مقاله تحقیقی

خوشه‌بندی بیومارکرهای تمایز سلول‌های بنیادی به آستروسیت‌ها

رامین رستگاری [۱]، مصطفی رضایی طاویرانی [۲،*]، نسیم حیاتی رودباری [۱]، حکیمه زالی [۳]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، تهران، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، تهران، ایران

* **مسؤول مکاتبات:** مصطفی رضایی طاویرانی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پست الکترونیکی: rezaei.tavirani@ibb.ut.ac.ir

محل انجام تحقیق: مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱۶

چکیده

به دلیل ایجاد حجم عظیمی از داده‌های پروتئومیکی و نیاز به روش‌های جدید تحلیل نتایج آزمایشگاهی، تحلیل جمعی پروتئین‌ها می‌تواند علاوه بر صرف زمان کمتر، محققین را در شناسایی الگوهای جدید در مجموعه داده‌ها یاری کند. تحلیل خوشه‌ای یک روش آماری مطلوب و همچنین ابزاری است که می‌تواند در تحلیل این‌گونه داده‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه با استفاده از تکنیک‌های پروتئومیکی و آنالیزهای بیوانفورماتیکی، پروتئوم سلول‌های بنیادی طی فرآیند تمایز به آستروسیت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. ژل‌های دو گروه نمونه (سلول‌های بنیادی و آستروسیت) با استفاده از نرم‌افزارهای Progensis same spots و Flicker از نظر افزایش و کاهش بیان پروتئینی و شناسایی پروتئین‌ها بررسی گردید و سپس با استفاده از برنامه‌های آنالیز پروتئوم DAVID و PANTHER خوشه‌بندی جهت ایجاد یک رابطه منطقی بین داده‌های حاصل در این فرآیند انجام گردید. در طی این تمایز ۱۱ پروتئین شناسایی شد که تعدادی از آن‌ها در مطالعات پیشین ارتباط معنی‌داری با فرآیند تمایز برقرار کرده بودند و تعدادی پروتئین جدید نیز بدست آمد که این پروتئین‌ها می‌توانند بیومارکرهای ناشناخته‌ای برای فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی به آستروسیت باشند. همچنین، نتایج نشان داد که اکثر پروتئین-های درگیر در این فرآیند در فضای خارج سلولی و قسمت‌های بین سلولی وجود داشتند و از نظر عملکرد ملکولی، در دسته پروتئین‌های اسکلت سلولی و اتصالات سلولی قرار می‌گیرند. بنابراین، خوشه‌بندی می‌تواند روش مطمئنی جهت جداسازی پروتئین‌ها در گروه‌های مجزایی بر اساس میزان بیان با عملکرد بیولوژیکی باشد که بدین طریق به محقق کمک می‌کند تا بتواند بیومارکرها را در بین گروه عظیمی از پروتئین‌ها با منطق درست‌تری انتخاب نماید.

واژه‌های کلیدی: پروتئومیکس، بیومارکر، آستروسیت، خوشه‌بندی

مقدمه

آستروسیت‌ها گروه هتروژنی از انواع سلول‌های غیرعصبی هستند، عملکردهای متنوعی دارند و در مهاجرت و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی نقش دارند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که آستروسیت‌ها و دیگر سلول‌های گلیا، به ویژه میکروگلیا، به‌طور

مستقیم در پیامدهای نوروپاتولوژیکی و نیز پیری سیستم عصبی مرکزی نقش دارند (۱،۲). آستروسیت‌ها قادرند از سلول‌های بنیادی طی فرآیند تمایز تکامل یابند. در واقع، تمایز فرآیندی است که در آن، سلول‌های غیرتخصصی، به سلول‌های تخصصی یک بافت خاص تبدیل می‌شوند و انواع مختلف آن شامل تمایز ریختی، ساختاری، سوخت و سازی و فیزیولوژیکی است (۳). یکی از راه‌های بررسی تغییرات کلی حاصل طی این فرآیند مطالعه دو نوع سلول با روش‌های پروتئومیکی و سپس آنالیزهای بیوانفورماتیکی است. پروتئومیکس به مطالعه پروتئوم که در یک سلول و در یک زمان مشخص بیان می‌شود، می‌پردازد. سلول‌ها علاوه بر پروتئین‌های ضروری که در همه انواع سلول‌ها بیان می‌گردد، دارای پروتئین‌های اختصاصی نیز هستند، از این رو بهتر است پروتئوم را برای هر یک از انواع سلول‌ها تعریف نمود. از نتایج با ارزش دانش پروتئومیک، کشف بیومارکرهای تشخیصی و درمانی است. در واقع، بیومارکرها مولکول‌های بیوشیمیایی هستند که یک حالت فیزیولوژیک ویژه (استرس، بیماری و رژیم غذایی) را نشان می‌دهند و قادر به اندازه‌گیری و آشکار شدن هستند و می‌توانند پیشرفت بیماری یا تاثیرات درمانی را مشخص نمایند (۴). خوشه‌بندی که راهی میان‌بر جهت کشف بیومارکرها محسوب می‌شود، عبارت است از تقسیم یک جمعیت ناهمگون (Heterogeneous population) به زیرمجموعه‌های همگون (Homogeneous subsets) که به آن‌ها خوشه اطلاق می‌شود. هدف از خوشه‌بندی، یافتن گروه‌هایی است که با یکدیگر بسیار متفاوت، ولی اعضای آن‌ها بسیار شبیه به هم است (۵،۶). هونگ بین شن و همکاران در سال ۲۰۰۵، از روش جدید خوشه‌بندی فازی برای پیش‌بینی کلاس‌های ساختاری پروتئین‌ها استفاده نمودند. بر اساس این روش در مرحله آموزش، اطلاعات مربوط به کلاس‌های ساختاری پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۷). پوپیسکو و همکاران در سال ۲۰۰۶، به منظور یافتن عبارت‌هایی که بتوانند در خوشه‌بندی بر اساس تشابهات هستی-شناسی ژنی نمایندگان خوبی برای خوشه‌ها باشند، از روش خوشه‌بندی سلسله مراتبی و اندازه‌گیری مشابهات حاصل از BLAST و اندازه مشابهت فازی استفاده نمودند (۸). کریستین اواسکا و همکاران در سال ۲۰۰۸، با اندازه‌گیری مشابهت‌های بین عبارات هستی‌شناسی ژنی و اجرای روش خوشه‌بندی سلسله مراتبی توانستند روشی ارائه دهند که به شناسایی سریع ژن‌های دارای عبارات GO (Gen Ontology) مشترک، کمک نمایند (۹). در این تحقیق، با استفاده از نرم‌افزار Progenesis same spot، DAVID و PANTHER، پروتئین‌های دخیل در فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی را به سلول‌های آستروسیت خوشه‌بندی خواهیم نمود

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی و تمایز آن به سلول-های آستروسیت

در ابتدا آسپیره مغز استخوان از دهنده سالم، تهیه شد و به دنبال آن، جداسازی سلول‌های تک-هسته‌ای با استفاده از ستون فایکول با دانسیته 1.077 انجام گرفت. در ادامه، سلول‌ها به فلاسک-های حاوی DMEM 10 درصد با گلوکز پایین، گلوتامین، استرپتومایسین و پنی‌سیلین انتقال یافت. انکوباسیون سلول‌ها در شرایط CO_2 (۵ درصد) و رطوبت 98 درصد در دمای $37^{o}c$ انجام شد. اولین پاساژ سلول پس از ۴ روز با تریپسین ۰/۲۵درصد و EDTA ۰/۵ درصد صورت گرفت. در مرحله بعد برای تمایز این سلول‌ها به سلول‌های آستروسیتی، سلول‌های کشت داده شده در مجاورت رتینوئیک اسید، cAMP، PGF، PDGF و NGF قرار گرفتند. از نظر مورفولوژی، سلول‌های آستروسیتی، ستاره‌ای شکل هستند و از این حیث با سلول‌های بنیادی متفاوتند (۱۰).

روش‌های پروتئومیکی

روش‌های پروتئومیکی مورد استفاده به ترتیب شامل استخراج پروتئین از سلول‌ها، که شامل خارج کردن محیط کشت از فلاسک کشت سلول‌های کنترل تمایز نیافته (سلول‌های بنیادی) و سلول‌های

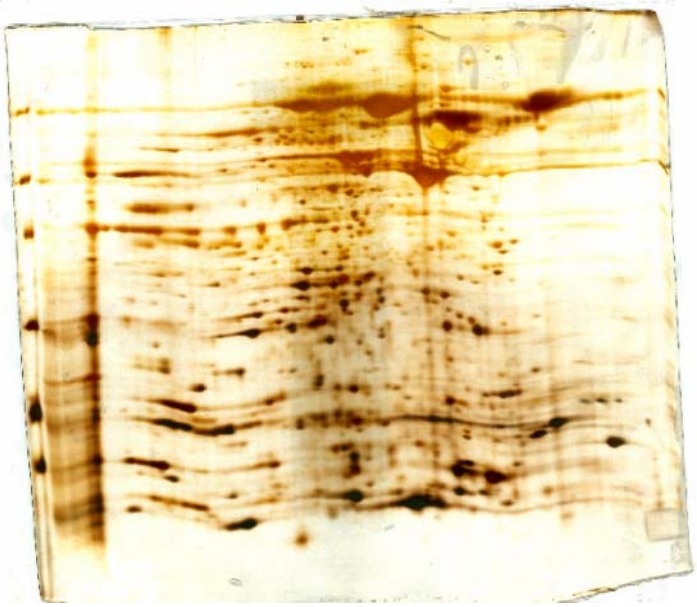
تمایز یافته (سلول‌های آستروسیت) و شستشو با بافر فسفات نمکی 0.5 X و تکان دادن در دمای اتاق به مدت یک ساعت ۳ بار تکرار و انجام عمل Freeze & Thaw و تایید لیز کامل سلول‌ها با میکروسکوپ، خارج ساختن لیز سلولی از فلاسک و ریختن در داخل ویال و سانتریفیوژ در 1000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و سپس سنجش غلظت پروتئین به روش Bradford و انجام الکتروفورز دو بعدی (2DE)،که شامل دو مرحله است مرحله اول جداسازی بر اساس ویژگی بار و در مرحله دوم جداسازی بر اساس وزن مولکولی می‌باشد و سپس رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها به روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره و اسکن ژل و پردازش تصویر می‌باشد (۱۱).

روش‌های بیوانفورماتیکی

این روش‌ها شامل آنالیز ژل‌های 2DE مربوط به نمونه سلول‌های بنیادی و آستروسیت با نرم‌افزار Non Linear Progenesis Same Spot (۱۲،۱۳)، شناسایی پروتئین‌ها با نرم‌افزار Flicker، آنالیز پروتئوم با کمک نرم‌افزارهای DAVID (۱۴) و PANTHER (۱۵) است. در آنالیز داده‌ها با نرم-افزار Progenesis ژل‌های دوبعدی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی به آستروسیت، مورد بررسی قرار می‌گیرند و تعداد نقاط پروتئینی و تفاوت آن‌ها (افزایش و یا کاهش بیان) توسط این نرم‌افزار آنالیز می‌شوند. نرم‌افزار آنالیز پروتئوم DAVID دارای ۴ نوع آنالیز شامل گروه‌بندی بر اساس عملکرد ژن، دیاگرام حاشیه‌نویسی عملکردی، جدول حاشیه-نویسی بر اساس عملکرد و خوشه‌بندی بر اساس حاشیه‌نویسی عملکردی است. نرم‌افزار PANTHER کتابخانه‌ای از خانواده و زیرخانواده پروتئینی است که از طریق عملکرد، ایندکس شده است. این نرم‌افزار ارتباط بین ترادف و عملکرد پروتئین را با دقت بسیار بالایی مورد بررسی قرار می‌دهد. خوشه‌بندی پروتئین‌ها در این نرم‌افزار، بر اساس عمکرد مولکولی، فرآیند بیولوژیکی و جایگاه سلولی است.

نتایج

در تصویر ۱، تصویر ژل الکتروفورز دوبعدی از سلول‌های بنیادی (الف) و آستروسیت (ب) را نشان می‌دهد. آنالیز ژل‌ها با کمک نرم‌افزار Progenesis ۷۷۴ نقطه پروتئینی را مشخص کرد که تعدادی از آن‌ها دارای افزایش بیان و تعدادی دارای کاهش بیان بودند.

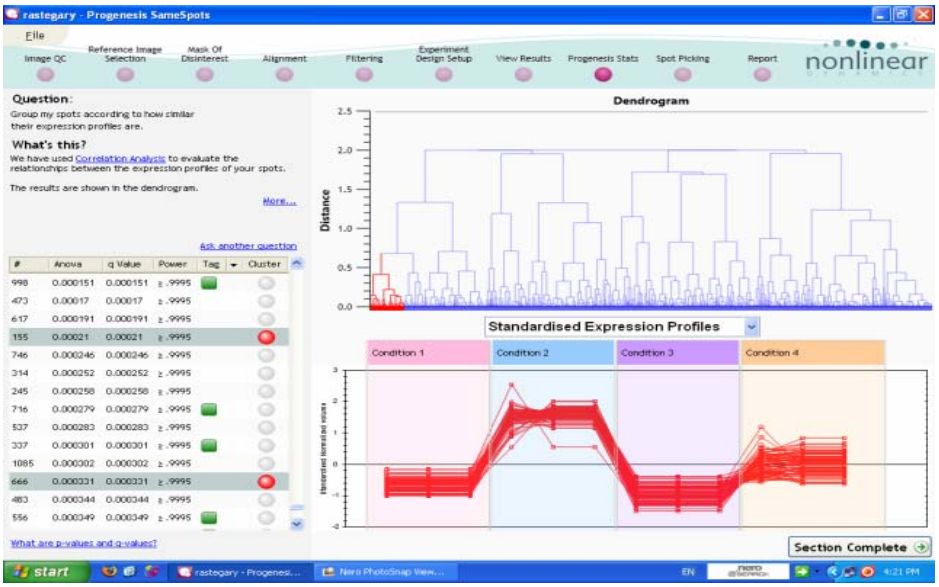


(الف)

(ب)

تصویر ۱ - شکل ظاهری ژل‌های دو بعدی برای سلول‌های بنیادی (الف) وآستروسیت مشتق از آن (ب).

این نرم‌افزار خوشه‌بندی پروتئین‌ها بر اساس میزان بیان آن‌ها را مورد آنالیز قرار می‌دهد، به طوری که پروتئین‌هایی که در یک خوشه، دارای بیان مشابهی باشند؛ بدین معنی که تغییر بیان یکسانی را در سلول مورد نظر دارند (با هم، افزایش و یا کاهش می‌یابند) که نتایج حاصل از این آنالیز خوشه‌بندی، در تصویر ۲ قابل مشاهده است.

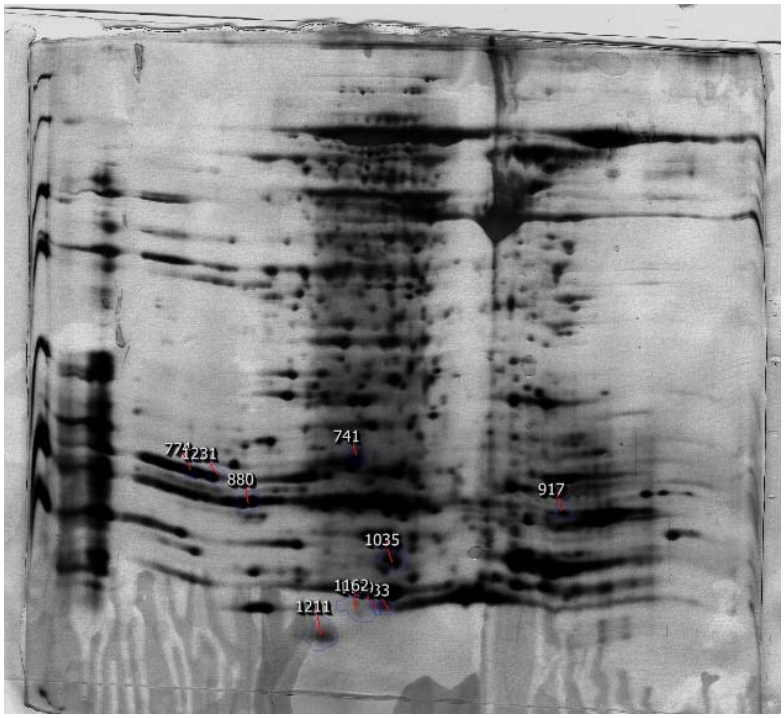


تصویر ۲ - خوشه‌بندی ۹ پروتئین به دست آمده توسط نرم‌افزار *Progenesis* .

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز ژل، با استفاده از نرم‌افزار Flicker و مقایسه بین ژل سلول بنیادی و ژل‌های موجود در بانک نرم‌افزار، حدود ۱۱ پروتئین شناسایی شد که اسامی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. تصویر ۳ نیز جایگاه این نقاط پروتئینی را نشان می‌دهد.

جدول ۱ - پروتئین‌های شناسایی شده توسط نرم‌افزار فلیکر.

of progenesis #	#	*Entry name*	uni prot id	Name
1211	1	*APOJ*	P010909	Clusterin
1035	2	*LEG1*	P09382	Galectin
123*1*	3	*AGP2*	P19652	Alpha-1-Acid glycoprotein2
774	4	*AGP1*	P02763	Alpha-1-Acid glycoprotein1
1233	5	*APOE*	P02649	Apolipoprotein E
880	6	*ANT3*	P01008	Antithrombin III
917	7	*NA3*	P99004	Possible apolipoprotein.
1159	8	*IGSA*	P99003	Secretory immunoglobulin chain alpha
1162	9	*IGHA*	P99002	Immunologlobulin heavy chain alpha
1093	10	*AAT*	P01009	Alpha-1-antitrypsin
741	11	*FGG*	P02679	Fibrinogen gamma chain



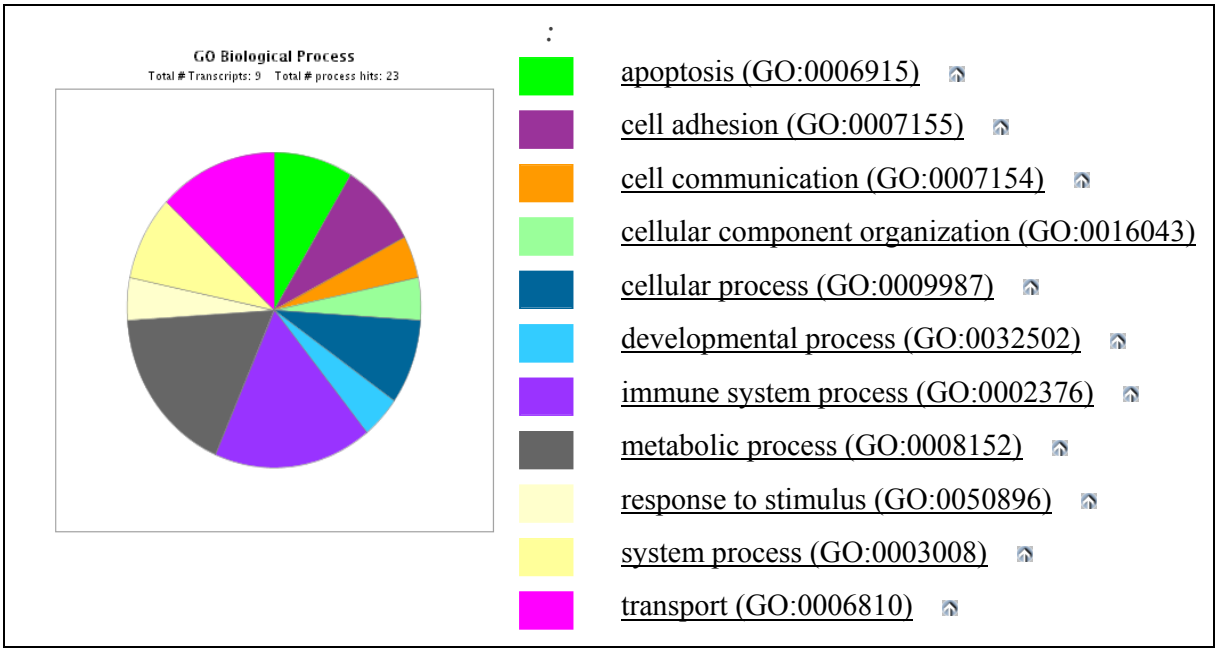
تصویر ۳- تصویر ژل سلول‌های بنیادی آنالیز شده توسط نرم‌افزار *progenesis* و ۹ پروتئین شناسایی شده توسط نرم-افزار فلیکر.

نرم‌افزار DAVID، این پروتئین‌ها را به ۸ کلاستر دسته‌بندی نمود که نتایج آن در قالب جدول ۲ مشخص شده است.

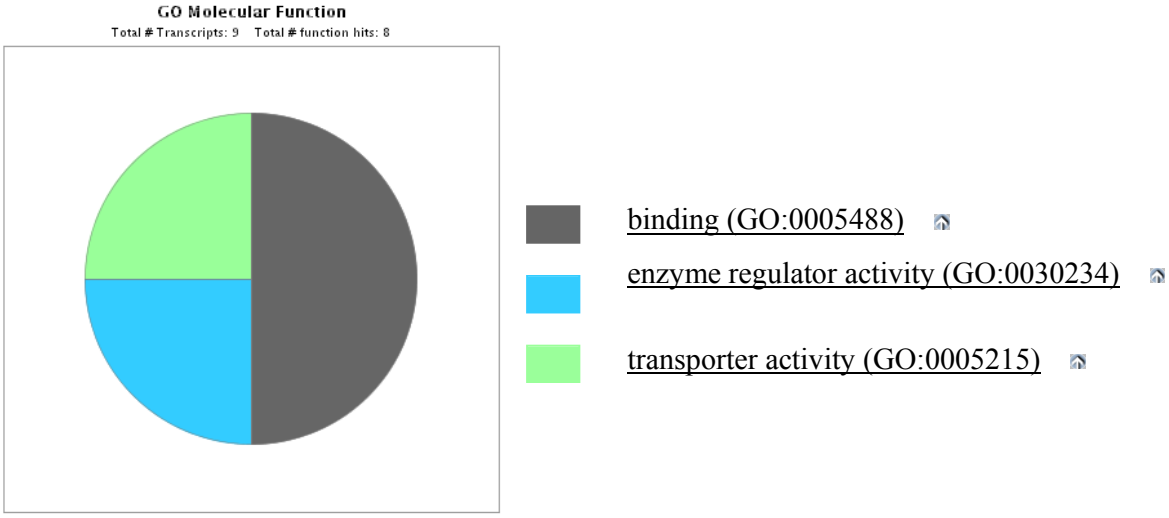
جدول ۲ - کلاسترهای به‌دست آمده توسط برنامه DAVID از پروتئین‌های شناسایی شده.

Annotation Cluster 1	**Enrichment Score: 8.54**
GO TERM_CC_FAT	Extracellular Space
GO TERM_CC_FAT	Extracellular Region part
GO TERM_CC_FAT	Extracellular Region
Annotation Cluster 2	**Enrichment Score: 4.08**
GO TERM_BP_FAT	Response to Wounding
GO TERM_BP_FAT	Acute Inflammatory response
GO TERM_BP_FAT	Acute_ phase response
GO TERM_BP_FAT	Defense response
GO TERM_BP_FAT	Inflammatorory response

همان طور که در تصویر ۴ مشاهده می‌کنید، آنالیز پروتئوم با استفاده از نرم‌افزار PANTHER بر اساس پروسه‌های بیولوژیکی نشان داد که این پروتئین‌ها بیشترین نقش را در فرآیندهای سیستم ایمنی و متابولیکی دارند.



تصویر ۴ - آنالیز ۹ پروتئین شناسایی شده توسط برنامه PANTHER بر اساس پروسه‌های بیولوژی.



تصویر ۵ - آنالیز ۹ پروتئین شناسایی شده توسط برنامه *PANTHER* براساس عملکرد مولکولی.

بحث

کشف عوامل موثر در تمایز، از دیگر کاربردهای تکنیک‌های پروتئومیکس است. امروزه بشر با استفاده

از روش‌های متعدد در جستجوی شناسایی عوامل موثر در این فرآیند است. از آن جایی که بیومارکر مولکولی در سلول و یا بافت موجود زنده است که تغییر فیزیولوژیکی را نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهد، می‌توان به توسط آن‌ها پیشرفت بیماری و یا تاثیرات درمانی را مشخص ساخت. در مطالعه مجموعه‌ای از پروتئین‌ها، هدف آن است تا به الگوها و روابط و تفاسیری در بین آن‌ها دست یابیم که شاید ناشناخته مانده باشند، کاپلان در سال ۲۰۰۳ فاصله بین هر دو پروتئین را به عنوان تابعی از تعداد عبارت‌های مشترک در تفسیر هستی‌شناسی آن دو تعیین نمود. او خوشه‌بندی سلسله مراتبی موفقی را انجام دادند که در آن، خوشه‌ها هیچ‌گونه تفسیر اشتباهی نداشتند (۱۶). ولتینگ و همکاران در سال ۲۰۰۶ مجموعه‌ای از داده‌های پروتئینی مربوط به مخمر را به کمک روش خوشه‌بندی، تقسیم‌بندی حول نماینده‌ها [1] (**PAM**) بر اساس تشابهات هستی‌شناسی ژنی حاصل از روش simUI خوشه-بندی کردند و در داخل خوشه‌ها به الگوهای تفسیر جدید دست یافتند (۱۷). هدف از این مطالعه، خوشه‌بندی بیومارکرهای دخیل در تمایز سلول‌های بنیادی به آستروسیت‌ها است که با به کارگیری روش‌های پروتئومیکی می‌توان پروفایل پروتئینی دو نوع سلول را با هم مقایسه نمود و بررسی جامعی را انجام داد. با توجه به تصویر ۱، تغییر در بیان پروتئین‌ها را که با افزایش بیان و یا کاهش بیان و یا حذف یک پروتئین و یا بیان یک پروتئین جدید همراه است، می‌توان در پروفایل ژل 2DE در دو حالت سلول‌های بنیادی و سلول‌های آستروسیت تمایز یافته مشاهده نمود. با کمک نرم‌افزار Progenesis و آنالیز دو ژل ۷۷۴ پروتئین شناسایی شد که میزان بیان متفاوت آن‌ها توسط نرم‌افزار، مورد آنالیز آماری قرار گرفت و پروتئین‌های دارای بیان مشابه را در دسته‌های مجزایی خوشه‌بندی نمود که نتایج آن در تصویر ۲ نشان داده شده است. خوشه‌بندی بر اساس بیان، نشان‌دهنده وجود پروتئین‌هایی است که می‌توانند وابستگی بیولوژیک نسبت به‌هم داشته باشند، به طوری که افزایش بیان همزمان چندین پروتئین باید در جبران کاهش بیان یا عدم بیان پروتئین‌های دیگر باشد. در واقع، این عمل یک مکانیسم برقراری هومئوستازی سلولی است که با خاموشی یک فرآیند، فرآیند جدیدی جایگزین آن شده و شروع به بیان یا افزایش بیان پروتئین‌های جدیدی می‌کند. مطالعات پیشین نیز که با کمک این نرم‌افزار به آنالیز ژل‌های دو بعدی پرداخته‌اند، نیز نتایج مشابهی را نشان می‌دهند و بیان می‌کنند که پروفایل بیانی مشابه اعضای یک خوشه دارای تفسیر بیولوژیکی منطقی است (۱۸).

نتایج آنالیز ژل‌ها با نرم‌افزار فلیکر ۱۱ پروتئین را شناسایی نمود که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است و جایگاه هر پروتئین نیز در تصویر ۳ به نمایش در آمده است. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که ۹ پروتئین، دارای ارتباط مستقیم با فرآیند تمایز سلول بنیادی به آستروسیت هستند.

پروتئین Clusterin (APOJ) در فرآیند آپوپتوزیس نقش دارد و در تمایز نورون‌ها در سیستم عصبی مرکزی نیز نقش مهمی را ایفاء می‌کند. پروتئین Galectin (LEG1) تمایز آستروسیت‌ها القاء می‌نماید و شدیداً تکثیر آستروسیت‌ها را مهار می‌کند. پروتئین Apolipoprotein E به عنوان پیش‌سازهای صفحه‌ای آستروسیت سنتز شده است. Antirombin III رسوب این پروتئین در بافت تخریب نورونی را افزایش می‌دهد. پروتئین‌های Alpha-1- acid glycoprotein 1، Possible Apolipoprotein، Secretory immunoglobulin chain Immunoglobulin heavy chain alpha، نقش مشخصی در فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی به آستروسیت‌ها ندارند. نتایج نشان می‌دهد که Galectin, Alppha-1-acidglycoprotein 1,2 و Antitrombin III، افزایش بیان را در طی تمایز سلول‌های بنیادی به آستروسیتی از خود نشان دادند. پروتئین‌های Clusterin، Possible, apolipoprotein, Immunoglobolin heavy chain alpha دارای کاهش بیان در این فرآیند بودند. پروتئین Apolipoprotein E و Fibrinogen gamma chain نیز تغییر بیانی

را در فرآیند تمایز نشان نداند. آنالیز پروتئوم مطابق جدول ۲ و تصاویر ۵ و ۴ نشان می‌دهد که پروتئین-های درگیر در فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی به آستروسیت، بیشتر در فضای خارج‌سلولی و قسمت-های بین سلولی وجود داشتند. در واقع تمایز سلول بنیادی به آستروسیت بر مبنای پروتئین‌های درگیر در اسکلت سلولی و اتصالات سلولی است. نتایج کلی نشان می‌دهد که پروتئین‌های P99003، P99002، P99004، P30092، P01008 که نقش آن‌ها در فرآیند تمایز مشخص نشده است، می‌توانند به عنوان بیومارکرهای جدیدی در فرآیند تمایز سلول بنیادی به آستروسیت معرفی شوند. بیومارکرها می‌توانند در شناسایی مراحل تمایز سلول‌های بنیادی به آستروسیت، نقش کاربردی داشته باشند. بدین معنی که نقص در بیان هریک از این پروتئین‌ها می‌تواند در روند تمایز این سلول‌ها اختلال ایجاد نماید. نتایج نشان داد که خوشه‌بندی می‌تواند روش مطمئنی جهت جداسازی پروتئین‌ها در گروه‌های مجزایی بر اساس میزان بیان با عملکرد بیولوژیکی باشد. بدین طریق می‌توان بیومارکرها را در بین گروه عظیمی از پروتئین‌ها با منطق درست‌تری انتخاب نمود.

تقدیر و تشکر

مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی حمایت مالی این تحقیق را بر عهده داشت. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه تحقیقاتی دانشجویی آقای رامین رستگاری می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Song, H., Stevens, C. F., Gage, F. H., 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature 417: 29-32.
2. Stevens, C. F., 2002. Astrocytes trigger maturation of neural stem cells. Howard Hughes Medical Institute News 312: 22-27.
3. Mckay, R., 1997. Stem cell in the central nervous system. Science 276: 66-71.
4. Zemla, A., Lga, A., 2003. Method for finding 3-D similarities in protein structures. Nucleic Acids Research 31: 3370-337.
5. Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., Chothia, C., 1995. A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. Journal of Molecular Biology 247: 536-540.
6. Orengo, C. A., Michie, A. D., Jones, S., Jones, D. T., Swindells, M. B., Thornton, J. M., 1997. CATH hierarchic classification of protein domain structures. Structure 5: 1093-1108.
7. Shen, H. B., Yang, J., Liu, X. J., Chou, K. C., 2005. Using supervised fuzzy clustering to predict protein structural classes. Biochemical and Biophysical Research Communications 334: 577-581.
8. Popescu, M., Keller, J. M., Mitchell, J. A., 2006. Fuzzy measures on the gene ontology for gene product similarity. Transactions on Computat Biology and Bioinformatics 6: 263–274.
9. Ovaska, K., Laakso Mand-Hautaniemi, S., 2008. Gene ontology based clustering for microarray experiments. Published: BioData Mining 423: 221-289.
10. Song, H., Stevens, C., 2002. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. Nature Neuroscience 5: 438–445.
11. Patterson, S. D., Aebersold, R. H., 2003. Proteomics: the first decade and beyond. Nature Genet 33: 311-23.
12. Bramwell, D., Reah, I., Miller, D., Hudson, W., Borthwick, A., 2010. Non linear progenesis same spot software. The effect of replicate number on significant spots 'nonlinear dynamics. Newcastle upon Tyne, United Kingdom.
13. Bramwell, D., Morns, I., O'Gorman, M., Hoving, S., Wiedmann, B., Voshol, H., The application of multivariate model building to derive predictive signatures from proteomics data nonlinear dynamics. Newcastle upon Tyne, United Kingdom, Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel (CH) and Cambridge (MA, USA).
14. Huang, S., Lempicki, R., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID. Bioinformatic Resources 33: 234-451.
15. Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., 2003. Panther: A library of protein families and subfamilies Indexed by function. Genome Res 13: 2129-2141.
16. Kaplan, N., Vaaknin, A., Linial, M., 2003. Pandora keyword-based analysis of protein sets by integration of annotation sources. Nucleic Acids Res 31: 5617-5626.
17. Wolting, C., McGlade, C. J., Tritchler, D., 2006. Cluster analysis of protein array results

via similarity of gene ontology annotation. BMC Bioinformatics 7: 338.
18. O'Gorman, M., Beauvallet, C., An Investigation into Crohn's disease using the progenesis same spots analysis platform. Nonlinear Dynamics, Newcastle-upon-Tyne, UK, Institute National de Recherche Agronomique (INRA), Jouy-en-Josas, France, Hopital Saint-Antoine, Paris, France.