceličnih organelov, postane učinkovito fagocitna in izloča večje količine topnih faktorjev (Alberts in sod., 2012). Makrofagi nato migrirajo na lokalna mesta vnetja in infekcije, kjer sodelujejo v imunskega odziva. Njihove poglavite naloge so: fagocitoza tujih delcev, lastnih odmrlih celic (npr. eritrocitov) in celičnih ostankov, izražanje citokinov in predstavljanje antigenov (Vozelj, 2000).

1.1.1 Klasično in alternativno aktivirani makrofagi

Sprva so bili aktivirani makrofagi definirani kot makrofagi v odzivu na prisotnost tujkov v organizmu s povečanim izločanjem vnetnih mediatorjev in sposobnostjo uničevanja patogenov (Mosser, 2003). Danes vemo, da aktivirane makrofage predstavlja več subpopulacij z različnimi fenotipi in možnostjo prehoda med njimi. Zelo pomembna lastnost makrofagov je prav njihova plastičnost oz. prilagodljivost, ki jim v odziv na različne signale v njihovem okolju omogoča reverzibilno spremembo fenotipa (Stout in sod., 2005).



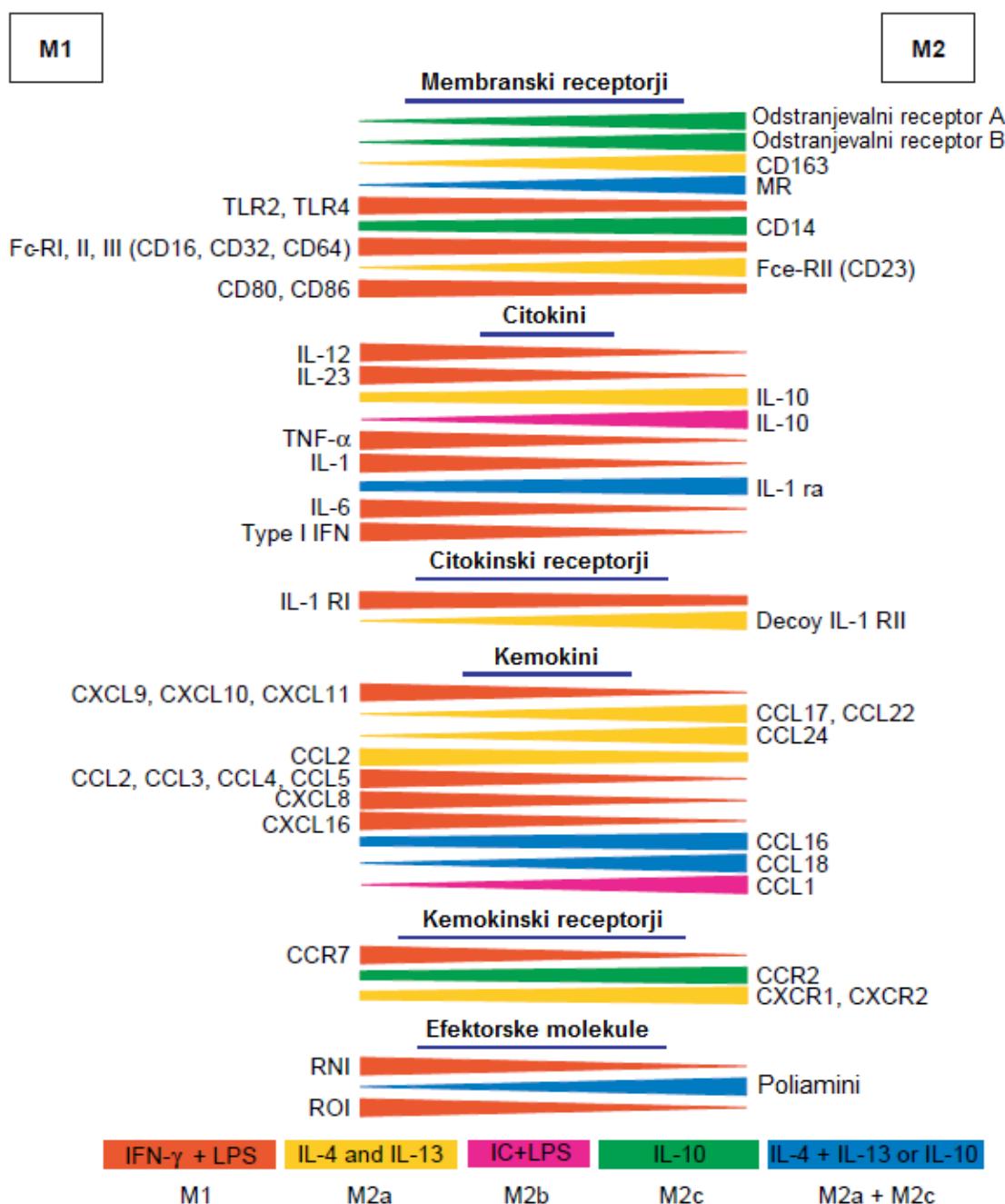
Slika 2: Alternativna (M2) in klasična (M1) aktivacija makrofagov; aktivacijski faktorji in na novo pridobljene funkcije. Prirejeno po Sica in sodelavci, 2012.

Prvi namig o večji heterogenosti aktiviranih makrofagov se je pojavil ob koncu prejšnjega stoletja, ko je Stein s sodelavci (1992) dokazal, da interlevkin 4 (IL-4) ni le inhibitor klasične aktivacije, temveč v makrofagih sproži tudi drugačen tip aktivacije v primerjavi z do tedaj poznanim. Posledično se je zanimanje za podrobnejše raziskave fiziologije in funkcije makrofagov povečalo. Trenutno je splošno sprejeto, da populacijo aktiviranih makrofagov v človeškem telesu sestavlja več subpopulacij. V grobem jo delimo na klasično aktivirane ali M1 makrofage in alternativno aktivirane ali M2 makrofage (slika 2). Med M2 makrofage uvrščamo vse različne subpopulacije alternativno aktiviranih makrofagov. Mantovani s sodelavci (2004) je predlagal delitev v 3 podskupine: M2a, M2b in M2c, kjer se M2a fenotip razvije ob stimulaciji z IL-4 in IL-13, M2b ob prisotnosti Toll-u podobnih receptorjev in IL-1R, M2c fenotip pa inducirajo IL-10 in glukokortikoidi (slika 3).

Izraz klasično aktivirani makrofagi se nanaša na makrofage, katerih aktivacija poteče kot odziv na LPS (lipopolisaharidi), IFN- γ (interferon gama), IFN- β (interlevkin-1 β) ali pa tumorski nekrozni dejavnik α (TNF- α). Enaki signali sprožijo Th1 imunski odziv v T celicah, zato tako aktivirane makrofage označujemo s kratico M1. M1 makrofagi običajno izločajo povečane količine interlevkina 12 (IL-12), interlevkina-23 (IL-23), interlevkina-1 (IL-1), interlevkina-6 (IL-6) in citokinov, ki ojačijo Th1 imunski odziv. M1 makrofagi sodelujejo pri predstaviti antigenov, ubijanju znotrajceličnih parazitov in promociji citotoksičnosti, torej pri pripravi anti-tumorskega okolja (O'Brien in Schedin, 2009).

Alternativna aktivacija makrofagov pa poteče pod vplivom določenih citokinov (IL-4, IL-13, IL-10) ali glukokortikoidov (Wang in Joyce, 2010). Tako aktivirani makrofagi sprožijo Th2 imunski odziv. Promovirajo angiogenezo, preoblikovanje in celjenje tkiv ter odstranjujejo celične ostanke. Različne lastnosti sovpadajo z različnim podtipom M2 makrofagov.

Izraza klasično in alternativno aktivirani makrofagi so vpeljali v obdobju pred večjimi raziskavami genoma in pred razvojem proteomike, zato predstavljata le oba ekstrema makrofagne polarizacije. V resnici je delitev aktiviranih makrofagov veliko bolj kompleksna, saj vsebuje še vse vmesne fenotipske različice aktiviranih makrofagov.



Slika 3: M1 in M2 makrofagi. Makrofagna aktivacija je povezana z velikimi spremembami v profilu genske ekspresije. Izpostavljenost različnim tkivnim stimulusom inducira različne profile polarizacije v povezavi z ekspresijo izbranih molekul. Rdeča barva predstavlja M1 inducirane molekule, rumena M2a, ciklamna M2b, zelena M2c in modra molekule, ki jih inducira fenotipa M2a in M2c, združena. Povzeto po Mantovani in sod. 2004.

1.1.2. Citokini

Citokini so skupina majhnih signalnih proteinov (~5-20 kDa), ki jih izločajo skoraj vse celice, predvsem pa limfociti in makrofagi. Delimo jih med interlevkine, interferone, dejavnike tumorske nekroze, spodbujevalne dejavnike rasti kolonij in ostale. Delujejo lahko avtokrino, parakrino in v redkih primerih tudi endokrino. Citokini se vežejo s specifičnimi receptorji na membrani tarčne celice in sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Na splošno se citokini vežejo na receptorje z močno afiniteto. Zaradi te velike afinitete lahko citokini posredujejo biološke učinke v pikomolarnih koncentracijah. Pomembna lastnost citokinov je pleiotropnost, tj. sposobnost, da v različnih tarčnih celicah sproščajo različne biološke učinke. Med številnimi fiziološkimi odzivi, za katere je potrebna udeležba citokinov, so sprožitev vnetja, uravnavanje celičnega razmnoževanja in diferenciacije ter zdravljenje ran (Vozelj, 2000).

Alternativno ali M2 aktivacijo makrofagov sprožijo interlevkini 4, 10 in 13, kateri so podrobneje opisani spodaj.

1.1.2.1. Interlevkin 4 (IL-4)

Poglavitni fiziološki funkciji interlevkina 4 sta usmeritev v odziv celic T_{H2} in uravnavanje alergijskih reakcij. IL-4 blokira večino učinkov IFN- γ na makrofage in onemogoča povečano izdelovanje IL-1, dušikovega oksida in prostaglandinov. IL-4 blokira diferenciacijo celic T_{H0} v T_{H1} in pospešuje diferenciacijo celic T_{H2} (Vozelj, 2000). IL-4 izboljša mikrobicidno aktivnost makrofagov (Wirth in sod. 1989). Makrofagi, stimulirani z IL-4, kažejo povečano izražanje katepsinov S in L, obenem pa zmanjšano aktivnost fagosomne NADPH oksidaze, kar povzroči bolj reduktivno fagosomsko mikrookolje (Balce in sod., 2011).

1.1.2.2 Interlevkin 10 (IL-10)

IL-10 imenujemo tudi zaviralni dejavnik sinteze citokinov, saj preprečuje sintezo citokinov, predvsem v makrofagih, celicah T_H in celicah NK (Moore in sod. 2001). Poglavitna funkcija IL-10 je preprečevanje tvorbe IL-1, TNF- α , GM-CSF in G-CSF. IL-10 zavira ekspresijo MHC razreda II in inhibira produkcijo proinflamatornih citokinov v monocitih (baza NCBI). Izločajo ga imunske celice, v glavnem monociti, makrofagi in T celice (Sabat in sod., 2010).

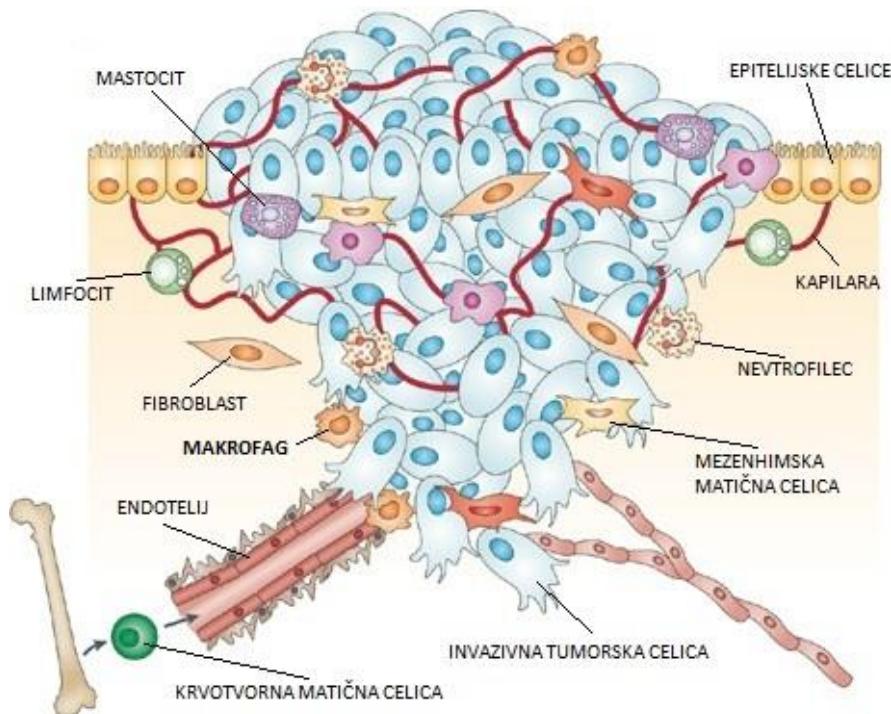
1.1.2.3 Interlevkin 13 (IL-13)

IL-13 je izražen pretežno v aktiviranih celicah T_H2 in uravnava aktivnost humanih celic B in monocitov. V človeških monocitih prepreči nastajanje citokinov induciranih z LPS (IL-1 α in β , IL-6, IL-8 in TNF- α). Za IL-13 je znano, da inducira metaloproteinaze matriksa (MMP) (Purwar in sod. 2008), ki so pomembni razgrajevalci izvenceličnega matriksa. Znatna strukturna podobnost med IL-13 in IL-4 ter bližnji položaj njunih genov na kromosomu kaže na to, da sta ta gena nastala s podvojevanjem (Minty in sod., 1993).

1.1.3 Mikrookolje tumorja in TAM

Tumorji niso preprosto kloni rakastih celic ampak so abnormalni organi sestavljeni iz več tipov celic in ekstracelularnega matriksa. Nekatere faze razvoja tumorja so močno podobne procesu razvoja organov. Tumorje lahko razumemo podobno kot človeške organe, le da med njimi obstaja ključna razlika; organi omogočajo preživetje organizma, medtem ko ga tumorji po navadi ubijejo ali mu vsaj škodujejo (Egebald in sod., 2010). V preteklosti so se znanstveniki osredotočali predvsem na rakavo celico in metabolne spremembe v njej, v zadnjem času pa se veliko več razmišlja o tem, kako telo oz. tako imenovano mikrookolje vpliva na rakave celice. Sekretom raka in njegovo mikrookolje predstavljata obetajoče področje za odkrivanje novih biomarkerjev (Xue in sod., 2008). Biomarkerji so ključni za detekcijo, diagnozo, prognozo in terapevtski monitoring raka. Trenutno poznani biomarkerji raka niso dovolj specifični in občutljivi, zato je veliko pozornosti usmerjenih v razvoj novih, učinkovitih biomarkerjev.

Zdrava celica se s spremembo rastne regulacije, ki je posledica spremembe v genskem zapisu, posledično spremeni v tumor. Omenjene spremembe so včasih spontane, včasih dedovane, včasih pa posledica različnih okoljskih vplivov (UV sevanje, kemikalije...). Število celic v tumorju se zaradi spremenjene rastne regulacije hitro povečuje. Kljub temu da rakaste celice uidejo regulatornim mehanizmom, ki omogočajo preživetje in homeostazo organizma, ne prekinejo vseh interakcij z okoljskimi, ne-rakovimi celicami. Vendar pa te interakcije niso statične, saj se razvijajo sočasno s tumorjem (Joyce in Pollard, 2009). Tako kot mikrookolje vpliva na razvoj tumorja, lahko tudi tumor reprogramira oz. prilagodi svoje mikrookolje (Gout in Huot, 2008). Heterogeno mikrookolje tumorja sestavljajo različne celice strome, imunske celice, epitelijske celice in krvne kapilare. (slika 4).



Slika 4: Rakave celice primarnega tumorja so obdane s kompleksnim mikrookoljem.
Prikejeno po Joyce in Pollard, 2009

S tumorji povezani makrofagi (TAM) so alternativno aktivirani makrofagi, ki spodbujajo napredovanje tumorjev s povečanjem invazivnosti in migracije tumorskih celic ter angiogenezo. Z raziskavami zadnjega desetletja je postalo znano, da TAM izkazujejo M2 fenotip (Mantovani in sod., 2002). Poleg samih tumorskih celic naj bi bili TAM tudi vir katepsinov (Gocheva in sod., 2010).

1.2 PROTEAZE

1.2.1 Pomen proteaz v raku

Proteaze ali peptidaze so proteolitični encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v polipeptidni verigi.

Razvrščamo jih po več kriterijih.

- Glede na izvor: mikrobnne, živalske, rastlinske.
- Glede na mesto delovanja: zunaj ali znotrajcelične
- Glede na mesto cepitve peptidne vezi: ekso (cepijo peptidno vez ob koncih verige) in endoproteaze (cepijo peptidno vez znotraj peptidne verige)
- Glede na katalitično mesto (po MEROPS-u): aspartatne, cisteinske, glutaminske, asparaginske, metalo, serinske, treoninske proteaze, mešane in neznane

Za uspešen razvoj in metastaziranje tumorjev je prehod rakavih celic v krvni obtok ključnega pomena, kar pa ni mogoče brez proteolitične razgradnje. Invazivne rakave celice pogosto same izločajo proteaze, kar nekaj raziskav pa dokazuje, da so glavne celice, ki v mikrookolje tumorja izločajo ključne proteaze, ravno makrofagi (Gocheva in sod., 2010). Za invazijo raka pomembne proteaze, ki se izločajo, so: metaloproteinaze, cisteinski katepsini in serinske proteaze (Joyce in Pollard, 2009).

1.2.1.1 Katepsini

Katepsini so velika raznolika skupina proteaz. So monomerni encimi z molekulsko maso približno 30 kDa, z izjemo tetramernega katepsina C. Katepsini so optimalno aktivni v rahlo kislem, reducirajočem okolju (Turk in sod., 2001). Glede na katalitično mesto jih delimo na serinske (A & G), asparaginske (D & E) in cisteinske katepsine (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X). Enajst poznanih človeških cisteinskih katepsinov pripada papainski poddružini (skupini) cisteinskih proteaz (Fonović in Turk, 2014b). Podobno kot večina ostalih proteaz, se katepsini sintetizirajo kot neaktivni prekurzorji. Za njihovo aktivacijo je potrebna proteolitska odstranitev N-terminalnega propeptida (Turk in sod., 2012).

V normalnih celicah se cisteinski katepsini običajno nahajajo v lizosomih in znotrajceličnih razdelkih, kjer so vključeni v razgradnjo in procesiranje proteinov. V določenih tumorjih pa so katepsini transportirani iz celic na njihovo površino ali pa jih celice celo izločajo.

Ena prvih odkritih patoloških vlog katepsinov je bila njihova povezava z napredovanjem raka. (Sloane in sod., 1981, cit. po Fonović in Turk, 2014a). Danes je znano, da so katepsini močno povišani v različnih tipih tumorjev (Joyce in Hanahan, 2004), kot tudi v drugačnih bolezenskih stanjih (pljučna fibroza, osteoporoza, reumatodini artritis, srčno-žilne bolezni). Najpogosteje so povezani z rakom katepsini B, C, H, L, S in X (Fonović in Turk, 2014b).

Izločanje katepsinov v izvencelični prostor je pogosto del normalnih fizioloških procesov, kot so: celjenje ran, prohormonsko procesiranje in preoblikovanje kosti. Ena najbolj pomembnih vlog katepsinov v raku je sposobnost razgrajevanja komponent izvenceličnega matriksa, ki omogoča rakavim celicam primarnega tumorja razširitev v organizmu in formiranje metastaz.

1.3 MASNA SPEKTROMETRIJA V PROTEOMIKI

Masna spektrometrija (MS) je v zadnjih dveh desetletjih postala primarna metoda za identifikacijo proteinov iz kompleksnih zmesi biološkega izvora. Gre za metodo, ki omogoča identifikacijo in kvantifikacijo proteinov v vzorcu z merjenjem količnika med maso in nabojem prej fragmentiranih proteinov. Masnospektroskopske metode se izvajajo z ioniziranimi molekulami v plinski fazi.

1.3.1 Sestava masnega spektrometa

Glavni sestavnici masnega spektrometra so ionizator, masni analizator in detektor. V ionizatorju se tvorijo ioni, v masnem analizatorju se ioni ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z), detektorji pa izmerijo ionski tok pri posamezni vrednosti m/z . Rezultat meritve je masni spekter, ki je prikaz absolutne ali relativne intenzitete ionskega toka v odvisnosti od m/z (Steen in Mann, 2004).

1.3.1.1 Ionizacija z elektrosprejem

Pri elektrospreju (slika 5) se vzorec v ionizator dovaja v raztopini skozi kovinsko kapilaro. Ob izhodu iz kapilare se raztopina s peptidi razprši v zelo drobne, pozitivno nabite kapljice. V vakuumu ionizatorja nato topilo odpireva, kapljice se manjšajo in nazadnje ostanejo le pozitivno nabiti ioni peptidov, ki se v visokem električnem polju pospešijo v smeri masnega analizatorja.

1.3.1.2 Masni analizator

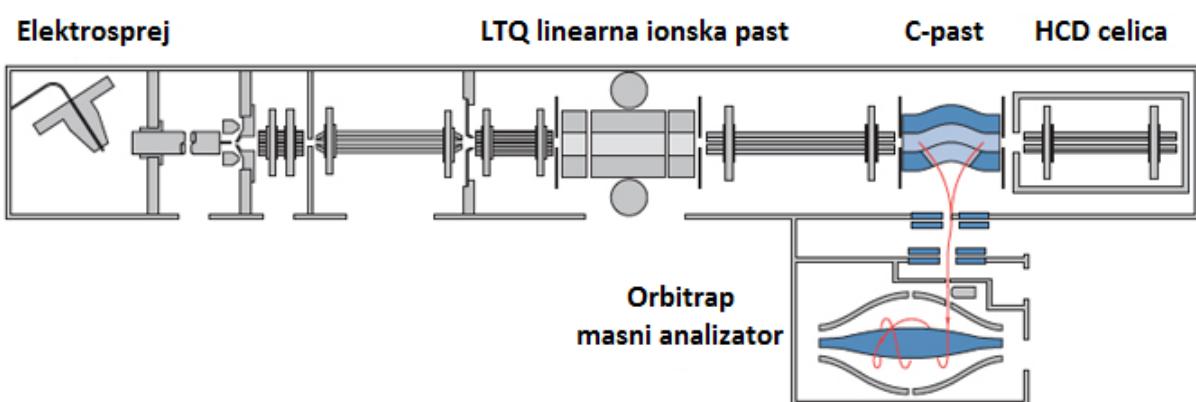
Masni analizator je centralni element na MS-osnovanih proteomskih tehnologij. Glavni parametri, ki označujejo masne analizatorje so njihova občutljivost (to je najmanjša množina vzorca, ki jo lahko ob določeni zanesljivosti še detektiramo), ločljivost (to je sposobnost ločbe dveh sosednjih masnih vrhov) in območje delovanja (to je največja masa, ki jo še lahko zanesljivo določimo). Poznamo pet osnovnih vrst masnih analizatorjev: magnetni sektorski analizator, analizator na čas preleta ionov, kvadrupolni analizator, analizator z ionsko pastjo in ionsko ciklotronski resonančni analizator.

1.3.1.3 Detektor

Detektor izmeri posamezne ionske tokove pri vsaki m/z vrednosti. Izhodni rezultati masnega spektrometra so torej m/z masni spektri ionskih tokov vseh detektiranih peptidov. Višina masnih spektrov predstavlja relativno količino zaznanih ionov. S korelativnim iskanjem po bazah podatkov o proteinih nato identificiramo vhodne proteine v vzorcu.

1.3.2 Orbitrap LTQ Velos masni spektrometer

Masni spektrometer Orbitrap LTQ Velos je hibridni masni spektrometer, ki združuje dvocelično vzdolžno ionsko past LTQ Velos in pa analizator Orbitrap. V orbitapu so ioni ujeti v orbiti, kjer krožijo okrog osrednje elektrode (slika 5). Njihove frekvence kroženja so značilne za razmerja m/z posameznih peptidov.



Slika 5: Shema masnega spektrometra Orbitrap LTQ Velos z označenimi glavnimi deli. Povzeto po planetorbitrap.com

Pri našem delu smo za analizo proteinov uporabili CID (angl. Collision-Induced Dissociation) ali s trki spodbujeni razpad ionov. Za kolizijsko celico je v tem primeru služila kar linearna past, v kateri se primarni ioni, ki izhajajo neposredno iz ionizatorja, fragmentirajo ob trkih z atomi ali molekulami razredčenega plina v celici.

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

2.1 NAMEN DELA

Moj namen v tej diplomski nalogi je bil proteomsko analizirati sekretom človeških makrofagov, saj tega v znanstveni literaturi še ni zabeleženega. S pomočjo masne spektrometrije, ki omogoča analize kompleksnih bioloških vzorcev, sem želela določiti kvalitativne in kvantitativne spremembe sekretoma človeških makrofagov po predhodni stimulaciji s citokini IL-4, IL-10 in IL-13. Predhodno sem makrofage stimulirala z izbranimi Th2 citokini, saj sem želela preveriti, če po stimulaciji makrofagi res povečano izločajo nekatere proteaze, predvsem katepsine (Gocheva in sod., 2010). Cisteinski katepsini so skupina cisteinskih proteaz, za katere je bilo v znanstveni literaturi že večkrat objavljeno, da stimulacija makrofagov s citokini poveča njihovo izločanje. Katepsini so tudi dokazano pogosto povisani v različnih patoloških stanjih, kar jih uvršča v vrh novejših potencialnih biomarkerjev.

2.2 HIPOTEZA

- Stimulirani makrofagi bodo pod vplivom interlevkinov IL-4, IL-10 in IL-13 razvili M2 fenotip. Pričakujemo povečano izločanje določenih sekretornih proteinov in cisteinskih katepsinov.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Preglednica 1: Kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC
Acetonitril	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska
Acetonitril z 0,1 % mravljično kislino	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska
amonijev bikarbonat (NH_4HCO_3)	Fluka, Buchs, Švica
Bradfordov reagent	BioRad, Hercules, ZDA
Coomassijevo briljantno modro	Fluka, Buchs, Švica
človeški rekombinantni Interleukin-10	Sigma, Saint Louis, ZDA
človeški rekombinantni Interleukin-13	Sigma, Saint Louis, ZDA
človeški rekombinantni Interleukin-4	Sigma, Saint Louis, ZDA
DTT (ditiotreitol)	Sigma, Saint Louis, ZDA
Dulbecco's PBS	Sigma, Saint Louis, ZDA
toplotočno inaktiviran fetalni goveji serum	PAA, Velizy-Villacoublay, Francija
Glutamin	PAA, Velizy-Villacoublay, Francija
jodoacetamid (IAA)	Sigma, Saint Louis, ZDA
analizni metanol	Applichem, Darmstadt, Nemčija
mravljična kislina	Fluka, Buchs, Švica
penicilin/streptomicin	PAA, Velizy-Villacoublay, Francija
PMA (forbol 12-miristat 13-acetat)	Sigma, Saint Louis, ZDA
RPMI 1640	PAA, Velizy-Villacoublay, Francija
Tripsin	Promega, Madison, ZDA
tripsinski pufer	Promega, Madison, ZDA
voda z 0,1 % mravljično kislino	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska

Preglednica 2: Laboratorijska oprema

ANALIZNI INSTRUMENT	PROIZVAJALEC
analizna tehnicka	Mettler Toledo, Greifensee, Švica
avtomatske pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
celični inkubator CB 210	Binder, Tuttlingen, Nemčija
centrifuge (5417C, 5415R, 5810R)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
čitalec mikrotiterskih plošč	Tecan, Mannerdorf, Švica
hladilnik (4 °C)	Gorenje, Velenje, Slovenija
invertni mikroskop Olympus CK40	Olympus, Tokyo, Japonska
izboljšani Neubauerjev hemocitometer	Brand, Wertheim, Nemčija
komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija
koncentrator (5301)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
masni spektrometer LTQ Orbitrap XL	ThermoFisher, San Jose, CA
zaščitna biološka komora M18	Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija
pH meter	Mettler Toledo, Greifensee, Švica
Termoblok	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
vibracijsko mešalo Vibromix 10	Tehnica, Železniki, Slovenija
visokotlačni tekočinski kromatograf	ThermoFisher, San Jose, CA
zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje, Velenje, Slovenija
zamrzovalnik (-80 °C)	Gorenje, Velenje, Slovenija

3.1.3 Pufri in ostale delovne raztopine

- 10-kratni SDS pufer za elektroforezo

30,3 g Tris baze

144,0 g glicina

10 g SDS

Dopolnimo do 1 litra z dH₂O. Pred uporabo 10x redčimo z dH₂O.

- 10-kratni pufer za Westernov prenos

30 g Tris baze

144 g glicina

Dopolnimo do 1 litra z dH₂O.

- Pufer za Westernov prenos

100 ml 10-kratnega pufra za Westernov prenos

200 ml metanola

Dopolnimo do 1 litra z dH₂O.

- 30 % razbarvalna tekočina

30 ml EtOH

100 ml CH₃COOH

600 ml dH₂O

- ekstrakcijska raztopina (po tripsinizaciji):

50 % acetonitril

5 % mravljična kislina

3.1.4 Gojišče

- obogateno gojišče RPMI 1640

500 ml gojišča RPMI 1640

56 ml toplotno inaktiviranega FBS

5,6 ml glutamina

5,6 ml penicilin/streptomicin

3.1.5 Celična linija

Pri delu smo uporabili monocitno celično linijo U-937, ki se v raziskavah uporablja kot model za diferenciacijo monocitov v makrofage. Gre za človeško monocitno celično linijo, izolirano iz histiocitnega limfoma. Prvič sta jo leta 1974 izolirala Sundstrom in Nilsson (vir: ATCC).

3.2 METODE:

3.2.1 Celični laboratorij

3.2.1.1 Odmrzovanje celic U-937

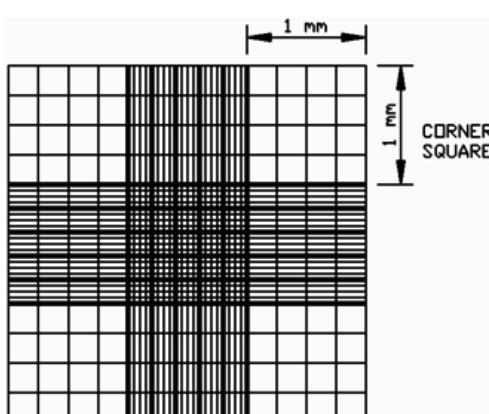
Vialo s celicami, predhodno shranjenimi na -80 °C, smo odtalili v vodni kopeli na 37 °C. Odtaljene celice smo prenesli v že prej pripravljeno komplementno gojišče RPMI (10 ml) in jih centrifugirali 5 minut pri 1100 obr/min. Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli. S tem smo se znebili ostankov celicam toksičnega krioprotектanta DMSO-ja. Celice smo nato resuspendirali v 10 ml svežega segretega gojišča ter suspenzijo celic prenesli v gojiščno plastenko kamor smo dodali še sveže gojišče do skupnega volumna 20 ml.

3.2.1.2 Gojenje celic U-937

Celice smo gojili v gojišču RPMI 1640 z dodanimi FBS, penicilinom, streptomycinom in glutaminom. Gojili smo jih v celičnem inkubatorju v gojiščnih plastenkah. Celice smo dohranjevali vsak dan, vsak 3. dan pa smo menjali gojišče s svežim. Dan pred začetkom poskusa smo celicam zamenjali gojišče, da so bile ob začetku poskusa čim bolj vitalne. Celice smo redno šteli.

3.2.1.3 Štetje celic

Celice smo šteli na Neubauer-jevem hemocitometru pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Pred štetjem smo jih obarvali z barvilom Tripan Blue, ki obarva le mrtve celice.



Slika 6: Neubauer-jev hemocitometer

Globina večjih vogalnih kvadratov hemocitometra je 0,1 mm, površina vsakega pa 1 mm^2 . Prešteli smo celice v vsakem od štirih vogalnih polj, nato pa končno število celic na ml gojišča izračunali po naslednji formuli.

$$\text{Št.celic/ml} = N' \times 10^4 / 4$$

N' = število pod mikroskopom preštetih celic(v vseh 4-ih vogalnih poljih)

3.2.1.4 Diferenciacija monocitov v makrofage

Celice smo pred začetkom diferenciacije prešteli pod invertnim svetlobnim mikroskopom in 7×10^6 celic v suspenziji, nacepili na 10-centimetrsko ploščo. Na vsako ploščo smo dodali obogateni RPMI do končnega volumna 10 ml. Celice smo diferencirali s 30 μM PMA. Diferenciacija je potekala 48 ur v celičnem inkubatorju pri 37 °C. Pred tem smo z rahlim mešanjem poskrbeli, da so se celice enakomerno porazdelile.

3.2.1.5 Regeneracija in stimulacija

Po 48-ih urah diferenciacije smo pod mikroskopom najprej preverili če so se celice uspešno pritrstile na podlago. Nato smo zavrgli gojišče, pritrjene celice previdno sprali s 5 ml Dulbecco's PBS-ja in dodali 10 ml svežega gojišča. Celice smo vrnili v inkubator za 24 ur.

3.2.1.6 Stimulacija z interlevkini

Pred stimulacijo z interlevkini smo celicam menjali gojišče s svežim. Celice smo ločeno stimulirali s človeškimi rekombinantnimi interlevkini (IL): IL-4, IL-10 in IL-13. Dodali smo 50 μl interlevkina na konfluentno preraščeno ploščo (t.j. na 10 ml medija). Preden smo gojiščne plošče za 24 ur prestavili v celični inkubator na 37 °C, smo jih še rahlo premešali.

3.2.1.7 Sekretom

Po 24-urni stimulaciji smo celice 3× sprali s PBS-jem. Nato smo celicam (vsaki plošči) dodali 10 ml PBS-ja in jih inkubirali 2 uri pri 37 °C. Po dveh urah smo celicam odvzeli pufer, celice pa zamrznili na -80 °C za kasnejšo pripravo celičnega lizata.

Medij smo centrifugirali najprej 5 min pri 1100 obr./min, nato pa supernatant še 30 min pri maksimalnem številu obratov. Centrifugiranje je potekalo pri 4 °C, da smo ohranili čim več celičnih produktov.

3.2.2 Predpriprava sekretomov

3.2.2.1 Koncentriranje

Odvzete celične sekretome v PBS-ju smo v manjši centrifugi skoncentrirali do koncentracije ~ 680 µg/ml. Pri tem smo uporabili Amicon ultrafiltrirne nastavke 3,000 MWCO (molecular weight cutoff). Vzorci so bili med tem ves čas na ledu ali v ohlajeni centrifugi.

3.2.2.2 Določanje koncentracije proteinov v vzorcu z metodo po Bradfordu

Bradfordova metoda je kolorimetrična metoda, ki se uporablja za merjenje celokupne koncentracije proteinov v raztopini. Skoncentrirane proteinske vzorce smo redčili 1:200 s sterilno destilirano vodo. Bio-Radov reagent (40 µl) in redčene proteinske vzorce (160 µl) smo v mikrotitrski plošči zmešali v razmerju 4:1. Po 5-ih minutah smo s spektrofotometrom Tecan izmerili absorbanco pri 595 nm in na podlagi umeritvene krivulje, pripravljene z redčitvami BSA, izračunali koncentracijo proteinov v vzorcu.

3.2.2.3 Poliakrilamidna gelska elektroforeza

Na-PAGE ali poliakrilamidna gelska elektroforeza je separacijska metoda, s katero ločujemo proteine glede na njihovo velikost. NaDS pufer proteine denaturira do primarne strukture in jih dodatno negativno nabije. Proteini v električnem polju tako potujejo proti pozitivno nabitemu polu. Zaradi strukture gela manjši proteini potujejo hitreje, večji pa počasneje.

K 30 µl vsakega skoncentriranega vzorca smo dodali po 6 µl nanašalnega pufra in mešanico v termobloku segrevali 5 min na 99 °C. Preostanek vzorcev smo zamrznili na -80 °C. Ohlajene hitro centrifugirane vzorce smo nato nanesli na gel. V prvi žep smo z avtomatsko pipeto nanesli 5 µl proteinskega standarda, v vsak nadaljnji žep pa po 35 µl vzorca. Elektroforetsko ločevanje je trajalo 90 min pri napetosti 125 V v 1 × NaDS pufru. V našem primeru smo uporabili elektroforezo kot preparativno metodo za nadaljnje analize, zato smo uporabili komercialne gele, kar zmanjša možnost keratinske kontaminacije.

3.2.2.4 Barvanje gelov s Coomassie brilliant blue in razbarvanje

Akrilamidni gel smo po elektroforezi prestavili v sterilno plastično petrijevko (premer = 15 cm), ter mu dodali 25 ml barvila Coomassie brilliant blue in 25 ml 20 % ocetne kisline. Na

mešalu smo gel barvali eno uro. Po eni uri smo barvilo zavrgli, gel sprali v 50 ml 30 % razbarvalne tekočine, postopek ponovili in pustili gel v hladni sobi v sveži razbarvalni tekočini čez noč.

Po razbarvanju smo gel slikali in iz njega izrezali naše proteinske vzorce. Tako ločene proteine v gelu smo prenesli v majhne plastične epruvetke, katere smo označili tudi z zaporedno številko, ki je predstavljala mesto na gelu pred izrezom.

3.2.3 Priprava vzorcev za analizo z masnim spektrometrom

3.2.3.1 Redukcija in alkilacija

Proteinom v gelu smo z raztopino 50 % acetonitrila in 25 mM NH₄HCO₃ v ciklih po 20 min z mešanjem odstranili zadnje ostanke barvila. Razbarvane vzorce smo še dvakrat dehidrirali s 100 % acetonitrilom (200 µl/vzorec) in jih na vakuumskem sušilniku posušili do suhega. V primeru da z nadaljnjo pripravo nismo nadaljevali isti dan, smo posušene vzorce zamrznili na -20 °C.

Posušenim vzorcem smo dodali po 200 µl raztopine 10 mM DTT v 25 mM NH₄HCO₃ in segrevali med mešanjem 45 min na 56 °C. Po inkubaciji smo vzorce ohladili na sobno temperaturo in jih na hitro centrifugirali. Supernatant smo zavrgli. Reduciranim vzorcem smo dodali po 100 µl raztopine 55 µM jodoacetamida (IAA) v 25 mM NH₄HCO₃, jih na kratko centrifugirali ter inkubirali 30 min na sobni temperaturi v temi. Jodoacetamid na svetlobi razpada, zato je potrebna inkubacija v temi. Po inkubaciji smo odstranili supernatant in vzorce med mešanjem 15 min spirali s 150 µl 25 mM NH₄HCO₃. Nato smo vzorce dehidrirali s 100 % acetonitrilom (200 µl/vzorec, 10 min, mešanje). Postopek smo enkrat ponovili. Dehidrirane vzorce smo nato posušili v vakuumskem koncentratorju; 20 min oz. do suhega, opalnega videza. Če s poskusom nismo nadaljevali isti dan, smo vzorce zamrznili na -20 °C.

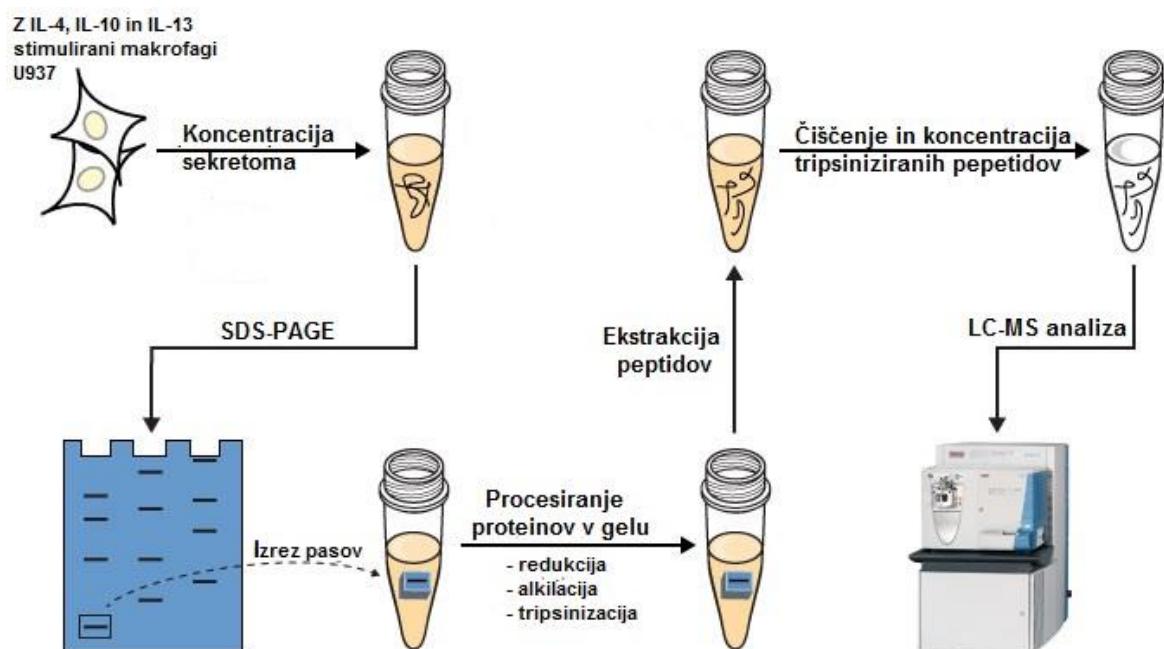
3.2.3.2 Tripsinizacija

Najprej smo pripravili 40 µl raztopine tripsina v tripsinskem pufru s koncentracijo 500 µg/ml. Raztopino tripsina smo nato resuspendirali v 2,5 ml 25 mM NH₄HCO₃ ter dobro premešali. Ves čas predpriprave smo vzdrževali raztopino tripsina ohlajeno na ledu, da smo

se izognili avtoprocesiranju tripsina. Posušenim proteinskim vzorcem po redukciji in alkilaciji smo dodali po 100 µl tripsinske raztopine s koncentracijo 7,87 µg/ml in jih inkubirali na ledu 20 min. Ko so proteinski vzorci absorbirali tekočino smo jim dodali še po 100 µl 25 mM NH₄HCO₃ in jih inkubirali čez noč v inkubatorju na 37 °C. Vzorcem smo dodali 25 mM NH₄HCO₃ z zamikom, saj smo želeli dobro absorbcojo tripsina v gel in čim manj tripsina v okoljski raztopini, ker bi lahko prišlo do avtoprocesiranja.

3.2.3.3 Ekstrakcija peptidov

Naslednji dan smo ekstrahirane peptide (supernatant) prenesli v nove plastične epruvetke. Gelom smo dodali po 150 µl ekstrakcijske raztopine, ter jih stresali 20 min. Tekočino smo prenesli v plastične epruvetke in postopek ponovili. Supernatante smo združili in vzorce skoncentrirali na 10-12 µl. Nato smo skoncentrirane vzorce prenesli v viale za MS analizo. Redčili smo (v kolikor je bilo to potrebno) do želenega volumna z 0,1 % mravljično kislino, saj ta med ionizacijo elektrospreja izboljša protonacijo peptidov.



Slika 7: Proses priprave sekretomskih vzorcev za analizo na masnem spektrometu. Pritejeno po www.lifetechnologies.com

3.2.3 Proteomska analiza

Proteomsko analizo smo opravili s pomočjo visokoločljivostnega masnega spektrometra Orbitrap LTQ Velos (ThermoFisher, San Jose, CA). Masni spektrometer Orbitrap LTQ Velos in Proxeon nano-LC tvorita sklopljen LC-MS/MS sistem, ki ga avtomatsko upravljam s pomočjo programskega paketa Xcalibur. V nadaljevanju so podrobnejše opisane metode nanotekočinske kromatografije in analize z masnim spektrometrom.

3.2.3.1 Nano-HPLC ali visokotlačna tekočinska kromatografija

Visokotlačna tekočinska kromatografija je ena najpogosteje uporabljenih kromatografskih tehnik, obenem pa je zelo primerna za pripravo vzorca za masno spektrometrijo, saj jo lahko neposredno sklopimo s kapilaro elektrospreja v masnem spektrometru.

Kromatograf poleg injektorja sestavlja predkolona in pa analitska kolona. V našem primeru smo uporabili analitsko kolono PicoFrit™ Aquasil C18 (New Objective, MA, ZDA). Peptidi se najprej vežejo na predkolono, s katere jih potem naraščajoči gradient acetonitrila in 0.1 % mravljinčne kisline (FA) z vodo spira po hidrofobnosti.

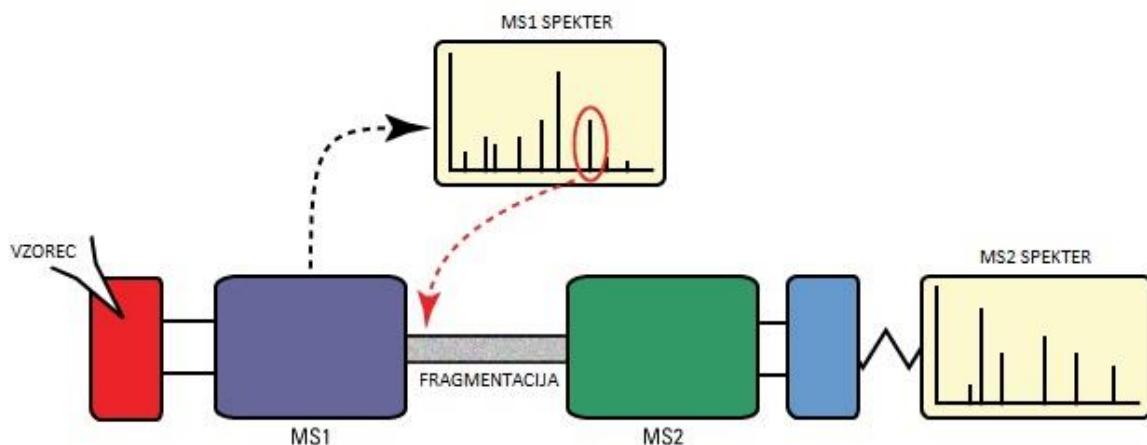
Gradient je sestavljen iz mobilne faze (A=voda, B=ACN z 0.1 % FA), ki se po času spreminja, procent acetonitrila linearno narašča od 5 % do 50 % 60 minut. Pretok mobilne faze je med celotno analizo konstanten in sicer 300 nl/min.

Preglednica 3: Parametri analize z nano-LC

Faza A	Voda
Faza B	Acetonitril z 0.1 % mravljinčno kislino(FA)
Volumen zanke	20 μ l
Volumen vzorca za injeciranje	3 μ l
Korak gradiента in čas analize	5 do 50 % v 60 minutah

3.2.3.2 Analiza na masnem spektrometru LTQ Orbitrap Velos

Masni spektrometer snema spekture ves čas gradienta. Najprej posname celotni MS spekter vseh potencialnih peptidnih prekurzorjev, ki so v določenem momentu v ionski pasti, za tem pa izbere 9 najintenzivnejših izbere za fragmentacijo v CID načinu (slika 8). Na ta način posname MS/MS spekture, iz katerih so razvidni fragmenti prekurzorja in njihove intenzitete.



Slika 8: Shema tandemske masne spektrometrije. Prikejeno po www.lifetechnologies.com

Pomembna uporabljeni nastavitev pri analizi z masnim spektrometrom je tudi dinamična izključitev (angl. dynamic exclusion). S to nastavitevijo je masni spektrometer MS/MS spekture zajemal tako, da je v primeru dvakratne fragmentacije istega peptida v roku 30 sekund, instrument ta peptid ignoriral 60 sekund. Na ta način smo preprečili stalno fragmentacijo peptidov, ki jih je v vzorcu največ.

3.2.3.3 Analiza podatkov z masnega spektrometra: iskanje po bazah podatkov, obdelava in analiza podatkov s bioinformatskimi proteomskimi programi

Iskanje podatkov smo izvedli s pomočjo programskega paketa MaxQuant (Cox in sod., 2008).

Nastavitev za iskanja s programom MaxQuant

Baza proteinov: ipi.human.v3.86

Preglednica 4: Parametri iskanja s programom MaxQuant

Modifikacije-variabilne	oksidacija metionina
Modifikacije - fiksne	karbamidometilacija cisteina
Maksimalno število zgrešenih cepitev	2
Minimalna dolžina peptida	7 aminokislin
Encimska razgradnjna	Tripsin (specifičnost R&K/P)
Način kvantifikacije	Relativna kvantifikacija na podlagi intenzitet
Anotacije	Znotrajcelična lokalizacija, biološka funkcija

Podatke po iskanju smo uvozili v Perseus, program, ki omogoča pregled in obdelavo podatkov. Vsem podatkom spektralnega štetja smo prišteli 1. S tem smo se izognili težavam pri primerjanju s kontrolnimi vzorci, katerih rezultat spektralnega štetja je bil 0, saj je z 0 nemogoče deliti. Za tem smo s kontrolo delili vse podatke za vzorce, tretirane z interlevkini.

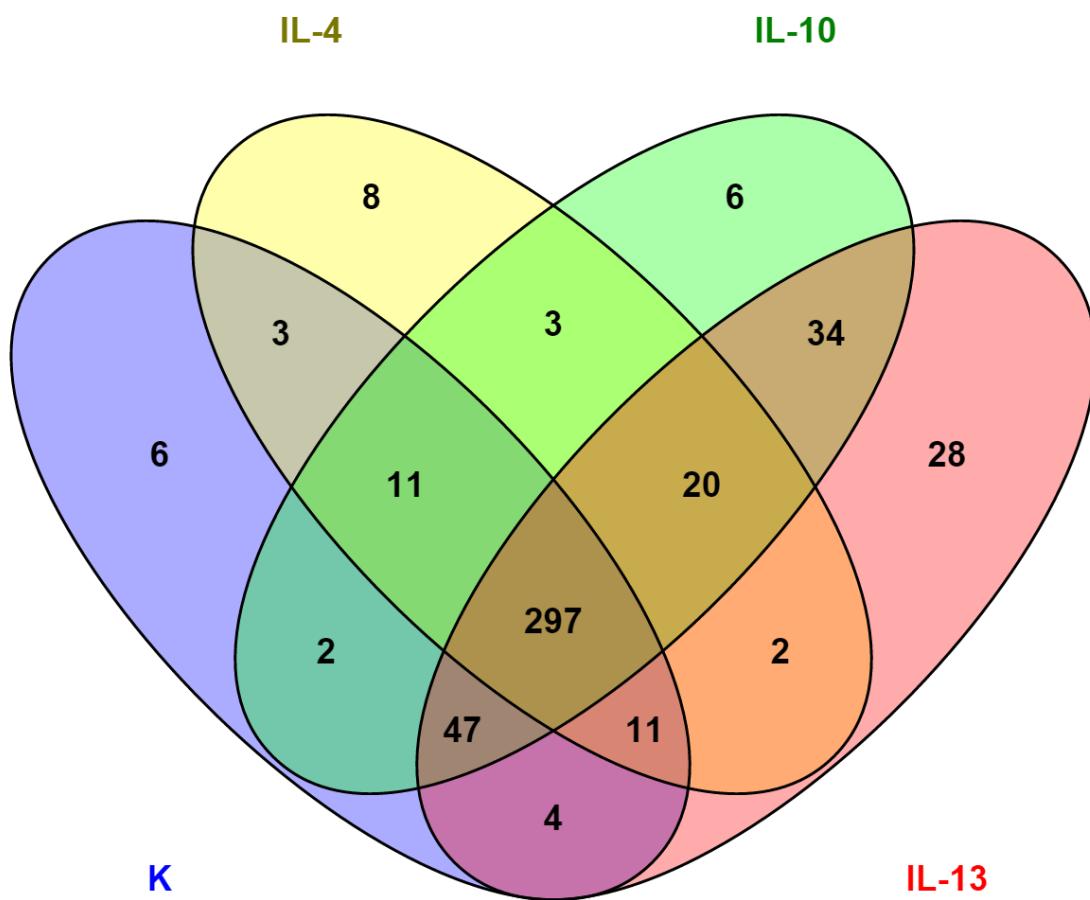
Pri MS analizi je poleg identifikacije pomembna tudi kvantifikacija rezultatov. Tako so se razvile različne kvantifikacijske metode MS analize, ki temeljijo na predhodnem označevanju vzorcev, kot je na primer SILAC (Choi in sod., 2008). Zaradi mnogih slabosti kvantifikacijskih metod z označevanjem vzorcev (več potrebnega materiala, zapleteni protokoli, dragi reagenti), se vse pogosteje uporablajo kvantitativne metode brez označevanja. Med pogosteje uporabljenimi je metoda spektralnega štetja. Spektralno štetje je metoda, kjer je število posnetih spektrov peptidov, ki ustrezajo proteinu v vzorcu, uporabljeno kot mera številčnosti proteina. V našo nadaljnjo analizo smo vključili tiste proteine, katerih razmerje posnetih spektrov (spectral count ratio) glede na kontrolni vzorec je bilo vsaj 3 krat povečano. Te proteine smo poimenovali proteini s signifikantno povišanim izražanjem in jih predstavili v rezultatih in uporabili za nadaljne analize.

Preverili smo tudi verjetnost posteriorne napake (angl. posterior error probability ali PEP score) identificiranih proteinov. Verjetnost posteriorne napake označuje zanesljivost identifikacije oz. verjetnost napačne identifikacije. Večji kot je, večja je verjetnost, da določena identifikacija ni pravilna.

4 REZULTATI

V naših vzorcih smo identificirali 482 proteinov. V kontrolnih vzorcih smo identificirali 381 proteinov, v vzorcih po stimulaciji z IL-4 355 proteinov, v vzorcih po stimulaciji z IL-10 420 proteinov in v vzorcih po stimulaciji z IL-13 443 proteinov.

Slika 9 prikazuje prekrivanje proteinov detektiranih v vzorcih sekretoma celic, ki so bile stimulirane z različnimi interlevkini ter v kontrolnem vzorcu (K).



Slika 9 : Prikaz deleža detektiranih proteinov v sekretomu makrofagov po stimulaciji teh z IL-4, IL-10 in IL-13

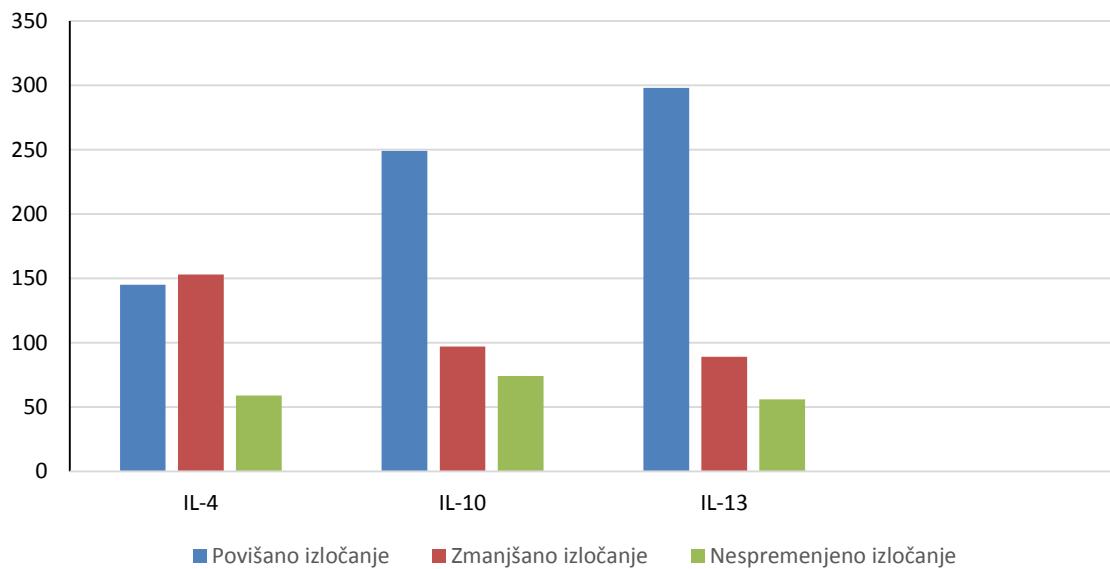
Proteini, ki smo jih zasledili izključno v posameznih vzorcih, so številčno prikazani v spodnji preglednici. Preglednica 5 prikazuje tudi prekrivanje proteinov med vzorci.

	IL-4	IL-10	IL-13	K
IL-4	8			
IL-10	3	6		
IL-13	2	34	28	
K	3	2	4	6

Preglednica 5: Število identificiranih enakih proteinov v vzorcih

Glede na kontrolni vzorec je bilo po stimulaciji z IL-4 povečano izločanje 145 proteinov, zmanjšano izločanje 153 in nespremenjeno izločanje 57 proteinov. Po stimulaciji z IL-10 je bilo povečano izločanje 249 proteinov, zmanjšano izločanje 97 in nespremenjeno izločanje 74 proteinov. Po stimulaciji z IL-13 je bilo povečano izločanje 297 proteinov, zmanjšano izločanje 89 in nespremenjeno izločanje 56 proteinov.

Ravni izločanja proteinov



Slika 10: Prikaz spremembe izločanja proteinov po stimulaciji z interlevkinimi. Izločanje detektiranih proteinov se je povišalo, zmanjšalo ali ostalo nespremenjeno.

V našo nadaljnjo analizo smo vključili tiste proteine, pri katerih je bilo število posnetih spektrov (spectral count ratio) glede na kontrolni vzorec je vsaj 3 krat povečano. Te proteine smo poimenovali proteini s signifikantno povečanim izražanjem in jih predstavili v rezultatih in uporabili za nadaljne analize. Seznam vseh teh proteinov se nahaja v Prilogi 1.

4.1. SEKRETORNI (IZVENCELIČNI) PROTEINI, S POVEČANIM IZLOČANJEM GLEDE NA POSAMEZEN INTERLEVKIN

Preglednica 6: Število proteinov s signifikatno povečanim izražanjem v sekretoru makrofagov U-937 po stimulaciji z interlevkinimi

Uporabljen interlevkin za stimulacijo	Število VSEH identificiranih proteinov s signifikatno povečanim izražanjem (MS/MS count)	Število SEKRETORNIH identificiranih proteinov s signifikatno povečanim izražanjem (MS/MS count)	Delež SEKRETORNIH proteinov s signifikantno povečanim izražanjem glede na vse signifikantno povečane proteine
IL-4	29	8	28 %
IL-10	57	10	18 %
IL-13	90	9	10 %

4.1.1 Seznam identificiranih SEKRETORNIH proteinov s signifikantno povečanim izražanjem (spektralno štetje) po stimulaciji makrofagov U-937 z interlevkinimi

Podatek o relativni številčnosti proteina dobimo z razmerjem posnetih spektrov določenega proteina glede na kontrolni vzorec. Vsak identificiran protein ima tudi pripadajočo vrednost PEP (verjetnost posteriorne napake), ki označuje zanesljivost identifikacije oz. verjetnost napačne identifikacije. Večja kot je, večja je verjetnost, da določena identifikacija ni pravilna.

Poleg imena ima vsak identificiran protein še UNIPROT kodo, ki je koda proteina v univerzalni zbirkki informacij o proteinih. Tam lahko pridobimo več informacij o sami zgradbi proteina, biološki funkciji, njegovi lokalizaciji v celici ipd.

Preglednica 7: Identificirani sekretorni proteini s signifikantno povečanim izražanjem po stimulaciji z IL-4

Razmerje spektralnega štetja	PEP vrednost	Ime identificiranega proteina	UNIPROT
8	3,95E-67	Verjetna serinska karboksipeptidaza CPVL	Q9H3G5
6	7.21E-12	Ribonukleaza 1	P07998
5.5	1.50E-184	Glukoza-6-fosfat izomeraza	B4DVJ0
5	0.003383	Defenzin	P59665
4	1.11E-65	Plazemska glutamat karboksipeptidaza	Q9Y646
3	1.78E-21	Atraktin	O75882-1
3	2.52E-08	Dermicidin	A5JHP3
3	9,12E-47	Sindekan-4	P31431

Preglednica 8: Identificirani sekretorni proteini s signifikantno povečanim izražanjem po stimulaciji z IL-10

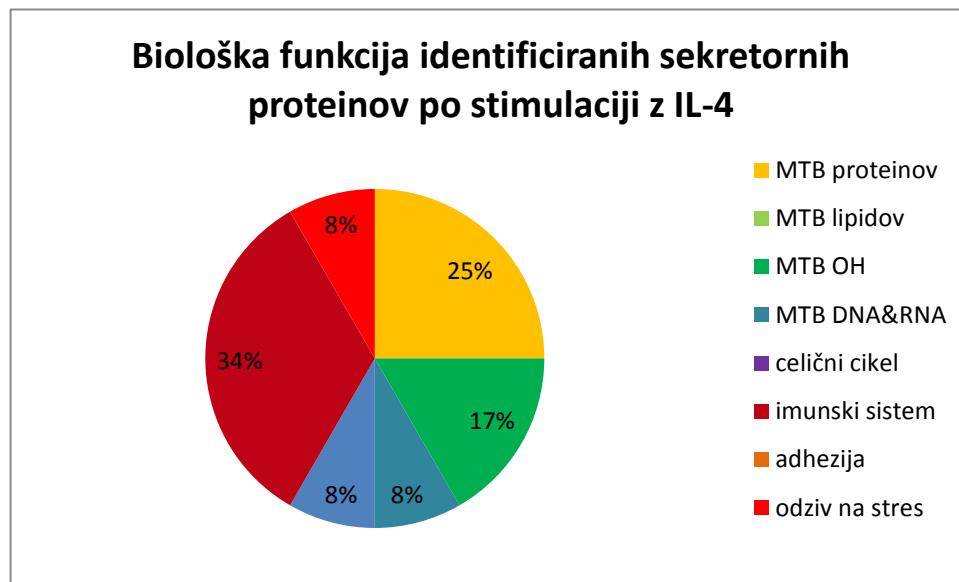
Razmerje spektralnega štetja	PEP vrednost	Ime identificiranega proteina	UNIPROT
14	1.00E-260	Alfa-1 proteazni inhibitor	P01009-1
9.5	1.50E-184	Glukoza-6-fosfat izomeraza	B4DVJ0
8	1.09E-05	Žilni endotelijski rastni dejavnik A	P15692-14
4	3,95E-67	Verjetna serinska karboksipeptidaza CPVL	Q9H3G5
3	3.63E-29	Zunajcelični protein matriksa 1	Q16610-4
3	2.76E-180	Quiescin Q6	O00391-1
3	1.11E-65	Plazemska glutamat karboksipeptidaza	Q9Y646
3	6.44E-13	Proteoglikan kostnega mozga	P13727
3	7.87E-78	A1 aktivator	P07602-2
3	1.55E-24	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 1 beta chain	P01024

Preglednica 9: Identificirani sekretorni proteini s signifikatno povečanim izražanjem po stimulaciji z IL-13

Razmerje spektralnega štetja	PEP vrednost	Ime identificiranega proteina	UNIPROT
19	2.76E-180	Quiescin Q6	O00391-1
13	1.50E-184	Glukoza-6-fosfat izomeraza	B4DVJ0
11	1.00E-260	Alfa-1 proteazni inhibitor	P01009-1
7	1.09E-05	Žilni endotelijski rastni dejavnik A	P15692-14
3	3,95E-67	Verjetna serinska karboksipeptidaza CPVL	Q9H3G5
3	3.63E-29	Zunajcelični matrični protein 1	Q16610-4
3	7.21E-12	Ribonukleaza 1	P07998
3	6,13E-19	Transformirajoči rastni faktor beta-1	P01137
3	7,21E-12	Nukleobindin-2	P80303-1

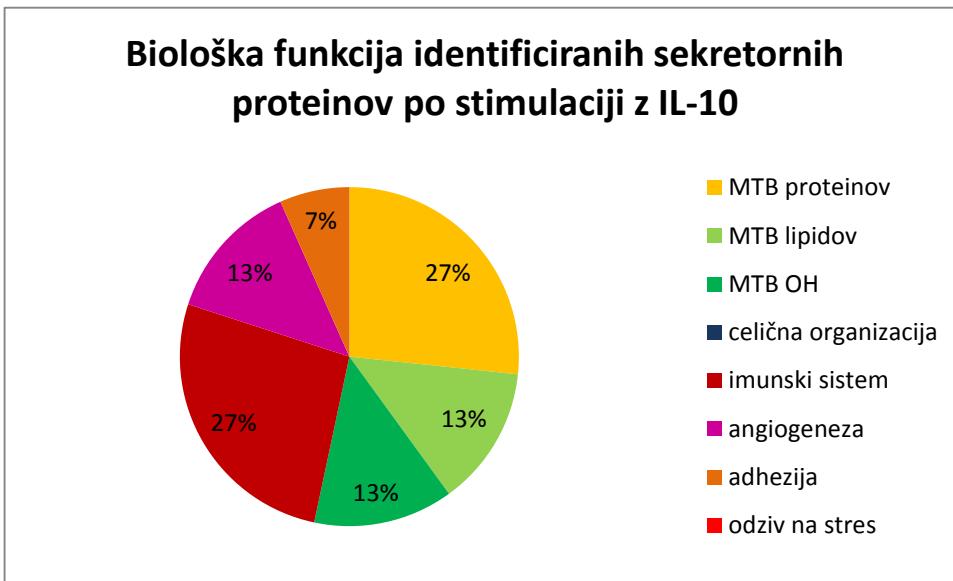
4.1.2. Identificirani sekretorni proteini s signifikantno povečanim izražanjem glede na biološko funkcijo po stimulaciji celic U-937 z interlevkini IL-4, IL-10 in IL-13

Po identifikaciji proteinov so nas zanimali njihove funkcije. Funkcije smo razdelili v 10 kategorij, ki jih prikazuje legenda na spodnjih tortnih diagramih. Kjer določena funkcijkska kategorija ni zastopana med proteini, tudi ni omenjena v legendi. Metabolno funkcijo smo razdelili v več podkategorij: metabolizem proteinov, metabolizem lipidov, metabolizem OH in metabolizem DNA in RNA. Anotacijo funkcije smo uvozili že pri obdelavi podatkov v Perseusu, nato sem funkcije posameznih sekretornih proteinov preverila še v UNIPROT univerzalni proteinski podatkovni bazi.



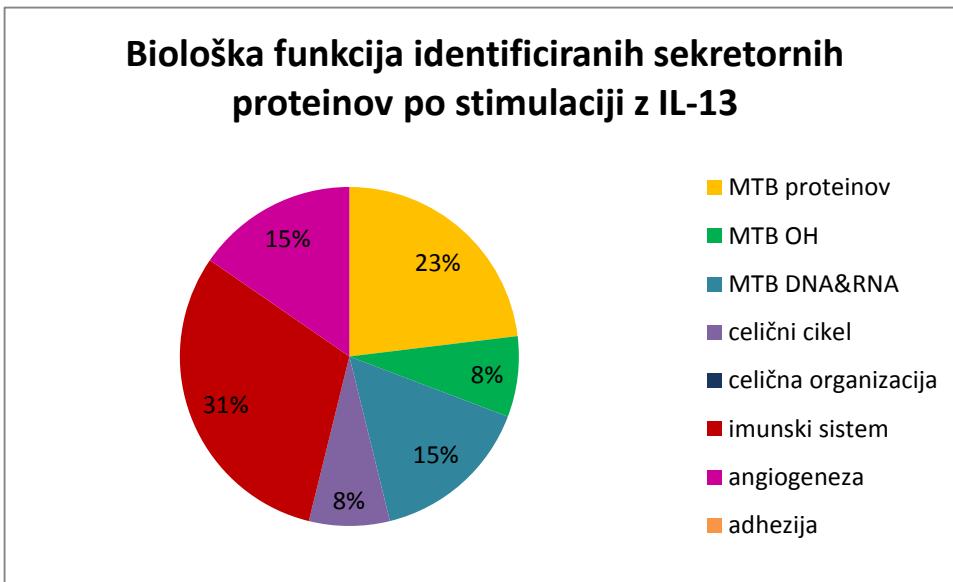
Slika 9: Stimulacija z interlevkinom IL-4

Tortni diagram prikazuje delitev identificiranih proteinov v sekretoru celic U-937 po stimulaciji celic z IL-4, glede na njihovo biološko funkcijo.



Slika 10: Stimulacija z interlevkinom IL-10

Tortni diagram prikazuje deleve identificiranih proteinov v sekretoru celic U-937 po stimulaciji celic z IL-10, glede na njihovo biološko funkcijo.



Slika 11: Stimulacija z interlevkinom IL-13

Tortni diagram prikazuje deleve identificiranih proteinov v sekretoru celic U-937 po stimulaciji celic z IL-13, glede na njihovo biološko funkcijo.

4.2. PROTEAZE S POVEČANIM IZLOČANJEM

Pri napredovanju in metastaziranju tumorja sodeluje več celičnih komponent, med katerimi so zelo pomembne proteaze. Njihova sposobnost razgrajevanja zunajceličnega matriksa je eden od mehanizmov invazivnosti raka. Vedno več pozornosti se namenja katepsinom, ki so bili dolgo poznani le kot lizosomske proteaze, zadnja leta pa se pojavljajo tudi kot izvencelične proteaze, ki so aktivne pri razgrajevanju zunajceličnega matriksa in pri razvoju drugih bolezenskih stanj (Turk, 2006). Zato smo se pri analizi rezultatov podrobno usmerili tudi na vse proteaze s povečanim izločanjem, najdene v vzorcih po stimulaciji z interlevkinimi.

Rezultati vsebujejo ime posamezna proteaze, razmerje posnetih spektrov glede na kontrolni vzorec, PEP vrednost in UNIPROT kodo.

4.2.1 Proteaze s povečanim izločanjem po stimulaciji z IL-4, IL-10 in IL-13

Preglednica 10: Proteaze s povečanim izločanjem po stimulaciji z IL-4

Razmerje spektralnega štetja	PEP vrednost	Ime proteaze	UNIPROT
8	3.95E-67	Verjetna serinska karboksipeptidaza CPVL	Q9H3G5
4	1.11E-65	Plazemska glutamat karboksipeptidaza	Q9Y646
3.1	7.26E-112	Katepsin C	P53634-1
3	7.44E-06	Kaspaza-14	P31944

Preglednica 11: Proteaze s povečanim izločanjem po stimulaciji z IL-10

Razmerje spektralnega štetja	PEP vrednost	Ime proteaze	UNIPROT
22	7.90E-25	Katepsin L	P07711
8	1.66E-30	Katepsin K	P43235
4	3.950E-67	Verjetna serinska karboksipeptidaza CPVL	Q9H3G5
3.1	1.93E-116	Tripeptidil-peptidaza I	O14773-1
3	1.11E-65	Plazemska glutamat karboksipeptidaza	Q9Y646
3	2.28E-11	Prolil endopeptidaza	P48147

Preglednica 12: Proteaze s povečanim izločanjem po stimulaciji z IL-13

Razmerje spektralnega štetja	PEP vrednost	Ime proteaze	UNIPROT
18	7.90E-25	Katepsin L	P07711
3	7.26E-112	Katepsin C	P53634-1
3	0.000244	Na puromicin občutljiva aminopeptidaza	P55786
3	6.78E-17	Tripeptidil peptidaza II	Q5VZU9

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1. RAZPRAVA

Namen diplomskega dela je bil določiti kvalitativne in kvantitativne spremembe sekretoma človeških makrofagov po predhodni stimulaciji s citokini IL-4, IL-10 in IL-13. Glede na ugotovitve dosedanjih raziskav s tega področja smo pričakovali, da bodo stimulirani makrofagi pod vplivom interlevkinov IL-4, IL-10 in IL-13 razvili M2 fenotip in bili po stimulaciji vir določenih sekretornih proteinov in predvsem cisteinskih katepsinov (Gocheva in sod., 2010). V znanstveni literaturi je bilo večkrat objavljeno, da stimulacija makrofagov s citokini poveča izločanje in aktivnost katepsinov (Lemaire in sod. 1997, Gocheva in sod. 2010). Cisteinski katepsi so po večini endopeptidaze, locirane v notranjosti celice ali v endosomskih veziklih. Cisteinski katepsi (kot sta CTSB in CTSL) se konstantno izražajo in sodelujejo pri proteinski razgradnji. Izražanje katepsinov je močno povišano pri mnogih vrstah raka. (Mohammed in Sloane, 2006). V raziskavi smo želeli ponoviti rezultate Johanne Joyce in sodelavcev iz leta 2010, kjer so ugotovili, da IL-4 inducira katepsinsko aktivnost v makrofagih. Poleg IL-4 smo v raziskavi uporabili še dva protivnetna interlevkina; IL-10 in IL-13 (tudi struktturna podobnost z IL-4).

V naših vzorcih smo skupno identificirali 482 proteinov. Od tega smo jih v sekretому kontrolnega vzorca, ki ni bil stimuliran z interlevkini, identificirali 381 proteinov. Delež proteinov, ki smo jih identificirali samo v sekretому z interlevkini stimuliranih celic (glede na vse identificirane proteine v vzorcih) je 21 % (101 protein). Največ proteinov (28), ki so bili najdeni samo v določenem vzorcu, smo identificirali v vzorcu sekretoma makrofagov, ki so bili stimularinai z IL-13. Pri stimulaciji z IL-4 je bilo teh proteinov 8, pri stimulaciji z IL-10 pa 6. Stimulacija z IL-13 je tako glede na identificirane proteine povzročila največje spremembe v sestavi sekretoma, mogoče tudi največje spremembe v celici.

Stimulacija z IL-13 je izzvala največ sprememb v sekretornem proteinskem profilu vzorca, saj smo tu našli največje število proteinov s povišanim izločanjem (90), kar je kar 61 več, kot v vzorcih stimuliranih z IL-4.

5.1.1 Identificirane proteaze s povišanim izločanjem

Med identificiranimi proteazami so nas najbolj zanimali katepsini. Katepsini so šele v zadnjih 20-ih letih postale bolj raziskane proteaze, saj se pojavlja vedno več dokazov o njihovi peptidazni aktivnosti zunaj celic in vpletenu v različna bolezenska stanja. Raziskave o delovanju katepsinov izven lizosomov in celic kažejo na njihovo pomembno vlogo v vnetju (Hannaford in sod., 2013).

V naših vzorcih so se pojavili trije cisteinski katepsini: **katepsin C** (CTSC), **katepsin K** (CTSK) in **katepsin L** (CTSL). CTSC je bil povišan po stimulaciji z IL-4 in IL-13, CTSK po stimulaciji z IL-10, ter CTSL po stimulaciji z IL-10 in IL-13. Vsi trije proteini so zaenkrat kategorizirani še kot lizosomski proteini (vir: UNIPROT), vendar se pojavlja vedno več dokazov, da lahko delujejo tudi zunaj celic (Joyce in Hanahan, 2004, Hashimoto in sod. 2006, Fonović in Turk, 2014a).

5.1.2. Proteaze in vnetje

Raziskave o delovanju katepsinov izven lizosomov in celic kažejo na njihovo pomembno vlogo v vnetju (Hannaford in sod., 2013). Glede na funkcijo, največji delež proteinov, identificiranih v sekretoru celic po stimulaciji z interlevkini, predstavljajo proteini imunskega sistema (slike 11,12 in 13). Glede na funkcije identificiranih proteinov v naši raziskavi lahko predpostavimo, da interlevkini vplivajo na vnetne procese v celici.

5.1.3 Vpliv na tumorigenezo

Med proteini s povišanim izločanjem smo našli take, ki spodbujajo tumorigenezo in pospešujejo metastaziranje tumorja. To so proteini, ki sodelujejo pri razraščanju žil, spodbujajo invazivnost celic in pospešujejo rast. Vse to so procesi, ki se odvijajo v mikrookolju tumorja in so potrebni za razvoj in razrast tumorjev.

Glukoza-6-fosfat izomerazo ali nevrolevkin izločajo tudi tumorske celice, kjer se imenuje avtokrini dejavnik gibljivosti tumorskih celic (angl. Tumor cell autocrine motility factor) in stimulira metastaziranje (Watanabe H. In sod. 1993). Povišano izločanje glukoze-6-fosfat izomeraze smo našli pri vzorcih celic stimuliranih s IL-4, IL-10 in IL-13.

Receptor za stimulirajoči dejavnik makrofagnih kolonij (CSF-1R) je bil signifikantno povišan v vzorcih stimuliranih z IL-10 in IL-13. Povišano izločanje CSF-1R skupaj z stimulirajočim dejavnikom makrofagnih kolonij (CSF-1) lahko pospeši delitev rakavih celic, njihovo invazivnost in tvorbo metastaz (Lin in sod. 2001).

5.2. SKLEPI

- Po primerjavi profila proteinov v posameznih vzorcih smo ugotovili, da se največ identificiranih proteinov prekriva v vzorcih IL-10 in IL-13, kjer smo našli kar 34 enakih proteinov, ki niso bili prisotni v kontrolnem vzorcu (slika 9). Glede na profil analiziranih proteinov so si sekretomi makrofagov po stimulaciji z IL-10 in IL-13 bolj podobni kot v primerjavi z IL-4.
- Stimulacija celic z interlevkini povzroči povišano izločanje proteinov imunskega sistema. Lahko sklepamo, da stimulacija celic z interlevkini 4, 10 in 13 vpliva na vnetne procese v celicah.
- Glede na profil identificiranih proteinov in njihove funkcije (imunski sistem, angiogeneza, celična rast) sklepamo, da stimulacija z izbranimi interlevkini lahko privede do sprememb okolja, ki bi ugodno delovale na razvoj in rast tumorjev.
- Lahko potrdimo našo hipotezo, da je stimulacija z interlevkini povzročila izločanje katepsinov in ostalih proteaz.
- Ne moremo potrditi naše hipoteze, da so izbrani interlevkini sprožili M2 polarizacijo makrofagov, saj nismo identificirali nobenih pogosto omenjenih M2 markerjev (CD68, CD206, CD163).
- Ena biološka ponovitev je premalo, za bolj zanesljive rezultate bi bilo potrebno izvesti vsaj dve ali tri.

6. VIRI

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science, 1313-1363

Balce D.R., Li B., Allan E.R., Rybicka J.M., Krohn R.M., Yates R.M. 2011. Alternative activation of macrophages by IL-4 enhances the proteolytic capacity of their phagosomes through synergistic mechanisms. *Blood*, 118: 4199-4208

Choi H., Fermin D., Nesvizhskii A.I. 2008. Significance Analysis of Spectral Count Data in Label-free Shotgun Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7: 2373–2385

Egeblad M., Nakasone E.S., Werb Z. 2010. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell*, 18: 884-901

Fonović M., Turk B. 2014a. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochimica et biophysica acta*, 1840: 2560-2570

Fonović M., Turk B. 2014b. Cysteine cathepsins and their potential in clinical therapy and biomarker discovery. *Proteomics. Clinical applications*, 00: 1–11

Gocheva V., Wang H.W., Gadea B.B., Shree T., Hunter K.E., Garfall A.L., Berman T., Joyce J.A. 2010. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes & Development*, 24: 241-255

Gordon S., Martinez F.O. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. European journal of immunology, 41: 2470-2472

Gout S., Huot J. 2008. Role of cancer microenvironment in metastasis: Focus on colon cancer. Cancer Microenvironment, 1: 69–83

Hannaford J., Guo H., Chen X. 2013. Involvement of cathepsins B and L in inflammation and cholesterol trafficking protein NPC2 secretion in macrophages. Obesity, 21: 1586-1595

Hashimoto Y., Kondo C., Kojima T., Nagata H., Moriyama A., Hayakawa T., Katunuma N. 2006. Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals, 21: 217-224

Joyce J.A., Hanahan D. 2004. Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. Cell Cycle, 3: 1516–1619

Joyce J.A., Pollard J.W. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. Nature Reviews Cancer, 9: 239-252

Lemaire R., Huet G., Zerimech F., Grard G., Fontaine C., Duquesnoy B., Flipo RM. 1997. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. British journal of rheumatology, 36: 735-743

Lin E.Y., Nguyen A.V., Russell R.G., Pollard J.W. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *Journal of experimental medicine*, 193: 727-740

Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25: 677–686

Minty A., Chalon P., Derocq J.M., Dumont X., Guillemot J.C., Kaghad M., Labit C., Leplatois P., Liauzun P., Miloux B., Minty A., Casellas P., Loison G., Lupker J., Shire D., Ferrara P., Caput D. 1993. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362: 248-250

Mohamed M.M., Sloane B.F. 2006. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6: 764-775

Moore K.W., de Waal Malefydt R., Coffman R.L., O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19: 683-765

Mosser D.M. 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*, 73: 209–212

Mosser D.M., Edwards J.P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, 8: 958-969

O'Brien J., Schedin P. 2009. Macrophages in Breast Cancer: Do Involution Macrophages Account for the Poor Prognosis of Pregnancy-Associated Breast Cancer? *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 14: 145–157

Purwar R., Kraus M., Werfel T., Wittmann M. 2008. Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *Journal of investigative dermatology*, 128: 59-66

Rickard A.J. and Young M.J. 2009. Corticosteroid receptors, macrophages and cardiovascular disease. *Journal of molecular endocrinology*, 42: 449-459

Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., Geginat J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews*, 21: 331-344

Sica A., Mantovani A., Allavena P., Solinas G., Rubino L., Larghi P., Mancino A. 2012. Tumor-Associated Macrophages. V: *Encyclopedia of Cancer*, 3rd ed. Schwab M. (eds.). Heidelberg, Springer: 3808-3812.

Sloane B. F., Dunn J.R., Honn K.V. 1981. Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. *Science*, 212: 1151-1153

Steen H., Mann M. 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5: 699-711

Stein M., Keshav S., Harris N., Gordon S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of experimental medicine*, 176: 287-292

Stout R.D., Suttles J. 2004. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *Journal of leukocyte biology*, 76: 509-513

Stout R.D., Jiang C., Matta B., Tietzel I., Watkins S.K., Suttles J. 2005. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *Journal of immunology*, 175: 342-349

Turk B. 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5: 785-799

Turk V., Turk B., Turk D. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO journal*, 20: 4629–4633

Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et biophysica acta*, 1824: 68-88

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1.izd. Ljubljana, Založba DZS: 552 str.

Wang H.W., Joyce J.A. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: Priming for protumoral functions. 2010. *Cell Cycle*, 9: 4824-4835

Watanabe H., Takehana K., Date M., Shinozaki T., Raz A. 1996. Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Research*. 56: 2960–2963

Wirth J.J., Kierszenbaum F., and Zlotnik A. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). 1989. *Immunology*, 66: 296–301

Xue H., Lu B., Lai M. The cancer secretome: a reservoir of biomarkers. 2008. *Journal of Translational Medicine*, 6: 52

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila mentorju, prof. dr. Borisu Turku, za možnost opravljanja diplomske naloge in njegov dragocen čas, ter somentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu za vso pomoč.

Zahvaljujem se tudi mojemu delovnemu mentorju asst. prof. Marku Fonoviču za vodenje, zaupanje in možnost pridobivanja novega znanja.

Hvala dr. Barbari Sobotič za vso njeno pomoč in dobro voljo.

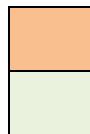
Posebna zahvala gre dr. Mateju Vizovišku za dolge ure v laboratoriju, za znanja, ki mu jih nikdar ni bilo težko predati in za njegov poseben, a nepogrešljiv humor.

Zahvaljujem se recenzentu, prof. dr. Petru Mačku za hiter in temeljit pregled diplomske naloge in predsednici komisije za zagovor, prof. dr. Darji Žgur Bertok za vse napotke.

Največja zahvala gre mojima staršema, za njuno večno in brezpogojno podporo ter optimizem, bratu za opominjanje in Janu za prenašanje mojega tarnanja in preprosto zato ker si bil ves čas ob meni.

Hvala!

PRILOGA 1: Seznam vseh proteinov s povečanim izločanjem po stimulaciji z IL-4, IL-10 in IL-13



- proteini s 3 ali večkrat povečanim izločanjem po stimulaciji z vsemi tremi interlevkini (4,10 in 13)
- proteini s 3 ali večkrat povečanim izločanjem po stimulaciji samo z enim interlevkinom

Razmerje spektralnega štetja ≥ 3			PEP vrednost	Ime proteina	Ime gena	Uniprot koda
IL-4	IL-10	IL-13				
✓	✓	✓	0	Cytosolic thyroid hormone-binding protein	OIP3;PK2;PK3;PKM;PKM2	P14618-1
	✓	✓	0	Actinin alpha 1 isoform 3	ACTN1	B7TY16
	✓	✓	1,00E-260	Alpha-1 protease inhibitor	AAT;PI;PRO0684;PRO2209	P01009-1
✓	✓	✓	1,50E-184	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	B4DVJ0
	✓	✓	2,76E-180	Quiescin Q6	QSCN6;QSOX1	O00391-1
✓	✓		9,94E-153	cDNA FLJ54303, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1		B4DFN9
	✓	✓	2,73E-134	Talin-1	KIAA1027;TLN;TLN1	Q9Y490
		✓	2,68E-122	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP;CAP1	Q01518-1
✓	✓	✓	5,48E-118	Catalase;Similar to catalase	CAT	P04040
	✓	✓	1,93E-116	Cellular thyroid hormone-binding protein	ERBA2L;P4HB;PDI	P07237
✓		✓	7,26E-112	Cathepsin C	CPPI;CTSC	P53634-1
	✓	✓	2,00E-86	CALNUC;Nucleobindin-1	NUC;NUCB1	Q02818
	✓		7,87E-78	A1 activator;Cerebroside sulfate activator;Co-beta-glucosidase	GLBA;PSAP	P07602-2
		✓	8,12E-73	Coronin-1A	CORO1;CORO1A	P31146
	✓	✓	4,99E-72	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	P11413-2
✓	✓	✓	1,02E-71	p195;Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGAP1;KIAA0051	P46940

se nadaljuje

nadaljevanje priloge 1

Razmerje spektralnega štetja ≥3			PEP vrednost	Ime proteina	Ime gena	Uniprot koda
IL-4	IL-10	IL-13				
✓			5,55E-71	Macrophage fusion receptor	BIT;MFR;MYD1	P78324-2
✓	✓	✓	3,95E-67	Carboxypeptidase, vitellogenin-like	CPVL;PSEC0124	Q9H3G5
		✓	2,30E-66	Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 1	GDI1;GDIL;OPHN2	P31150
✓	✓		1,11E-65	Plasma glutamate carboxypeptidase	PGCP	Q9Y646
		✓	5,69E-62	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1;HNRPA2B1	P22626-1
	✓		1,92E-59	Heme-binding protein 2;Placental protein 23	C6orf34;HEBP2;SOUL	Q9Y5Z4-1
	✓		1,87E-51	Ras-related protein Rab-7a	RAB7;RAB7A	P51149
✓			9,12E-47	Amphiglycan	SDC4;hCG_38363	P31431
		✓	2,16E-46	Metavinculin	VCL;RP11-178G16.3-002	P18206-1
✓	✓		2,08E-44	Hemidesmosomal protein 1;Plectin-1	PLEC1;hCG_1994702	Q15149-1
	✓	✓	6,52E-41	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor;Proto-oncogene c-Fms;Tyrosine-protein kinase receptor;CSF1R protein	CSF1R;FMS	P07333
		✓	1,31E-39	Ras-related protein Rab-2A	RAB2;RAB2A;RAB2B	P61019
	✓	✓	2,59E-39	80K-H protein;Glucosidase 2 subunit beta	G19P1;PRKCSH	P14314
✓		✓	7,21E-39	ABPP;Alzheimer disease amyloid protein	A4;AD1;APP	P05067-1
		✓	5,13E-37	eEF-1B gamma;Elongation factor 1-gamma	EEF1G;EF1G;PRO1608	P26641
		✓	3,67E-36	Cytovillin;Ezrin;p81;Villin-2;cDNA	EZR;VIL2	P15311
	✓	✓	6,48E-36	Biliverdin reductase B;Biliverdin-IX beta-reductase	BLVRB;FLR	P30043
✓			9,70E-34	Chondroitinsulfatase;Galactose-6-sulfate sulfatase	GALNS;FLJ00319	P34059
✓	✓	✓	1,36E-33	Acid ceramidase	ASAHC;ASAHC1;HSD33;HSD-33	Q13510-2

se nadaljuje

nadaljevanje priloge 1

Razmerje spektralnega štetja ≥3			PEP vrednost	Ime proteina	Ime gena	Uniprot koda
IL-4	IL-10	IL-13				
		✓	1,61E-32	Alanine-serine/cysteine/threonine transporter 1;Neutral amino acid transporter A	ASCT1;SATT;SLC1A4	P43007
✓	✓		1,69E-32	Beta-galactosidase	GLB1;ELNR1	B7Z6Q5
	✓	✓	7,53E-32	Signal recognition particle 19 kDa protein	SRP19;hCG_2039564	P09132
✓			1,66E-30	Cathepsin K	CTSK;CTSO;CTSO2	P43235
		✓	1,32E-29	Baboon M7 virus receptor;Neutral amino acid transporter B	ASCT2;M7V1;RDR	Q15758
✓	✓		3,63E-29	Extracellular matrix protein 1;Secretory component p85	ECM1	Q16610-4
		✓	6,00E-29	Adipocyte lipid-binding protein	FABP4	P15090
		✓	1,28E-28	Prefoldin subunit 2	HSPC231;PFD2;PFDN2	Q9UHV9
✓	✓		1,09E-27	Long-chain acyl-CoA synthetase 4	ACS4;ACSL4;FACL4;LACS4	O60488-1
✓	✓	✓	2,52E-26	Acyl-coenzyme A	CES1;CES2;SES1	P23141-2
✓	✓		7,90E-25	Cathepsin L1	CTSL;CTSL1	P07711
		✓	1,55E-24	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 1	C3;CPAMD1	P01024
		✓	5,01E-24	MLC-2A;Myosin regulatory light chain 12B	MRLC2;MYL12B	O14950
		✓	9,33E-24	94 kDa glucose-regulated protein;Endoplasmic	GRP94;HSP90B1	P14625
✓			1,78E-21	Attractin	ATRN;KIAA0548;MGCA	O75882-1
✓	✓	✓	2,19E-21	Tropomodulin-3	TMOD3;DKFZp686E1899	Q9NYL9
		✓	2,44E-20	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2;cDNA FLJ75154	HNRNPC;HNRPC	P07910-1
✓			3,20E-20	Alternative-splicing factor 1	ASF;OK/SW-cl.3	Q07955-2
✓			1,30E-19	Cell growth-inhibiting gene 1 protein	CLN2;GIG1;TPP1	O14773-1
✓			1,41E-19	cDNA FLJ76863, highly similar to Homo sapiens stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	A8K690

se nadaljuje

nadaljevanje priloge 1

Razmerje spektralnega štetja ≥3			PEP vrednost	Ime proteina	Ime gena	Uniprot koda
IL-4	IL-10	IL-13				
		✓	5,61E-19	Actin-like protein 3	ACTR3;ARP3;hCG_26669	P61158
		✓	6,13E-19	Latency-associated peptide;Transforming growth factor beta-1	TGFB;TGFB1	P01137
	✓		3,99E-18	Macropain epsilon chain	LMPX;MB1;PSMB5;X	P28074-1
✓			8,96E-18	Protein tyrosine phosphatase	hCG_1811178;PTPRC	B1ALS2
		✓	3,88E-17	A6-related protein	MSTP011;PTK9L	Q6IBS0
	✓	✓	6,78E-17	Nucleolar protein 56	NOL5A;NOP56	O00567
		✓	1,10E-16	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A;EEF1A1	P68104
		✓	1,46E-16	Puromycin-sensitive aminopeptidase;cDNA FLJ39390 fis	NPEPPS;PSA;NPEPPSL1	P55786
		✓	2,21E-16	Elongation factor 2;EEF2 protein	EEF2;EF2	P13639
		✓	3,67E-16	Small nuclear ribonucleoprotein G-like protein	PBSCG;SNRPG	A8MWD9
		✓	1,29E-15	Ras-related protein Rab-1A;YPT1-related protein;cDNA, FLJ96558	RAB1;RAB1A	P62820-1
✓			1,38E-15	EndoCAM;GPIIA;PECA1;Platelet endothelial cell adhesion molecule	PECAM1	P16284-1
	✓		2,50E-14	Post-proline cleaving enzyme;Prolyl endopeptidase	PEP;PREP	P48147
		✓	2,79E-13	Nucleoprotein TPR	TPR;Tpr;tpr	P12270
		✓	3,29E-13	Actin-depolymerizing factor;Destrin;cDNA FLJ52030, highly similar to Destrin	ACTDP;DSN	P60981
	✓		6,44E-13	Bone marrow proteoglycan;Eosinophil granule major basic protein	MBP;PRG2	P13727
✓	✓	✓	3,21E-12	Alcadein-alpha;Alzheimer-related cadherin-like protein;Calsyntenin-1	CLSTN1;CS1;KIAA0911	O94985-1
✓		✓	7,21E-12	HP-RNase;RIB-1;Ribonuclease 1	RIB1;RNASE1;RNS1	P07998
		✓	8,38E-12	CCT-delta;Stimulator of TAR RNA-binding	CCT4;CCTD;SRB	P50991
✓			1,84E-11	Immunoglobulin alpha Fc receptor;CD89_U13;CD89_U11;CD89_U06	CD89;FCAR	P24071-6

se nadaljuje

nadaljevanje priloge 1

Razmerje spektralnega štetja ≥3			PEP vrednost	Ime proteina	Ime gena	Uniprot koda
IL-4	IL-10	IL-13				
	✓	✓	2,28E-11	Protein disulfide isomerase P5;Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6;TXNDC7	Q15084-2
	✓	✓	3,63E-11	Putative uncharacterized protein ARPC4;Actin-related protein 2/3	ARPC4;ARC20	E7ETI0
		✓	8,11E-11	cDNA FLJ53028, highly similar to Ras-related protein Rab-8A;Oncogene c-mel	MEL;RAB8;RAB8A	B4DEK7
	✓		1,57E-10	cDNA FLJ52364, highly similar to Heat-shock protein 105 kDa	hCG_32198;HSPH1	B4DYH1
		✓	4,40E-10	Alpha-CP1;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1	PCBP1;hCG_1776997	Q15365
		✓	6,69E-10	Ras-related protein Rap-1b-like protein;GTP-binding protein smg p21B	OK/SW-cl.11;RAP1B	A6NIZ1
		✓	7,02E-10	Fermitin family homolog 3;Kindlin-3;MIG2-like protein	FERMT3;KIND3;MIG2B;URP2	Q86UX7-1
		✓	7,12E-10	UV excision repair protein RAD23 homolog B	RAD23B;RP11-131A5.1-002	P54727
		✓	2,69E-09	Ubiquitin carrier protein;p18;SUMO-conjugating enzyme UBC9	LA16c-358B7.1-006	B0QYN7
✓	✓	✓	3,47E-09	300 kDa mannose 6-phosphate receptor	IGF2R;MPRI;igf2R	P11717
	✓		5,72E-09	25 kDa FK506-binding protein	FKBP25;FKBP3	Q00688
		✓	2,30E-08	Leukemia-associated phosphoprotein p18;Metablastin;Oncoprotein 18	LAP18;OP18;STMN1	P16949-2
✓			2,52E-08	Dermcidin isoform 2;DCD-1;Dermcidin	DCD;AIDD;DSEP	A5JHP3
		✓	3,44E-08	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ARC21;ARPC3	O15145
		✓	9,32E-08	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3;HNRPA3	P51991-1
		✓	1,03E-07	Archain 1, isoform CRA_a	ARCN1;hCG_40220	B0YIW6
	✓	✓	1,08E-07	Glycine- and tyrosine-rich RNA-binding protein	HNRPQ;NSAP1	O60506-1
		✓	1,94E-07	cDNA FLJ60076, highly similar to ELAV-like protein 1	ELAVL1;HUR	B4DVB8
		✓	2,77E-07	High mobility group protein 2a;High mobility group protein 4	HMG2A;HMG4	O15347
✓			3,04E-07	Niemann-Pick C1 protein;cDNA FLJ57114	NPC1	O15118

se nadaljuje

nadaljevanje priloge 1

Razmerje spektralnega štetja ≥3			PEP vrednost	Ime proteina	Ime gena	Uniprot koda
IL-4	IL-10	IL-13				
	✓	✓	6,07E-07	CROC-1;TRAF6-regulated IKK activator 1 beta Uev1A	CROC1;P/OKcl.19	Q13404-1
		✓	1,09E-06	DNA-binding protein NEFA;Gastric cancer antigen Zg4;Nucleobindin-2	NEFA;NUCB2	P80303-1
✓			1,67E-06	Extended synaptotagmin-1	ESYT1;FAM62A	Q9BSJ8-2
	✓		2,41E-06	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R;cDNA, FLJ93632	HNRRNPR;HNRPR	O43390-2
✓			2,51E-06	Putative uncharacterized protein PSME1	PSME1;IFI5111;hCG_40175	A6NJG9
	✓		5,74E-06	Tripeptidyl peptidase II	RP11-29B2.2-002;TPP2	Q5VZU9
✓			7,44E-06	Caspase-14	CASP14;hCG_38589	P31944
	✓	✓	1,09E-05	Vascular endothelial growth factor A	VEGF;VEGFA	P15692-14
✓			1,15E-05	CD11 antigen-like family member A;Integrin alpha-L	CD11A;ITGAL;hCG_18670	P20701-2
	✓	✓	1,22E-05	cDNA FLJ54776, highly similar to Cell division control protein 42 homolog	CDC42;RP1-224A6.5-004	B4E1U9
✓			2,16E-05	Cyclin-A/CDK2-associated protein p19	EMC19;OCP2	E5RJR5
✓			2,36E-05	Low-density lipoprotein receptor	LDLR;ldlr	P01130
	✓		7,41E-05	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3;snRNP core protein D3	SNRPD3	P62318
	✓		0,00010083	Importin subunit beta-3	IPO5;KPNB3;RANBP5	O00410-3
✓			0,00010245	Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal	EIF1AY;EIF1A	O14602
	✓		0,00010767	Protein mago nashi homolog 2	MAGOH2	Q96A72
✓	✓		0,00017168	LIM and SH3 domain protein 1;Metastatic lymph node gene 50 protein	LASP1;MLN50	Q14847-1
	✓		0,00023144	cDNA FLJ90628 fis	CLN5	B3KQK7
	✓		0,0002443	51 kDa FK506-binding protein highly similar to Homo sapiens FK506 binding protein 4, 59kDa (FKBP4), mRNA	FKBP4;FKBP52	Q02790
✓	✓		0,0004952	Rho cDNA clone 12;Transforming protein RhoA	ARH12;ARHA;RHO12;RHOA	P61586

se nadaljuje

nadaljevanje priloge 1

Razmerje spektralnega štetja ≥3			PEP vrednost	Ime proteina	Ime gena	Uniprot koda
IL-4	IL-10	IL-13				
✓			0,00072334	Galactoglycoprotein;Leukocyte sialoglycoprotein;Leukosialin;Sialophorin	CD43;SPN;hCG_21624	P16150
	✓		0,0011276	Death receptor 6	DR6;TNFRSF21	O75509
	✓		0,0016022	cDNA FLJ13982 fis	RO60;SSA2	B3KN94
	✓		0,0017229	28 kDa heat shock protein	HSP27;HSP28;HSPB1	P04792
	✓		0,0019346	60 kDa poly(U)-binding-splicing factor	FIR;PUF60;ROBPI	Q9UHX1-1
	✓		0,0027316	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	ADSS;ADSS2	P30520
✓			0,0033832	Defensin, alpha 1;HNP-1	DEF1;DEFA1	P59665
✓			0,0041462	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	GNG5;GNGT5	P63218
		✓	0,0059	CD49 antigen-like family member E;Fibronectin receptor subunit alpha	FNRA;ITGA5	P08648
		✓	0,0061884	DEAD box protein 21;Gu-alpha;Nucleolar RNA helicase 2	DDX21;OK/SW-cl.65	Q9NR30-1
		✓	0,01899	Double-stranded RNA-binding protein 76;Interleukin enhancer-binding factor 3	DRBF;ILF3;MPHOSPH4	F4ZW65
		✓	0,033831	ADP-ribosylation factor 6;ARF6 protein	ARF6;hCG_2013574	P62330