

METABOLE WIJZIGINGEN BIJ LONGKANKER
EEN ¹H-NMR SPECTROSCOPISCHE ANALYSE VAN BLOEDPLASMA

Vincent Stevens

Eindwerk ter behalen van de graad van BSc in de biologie aan de Universiteit Hasselt, academiejaar 2013 – 2014

Promotor: prof. dr. Peter Adriaensens

Copromotor: prof. dr. Wanda Guedens

Begeleider: drs. Evelyne Louis

Inhoud

Abstract	1
Inleiding	2
Materiaal en methoden	6
Proefpersonen	6
Staalvoorbereiding	7
¹ H-NMR spectroscopische analyse en toewijzing van resonantiesignalen	7
Statistische analyse	8
Resultaten	11
Discussie	20
Conclusie	23
Dankwoord	24
Referentielijst	25
Appendix A: Toewijzing resonantiesignalen ¹H-NMR	28
Appendix B: Intermediair metabolisme	32

Abstract

Longkanker is wereldwijd de meest letale en een veelvuldig gediagnosticeerde kanker. In het algemeen is de prognose slecht, wat hoofdzakelijk te wijten is aan het feit dat longtumoren vaak pas in een vergevorderd stadium worden gediagnosticeerd. Identificatie van potentiële biomerkers in bloedplasma kan deze problematiek tegemoetkomen, alsook biedt het een mogelijkheid om metabole wijzigingen, die gepaard gaan met de carcinogenese, te karakteriseren. De groep proefpersonen beschreven in dit eindwerk bestaat uit 539 individuen (248 longkankerpatiënten en 291 controlepersonen). ^1H -NMR spectroscopie en multivariate statistische analysemethoden werden gehanteerd om te onderzoeken of de metabole samenstelling van bloedplasma toelaat om een onderscheid te maken tussen longkankerpatiënten en controlepersonen. Er werd een *up*-regulatie van glucose, inositol en threonine alsook een *down*-regulatie van lipiden, lactaat, alanine en citraat in het bloedplasma van longkankerpatiënten vastgesteld. Deze resultaten zijn onderhevig aan enkele belangrijke voorwaarden, in het bijzonder is de extrapolatie van statistische relevantie naar biochemische relevantie niet evident. De voorgestelde biochemische interpretatie van de verkregen resultaten ondersteunt hoofdzakelijk twee metabole wijzigingen bij longkanker, namelijk een verhoogde gluconeogenese en een verstoorde citroenzuurcyclus.

Inleiding

Longkanker is wereldwijd de meest gediagnosticeerde en letale kanker bij mannen alsook de vierde meest gediagnosticeerde en tweede meest letale kanker bij vrouwen (JEMAL et al. 2011). In het algemeen is de prognose slecht, met een vijfjaarsoverleving van minder dan 15% (KARIM-KOS et al. 2008). Dit is hoofdzakelijk te wijten aan het feit dat longtumoren vaak pas in een vergevorderd stadium worden gediagnosticeerd, wegens het veelal ontbreken van symptomen tijdens de initiële stadia (DIEDERICH et al. 2004). Recent onderzoek focust zich dan ook op het detecteren van longtumoren in een vroeg stadium, in het bijzonder door het trachten te identificeren van potentiële biomerkers in onder meer bloedplasma, urine, speeksel en sputum (HASSANEIN et al. 2012). Holistische, *high-throughput* onderzoeksdomeinen zoals *genomics*, *epigenomics*, *transcriptomics* en *proteomics* hebben een beduidende bijdrage geleverd aan vorderingen in dit onderzoeksgebied (OCAK et al. 2009). Echter kennen geen van de tot nog toe geïdentificeerde, (long)kanker-geassocieerde biomerkers een succesvolle klinische implementatie: de interactie tussen theorie en toepassing op het gebied van biomerkers in de oncologie is tot op heden zo goed als onbestaande (HASSANEIN et al. 2012).

Metabolomics is een recent onderzoeksdomein waarbij de metabole samenstelling van cellen, weefsels, en lichaamsvloeistoffen (e.g. bloedplasma, urine) bestudeerd wordt. Zodoende kunnen specifieke metabole verstoringen, veelal kenmerkend bij bepaalde aandoeningen (e.g. (long)kanker), gekarakteriseerd worden (DUARTE et al. 2013). Om deze doelstelling te bereiken worden gewoonlijk geavanceerde analytische methoden gebruikt, zoals proton nucleaire magnetische resonantie ($^1\text{H-NMR}$) spectroscopie, gecombineerd met multivariate statistische data-analyse (LENZ & WILSON 2007; NICHOLSON et al. 1999).

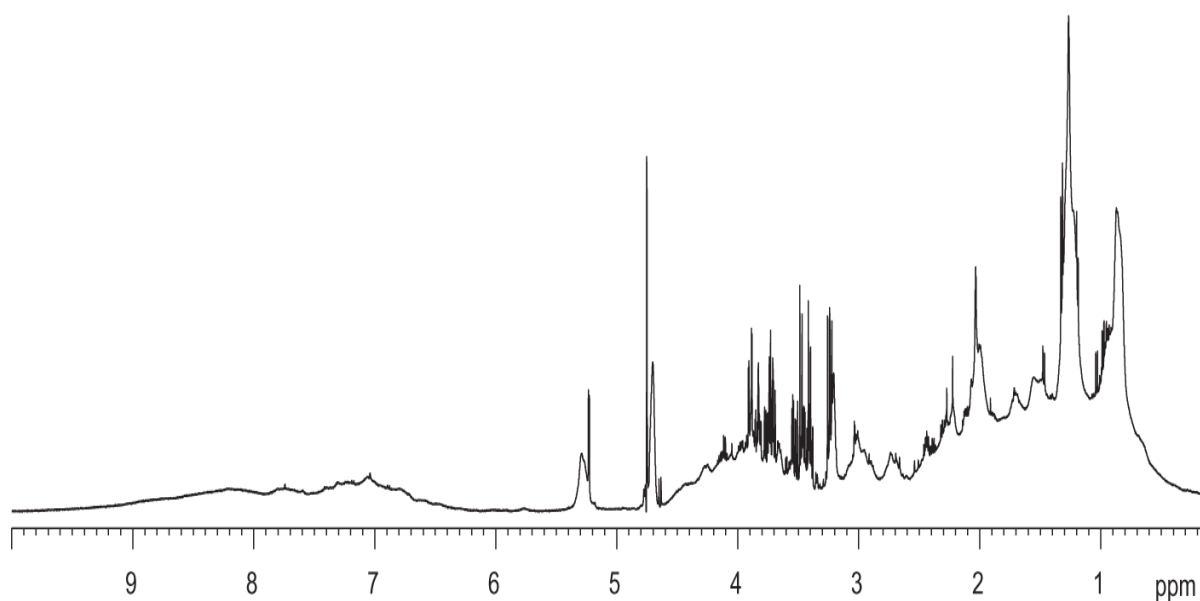
De carcinogenese gaat onvermijdelijk gepaard met aanzienlijke metabole wijzigingen op het niveau van de tumor. De karakteristieke verhoogde celdelingsactiviteit leidt tot een toenemende vraag naar essentiële biomoleculen en bijgevolg tot een toename van de anabole activiteit in de cel. Eveneens verstoort de aberrante celgroei veelal de weefselstructuur waardoor de afstand tussen cellen en bloedvaten toeneemt en zodus de toevoer van nodige nutriënten en zuurstof daalt. Daarom kan de “metabole transformatie” van kankercellen in de meeste situaties begrepen worden als een overlevingsstrategie in zuurstof- en nutriëntarme omstandigheden en als ondersteuning voor de typische expansiedrang van tumoren (BRACKE et al. 2011).

Het meest opvallende voorbeeld van een dergelijke tumor-specifieke metabole wijziging is een verschuiving van het glucosemetabolisme en staat bekend als het Warburg effect (WARBURG et al. 1924). Typerend voor deze metabole wijziging is een verhoogde glycolyse, behouden bij een normale cellulaire zuurstofspanning, met een verhoogde productie van lactaat tot gevolg (BRAHIMI-HORN et al. 2007). Een alternatieve metabole wijziging, die vaak gepaard gaat met het Warburg effect, bestaat uit het verhoogd gebruik van glucose als koolstofbron voor anabole reacties (KROEMER & POUYSSÉGUR 2008). Hoewel het Warburg effect niet voorkomt bij alle kankers, is een verhoogde glucoseopname nagenoeg universeel (FUNES et al. 2007). Er zijn verscheidene redenen waarom een verhoogde glucoseopname voor glycolytische energieproductie en/of voor anabole reacties een voordeel levert bij het onderhoud en de groei van tumoren, zie KROEMER & POUYSSÉGUR (2008) voor een gedetailleerde discussie.

De opmerkelijke verschuiving van het glucosemetabolisme is echter slechts een onderdeel van de “metabole transformatie” die zich manifesteert bij vele kankercellen. Om celgroei en bijgevolg celdeling efficiënt te doen verlopen, moet de cel aan een gestaag tempo zijn uit nucleïnezuren bestaande genoom volledig repliceren, een groot aantal proteïnen en lipiden produceren en bijgevolg deze biomoleculen assembleren in twee dochtercellen. Het is dan ook niet verwonderlijk dat kankercellen, naast de verhoogde glucoseopname, ook tal van andere metabole wijzigingen ondergaan, zoals de verhoogde opname van glutamine, choline en acetaat (DEBERARDINIS et al. 2008). De bovengenoemde voorbeelden van metabole wijzigingen als onderdelen van de “metabole transformatie” bij kankercellen worden in grote mate gestuurd door oncogenen en tumorsuppressorgenen (BRACKE et al. 2011). Dit eindwerk heeft niet als doel om dieper in te gaan op het genetische aspect, maar het is duidelijk dat deze “metabole transformatie” onlosmakelijk verbonden is met een “genetische transformatie”.

De beschreven metabole wijzigingen in beschouwing genomen, is het begrijpelijk dat bepaalde metabolieten geschikt zijn als biomarker voor (long)kanker (MAMAS et al. 2011). ¹H-NMR spectroscopie maakt een relatief snelle en niet-invasieve identificatie alsook kwantificering van complexe mengsels van metabolieten mogelijk, zonder dat er een uitgebreide staalvoorbereiding bij komt kijken (ABOUD & WEISS 2013; LINDON & NICHOLSON 2008).

Met behulp van ^1H -NMR spectroscopie worden de magnetische eigenschappen van de kernen van waterstofatomen bestudeerd. Een belangrijk aspect van ^1H -NMR spectroscopie is dat bepaalde chemische verbindingen, in het bijzonder metabolieten, geïdentificeerd kunnen worden via een ^1H -NMR spectrum op basis van de plaats (i.e. chemische verschuiving, uitgedrukt in *parts per million* (ppm)), de intensiteit en de vorm (cfr. J-koppeling) van karakteristieke resonantiesignalen. Hierbij valt op te merken dat de intensiteit van deze resonantiesignalen proportioneel is met het aantal “soorten” waterstofatoomkernen aanwezig in het staal, waardoor een kwantificering van metabolieten mogelijk is mits de “soorten” waterstofatoomkernen van deze metabolieten gekend zijn. **FIGUUR 1** geeft een voorbeeld weer van een typisch *in vivo* ^1H -NMR spectrum van bloedplasma. Zie TER VOERT et al. (2011) voor een meer diepgaande uitleg over ^1H -NMR spectroscopie in een toegepast biochemisch kader.



FIGUUR 1 Typisch 500 MHz ^1H -NMR spectrum (0 – 10 ppm gebied) van bloedplasma. De horizontale as toont de chemische verschuiving, uitgedrukt in *parts per million* (ppm). De verticale richting illustreert de relatieve intensiteit van de resonantiesignalen. Figuur afkomstig uit DUARTE & GIL (2012).

Kenmerkend voor *metabolomics* is de grote hoeveelheid complexe data waarbij het resumeren en interpreteren ervan vaak niet mogelijk is zonder geschikte statistische *tools*. Het is aangewezen om multivariate statistische analysemethoden te hanteren om een correcte modellering, analyse en interpretatie van dergelijke data mogelijk te maken (WIKLUND et al. 2008). De reden hiervoor is dat bij deze analysemethoden, in tegenstelling tot bij univariate analysemethoden, verondersteld wordt dat de afhankelijke variabele door meerdere factoren (en zelfs combinaties van factoren) beïnvloed kan worden, bijvoorbeeld door de leeftijd en het geslacht van proefpersonen (JOHNSON & WICHERN 2007). Veelgebruikte voorbeelden van multivariate statistische *tools* zijn *principal component analysis* (PCA) en *orthogonal projections to latent structures discriminant analysis* (OPLS-DA). PCA maakt het mogelijk om gecorreleerde structuren en uitschieters binnen de dataset op te sporen (JACKSON 1991; JOLLIFFE 2002). OPLS-DA kan gebruikt worden om modellen te bouwen die het aan de hand van de data mogelijk maken om klassen van elkaar te onderscheiden, zoals vaak de bedoeling is bij *case-control* studies (TRYGG & WOLD 2002). Zodus kan de relevantie van dergelijke statistische analysemethoden in de zoektocht naar potentiële biomerkers begrepen worden.

Dit eindwerk tracht een bijdrage te leveren aan de zoektocht naar een geschikte biomarker voor longkanker. De focus ligt er op om, met behulp van ^1H -NMR spectroscopische analyse van bloedplasma en multivariate statistische analysemethoden, een beter begrip te verkrijgen van de metabole wijzigingen die plaatsvinden bij longkanker.

Materiaal en methoden

Proefpersonen

Enkel proefpersonen bij wie longkanker ontdekt werd via computertomografie (CT) met vervolgens een bevestiging door positronemissietomografie (PET)-CT in het Limburgs PET Centrum werden geïncludeerd. De diagnose van longkanker werd bevestigd aan de hand van een anatomopathologische biopsie of door een arts gespecialiseerd in het interpreteren van radiologische en klinische data betreffende longkanker. Op basis van de anatomopathologische biopsie werd eveneens de histologie van de longtumoren vastgesteld. De *tumor, nodes and metastases* (TNM) classificaties en de corresponderende tumorstadia werden bepaald volgens *TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition* (SOBIN et al. 2009). De controlegroep bestaat uit personen die verwezen werden naar de afdeling nucleaire geneeskunde in het Ziekenhuis Oost-Limburg voor een hartonderzoek. Deze controlepersonen hebben geen PET/CT-scan ondergaan.

Algemene karakteristieken van de proefpersonen (i.e. geslacht, leeftijd, lichaamslengte, lichaamsgewicht en rookstatus) alsook relevante aandoeningen (in het bijzonder diabetes type 1/2) werden in beschouwing genomen. Exclusiecriteria werden als volgt gedefinieerd: (1) minder dan zes uren nuchter, (2) nuchtere bloedplasmaglucozeconcentratie ≥ 200 mg/dl, (3) inname van medicatie op de dag van bloedafname en (4) behandeling of geschiedenis van kanker in de voorgaande vijf jaren.

De studie werd uitgevoerd in overeenstemming met de ethische code van de Verklaring van Helsinki en van *Good Clinical Practice*. Het studieprotocol werd goedgekeurd door de medisch-ethische commissies van het Ziekenhuis Oost-Limburg en de Universiteit Hasselt. *Informed consents* werden verkregen van alle proefpersonen.

Staalvoorbereiding

Veneuze bloedstalen van nuchtere proefpersonen werden verzameld in *BD Vacutainer® Lithium Heparin 17 IU/ml 10 ml Tubes* en binnen vijf tot tien minuten bewaard op 4 °C. Binnen tien uren na de bloedafname werden de bloedstalen op ijs naar het centraal laboratorium getransporteerd en vervolgens op kamertemperatuur gecentrifugeerd (1600 g, 15 min). Daarna werden vier bloedplasma *aliquots* van 500 µl overgebracht in steriele *cryovials* en bewaard op -80 °C tot de ¹H-NMR analyse, die binnen zes maanden plaatsvond. Indien proefpersonen toestemming gaven om hun biologisch materiaal te bewaren, werden drie van de vier bloedplasma *aliquots* bewaard bij de Universitaire Biobank Limburg voor onderzoekdoeleinden.

Voordat de ¹H-NMR analyse plaatsvond, werden de bloedplasma *aliquots* ontdooid en gehomogeniseerd met een *vortex mixer*. Na centrifugatie (13000 g, 4 min, 4 °C) werden bloedplasma *aliquots* van 200 µl verdund met 600 µl gedeutereerd water (D₂O, 99,9%, *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*, Andover, VS), dat 0,3 µg/µl 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionzuur (TSP, 98%, *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*, Andover, VS) bevat als interne standaard voor de kalibratie van de chemische verschuiving op 0,015 ppm (BECKONERT et al. 2007; POHL & ECKLE 1969). De bloedplasmastalen werden uiteindelijk overgebracht in 5 mm NMR-buisjes en geanalyseerd.

¹H-NMR spectroscopische analyse en toewijzing van resonantiesignalen

De ¹H-NMR spectra werden opgenomen met een 400 MHz *Varian Inova* NMR spectrometer (*Agilent Technologies, Inc.*, Santa Clara, VS), waarbij de magnetische fluxdichtheid 9,4 T en de temperatuur 294,35 K bedroeg. Gebruikmakend van de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulssequentie werden resonantiesignalen van macromoleculen onderdrukt aangezien deze een kortere T_2 -relaxatietijd hebben dan kleinere moleculen (CONNOR et al. 1987; MEIBOOM & GILL 1958). Ook werd het resonantiesignaal van water onderdrukt om zo een optimale detectie en kwantificering van resonantiesignalen in de buurt ervan te verkrijgen. De ¹H-NMR spectra werden manueel gefaseerd en gekalibreerd met het resonantiesignaal van de interne standaard, i.e. TSP, op 0,015 ppm. Eveneens werden de *baselines* van deze spectra gecorrigeerd.

De toewijzing van de resonantiesignalen aanwezig in de $^1\text{H-NMR}$ spectra gebeurde aan de hand van literatuur wat betreft lipiden, maar voornamelijk op basis van informatie afkomstig van *spiking* experimenten, waarbij referentiestalen van bloedplasma (steeds van dezelfde controlepersoon) telkens *gespiked* werden met 32 verschillende metabolieten met een bloedplasmaconcentratie van 0,01 mg/ μl . Deze 32 metabolieten omvatten alle bij de mens voorkomende aminozuren en componenten van het koolhydraten- en lipidenmetabolisme, nl. acetaat, acetoacetaat, alanine, arginine, asparagine, asparaat, citraat, creatine, creatinine, cysteïne, glucose, glutamaat, glutamine, glycine, histidine, inositol, isoleucine, lactaat, leucine, lysine, methionine, fenylalanine, proline, pyruvaat, serine, succinaat, threonine, tryptofaan, tyrosine, valine, α -ketoglutaraat en β -hydroxybutyraat. **TABEL A** (Appendix A) geeft een overzicht.

De $^1\text{H-NMR}$ spectra werden opgedeeld in 112 integratiegebieden, waarvan de integratiewaarden genormaliseerd werden ten opzichte van de som van de integratiewaarden van alle integratiegebieden exclusief integratiegebieden 18, 19, 21, 24, 28, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 53, 54, 58, 66, 69, 71, 76, 86, 87, 88, 90, 91, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 en 110. Deze 33 integratiegebieden omvatten relatief hoge integratiewaarden, waardoor het includeren ervan bij de normalisatie tot misleidende resultaten kan leiden. Het eindresultaat is een verzameling van genormaliseerde integratiewaarden kenmerkend voor 110 integratiegebieden (alle integratiegebieden met uitzondering deze van water en TSP).

Statistische analyse

Gebruikmakend van SIMCA (Versie 13.0.3.0, *Umetrics*, Umeå, Zweden) werden multivariate statistische analysemethoden gehanteerd om te onderzoeken of de metabole samenstelling van bloedplasma toelaat om een onderscheid te maken tussen longkankerpatiënten en controlepersonen. Na *mean-centering* en *Pareto scaling* van de data werd getracht om, door middel van PCA, gecorreleerde structuren binnen de dataset (longkankerpatiënten en controlepersonen apart beschouwd) te identificeren (CRAIG et al. 2006; VAN DEN BERG et al. 2006). Bij *mean-centering* worden alle gemiddelde waarden als gelijk beschouwd. Hierdoor wordt er gecorrigeerd voor de variantie te wijten aan verschillen tussen hoge en lage gemiddelde waarden en wordt zodus enkel het fluctuerende gedeelte van de data beschouwd (BRO & SMILDE 2003). Bijgevolg wordt enkel de relevante variantie (i.e. de variantie tussen de stalen) in rekening gebracht. Bij *Pareto scaling* wordt de vierkantswortel van de standaarddeviatie gebruikt als schaalfactor (ERIKSSON et al. 1999). Hierdoor wordt de dominantie van grotere waarden gereduceerd.

Een PCA *score scatter plot* van zowel longkankerpatiënten als controlepersonen, verkregen gebruikmakend van alle 110 integratiegebieden, maakt een relevante interpretatie van de betreffende PCA modellen mogelijk. *Scores* zijn nieuwe variabelen die de X-datamatrix samenvatten en zijn orthogonaal, i.e. volledig onafhankelijk van elkaar. De X-datamatrix bestaat uit de integratiegebieden met bijhorende waarden voor elke beschouwde proefpersoon. Er zijn evenveel *scores* als dat er principale componenten in het PCA model aanwezig zijn. *Score* t_1 verklaart de grootste variantie, gevolgd door *score* t_2 , *score* t_3 , etc.

$R^2X_{\text{cumulatief}}$ en $Q^2_{\text{cumulatief}}$ zijn representatieve maten om de statistische relevantie van een PCA model te bepalen. $R^2X_{\text{cumulatief}}$ is het cumulatieve percentage van de variantie in X verklaard door het PCA model gebruikmakend van alle principale componenten. $Q^2_{\text{cumulatief}}$ is het cumulatieve percentage van de variantie in X voorspeld door dit model volgens *cross-validation*. Bijgevolg zijn $R^2X_{\text{cumulatief}}$ en $Q^2_{\text{cumulatief}}$ maten voor, respectievelijk, hoe goed het PCA model de variantie in X beschrijft en hoe goed dit model de variantie in X voorspelt.

Op basis van de *Hotelling's T^2 range plots*, inherent aan de betreffende PCA modellen, werden de uitschieters geïdentificeerd. De *Hotelling's T^2 -toets* kan gezien worden als een multivariate generalisatie van de t-toets en is een combinatie van alle *scores* in alle principale componenten (HOTELLING 1931). Het is een maat voor hoe ver een observatie (i.e. proefpersoon) van de oorsprong van het PCA model gelegen is.

Na exclusie van de uitschieters werd OPLS-DA gebruikt om een model te bouwen dat een onderscheid maakt tussen longkankerpatiënten en controlepersonen (een zogenaamde *classifier*). OPLS-DA legt een relatie tussen een X-datamatrix en een Y-datamatrix in een lineair multivariaat model. De X-datamatrix bestaat hier opnieuw uit de integratiegebieden met bijhorende waarden voor elke proefpersoon. De Y-datamatrix bestaat uit discrete variabelen die twee klassen (in dit geval longkankerpatiënten en controlepersonen) weerspiegelen. Aan de hand van dit klasse-onderscheid separeert OPLS-DA de systematische variantie in X in twee componenten: één die lineair gerelateerd (en bijgevolg voorspellend) is en één die orthogonaal is ten opzichte van Y. Zodus is de lineair gerelateerde (i.e. voorspellende) variantie in X ten opzichte van Y gemodelleerd door de voorspellende componenten en vertegenwoordigt het de variantie tussen de twee klassen. De variantie in X orthogonaal ten opzichte van Y wordt gemodelleerd door de orthogonale componenten en vertegenwoordigt de variantie binnen de twee klassen. De orthogonale *scores* in X worden weergegeven als t_{01} , t_{02} , t_{03} , etc. voor respectievelijk de eerste, tweede, derde, etc. orthogonale *score*.

$R^2X_{\text{cumulatief}}$, $R^2_{\text{cumulatief}}$ en $Q^2_{\text{cumulatief}}$ zijn representatieve maten om de statistische relevantie van een OPLS-DA model te bepalen. $R^2X_{\text{cumulatief}}$ is het percentage van de variantie in X verklaard door het OPLS-DA model gebruikmakend van alle voorspellende en orthogonale componenten, $R^2_{\text{cumulatief}}$ is het percentage van de variantie in Y verklaard door dit model en $Q^2_{\text{cumulatief}}$ is het percentage van de variantie in Y die aan de hand van dit model voorspeld kan worden volgens *cross-validatie*. Hieruit volgt dat $R^2X_{\text{cumulatief}}$, $R^2_{\text{cumulatief}}$ en $Q^2_{\text{cumulatief}}$ maten zijn voor, respectievelijk, hoe goed het OPLS-DA model de variantie in X beschrijft, hoe goed het model de variantie in Y beschrijft en hoe goed het model de variantie in Y voorspelt. Merk hierbij op dat $Q^2_{\text{cumulatief}}$ bij PCA een maat is voor hoe goed het PCA model gebruikmakend van alle principale componenten de variantie in X voorspelt, en zodus niet equivalent is aan $Q^2_{\text{cumulatief}}$ bij OPLS-DA.

Op basis van *variable influence on projection* (VIP)-waarden, inherent aan het verkregen OPLS-DA model, werden de statistisch meest relevante integratiegebieden geïdentificeerd. VIP-waarden illustreren de statistische relevantie van de integratiegebieden in dit model zowel ten opzichte van Y als ten opzichte van X. Er werd gekozen om alle variabelen (i.e. integratiegebieden) met een VIP-waarde hoger dan 0,8 als statistisch meest relevant te beschouwen. Deze keuze bevat een zekere subjectieve component, en waarschijnlijk zijn er onderzoekers die bereid zijn om variabelen met een lagere VIP-waarde als statistisch meest relevant te beschouwen.

De *S-plot* is een visuele manier om integratiegebieden met een hoge VIP-waarde te identificeren in het verkregen OPLS-DA model. Integratiegebieden die in de “staarten” van de S-vorm gesitueerd zijn hebben een hoge VIP-waarde. Wat betreft de theoretische achtergrond met betrekking tot de *S-plot* wordt verwezen naar WIKLUND et al. (2008).

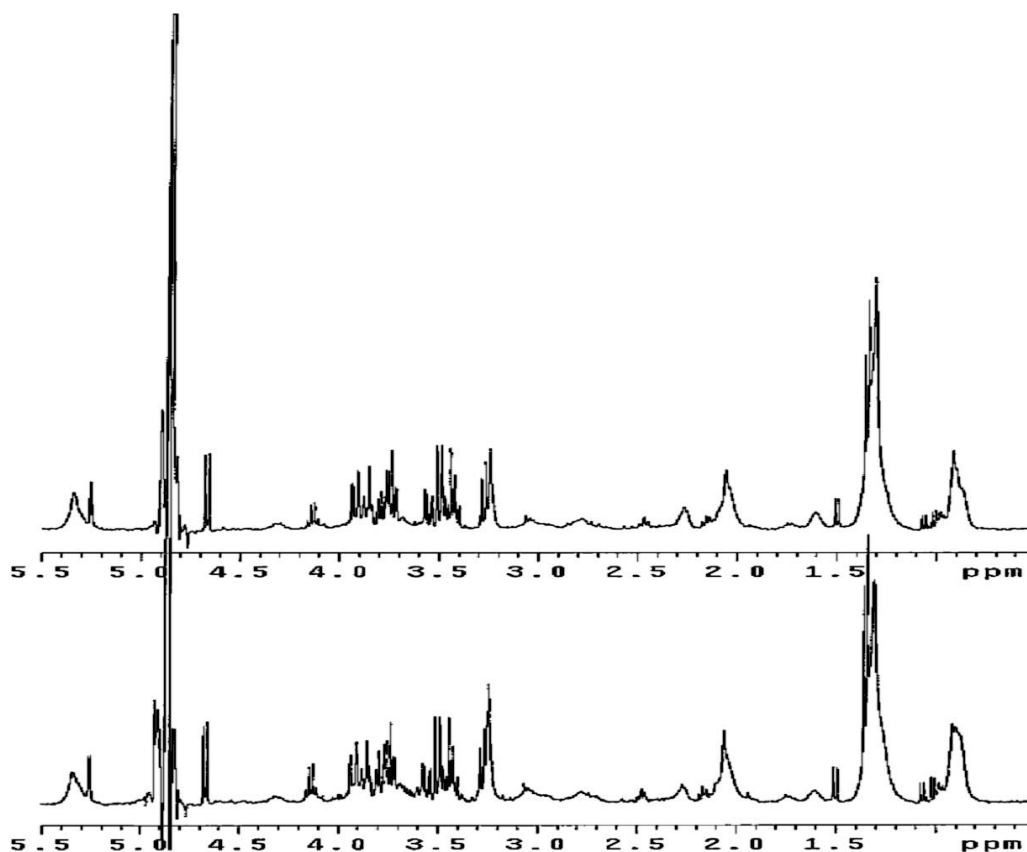
Resultaten

De groep proefpersonen, beschreven in dit eindwerk, bestaat uit 539 individuen (248 longkankerpatiënten en 291 controlepersonen). **TABEL 1** geeft een overzicht van algemene karakteristieken van de geïncludeerde proefpersonen. Er kan vastgesteld worden dat er geen sprake is van sterk afwijkende heterogeniteit tussen beide groepen.

Het bloedplasma van de proefpersonen werd geanalyseerd met behulp van $^1\text{H-NMR}$ spectroscopie. **FIGUUR 2** toont twee willekeurig gekozen 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra afkomstig van een longkankerpatiënt en een controlepersoon. Merk hierbij op dat het niet mogelijk is om eventuele systematische verschillen te karakteriseren enkel door middel van visuele inspectie. Om eventuele systematische verschillen toch te kunnen karakteriseren werden de $^1\text{H-NMR}$ spectra eerst in 110 (initieel 112, cfr. Materiaal en Methoden p. 8) integratiegebieden opgedeeld. Deze integratiegebieden zijn de variabelen waarop vervolgens multivariate statistische analysemethoden werden toegepast.

TABEL 1 Overzicht van algemene karakteristieken (i.e. geslacht, leeftijd, lichaamslengte, lichaamsgewicht en rookstatus) van de 539 proefpersonen, waarvan 248 longkankerpatiënten en 291 controlepersonen. De *body mass index* (BMI) werd berekend. Leeftijd, lichaamslengte, lichaamsgewicht en BMI zijn weergegeven als gemiddelde waarden met standaarddeviatie. *: langer dan zes maanden gestopt met roken.

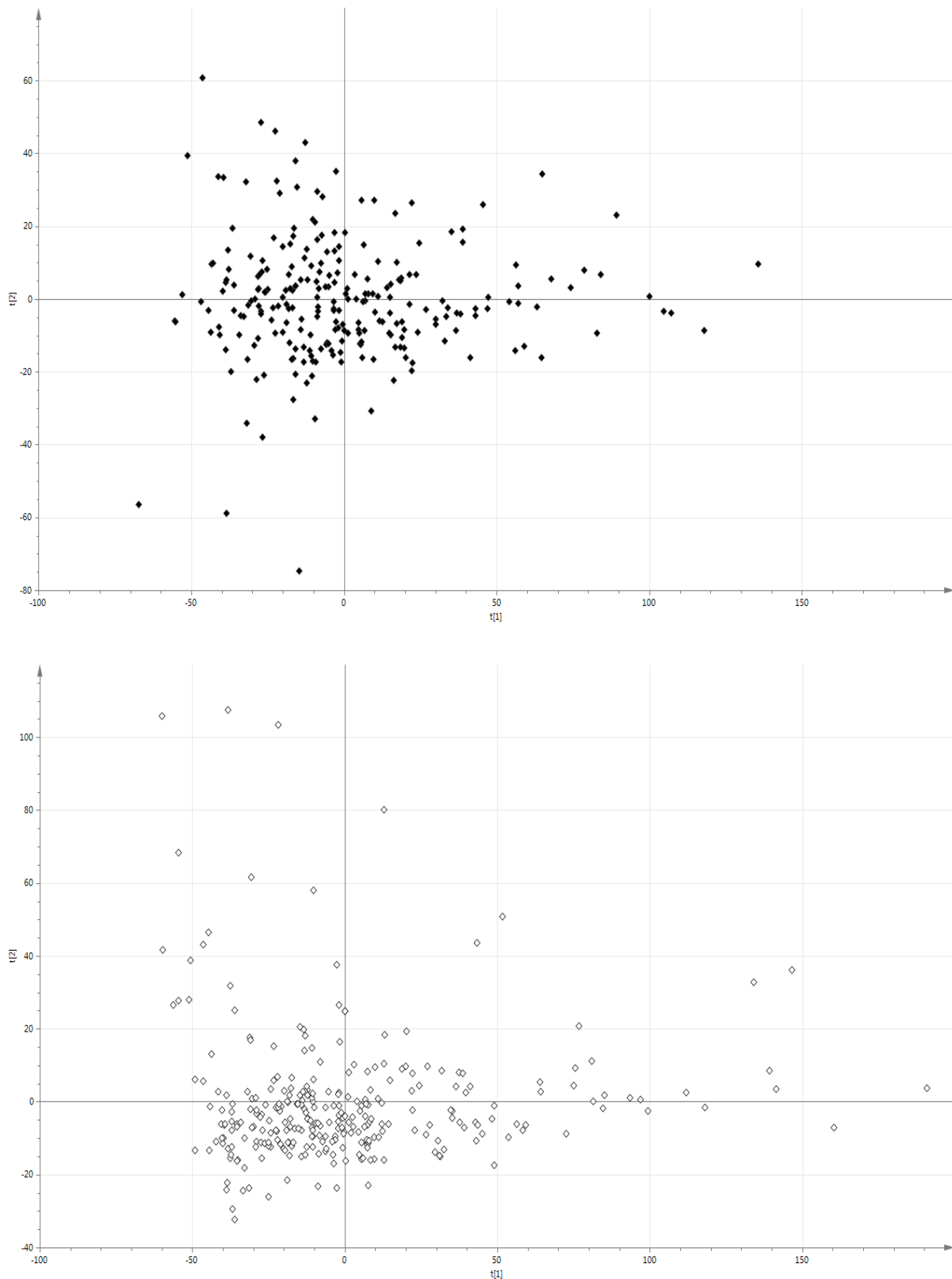
		Longkankerpatiënten (248)	Controlepersonen (291)
Geslacht , aantal (%)	Man	170 (69)	156 (54)
	Vrouw	78 (31)	135 (46)
Leeftijd , jaren (bereik)		68 ± 10 (36 – 88)	66 ± 12 (23 – 89)
Lichaamsgewicht , kg (bereik)		73 ± 14 (45 – 120)	78 ± 15 (46 – 136)
Lichaamslengte , m (bereik)		1,69 ± 0,08 (1,45 – 1,98)	1,67 ± 0,10 (1,41 – 1,95)
BMI , kg/m ² (bereik)		25,7 ± 4,6 (17,5 – 44,4)	27,9 ± 5,1 (16,5 – 46,7)
Rookstatus , aantal (%)	Roker	129 (52)	60 (21)
	Ex-roker*	110 (44)	125 (43)
	Niet-roker	9 (4)	106 (36)



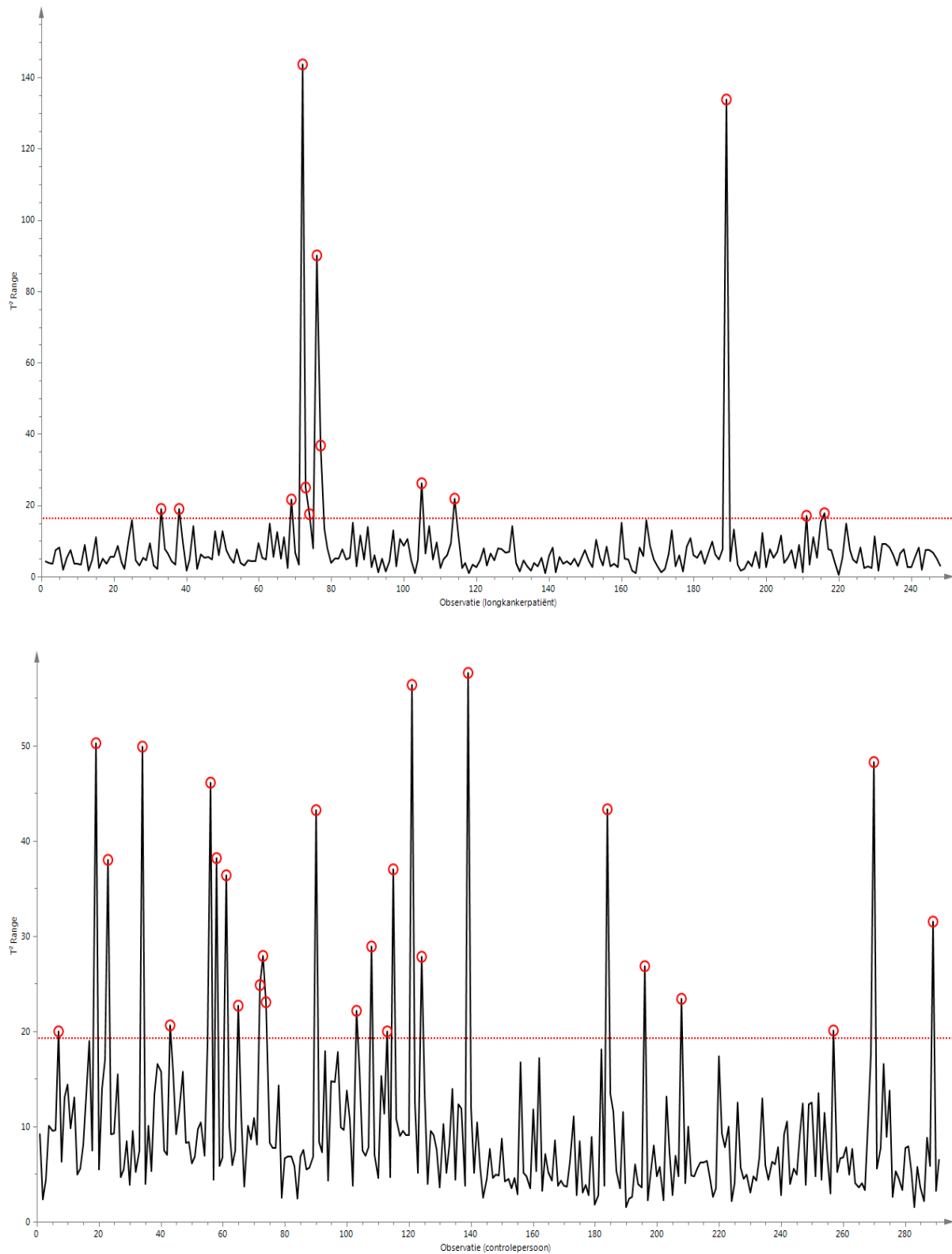
FIGUUR 2 400 MHz ^1H -NMR spectra (0 – 5,5 ppm gebied) van een longkankerpatiënt (boven) en een controlepersoon (onder). De horizontale as toont de chemische verschuiving, uitgedrukt in *parts per million* (ppm). De verticale richting illustreert de relatieve intensiteit van de resonantiesignalen.

Multivariate statistische analysemethoden werden gehanteerd om te onderzoeken of de metabole samenstelling van bloedplasma toelaat om een onderscheid te maken tussen longkankerpatiënten en controlepersonen. Na *mean-centering* en *Pareto scaling* van de data werd getracht om, door middel van PCA, gecorreleerde structuren binnen de dataset (longkankerpatiënten en controlepersonen apart beschouwd) te identificeren. **FIGUUR 3** toont de PCA *score scatter plot* van, respectievelijk, de 248 longkankerpatiënten (PCA model met 8 principale componenten, $R^2X_{\text{cumulatief}} = 0,890$ en $Q^2_{\text{cumulatief}} = 0,681$) en de 291 controlepersonen (PCA model met 10 principale componenten, $R^2X_{\text{cumulatief}} = 0,953$ en $Q^2_{\text{cumulatief}} = 0,889$), verkregen gebruikmakend van alle 110 integratiegebieden.

Op basis van de *Hotelling's T² range plots*, inherent aan de betreffende PCA modellen, werden 39 uitschieters geïdentificeerd (**FIGUUR 4**). Deze uitschieters omvatten 13 longkankerpatiënten en 26 controlepersonen, waarbij het veelal over personen met diabetes type 1/2 en/of met verhoogde lipidenconcentraties in het bloed gaat.

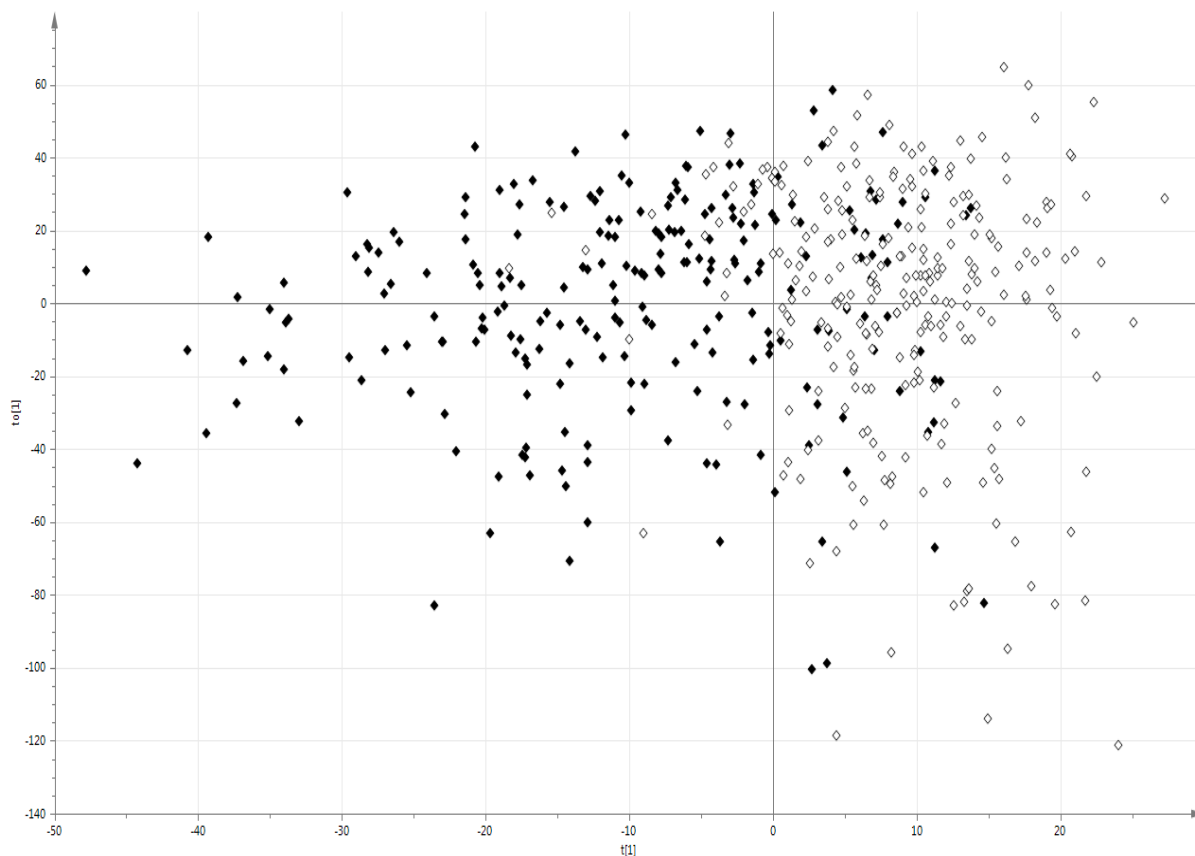


FIGUUR 3 PCA score scatter plot van, respectievelijk, de 248 longkankerpatiënten (boven (◆), PCA model met 8 principale componenten, $R^2X_{\text{cumulatief}} = 0,890$ en $Q^2_{\text{cumulatief}} = 0,681$) en de 291 controlepersonen (onder (◇), PCA model met 10 principale componenten, $R^2X_{\text{cumulatief}} = 0,953$ en $Q^2_{\text{cumulatief}} = 0,889$), verkregen gebruikmakend van alle 110 integratiegebieden. In een PCA score scatter plot worden de twee belangrijkste scores gevisualiseerd, i.e. t_1 en t_2 , in een tweedimensionale ruimte, waarbij weergegeven wordt hoe de observaties (i.e. proefpersonen) liggen ten opzichte van elkaar.



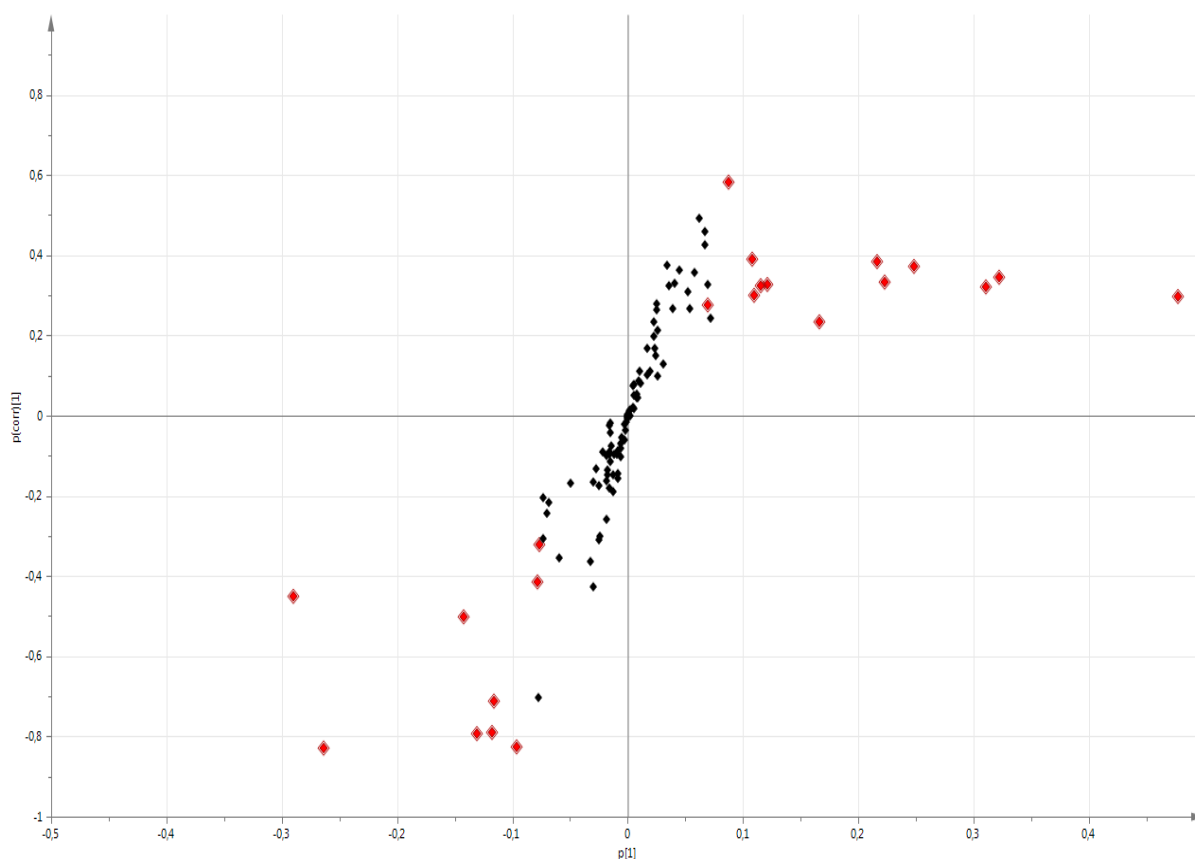
FIGUUR 4 Hotelling's T^2 range plots, inherent aan de betreffende PCA modellen. Observaties (i.e. longkankerpatiënten (boven) en controlepersonen (onder)) die niet voldoen aan het beschouwde criterium, i.e. T^2 range < 95% (significantieniveau van 0,05), zijn boven de rode stippellijn gesitueerd en aangeduid. Deze 39 uitschieters omvatten 13 longkankerpatiënten alsook 26 controlepersonen en werden geëxcludeerd. T^2 range representeert de Hotelling's T^2 -toets, i.e. de combinatie van alle scores in alle principale componenten. Het is een maat voor hoe ver een observatie (i.e. proefpersoon) van de oorsprong van het betreffende PCA model gelegen is.

Na exclusie van de uitschieters, waardoor de totale groep proefpersonen gereduceerd wordt naar 500 proefpersonen (235 longkankerpatiënten en 265 controlepersonen), werd OPLS-DA gebruikt om een model te bouwen dat een onderscheid maakt tussen longkankerpatiënten en controlepersonen (een zogenaamde *classifier*). **FIGUUR 5** toont de OPLS-DA *score scatter plot* van de 500 proefpersonen (OPLS-DA model met één voorspellende component en vier orthogonale componenten, $R^2X_{\text{cumulatief}} = 0,813$, $R^2_{\text{cumulatief}} = 0,466$ en $Q^2_{\text{cumulatief}} = 0,385$), verkregen gebruikmakend van alle 110 integratiegebieden. De misclassificatie is acceptabel: 75,3% van de longkankerpatiënten en 93,6% van de controlepersonen werden correct geclassificeerd.



FIGUUR 5 OPLS-DA *score scatter plot* van de 500 proefpersonen (OPLS-DA model met één voorspellende component en vier orthogonale componenten, $R^2X_{\text{cumulatief}} = 0,813$, $R^2_{\text{cumulatief}} = 0,466$ en $Q^2_{\text{cumulatief}} = 0,385$), verkregen gebruikmakend van alle 110 integratiegebieden. Er kan visueel waargenomen worden dat longkankerpatiënten (\blacklozen , $n = 235$) van controlepersonen (\diamond , $n = 265$) onderscheiden kunnen worden op basis van de metabole samenstelling van het bloedplasma. De misclassificatie is acceptabel: 75,3% van de longkankerpatiënten en 93,6% van de controlepersonen werden correct geclassificeerd. In deze OPLS-DA *score scatter plot* wordt de variantie tussen de klassen in de eerste voorspellende *score* (t_1 , horizontale richting) ten opzichte van de variantie binnen de klassen in de eerste orthogonale *score* (to_1 , horizontale richting) weergegeven.

Op basis van *variable influence on projection* (VIP)-waarden, inherent aan het verkregen OPLS-DA model, werden de statistisch meest relevante integratiegebieden geïdentificeerd. Alle integratiegebieden met een VIP-waarde hoger dan 0,8 werden beschouwd. Er zijn 22 integratiegebieden die aan dit criterium voldoen, waarvan 9 *up*-gereguleerd en 13 *down*-gereguleerd zijn bij longkankerpatiënten. De *S*-plot is een visuele *tool* om de integratiegebieden met een VIP-waarde hoger dan 0,8 te visualiseren in het verkregen OPLS-DA model (FIGUUR 6).



FIGUUR 6 *S*-plot kenmerkend voor het verkregen OPLS-DA model. De integratiegebieden met een VIP-waarde hoger dan 0,8 zijn rood aangeduid. Merk op dat deze integratiegebieden in de “staarten” van de S-vorm gesitueerd zijn. De 9 rood aangeduide integratiegebieden in de linkse “staart” en de 13 rood aangeduide integratiegebieden in de rechtste “staart” zijn respectievelijk *up*-gereguleerd en *down*-gereguleerd bij longkankerpatiënten. Wat de betekenis en theoretische achtergrond van de twee getoonde assen betreft, wordt verwezen naar WIKLUND et al. (2008).

TABEL 2 en **TABEL 3** geven de statistisch meest relevante (VIP-waarde > 0,8) integratiegebieden weer, respectievelijk de 9 *up*-gereguleerde en 13 *down*-gereguleerde ten opzichte van longkankerpatiënten. De exacte VIP-waarde alsook de aanwezige metabolieten, geïdentificeerd aan de hand van metaboliet-specifieke resonantiesignalen in de betreffende integratiegebieden, zijn steeds gegeven. Indien van toepassing, werd de meest vertegenwoordigde metaboliet in elk integratiegebied geïdentificeerd aan de hand van de ¹H-NMR spectra. Een uitzondering hierop is integratiegebied 37, waar het op basis van de ¹H-NMR spectra niet mogelijk was om de meest vertegenwoordigde metaboliet met enige zekerheid te identificeren. Hierbij valt op te merken dat de identificatie van de meest vertegenwoordigde metaboliet onvermijdelijk een subjectieve component bevat.

In de veronderstelling dat (1) de steekproefpopulatie representatief is voor de totale populatie, (2) alle ¹H-NMR spectroscopische metingen in equivalente omstandigheden gebeurd zijn, (3) de toewijzing van de metaboliet-specifieke resonantiesignalen in de betreffende integratiegebieden waarheidsgetrouw is, (4) de identificatie van de meest vertegenwoordigde metaboliet adequaat gebeurde en (5) de statistische relevantie extrapoleerbaar is naar een biochemische relevantie, is er sprake van een *up*-regulatie van glucose, inositol en threonine alsook van een *down*-regulatie van lipiden, lactaat, alanine en citraat in het bloedplasma van longkankerpatiënten. Merk op dat glucose ook als meest vertegenwoordigde metaboliet geïdentificeerd werd in integratiegebied 58, dat *down*-gereguleerd is in het bloedplasma van longkankerpatiënten. Mogelijk bevindt zich hier een metaboliet die niet *gespiked* werd, en is het aandeel van glucose hier toch niet relevant.

TABEL 2 De 9 statistisch meest relevante (VIP-waarde > 0,8) integratiegebieden (IG) die *up*-gereguleerd zijn bij longkankerpatiënten. De exacte VIP-waarde (VIP) alsook de geïdentificeerde aanwezige metabolieten zijn steeds gegeven. Indien van toepassing, werd de meest vertegenwoordigde metaboliet (MVM) in elk integratiegebied geïdentificeerd aan de hand van de ¹H-NMR spectra.

IG	VIP	Aanwezige metabolieten	MVM
38	3,0396	aspartaat, cysteïne, methionine, serine, tyrosine, glucose	glucose
45	2,6660	arginine, isoleucine, inositol	inositol
44	1,5075	glucose	glucose
46	1,2699	inositol	inositol
50	1,1875	threonine	threonine
49	1,1825	threonine, inositol	inositol
48	0,9319	valine, inositol	inositol
39	0,8903	alanine, serine, glucose	glucose
37	0,8670	asparagine, creatine, cysteïne, histidine, serine, tyrosine	niet geïdentificeerd

TABEL 3 De 13 statistisch meest relevante (VIP-waarde > 0,8) integratiegebieden (IG) die *down*-gereguleerd zijn bij longkankerpatiënten. De exacte VIP-waarde (VIP) alsook de geïdentificeerde aanwezige metabolieten zijn steeds gegeven. Indien van toepassing, werd de meest vertegenwoordigde metaboliet (MVM) in elk integratiegebied geïdentificeerd aan de hand van de ¹H-NMR spectra. *: ondanks dat deze metabolieten geen deel uitmaken van de geïdentificeerde aanwezige metabolieten in de betreffende integratiegebieden, blijkt na inspectie van de ¹H-NMR spectra dat deze metabolieten hier wellicht het meest vertegenwoordigd zijn. LDL: *low-density-lipoproteïnen*. VLDL: *very-low-density-lipoproteïnen*.

IG	VIP	Aanwezige metabolieten	MVM
100	4,8907	threonine, isoleucine, lipiden (LDL & VLDL, CH ₃ -(CH ₂) _n -)	lipiden (LDL & VLDL, CH ₃ -(CH ₂) _n -)
99	3,6813	threonine, lactaat	lactaat
110	3,4309	lipiden (LDL & VLDL, CH ₃ -(CH ₂) _n -)	lipiden (LDL & VLDL, CH ₃ -(CH ₂) _n -)
98	2,5612	niet geïdentificeerd	lactaat*
95	2,2129	arginine, lysine, lipiden (-CH ₂ -CH ₂ -C=O)	lipiden (-CH ₂ -CH ₂ -C=O)
18	2,1004	lipiden (-CH=CH-)	lipiden (-CH=CH-)
58	1,6746	arginine, histidine, fenylalanine, tyrosine, glucose, inositol	glucose
96	1,1923	alanine, isoleucine, lysine	alanine
87	1,1801	methionine, valine, lipiden (-CH ₂ -C=O)	lipiden (-CH ₂ -C=O)
97	1,1666	isoleucine, lysine	lactaat*
69	1,1143	asparagine, aspartaat, lipiden (=CH-CH ₂ -CH=)	lipiden (=CH-CH ₂ -CH=)
73	0,9173	citraat	citraat
67	0,8360	asparagine, lipiden (=CH-CH ₂ -CH=)	lipiden (=CH-CH ₂ -CH=)

Discussie

Dit eindwerk heeft als doel om een bijdrage te leveren aan de zoektocht naar een geschikte biomarker voor longkanker. Met behulp van $^1\text{H-NMR}$ spectroscopische analyse van bloedplasma en multivariate statistische analysemethoden, wordt getracht een beter begrip te verkrijgen van de metabole wijzigingen die plaatsvinden bij longkanker. Een OPLS-DA model, dat 75,3% van de longkankerpatiënten en 93,6% van de controlepersonen correct classificeerde, werd beschouwd. Van de 22 statistisch meest relevante variabelen (i.e. de 22 meest differentiërende integratiegebieden), zijn er 9 *up*-gereguleerd en 13 *down*-gereguleerd bij longkankerpatiënten. Na identificatie van de meest vertegenwoordigde metaboliet in elk van deze integratiegebieden kan gesteld worden dat er sprake is van een *up*-regulatie van glucose, inositol en threonine alsook een *down*-regulatie van lipiden, lactaat, alanine en citraat in het bloedplasma van longkankerpatiënten. Deze resultaten zijn onderhevig aan enkele belangrijke voorwaarden (cfr. Resultaten p. 17), in het bijzonder is de extrapolatie van statistische relevantie naar biochemische relevantie niet evident. Het is eveneens van essentieel belang dat correlatie en causaliteit niet als equivalent beschouwd worden. Enkel uitgebreid onderzoek kan deze problematiek tegemoetkomen.

Hoewel het de doelstelling van dit eindwerk deels bagatelliseert, valt op te merken dat, indien een bepaalde biomarker in staat is om systematisch een willekeurig persoon correct te classificeren (en bijgevolg te diagnosticeren), dit voldoende is voor klinische implementatie. Uiteraard zal deze biomarker intrinsiek gebaseerd zijn op biochemische relevantie, maar het is in principe niet noodzakelijk dat deze biochemische relevantie op voorhand gekarakteriseerd is.

Om een biochemische interpretatie te koppelen aan de verkregen resultaten, wordt er biochemische relevantie, meer bepaald een causaal verband met longkanker, verondersteld. In het bijzonder wordt verondersteld dat metaboliëten, die *up*- of *down*-gereguleerd zijn in het bloedplasma van longkankerpatiënten, het intermediaire metabolisme bij longkanker als dusdanig weerspiegelen. **FIGUUR B** (Appendix B) toont een overzicht van het (humane) intermediaire metabolisme. Wetende dat dit intermediaire metabolisme een zorgvuldig geïntegreerd systeem omvat, is het noodzakelijk om in te zien dat een uni- of bifactoriële associatie van metaboliëten met een bepaalde *pathway* veelal een simplisme van de werkelijkheid is. Desalniettemin kunnen ook dergelijke simplismen bruikbare informatie opleveren.

De waargenomen *up*-regulatie van glucose en *down*-regulatie van alanine bij longkanker wijst mogelijk op een verhoogde gluconeogenese, i.e. een biochemische *pathway* die bij mensen hoofdzakelijk in de lever plaatsvindt en waarbij verschillende precursors enzymatisch geconverteerd worden naar glucose (VOET & VOET 2011). Een verhoogde gluconeogenese bij (long)kanker werd gerapporteerd in de literatuur (LEIJ-HALFWERK et al. 2000; LUNDHOLM et al. 1982; WATERHOUSE et al. 1979). Het vergt slechts één enzymatische conversie om vanuit alanine pyruvaat te verkrijgen, wat van alanine een belangrijke gluconeogenetische precursor maakt (VOET & VOET 2011). Het is daarom redelijk om te stellen dat een verhoogde gluconeogenese tot een verlaagde alanineconcentratie leidt. De *up*-regulatie van glucose bij longkanker strookt eveneens met een verhoogde gluconeogenese. Bovendien kan een verhoogde glycogeenafbraak bij (long)kanker mogelijk ook bijdragen aan de waargenomen *up*-regulatie van glucose bij longkanker (FAVARO et al. 2012; FAVARO & HARRIS 2013). Verhoogde gluconeogenese en/of glycogeenafbraak bij (long)kanker zijn aannemelijke metabole wijzigingen. Immers, een verhoogde glucoseconcentratie voor glycolytische energieproductie en/of voor anabole reacties draagt bij aan het onderhoud en de groei van tumoren (KROEMER & POUYSSÉGUR 2008). Hoe (long)tumoren biochemische *pathways* elders in het lichaam (e.g. hepatische gluconeogenese) kunnen beïnvloeden, is echter niet helemaal duidelijk.

De *up*-regulatie van inositol bij longkanker zou verwacht kunnen worden omwille van de verhoogde glucoseconcentratie. Immers, inositol kan vanuit glucose-6-fosfaat gesynthetiseerd worden (HOLUB 1986). Hierbij wordt verondersteld dat de enzymatische conversie van glucose-6-fosfaat naar inositol substraat-gelimiteerd is.

Opmerkelijk bij deze bevindingen is dat er niet direct ondersteuning wordt gevonden voor het welgekende Warburg effect, dat gekenmerkt wordt door een verhoogde glycolyse, behouden bij een normale cellulaire zuurstofspanning en met een verhoogde productie van lactaat tot gevolg (BRAHIMI-HORN et al. 2007). Er werd echter een *down*-regulatie van lactaat bij longkanker waargenomen. Hierbij valt op te merken dat een deel van de controlepersonen last had van systemische ischemie. De hiermee gepaarde verhoogde lactaatproductie verklaart mogelijk de waargenomen *down*-regulatie van lactaat bij longkanker. De waargenomen *up*-regulatie van glucose bij longkanker spreekt het Warburg effect niet noodzakelijk tegen. Verhoogde gluconeogenese en/of glycogeenafbraak kunnen het toegenomen glycolytische glucoseverbruik immers maskeren.

De waargenomen *up*-regulatie van threonine en de *down*-regulatie van citraat bij longkanker reflecteren mogelijk een verstoring van de citroenzuurcyclus bij longkanker, te wijten aan mitochondriale defecten bij kankercellen (WEINBERG & CHANDEL 2009). De *down*-regulatie van citraat bij longkanker, als component van de citroenzuurcyclus, kan bijgevolg hier aan toegewezen worden. De *up*-regulatie van threonine bij longkanker is minder evident. Threonine is immers een mogelijke gluconeogenetische precursor. Indien er werkelijk sprake is van een verhoogde gluconeogenese bij longkanker, wordt eerder een verlaagde threonineconcentratie verwacht, net zoals bij alanine geargumenteed werd. Echter, slechts 7-10% van het totale humane threoninekatabolisme kan toegeschreven worden aan de rol van threonine als gluconeogenetische precursor. De oxidatie van threonine tot koolstofdioxide daarentegen bedraagt 89-93% van het totale humane threoninekatabolisme (DARLING et al. 2000). Threonine wordt hierbij eerst enzymatisch geconverteerd naar 2-oxobutanoaat waarna via verdere enzymatische conversies succinyl-CoA verkregen wordt, een component van de citroenzuurcyclus. In de veronderstelling dat er sprake is van een verstoring van de citroenzuurcyclus bij longkanker, is het redelijk om te stellen dat er bij de enzymatische conversie van threonine tot succinyl-CoA een ophoping van beginproduct, i.e. threonine, plaatsvindt.

De waargenomen *down*-regulatie van lipiden bij longkanker is minder eenvoudig toe te wijzen aan specifieke *pathways*, er wordt hier immers een groep chemische verbindingen beschouwd. Mogelijk draagt een verhoogd lipidenverbruik voor (cel)membraansynthese van prolifererende cellen bij aan de waargenomen *down*-regulatie van lipiden bij longkanker (SANTOS & SCHULZE 2012). Hierbij valt op te merken dat er in de literatuur veelal sprake is van verhoogde *de novo* lipidsynthese bij longkanker (MASHIMA et al. 2009). Deze ogenschijnlijke tegenstrijdigheid met de waargenomen *down*-regulatie van lipiden bij longkanker valt niet direct te verklaren. Voor een meer adequate interpretatie betreffende lipiden bij longkanker, is een massaspectrometrische analyse wellicht meer aangewezen. Hiermee is het, in tegenstelling tot bij de gehanteerde ¹H-NMR spectroscopische analyse, mogelijk om adequaat te differentiëren tussen de verschillende typen lipiden.

Tot slot kan algemeen opgemerkt worden dat ¹H-NMR spectroscopische analyse met een hoge-resolutie NMR spectrometer wellicht meer informatief zal zijn met oog op het karakteriseren van metabole wijzigingen bij longkanker.

Conclusie

Met behulp van $^1\text{H-NMR}$ spectroscopische analyse van bloedplasma en multivariate statistische analysemethoden werd er een *up*-regulatie van glucose, inositol en threonine alsook een *down*-regulatie van lipiden, lactaat, alanine en citraat in het bloedplasma van longkankerpatiënten vastgesteld. Deze resultaten zijn onderhevig aan enkele belangrijke voorwaarden, in het bijzonder is de extrapolatie van statistische relevantie naar biochemische relevantie niet evident. De voorgestelde biochemische interpretatie van de verkregen resultaten ondersteunt hoofdzakelijk twee metabole wijzigingen bij longkanker, namelijk een verhoogde gluconeogenese en een verstoorde citroenzuurcyclus. Wetende dat het intermediaire metabolisme een zorgvuldig geïntegreerd systeem omvat, is een uni- of bifactoriële associatie van metabolieten met een bepaalde *pathway* veelal een simplisme van de werkelijkheid. Desalniettemin kunnen ook dergelijke simplismen bruikbare informatie opleveren. Ondanks onvermijdelijke gebreken van de toegepaste methoden dragen de verkregen resultaten en de voorgestelde biochemische interpretatie ervan mogelijk bij aan de zoektocht naar een geschikte biomarker voor longkanker. Verder onderzoek zal nodig zijn voor een bevestiging of een ontkrachting van deze stelling. Ideeën wat dit betreft zijn $^1\text{H-NMR}$ spectroscopische analyse met een hoge-resolutie NMR spectrometer alsook massaspectrometrische analyse voor een betere differentiatie tussen de verschillende typen lipiden.

Dankwoord

Dat ik een biochemisch gerelateerd eindwerk kon maken, heb ik hoofdzakelijk te danken aan mijn copromotor, prof. dr. Wanda Guedens. Voor haar bereidwilligheid hiertoe ben ik haar dan ook erg dankbaar. Ik dank ook prof. dr. Tom Artois voor zijn bijdrage in dit organisatorische aspect.

Ik dank mijn promotor, prof. dr. Peter Adriaensens, in het bijzonder voor zijn uitgebreide uitleg over $^1\text{H-NMR}$ spectroscopie.

Mijn begeleider, drs. Evelyne Louis, ben ik enorm dankbaar voor haar beschikbaarheid, hulp en de vlotte samenwerking. Steeds kon ik bij haar terecht met vragen.

Sara, mijn taalvaardig zusje, dank ik voor het nalezen van dit eindwerk.

Ik dank Mira voor haar onvoorwaardelijke steun in alles wat ik doe. Zij kreeg gedurende de periode van dit eindwerk niet de aandacht die ze van mij verdiende.

Ik wil mij nogmaals richten tot mijn promotor, copromotor en begeleider om hen te bedanken voor de samenkomsten alsook voor hun expertise betreffende de toegepaste methoden en het interpreteren van de verkregen resultaten. Ook waren hun opmerkingen en suggesties betreffende het schrijven van dit eindwerk van onschatbare waarde.

Ik heb met dit eindwerk nagestreefd om een waardevolle bijdrage te leveren aan de zoektocht naar een biomarker voor longkanker. Het is aan de lezer om te oordelen in welke mate ik hierin geslaagd ben. Hoe dan ook eindig ik graag met een citaat toegeschreven aan Sir Isaac Newton: *“If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants.”*

Referentielijst

- ABOUD, O.A. & R.H. WEISS (2013). New opportunities from the cancer metabolome. *Clinical Chemistry*, 59: 138-146.
- BECKONERT, O., H.C. KEUN, T.M. EBBELS, J. BUNDY, E. HOLMES, J.C. LINDON & J.K. NICHOLSON (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, 2: 2692-2703.
- BRACKE, M., F. LARDON, P. VANDENBERGHE & K. VANDERKERKEN (2011). *Kanker biomedisch bekeken*. Standaard Uitgeverij Professional, Antwerpen.
- BRAHIMI-HORN, M.C., J. CHICHE & J. POUYSSÉGUR (2007). Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current Opinion in Cell Biology*, 19: 223-229.
- BRO, R. & A.K. SMILDE (2003). Centering and scaling in component analysis. *Journal of Chemometrics*, 17: 16-33.
- CONNOR, S., J. EVERETT & J.K. NICHOLSON (1987). Spin-echo proton NMR spectroscopy of urine samples. Water suppression via a urea-dependent T_2 relaxation process. *Magnetic Resonance in Medicine*, 4: 461-470.
- CRAIG, A., O. CLOAREC, E. HOLMES, J.K. NICHOLSON & J.C. LINDON (2006). Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Analytical Chemistry*, 78: 2262-2267.
- DARLING, P.B., J. GRUNOW, M. RAFII, S. BROOKES, R.O. BALL & P.B. PENCHARZ (2000). Threonine dehydrogenase is a minor degradative pathway of threonine catabolism in adult humans. *The American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 278: 877-884.
- DEBERARDINIS, R.J., N. SAYED, D. DITSWORTH & C.B. THOMPSON (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18: 54-61.
- DIEDERICH, S., M. THOMAS, M. SEMIK, H. LENZEN, N. ROOS, A. WEBER, W. HEINDEL & D. WORMANN (2004). Screening for early lung cancer with low-dose spiral computed tomography: results of annual follow-up examinations in asymptomatic smokers. *European Radiology*, 14: 691-702.
- DUARTE, I.F. & A.M. GIL (2012). Metabolic signatures of cancer unveiled by NMR spectroscopy of human biofluids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 62: 51-74.
- DUARTE, I.F., C.M. ROCHA & A.M. GIL (2013). Metabolic profiling of biofluids: potential in lung cancer screening and diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 13: 737-748.
- ERIKSSON, L., E. JOHANSSON & S. WOLD (1999). *Introduction to multi- and megavariate data analysis using projection methods (PCA & PLS)*. Umetrics, Umeå.
- FAVARO, E., K. BENSAD, M.G. CHONG, D.A. TENNANT, D.J. FERGUSON, C. SNELL, G. STEERS, H. TURLEY, J.L. LI, U.L. GUNTHER, F.M. BUFFA, A. MCINTYRE & A.L. HARRIS (2012). Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells. *Cell Metabolism*, 16: 751-764.
- FAVARO, E. & A.L. HARRIS (2013). Targeting glycogen metabolism: a novel strategy to inhibit cancer cell growth? *Oncotarget*, 4: 3-4.
- FUNES, J.M., M. QUINTERO, S. HENDERSON, D. MARTINEZ, U. QURESHI, C. WESTWOOD, M.O. CLEMENTS, D. BOURBOULIA, R.B. PEDLEY, S. MONCADA & C. BOSHOFF (2007). Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 6223-6228.

- HARVEY, R.A., D.R. FERRIER & P.C. CHAMPE (2011). *Biochemistry* (5th ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- HASSANEIN, M., J.C. CALLISON, C. CALLAWAY-LANE, M.C. ALDRICH, E.L. GROGAN & P.P. MASSION (2012). The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer. *Cancer Prevention Research*, 5: 992-1006.
- HOLUB, B.J. (1986). Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids. *Annual Review of Nutrition*, 6: 563-597.
- HOTELLING, H. (1931). The generalization of Student's ratio. *The Annals of Mathematical Statistics*, 2: 360-378.
- JACKSON, J.E. (1991). *A user's guide to principal components*. Wiley, New York.
- JEMAL, A., F. BRAY, M.M. CENTER, J. FERLAY, E. WARD & D. FORMAN (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61: 69-90.
- JOHNSON, R.A. & D.W. WICHERN (2007). *Applied multivariate statistical analysis* (6th ed.). Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River.
- JOLLIFFE, I.T. (2002). *Principal component analysis* (2nd ed.). Springer, New York.
- KARIM-KOS, H.E., E. DE VRIES, I. SOERJOMATARAM, V. LEMMENS, S. SIESLING & J.W. COEBERGH (2008). Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *European Journal of Cancer*, 44: 1345-1389.
- KROEMER, G. & J. POUYSSÉGUR (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13: 472-482.
- LEIJ-HALFWERK, S., P.C. DAGNELIE, J.W. VAN DEN BERG, J.D. WATTIMENA, C.H. HORDIJK-LUIJK & J.P. WILSON (2000). Weight loss and elevated gluconeogenesis from alanine in lung cancer patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 583-589.
- LENZ, E.M. & I.D. WILSON (2007). Analytical strategies in metabonomics. *Journal of Proteome Research*, 6: 443-458.
- LINDON, J.C. & J.K. NICHOLSON (2008). Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1: 45-69.
- LUNDHOLM, K., S. EDSTROM, I. KARLBERG, L. EKMAN & T. SCHERSTEN (1982). Glucose turnover, gluconeogenesis from glycerol, and estimation of net glucose cycling in cancer patients. *Cancer*, 50: 1142-1150.
- MAMAS, M., W.B. DUNN, L. NEYES & R. GOODACRE (2011). The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Archives of Toxicology*, 85: 5-17.
- MASHIMA, T., H. SEIMIYA & T. TSURUO (2009). *De novo* fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 100: 1369-1372.
- MEIBOOM, S. & D. GILL (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Review of Scientific Instruments*, 29: 688-691.
- NICHOLSON, J.K., J.C. LINDON & E. HOLMES (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29: 1181-1189.
- OCAK, S., M.L. SOS, R.K. THOMAS & P.P. MASSION (2009). High-throughput molecular analysis in lung cancer: insights into biology and potential clinical applications. *The European Respiratory Journal*, 34: 489-506.

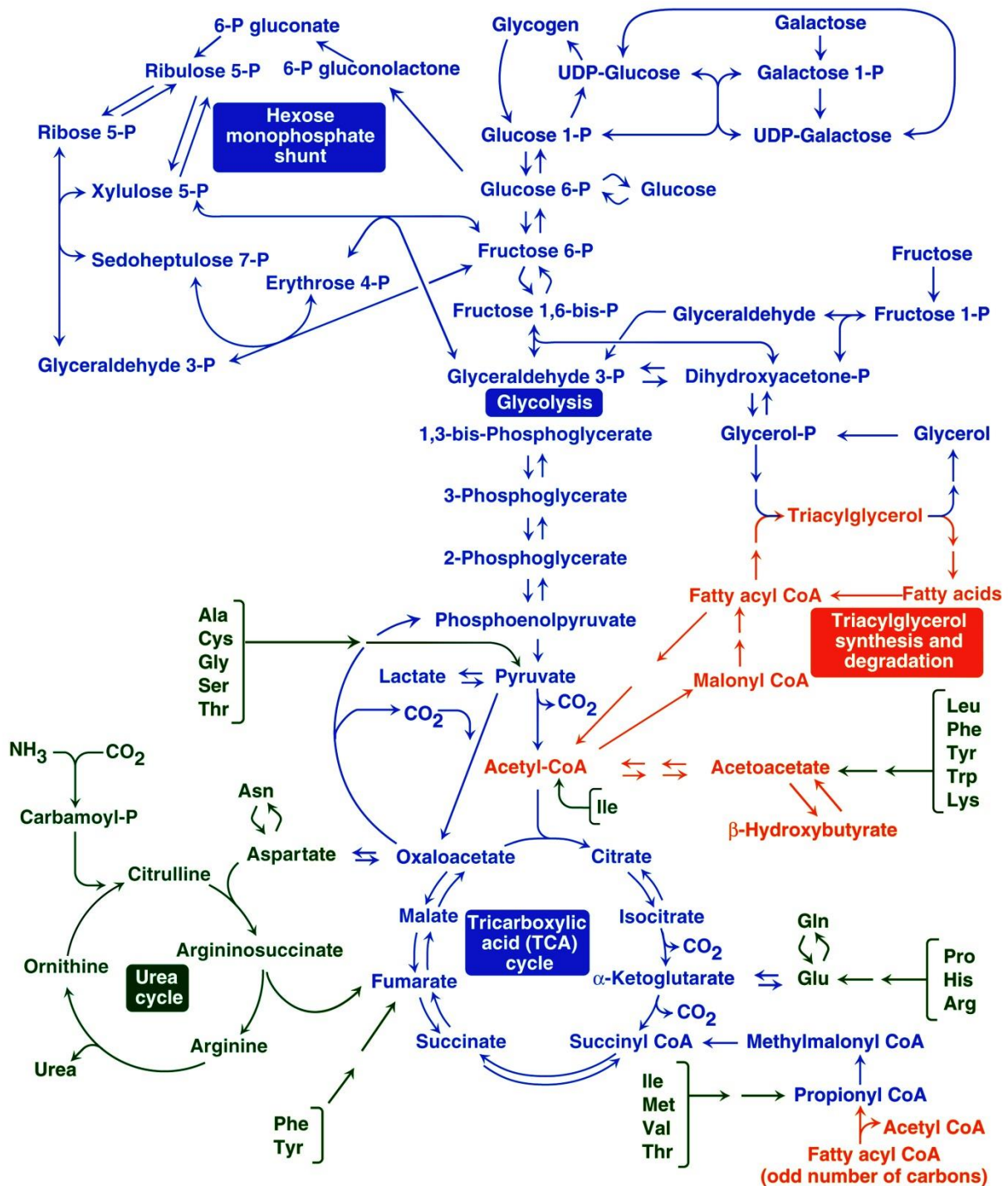
-
- POHL, L. & M. ECKLE (1969). Sodium 3-trimethylsilyltetradeteriopropionate, a new water-soluble standard for ^1H -NMR. *Angewandte Chemie International Edition*, 8: 381.
 - SANTOS, C.R. & A. SCHULZE (2012). Lipid metabolism in cancer. *The FEBS Journal*, 279: 2610-2623.
 - SOBIN, L.H., M.K. GOSPODAROWICZ & C. WITTEKIND (2009). *TNM classification of malignant tumours* (7th ed.). Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey.
 - TER VOERT, E.G., L. HEIJMEN, H.W. VAN LAARHOVEN & A. HEERSCHAP (2011). *In vivo* magnetic resonance spectroscopy of liver tumors and metastases. *World Journal of Gastroenterology*, 17: 5133-5149.
 - TRYGG, J. & S. WOLD (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics*, 16: 119-128.
 - VAN DEN BERG, R.A., H.C. HOEFSLOOT, J.A. WESTERHUIS, A.K. SMILDE & M.J. VAN DER WERF (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7: 142.
 - VOET, D. & J.G. VOET (2011). *Biochemistry* (4th ed.). John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
 - WARBURG, O., K. POSENER & E. NEGELEIN (1924). Über den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochemische Zeitschrift*, 152: 319-344.
 - WATERHOUSE, C., N. JEANPRETRE & J. KEILSON (1979). Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. *Cancer Research*, 39: 1968-1972.
 - WEINBERG, F. & N.S. CHANDEL (2009). Mitochondrial metabolism and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1177: 66-73.
 - WIKLUND, S., E. JOHANSSON, L. SJOSTROM, E.J. MELLEROWICZ, U. EDLUND, J.P. SHOCKCOR, J. GOTTFRIES, T. MORITZ & J. TRYGG (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry*, 80: 115-122.

Integratiegebied	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82											
	ppm ₁	3,40	3,38	3,34	3,32	3,22	3,19	3,18	3,15	3,11	3,09	3,07	3,06	3,00	2,89	2,86	2,86	2,75	2,74	2,74	2,66	2,66	2,63	2,53	2,52	2,52	2,49	2,49	2,45	2,43	2,43	2,41	2,41	2,40	2,40	2,36	2,35		
	ppm ₂	3,38	3,34	3,32	3,22	3,19	3,18	3,15	3,11	3,09	3,07	3,06	3,00	2,89	2,86	2,75	2,74	2,66	2,63	2,53	2,52	2,49	2,45	2,43	2,41	2,41	2,40	2,36	2,35										
Alanine																																							
Arginine																																							
Asparagine																																							
Asparaat																																							
Creatine																																							
Creatinine																																							
Cysteine																																							
Glutamaat																																							
Glutamine																																							
Glycine																																							
Histidine																																							
Isoleucine																																							
Leucine																																							
Lysine																																							
Methionine																																							
Fenylalanine																																							
Proline																																							
Pyruvaat																																							
Serine																																							
Succinaat																																							
Threonine																																							
Tryptofaan																																							
Tyrosine																																							
Valine																																							
Glucose																																							
Inositol																																							
Acetaat																																							
Acetoacetaat																																							
α-ketoglutaraat																																							
β-hydroxybutyraat																																							
Citraat																																							
Lactaat																																							

Lipiden (=CH-CH₂-CH=)

NG

Appendix B: Intermediar metabolisme



FIGUR B Belangrijke reacties van het (humane) intermediaire metabolisme. Gebogen dubbele reactiepijlen representeren reversibele reacties gekatalyseerd door verschillende enzymen. Rechte dubbele reactiepijlen representeren reversibele reacties gekatalyseerd door hetzelfde enzym. Enkele reactiepijlen representeren irreversibele reacties. Blauw: componenten van het koolhydratenmetabolisme. Rood: componenten van het lipidenmetabolisme. Groen: componenten van het eiwitmetabolisme. Figuur afkomstig uit HARVEY et al. (2011).