

Biološki i tehnički izvori varijacija u sekvenciranju transkriptoma tkiva štitnjače

Aliti, Đilferije

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:622273>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Điljferije Aliti

**BIOLOŠKI I TEHNIČKI IZVORI
VARIJACIJA U SEKVENCIRANJU
TRANSKRIPTOMA TKIVA ŠTITNJAČE**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Đilferije Aliti

**BIOLOŠKI I TEHNIČKI IZVORI
VARIJACIJA U SEKVENCIRANJU
TRANSKRIPTOMA TKIVA ŠTITNJAČE**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za nuklearnu medicinu i onkologiju.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Mario Štefanić

Rad ima 37 listova, 4 tablice i 11 slika.

Predgovor

Veliko hvala mom mentoru izv. prof. dr. sc. Mariu Štefaniću na svakom savjetu i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala što je uvijek bio dostupan i što je imao odgovor na svako pitanje. Bila mi je čast izraditi ovaj diplomski rad pod njegovim vodstvom.

Diplomski rad posvećujem svojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje i koji su mi bili podrška u svakom trenutku.

Hvala mojim sestrama i bratu što su bili uz mene kada je bilo teško i nisu mi dali da odustanem.

Hvala mojim kolegicama s kojima sam zajedno prolazila kroz sve i koje su u svako doba dana i noći bile dostupne da poslušaju, daju savjet i pomognu. S njima je studiranje bilo lakše i ljepše.

Hvala najjačoj osobi koju poznajem, mom Filipu. Hvala što je svaki dan slušao sve što me muči. Hvala što me uvijek znao razveseliti i smiriti. Hvala što je bio uz mene i kad je njemu bilo teže nego meni. Hvala mu na svakom zajedničkom smijanju i plakanju. Hvala što smo prolazili zajedno kroz ovo divno putovanje.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. ŠTITNJAČA..... | 1 |
| 1.1.1. Bolesti štitnjače : hipotireoza i hipertireoza | 1 |
| 1.1.2. Hashimotov tiroiditis | 2 |
| 1.1.3. Epidemiološki značaj..... | 2 |
| 1.2. Sekvenciranje RNK – osnove..... | 3 |
| 1.2.1. Ograničenja transkripcijskog profiliranja sekvenciranjem RNK | 4 |
| 2. HIPOTEZA | 6 |
| 3. CILJEVI | 7 |
| 4. MATERIJAL I METODE..... | 8 |
| 4.1. Ustroj studije..... | 8 |
| 4.2. Ispitanici (selekcija knjižnica) | 8 |
| 4.3. Zbunjujući čimbenici | 10 |
| 4.4. Kontrola kvalitete | 11 |
| 4.5. Normalizacija ekspresije..... | 12 |
| 4.6. Povezanost zbunjujućih čimbenika s transkripcijskim varijacijama. | 12 |
| 4.7. Interpretacija bioloških procesa povezanih sa zbunjujućim čimbenicima | 12 |
| 4.8. Statistička analiza | 13 |
| 5. REZULTATI | 14 |
| 5.1. Deskriptivna analiza | 14 |
| 5.2. Analiza transkripcijske varijabilnosti tkiva štitnjače | 18 |
| 5.3. Ekstrakcija metagena i analiza bioloških putova..... | 23 |
| 6. RASPRAVA..... | 26 |
| 7. ZAKLJUČCI | 28 |
| 8. SAŽETAK..... | 29 |
| 9. SUMMARY | 30 |
| 10. LITERATURA..... | 31 |
| 11. ŽIVOTOPIS | 37 |

POPIS KRATICA

ctr – kontrole

DTHHRDY – agonalna Hardy kategorija

GO BP – engl. *Gene Ontology Biological Pathways*

gRNK – glasnička ribonukleinska kiselina

GTE_x – engl. *The Genotype – Tissue Expression* projekt

HGNC – engl. *HUGO Gene Nomenclature Committee*

HT – Hashimotov tiroiditis

IQR – interkvartilni raspon

KEGG – Kyoto enciklopedija gena i genoma (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

MG – metagen

MSigDB – engl. *The Molecular Signatures Database*

NF κ B – nuklearni čimbenik faktor kappa B

NGS – sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *Next Generation Sequencing*)

NMF – faktorizacija nenegativnih matrica

NRF2 – engl. *nuclear factor erythroid-related factor 2*

PAX – vrijeme provedeno u PAX fiksativu

PC – glavna komponenta (engl. *principal component*)

RIN – engl. *RNA Integrity Number*

RNASeq – RNK sekvenciranje

RNK – ribonukleinska kiselina

SMMPPD – ukupan broj mapiranih očitavanja

SMNTERRT – proporcija intergenskih očitavanja

SMRRNANM – udio ribosomske RNK

TISH – vrijeme ishemije

TMM – engl. *Trimmed Mean of M-values*

TNF – čimbenik nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*)

TSH – tireostimulin (engl. *Thyroid Stimulating Hormone*)

POPIS TABLICA

| | |
|--|----|
| Tablica 1. Popis zbunjujućih čimbenika, <i>The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project</i> | 9 |
| Tablica 2. Mjere kontrole kvalitete, sekvenciranje RNK, <i>The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project</i> , tkivo štitnjače (228 uzoraka) | 10 |
| Tablica 3. Demografska obilježja donora i tehničke karakteristike uzoraka | 14 |
| Tablica 4. Opis metagena (MG), njihovih komponenti i poveznica s dendrogramom tkivnih uzoraka | 23 |

POPIS SLIKA

| | |
|--|----|
| Slika 1. Izolacija glasničke RNK pomoću poli d(T) magnetskih kuglica | 3 |
| Slika 2. Demografska, tehnička i transkripcijska varijabilnost uzoraka. Hijerarhijsko grupiranje na temelju sličnosti ekspresijskog profila | 15 |
| Slika 3. Kanonička korelacijska analiza, s prikazom grupiranja neortogonalnih varijabli. | 16 |
| Slika 4. Korelogram, mjere kvalitete RNK u ovisnosti o trajanju ishemije (TISH) i stupnju autolize | 16 |
| Slika 5. Hijerarhijsko grupiranje uzoraka na temelju sličnosti ekspresijskog profila | 18 |
| Slika 6. Razlike u distribuciji zbunjujućih čimbenika, dendrogram, grana 2 vs. 3 | 19 |
| Slika 7. Razlike u distribuciji zbunjujućih čimbenika, dendrogram, grana 4 vs. 5 | 19 |
| Slika 8. Faktorizacija nenegativnih matrica, 1000 najvarijabilnijih gena | 20 |
| Slika 9. Kofenetički koeficijent i silueta za faktorizacijski rang 2-5, 100 inicijacija, Brunet algoritam | 20 |
| Slika 10. Doprinos ispitivanih čimbenika u transkripcijskoj varijabilnosti | 21 |
| Slika 11. Ekstrakcija transkripcijskih programa. Dominantni metageni u svakom tkivnom uzorku i njihova podudarnost s biološkim i tehničkim obilježjima | 22 |

1. UVOD

1.1. ŠTITNJAČA

Štitnjača je endokrina žlijezda s unutarnjim izlučivanjem koja je smještena u donjem dijelu vrata, s prednje strane. Sastoji se od lijevog i desnog režnja koje spaja istmus, tanki dio leptirastog oblika (1, 2). Temeljna fiziološka uloga štitnjače je proizvodnja i lučenje hormona, tiroksina (T4), trijodtironina (T3) i kalcitonina. Za sintezu T4 i T3 potreban je jod. Štitnjača jod dobiva oksidacijom jodida iz krvne plazme, koji tireociti unose iz arterijske krvi (2). Glavni izvor joda je prehrana. T3 i T4 najvažniji su hormoni štitnjače i oni djeluju na povećanje metaboličke aktivnosti svih tkiva u organizmu. Osim toga hormoni štitnjače djeluju na rast, razvoj i mnoge specifične tjelesne funkcije putem metabolizma masti i ugljikohidrata (3). Bolesti štitnjače često prati poremaćaj u lučenju hormona. Sukladno tome postoji li manjak ili višak hormona razlikujemo hipotireozu i hipertireozu.

1.1.1. Bolesti štitnjače : hipotireoza i hipertireoza

Hipotireoza predstavlja patološko stanje smanjenog izlučivanja ili nedostatka hormona štitnjače. Globalno najvažniji uzrok hipotireoze je manjak joda, a u razvijenim zemljama Hashimotov tiroiditis, destruktivna autoimuna bolest štitnjače (4, 5). Hipotireoza je češća u drugoj polovici života i u žena, ali može biti prisutna i kod svakog drugog uzrasta (6). Neki od najčešćih simptoma hipotireoze kod odraslih su letargija, umor, dobivanje na tjelesnoj težini, zatvor i suha koža. Klinička slika uključuje širok raspon simptoma koji se razlikuju ovisno o dobi i spolu. Biokemijski, obično je prisutna povišena serumska razina hormona koji stimulira štitnjaču (TSH, tireostimulin), a pokreće ju snižena vrijednost slobodnog tiroksina (4) negativnom povratnom spregom na razini adenohipofize. Razlikujemo i subkliničku hipotireozu koja je znak ranog zatajenja štitnjače i očituje se povišenim koncentracijama TSH i slobodnim tiroksinom unutar referentnog raspona (5, 7).

Hipertireoza predstavlja patološko stanje u kojemu štitnjača sintetizira i izlučuje višak hormona. Hipertireoza može biti očita ili subklinička. Očitu karakterizira koncentracija TSH ispod referentnih vrijednosti i serumske koncentracije T4 i T3 iznad referentnih vrijednosti. Subkliničku karakterizira nizak TSH, a normalne koncentracije T4 i T3 (8). Najčešći uzroci

hipertireoze su Gravesova bolest, multinodozna toksična struma, toksični adenom štitnjače i bezbolni tiroiditis. Gravesova bolest je autoimuni poremećaj kod kojeg protutijela aktiviraju TSH receptore i na taj način potiču sintezu hormona štitnjače što dovodi do hipertireoze. Multinodozna toksična struma javlja se u endemskim područjima s nedostatkom joda i to najčešće kod starijih osoba (8, 9).

1.1.2. Hashimotov tiroiditis

Hashimotov tiroiditis je druga najčešća autoimuna bolest. Ima relativno visoku učestalost u općoj populaciji (prevalencija iznosi 10 – 15 %), a morfološki se sastoji od postepene atrofije tkiva štitnjače nakon invazije citotoksičnih limfocitnih stanica u intersticij. Posljedica je atrofija folikula štitnjače, bujanje veziva i hiperemija koju prati onkocitna metaplazija folikularnih stanica (5, 9). Dijagnoza ove kronične autoimune bolesti temelji se na dokazivanju cirkulirajućih protutijela na antigene štitnjače, većinom protutijela na tiroglobulin i tireoperoksidazu i smanjene ehogenosti tkiva štitnjače kod pacijenata kod kojih su kliničke značajke uredne (11-13).

1.1.3. Epidemiološki značaj

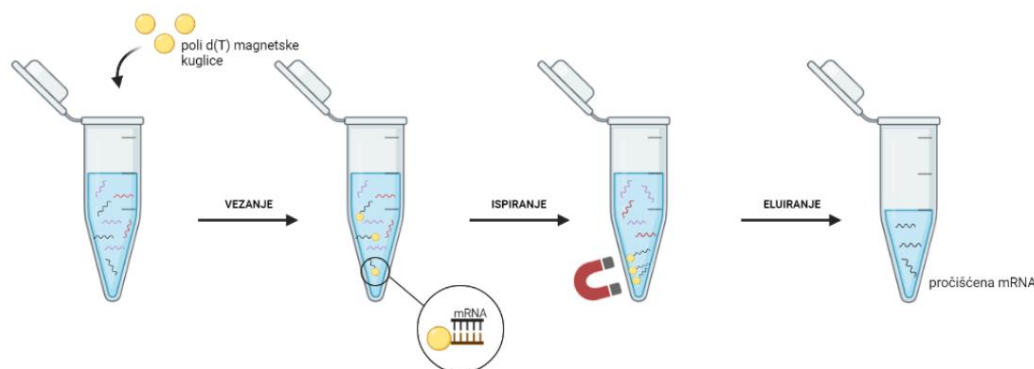
Visoka prevalencija odgovara visokom populacijskom i javno-zdravstvenom bremenu bolesti štitnjače. Neliječena hipotireoza i hipertireoza remete kvalitetu života (14), povećavaju opću i kardiovaskularnu smrtnost (15-18) i uzrokuju komplikacije trudnoće i poroda kod žena generativne dobi (19). Ishod liječenja često je nezadovoljavajući i normalizacija biokemijskih nalaza često ne poboljšava kvalitetu života niti eliminira rizik kasnog pobola i pomora (15, 16, 18). Liječenje hipotireoze i hipertireoze (radiojod, operativna terapija) obično završava trajnim, doživotnim nadomjesnim hormonskim liječenjem koje zahtijeva svakodnevni peroralni unos L-tiroksina. Pri tom, doziranje L-tiroksina često nije jednostavno i ne postiže optimalnu i stabilnu serumsku razinu slobodnog T4 i T3 (17, 20). Osim toga, kronične upalne bolesti štitnjače prate povećani izgledi za pojavu papilarnog karcinoma i limfoma štitnjače.

Zbog svega toga, bolje razumijevanje biologije zdravlja i bolesti štitnjače preduvjet je bolje skrbi i ishoda liječenja. U tu svrhu, istraživanje patologije štitnjače okreće se posljednjih

godina novim tehnologijama, poput masivnog paralelnog sekvenciranja RNK (sekvenciranje sljedeće generacije, engl. *next generation sequencing*, NGS), sekvenciranja tkivnog transkriptoma (21) i sekvenciranja jednostanične RNK (22). Ukupno iskustvo s tkivom štitnjače, međutim, i dalje je ograničeno, posebice u segmentu procesiranja tkiva i optimizacije operativnih procedura.

1.2. Sekvenciranje RNK – osnove

RNK sekvenciranje (RNASeq) naziv je za kvalitativno i kvantitativno određivanje svih RNK u stanici (23). Sekvenciranje RNK je stupnjevit proces. Obzirom da je većina RNK u stanici ribosomska RNK, a glasnička RNK (gRNK) čini oko 2 % ukupne RNK, izolacija i obogaćivanje gRNK prethodi sekvenciranju (17). Jedan od načina izolacije gRNK je korištenjem poli d(T) magnetskih kuglica. D(T) oligonukleotid komplementaran je s poli(A) repom na 3' kraju gRNK te se gRNK veže za oligo d(T) lance magnetskih kuglica. Postavljanjem magneta uz rub epruvete magnetske se kuglice zadržavaju unutar epruvete, a ostatak RNK se ispiri. Na samom kraju gRNK se eluira (Slika 1.)



Slika 1. Izolacija glasničke RNK pomoću poli d(T) magnetskih kuglica (sliku izradila autorica rada, BioRender.com, <https://app.biorender.com/biorender-templates>).

Jednolančana RNK se zatim reverznom transkriptazom prepisuje u dvolančanu komplementarnu cDNK te podliježe sekvenciranju sljedeće generacije, NGS-u. Prvi korak NGS-a je fragmentacija DNK. Nakon fragmentiranja dodaju se adapterske sekvence i one se vežu na krajeve fragmenata. Adapterske sekvence imaju ulogu početnica za umnažanje i

sekvenciranje. Sljedeći korak je vezanje DNK za čvrstu podlogu i tu dolazi do umnažanja (amplifikacije) DNK reakcijom lančane polimeraze (23, 24). Nakon sekvenciranja, nalijeganjem na referentni genom računalo određuje udio očitavanja u pojedinačnim genima ili prijevima. Sekvenciranje RNK omogućuje paralelno čitanje više milijuna odsječaka, i time cjelogenomsku, agnostičku analizu zastupljenosti genskih prijevisa u uzorku. Prevladava tehnologija sekvenciranja kratkog čitanja, a primjena mu je analiza diferencijalnog (razlikovnog) izražaja gena, sekvenciranje polimorfizama jednog nukleotida, detekcija genskih rearanžmana (delecije, insercije), alternativnog prekrajanja RNK i drugo (24).

1.2.1. Ograničenja transkripcijskog profiliranja sekvenciranjem RNK

Sve navedeno čini RNASeq moćnom, ali osjetljivom istraživačkom tehnikom čiji su rezultati podložni iskrivljavanju različitim uzrocima (25). Posljedica je disperzija mjerenja, širok raspon nesigurnosti rezultata i odstupanje mjerenja od izvornog stanja. Gotovo svaki korak RNASeq, od uzorkovanja do sekvenciranja knjižnice, izvor je varijacija koje unose odstupanja u biološki signal umanjujući stabilnost, robustnost i reproducibilnost rezultata. Zbog toga, prepoznavanje i kontrola zbunjujućih čimbenika čine neizmjerljivo važan dio redukcije RNASeq podataka, posebice u istraživanjima koja počivaju na korištenju posmrtno doniranog materijala (26). U tu svrhu, na raspolaganju je više namjenskih računalnih algoritama za otkrivanje i korekciju sustavnih odstupanja (27), poput analize surogatnih varijabli (28). Njihova primjena, međutim, nije trivijalan zadatak: učinak može biti nepredvidljiv i zahtijeva duboko razumijevanje strukture podataka i svrhe analize za svaki pojedinačni slučaj. U velikim projektima, poput biobanki, nisu rijetkost i prozaične greške poput zamjene uzoraka (29), pogrešnog obilježavanja i kontaminacije primjesama drugih tkiva (30). Druga značajka takvih biobanki je široka upotreba kadaveričnih tkiva koja prije smrti donora trpe agonalne promjene, a u supravitalnom vremenu različitim tempom podliježu autolizi i posmrtnim preinakama transkriptoma [tzv. tanatotranskriptom, (31, 32)]. Zbog toga, svaka korekcija sustavnih, nebioloških varijacija u RNASeq analizi zahtijeva pomnu eksploraciju njihovih izvora, uz puno uvažavanje tkivnih specifičnosti i razlika u stabilnosti.

Na tom tragu, cilj je ovog istraživanja identificirati vodeće izvore zbunjivanja u RNASeq analizi transkriptoma tkiva štitnjače koristeći agonalne, procesne i tehničke metapodatke cjelogenomskih knjižnica iz v8 izdanja *The Genotype-Tissue Expression (GTEx)* projekta.

GTEX projekt (33) pohranjuje RNASeq knjižnice više stotina tkivnih uzoraka, u broju koji omogućava adekvatnu reprezentaciju ukupne biološke varijabilnosti genskog izražaja. Osim histološkom verifikacijom, korišteni uzorci odlikuju se vrlo detaljnim i pouzdanim podacima o kontroli kvalitete uzoraka, demografskim, tehničkim i procesnim obilježjima donora, što omogućuje primjenu različitih bioinformatičkih postupaka raščlambe i kvantifikacije njihovog utjecaja na sveukupni genski izražaj. Standardizirane operative procedure GTEX projekta opsežno su dokumentirane, što krajnjim korisnicima olakšava sustavan pristup analizi visokodimenzionalnih RNASeq podataka.

2. HIPOTEZA

Demografska, agonalna i procesna obilježja značajan su izvor transkripcijskih varijacija u cjelogenomskom sekvenciranju RNK tkiva štitnjače.

3. CILJEVI

Ispitati utjecaj demografskih, agonalnih i procesnih osobitosti uzoraka na transkripcijsku varijabilnost i kontrolu kvalitete u cjelogenomskoj RNASeq analizi tkiva štitnjače. Svrha ovog istraživanja jest identificirati poglavito tehničke izvore kontaminacije transkripcijskog signala u tkivu štitnjače, čija kontrola i korekcija mogu poboljšati reproducibilnost RNASeq rezultata.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao eksploracijska studija (in silico analiza).

4.2. Ispitanici (selekcija knjižnica)

Anonimizirani RNASeq podatci GTEx projekta (v8 izdanje) preuzeti su iz javnog repozitorija (<https://gtexportal.org/home/datasets>, datum pristupa: 20.10.2019. g.), i to redom:

1. 574 cjelogenomske knjižnice tkiva štitnjače (glasnička RNK, matrice brojeva očitavanja, dbGaP oznaka phs000424.v8.p2, UBERON0002046, jedan donor = jedna knjižnica);
2. pripadni metapodaci donora – patohistološki nalazi, agonalna, tehnička i procesna obilježja uzoraka;
3. prvih pet glavnih genotipskih komponenti (engl. *principal component*, PC1-5) koje odražavaju rasnu pripadnost i srodnost pojedinačnih donora u cjelogenomskoj genotipizaciji (33);
4. digitalizirane mikroskopske slike hematoksilin-eozin bojanja tkivnih rezova štitnjače (Aperio, Leica Biosystems). Za vizualizaciju je korišten QuPath v0.2.0-m9 (34).

Nakon primjene selekcijskih kriterija [1) pogrešno označen uzorak, 2) uznapredovala autoliza tkiva (GTEx kod DTHHRDY= 3), 3) novotvorina, benigna ili maligna, 4) nespecifične histološke promjene poput atrofije, regresije i fibroze, 6) masivna kongestija, 7) kontaminacija rubnim primjesama (>1 mm) masnog, mišićnog, paratiroidnog ili vaskularnog tkiva], za konačnu analizu preostalo je 228 uzoraka. Među njima 37 uzoraka sadrži histološke znakove difuznog ili fokalnog limfocitnog tiroiditisa (35). Svi donori stariji su od 21 god., s *post-mortem* intervalom <24 h.

Svi su podatci deidentificirani i pripadaju javnoj domeni. Za istraživanje je pribavljena i suglasnost Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku (ur. broj.2158-61-46-22-17, 25. veljače 2022.).

Detalji standardiziranih operativnih postupaka GTEx projekta ranije su objavljeni (33, 36, 37).

4. MATERIJAL I METODE

Ukratko, sekvenciranje RNK provedeno je uporabom Illumina TruSeq v1 protokola (*non-stranded*, polyA, HiSeq 2000 ili HiSeq 2500 platforma) na 200 ng ukupne RNK (PAXgene Tissue miRNA Kit, PreAnalytix, Qiagen), uz pokrivenost (*coverage*) od 24,1-188 milijuna očitavanja (76 parova baza). Kvaliteta RNK nakon fiksacije tkiva (PAXgene Tissue FIX, Qiagen) procijenjena je RIN metrikom [*RNA Integrity Number*, Agilent Bioanalyzer, minimalni RIN>5,5].

Za poravnanje očitavanja na referentni humani genom (GRCh38/hg38) korišten je STAR v2.5.3a alat (38) i GENCODE v26 anotacija. Broj očitavanja na razini gena izračunat je pomoću RNA-SeQC v1.1.9 alata (39).

4.3. Zbunjujući čimbenici

Agonalna, procesna i tehnička obilježja uzoraka izdvojena su iz anotacijskih tablica i GTEx rječnika (Tablica 1). Zbunjujuće varijable pripadaju demografskim (dob, spol, PC1-3), agonalnim mjerama (agonalna kategorija/vrsta smrti) i procesnim obilježjima (ustanova, očuvanost tkiva i RNK, vrijeme ishemije, trajanje fiksacije). Konstantna obilježja su isključena iz istraživanja.

Tablica 1. Popis zbunjujućih čimbenika, *The Genotype-Tissue Expression* (GTEx) projekt.

| Izvorni naziv varijable (GTEx nomenklatura) | Opis | Kategorija |
|---|---|--|
| AGE | Dob | Demografija |
| SEX | Spol (M/Ž) | Demografija |
| DTHHRDY | Agonalna Hardy kategorija (0-4, nominalna ljestvica)* | Okolnosti/uzrok smrti (Procesiranje tkiva) |
| SMATSSCR | Stupanj autolize (0-3, ordinalna ljestvica)** | Izvešće patologa (Procesiranje tkiva) |
| SMCENTER | Mjesto prikupljanja uzoraka (šifra B1-D1) | Procesiranje tkiva |
| SMPHNTS | Opaska patologa, patohistološki nalaz | Izvešće patologa |
| SMRIN | RIN (<i>RNA Integrity Number</i>) | Procesiranje tkiva |
| SMTSISCH | Ukupno ishemijsko vrijeme za uzorak | Procesiranje tkiva |
| SMTSPAX | Vrijeme provedeno u PAXgene fiksativu | Procesiranje tkiva |
| - | Limfocitni tiroiditis | Patohistološki nalaz |

*Hardy ljestvica [DTHHRDY, (40)]:

- | | |
|---|---|
| 0 | Smrt na respiratoru |
| 1 | Brza, nasilna smrt (nesreća, trauma ili suicid, terminalna faza < 10 min. |
| 2 | Brza, iznenadna smrt, prirodni uzrok, terminalna faza < 1 h |
| 3 | Intermedijarna smrt, terminalna faza 1-24 h, prethodna bolest |
| 4 | Spora, očekivana smrt, obično nakon duge bolesti, terminalna faza > 1 dan |

**Stupanj autolize (33, 36):

- | | |
|---|--|
| 0 | Bez autolize |
| 1 | Blaga autoliza |
| 2 | Umjerena autoliza |
| 3 | Masivna autoliza (isključeni iz analize) |

4.4. Kontrola kvalitete

Mjere kontrole kvalitete za odabrane uzorke popisane su i sažete u Tablici 2.

Tablica 2. Mjere kontrole kvalitete, sekvenciranje RNK, *The Genotype-Tissue Expression* (GTEx) project, tkivo štitnjače (228 uzoraka).

| Obilježje | Medijan | Interkvartilni raspon | Opis |
|-----------|--------------------|-----------------------|--|
| SME1MMRT | 0,0026 | 0,0022-0,0032 | Broj kraj-1 baza nepodudarnih s referencom podijeljen s ukupnim brojem kraj2- baza |
| SMSFLGTH | 158 | 131-206 | Duljina fragmenata |
| SMMPDP | $8,1 \times 10^7$ | $6,85-9,35(x10^7)$ | Ukupan broj mapiranih očitavanja |
| SMNTRRT | 0,034 | 0,034-0,037 | Frakcija očitavanja mapiranih u intergenske slijedove |
| SMRRNANM | 321248 | 221102-458715 | Broj očitavanja mapiranih u ribosomsku RNK |
| SMRD TTL | $8,2 \times 10^7$ | $7,05-9,53(x10^7)$ | Ukupan broj očitavanja, isključujući neuspješna ili višestruka mapiranja |
| SMVQCFL | $0,73 \times 10^7$ | $0,47-1,1(x10^7)$ | Broj očitavanja odbačenih u kontroli kvalitete |
| SMTRSCPT | 24301 | 23523-25073 | Broj prijepisa s barem 5 očitavanja mapiranih u eksone |
| SMMPDPDR | 4×10^7 | $3,4-4,65(x10^7)$ | Mapirani parovi |
| SMNTRNRT | 0,215 | 0,194-0,237 | Frakcija očitavanja mapiranih u introne |
| SMMPUNRT | 0,991 | 0,987-0,993 | Broj jedinstvenih očitavanja |
| SMEXPEFF | 0,736 | 0,708-0,765 | Omjer eksonskih očitavanja i ukupnih očitavanja |
| SMMPDPDUN | $8,1 \times 10^7$ | $6,85-9,35(x10^7)$ | Broj mapiranih jedinstvenih očitavanja |
| SME2MMRT | 0,0038 | 0,0032-0,0046 | Broj kraj-2 baza nepodudarnih s referencom podijeljen s ukupnim brojem kraj-2 baza |
| SME2ANTI | $1,8 \times 10^7$ | $1,49-2,04(x10^7)$ | Broj očitavanja sekvenciranih u <i>antisense</i> smjeru |
| SMALTALG | 0,91 | $0,74-1,18(x10^7)$ | Duplicirana očitavanja s alternativnim koordinatama |
| SME2SNSE | $1,8 \times 10^7$ | $1,50-2,06(x10^7)$ | Broj očitavanja sekvenciranih u <i>sense</i> smjeru |
| SME1MPRT | 0,994 | 0,99-0,995 | Broj mapiranih kraj-2 očitavanja podijeljen s ukupnim brojem kraj-1 očitavanja |
| SMCHMPRS | 256564 | 202337-340770 | Kimerični parovi; parovi mapirani u različite gene |
| SMMAPRT | 0,991 | 0,9875-0,993 | Omjer broja mapiranih očitavanja i ukupnog broja očitavanja |
| SMEXNCRT | 0,749 | 0,727-0,774 | Frakcija očitavanja mapiranih unutar eksona |
| SMGNSDTC | 24260 | 23498-25027 | Broj gena s barem 5 očitavanja mapiranih u eksone |

4.5. Normalizacija ekspresije

Ekspresijske vrijednosti normalizirane su za efektivnu veličinu knjižnice upotrebom TMM [*Trimmed Mean of M-values*, (41)] u edgeR paketu (42). Geni bez izražaja isključeni su iz analize. Za svaki zadržani gen, stabilizacija varijance provedena je uporabom inverzne normalne transformacije rangova (43).

4.6. Povezanost zbunjujućih čimbenika s transkripcijskim varijacijama

Hijerarhijsko grupiranje uzoraka na temelju sličnosti transkriptoma (Euklidska udaljenost, Ward.D2 metoda) učinjeno je korištenjem SGI paketa [*SubGroup Identification* paket, (44)], a produkt je dendrogram s rezultatima testova razlike u razdiobi zbunjujućih čimbenika na svakoj točki grananja (Fisherov egzaktni test ili Mann-Whitney test, Bonferroni korekcija, $P < 0,05$). Za kvantifikaciju doprinosa pojedinih čimbenika ukupnoj transkripcijskoj varijabilnosti korištena je particija varijance, vodeći računa o kolinearnosti [variancePartition v1.30.0, (45); Principal Variance Component Analysis v1.20.0, (46)]. Za nastavak analize korištena su obilježja s >1 % učešća u ukupnoj varijanci.

4.7. Interpretacija bioloških procesa povezanih sa zbunjujućim čimbenicima

Povezanost vodećih zbunjujućih čimbenika s genskim programima (metagenima) ispitana je faktorizacijom nenegativnih matrica [NMF v0.23.0 paket, faktorizacijski rang = 2-5, 100 inicijacija, Brunet algoritam, (47)]. Za optimalno rješenje (faktorizacijski rang = 3, TMM matrica, kofenetički korelacijski koeficijent, (48)], ekstrakcija metagena povezanih sa zbunjujućim čimbenicima provedena je Kim-Park metodom (49).

Biološka interpretacija izdvojenih metagena utemeljena je na H (Hallmark), C2 [*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG, (50)], C5 (*Gene Ontology Biological Pathways/GO BP*) i C8 setu (stanični potpisi) MSigDB zbirke [*The Molecular Signatures Database*, UC San Diego/Broad Institute, (51)], v7.4 izdanje. Prag značajnosti definiran je

kao Benjamini-Hochberg $P < 0,05$, za genske skupove s najmanje 10 gena (www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp, posljednji pristup 20.08.2022.).

Za interkonverziju genskih simbola korišten je biomaRt paket (Ensembl r105/ENSG ↔ The HUGO Gene Nomenclature Committee/HGNC, *H. sapiens*). U prikazu rezultata korišteni su HGNC simboli gena.

4.8. Statistička analiza

Deskriptivna analiza slijedi uobičajena pravila prikaza podataka. Demografske, tehničke varijable i mjere kontrole kvalitete sažete su medijanom s interkvartilnim rasponom (omjerne varijable), ili apsolutnim i relativnim frekvencijama (kategorički podaci). Ukoliko nije drugačije navedeno, analiza tablica kontingencije počiva na Fisherovom egzaktnom testu i njegovim ekstenzijama, a usporedba omjernih varijabli za 2 ili više neovisnih skupina na neparametrijskim testovima (Mann-Whitney/Kruskal-Wallis test). Međusobna povezanost vodećih zbunjujućih čimbenika ispitana je neparametrijskom korelacijom rangova (corrplot paket) i kanoničkom korelacijskom analizom (variancePartition paket). Sve P-vrijednosti su dvostrane uz korekciju za broj testova kako je gore navedeno. $P < 0,05$ predstavlja razinu značajnosti. Vizualizacija rezultata temelji se na funkcijama ComplexHeatMap paketa v2.6.2, NMF v0.23.0, corrplot v0.84, RColorBrewer v1.1-2 i ggubr v0.4.0 u R4.0.3 programu (The R Project for Statistical Computing, Vienna, Austria, www.r-project.org).

5. REZULTATI

5.1. Deskriptivna analiza

U konačnu analizu uključeno je 228 ispitanika i 17322 gena s jedinstvenim HGNC simbolom. Demografska obilježja donora i tehnička obilježja uzoraka prikazana su u Tablici 3, s detaljima dostupnim u Slici 2. Gotovo sve knjižnice ($n = 222$) sadrže više od 5×10^7 očitavanja. Većina donora su muškarci u dobi 40 - 69 godina s minimalnim ili umjerenim stupnjem autolize u tkivnim uzorcima. U svim dobnim skupinama većina donora dolazi s respiratora. Minimalni RIN iznosi 5,5, a najviši 9,7. Najkraća ishemija trajala je 54 min, a najdulja 1522 min (~25 h). Minimalno trajanje fiksacije iznosilo je 240 min, a maksimalno 1594 min. U 37 od 228 uzoraka prisutni su histološki elementi limfocitnog (Hashimotovog) tiroiditisa, s jasnom prevagom žena u ovoj skupini (21/37 vs. 59/191, $P = 4,3 \times 10^{-3}$, Fisherov egzaktni test).

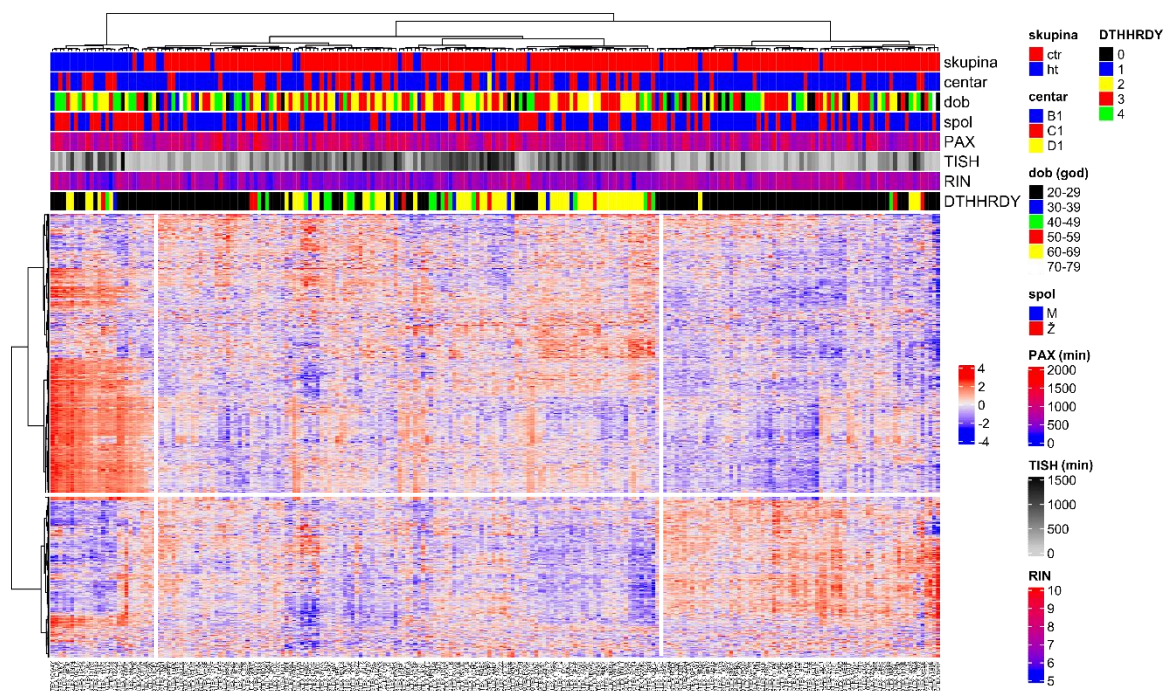
Tablica 3. Demografska obilježja donora i tehničke karakteristike uzoraka

| Obilježje | Kategorija/ mjerna jedinica | N (%) |
|----------------------------------|--|------------------|
| Spol | M | 148 (65) |
| | Ž | 80 (35) |
| Dob (god.) | 20-29 | 21 (9,2) |
| | 30-39 | 16 (7) |
| | 40-49 | 46 (20,2) |
| | 50-59 | 73 (32) |
| | 60-69 | 69 (30,3) |
| | 70-79 | 3 (1,3) |
| Autoliza (stupanj) (SMATSSCR) | 0 | 24 (10,5) |
| | 1 | 174 (76,3) |
| | 2 | 30 (13,2) |
| TISH (SMTSISCH) | min. | 480 (171-781)* |
| PAX (SMTSPAX) | min. | 821 (636-1094)* |
| RIN (SMRIN) | - | 6,8 (5,5-9,7)* |
| Centar (SMCENTER) | B1 | 162 (71,1) |
| | C1 | 65 (28,5) |
| | D1 | 1 (0,4) |
| | 0 | 134 (58,8) |
| Agonalna kategorija (DTHHRDY) | 1 | 7 (3,1) |
| | 2 | 25 (25,4) |
| | 3 | 11 (4,8) |
| | 4 | 18 (7,9) |
| | Ukupan broj mapiranih očitavanja (SMMPPD) | x10 ⁷ |

* medijan (interkvartilni raspon)

TISH vrijeme ishemije, PAX vrijeme provedeno u PAX fiksativu, RIN RNK integrity number, Centar = ustanova uzorkovanja. Tumačenje agonalnih kategorija i stupnja autolize dostupno je na str. 10. Oznake u zagradama predstavljaju izvorne kodove za pojedina obilježja.

5. REZULTATI

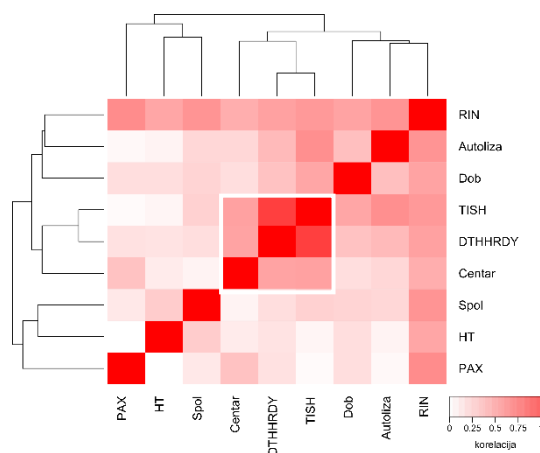


Slika 2. Demografska, tehnička i transkripcijska varijabilnost uzoraka. Hijerarhijsko grupiranje na temelju sličnosti ekspresijskog profila (prvih 1000 najvarijabilnijih gena, Euklidska udaljenost, Ward.D2 metoda). ht Hashimoto tiroiditis, ctr kontrolni ispitanici, TISH vrijeme ishemije, PAX vrijeme provedeno u PAX fiksativu, RIN, RNK *integrity number*, centar ustanova uzorkovanja, DTHHRDY agonalna Hardy kategorija. Tumačenje Hardyjevih kategorija dostupno je na str. 10. Imena stupaca (donji red) odgovaraju izvornim oznakama uzoraka. Horizontalne i vertikalne bijele linije odgovaraju grananju dendrograma. Ekspresijske vrijednosti prikazane su na z-skali.

Većina donora unovačena je u dva centra, B1 i C1. U obje institucije (B1 - C1) donori su slične dobne strukture, ali se uzroci njihove smrti značajno razlikuju, kao i trajanje tople ishemije. U C1 ustanovi češća je smrt nakon produljene terminalne faze (> 1 h, 13/162 vs. 15/65, B1 vs. C1, $P = 3,2 \times 10^{-3}$, Fisherov egzaktni test), a u B1 većina donora dolazi s respiratora (22/62 vs. 112/162, $P = 1.4 \times 10^{-6}$). U C1 obdukcija kasni u prosjeku 5 h za B1 [275 (133 - 718) vs. 653 (485 - 972) min., B1 vs. C1, $P < 10^{-6}$, Mann-Whitney test], a fiksacija tkiva traje značajno dulje [801 (612 - 1020) vs. 1031 (711 - 1189) min., B1 vs. C1, $P = 3,4 \times 10^{-3}$]. Najkraća ishemija registrirana je u ventiliranih donora [203 (118 - 431) vs. 842 (645 - 1059) min., DTHHRDY = 0 vs. DTHHRDY \neq 0, $P < 10^{-6}$], a naložija kvaliteta RNK u produljenoj agoniji [spora smrt > 24 h], 6,35 (5,9 - 6,7) vs. 6,9 (6,4 - 7,3), DTHHRDY = 4 vs.

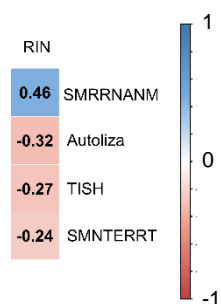
5. REZULTATI

DTHHRDY $\neq 4$, $P = 7,6 \times 10^{-4}$]. Kanonička korelacijska analiza potvrđuje ove međuovisnosti (Slika 3.), u prilog složenih neortogonalnih relacija među demografskim i tehničkim kovarijatama.



Slika 3. Kanonička korelacijska analiza, s prikazom grupiranja neortogonalnih varijabli (dendrogram). Intenzitet boje kodira stupanj povezanosti (veći intenzitet = snažnija povezanost). Tumačenje kratica dostupno je u legendi Slike 2.

Tipično za degradiranu RNK, niža kvaliteta (RIN) povezana je sa većom proporcijom intergenskih očitavanja (SMNTERRT) i većim udjelom ribosomske RNK (SMRRNANM, Slika 4).



Slika 4. Korelogram, mjere kvalitete RNK u ovisnosti o trajanju ishemije (TISH) i stupnju autolize. Obojana polja označavaju $P < 0,05$, a brojevi (obojana vrpca) Spearmanov korelacijski koeficijent. (RIN, RNK *Integrity Number*), trajanje ishemije (TISH), proporcija intergenskih očitavanja (SMNTERRT), udjel ribosomske RNK (SMRRNANM).

5.2. Analiza transkripcijske varijabilnosti tkiva štitnjače

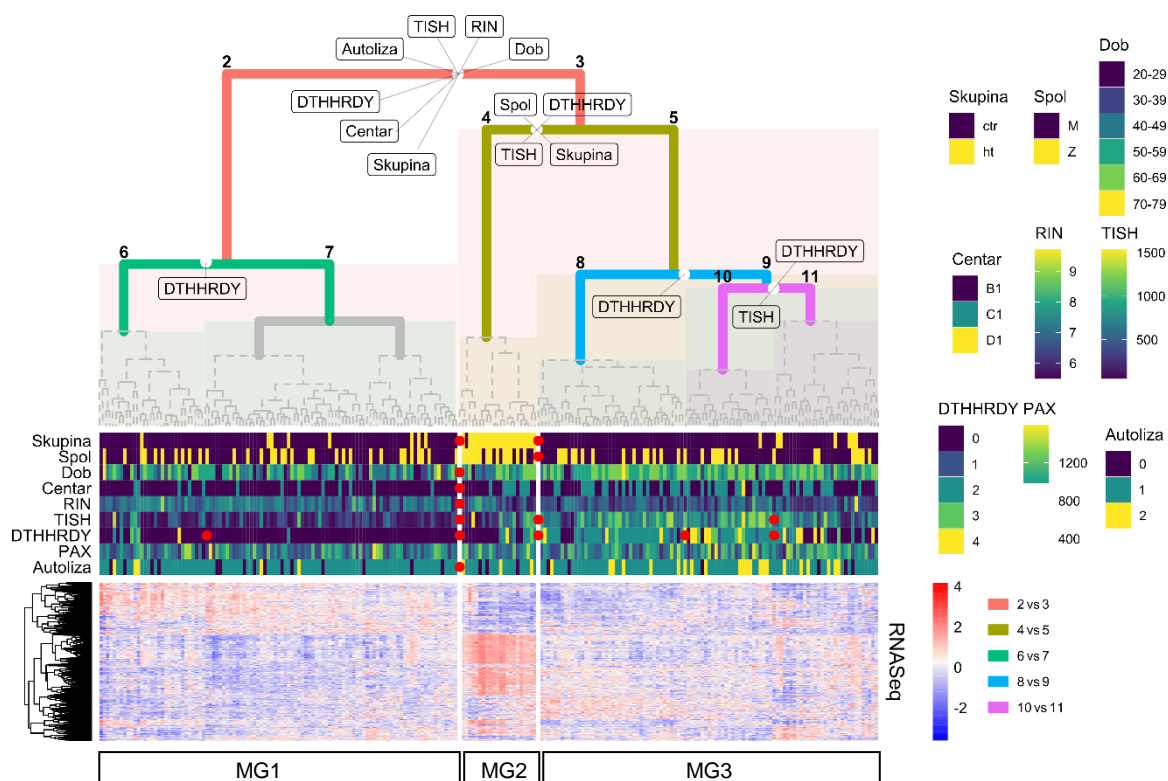
U sljedećem koraku ispitane su transkripcijske sličnosti i razlike među tkivnim uzorcima.

Također, testirana je povezanost transkripcijskih varijacija s tehničkim i demografskim varijablama.

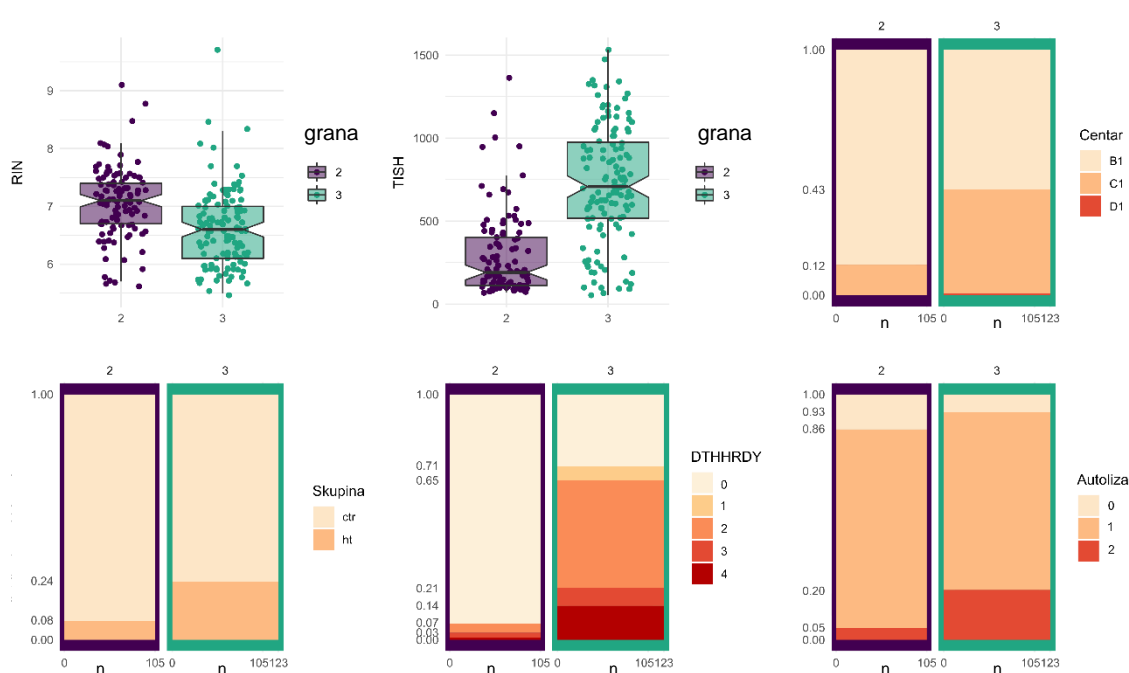
Rezultat hijerarhijskog grupiranja uzoraka na temelju sličnosti genskog izražaja prikazan je Slikom 5. Dendrogram razotkriva jasnu substrukturu u transkripcijskim obrascima, s grupiranjem tkivnog materijala u 3 vodeće skupine (transkripcijska profila) koji se razlikuju dobi, spolom, kvalitetom RNK, trajanjem ishemije, prisustvom HT i uzrokom smrti donora. Jedna skupina davatelja (grana 2, Slika 6, MG1), koju čine uglavnom ventilirani ispitanici s urednom histologijom štitnjače, odlikuje se mlađom dobi, bolje očuvanom RNK, kraćom ishemijom, manjim stupnjem tkivne autolize i manjim brojem sjedišta uzorkovanja (B1 >> C1). Drugu skupinu (grana 3→4) čine uglavnom ispitanice s Hashimotovim tiroiditisom (HT, MG2). Treća skupina (grana 3→5, Slika 7, MG3) sadrži veću proporciju donora umrlih iznenadnom smrću i sporom smrću, a odlikuje se višom dobi, lošije očuvanom RNK, produljenom ishemijom, višim stupnjem autolize i pretežito urednom histologijom štitnjače. Grupiranje uzoraka s HT ovisi o izraženosti i opsegu histoloških promjena: za razliku od difuzne bolesti, uzorci s fokalnim tiroiditisom značajno češće podliježu disperziji u granu 2 i granu 5 (11/16 vs. 2/21, $P = 3,3 \times 10^{-4}$).

Rasna struktura ne pridonosi razlikama (PC1 - 3). Radi preglednosti PC1 - 3 su izostavljene iz prikaza (Slika 5).

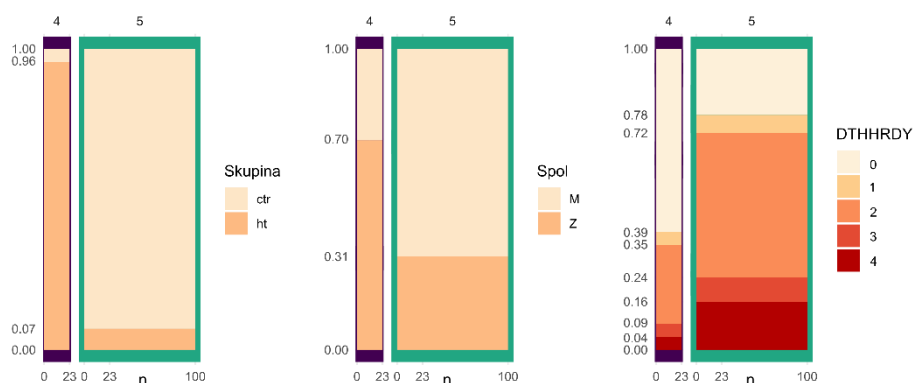
5. REZULTATI



Slika 5. Hijerarhijsko grupiranje uzoraka na temelju sličnosti ekspresijskog profila (sekvenciranje RNK, RNASeq). Dendrogram prikazuje segregaciju uzoraka na temelju sličnosti i razlika transkriptoma (prvih 1000 najvarijabilnijih gena, Euklidska udaljenost, Ward.D2 metoda). Prikazana su obilježja sa značajnim rezultatima testova razlike u svakoj točki grananja (Fisherov egzaktni test i Mann-Whitney test, Bonferroni-korigirani $P < 0,05$). U horizontalnoj vrpici, crveni krug razmeđuje dvije skupine (lijevo - desno) sa značajnom razlikom u razdiobi pripadnog obilježja (uokvirena imena). Vertikalna bijela linija omeđuje transkripcijske obrasce. ht Hashimoto tiroiditis, ctr kontrolni ispitanici, TISH vrijeme ishemije (min.), PAX vrijeme provedeno u PAX fiksativu / (min.), RIN, RNK *Integrity Number*, centar ustanova uzorkovanja, DTHHRDY agonalna Hardy kategorija. MG metagen. Tumačenje Hardy ljestvice i supnja autolize dostupno je na str. 10. Intenzitet genskog izražaja (RNASeq) je prikazan na z-skali.

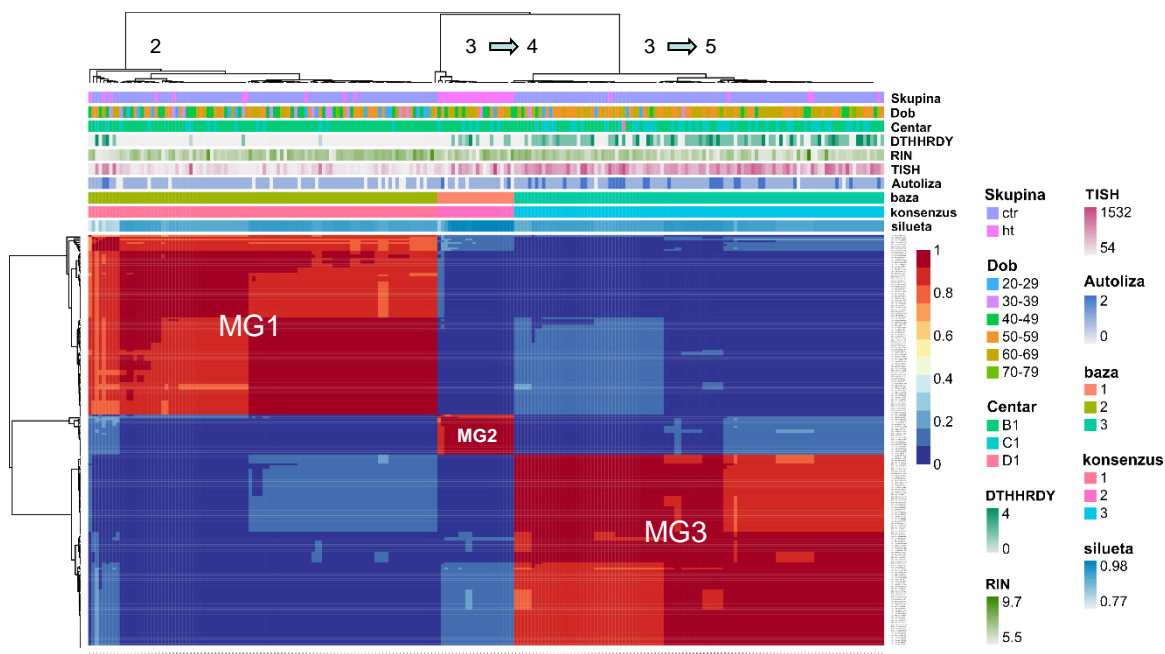


Slika 6. Razlike u distribuciji zbujujućih čimbenika, dendrogram, grana 2 vs. 3. Vrijeme ishemije (TISH/min.), RIN (RNK *Integrity Number*), Hardy kategorija (DTHHTDY), ht Hashimoto tiroiditis, ctr kontrole. Dijagrami raspršenja: svaka točka odgovara jednom uzorku, a horizontalni graničnici omeđuju medijan s interkvartilnim rasponom (IQR). Vertikalne linije odgovaraju 1,5 x IQR. Stupčasti dijagrami opisuju relativne frekvencije pojedinih kategorija ispitanika, a njihova širina razmjerna je broju uzoraka (n) u grani dendrograma. Tumačenje Hardyjevih kategorija i stupnja autolize dostupno je na str. 10.

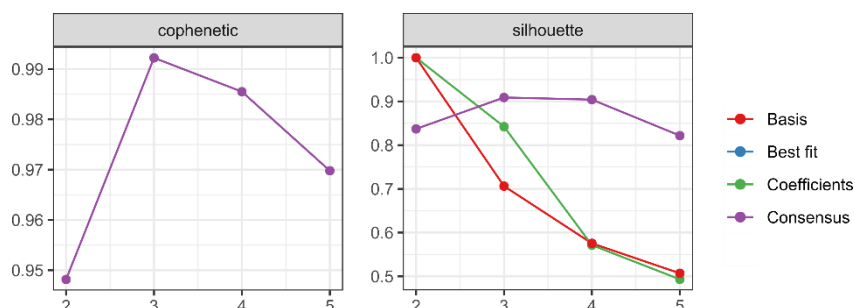


Slika 7. Razlike u distribuciji zbujujućih čimbenika, dendrogram, grana 4 vs. 5. Hardy kategorija (DTHHTDY), ht Hashimoto tiroiditis, ctr kontrole. Stupčasti dijagrami opisuju relativne frekvencije pojedinih kategorija ispitanika, a njihova širina razmjerna je broju uzoraka (n) u grani dendrograma. Tumačenje Hardyjevih kategorija dostupno je na str. 10.

Faktorizacija nenegativnih matrica potvrđuje robustnost i stabilnost ovog rezultata (Slika 8). Optimalno rješenje (kofenetički koeficijent) postignuto je za faktorizacijski rang 3 (tri transkripcijska programa, Slika 9) koji konzistentno reproducira raniju particiju uzoraka (Slika 2, Slika 5).



Slika 8. Faktorizacija nenegativnih matrica, 1000 najvarijabilnijih gena (*Trimmed Median of Means* normalizacija), faktorizacijski rang = 3 (baza). Konzensus rješenje za 100 inicijacija, Brunet algoritam. Silueta odgovara mjeri konzistentnosti grupiranja. Oznake uz dendrogram odgovaraju granama iz Slike 5. Vrijeme ishemije (TISH/min.), RIN (RNK Integrity Number), Hardy kategorija (DTHHTDY), MG metagen, ht Hashimotov tiroiditis, ctr kontrole. Dendrogram je numeriran sukladno Slici 5. Tumačenje Hardyjevih kategorija i stupnja autolize dostupno je na str. 10.

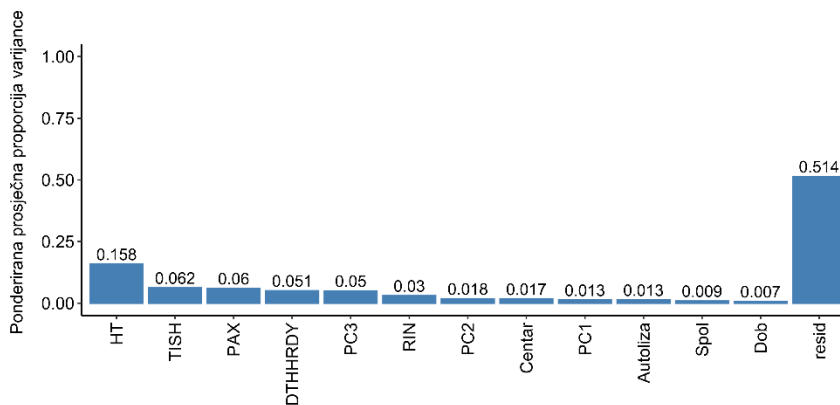


Slika 9. Kofenetički koeficijent i silueta za faktorizacijski rang 2 - 5, 100 inicijacija, Brunet algoritam.

Iz navedenog proizlaze tri bitna rezultata:

- 1) Difuzna Hashimotova bolest uzrokuje robustne promjene transkriptoma koje su relativno otporne na varijacije u tehničkim i biološkim čimbenicima. Transkripcijske razlike između zdravog i oboljelog tkiva nadmašuju interindividualne razlike (transkripcijsku buku) među histološki urednim uzorcima. Izuzetak čini fokalni tiroiditis, kao subdominantni izvor varijacija u genskom izražaju.
- 2) Sirovi transkriptom urednog tkiva štitnjače izrazito je heterogen i varira u ovisnosti o tehničkim i demografskim varijablama.
- 3) Transkripcijski obrasci odražavaju sustavne trendove u međupovezanim tehničkim i demografskim kovarijatama.

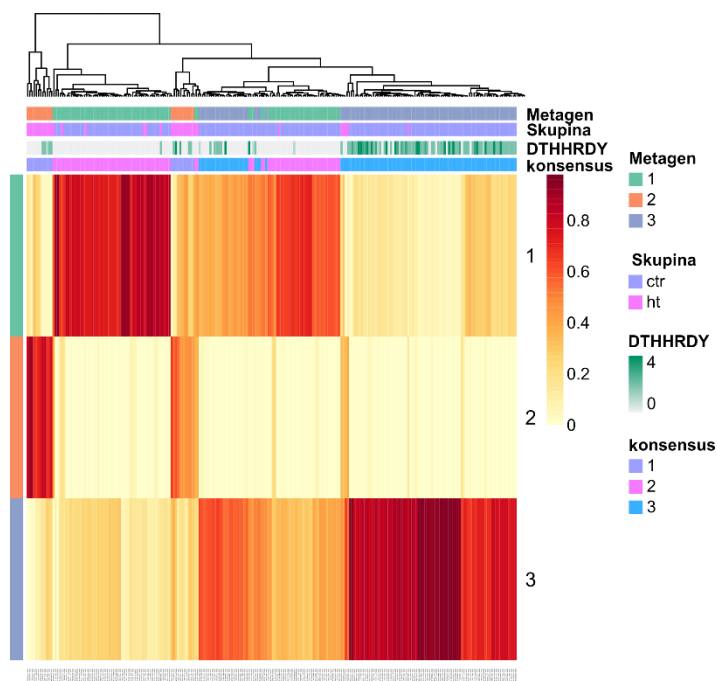
Particija varijance potvrđuje dominantni udio HT (~ 15 %) u ukupnoj transkripcijskoj varijabilnosti (Slika 10). Dob, spol i rasa (PC1 - 3) odgovorni su zajednički za ~ 10 % ukupne varijance genske ekspresije, a ispitivani tehnički čimbenici za ~ 23 %. Ovaj zaključak nije osjetljiv na broj analiziranih gena: rezultat je gotovo istovjetan za 500, 2000 i 5000 gena.



Slika 10. Doprinos ispitivanih čimbenika u transkripcijskoj varijabilnosti (particija varijance, 1000 najvarijabilnijih gena, uprosječna proporcija). HT Hashimoto tiroiditis, PAX vrijeme u PAX fiksativu, TISH vrijeme ishemije, DTHHRDY Hardy kategorija (str. 10), PC1 -3 glavna komponenta cjelogenomske genotipizacije, RIN (RNK *Integrity Number*), resid-rezidualna varijanca. Tumačenje Hardyjevih kategorija i stupnja autolize dostupno je na str. 10.

5.3. Ekstrakcija metagena i analiza bioloških putova

Za ekstrakciju metagena (gena koji čine okosnicu identificiranih transkripcijskih programa, Slika 11) korišten je faktorizacijski rang 3 koji rekapitulira razdiobu tkiva u 3 transkripcijska profila (3 grane, dendrogram, Slika 8, Slika 9).



Slika 11. Ekstrakcija transkripcijskih programa. Dominantni metageni u svakom tkivnom uzorku i njihova podudarnost s biološkim i tehničkim obilježjima. Podudarnost metagena 2 s prisusutvom HT, podudarnost metagena 3 s DTHHRDY klasom 3-4 (agonalna faza > 1 h). Nazivi stupaca odgovaraju izvornim oznakama uzoraka. Tumačenje Hardyjevih kategorija dostupno je na str. 10. Konsenzus se temelji na 100 inicijacija Brunet algoritma.

Broj identificiranih gena u svakom metaprogramu sličan je onom u drugim istraživanjima toga tipa (Tablica 4).

5. REZULTATI

Tablica 4. Opis metagena (MG), njihovih komponenti i poveznica s dendrogramom tkivnih uzoraka (Slika 5, Slika 8). Rječnik genskih simbola dostupan je na www.genecards.org (GeneCards: The Human Gene Database, v5.11, 21-06-2022, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael).

| Metagen | grana 2 (MG1) | grana 3→4 (MG2) | | grana 3→5 (MG3) | |
|-----------|---------------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| Broj gena | 27 | 54 | | 62 | |
| Geni | MTCO1P12 | IGHG1 | IGLC2 | PRL | ADAMTS4 |
| | MT-CO1 | IGLV2-11 | IGHA2 | HBB | SLC34A2 |
| | NQO1 | IGKV1-39 | CD79A | STC1 | MYOC |
| | MT-ND6 | IGKC | IGLV3-21 | HBA2 | INHBB |
| | PCSK2 | IGKJ5 | IGLC3 | SERPINE1 | ERRFI1 |
| | MIR22HG | IGHV4-59 | JCHAIN | ADM | CORO6 |
| | TPO | IGHV3-30 | MZB1 | SLC2A3 | SUCNR1 |
| | AKR1C2 | IGKJ2 | IGLV1-51 | FOS | NR1D1 |
| | SCD | IGLV3-19 | MS4A1 | TCIM | C11orf96 |
| | KNSTRN | IGLV2-23 | IGHM | JUN | SEMA3B |
| | SRXN1 | IGLV1-47 | POU2AF1 | CCN1 | TNXB |
| | ADGRV1 | IGKV3-11 | IGHG4 | BHLHE40 | CCN3 |
| | LRP8 | IGKJ1 | CD37 | ACE | CFAP70 |
| | SERPINA3 | IGKV3-20 | TMC8 | ATF3 | EFNA1 |
| | DIO1 | IGKJ4 | RGS1 | ZFP36 | LYVE1 |
| | TUBB4B | IGLV1-40 | ITGAL | SFRP4 | POSTN |
| | AKR1C1 | IGHV1-2 | CXCR4 | CCL2 | F2RL3 |
| | TFCP2L1 | IGHGP | PIM2 | EGR1 | PPP1R15A |
| | SLC4A11 | IGLV2-8 | ARHGAP9 | NR4A1 | FLT1 |
| | TRIM16 | IGHV4-39 | ACTA1 | FOSB | JUNB |
| | TALDO1 | IGKV3-15 | CORO1A | PI16 | THBS1 |
| | HGD | IGKV1-5 | PTPRC | STC2 | MAFF |
| | ID1 | IGLV3-1 | CD53 | DLL4 | ABCA10 |
| | MGST1 | IGLV2-14 | ACAP1 | GEM | FLNC |
| | FCGBP | IGHG3 | | PLAT | KIF12 |
| | SCUBE3 | IGHA1 | | OGN | HTRA3 |
| | ABCC3 | IGHV3-23 | | HSPA1B | SULF1 |
| | | IGKV4-1 | | SFRP2 | DAPK2 |
| | | IGLC1 | | HSPA1A | HBEGF |
| | | | | LEPR | ITIH5 |
| | | | | | DDX3Y |
| | | | | | DDX3Y |

MG1 program (grana 2, Slika 5, Slika 8, Tablica 4) obilježen je odgovorom na oksidativni stres (HALLMARK REACTIVE_OXYGEN SPECIES PATHWAY, $P = 2,3 \times 10^{-4}$, NQO1, SRXN1, MGST1), metabolizmom ksenobiotika (HALLMARK XENOBIOTIC METABOLISM, $P = 2,3 \times 10^{-4}$) i indukcijom detoksikacijskih/ citoprotektivnih gena iz NRF2 signalnog puta (LRP8, AKR1C1, AKR1C2, IBRAHIM_NRF2_UP, $P = 4.9 \times 10^{-6}$).

5. REZULTATI

U MG2 programu (Tablica 4), čiji su tkivni uzorci obilježeni prisustvom HT (grana 3→4, Slika 5) dominira B stanična biologija (MS4A1, CD79A, CXCR4), plazmocitni biljezi (MZB1, JCHAIN), produkcija imunoglobulina (IgG1, G2, G4, IgM, IgA1) i ekspresija transkripcijskih čimbenika s ključnom ulogom u razvoju žarišnog klijanja (POU2AF1). C1 program upućuje na sazrijevanje B stanica odgovarajući ranije opisanom fenomenu limfoidne neoorganogeneze u Hashimotovom tiroiditisu (52).

MG3 programom dominiraju biljezi (53 - 55) adventicijskih (PI16⁺LEPR⁺SFRP⁺) fibroblasta (TRAVAGLINI_LUNG_ADVENTITIAL_FIBROBLAST, $P = 8.5 \times 10^{-31}$), angiogeneza (DLL4, FLT1, THBS1, ACE, SULF1, ERFFI1, $P = 1,3 \times 10^{-9}$) i disocijacijski stres [JUN, FOS, FOSB, EGR1, ZFP36, HSPA1A, HSPA1B, (26, 56, 57)]. U metaboličkom smislu, prevladava odgovor na hipoksiju (HALLMARK HYPOXIA, $P = 2.5 \times 10^{-20}$), transkripcija signalnih komponenti NF (nuklearni factor) κ B puta (HALLMARK TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB, $P = 9.4 \times 10^{-26}$) i promjene u koagulaciji i fibrinolizi (HALLMARK COAGULATION, $P = 3,3 \times 10^{-4}$). U cjelini, MG3 program transkripcijski rekapitulira ranije opisanu (58) ishemijsku ozljedu vaskulature (ADM, CCN1, CCN3, F2RL3, HBB, HBEGF, INHBB, LYVE1, MAFF).

6. RASPRAVA

Izražaj glasničke RNK ovisan je o mnogim staničnim procesima. RNASeq kao metoda kvantifikacije izražaja gRNK počiva na destruktivnom procesiranju tkiva u kojem odgovor stanica za egzogeni inzult snažno iskrivljuje izvorni biološki signal. Krajnji primjer je posmrtno uzorkovanje u kojem tkiva trpe agoniju, ishemiju i autolizu, s posljedičnim posmrtnim reprocessiranjem stanične gRNK, kako u kvantitativnom smislu (jednostavna degradacija gRNK), tako i u kvalitativnom smislu (promjene stanične genske aktivnosti u supravitalnom vremenu). U ovom istraživanju pokazali smo, na primjeru tkiva štitnjače, snažan utjecaj tehničkih i procesnih čimbenika na oblikovanje transkripcijskog profila (kvalitetu i sadržaj transkriptoma), a rezultat je veće ili manje odstupanje od ishodišnog, izvornog genskog izražaja tkiva u cjelini. U usporedbi s tehničkim čimbenicima, demografske varijable subdominant su izvor varijacija. Pri tom, promjene genskog izražaja su izrazito asimetrične: s jedne strane nalazimo veći broj gena s manje-više stabilnim komplementom RNK, a s druge strane manji broj gena i procesa čije je prepisivanje uglavnom oblikovano demografijom donora i tehničkim okolnostima. Očigledno, transkripcijski profili zrcale povijest uzoraka, biološke uvjete i tehničke okolnosti; očekivano, reproducibilnost RNASeq mjerenja kritično ovisi o pravilnom razlikovanju i razdvajanju bioloških signala od tehničkih artefakata. Kada je riječ o patologiji tkiva štitnjače, robustnost transkripcijskog signala razmjerna je stupnju patološkog remodeliranja tkiva: za difuzne promjene tkiva, osobito praćene promjenom staničnog sastava, opseg i intenzitet razlikovnog izražaja gena obično nadmašuje tehničku i transkripciju buku. Jedan takav primjer je i Hashimotov tiroiditis, koji patohistološki prati destrukcija folikularne arhitekture, ožiljavanje i nadomještanje žljezdanog tkiva limfocitnim infiltratom. Naprotiv, fokalne promjene tkiva i njihov transkripcijski potpis, osobito sporadične i mikroskopske, vrlo su osjetljivi na utjecaj zbunjujućih čimbenika. Pravilan probir uzoraka, detaljno poznavanje izvora varijacija, metodično planiranje eksperimenata i pažljiva redukcija podataka neizostavni su korak u pripremi za analizu i interpretaciju RNASeq podataka. Osobito važno, zbunjujući čimbenici često su neraskidivo povezani, a njihovi učinci neraspletni, zbog čega je konačni test valjanosti rezultata u analizi genskog izražaja svakako neovisna reprodukcija i ortogonalna validacija biološkim metodama (npr. imunohistokemija, proteomika, animalni modeli, sekvenciranje jednostanične RNK i slično). Ovo osobito vrijedi za agnostički pristup poput cjelogenomskog sekvenciranja glasničke RNK.

Osim uvida u particiju varijance genskog izražaja, drugi bitan aspekt ovog istraživanja je uvid u stanične biološke procese koji su aktivni u supravitalnom vremenu, a pridonose kvalitativnim promjenama transkriptoma tijekom uzorkovanja tkiva. Među njima ističu se aktivacija genskog izražaja detoksikacijskih, antioksidativnih i citoprotektivnih molekula iz NRF2 programa (*nuclear factor erythroid-related factor 2*) u ranoj i intermedijarnoj ishemiji, koju u kasnoj ishemiji zamjenjuje izražaj biljega disocijacijskog stresa, ishemijske ozljede vaskulature i aktivacije fibroblasta. Narav ovih procesa nije iznenađenje, odgovara literaturi, i njihova reprodukcija potvrđuje primjenjivost metoda strojnog učenja na otkrivanje biološki smislenih signala i procesa. Disekcija ovakvih posmrtnih promjena transkriptoma važna je za bolje razumijevanje stanične i tkivne dekompozicije, čime pridonosi i razvoju metoda očuvanja i revitalizacije tkiva u toploj ishemiji (59). Time je definiran i translacijski potencijal istraživanja.

Zaključno, u ovom radu analizirali smo izvore varijacija u cjelogenomskom izražaju gena unutar tkiva štitnjače koristeći detaljne metapodatke GTEx projekta, sa posebnim fokusom na tehnički uzrokovane devijacije koje remete izvorni biološki signal u sekvenciranju RNK. Na taj način, rezultat predstavlja korak u smjeru informiranog planiranja redukcije RNASeq podataka.

7. ZAKLJUČCI

1. U cjelini, demografska, agonalna i procesna obilježja značajan su izvor transkripcijskih varijacija u cjelogenomskom sekvenciranju RNK tkiva štitnjače.
2. U sekvenciranju RNK morfološki urednog tkiva štitnjače, agonalna i procesna obilježja uzoraka dominantan su izvor transkripcijskih varijacija u usporedbi s demografskim obilježjima donora.
3. Kada je prisutan, difuzni Hashimotov tiroiditis uzrokuje robustne promjene transkriptoma koje su relativno otporne na varijacije u tehničkim i biološkim čimbenicima.
4. Među tijesno povezanim zbunjujućim čimbenicima, izdvojene su dvije glavne realizacije koje odgovaraju aktivaciji različitih genskih skupova i bioloških putova: ventilirani ispitanici, mlađa dob, bolje očuvana RNK, kraća ishemija i manji stupanj tkivne autolize obilježeni su izražajem detoksikacijskih i antioksidacijskih gena iz NRF2 puta. Nasuprot tome, spora smrt, viša dob, lošije očuvana RNK, produljena ishemija i viši stupanj autolize povezani su s transkripcijskim biljezima hipoksijskog odgovora, ishemijske ozljede vaskulature, NFκB signaliziranja i aktivacije perivaskularnih fibroblasta.

8. SAŽETAK

CILJ. Ispitati utjecaj demografskih, agonalnih i procesnih osobitosti uzoraka na transkripcijsku varijabilnost i kontrolu kvalitete u cjelogenomskoj RNASeq analizi tkiva štitnjače (bioinformatička analiza).

USTROJ STUDIJE. Istraživanje je ustrojeno kao eksploracijska studija (in silico analiza).

METODE. Analizirana je transkripcijska varijabilnost tkiva štitnjače korištenjem knjižnica RNK sekvenciranja iz GTEx projekta (v8 izdanje). Ukupno je analizirano 228 profila cjelogenomske ekspresije u ovisnosti o demografskim podacima donora i atributima uzoraka. Provedena je analiza particije varijance, hijerarhijsko grupiranje i faktorizacija matrica, nakon čega je uslijedilo profiliranje bioloških puteva unutar visoko izraženih metagena (*Gene Ontology, Hallmark, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Cell Signatures, Broad Molecular Signatures Database v7.4*).

REZULTATI. U potpunosti razvijen Hashimotov tiroiditis, kada je bio prisutan, dominantan je izvor transkripcijske varijabilnosti. Za zdravo tkivo štitnjače doprinos tehničkih kovarijata nadmašuje utjecaj demografskih podataka (starost, spol i etnička pripadnost). Mlađa dob, smrt na respiratoru, bolje očuvana RNK, kratka ishemija i ograničena autoliza povezani su s izražajem detoksikacijskih i antioksidativnih, obrambenih gena iz NRF2 puta. Nasuprot tome, starija dob, spora smrt, lošije očuvana RNK, produljena ishemija i viši stupanj autolize povezani su s transkripcijskim biljezima hipoksijskog odgovora, ishemijske ozljede vaskulature, NF κ B signaliziranja i aktivacije perivaskularnih fibroblasta.

ZAKLJUČAK. Identificirani su različiti obrasci transkripcijske varijabilnosti koji proizlaze iz širokog raspona demografskih i tehničkih kovarijata. Brojni geni koordinirano mijenjaju izražaj, odražavajući rezidualnu transkripciju dugo nakon prestanka života.

Ključne riječi: štitnjača, RNASeq, cjelogenomsko sekvenciranje, zbunjujući čimbenici, analiza varijance, analiza klastera, računalna biologija

9. SUMMARY

TITLE. Biological and technical sources of variations in transcriptome sequencing of thyroid tissue

AIM. To assess the effect of demographic, agonal and technical factors on whole-genome transcriptional variability of thyroid tissue using bulk RNASeq analysis (bioinformatics analysis).

STUDY DESIGN. This research is designed as an exploratory research (in silico analysis).

METHODS. The transcriptional variability of thyroid tissue was dissected by using RNA-sequencing libraries from the Genotype-Tissue Expression project (v8 release). In total, 228 whole-genome expression profiles were analyzed in relation to their host demographics and sample attributes. Variance partition analysis, hierarchical clustering and matrix factorization were performed, followed by pathway enrichment profiling of highly expressed metagenes (Gene Ontology, Hallmark, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Cell Signatures, Broad Molecular Signatures Database v7.4).

RESULTS. Full blown Hashimoto's thyroiditis, when present, was the dominant source of transcriptional variability. For healthy thyroid tissue, technical covariates outweighed the contribution from demographic data (age, sex, and ethnicity). Younger age, death on the ventilator, higher RNA integrity, short ischemia, and low autolysis were associated with an array of detoxifying and antioxidant defence genes from the NFR2 pathway. In contrast, older age, slow death, poor RNA integrity, long ischemia, and higher autolysis score were associated with transcriptional markers of vascular injury, hypoxic response, NF κ B signalling, and fibroblast activation.

CONCLUSIONS. Different patterns of transcriptional variability stemming from a broad range of demographic and technical covariates were identified. Many genes co-ordinately changed their expression, reflecting an ongoing transcription long after cessation of life.

Keywords: Thyroid gland, RNA-Seq, Whole Genome Sequencing, Confounding Factors, Analysis of Variance, Cluster Analysis, Computational Biology

10. LITERATURA

1. Matokanović, Leonarda. "Uloga i poremećaji hormona štitnjače." Završni rad, Zdravstveno veleučilište, 2019. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:139:172679>
2. Kujundžić M., 2003. Klinička patofiziologija za studente Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta
3. Šoštarić, Natalia. "ULOGA I REGULACIJA TIROIDNIH HORMONA." Završni rad, Zdravstveno veleučilište, 2020. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:139:233475>
4. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. *Lancet*. 2017 Sep 23;390(10101):1550-1562.
5. Cooper DS, Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet* 2012; 379: 1142–54.
6. Carlé A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Laurberg P. Gender differences in symptoms of hypothyroidism: a population-based DanThyr study. *Clin Endocrinol* 2015; 83: 717–25.
7. Carlé A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Andersen S, Laurberg P. Hypothyroid symptoms fail to predict thyroid insufficiency in old people: a population-based case-control study. *Am J Med* 2016; 129: 1082–92.
8. De Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. *Lancet*. 2016 Aug 27;388(10047):906-918.
9. Kravets I. Hyperthyroidism: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2016 Mar 1;93(5):363-70.
10. Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Roliński J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? *J Immunol Res*. 2015;2015:979167.
11. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med*. 2003 Jun 26;348(26):2646-55. Erratum in: *N Engl J Med*. 2003 Aug 7;349(6):620.
12. Sandru F, Carsote M, Albu SE, Dumitrascu MC, Valea A. Vitiligo and chronic autoimmune thyroiditis. *J Med Life*. 2021 Mar-Apr;14(2):127-130.
13. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev*. 2014 Apr-May;13(4-5):391-7.

14. Thvilum M, Brandt F, Almind D, Christensen K, Brix TH, Hegedüs L. Type and extent of somatic morbidity before and after the diagnosis of hypothyroidism. A nationwide register study. *PLoS One*. 2013 Sep 16;8(9):e75789.
15. Stott DJ, Rodondi N, Kearney PM, Ford I, Westendorp R G.J., Mooijaart SP, i sur. Thyroid Hormone Therapy for Older Adults with Subclinical Hypothyroidism. *N Engl J Med*. 2017 Jun 29;376(26):2534-2544.
16. Feller M, Snel M, Moutzouri E, Bauer DC, de Montmollin M, Aujesky D, i sur. Association of Thyroid Hormone Therapy With Quality of Life and Thyroid-Related Symptoms in Patients With Subclinical Hypothyroidism: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2018 Oct 2;320(13):1349-1359.
17. Lillevang-Johansen M, Abrahamsen B, Jørgensen HL, Brix TH, Hegedüs L. Over- and Under-Treatment of Hypothyroidism Is Associated with Excess Mortality: A Register-Based Cohort Study. *Thyroid*. 2018;28(5):566-574.
18. Hegedüs L, Bianco AC, Jonklaas J, Pearce SH, Weetman AP, Perros P. Primary hypothyroidism and quality of life. *Nat Rev Endocrinol*. 2022 Apr;18(4):230-242.
19. Maraka S, Singh Ospina NM, Mastorakos G, O'Keefe DT. Subclinical Hypothyroidism in Women Planning Conception and During Pregnancy: Who Should Be Treated and How? *J Endocr Soc*. 2018 May 3;2(6):533-546. eCollection 2018 Jun 1.
20. Benvenga S. When thyroid hormone replacement is ineffective? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2013 Oct;20(5):467-77.
21. Cho BA, Yoo SK, Song YS, Kim SJ, Lee KE, Shong M, Park YJ, Seo JS. Transcriptome Network Analysis Reveals Aging-Related Mitochondrial and Proteasomal Dysfunction and Immune Activation in Human Thyroid. *Thyroid*. 2018 May;28(5):656-666.
22. Zhang QY, Ye XP, Zhou Z, Zhu CF, Li R, Fang Y i sur. Lymphocyte infiltration and thyrocyte destruction are driven by stromal and immune cell components in Hashimoto's thyroiditis. *Nat Commun*. 2022 Feb 9;13(1):775.
23. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019 Nov;20(11):631-656.
24. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019 Nov 1;9(11).

10. LITERATURA

25. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, Simcha D, Langmead B, Johnson WE, i sur. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nat Rev Genet.* 2010 Oct;11(10):733-9.
26. Ferreira PG, Muñoz-Aguirre M, Reverter F, Sá Godinho CP, Sousa A, Amadoz A, i sur. The effects of death and post-mortem cold ischemia on human tissue transcriptomes. *Nat Commun.* 2018 Feb 13;9(1):490.
27. Stegle O, Parts L, Durbin R, Winn J. A Bayesian framework to account for complex non-genetic factors in gene expression levels greatly increases power in eQTL studies. *PLoS Comput Biol.* 2010 May 6;6(5):e1000770.
28. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics.* 2012 Mar 15;28(6):882-3.
29. Javed N, Farjoun Y, Fennell TJ, Epstein CB, Bernstein BE, Shores N. Detecting sample swaps in diverse NGS data types using linkage disequilibrium. *Nat Commun.* 2020 Jul 29;11(1):3697.
30. Nieuwenhuis TO, Yang SY, Verma RX, Pillalamarri V, Arking DE, Rosenberg AZ, i sur. Consistent RNA sequencing contamination in GTEx and other data sets. *Nat Commun.* 2020 Apr 22;11(1):1933.
31. Pozhitkov AE, Neme R, Domazet-Lošo T, Leroux BG, Soni S, Tautz D i sur. Tracing the dynamics of gene transcripts after organismal death. *Open Biol.* 2017 Jan;7(1):160267.
32. Javan GT, Hanson E, Finley SJ, Visonà SD, Osculati A, Ballantyne J. Identification of cadaveric liver tissues using thanatotranscriptome biomarkers. *Sci Rep.* 2020 Apr 20;10(1):6639.
33. GTEx Consortium. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science.* 2015 May 8;348(6235):648-60.
34. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, i sur. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017 Dec 4;7(1):16878.

35. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med*. 2003 Jun 26;348(26):2646-55. doi: 10.1056/NEJMra021194. Erratum in: *N Engl J Med*. 2003 Aug 7;349(6):620.
36. GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet*. 2013 Jun;45(6):580-5.
37. Carithers LJ, Ardlie K, Barcus M, Branton PA, Britton A, Buia SA, i sur. A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. *Biopreserv Biobank*. 2015 Oct;13(5):311-9.
38. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, i sur. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013 Jan 1;29(1):15-21.
39. DeLuca DS, Levin JZ, Sivachenko A, Fennell T, Nazaire MD, Williams C, i sur. RNA-SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization. *Bioinformatics*. 2012 Jun 1;28(11):1530-2.
40. Hardy JA, Wester P, Winblad B, Gezelius C, Bring G, Eriksson A. The patients dying after long terminal phase have acidotic brains; implications for biochemical measurements on autopsy tissue. *J Neural Transm*. 1985;61(3-4):253-64.
41. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;11(3):R25.
42. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010 Jan 1;26(1):139-40.
43. Chien LC. A rank-based normalization method with the fully adjusted full-stage procedure in genetic association studies. *PLoS One*. 2020 Jun 19;15(6):e0233847.
44. Buyukozkan M, Suhre K, Krumsiek J. SGI: Automatic clinical subgroup identification in omics datasets. *Bioinformatics*. 2021 Sep 16;38(2):573–6.
45. Hoffman GE, Schadt EE. variancePartition: interpreting drivers of variation in complex gene expression studies. *BMC Bioinformatics*. 2016 Nov 25;17(1):483.
46. Li, J., Bushel, P.R., Chu, T.-M. and Wolfinger, R.D. (2009). Principal Variance Components Analysis: Estimating Batch Effects in Microarray Gene Expression Data. In

Batch Effects and Noise in Microarray Experiments, A. Scherer (Ed.).

<https://doi.org/10.1002/9780470685983.ch12>

47. Yi H, Raman AT, Zhang H, Allen GI, Liu Z. Detecting hidden batch factors through data-adaptive adjustment for biological effects. *Bioinformatics*. 2018 Apr 1;34(7):1141-1147.
48. Brunet JP, Tamayo P, Golub TR, Mesirov JP. Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 23;101(12):4164-9.
49. Kim H, Park H. Sparse non-negative matrix factorizations via alternating non-negativity-constrained least squares for microarray data analysis. *Bioinformatics*. 2007 Jun 15;23(12):1495-502.
50. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D353-D361.
51. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*. 2015 Dec 23;1(6):417-425.
52. Marinkovic T, Garin A, Yokota Y, Fu YX, Ruddle NH, Furtado GC, i sur. Interaction of mature CD3+CD4+ T cells with dendritic cells triggers the development of tertiary lymphoid structures in the thyroid. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116(10):2622-32.
53. Muhl L, Genové G, Leptidis S, Liu J, He L, Mocci G, i sur. Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination. *Nat Commun*. 2020 Aug 7;11(1):3953.
54. Sharma V, Letson J, Furuta S. Fibrous stroma: Driver and passenger in cancer development. *Sci Signal*. 2022 Mar 8;15(724):eabg3449.
55. Buechler MB, Pradhan RN, Krishnamurty AT, Cox C, Calviello AK, Wang AW, i sur. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature*. 2021 May;593(7860):575-579.
56. Madisson E, Wilbrey-Clark A, Miragaia RJ, Saeb-Parsy K, Mahbubani KT, Georgakopoulos N, i sur. scRNA-seq assessment of the human lung, spleen, and esophagus tissue stability after cold preservation. *Genome Biol*. 2019 Dec 31;21(1):1.

10. LITERATURA

57. van den Brink SC, Sage F, Vértesy Á, Spanjaard B, Peterson-Maduro J, Baron CS, i sur. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nat Methods*. 2017 Sep 29;14(10):935-936.
58. Tombor LS, John D, Glaser SF, Luxán G, Forte E, Furtado M, i sur. Single cell sequencing reveals endothelial plasticity with transient mesenchymal activation after myocardial infarction. *Nat Commun*. 2021 Jan 29;12(1):681.
59. Andrijevic D, Vrselja Z, Lysyy T, Zhang S, Skarica M, Spajic A, i sur. Cellular recovery after prolonged warm ischaemia of the whole body. *Nature*. 2022 Aug;608(7922):405-412.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Điljferije Aliti

Datum i mjesto rođenja: 4. 6. 1998., Osijek

Adresa stanovanja: Županijska 40, Osijek

Kontakt: +385 95 544 3300

E-mail: alitidiljferije@gmail.com

OBRAZOVANJE

2005. – 2013. Osnovna škola Svete Ane u Osijeku

2013. – 2017. II. gimnazija Osijek

2017. – 2020. Medicinski fakultet u Osijeku, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2020. – 2022. Medicinski fakultet u Osijeku, Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika