dc_1779_20

Kvantitatív proteomikai módszerek fejlesztése és alkalmazása komplex biológiai kérdések tanulmányozására és potenciális biomarkerek azonosítására

MTA Doktori Értekezés

Csősz Éva

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Debreceni Egyetem

2020

TARTALOMJEGYZÉK 1
1. BEVEZETÉS 4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 6
2.1. Gél alapú proteomikai módszerek 6
2.1.1. Kétdimenziós elektroforézis 7
2.1.2. Differenciál gélelektroforézis 10
2.2. Tömegspektrometrián alapuló proteomikai módszerek 11
2.2.1. A tömegspektrométer felépítése és működése 11
2.2.1.1. Mátrix által segített lézer deszorpció ionizáció (MALDI) 12
2.2.1.2. Az elektrospray ionizáció (ESI) 13
2.2.2. Kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria 16
2.2.3. Fehérjék azonosítása LC-MS segítségével 17
2.2.4. Adatgyűjtési módok 19
2.2.5. Fehérjék kvantitálása 21
2.2.6. Adatgondozás, adatelemzés 22
2.3. A proteomikai módszerek alkalmazási területei 23
2.3.1. Fehérjék szerepének vizsgálata 24
2.3.2. Betegségek patomechanizmusának vizsgálata 25
2.3.3. Biomarkerek azonosítása 26
2.3.3.1. A kémiai barrier, mint potenciális biomarker forrás 27
3. CÉLKITŰZÉSEK 30
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 31
4.1. Vegyszerek 31
4.2. Mintagyűjtés 31
4.2.1. Könnyminták 31
4.2.2. Csarnokvíz minták 31
4.2.3. Verejtékminták 32
4.2.4. Nyálminták 32
4.2.5. Sejtkultúra minták 32
4.2.6. *Candida albicans* sejtlizátumok 32
4.2.7. Üvegtest minták 33
4.2.8. HIV-1 transzdukált sejtlizátumok 33
4.3. MRM/SRM módszertervezés 34

4.4. Fehérjék emésztése oldatban 34
4.5. Fehérjék emésztése gélben 35
4.6. Tömegspektrometriás analízis 35
4.7. Kétdimenziós elektroforézis 36
4.7.1. Mintaelőkészítés 36
4.7.2. Izoelektromos fókuszálás 37
4.7.3. Ekvilibrálás 37
4.7.4. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis 37
4.7.5. Gélek festése 38
4.7.6. Géldokumentáció és gélkép analízis 39
4.8. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis 39
4.9. Immunológiai módszerekkel történő vizsgálatok 40
4.10. Statisztikai analízis 40
4.11. Hálózatok tanulmányozása 41
4.11.1. Súlyozott hálózatok létrehozása 41
4.11.2. A súlyozott hálózatok hálózati paramétereinek vizsgálata 43
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK 45

5.1. A *Candida albicans* PPZ1 szerepének vizsgálata kétdimenziós elektroforézis segítségével 45
5.2. Proliferatív vitreoretinopátia tanulmányozása kétdimenziós elektroforézis segítségével 59
5.3. A könnyben, nyálban, verejtékben levő kémiai barrier vizsgálata és potenciális biomarkerek azonosítása 72
5.3.1. Humán béta defenzinek vizsgálatára alkalmas MRM/SRM-alapú célzott tömegspektrometriás módszer kifejlesztése 72
5.3.2. A könny, mint potenciális biomarker forrás 78
5.3.3. A könny kémiai barrierjének vizsgálata és Alzheimer kór-specifikus potenciális könny biomarkerek azonosítása 78
5.3.4. A szemben zajló sebgyógyulási folyamatok tanulmányozása, és olyan potenciális biomarkerek azonosítása, amelyek előrejelezhetik a trabekulektómia utáni komplikációk kialakulását 84
5.3.4.1. Citokinek mennyiségének vizsgálata könnyben 87
5.3.4.2. Citokinek mennyiségének vizsgálata csarnokvízben 91

5.3.4.3. Könny és csarnokvíz citokin tartalmának összehasonlítása 92
5.3.4.4. Könny fehérje profil változások tanulmányozása trabekulektómia után bekövetkező sebgyógyulás során 94
5.3.5. A nyál kémiai barrierjének vizsgálata és szájüregi laphámrák-specifikus potenciális biomarkerek azonosítása 108
5.3.5.1. Az OSCC-re jellemző nyálfehérje profil vizsgálata 110
5.3.5.2. A magyarországi populációban diagnosztikus jelentőségű potenciális nyálbiomarkerek azonosítása 121
5.3.6. A normál verejték tömegspektrometriás analízise, és a nagy mennyiségben levő verejtékfehérjék azonosítása 129
5.4. Komplex, rendszerszintű hálózatelemzési módszerek kidolgozása és alkalmazása a minőségi és mennyiségi proteomikai adatok együttes elemzésére 134
5.4.1. Fehérje-fehérje interakciós hálózatok analízise 138
6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK 147
7. IRODALOMJEGYZÉK 149
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 190
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK 192
FÜGGELÉK 194

1. BEVEZETÉS

A biológiai rendszerek bonyolult működésének a megismerése régóta foglalkoztatja a gondolkodó embert. Az évszázadok során különféle módszereket alkalmaztak és alkalmaznak, hogy információt gyűjtsenek, az információt felhasználva modellt alkossanak, amelyet aztán az újabb információk birtokában megerősíthetnek vagy elvethetnek. Az információgyűjtés és modellalkotás elsődleges célja, hogy jobban megértsük az élővilág egyszerű építőkövekből felépülő igen komplex működését.

Régóta kérdés az is, hogy mit vizsgáljunk ahhoz, hogy egy vizsgálattal minél több biológiailag releváns ismeretet nyerhessünk. A géneket vizsgálva információt kaphatunk a genomról, epigenetikai módosításokról, a transzkriptómot vizsgálva megismerhetjük az adott időpillanatban bekapcsolt géneket, viszont ezek még csak közelítő információt adnak a sejtek, biológiai rendszerek tényleges működéséről. Amennyiben a kivitelezőket, a fehérjéket, vizsgáljuk, tisztább képet kaphatunk, de a tényleges működést csak akkor érthetjük meg, ha a termékeket, vagyis a metabolómot is megvizsgáljuk. Ideális esetben a teljes omikai palettát lefedhetjük vizsgálatokkal: tanulmányozhatjuk a genomot és/vagy transzkriptómot, a proteómot és a metabolómot, ez esetben viszont a komplex adatok értelmezése jelenthet problémát. Igen jelentős próbálkozások vannak annak érdekében, hogy megfelelő rendszerbiológiai modelleket dolgozzanak ki, amelyek segítségével egy rendszeren belül értelmezhetők a különböző típusú omikai adatok. Sajnos mindezidáig nem született egységes modell, amely egyben tudná kezelni a különböző omikai eredményeket [1].

Ugyanakkor az is kérdés, hogy milyen módszerrel történjen a vizsgálat. A régóta jól bevált hipotézis-centrikus megközelítéseket alkalmazva egy jól körülhatárolt kérdést próbálunk körüljárni sok esetben úgy, hogy egy változást indukálunk a biológiai rendszerben és az arra adott választ kíséreljük meg minél pontosabban karakterizálni. Tekintve, hogy ebben az esetben egy beavatkozást végzünk a rendszerben, nem tudjuk biztosítani, hogy a megfigyeléssel begyűjtött adatok tényleg a normális biológiai állapotot és nem csak a mesterségesen megzavart rendszer válaszait tükrözik. Ha célunk nem egy előzetesen felállított hipotézis megerősítése vagy megcáfolása, lehetőségünk van a rendszer egészének megfigyelésére, a teljes élőlényre/rendszerre vonatkozó adatok gyűjtésére. Az omikai vizsgálatok általában ezt az ún. hipotézis nélküli megközelítést alkalmazzák, és a vizsgálat alatt begyűjtött több ezer adatpontból származó információ alapján utólag, az adatok feldolgozása révén próbálnak egy modellt létrehozni, vagy egy működési mechanizmust leírni [2]. Tekintve, hogy hipotézis vagy modell itt is születik, a „hipotézis nélküli” megnevezés nem teljes mértékben helytálló, talán célszerűbb helyette az „adatintenzív”,

„adatvezérelt” vagy „adatalapú” megközelítés megnevezések használata [3]. Tudományos gondolkodók és filozófusok többször kifejtették nézeteiket az egyik vagy a másik megközelítés támogatására, ám ha nem választani akarunk, hanem célunk a minél jobb megismerés, a két módszert akár egymás komplementereként is használhatjuk. Két, eltérő megközelítést használó kutatócsoport lényegileg ugyanarra az eredményre jutott hipotézis-vezérelt kutatást, illetve omikai megfigyelést alkalmazva a koenzim Q szintézisét illetően [4]. Ez a példa is azt sugallja, hogy a kétféle módszer nem egymással versengve, hanem egymást kiegészítve, mindkét módszer erősségeit kiaknázva vezethet a biológiai jelenségek pontosabb megismeréséhez.

A proteomikai vizsgálatok az esetek legnagyobb részében az adatalapú megközelítést részesítik előnyben, amikor két vagy több állapot proteómját hasonlítják össze. A sok adatpontot generáló proteomikai technikák (kétdimenziós elektroforézis, tömegspektrometria alapú fehérje vizsgálatok, multiplex immunesszék stb.) lehetőséget biztosítanak az egyes állapotok között jelentős változást mutató fehérjék vagy fehérje módosulatok azonosítására. Ez a típusú vizsgálati megközelítés alkalmas beteg- és kontrollcsoportok közötti különbségek vizsgálatára, potenciális biomarkerek azonosítására.

Kutatómunkám során célom volt a nagyműszeres analitika biológiai alkalmazása, a széleskörű proteomikai módszertan fejlesztése és optimalizálása a kétdimenziós elektroforézistől a célzott és shotgun tömegspektrometriás eljárásokon át az átfogó bioinformatikai adatelemzésig. Eközben a számomra ismerősebb kétdimenziós elektroforézistől haladtam a bonyolultabb, tömegspektrometriás módszerfejlesztést és optimalizálást igénylő technikák kifejlesztése és alkalmazása, majd a bioinformatikai adatfeldolgozás felé. A célom az volt, hogy a rendelkezésemre álló átvett és/vagy általunk kifejlesztett módszereket felhasználva ismeretet nyerjek biológiai rendszerekről, fehérjék szerepéről és betegségek patomechanizmusáról. Ugyanakkor kiemelten fontosnak tartottam a könnyen hozzáférhető, nem invazív módon gyűjthető biológiai minták (könny, nyál, verejték) tanulmányozását, hogy betegségekre jellemző biomarkereket azonosítsak.

Céljaim közé tartozott a proteomikai technikák meghonosítása a Debreceni Egyetemen, és egy olyan kutatólabor kiépítése, amely proteomikai technikákat fejleszt és alkalmaz a saját, valamint a kutatóközönség kérdéseinek megválaszolására. Fontos volt számomra a proteomikai technikák fejlesztése, a lehető legszélesebb proteomikai arzenál naprakészen tartása és használata mellett a megszerzett tudás átadása, hallgatók és munkatársak tanítása, illetve olyan kutatók képzése, akik képesek alkalmazni és továbbfejleszteni a proteomikai módszereket.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A proteomikai technikák alkalmazása lehetőséget biztosít elegendő mennyiségű adat gyűjtésére ahhoz, hogy az egyes biológiai kérdések rendszerszinten legyenek vizsgálhatók. A proteomikai technikákat osztályozva, gyakorlatilag két nagy módszercsoportot lehet elkülöníteni. A gél alapú módszerek első körben gélelektroforézist alkalmaznak, míg a tömegspektrometriás módszerek elsősorban tömegspektrometriás és kromatográfiás technikákat használnak. Természetesen a két módszercsoport metodikai szempontból összefonódik, ugyanis a gél alapú módszerekkel elkülönített fehérje foltokban vagy sávokban levő fehérjék azonosítása majdnem minden esetben tömegspektrometriás technikák használatával történik.

A továbbiakban először a gél alapú módszereket fogom bemutatni, külön kiemelve a kétdimenziós elektroforézist, majd ez után térek rá a tömegspektrometriás módszerek ismertetésére, és a kutatómunkám során tanulmányozott biológiai problémákra.

2.1. Gél alapú proteomikai módszerek

A gél alapú proteomikai technikák mindegyike gélben, az esetek igen jelentős részében poliakrilamid gélben történő elválasztást alkalmaz. A fehérjék egymástól történő elválasztása elektroforézissel történik, amely különböző komponensek elválasztására alkalmazható technika. A név a görög „Ηλεκτροφόρηση [elektrophorese]” szóból származik, amelynek jelentése elektronokat birtokolni. Az elválasztás során a töltött részecskék elektromos erőtérben vándorolnak, és méretük és/vagy töltésük szerint elválaszthatók egymástól. A molekuláris biológiában az elektroforézist gyakran alkalmazzák fehérjék és nukleinsavak vizsgálatára [5,6]. Az elválasztó közeg egy térhálós szerkezet, amelyben a pórusok méretét szabályozni lehet. A fehérjék elválasztására általában poliakrilamidot, míg a nukleinsavak elválasztására agarózt használnak. Az esetek nagy részében a fehérjék méret szerinti elválasztására ún. SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) végeznek; ekkor egy detergenst, a nátrium dodecil-szulfátot (SDS) alkalmaznak, amely egyenletesen beborítja a fehérjéket, azoknak negatív töltést kölcsönözve. A negatívan töltött fehérjék az elektromos erőtér hatására az anód felé vándorolnak a meghatározott koncentrációjú, térhálós szerkezetű akrilamid gélben és méretük függvényében elválaszthatók egymástól. A kisebb, és emiatt mozgékonyabb fehérjék nagyobb távolságot képesek megtenni az akrilamid polimerben adott időegység alatt, mint a nagyobb és kevésbé mozgékony fehérjék. Az elválasztás mértékét az akrilamid koncentrációjával lehet szabályozni: minél nagyobb az

akrilamid koncentrációja, annál jobban el lehet választani egymástól a kis molekulatömegű fehérjéket, míg alacsony akrilamid koncentráció mellett az elválasztás hatékonysága a magasabb tömegtartományban nagyobb. Az akrilamid koncentráció változtatásával a jobb elválasztást kívánó tartományt pontosan meg lehet határozni [6]. Attól függően, hogy az elektroforézist megelőző minta-előkészítés során alkalmaznak-e denaturáló szereket, megkülönböztetünk natív és denaturáló gélelektroforézist. A natív elektroforézis során nem alkalmaznak detergenst, denaturáló- vagy redukáló szert, így az adott fehérje negyedleges szerkezete is intakt marad, a fehérjét alkotó alegységek együtt vándorolnak a gélben. Információ nyerhető a vizsgált fehérje térszerkezetéről, a feltekeredés állapotáról (pl. részlegesen vagy teljesen denaturált), ligandumhoz vagy más fehérjékhez való kötődéséről, oligomerizációjáról vagy aggregációjáról [7]. A denaturáló változatban a minta-előkészítés során redukáló szert alkalmaznak (pl. béta-merkaptoetanolt), amely felszakítja az alegységek stabilizálására létrejött diszulfid hidakat. A redukált minták SDS gélelektroforézise segítségével az adott komplexet vagy fehérjét alkotó alegységek egyenként vizsgálhatók [6].

A natív vagy denaturáló gélelektroforézis segítségével vagy ezek kombinálásával sok információ gyűjthető egy adott fehérjéről vagy fehérje komplexről (molekulatömeg, alegységek száma, alegységek mérete, kötőpartnerek, negyedleges szerkezetet stabilizáló erők típusa stb.), viszont komplex biológiai minták (pl. sejtlizátum, szövet homogenizátum stb.) vizsgálatára kevésbé alkalmazhatók hatékonyan az alacsony felbontóképesség miatt. Olyan esetekben, amikor nem csak egy vagy néhány fehérjét, hanem komplex minták proteómját kívánják vizsgálni, célszerűbb a kétdimenziós elektroforézis alkalmazása.

2.1.1. Kétdimenziós elektroforézis

A kétdimenziós elektroforézist 1974-ben alkalmazták először, de csak egy évvel később figyeltek fel rá igazán [8–10]. A technika két elválasztási módot kombinál: az első dimenzióban a molekulák a töltésük, míg a második dimenzióban a méretük szerint kerülnek elválasztásra. Az elválasztás eredményeként O'Farrell 1100 foltot azonosított *E. coli* sejtlizátumban, de véleménye szerint akár 5000 fehérje elválasztása is lehetséges a módszerrel [9]. A módszer nagy jelentőségűnek bizonyult, ugyanis az egyes foltok tulajdonképpen az egyes fehérje változatokra vagy módosulásokra, az ún. proteoformákra vonatkoznak. A kétdimenziós elektroforézis alkalmazásával megkülönböztethetők egy adott fehérje egyazon mintában előforduló különböző poszt-transzlációs módosulatai (pl. foszforilált, glikozilált, hasított formák), amelyek integrált vizsgálata más módszerek alkalmazásával egy analízis keretében nehézkes lehet [10].

Az első dimenzió az **izoelektromos fókuszálás,** amely 3-4% akrilamid tartalmú ún. fókuszáló gélben (angolul strip) történik. Különböző amfolitok segítségével egy immobilizált pH gradienst hoznak létre a gélben, majd a gélre felvitt fehérjéket elektromos erőtérbe helyezik. Az elektromos erőtér hatására a molekulák vándorolni kezdenek, és abban a pH tartományban, ahol nettó töltésük nulla, emiatt nem hat rájuk sem az anód, sem a katód vonzó hatása, megállnak. Attól függően, hogy milyen izoelektromos pontú fehérjék elválasztása a cél többféle, előre elkészített, immobilizált pH gradiens közül lehet választani. A legszélesebb pH tartományt a pH 3-10 jelenti; ebben az esetben az izoelektromos fókuszáló gélen egyenletes eloszlásban helyezkednek el pH 3 – pH 10 tartományban az egyes pH értékeknek megfelelő zónák. Ezzel szemben a nem lineáris pH 3-10 NL jelzésű géleken az egyes pH értékeknek megfelelő zónák nem egyenletesen vannak elosztva, hanem kevesebb terület jut a pH 3-4, illetve a pH 8-10 tartományok számára, és nagyobb területet foglal el a pH 5-7 közötti tartomány. Ez azért fontos, mert a sejtekben levő fehérjék izoelektromos pontja is főként a pH 5-7 tartományba esik, és viszonylag kevés döntően savas vagy döntően bázikus jellegű fehérje található. Amennyiben a nagyobb felbontóképesség a fontos, egy-két pH értéket tartalmazó fókuszáló gélek is használhatók. A mélyreható vizsgálatok általában kétlépcsős stratégiát alkalmaznak, amelynek során először pH 3-10 lineáris pH tartományt átfogó fókuszáló gélen egy átfogó képet kapnak az adott biológiai rendszerre jellemző fehérje változásokról, majd a gélkép alapján fontosabbnak ítélt tartományt csak egy pH egységet tartalmazó fókuszáló gélen vagy géleken vizsgálják [11]. Az izoelektromos fókuszálás során fontos, hogy a fehérjék kitekert és oldott állapotban legyenek, ezért speciális puffereket alkalmaznak a fehérjék feloldására és oldatban tartására. A leggyakrabban alkalmazott puffer az ún. Rabilloud puffer (7% urea, 2% tiourea, 4% CHAPS, 1% ditio-treitol), ami Thierry Rabilloud a kétdimenziós elektroforézis fejlesztése és alkalmazása terén úttörő munkát végző francia kutatóról kapta a nevét [10].

Ahhoz, hogy az első dimenzióban az izoelektromos fókuszáló gélen elválasztott fehérjék méretük szerint is elválaszthatók legyenek a második dimenzióban, egy köztes lépésre, az ún. ekvilibrálásra van szükség. Az ekvilibrálás során a fókuszáló gélen levő fehérjéket ditio-treitol (DTT) jelenlétében redukálják, majd a redukált tiol csoportokat alkiláló szer (általában jódacetamid) segítségével alkilálják, hogy megakadályozzák a diszulfid hidak kontrollálatlan újraalakulását [10,11]. Az ekvilibrált fókuszált gél megfelelő koncentrációjú poliakrilamid gél tetejére kerül rá, majd elektromos erőtérbe helyezve a gélt megtörténik a **méret alapján történő elválasztás**. A második dimenzióhoz nagyon gyakran ún. gradiens gélt alkalmaznak, amely felső része alacsony (általában 4-5%-os) akrilamid

tartalmú, az alsó része töményebb (általában 18-20%-os) és a kettő közötti átmenet egyenletes. Az ilyen gradiens gélek biztosítják a legjobb elválasztást, mert mind a magas, mind az alacsony mérettartományban megfelelő felbontóképességgel rendelkeznek [11].

A méret szerinti elválasztást követően a gélben levő fehérjék nem láthatók, ezért valamilyen festési eljárás alkalmazásával lehet őket láthatóvá és/vagy vizsgálhatóvá tenni. A legelterjedtebb módszer talán még mindig a Coomassie Brillant Blue G-250-el történő festés, viszont a fluoreszcens festékek alkalmazása is egyre elterjedtebb. A fehérje foltok vizualizálására alkalmazott festési módszerek közül a legérzékenyebb az ezüst festés (érzékenység kb. 0,1 ng), viszont az összehasonlító mennyiségi elemzésekhez leggyakrabban a fluoreszcens festékeket (pl. Sypro Ruby, Flamingo Red stb.) alkalmazzák, mert ezeknek a legszélesebb a lineáris dinamikus tartománya. A fluoreszcens festékek a poszt-transzlációs módosítások vizsgálatára is alkalmazhatók. Míg a Sypro Ruby és a Flamingo Red a fehérjéken levő poszt-transzlációs módosításoktól függetlenül minden fehérjét megfest, addig a ProQ Diamond csak a foszforilált fehérjéket, a ProQ Emerald pedig csak a glikozilált fehérjéket teszi detektálhatóvá [10–14].

A kétdimeziós elektroforézis alkalmas egy adott mintában levő fehérjék, illetve különböző állapotok vagy proteómok közötti minőségi és mennyiségi különbségek vizsgálatára. A kétdimenziós gélelektroforézissel elválasztott és megfelelő festési eljárással láthatóvá/vizsgálhatóvá tett fehérjéket tartalmazó gélek összehasonlítására komplex képanalízis szükséges. Ezért a gélképeket először megfelelő szkennerek segítségével beszkennelik, és a bennük levő információt digitalizálják, majd bonyolult számítási háttérrel rendelkező szoftverek segítségével elvégzik a gélképek összehasonlító elemzését. A minőségi és mennyiségi analízis révén információ nyerhető pl. egyes organellumok proteómjáról, egy betegségre jellemző proteoformák változásáról, egy adott kezelésre vagy beavatkozásra bekövetkező fehérje szintű változásokról, stb. [15].

A kétdimenziós elektroforézis a sok információt adó, átfogó vizsgálatok közé tartozik, amely betekintést ad az adott mintára jellemző fehérjék minőségi és mennyiségi változásaiba. A módszer alkalmas a teljes proteóm vizsgálatára, globális képet lehet kapni a fehérjékről és a fehérjék poszt-transzlációs módosításáról, viszont nagyon érzékeny, emiatt nagy technikai tudást és nagyon tiszta, ún. elektroforézis minőségű vegyszereket igényel. Ahhoz, hogy a gélképen tipikusan detektálható 600-700 fehérjét tartalmazó mintázat reprodukálhatóságáról meg lehessen győződni, 3 technikai és 3 biológia párhuzamos alkalmazása javasolt. Tekintve, hogy a kétdimenziós elektroforézis kevéssé automatizálható, és a nagy tisztaságú vegyszerek drágák, nagy erőforrást igényel megfelelő kivitelezése. Továbbá a gélkép elemzés

bonyolultságát és a párhuzamosok számát figyelembe véve az állapotonként több gélkép elemzése jelentős számítógépes erőforrást és sok időt igényelhet [10,11,16].

A kétdimenziós elektroforézis elsősorban sejtlizátumok vizsgálatára alkalmazható a legnagyobb sikerrel, viszont különböző szövetek (pl. izom) vagy más biológiai minták, pl. szérum, tej, tojás tanulmányozására is használható [17,18]. A membránfehérjék vizsgálata nagy kihívást jelent a módszer alkalmazói számára, ugyanis a membránokban levő fehérjék oldatban tartása az analízis idejére nehezen megoldható feladat [19].

2.1.2. Differenciál gélelektroforézis

A kétdimenziós elektroforézis gyorsítására fejlesztették ki a differenciál gélelektroforézist (DIGE), amely során különböző fluoreszcens festékek segítségével az egyes mintákat megfestik, összekeverik, és egyetlen kétdimenziós elektroforézist végezve a technikai párhuzamosokat kiküszöbölik [16]. A differenciál gélelektroforézis során egyszerre háromféle minta vizsgálható. A háromféle mintát háromféle fluoreszcens festékkel (Cy2, Cy3 és Cy5) jelölik meg, a mintákat összekeverik, és egyszerre végzik el a kétdimenziós elektroforézist. Tekintve, hogy az elválasztás egy gélen megy végbe, nincs különbség az elválasztási körülményekben, ezért nincs szükség technikai párhuzamosokra, ami jelentős erőforrást spórolhat meg. Az egyes állapotokra jellemző fehérjék megjelenítése a géldokumentáció során történik, amikor a gélben lévő jeleket háromféle szűrő segítségével szkennelik be. A módszer alkalmazásával a gélképek analízise is sokkal egyszerűbben és gyorsabban kivitelezhető. A differenciál gélelektroforézis egyetlen hátránya a fluoreszcens festékek magas ára, viszont mindent figyelembe véve, a módszer ár-érték aránya összemérhető a hagyományos kétdimenziós gélelektroforézis ár-érték arányával [16].

A gélképek analízise során statisztikailag szignifikáns különbséget mutató fehérjéket tartalmazó foltokat kivágják, és azokat további analíziseknek vetik alá, amelyeknek általában a célja a fehérjék tömegspektrometriás azonosítása. Ismerve az egyes foltokban megtalálható fehérjéket, össze lehet kapcsolni a gélképen felismert minőségi vagy mennyiségi változást a mintában található fehérje módosulatokkal, a proteoformákkal [20].

2.2. Tömegspektrometrián alapuló proteomikai módszerek

A tömegspektrometria olyan nagyműszeres analitikai platform, amely gázfázisú ionok vizsgálatán alapul. Története az 1890-es évekig nyúlik vissza, amikor Wilhelm Wien, Eugen Goldsein megfigyeléseit alkalmazva egy olyan készüléket épített, amelyben tömeg-töltés arány alapján el tudta egymástól választani az egyes gázok által keltett anódsugarakat, az ún. „Kanalstrahlen” sugarakat. Ezt a készüléket továbbfejlesztve Joseph John Thompson hozta létre az első tömegspektrográfot. A tömegspektrográfot a tömegspektroszkóp követte, majd 1918-ban Arthur Jeffrey Dempster elkészítette az első modern tömegspektrométert, amely a mai tömegspektrométerek elődje [21].

Felépítését tekintve, a tömegspektrométer ionforrásból, tömeg analizátorból, és detektorból áll. Az ionforrás felelős a gázfázisú ionok létrehozásáért, amelyek aztán a tömeg analizátorban elválasztásra kerülnek egymástól és a detektorba jutnak. A készülékben vákuum uralkodik; a teljes rendszert egy nagyon bonyolult elektronika szabályozza [21].

A tömegspektrometriát kezdetektől előszeretettel alkalmazták különböző fémek, szerves és szervetlen kismolekulák vizsgálatára, viszont fehérjék és nagyméretű biológiailag fontos vegyületek alkalmazására csak néhány évtizede, az ún. kíméletes („lágy”) ionizációs technikák felfedezése után került sor [21]. A tömegspektrometria segítségével kis mintamennyiségből jelentős információ halmazt lehet nyerni, amely felhasználható a mintában levő ismeretlen anyagok azonosítására és mennyiségük meghatározására [22]. Emiatt a technika alkalmazása nagyon elterjedt a természettudományokban; a PubMed adatbázisban több mint 336 ezer publikáció tartalmazza a tömegspektrometria kulcsszót.

Fontos megemlíteni, hogy több Nobel-díj odaítélése is kötődik a tömegspektrometriás fejlesztésekhez és kutatásokhoz. J. J. Thomson a gázokon áthaladó elektromosságra vonatkozó elméleti és kísérleti vizsgálataiért 1906-ban, Francis W. Aston 1922-ben számos nem radioaktív elem izotópjának felfedezéséért és az „egész szám szabály” felállításáért, Ernst O. Lawrence 1939-ben a ciklotron felfedezéséért, 1989-ben Wolfgang Paul és Hans Georg Dehmelt az ioncsapda felfedezéséért, valamint 2002-ben Koichi Tanaka és John Fenn biomakromolekulák vizsgálatát biztosító lágy ionizációs technikák (mátrix által segített lézer deszorpció ionizáció, ill. elektroporlasztásos ionizáció) felfedezéséért kapták meg a legrangosabb tudományos díjat (https://www.nobelprize.org/).

2.2.1. A tömegspektrométer felépítése és működése

A tömegspektrométerek változatos felépítéssel és emiatt széleskörű alkalmazhatósággal rendelkeznek, azonban mindegyik tömegspektrométer tartalmaz három

alapvető elemet: ionforrást, tömeg analizátort és detektort. Az analizátor és a detektor, valamint típustól függően az ionforrás is vákuumban található, amely biztosítja az ionok torzításmentes továbbhaladását az egyes elemeken. A tömegspektrométereket bonyolult elektronika vezérli, minden esetben vezérlő és adatkiértékelő számítógépekkel vannak összekötve, amelyek egyrészt biztosítják a rendszer működését, ill. működtetését, másrészt pedig az adatelemzésben segítenek [22–24].

A tömegspektrométerek lehetnek egyszerű készülékek, amelyek az ionforrás és detektor mellett csak egy analizátort tartalmaznak, vagy lehetnek tandem készülékek, amelyek több analizátorral rendelkeznek. Az analizátorok lehetnek ugyanolyan típusúak pl. a tripla kvadrupól tömegspektrométerek esetében vagy különböző típusúak. A Q-TOF típusú tömegspektrométerek TOF és kvadrupól analizátorokat, a QTRAP típusú készülékek három kvadrupólt tartalmaznak, de a harmadik kvadrupól beállítástól függően kvadrupólként vagy ioncsapdaként is funkcionál, illetve a tribrid készülékek felépítésében ioncsapda, kvadrupól és Orbitrap analizátorok vesznek részt [21,22]. A továbbiakban a proteomikában leggyakrabban használt és legelterjedtebb ionforrás és analizátor típusokat fogom röviden bemutatni.

Az ionforrás felelős a gázfázisú ionok létrehozásáért. Többféle ionizációs technika létezik, mint pl. a kémiai ionizáció, elektron ionizáció, fotoionizáció, gyors atom bombázás, stb. Az ionizáció során energiát közölnek a mintával, amely a mintaionok fragmentációját okozhatja. A kemény ionizációs technikák jelentős mértékű fragmentációval járnak, ezért ezek az ionizációs technikák gyakorlatilag a biológiai makromolekulák vizsgálatára alkalmatlanok [21,24]. A makromolekulák ionizálására az ún. lágy ionizáció alkalmas, ugyanis ebben az esetben a gáz fázisú ionok képződése nem jár jelentős fragmentációval, így akár intakt fehérjék, lipidek vagy nukleinsavak is vizsgálhatók tömegspektrométer segítségével. A biológiai makromolekulák ionizációjának kidolgozása az 1980-as évek közepére tehető, és jelentőségét mutatja, hogy a felfedezést 2002-ben Nobel díjjal jutalmazták [22,24].

2.2.1.1. Mátrix által segített lézer deszorpció ionizáció (MALDI)

A MALDI technika segítségével ionizálandó molekulák szilárd fázisban találhatók, egy fém hordozó felületére kikristályosított formában. A kristályos formában levő mintával energiát közölnek lézer segítségével, és ezzel bírják rá a minta molekulákat a deszorpcióra, a felülettől való elválásra, és gáz fázisba jutásra. A felületre a minta mellé egy segédanyagot, ún. mártrixot is felhelyeznek, akár úgy, hogy előzőleg összekeverik a mintával és együtt

kristályosítják azzal, vagy a már kristályos mintára rétegezik, esetleg szendvics módszerrel a mintát cseppentik egy mátrix kristály rétegre, majd a kikristályosodott mintára ismét mátrixot cseppentenek. A mátrix általában aromás gyűrűt tartalmazó kismolekula pl. 2,5-dihidroxi-benzoésav (DHB), alfa-ciano-4-hidroxifahéjsav (CHCA), szinapinsav, stb., amely a lézer energiájának hatására elválik a felülettől és ionizálódik. Az ionokat ezután iontranszfer segítségével átadja az időközben gáz fázisba kerülő minta molekuláknak, így minta-ionok képződhetnek. Mivel ez a transzfer nem hatékony, a MALDI ionizáció során az esetek nagy részében egyszeresen, esetleg kétszeresen töltött ionok keletkeznek. A megfelelő mátrix kiválasztása a minta típusától függ, a lézer energiájának beállítása pedig az esetek nagy részében empirikus módon, az adott mintára, készülékre, illetve a mérési körülményekre specifikusan történik [21,22,24].

2.2.1.2. Az elektroporlasztásos ionizáció (elektrospray ionizáció - ESI)

Az ESI során a minta folyékony halmazállapotban található, és az ionforrásban a kapilláris elhagyásakor kapja meg a nagyfeszültséget. A nagyfeszültség hatására az kapillárist elhagyó minta cseppek ionizálódnak, majd az ionforrásban a minta áramlási irányával ellentétesen áramló szárító nitrogén gáz hatására az oldószer párolog, és a töltött cseppek mérete csökken. Amikor a töltött cseppek mérete nem tudja biztosítani a megfelelő távolságot az azonos módon töltött részecskék számára, bekövetkezik az ún. Coulomb féle robbanás, a taszító erő szétveti a cseppet. A cseppek tovább zsugorodnak, ez a folyamat többször megismétlődhet, így mire a tömegspektrométer bemeneti nyílásához, az ún. orifice-hez ér a minta, már alig tartalmaz oldószert, inkább csak többszörösen töltött minta ionokat. A tömegspektrométer bemeneti nyílása fűtött lemezen található, amely biztosítja az oldószer teljes elpárolgását, valamint azt, hogy csak a töltött minta ionok jussanak be a készülékbe [21,22,24,25].

A tömeganalizátor feladata, hogy a bejutott minta ionokat tömeg/töltés (m/z) hányadosuk alapján elválassza egymástól és eljuttassa a detektorba. Többféle típusa ismert, így lehet repülési idő analizátor, kvadrupól, ioncsapda, orbitális ioncsapda stb.

A repülési idő (Time of Flight – TOF) analizátor a bejutott ionokat a méretük és mozgékonyságuk alapján választja el egymástól. Az analizátor gyakorlatilag egy légüres cső, amelyben a kisebb, mozgékonyabb ionok gyorsabban repülnek, így hamarabb bejutnak a detektorba, míg a lomhább, nagyobb ionoknak ugyanez a folyamat több időt vesz igénybe, etért később érik el a detektort. Amennyiben az analizátorba történő belépés és a detektorba jutás között eltelt időt mérik, illetve megfelelő kalibráló anyagokkal rendelkeznek, a repülési idő meghatározásával pontosan meg lehet mondani az adott anyagra jellemző m/z értéket.

Tekintve, hogy a TOF analizátorokat előszeretettel kombinálják MALDI ionizációval, a lézer impulzus kibocsátása és a detektorba jutás közötti időtartamot szokták meghatározni [22].

A TOF analizátor érzékenysége és felbontóképessége igen nagy, ezért a proteomikai alkalmazásokban, peptidek szekvenálására gyakran alkalmazzák. A TOF analizátort gyakran kell kalibrálni, ha MALDI-TOF kombinációban használják, akkor gyakorlatilag minden mérés előtt szükséges elvégezni a kalibrációt [26].

A TOF analizátor felbontóképessége egyenesen arányos az analizátorban megtett út hosszával, vagyis minél hosszabb egy TOF analizátor, annál jobban el tudja választani egymástól a közeli m/z értékkel rendelkező ionokat. A gyártási technológiák alkalmasak lennének igen hosszú TOF analizátorok gyártására is, de a 2-3 m-nél hosszabb analizátorok nem terjedtek el, ugyanis nehezen férnének be a kutatólaboratóriumok többségébe. Azért, hogy növeljék a felbontást, de ez ne járjon az analizátor méretének jelentős növeléséhez a TOF analizátorban egy ún. ion tükröt alkalmaznak, amely potenciál-különbségek sorozatával gyakorlatilag visszafordítja, tükrözi az ionokat. Ily módon az ionok hosszabb utat tudnak bejárni, ezáltal az egymáshoz közeli m/z értékek jobban elkülöníthetők egymástól [21,24].

A kvadrupól analizátor négy fémrúdból áll, amelyekre feszültséget kapcsolnak. A szemben álló fémrúd-párokra kapcsolt váltakozó feszültség a fém rudak között levő töltött részecskéket csigavonal mozgásra készteti. Az rádiófrekvenciás (Rf) és egyenáram (Dc) feszültségek megfelelő megválasztásával stabilizálni lehet egy meghatározott m/z értékkel rendelkező ion pályáját, így csak az jut át az analizátoron, a többi ion pedig eltérül. Az Rf és Dc feszültségek változtatásával különböző ionok pályája stabilizálható, vagyis a kvadrupólra jellemző, hogy szelektíven stabilizálja az ionokat [24].

A kvadrupól felbontóképessége nem nagy, pl. a TOF analizátorral szemben jelentősen alulmarad, viszont az ionok szelektív kiválasztása és más analizátorokkal kombinálva a felvehető pásztázási típusok sokféleségének biztosítása vezethetett a viszonylag széleskörű elterjedéséhez [22].

Egyes tömegspektrométerekben hasonló elven, de precízebben működő hexapólok, oktapólok vagy multipólok biztosítják a nagyobb szelektivitást, de ezek nem terjedtek el széleskörűen [24].

Az ioncsapda felépítését tekintve hasonlít a kvadrupólhoz, viszont itt speciális elektron lencsék segítségével minden iont bent tartanak az analizátorban. A kvadrupólok elhelyezkedését tekintve az ioncsapda lehet lineáris (2D) vagy ún. 3D ioncsapda. Az ioncsapda szelektíven destabilizál, vagyis csak bizonyos m/z értékkel rendelkező ionok

pályáját destabilizálja, ezek kijutnak az ioncsapdából és bejuthatnak egy másik analizátorba vagy a detektorba [24,25].

Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia (FTICR) analizátor és detektor a jelenleg elérhető legnagyobb felbontású és pontosságú analizátor. Mindezen kiváló tulajdonságai ellenére az FTICR analizátor nem terjedt el a mindennapi használatban, ugyanis nagyon drága, illetve fenntartása is igen nagy költségekkel jár. Az analizátor mágneses térbe elhelyezett négy elektródából áll. Az analizátor belsejében az erős mágneses tér hatására az ionok ciklikus mozgást végeznek és minden egyes ciklus során mikor elhaladnak a detektáló elektród előtt, akkor áramot indukálnak és ezt az áramot rögzítik. Tehát ebben az esetben, az analizátor tulajdonképpen detektor is. A begyűjtött áramokat bonyolult matematikai műveletek, ún. Fourier transzformáció segítségével alakítják át spektrumokká. Az analizátor felbontóképessége annál jobb minél nagyobb a mágneses tér, ez viszont erős mágneseket, erős hűtést és többek közt jelentős mennyiségű tiszta He és N_2 gázokat igényel [22,27].

Orbitális ioncsapda – Orbitrap analizátor a többihez képest a legkisebb méretű nagyfelbontású analizátor, egy néhány cm hosszúságú orsó alakú egység. Az analizátorban a bejutott ioncsomagok a ciklotronra jellemző körpályán mozognak és a mozgásuk során keltett potenciál-változást az analizátor falát képező gyűrű elektródok érzékelik, vagyis az Orbitrap analizátor az FTICR-hez hasonlóan, egyben detektorként is működik. A detektált potenciál-változásokat ez után Fourier-transzformáció segítségével alakítják át spektrumokká. Az Orbitrap analizátor felbontása és pontossága rendkívül nagy, megközelíti az FTICR analizátorok teljesítményét [28]. Tekintve a kis helyigényt, a viszonylag egyszerű üzemeltetést és a kiváló működési paramétereit, manapság nagyon elterjedt a proteomika laboratóriumokban.

Az ütközési cella a tömegspektrométerek nem egy feltétlenül különálló egysége, hanem sokszor a tandem tömegspektrométerek valamelyik analizátora szolgáltat speciális teret a molekulák fragmentációjára. Ebben az egységben vagy üzemmódban általában ütközés indukálta disszociáció (collision induced dissociation – CID) játszódik le. A CID elterjedten használt fragmentációs mód a peptidek azonosításához, ugyanis megfelelően beállítva, a peptid kötés mentén fragmentálja a peptideket. Más fragmentációs módok is használhatók, úgymint az ECD (electron capture dissociation) vagy az ETD (electron transfer dissociation) [29,30], de a peptidek azonosítása során ezeket kevésbé használják. Elterjedésüket az is limitálja, hogy csak bizonyos tömegspektrométerek speciális tartozékaként lehet alkalmazni.

Az analizátorból érkező ionokat **a detektor** érzékeli és alakítja át elektromos jellé. A jel intenzitása arányos a detektorba jutó ion mennyiségével. Változatos felépítésű detektorokat alkalmaztak a különböző tömegspektrométerek esetében, ezek jelentős része ma már nem használatos. Az egyik legelterjedtebb detektor az elektron sokszorozó, illetve az utóbbi években megjelent, és az újabb készülékekben található Daly-féle detektorok [31]. Az FTICR, illetve Orbitrap analizátort tartalmazó tömegspektrométerek esetében a tömeganalizátor képezi a detektort is, így az ilyen készülékeknél nincs szükség külön detektor egységre.

A detektor által generált jeleket az adatfeldolgozó rendszer digitális tömegspektrumokká alakítja, amelyeket felhasználva elemezni lehet a mintákban jelen levő anyagok milyenségét és mennyiségét [31].

2.2.2. Kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS)

A tömegspektrométereket alkalmazhatják önmagukban pl. MALDI ionforrással ellátott készülékek esetében, de a leggyakrabban kromatográfiás rendszerrel kapcsolva használják. Az illékony kismolekulák esetében a gázkromatográfia (GC) az elterjedtebb, míg a proteomikában az esetek legnagyobb részében a folyadékkromatográfia (LC) az alkalmazott elválasztási módszer [32,33].

A kromatográfiás elválasztásnak két fő célja van: egyrészt a minta komplexitását hivatott csökkenteni, másrészt pedig a mintában levő anyagok kémiai tulajdonságait kihasználva speciális elválasztási módszereket lehet kidolgozni és alkalmazni a komponensek pontos és reprodukálható elválasztására. A proteomikában az esetek legnagyobb részében a cél a minta komplexitásának csökkentése, és ez általában egydimenziós reverz fázisú elválasztás segítségével történik. Ilyenkor az állófázis kromatográfiás oszlopa C18 alkil láncokkal borított szilika szemcséket tartalmaz, amelyhez a peptidek kikötődnek. A kötődés erőssége a peptidek hidrofobicitásával egyenesen arányos és a mozgó fázisban alkalmazott szerves oldószer mennyiségének a növelésével lehet a peptideket eluálni a töltet szemcséiről [34]. Tekintve, hogy a folyadékkromatográf sorba van kötve a tömegspektrométerrel (ún. on-line kapcsolás) az eluálódó peptidek közvetlenül a tömegspektrométerbe jutnak. A fehérjék folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (LC-MS) vizsgálata során leggyakrabban alkalmazott ionizációs mód az ESI [25].

Azért, hogy megfelelő minőségű elválasztást biztosítsanak az általában rendelkezésre álló kis mintamennyiség mellett is, a töltet szemcséinek méretét, a kromatográfiás oszlop és a mozgófázist hordozó kapillárisok átmérőjét csökkentik. Ilyen körülmények között kisebb

áramlást szükséges alkalmazni, ez az ún. nanoLC [33]. A proteomikában általában nanoLC körülményeket alkalmaznak, tipikusan 200-500 nl/min áramlási sebességgel dolgoznak, szemben a normál LC ml/min nagyságrendű áramlási sebességével.

A nagyon komplex minták esetében gyakran alkalmaznak két- vagy többdimenziós kromatográfiát (MUDPIT), amikor az elválasztási módok kombinálásával választják szét a minta komponenseit. Gyakran a peptideket először ioncserés kromatográfiának vetik alá, majd az egyes frakciókat reverz fázisú kromatográfiával választják szét további frakciókra [35]. A proteomikában többféle frakcionálási technika érhető el (pl. spider frakcionálás), amelyeket lehet a tömegspektrometriás elválasztással on-line vagy offline alkalmazni [36].

A fehérjék azonosítására és/vagy kvantitálására LC-MS-t, pontosabban nanoLC-MS-t használnak az esetek legnagyobb részében [33].

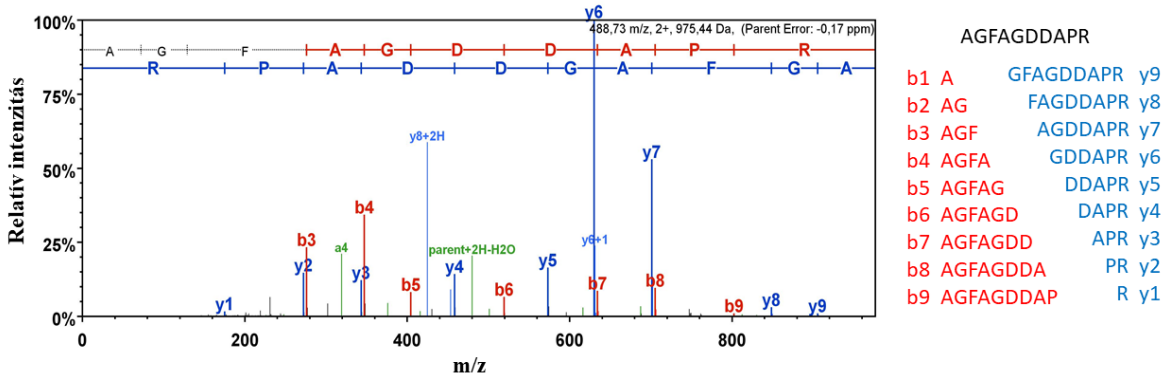
2.2.3. Fehérjék azonosítása LC-MS segítségével

A fehérjék azonosítása alapvetően kétféle módon történhet. Az egyik lehetőség a tömegspektrumok (**MS spektrum**) alapján az ún. **peptidtömeg-térképezés** (pepide mass fingerprint – PMF). A PMF során az egyes fehérjékről készült enzimes emésztményben levő peptidek m/z értékeit rögzítik egy tömegspektrometriás analízisben. A keletkezett peptidtömeg listát adatbázisokban levő fehérjék elméleti peptidtömeg listáival vetik össze keresőmotorok segítségével és megfelelő találat esetén a fehérjét azonosítottnak tekintik [33,37–39]. A PMF komplex minták esetén kevésbé jól használható, mert sokszor nehéz a fehérjék pontos és megbízható azonosítása, de fontos előnye, hogy egyszerű tömegspektrométerek esetében is alkalmazható [40].

A pontos és megbízható fehérje azonosítás általában az ún. **MS/MS spektrumok** alapján történik manuálisan, vagy szoftverek segítségével [41]. Itt minden esetben szükséges a peptideket fragmentálni, ezért ez a módszer leginkább a tandem tömegspektrométerekre jellemző. A folyamat során először egy MS spektrum felvétele történik az enzimes fehérje emésztményről, majd a spektrumban rögzített, általában legintenzívebb csúcsok kiválasztása után a kiválasztott csúcsnak megfelelő peptid, ún. prekurzor ion fragmentációja következik az ütközési cellában. A kiválasztott peptidből keletkező fragmensek adják az ún. MS/MS spektrumot [33,38,40]

A peptidek tömegspektrométerben történő fragmentációja esetében a fragmentációs energiákat úgy állítják be, hogy egyszerre csak egy peptidkötés hasadjon fel. A folyamatban azonban lehetőség nyílik a legtöbb kötés felhasadására. Így ún. „b” ill. „y” ionsorozatokat lehet kapni, amelyekben a sorozat egyik tagja a sorozat következő tagjától 1 aminosav-

maradvány tömegének megfelelő m/z értékkel különbözik (1. ábra). A „b” és „y” ionokat az szerint nevezik el, hogy a peptid melyik része (N- vagy C-terminális) viszi a töltést, és az adott végtől számítva hányadik peptidkötés hasad fel. Pl. a „b4” ion esetében a töltés az N-terminálison van, és az N-terminálistól számított negyedik peptidkötés hasad fel, míg az „y4” ion esetében a töltés a C-terminálison van és a C-terminálistól számított negyedik peptidkötés hasad fel [33,40].



1. ábra. Az AGFAGDDAPR peptid MS/MS spektruma.
Az ábra bal oldalán a peptid spektrumát és a rögzített „b” és „y” ionokat tüntettük fel, míg a jobb oldalon az elméletileg képződő „b” és „y” ionokat.

Ismerve az aminosavak ún. monoizotópos tömegeit a „b” és „y” ionsorozatokat felhasználva megállapítható a vizsgált peptid szekvenciája [24,42]. Amennyiben nem áll rendelkezésre egyéb információ, csak az MS/MS spektrumot felhasználva lehetőség van a peptid szekvencia egyértelmű azonosítására. Ez az ún. *de novo* szekvenálás, amely a korszerű keresőszoftverek alkalmazásával is sokszor nagy kihívást jelent [40,43–45].

A keresőmotorok általában más megközelítést alkalmaznak. A felhasználó által kiválasztott adatbázist (UniProt, NCBInr stb.) és paramétereket (hasító enzim típusa, kihagyott hasító helyek száma, alkalmazott tömegspektrométer, ütközés típusa, poszt-transzlációs módosítások stb.) felhasználva egy elméleti spektrum adatbázist generálnak. Az analízis eredményeként kapott spektrumot az elméleti spektrumokhoz hasonlítják, és az összehasonlítás eredményeként egy valószínűségi értéket, valamint az elméleti spektrumnak megfelelő peptidet jelenítenek meg [41]. Amennyiben az eredményben megjelenített valószínűségi értékek megfelelők (legalább 95%), a találat elfogadható. Egy fehérjét akkor tekintünk azonosítottnak, ha legalább 2 olyan peptidet találtunk a mintánkban, ahol a peptid azonosítás valószínűségi értéke 80-99,9%, valamint a fehérjéhez rendelt valószínűségi értéke 0-50% [46]. Annak ellenére, hogy a legalább 2 peptid alapján történő azonosítás széles körben elterjedt, többen megkérdőjelezik a megfelelőségét, és az egy peptid alapján történő

azonosítás mellett érvelnek [47,48]. Kevés találat esetén a spektrumok manuális ellenőrzése elvégezhető, de a nagy pontosságú és nagyfelbontású készülékek által generált nagymennyiségű adatból azonosított több száz fehérje esetében ez a módszer nem alkalmazható. Ebben az esetben a keresést egy random vagy fordított szekvencia adatbázison is célszerű elvégezni, és a kereső- vagy megjelenítő szoftver által kiszámolt hamis felfedezési ráta (false discovery rate – FDR) értékeket is figyelembe véve meghatározni az adott mintában jelen levő fehérjéket [49]. Az elfogadható FDR értékek fehérje szinten általában a 0,01 (1%), aminek elérése sok esetben csak az általános kritériumok (95% peptidekhez és 99% fehérjékhez rendelt valószínűségi értékek és fehérjénként legalább 2 peptid) szigorításával oldható meg.

2.2.4. Adatgyűjtési módok

A leggyakrabban az ún. **információfüggő adatgyűjtést (Data/Information Dependent Acquisition – DDA vagy IDA)** alkalmazzák a fehérjék azonosítására és kvantitálására. A módszer során a tömegspektrométer gyorsaságától függően az n (tömegspektrométertől függően n = 1-20) legintenzívebb iont választják ki, azt fragmentálják és megtörténik az MS/MS spektrumok felvétele [50]. A cél, hogy minél több információ kerüljön begyűjtésre, ezért az n értékét megfelelően kell megválasztani. Ha nagyon megnövelik az n értékét, elméletileg több MS/MS spektrumot lehet felvenni, de ez több időt fog igénybe venni, megnő az egy peptid analízisére fordított ciklusidő. Tekintve, hogy az on-line kapcsolt kromatográfból folyamatosan érkeznek a tömegspektrométerbe a peptidek, érdemes az n értékét úgy megválasztani, hogy az összhangban legyen a kromatográfia során elválasztott peptidek elúciójával. A módszer jól automatizálható és elterjedten használt, viszont a hátránya, hogy csak a legintenzívebb ionokról van így információ. Emiatt bizonyos szennyezők, mint pl. a keratin, vagy a mintában levő abundáns fehérjék pl. szérum esetében az albumin, nagyobb arányban jelennek meg a találatok között, megnehezítve a fontosabb, de kisebb mennyiségben jelen levő fehérjék detektálását. Ugyanakkor a reprodukálhatóság is viszonylag alacsony, és a hiányzó adatpontok miatt információveszteséggel is számolni kell [51].

Ezzel szemben az **információ független adatgyűjtés (Data Independent Acquisition – DIA)** esetében a teljes mérendő tömegtartományt felosztják kisebb részekre (10-20 m/z) és az így definiált tömeg ablakokban levő összes prekurzor iont fragmentálják, függetlenül attól, hogy milyen az intenzitása, ill. milyen a prekurzor ion m/z értéke [52,53]. A folyamatot többször megismételve a teljes tömegtartományon, és az így begyűjtött adatokat

felhasználva, a későbbiek során a fehérjéket azonosítani és kvantitálni lehet. Az információfüggő adatgyűjtéssel szemben, ahol pontosan ismert, hogy melyik MS/MS spektrum melyik prekurzor ionhoz tartozik, az információ független adatgyűjtés során ez nem ennyire egyértelmű [54]. A megfelelő eredmények érdekében először egy könyvtárat célszerű építeni a vizsgálni kívánt mintatípus többszöri információfüggő analízisével. Tipikusan 100 m/z tömegtartományonként felveszik a 16 legintenzívebb prekurzor ionról az MS/MS spektrumokat, és ezeket használják fel a könyvtár építéséhez [52,55].

Tekintve, hogy a DDA és DIA adatgyűjtési módok esetében nincs előzetes információ arra vonatkozóan, hogy milyen fehérjék vannak a mintában, és az ott levő lehető legtöbb fehérjét azonosítják, ezeket a módokat ún. shotgun adatgyűjtési módoknak nevezzük. Ezzel szemben a célzott módszerek mindegyike azon alapul, hogy a mintában egy, vagy több adott fehérjére vonatkozó információt gyűjtenek [56].

A **célzott tömegspektrometria** alkalmazása során az ún. MRM/SRM (Multiple/Selected Reaction Monitoring) adatgyűjtési módot használják az esetek jelentős részében. Az MRM/SRM módszerek specifikusan képesek detektálni adott molekulákat, és információ nyerhető az illető anyag mennyiségére vonatkozóan is [57]. A módszer elsősorban hármas kvadrupól analizátorokat tartalmazó tömegspektrométerek sajátossága: azon alapul, hogy az első kvadrupólt (Q1) úgy állítják be, hogy csak a meghatározott molekulára jellemző m/z értékkel rendelkező ionokat engedje át, amelyek majd az ütközési cellában fragmentálódnak. A harmadik kvadrupól (Q3) beállításait úgy módosítják, hogy a keletkezett fragmensek közül csak az előre meghatározott fragmenseket engedje át. Tehát csak akkor lesz detektálható jel, ha mindkét, az adott molekulára jellemző feltétel egyidejűleg teljesül. Az ilyen, ún. MRM/SRM átmenetek (Q1 és Q3 kvadrupólban beállított m/z érték) alkalmazása egyrészt biztosítja a specificitást, másrészt a kromatográfiás csúcs alatti terület (AUC) arányos a tömegspektrométerbe juttatott molekula mennyiségével. A módszer specificitását, valamint a kvantitálást, ismert mennyiségű, szintetikus, stabil izotóppal jelzett (SIL) peptidek hozzáadásával lehet ellenőrizni. Bár a tömegkülönbség miatt a SIL peptidek MRM/SRM átmenetei értelemszerűen különböznek a vizsgálandó peptidétől, a mintában levő vizsgálandó (endogén) peptid és a szintetikus SIL peptid azonos fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkezik. Az endogén és a SIL peptidek egyszerre eluálódnak, hasonló módon fragmentálódnak, így a szintetikus, SIL peptidek belső standardként használhatók [57].

A módszer óriási előnye, hogy egyszerre több fehérjére jellemző MRM/SRM átmenetek is beilleszthetők egyetlen módszerfájlba, ezáltal több fehérje mennyiségi analízise is elvégezhető egyetlen mintából [57,58].

A kvadrupól és Orbitrap analizátorokat együtt tartalmazó tandem tömegspektrométerek esetében a fenti hármas kvadrupól segítségével megvalósított MRM/SRM-hez hasonló, de nagyobb áteresztőképességű célzott vizsgálat végezhető [59]. Itt is szükséges a vizsgálandó fehérje ismerete, és a fehérje-specifikus egyedi peptid(ek)nek, az ún. proteotipikus peptid(ek)nek megfelelő m/z értékeket itt is ki kell választani, viszont itt egyszerre több prekurzort is kiválasztható, és az Orbitrap analizátorban a kiválasztott prekurzorok mindegyikének fragmenseit rögzíteni lehet. Így gyakorlatilag MS/MS spektrum lesz az eredmény, ami kiválóan alkalmazható a peptidek azonosítására. A PRM (Parallel Reaction Monitoring) során nem szükséges az átmeneteket megtervezni, ugyanis az összes fragmens rögzítésre kerül, és az adatelemzés során lehet az MRM/SRM átmeneteket kigyűjteni és kvantitatív analízisre felhasználni [59,60].

2.2.5. Fehérjék kvantitálása

A fehérjék tömegspektrometriás kvantitálása történhet shotgun vagy célzott módszerek alkalmazásával [56]. A shotgun adatgyűjtési módok jelölést vagy jelölés nélküli módszereket egyaránt használhatnak [58].

A kémiai jelölés során bármilyen biológiai mintát lehet kémiai reakció révén jelölni, de a jelölés hatékonysága sosem 100%-os. Az iTRAQ (izobár jelölés abszolút és relatív kvantitáláshoz – isobaric tag for relative and absolute quantitation) [61] vagy TMT (tandem mass tag) [62] során olyan SIL jelölő reagenst alkalmaznak, amely elsősorban a fehérjék N-terminálisához, illetve a lizin oldalláncok amin csoportjához kapcsolódik. A jelölő reagens tartalmaz egy jelölő csoportot, egy kiegyenlítő csoportot - amely tömegét úgy választják meg, hogy a jelölő csoporttal együtt azonos tömeget biztosít (izobár) mindegyik jelölő reagensnek -, valamint egy reaktív csoportot, amely a mintában levő fehérjék amino csoportjához való kapcsolódást biztosítja. A különböző izobár jelölő reagensekkel jelölt mintákat összekeverik, és egy mintaként vizsgálják. A tömegspektrometriás analízis során az MS spektrumban a peptidekre jellemző csúcsok azonos m/z értéknél detektálhatók, de a fragmentáció során a jelölő csoportra jellemző fragmensek is megjelennek. Az iTRAQ jelölők esetén az utóbbi fragmensek a 113-121 Da, míg a TMT jelölők esetén a 126-134 Da tartományba esnek. Ezen fragmenseket külön-külön detektálni lehet az MS/MS felvételeken, és a csúcsok alatti

területek minden esetben arányosak az adott jelölő csoport koncentrációjával, vagyis a jelölt peptid, és az annak megfelelő fehérje mennyiségével [61,62].

A jelölés nélküli kvantitálás (label-free quantification) teljes mértékben tömegspektrometriás módszer, amely nem alkalmaz semmiféle jelölő anyagot. A vizsgálat során bekövetkező MS/MS események számát, vagy a prekurzor ion intenzitását használják a kvantitáláshoz. Ugyanis minél több MS/MS készül egy fehérjéről, vagy minél nagyobb a kiválasztott prekurzor ion intenzitása, annál nagyobb koncentrációban van jelen a fehérje a mintában. Mind a jelölés nélküli, mind a kémiai jelölést alkalmazó módszer jól használható biológiai minták fehérjéinek azonosítására és relatív kvantitálására [58,63].

A proteomikai feladatok megoldására a komplex biológiai kérdések megválaszolásánál egyre szélesebb körben elterjedt a célzott proteomika alkalmazása. A kémiai jelölést alkalmazó vagy a jelölés nélküli kvantitálási módszerekkel ellentétben, a célzott módszerek során szükség van a vizsgálni kívánt fehérje ismeretére. Viszont azáltal, hogy pontos információval rendelkezünk a vizsgálandó fehérjéről, specifikus és szenzitív MRM/SRM vagy PRM módszert lehet tervezni. A célzott módszerek során az egyes átmenetekre kapott jelekből a kapcsolt kromatográfiás elválasztás (online LC) során kialakuló csúcs, pontosabban a csúcs alatti terület arányos a fehérje mennyiségével [57,59,60,64].

A kvantitálási módszerek mindegyikével meghatározható a fehérjék relatív mennyisége, viszont csak a célzott módszerek segítségével nyílik lehetőség az abszolút kvantitálásra. Az ismert mennyiségű SIL peptidek mint „belső standardok” alkalmazásával végzett abszolút kvantitálás segítségével pontosan meg lehet állapítani a vizsgált fehérje/peptid koncentrációját vagy anyagmennyiségét az adott mintában [57].

2.2.6. Adatgondozás, adatelemzés

A proteomikai módszerekkel generált minőségi vagy mennyiségi információkat az esetek igen jelentős részében adatbázisokban tárolják. A megfelelő paraméterek, sok esetben a MIAPE (Minimum Information About a Proteomic Experiment) irányelveknek (http://www.psidev.info/miape) megfelelő információk megadásával a nyers és elemzett adatokat fel lehet tölteni adatbázisokba. Ilyen adatbázisok például az EMBL-EBI (https://www.ebi.ac.uk/) által gondozott Pride [65], a Peptide Atlas [66], a célzott adatokra specializálódott Panorama [67,68], stb. Ezek az adatok szabadon hozzáférhetők és a ProteomeXchange-n keresztül letölthetők. A ProteomeXchange integrálja az egyes adatbázisokat, így egy egységes felületet biztosít az adatok feltöltéséhez és letöltéséhez [69]. Jelenleg 10848 adathalmazt tartalmaz, amelyből 4489 humán

(http://www.proteomexchange.org/, 2020.04.03.). A proteomikai kutatóközönség számára nagyon fontos a megbízható és szabadon hozzáférhető adatok generálása, emiatt a terület vezető folyóirataiban a publikálás feltétele az adatok feltöltése a MIAPE kritériumoknak megfelelően a szabadon hozzáférhető adatbázisba, lehetőség szerint a ProteomeXchange felületen keresztül.

Az omikai módszerekkel begyűjtött nagy adatmennyiség egyik legátfogóbb és legjobb vizualizációs lehetőséget biztosító megjelenítése a hálózatok alkalmazása [70,71]. A hálózatok rajzolásánál a rendelkezésre álló kísérleti vagy predikciós adatok felhasználásával ténylegesen igazolt, vagy becsült fehérje-fehérje interakciókat használják fel. A hálózatrajzoló szoftverek jelentős része csak a bináris információt, a kapcsolat meglétét vagy hiányát alkalmazza, de az egyre nagyobb mértékben rendelkezésre álló mennyiségi adatokat csak kismértékben használják [72,73].

A hálózatok rajzolásához egyik leggyakrabban alkalmazott adatbázis és szoftverkörnyezet a String, amely szabadon hozzáférhető és felhasználóbarát módon, folyamatosan frissülő adatbázissal biztosítja a könnyen értelmezhető eredményeket [74,75]. A hálózatok elemzésekor fontos a hálózati csomópontok, jelen esetben a fehérjék, illetve a csomópontok közötti élek, esetünkben a fehérje-fehérje interakciók ismerete. Ezen információkat felhasználva a hálózat változására jellemző paraméterek számíthatók, illetve a hálózati paraméterek vizsgálatával a hálózatok változásai számszerűsíthetők. A String adatbázis a hálózat megjelenítésén kívül alkalmas a funkcionális elemzés elvégzésére is: a vizsgált hálózatban a feldúsult, a véletlentől statisztikailag szignifikáns módon gyakrabban előforduló funkciójú fehérjéknek megfelelő génontológiai (Gene Ontology – GO) funkciókat kilistázza, és a funkcióknak megfelelően a fehérjéket színezi.

Jelenleg az adatbázis - viszonylag bonyolult matematikai módszereket alkalmazva - használható a mennyiségi adatok elemzésére is, de vizsgálataink idején még nem állt rendelkezésre hasonló funkció [76].

2.3. A proteomikai módszerek alkalmazási területei

A proteomikai technikákat leggyakrabban biológiai jelenségek hátterében húzódó molekuláris mechanizmusok megértésére, fehérjék szerepének, illetve betegségek patomechanizmusának vizsgálatára és biomarkerek azonosítására használják az orvostudománnyal kapcsolatos területeken. Tekintve, hogy az adatintenzív módszerek alkalmazása jelentős mennyiségű adatot hoz létre, ezek megfelelő elemzésével az adatokban

rejlő biológiai információ kinyerhető. Ezért gyakran alkalmazzák a proteomikai technikákat szignalizációs útvonalak analízisére, szekretált fehérjék vizsgálatára, különböző állapotok összehasonlítására azzal a céllal, hogy a jelenségek mögött meghúzódó, biológiai szempontból releváns információ nyilvánvalóvá váljon [33,77–80]. Változatos alkalmazási lehetőségeit tekintve a proteomika a fehérjékkel kapcsolatos kutatások egyik nagyon gyakori eszköze. Jól mutatja ezt a tényt a FEBS (Federation of the European Biochemical Societies) (https://2019.febscongress.org/program) a HUPO (Human Proteome Organization) (http://hupo-2019.p.asnevents.com.au/), valamint az EuPA (European Proteomics Association) (https://www.eupa2019.org/program/scientific-program/) által szervezett éves konferenciák tematikája. A proteomika jól használható a baktériumok mennyiségi analízisétől kezdve (metaproteomika) [81,82] a genomikai és proteomikai információkat ötvöző proteogenomikán [83] át a fehérjék sejten belüli lokalizációjának és előfordulási gyakoriságának vizsgálatáig [84,85] a biológia és elméleti orvostudományok majdnem minden területén.

2.3.1. Fehérjék szerepének vizsgálata

A proteomikai technikákat gyakran alkalmazzák fehérjék szerepének vizsgálatára. Az ilyen jellegű módszerek általában ötvözik a hipotézis-vezérelt és adatintenzív megközelítéseket. Egy adott fehérje pontos funkciójának felderítésére még mindig a legjobb módszer - ha kivitelezhető - a fehérjét kódoló gén eltávolítása a vizsgált biológiai rendszerből (élőlény, szerv, sejtvonal stb.), és a kieső, illetve megváltozott funkciók tanulmányozása [86]. Az adatintenzív proteomikai módszerek alkalmazásával átfogó képet kaphatunk a fehérjék minőségi és mennyiségi változásait illetően a kontroll és génkiütött biológiai mintákban, ezeket az információkat pedig felhasználhatjuk a megváltozott biológiai funkciók feltérképezésére [87]. Ugyanakkor a poszt-transzlációs módosítások vizsgálatával olyan fontos szabályozó folyamatokról nyerhetünk információt, mint a foszforiláció-defoszforiláció [88,89]. A foszforilációt a kinázok, míg a defoszforilációt a protein foszfatázok katalizálják. Számos kutatási eredmény bizonyítja a kinázok szerepét a jelátviteli folyamatokban, de összefüggésbe hozták több patofiziológiás állapot kialakulásával is, mint például a daganatok kialakulása [90,91]. Egyre több bizonyítékot találtak arra vonatkozóan, hogy a foszfatázok nem csak kikapcsolói a kinázok által okozott változásoknak, hanem fontos részt vállalnak a szignalizációs folyamatok szabályozásában is [92]. A Ser/Thr foszfatázok a Ser/Thr kinázok által a Ser, ill. Thr aminosavakra helyezett foszfát csoportokat távolítják el. A Ser/Thr

specifikus PPP foszfoprotein foszfatázok egyik jelentős alcsoportját képezik az 1 típusú foszfatázok, melyek legismertebb képviselője a PP1 [92].

A PPP foszfatáz család egy új, gombákra jellemző tagja a PPZ1 foszfatáz [93], amelyet elsőként a *Saccharomyces cerevisiae* modell organizmusban jellemeztek [92,94]. Ortológjait számos gomba fajban megtalálták, mint a *Schisosaccharomyces pombe, Neurospora crassa, Aspergillus nidulans* és *Candida albicans* [95–98]. A deléciós mutáns *C. albicans* törzsek vizsgálatával úgy találták, hogy a *CaPPZ1* gén által kódolt CaPpz1 enzimnek szerepe van a kation homeosztázis szabályozásában, a sejtfal bioszintézisében, az oxidatív stresszre adott válasz kialakításában, a morfogenezisben, valamint módosíthatja a patogén virulenciáját [97,99–101]. Annak ellenére, hogy a deléciós kísérletekkel viszonylag sok információt sikerült gyűjteni a foszfatáz funkciójáról, fiziológiás szubsztrátja és a pontos hatásmechanizmusa még megismerésre vár. A proteomikai technikák alkalmazása kiváló lehetőséget biztosít a CaPpz1 szerepének tanulmányozására proteomikai és foszfoproteomikai szinten egyaránt.

2.3.2. Betegségek patomechanizmusának vizsgálata

A fent említett alkalmazási területek mellett a proteomikát leggyakrabban betegségek patomechanizmusának felderítésére, molekuláris szintű vizsgálatára alkalmazzák [79]. A betegektől és a megfelelő kontrolloktól származó humán mintákat, vagy az egyes állatfajokban létrehozott betegségmodellekből származó mintákat összehasonlítják, és adatintenzív technikákkal minden elérhető, fehérjéről származó információt begyűjtenek. Ez után bonyolult adatelemzési módokat használva az adatokat elemzik és értelmezik.

Munkám során az adatintenzív proteomikai módszereket a proliferatív vitreoretinopátia (PVR) patomechanizmusának tanulmányozására használtam. A PVR-ről viszonylag keveset tudunk, sajnos etiológiája nem ismert pontosan. Multifaktoriális betegségről van szó, amely a rhegmatogén retinaleválás egyik komplikációja. A rhegmatogén retinaleválást korrigáló műtétek után az esetek 8-25 %-ában kifejlődhet [102,103]. A rendelkezésre álló adatok alapján úgy tűnik, hogy a PVR tulajdonképpen a retina fiziológiás javítási mechanizmusának kóros folyamata, amely nemkívánatos, sok esetben súlyos látásromlással járó állapotokat okoz. A szérum eredetű vagy üvegtesti faktorok hatására egy epidermális-mesenchimális átalakulás figyelhető meg. A retina pigment epitél (RPE) sejtek és gliasejtek migrációját a RPE sejtek agresszív proliferációja követi és kialakul az epiretinális membrán, amely a betegség egyik vezető tünete [104,105]. A membrán ez után összehúzódik, közben extracelluláris kollagén termelődik, és ezen hatások eredményeként a

retina húzódik és gyűrődik [103]. A PVR műtéti kezelése, amelynek során a szem normális anatómiai viszonyait próbálják helyreállítani, gyakran sikertelen. Ezért a műtét után helyi gyógyszeres kezelést alkalmaznak azzal a céllal, hogy meggátolják az újabb proliferatív vitreoretinopátiás elváltozás kialakulását [102,106]. Annak ellenére, hogy a pontos patogenezist még homály fedi, számos gyógyszert teszteltek és kezdtek el alkalmazni a PVR terápiájában, de ezek nem mindig bizonyultak hatásosnak. Emiatt nagyon fontos lenne olyan betegség modellek létrehozása, amelyek segítségével jobban meg lehet ismerni a PVR-t okozó elváltozások patomechanizmusát, és új terápiás célpontok azonosíthatók. Az adatintenzív módszerek alkalmazásával jelentős mennyiségű információ gyűjthető, ezáltal jó lehetőséget kínálnak a PVR patomechanizmusának vizsgálatára.

2.3.3. Biomarkerek azonosítása

A proteomikai technikák által biztosított érzékenység és áteresztőképesség az orvostudományban a biomarkerek kutatása és terápiás célpontok azonosítása terén nyit lehetőségeket. A biomarkerek olyan fehérjék, amelyek segítségével betegségek diagnosztizálhatók, a betegség megjelenése vagy a komplikációk kialakulása előrejelezhető, vagy a terápia hatásossága nyomon követhető [107]. Több stratégia alkalmazható a biomarkerek azonosítására, az egyik leggyakrabban alkalmazott a National Cancer Institute által ajánlott stratégia [108]. Az esetek legnagyobb részében a biomarkerek azonosítása a felfedezéssel kezdődik. Ebben a fázisban a megfelelően megválasztott beteg és a kontroll csoportok közötti különbségeket vizsgáljuk shotgun tömegspektrometriás technikák segítségével. Általában csoportonként 3-5 donortól származó mintában az összes lehetséges fehérjét azonosítjuk, majd a két csoport közötti statisztikailag szignifikáns különbséget mutató fehérjéket kiválogatjuk. Ezek száma egy kellően érzékeny analitikai rendszer esetében több tíz, akár száz is lehet. A kiválasztott fehérjéket ezután nagyobb mintaszámon ellenőrzik, általában valamilyen célzott tömegspektrometriás módszer segítségével. Ebben a fázisban a cél az, hogy tovább szűkítsük a potenciális markerek számát. Az ellenőrzés után következik a validálás, amikor a kiválasztott néhány fehérje mennyiségét több ezer donor esetében megvizsgálják. Amennyiben a fehérje segítségével nagy mintaszámon is megfelelő szenzitivitással és specificitással különbséget lehet tenni a beteg és a kontroll minták között, a fehérjét alkalmazni lehet a klinikai diagnosztika során [109,110].

A szakirodalomban számos potenciális biomarkert közöltek a különböző betegségek esetében, de a Food and Drug Administration (FDA) által elfogadott biomarkerek száma

viszonylag alacsony, ugyanis különböző okok miatt a potenciális biomarkerek közül csak keveset sikerül validálni nagy mintaszámon [111–114].

A biomarkerek kutatása legrelevánsabb a probléma helyéhez legközelebbi szövet vagy szerv esetében lehet, mivel itt a legnagyobb a valószínűsége annak, hogy olyan fehérjéket sikerül azonosítani, amelyek eltérése összefüggésben van a betegséggel [115]. Ugyanakkor azt is figyelembe kell venni, hogy ilyen minták gyűjtése sokszor invazív módszerrel, esetleg műtéti beavatkozással lehetséges pl. biopsziák, retina, csarnokvíz, agy-gerincvelői folyadék stb. Emiatt az ilyen jellegű minták szűrésre nem alkalmazhatók. A legkézenfekvőbb lenne diagnosztikai szempontból olyan biológiai minták használata, amelyek nem invazív vagy minimálisan invazív módon gyűjthetők. A szérum és vizelet vizsgálata már régóta a laboratóriumi diagnosztika alapját képezik, viszont egyre jobban előtérbe kerül a nem invazív módon gyűjthető nyál, könny és verejték vizsgálata [116].

2.3.3.1. A kémiai barrier, mint potenciális biomarker forrás

Szervezetünk folyamatos támadásoknak van kitéve a környezetben levő mikroorganizmusok részéről, ugyanis szervezetünk anyagai jó táplálékforrást szolgáltatnak számukra. A bőrünk és a nyálkahártyáink ezért megfelelő védelmet kell biztosítsanak; fizikai barrierként elválasztó felületet képeznek szervezetünk és környezetünk között, elhatárolva szervezetünket a környezet anyagaitól és biztosítva integritásunkat [117]. Ugyanakkor a szervezet-környezet határfelületen intenzív folyamatok zajlanak [118]. A fizikai barrier mellett a termelt folyadékokkal testünk aktívan védekezik a potenciális patogének ellen. A könny, a verejték, a nyál, vagy az orrváladék például, hígítja a potenciális behatolókat, partikuláris részecskéket és mintegy kimosva megpróbálja eltávolítani a lehetséges behatolási pontokról. A megnövekedett folyadékmennyiséggel és áramlással csökkenthető a potenciális patogének száma. Emellett olyan anyagokat is tartalmaznak, amelyek ellehetetlenítik a patogének megtelepedését, különböző mechanizmusokkal pusztítva azokat [119–121]. Így, a potenciális behatolási felszíneken, vagyis minden olyan ponton, ahol szervezetünk a külvilággal érintkezik, a fizikai határ mellett van egy jól felépített ún. kémiai barrier is, amely fehérjék és kismolekulák segítségével elpusztítja a mikroorganizmusokat. A kémiai barrier fő komponensei az ún. antimikrobiális és immunmodulátor fehérjék (AMP) családjába tartozó kisebb és nagyobb peptidek és fehérjék [117,118,122].

A kémiai barrier komponensei mellett a szervezetünkben élő baktériumok is segítenek a potenciális patogénekkel szembeni védelemben. Az evolúció során egy mindkét fél számára kölcsönös előnyöket biztosító kapcsolat alakult ki, és az emberi szervezet ezekkel a

mikroorganizmusokkal mintegy szövetségben képes megbirkózni a különböző feladatokkal [123]. Testünk táplálékforrást szolgáltat a velünk együtt élő, ún. kommenzális baktériumok számára, azok viszont antimikrobiális peptidjeik révén és a táplálékok felhasználásával gátolják a potenciális patogének megtelepedését. Szervezetünk egy AMP koktélt termel folyamatosan, amely segítségével szabályozni tudja a határfelületeken élő mikroorganizmusokat [123]. Az AMP koktél a szervezetünk és a mikroorganizmusok által termelt AMP peptidek és fehérjék keveréke, amelynek összetétele folyamatosan változik, így védve ki a potenciális patogén mikrobák támadásait és tolerálva a kommenzális baktériumokat.

Környezetünk, életmódunk (pl. sportolás, kozmetikumok használata stb.) és a testünkben végbemenő fiziológiás vagy patológiás változások módosítják az AMP koktél összetételét, és ezáltal a kommenzális baktériumok számát, típusát [123]. Amikor a jól beállított egyensúly felbomlik, akkor betegségek lépnek fel. Atópiás dermatitiszben például megfigyelték a bőr fő AMP-jének a dermcidin szintjének a csökkenését, vagy irritábilis bél szindrómában és ulceratív kolitiszben a humán béta defenzinek szintjének változását [124,125].

Az antimikrobiális és immunmodulátor fehérjék családjába tartozó peptidek és fehérjék a kémiai barrier fontos komponensei [122,126]. Jelenleg a különböző adatbázisokban több, mint 180 olyan fehérjét gyűjtöttek össze, amelyek AMP tulajdonságokkal rendelkeznek [127–130]. Ezek lehetnek nagyobb molekulák, mint például a lizozim vagy laktoferrin, de tipikusan 15-50 aminosavas peptidek, vagy kisebb fehérjék. Szerkezetük stabil, alkalmazkodva a különböző helyeken levő körülményekhez, pl. magas só koncentráció, pH, proteázok jelenléte stb. Az AMP-ket többféle módon lehet csoportosítani. Termelődésük szerint lehetnek állandóan jelen lévő, konstitutívan termelődők, mint pl. a dermcidin, pszoriazin, RNáz 7, vagy lehetnek indukálhatók, mint bizonyos defenzinek, katelicidin peptidek stb., amelyek csak meghatározott stimulusok hatására termelődnek [126,131,132]. Az AMP-k termelődését gyulladásos citokinek (pl. IL-1β) vagy maguk a baktériumok indukálhatják [133]. Funkcióik szerint lehetnek antibakteriálisak, antivirálisak, illetve rendelkezhetnek immunmodulátor funkciókkal [134].

A defenzinek fő funkciója az antimikrobiális védekezés és az immunsejtek modulációja [126]. Az alfa és béta defenzinek jelentős szekvenciális és térszerkezeti homológiát mutató fehérjék, amelyek a prekurzor aminosav sorrendjében, az aktív peptidek hosszában és a szekréció helyében különböznek egymástól [126,135–137]. A béta defenzinek szerkezete nagy stabilitást mutat, egy speciális béta redős szerkezetet vesznek fel, amelyet

béta defenzin struktúrának neveznek [138]. Több béta defenzin szekvenciát tárolnak az UniProt adatbázisban, de nagyobb mennyiségű információ a humán béta defenzin (hBD) 1, 2, 3, és 4-ről áll rendelkezésre. A hBD 1 és 4 a konstitutívan experesszálódó, míg a hBD 2 és 3 az indukálható béta defenzinek közé tartozik [139,140]. A béta defenzineket főként az endotél sejtek termelik, és védelmet nyújtanak bizonyos Gramm negatív baktériumokkal és *Candida* törzsekkel szemben [141]. Ugyanakkor fontos kemotaktikus anyagok, amelyek szerepet játszanak az immunsejtek fertőzés helyére való irányításában és vonzásában [142]. Emelkedett hBD2 szintet mértek gyulladt béltraktusú betegek székletében, és magas hBD3 szint jellemezte az ulceratív kolitiszes betegek vastagbelének nyálkahártyáját [143,144]. A hBD4 esetében kimutatták, hogy kapcsolatot alakít ki a lizozim C-vel, és a hBD3-al közösen, egymás hatását kölcsönösen erősítve működnek [133].

A defenzinek kívül más AMPk is, mint például a dermcidin, lizozim C, prolaktin indukált fehérje, laktoferrin, katelicidin stb. megtalálhatók a kémiai barrierek összetételében. A dermcidin és az egymással átfedő szekvenciájú dermcidin peptidek mind az antimikrobiális védelemben, mind az immunmodulációban részt vesznek, széles antimikrobiális aktivitással rendelkeznek és ellenállóak az alacsony pH-nak és a magas sókoncentrációnak [126,145]. A katelicidin a dermcidinhez hasonlóan kis, bázikus peptidek összessége, amely inaktív prekurzor formájában termelődik, és a neutrofilekben a szerin proteináz 3, míg a bőrben a kallikrein 5 és 7 hatására aktiválódik. Az LL-37 katelicidin peptid széles antimikrobiális spektrummal rendelkezik, de emellett részt vesz az angiogenezisben, kemotaxisban, citokin termelésben és a sebgyógyulásban [146–151]. A lizozim C, laktoferrin, prolaktin indukált fehérjék, kluszterinek nagyobb fehérjék, amelyeknek változatos szerepük van: a lizozim C elsősorban a peptidoglikán sejtfal bontásáért felelős, valamint immunmodulátor aktivitással rendelkezik; a laktoferrin megköti a baktériumok számára fontos vasat, valamint antimikrobiális, gyulladásellenes és daganat ellenes hatású; míg a kluszterinek chaperonként működnek és mátrix metalloproteináz (MMP) gátlók [152–155]. A prolaktin indukált fehérje általában az apokrin mirigyekben termelődő szekretált fehérje, amelynek megnövekedett mennyiségét kimutatták daganatokban pl. emlődaganatban [156]. A pontos funkciója nem ismert, szerepe van az immunmodulációban és a T sejtek apoptózisának gátlásában [157].

A különböző betegségek hatására megváltozó kémiai barrier összetétel diagnosztikus jelentőségű lehet. Kutatómunkám során behatóan tanulmányoztam a könny, nyál és verejték összetételét és annak változásait különböző betegségekben. Vizsgáltam a könnyet Alzheimer kór és zöldhályog esetén, a nyál fehérje összetételének változásait szájüregi laphámrákban, valamint a normális, hő hatására termelődő verejték összetételét.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkám során célom volt egy változatos, elsősorban kvantitatív proteomikai technikákat alkalmazó platform fejlesztése, amely a saját kutatási kérdéseim megválaszolásával bizonyítja széleskörű használhatóságát az élettudományok területén. A kétdimenziós elektroforézistől, mint számomra ismerős, a PhD tanulmányaim alatt alkalmazott proteomikai technikától kiindulva a bonyolultabb, tömegspektrometriás technikák alkalmazásán keresztül olyan interdiszciplináris kutatásokig kívántam eljutni, amelyek nemcsak létrehozzák, hanem bioinformatikai és hálózatelemző módszerek alkalmazásával értelmezik is a kvantitatív adatokat. A proteomikai technikákat eszközként használva célom volt a minél szélesebb körű biológiailag releváns információ kinyerése a mintákból. Ehhez mind proteomikai, mind adatelemző módszereket kívántam továbbfejleszteni, optimalizálni és alkalmazni.

Célom volt a kutatócsoportom által bevezetett kvantitatív proteomikai technikák segítségével megszerzett tudás transzlációs jellegének növelése, így kutatásaim témájául fontos orvosi vonatkozásokkal bíró kérdéseket választottam. Fő érdeklődési területem a betegségek patomechanizmusának feltárása mellett a diagnosztikus biomarkerek azonosítása nem invazív módon gyűjthető testfolyadékokban. Célom volt olyan kvantitatív proteomikai módszerek kifejlesztése, amelyek segítségével a könnyben, nyálban és verejtékben levő kémiai barrier komponensei vizsgálhatók. A kémiai barrier megváltozásának tanulmányozásával Alzheimer kórban, zöldhályogban illetve szájüregi laphámrákban szenvedő betegek számára diagnosztikus és prognosztikus biomarkereket kívántam azonosítani. Terveztem a szemben zajló sebgyógyulási folyamatok tanulmányozását és potenciális biomarkerek azonosítását, amelyek segítségével előrejelezhető a trabekulektómia utáni komplikációk megjelenése, valamint olyan szájüregi laphámrák-specifikus potenciális nyálbiomarkerek azonosítását, amelyek a magyarországi populációra jellemzőek. Emellett szándékomban állt a proteomika minél szélesebb körű alkalmazhatóságának igazolása, a CaPpz1 gomba-specifikus foszfatáz pontos szerepének felderítése, valamint komplex, rendszerszintű hálózatelemzési módszerek kidolgozása, és alkalmazása a minőségi és mennyiségi proteomikai adatok együttes elemzése céljából.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Vegyszerek

A kísérletek kivitelezése során felhasznált vegyszerek és oldatok nagy tisztaságúak (electrophoresis grade vagy chromatography grade) voltak, és a Merck/Sigma-tól kerültek beszerzésre. A más cégtől származó reagenseket és fogyó eszközöket az első említésükkor zárójelben jelöltem.

4.2. Mintagyűjtés

A humán minták gyűjtése az érvényben levő szabályoknak és a Helsinki Egyezményben foglaltaknak megfelelően, a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyásával történt (3385–2011, 2980-2009, 4078-2013, 2885-2008, 4701A-2016). A betegek minden esetben megkapták a megfelelő tájékoztatást, és írásos beleegyező nyilatkozat formájában beleegyezésüket adták a vizsgálatok elvégzéséhez.

Minden mintatípus esetében a mintagyűjtés után maximum 2 órán belül munkatársaimmal a mintákat feldolgoztuk, és -70 ^{o}C-on lefagyasztottuk. Az analízis során minden mintát csak egyszer olvasztottunk fel, a felolvasztott mintát azonnal felhasználtuk. A vizsgálatok előtt a minták fehérje tartalmát Bradford módszerrel [158] határoztuk meg.

4.2.1. Könnyminták

A könny-mintavétel standard kapilláris mintavételi technikával, a kötőhártya ingerlése nélkül, üveg-kapillárissal (VWR) történt 2 percen keresztül. Az egyedi mintákat lecentrifugáltuk, majd a felülúszókat 5 µl-es adagokra osztottuk és azonnal -70 ^{o}C-on lefagyasztottuk. A mintagyűjtés előtt a donorok szemészeti vizsgálaton estek át, és csak azoktól a donoroktól vettünk könnymintát, akiknek kórelőzményében nem szerepelt autoimmun betegség vagy szisztémás gyulladás, illetve a szemész nem talált a vizsgált betegségen kívül más kórós szemészeti elváltozást.

4.2.2. Csarnokvíz minták

A csarnokvíz mintákat a Szemészeti Klinikán, trabekulektómia műtét közben gyűjtötték. A mintákat üveg kapilláris segítségével limbális paracentézist alkalmazva a műtétet végző szakorvos gyűjtötte. Gyűjtés után rögtön jégre tették a mintákat, majd jégen a Proteomika Szolgáltató Laboratóriumba szállították. Itt a könnyhöz hasonlóan a mintákat lecentrifugáltuk, szétmértük és azonnal -70 ^{o}C-on lefagyasztottuk.

4.2.3. Verejtékminták

A verejték gyűjtése egészséges önkéntesektől szaunában történt. A szaunázás előtti 24 órában az önkéntesek nem használtak testápolót, tusfürdőt, illetve dezodort. A hő hatására a bőrön képződő verejtékcseppeket üveg kapilláris segítségével a bőr érintése nélkül összegyűjtöttük. A mintákat lecentrifugáltuk, a felülúszót pooloztuk, beszárítottuk, visszaoldottuk ammónium bikarbonát oldatban, majd 100 µl-es adagokra osztottuk és azonnal -70 ºC-on lefagyasztottuk.

4.2.4. Nyálminták

A nem stimulált nyálmintákat 50 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük. Az egyedi mintákat 5 µm-es pórusátmérőjű PVDF membránszűrőn (Millipore) átszűrtük, majd a szűrletet 200 µl-es adagokra osztottuk és azonnal -70 ºC-on lefagyasztottuk. A mintavétel a fogszakorvosi rendelőben történt fogász szakorvos által, és a mintavétel után teljes státuszvizsgálat következett. A daganatos betegek esetében a mintavétel után a szájsebészeten biopszia vétele is történt, amit a Patológiai Intézetben vizsgáltak meg. Minden tumor esetében a szakorvos meghatározta a tumor lokalizációját, a TNM szerinti besorolását, a tumor stádiumát és differenciáltsági állapotát.

4.2.5. Sejtkultúra minták

A sejtkultúrákat Rajnavölgyi Éva professzor asszony (Debreceni Egyetem ÁOK, Immunológiai Intézet) munkacsoportja biztosította. A tápfolyadékot összegyűjtöttük, lecentrifugáltuk, majd a felülúszót azonnal -70 ºC-on lefagyasztottuk. A sejteket először mostuk, majd lízis pufferrel (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1 mM EDTA, 17 mM beta-merkaptoetanol, 0,5% TritonX) lizáltuk. A lizátumokat lecentrifugáltuk, a tiszta felülúszót -70 ºC-on lefagyasztottuk.

4.2.6. Candida albicans sejtlizátumok

A Dombrádi Viktor professzor úr (Debreceni Egyetem ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet) munkacsoportja által tenyésztett QMY23 kontroll és *cappz1* hiányos *Candida albicans* törzsek csak a *CaPPZ1* gén jelenlétében különböztek egymástól, egyébként genetikailag azonosak voltak. A *cappz1* mutáns és kontroll törzsek tenyésztése azonos körülmények között történt. Az egyetlen megfigyelhető különbség a két törzs között az volt, hogy a *cappz1* törzsek lassabban növekedtek. Tekintve, hogy a tenyésztés addig történt, amíg az OD_{640} elérte a 0,8-as értéket, a két törzs tenyésztési ideje kissé eltért egymástól: a kontroll

törzset kb. 5,5 óra, míg a *cappz1* törzset 6 óráig tenyésztették. Mindkét törzs esetében a begyűjtött kultúrákat először lecentrifugálták (3237xg, 4 ^{o}C, 10 min), majd hideg PBS-ben mosták kétszer. A mosás utáni centrifugálással összegyűjtött sejteket folyékony nitrogénben lefagyasztották. Közvetlenül az analízis előtt a fagyasztott sejteket felolvasztották és 1 ml lízis pufferben (50 mM NaH_2PO_4 pH 7,4, 1 mM EDTA, 5% glicerol, EDTA-mentes proteáz inhibitor koktél (Roche), 5 mM benzamidin, 10 nM leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM $MnCl_2$) 0,5 ml 1 mm átmérőjű üveggyöngy (Marienfeld) hozzáadásával 3 x 1 percig maximális fordulatszámon vortexelték és homogenizálták. A sejttörmeléket centrifugálással (7750xg, 4 ^{o}C, 10 min) távolították el, így mi a frissen tisztított felülúszót használtuk fel a kétdimeziós elektroforézishez.

4.2.7. Üvegtest minták

Az egerek kezelését és az üvegtest eltávolítását Dr. Petrovszki Goran (Debreceni Egyetem ÁOK, Szemészeti Klinika) munkacsoportja végezte. Az egerekből eltávolított szemeket azonnal folyékony nitrogénben lefagysztották. Az üvegtest izoláláshoz a szemeket felolvasztották, az üvegtesteket izolálták, amelyeket munkatársaimmal azonnal lízis pufferbe tettünk és feldolgoztunk.

4.2.8. HIV-1 transzdukált sejtlizátumok

Munkánk során kontroll és HIV-1-el transzdukált 293T sejteket használtunk fel, amelyeket Tőzsér József professzor úr (Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) munkacsoportja hozott létre. A VSV-1 pszeudotipizált HIV-1 részecskéket 293T sejtekben termelték, úgy, hogy a tranziens transzfekcióhoz a pWOX-CMV-GFP (transzfer vektor plazmid), pMDLg/pRRE (csomagoló plazmid), pRSV.rev (Rev-kódoló plazmid), és pMD. G (VSV-G fehérje kódoló plazmid) plazmidokat használták fel. A transzdukcióhoz 5 ng reverz transzkriptáz-ekvivalens HIV-1 pszeudoviriont használtak 4 μg/ml polibren (Sigma-Aldrich) jelenlétében. A kontroll sejtek esetében csak pszeudovirion-mentes tápfolyadékot adtak a sejtekhez. A transzdukció után azonnal (0 óra), 4 óra, illetve 12 óra elteltével a sejteket tripszinizálták 10 percig, majd háromszor mosták hideg PBS-ben. A mosás után a sejteket 4 ml cOmplete proteáz inhibitor koktéllal (Sigma-Aldrich) kiegészített lízis pufferben (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 % Na- deoxikolát, 0,1 % SDS, 50 mM Tris pH 8) szuszpendálták. A tisztított lizátumok kerültek a laboratóriumunkba, ahol acetonos fehérje kicsapást végeztünk 24 ml hideg aceton felhasználásával. A fehérje csapadékot ammónium bikarbonát oldatban vettük fel, és tripszines oldatban emésztésnek vetettük alá.

4.3. MRM/SRM módszertervezés

Ahhoz, hogy megfelelő MRM/SRM-alapú célzott módszereket tudjunk tervezni, szükség van a fehérje aminosav szekvenciájának pontos ismeretére. A célfehérjék aminosav szekvenciáját a UniProt (www.uniprot.org) adatbázisból töltöttük le. Mivel a tömegspektrometriás analízisek során alkalmazott enzimatikus emésztéskor tripszint használunk, a fehérje szekvenciákat *in silico* tripszinnel hasítottuk a UniProt oldalról elérhető PeptidCutter segítségével. Azon peptidek esetében, ahol a tripszin hasítás valószínűsége >95% volt, specificitási analízist végeztünk. BLASTp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) program segítségével egyenként megvizsgáltuk a triptikus peptideket, és az MRM/SRM átmenetek tervezéséhez azokat az ún. proteotipikus peptideket használtuk, amelyek csak a vizsgálandó fehérjére jellemzők. Ez azért volt szükséges, hogy biztosítani tudjuk a módszer megfelelő specificitását, és kizárjuk a lehetséges fals pozitív jelek megjelenését. Az átmenetek tervezéséhez a Skyline (https://skyline.ms/) szoftvert használtuk, és a megtervezett MRM/SRM átmeneteket - vagyis az egyes kvadrupólokban beállítandó m/z értékeket - egy tömegspektrometriás módszerfájlba integráltuk. A módszerfájlt megfelelő pozitív és negatív kontrollokon alkalmazva tovább optimalizáltuk a beállításokat, megkerestük az optimális ütközési energia értékeket. Akkor minősítettük megfelelőnek az MRM/SRM átmeneteket, amikor nem adtak jelet a negatív kontrollon, és koncentrációfüggő specifikus jelet adtak a pozitív kontrollon. Ezután a megfelelőnek bizonyult peptidek esetében megrendeltük a kiválasztott peptideknek megfelelő stabil izotóppal jelölt peptid párokat, majd ezeket ismert mennyiségben a tömegspektrometriás analízisek előtt a mintákhoz kevertük. A SIL peptideket a JPT Germany cégtől vásároltuk; mindegyik peptid stabil izotóppal jelezett C-terminális Lys vagy Arg-t tartalmazott. A terminális Lys vagy Arg esetében a C13 vagy N15 izotópokat oly módon kombinálták, hogy 6 Da ill. 8 Da tömegkülönbség volt megfigyelhető a szintetikus SIL, és a vizsgálni kívánt peptidek között. Minden fehérje esetében lehetőség szerint két peptidet, peptidenként legalább két MRM/SRM átmenetet vizsgáltunk.

4.4. Fehérjék emésztése oldatban

Az oldatban emésztés során a fehérjéket először 6 M urea segítségével 30 percig szobahőmérsékleten denaturáltuk, majd redukáltuk. A redukálás minden esetben 37 ^{o}C-on, 60 percig 10 mM DTT (Bio-Rad) segítségével történt. A redukált –SH csoportokat 20 mM jódacetamid (IAA) (Bio-Rad) segítségével 45 percig, szobahőmérsékleten, sötétben alkiláltuk, hogy megakadályozzuk a kénhidak nem kontrollált újraalakulását, majd a mintát 25 mM-os ammónium bikarbonát oldattal úgy hígítottuk, hogy az urea koncentrációja 1 M

legyen. A tripszines emésztés 1:25 arányban MS minőségű, stabilizált tripszinnel (Sciex) 37 ^{o}C-on egy éjszakán át történt. A fehérje emésztményt beszárítottuk, majd feloldottuk 1% hangyasavat tartalmazó vizes oldatban, és reverz fázisú C18 töltetet tartalmazó ZipTip (Millipore) pipetta hegyek segítségével megtisztítottuk a sóktól és egyéb hidrofil szennyező anyagtól. A C18-as töltetről eluált peptideket ismét beszárítottuk, majd 1% hangyasavban történő feloldás után tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá.

4.5. Fehérjék emésztése gélben

A gélsávokat vagy foltokat kb. 1 cm^3-es darabokra vágtuk, majd 50% acetonitril tartalmú 25 mM-os ammónium bikarbonát oldat segítségével festékmentesítettük. A festékmentesítés után 20 mM DTT tartalmú oldattal, 56 ^{o}C-on inkubálva 60 percig elvégeztük a redukálást, majd a DTT tartalmú oldatot kidobva és 55 mM jódacetamid oldatot rárétegezve, szobahőn és sötétben inkubálva 45 percig elvégeztük az előző lépésben redukált tiol csoportok alkilálását. A kétdimenziós gélekből kivágott foltok esetében a redukálás és alkilálás lépéseket kihagytuk, ugyanis ezek már megtörténtek az izoelektromos fókuszáló gélek ekvilibrálása során.

A géldarabokat vákuumkoncentrátorban kiszárítottuk és a szárított géldarabokra 100 ng stabilizált, MS minőségű tripszint tettünk ammónium bikarbonát oldatban. A tripszines emésztést 37 ^{o}C-on végeztük egy éjszakán át, majd másnap reggel a tripszint 1 µl koncentrált hangyasav hozzáadásával előidézett savasodás segítségével állítottuk le. A gélből kidiffundált peptideket összegyűjtöttük egy tiszta, megfelelően feliratozott csőbe, majd a géldarabokat 5% acetonitril, 0,1% hangyasav oldattal 30 percig rázattuk, hogy a maradék peptideket is összegyűjtsük. Az extrahálás ezen lépését kétszer ismételtük meg, és a gélről leszívott, peptideket tartalmazó oldatot vákuumkoncentrátor segítségével beszárítottuk. A megfelelő feliratokkal ellátott csövekben levő beszárított peptideket az analízisig -20 ^{o}C-on tároltuk.

4.6. Tömegspektrometriás analízis

A tömegspektrometriás analízis nanoHPLC-vel kapcsolt 4000 QTRAP (AB Sciex) tömegspektrométeren történt. A fehérje azonosításhoz a peptideket 0,3 µl/perc áramlási sebesség mellett 90 perces víz- acetonitril gradiens segítségével választottuk el Zorbax 300SB-C18 (150 mm x 75 µm, 3,5 µm részecske átmérő, 300 Å pórusátmérő) analitikai oszlopon (Agilent), miután Zorbax 300SB-C18 töményítő oszlopon (5 x 0,3 mm, 5 µm részecske átmérő) (Agilent) dúsítottuk és a kísérő puffer komponensektől megszabadultunk.

A mintát MicroIon forrás segítségével juttattuk be a tömegspektrométerbe. Az MRM/SRM-alapú analízisekhez hasonló paramétereket, de 30 perces gradienst alkalmaztunk.

A fehérjék azonosításához információ-függő adatgyűjtést használtunk, amelynek során először egy felderítő pásztázást (tömegtartomány: 440-1400 Da) végeztünk. Ezt követően a három legintenzívebb csúcs töltöttségi fokának meghatározása, majd a töltöttségi fokok alapján számolt energiával, a csúcsokhoz tartozó peptidek fragmentálása és a fragmensek analízise történt. A fehérjék azonosítását a tömegspektrométer által rögzített MS/MS adatok alapján a ProteinPilot (Sciex) szoftver segítségével végeztük el. Azokat a fehérjéket fogadtuk el találatként, amelyeket legalább két olyan peptiddel sikerült azonosítani, amelynek a konfidencia értéke minimum 95% volt.

Az MRM/SRM analízishez az MRM/SRM módszer tervezésénél megállapított és optimalizált paramétereket felhasználva módszerfájlokat készítettünk, és ezek segítségével történt az adatgyűjtés pozitív MRM módban. Minden vizsgálatot duplikátumban végeztünk, az adatok értékeléséhez a Skyline szoftvert használtuk.

A jelölés nélküli kvantitálási kísérleteket kollaborációs partnereink végezték; a nyál elemzése a Szegedi Biológiai Központ Proteomika Laboratóriumában történt, míg a HIV-1 transzdukció és a verejték vizsgálata során végzett analízisek az Arizonai Egyetem Proteomika Laboratóriumában készültek.

4.7. Kétdimenziós elektroforézis

4.7.1. Mintaelőkészítés

A QMY23 és a *cappz1* deléciós mutáns *Candida albicans* törzseket tartalmazó mintákat proteáz és foszfatáz inhibitorokat tartalmazó sejtlizátumok formájában kaptuk meg kollaborációs partnerünktől (Prof. Dombrádi Viktor, DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet). A sejtlizátumok fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg, majd 450 µg-nyi fehérjét tartalmazó mintát Ready-Prep CleanUp Kit (Bio-Rad) segítségével tisztítottunk a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztítás során történő fehérje kicsapás és centrifugálás után a mosott fehérjéket tartalmazó csapadékot 450 µl 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2 % Bio-Lyte (Bio-Rad) és 0,001% brómfenolkék tartalmú rehidráló oldatban oldottuk fel és azonnal 24 cm-es pH 4-7 immobilizált pH gradiensű fókuszáló gélre (Bio-Rad) vittük fel, és elkezdtük a passzív rehidrálást.

Az egér üvegtesti mintákat a kollaborációs partnerünk (Dr. Petrovszki Goran, ÁOK Szemklinika) által történő üvegtest izolálása után azonnal 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS és 30 mM Tris-HCl tartalmú pufferbe tettük, pipettával szuszpendáltuk, majd jégen

szonikáltuk 5 percig. Ez után egy centrifugálás segítségével (500xg, 4°C, 10 min) megszabadultunk a sejttörmeléktől és a felülúszót Ready-Prep CleanUp Kit segítségével tisztítottuk az előzőekben ismertetett módon. A mintákat 24 cm-es pH 3-10 immobilizált pH gradiensű fókuszáló gélre (Bio-Rad) vittük fel, majd passzív rehidrálással juttattuk a gélbe.

4.7.2. Izoelektromos fókuszálás

A kétdimenziós elektroforézis első dimenziójához, az izoelektromos fókuszáláshoz a 450 µl mintát passzív rehidrálással, 20 °C-on egy éjszakán át jutattuk az immobilizált pH gradienst tartalmazó fókuszáló gélekre. Másnap reggel, a mintába kevert brómfenolkék által biztosított kék szín egyenletes eloszlásának és a fókuszáló gél térfogatának megnövekedésének megfigyelése után a fókuszáló géleket izoelektromos fókuszáló készülékbe (Bio-Rad) helyeztük és ásványi olajat rétegeztünk rá. Az izoelektromos fókuszálást a következő beállításokkal végeztük el: 300 V feszültséggel 3 órán át sómentesítettük a mintát, majd fokozatosan, 5 óra alatt a feszültséget 3500 V-ra emeltük, és 3500 V-on tartottuk 18 órán át. A fókuszálást követően a géleket -70 °C-on tároltuk az ekvilibrálásig.

4.7.3. Ekvilibrálás

A -70 °C-ról kivett géleket frissen elkészített, 500 mM Tris-HCl (pH 8,5), 6 M urea, 2% SDS, 20% glicerol és brómfenolkék tartalmú ekvilibráló pufferben ekvilibráltuk. Az ekvilibrálás első lépésében a pufferhez 0,6% DTT-t adtunk, aminek hatására megtörtént a diszulfid hidak redukálása. Az ekvilibrálás második lépésében lecseréltük az oldatot és az ekvilibráló pufferhez 1,2% jódacetamidot adtunk annak érdekében, hogy az előző lépésben redukált tiol csoportokat alkiláljuk. Az ekvilibrálás mindkét lépése egyenként 15 percig tartott, miközben az egyenletes keverés érdekében billenő asztalon lassan billegtettük a géleket.

4.7.4. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

A második dimenzióhoz 12%-os SDS-poliakrilamid gélt öntöttünk. Tekintve, hogy a keratinszennyezés ebben a lépésben már lényeges problémát jelenthet, különös figyelmet fordítottunk a tisztaságra. Az asztalfelületet, valamint a gélöntéshez használt üveglapokat és eszközöket tömény etanollal átitatott szöszmentes kendővel alaposan áttöröltük. Ez után a 24 cm-es géllapok aljára kb. 1 cm magas akrilamid gélcsíkot öntöttünk, majd ennek megszilárdulása után készítettük el és öntöttük rá a gél többi részét. A gélöntés két lépésben

való elvégzésére azért volt szükség, mert a gél nagy tömege miatt a megszilárdulás előtt egy része elfolyt volna az illesztéseknél. A gélek tetejére vizet rétegeztünk, hogy biztosítsuk az egyenletes gélfelületet. A megszilárdulás után (kb. 40 perc) a vizet leöntöttük a gélek tetejéről, szöszmentes szűrőpapírral leitattuk és azonnal ráhelyeztük az ekvilibrált izoelektromos fókuszáló géleket, és egy megfelelően kiképzett spatula segítségével óvatosan rányomtunk az SDS-poliakrilamid gélek tetejére. Vigyáztunk, hogy ne sértsük meg a gél felszíneket, majd brómfenolkékkel színezett alacsony olvadáspontú agarózt rétegeztünk rá annak érdekében, hogy légmentesen lezárjuk a két gél közötti részt. A gélek tetejére rétegzett agaróz megszilárdulása után a géleket tartalmazó üveglap-szendvicseket Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) elektroforézis futtatókádba helyeztük. A kád egyszerre 12 gél elektroforézisét teszi lehetővé, így az egy analízishez szükséges összes párhuzamos elektroforézise egyidejűleg volt lehetséges.

Az elektroforézist 100 mA konstans áramerősséggel végeztük kb. 24 órán át, amíg a brómfenolkék elérte a gélek alját.

Az elektroforézis után az üveglap-szendvicseket szétszedtük és a géleket előre elkészített, feliratozott puffert tartalmazó jól zárható fedelű edényekbe helyeztük.

4.7.5. Gélek festése

A gélek festéséhez kétféle fluoreszcens festéket alkalmaztunk. A házilag készített RuBPS festék [13] az összes fehérjét megfesti, míg a ProQ Diamond (Thermo Life Technologies) festék csak a foszforilált fehérjékhez kötődik, így csak azok válnak detektálhatóvá.

ProQ Diamond festés

A festést fixálással kezdtük, amely megakadályozta a fehérjék diffundálását a gélben az elektroforézis után. A fixáláshoz 10% ecetsav, 50% metanol oldatot használtunk és 2x30 percig fixáltuk a géleket. A fixálás után 3-szor mostuk nagy tisztaságú MilliQ vízzel a géleket, majd ráöntöttük a festéket és egy éjszakán át 20^{o}C-on billegtettük. Másnap reggel a géleket áttettük ProQ Diamond Destain oldatba és 3x30 percig, majd MilliQ vízben 2x5 percig mostuk a géleket.

RuBPS festés

A festés ebben az esetben is a fixálással kezdődött, amelynek során a géleket 10% ecetsav, 50% metanol elegyében áztattuk 2 órán át, majd a géleket 20% etanolt és 100 nM RuBPS-t tartalmazó oldatba helyeztük, és egy éjszakán át 20^{o}C-on, sötétben billegtettük. Másnap reggel a géleket áttettük 7% ecetsav, 10% metanol oldatába, annak érdekében, hogy

a nem kötődött festékszemcséket eltávolítsuk, majd MilliQ vízben 3x30 percig mostuk a géleket.

4.7.6. Géldokumentáció és gélkép analízis

A géldokumentáció Pharos FXPlus Molecular Imager (Bio-Rad) szkennerrel történt a következő beállításokkal: excitáció: 532 nm-en, szkennelés 615 nm-en, 100 μm felbontással. A gélképek analízisét a Delta 2D 4.4 szoftver (Decodon) segítségével végeztük. A szkenner által készített képek tiff formátumát betöltöttük a Delta 2D szoftverbe, ahol létrehoztuk a kísérleti elrendezésnek megfelelő csoportokat. Az egyes csoportokba tartozó géleken levő foltokat egymásra vetítettük a szoftver által biztosított „exact mode matching protocol" és „group warping strategy" beállítások segítségével. A „union mode" segítségével egy egyesített gélképet hoztunk létre (fused image), amely az összes foltot tartalmazta. A továbbiakban a foltok detektálása ezen az egyesített gélképen történt, majd a szoftver a foltok körberajzolásával nyert folt területeket visszavetítette az egyes gélekre, és ezeket a területeket - pontosabban az ezekhez a területekhez tartozó intenzitás értékeket - használta fel a mennyiségi analízis elvégzéséhez. A kvantitálás úgy történt, hogy a szoftver az összes detektált folt intenzitásának az összegét 100%-nak minősítette, majd az egyes géleken levő foltok intenzitását az összes intenzitás százalékaként tüntette fel és normalizált folt-térfogatnak nevezte el. Az egyes csoportokhoz tartozó géleken mért átlagos normalizált folt-térfogatokat összevetettük, és a szoftver által elvégzett Student t-tesztben szignifikáns változást mutató értékekhez tartozó foltokat kivágtuk. A kivágott foltokban levő fehérjéket MS/MS-alapú tömegspektrometriás fehérje azonosítás segítségével azonosítottuk.

4.8. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

20 μg totál protein tartalmú, előzőleg 4% SDS, 20% glicerol, 10% beta-merkaptoetanol, 0,02% brómfenolkék tartalmú 0,125 M Tris-HCl, pH 6.8 oldatban elfőzött és lehűtött könnyminták fehérje tartalmát vizsgáltuk. Az elválasztás 10%-os SDS-poliakrilamid gélen történt Bio-Rad mini tetra cell (Bio-Rad) elválasztó egységben 100 A konstans áramerősséggel 1 órán át. A gélfestéshez Coomassie PageBlue (Fermentas) oldatot használtunk a gyártó utasításainak megfelelően, és a gélképet Pharos FX Plus lézer szkenner (Bio-Rad) segítségével rögzítettük. A gélkép analízisét a QuantityOne szoftver (Bio-Rad) segítségével végeztük, így határoztuk meg az egyes sávok intenzitását.

4.9. Immunológiai módszerekkel történő vizsgálatok

A multiplex immungyöngy-alapú és ELISA analízisek során a gyártó által javasolt protokollok szerint jártunk el. A nyálmintákban az IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α és VEGF analízisét Custom 6plex Milliplex kit (Merk-Millipore) segítségével végeztük el. A könnyben és csarnokvízben az FGFb, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNF-α és VEGF citokinek mennyiségét Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-Rad) segítségével határoztuk meg. A könny esetében 1:25-ös, míg a csarnokvíz esetében 1:2-es hígítást alkalmaztunk. A leolvasás mindegyik multiplex kit esetében BioPlex 2.0 rendszeren (Bio-Rad), az adatok kiértékelése pedig BioPlex Manager 4.0 (Bio-Rad) szoftver segítségével történt. Az IL-6, tioredoxin, S100A9 és hBD2 mennyiségét kvantitatív ELISA kitek segítségével határoztuk meg (IL-6 – EK0410 Boster Biological Technology, tioredoxin – EK1254 Boster Biological Technology, S100A9 – E-EL-H1290 Elabsience Biotechnology, hBD2 – EK-072-37 Phoenix Pharmaceuticals) a gyártó utasításainak megfelelően.

4.10. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analízise során először megvizsgáltuk az eloszlást. Normál eloszlás esetén Student féle t-tesztet használtunk, míg nem normál eloszlás esetén nem parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. A trabekulektómia utáni komplikációk vizsgálatánál alkalmazott lineáris modellt és az ANOVA analízist az Olink (Svédország) cég végezte. Az MRM/SRM adatok statisztikai elemzése során a Skyline szoftverbe beépített MsStat [159] programcsomagot használtuk, majd az eredményeket post-hoc teszt segítségével korrigáltuk. A potenciális biomarkerek vizsgálatára ROC (Receiver Operating Characteristic) statisztikát alkalmaztunk [160].

A HIV-1 transzdukció hatásának vizsgálata során figyelembe véve, hogy a technikai replikátumok adatai általában a Poisson eloszlást követik, míg a viszonylag nagy biológiai variancia általában a negatív binomiális eloszlással modellezhető, egy módosított általános lineáris modellt alkalmaztunk, majd az eredményeket post-hoc teszt segítségével korrigáltuk [161–164].

A statisztikai analízisekhez a Dr. Emri Miklós által fejlesztett R-alapú szoftvercsomagot használtuk. Vizsgálatainkat a String [165], circlize (https://jokergoo.github.io/circlize_book/book/), MASS [166], lsmeans [167], matrixStats

(https://github.com/HenrikBengtsson/matrixStats), reshape2 [168] és ggplot2 [169] programcsomagok felhasználásával végeztük.

4.11. Hálózatok tanulmányozása

A hálózatok megrajzolásához String adatbázist használtuk közepes szigorúságú kapcsolatokat (interakciós érték kb. 0,7) figyelembe véve. A vizsgált hálózatokban az egyes GO (www.*geneontology.org/*) funkciók feldúsulását a String-be beépített elemzés segítségével vizsgáltuk. A csomópontok (fehérjék) funkció szerinti színezéséhez is a String által biztosított lehetőséget használtuk. A String a rendelkezésre álló interakciós adatok alapján színezi a fehérjék közötti kapcsolatokat. A cián és magenta szín az ismert interakciókat jelöli (cián az adatbázisokban levő adatra, míg a magenta a kísérletes adatra utal), a zöld, piros és kék színek a prediktált interakciókra vonatkoznak, a sárga szín az adatbányászattal, fekete a koexpresszióval, ill. a világoskék a fehérje homológia alapján meghatározott interakciókat jelöli. A jelölések színén nem változtattunk, de az elemzések során nem vettük figyelembe az egyes színek által jelölt különbségeket.

A HIV-1 transzdukció során generált bináris hálózatok esetében is a hálózat készítésekor a String adatbázist használtuk (String-R programcsomag), de itt a >0,95 interakciós értéket állítottuk be, így csak az igen nagy valószínűségű fehérje-fehérje interakciókat vettük figyelembe. A hálózatokat úgy alkottuk meg, hogy az NW hálózat a HIV-1 kezel és kontroll 0 órás mintáiból azonosított fehérjéket tartalmazta, a C04 és C12 hálózatok a 4, ill. 12 órás időpontban begyűjtött kontroll minták fehérjéit, míg a H04 és H12 hálózatok a HIV-1 kezelt sejtekből 4, ill. 12 óra után begyűjtött minták fehérjéit tartalmazták. Az így generált bináris hálózatokban $B_{t,s}$ *(*B_0*,* $B_{4h,C}$*,* $B_{4h,H}$ *,* $B_{12h,C}$*,* $B_{12h,H}$*)* a csomópontok a fehérjék, míg az élek a fehérje-fehérje interakciók lehetőségét jelentik, ugyanis az adatbázisban tárolt adatok alapján lehetséges fehérje-fehérje interakció tényleges jelenlétéről a mintáinkban azonosított fehérjék között nincs információnk.

4.11.1. Súlyozott hálózatok létrehozása

Ahhoz, hogy a valós interakciókról több információt kaphassunk, a String által generált bináris hálózatokat ($B_{t,s}$) tovább módosítottuk. A tömegspektrometriás analízis során kapott mennyiségi információkat használtuk fel arra, hogy az éleknek w_{ij} súlyt adjunk. Az így kapott súlyozott hálózatokban ($W_{t,s}$) az élek az interakció valószínűségéről és erősségéről adnak információt az alábbi képlet alapján:

$$w_{ij} = \frac{n_i}{k_i}\frac{n_j}{k_j}$$

ahol w_{ij} a P_i és P_j fehérjék közötti interakciós sűrűséget jelenti,; az n_i, n_j a fehérje mennyiségre, míg a k_i, k_j a fokszámra (élek, azaz a lehetséges kapcsolatok száma) utal a P_i és P_j esetében az adott $B_{t,s}$ bináris hálózatban.

A tömegspektrometriás analízisből kapott mennyiségi adatok (n_i, n_j) felhasználása lehetővé tette, hogy a bináris hálózat biztosította elméleti fehérje-fehérje interakciós lehetőségeket valós, mintaközpontú interakciós hálózatokká alakítsuk, ahol az élek súlya egyenes arányban áll a fehérjék mennyiségével, és fordítottan arányos az összes interakció lehetőségével az adott hálózatban/mintában. Abból kiindulva, hogy az n_i a P_i fehérje mintában jelen levő mennyiségére jellemző, az n_i/k_i arány az egy interakcióban résztvevő Pi fehérjék mennyiségére vonatkozik. Ezért a P_i és P_j fehérjék közötti interakciós sűrűség az n_i/k_i és n_j/k_j hányadossal jellemezhető.

Funkcionális alhálózatok létrehozása

Tekintve, hogy a String alkalmas a GO funkciók feltüntetésére és a fehérjék rendezésére a GO funkciók alapján, minden súlyozott $W_{t,s}$ hálózatban a fehérjéket egy (f) funkció címkével láttuk el, amely mutatta, hogy az adott funkcióhoz tartozik-e a fehérje vagy sem. A funkció szerinti besorolást a String segítségével végeztük, és azokat a String által felsorolt feldúsult GO funkciókat választottuk ki a további analízisekhez, ahol hálózatonként legalább 10 fehérje tartozott az adott funkcióhoz. Ily módon minden kiválasztott GO funkcióhoz egy $W^f_{t,s}$ kapcsolatmátrixszal jellemzett funkcionális alhálózatot ($F^f_{t,s}$) tudtunk definiálni. A funkcionális alhálózat mellett az adott GO funkcióval nem rendelkező fehérjéket, amelyek ily módon nem a funkcionális hálózathoz tartoznak, a „nem funkcionális" alhálózatba ($NF^f_{t,s}$) soroltuk. A fehérjék közötti interakciók esetében is ugyanezt a felosztást alkalmaztuk: a funkcionális hálózat elemei közötti kapcsolatokat funkcionális kapcsolatoknak, a nem funkcionális hálózat elemei közötti kapcsolatokat nem funkcionális kapcsolatoknak neveztük el. Előfordult olyan eset is, amikor a funkcionális alhálózatba tartozó fehérje a nem funkcionális alhálózat egyik elemével létesített kapcsolatot, ezeket a kapcsolatokat kereszt kapcsolatoknak neveztük el (c), és az ilyen kapcsolatokat tartalmazó hálózatot kereszt hálózatként definiáltuk.

4.11.2. A súlyozott hálózatok hálózati paramétereinek vizsgálata

Az általunk definiált súlyozott W(N,E) fehérje-fehérje interakciós hálózatok csomópontokat (N) és éleket (E) tartalmaznak. A csomópontok minden hálózat esetében a fehérjék (pl. Pi, Pj), míg az élek a fehérjék közötti interakciók (w_{ij}). Tekintve, hogy nincs adatunk arra vonatkozóan, hogy milyen az interakciók iránya, ezért a felrajzolható kapcsoltsági mátrix szimmetrikus: $w_{ij} = w_{ji}$.

A vizsgálatok során az alábbi hálózati paramétereket számoltuk ki:

A csomópontok (N) és az élek (E) száma:

N, Nf és Nn a teljes hálózatban, valamint a funkcionális, ill. nem funkcionális alhálózatban levő csomópontok (fehérjék) számát mutatja a következőképpen:

N = Nf + Nn.

E az élek (interakciók) számára vonatkozik a teljes hálózatban, az Ef és En az élek számát mutatja a funkcionális, ill. nem funkcionális alhálózatban, míg az Ec a funkcionális – nem funkcionális alhálózatba tartozó fehérjék közötti interakciókat mutatja az alábbi képlet szerint:

E = Ef + En + Ec.

Hálózati erősség (S): a hálózati erősséget a súlyozott élek összegeként definiáltuk:

$$S = \frac{1}{2} \sum_{\substack{i,j=1 \\ i \neq j}}^{N} w_{ij}$$

A képletet felhasználva kiszámítottuk a funkcionális (Sf) és nem funkcionális (Sn) alhálózatokra jellemző értékeket, valamint az

Sc = S – Sf – Sn

képlet felhasználásával a funkcionális-nem funkcionális keresztkötésekre jellemző (Sc) értékeket.

Élsűrűség (D): az élsűrűség azt mutatja meg, hogy a súlyozott hálózati erősség (S) hogyan aránylik a maximálisan telített hálózatéhoz:

$$D = \frac{S}{w_{max} \frac{N(N-1)}{2}} = \frac{2S}{w_{max} N(N-1)}$$

Az élsűrűséget meghatároztuk a teljes hálózatra (D), a funkcionális (Df), nem funkcionális (Dn), valamint a kereszt (Dc) alhálózatokra.

Él arány (R): a hálózati erősséget figyelembe véve kiszámoltuk az él arányt az alhálózatokra vonatkozóan. A funkcionális alhálózatok esetében az alábbi képletet alkalmaztuk:

$$R^f = \frac{S^f}{S}$$

A nem funkcionális hálózatok esetében az:

$$R^n = \frac{S^n}{S}$$

képlettel számoltunk.

Mivel az hálózati paraméterek eloszlása nem a Gauss-i vagy negatív binomiális eloszlást követte, ezért Wilcoxson tesztet [170] alkalmaztunk, hogy karakterizálhassuk a csoportspecifikus változásokat a 4 és 12 órás időpontokban. A p értékeket többszörös összehasonlításra korrigáltuk és FDR korrekciót alkalmaztunk [164].

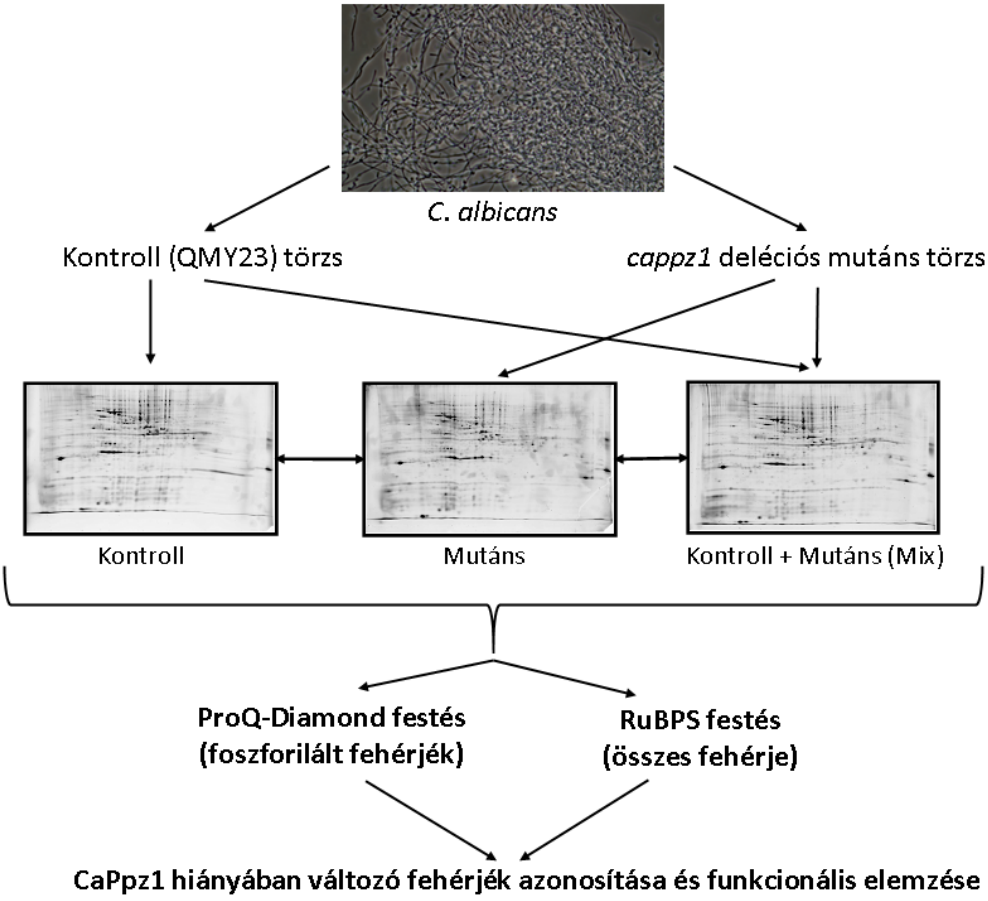
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

5.1. A *Candida albicans* PPZ1 szerepének vizsgálata kétdimenziós elektroforézis segítségével

Annak érdekében, hogy több információt nyerjünk arról, hogy a *cappz1* gén terméke hogyan fejti ki biológiai hatását, kétdimeziós elektroforézis segítségével megvizsgáltuk a *C. albicans* proteómját és foszfoproteómját kontroll (QMY23) és *cappz1* hiányos (*cappz1*) törzsekben. Arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen változások tapasztalhatók a *C. albicans* proteómjában a CaPpz1 protein hiányában. Tekintve, hogy a genomból eltávolított enzim egy foszfatáz, a foszforilációs állapot változását is megvizsgáltuk. Csoportonként három biológiai párhuzamossal dolgoztunk, és a foltok kivágásának megkönnyítésére egy preparatív Mix mintát is létrehoztunk, amelyet a kontroll és foszfatáz hiányos minták 1:1 arányú összekeverésével nyertünk.

A gélképek analízise során a 2. ábrán bemutatott protokollt használtuk. Először összehasonlítottuk a ProQ Diamonddal festett, foszforilált fehérjéket megjelenítő foltokat a kontroll és a mutáns törzsek esetében, ezután a ProQ Diamonddal festett géleket RuBPS-el újra festettük. A foszforilált fehérjék esetében végzett összehasonlítást elvégeztük a RuBPS-el festett géleken is, utána a géleket a Mix elnevezésű, RuBPS-el festett preparatív gélekkel hasonlítottuk össze annak érdekében, hogy a különbséget mutató foltokat pontosan beazonosíthassuk a Mix gélen, majd kivághassuk további elemzés céljából.

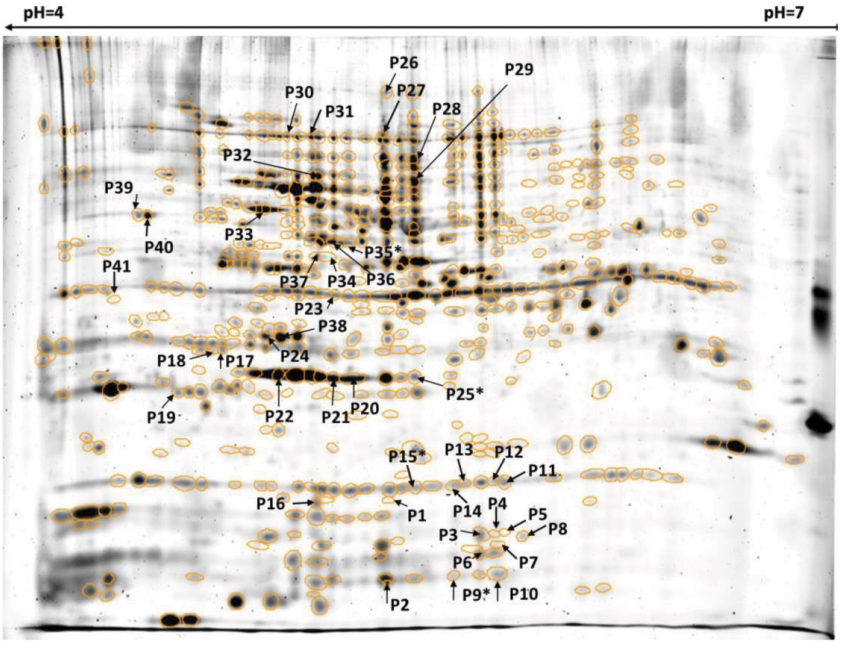
Tekintve, hogy a Mix gélek a mutáns és kontroll törzsek lizátumának 1:1 arányú keverékét tartalmazták, biztosították mindegyik vizsgált folt jelenlétét, így egyértelművé téve a foltok beazonosítását.



2. ábra. A kontroll és mutáns *C. albicans* törzsek elemzésekor alkalmazott stratégia.

A foszfoproteóm változásait tanulmányozva a ProQ Diamond festékkel megfestett gélek gélképét elemeztük. A kontroll és *cappz1* deléciós mutánst tartalmazó gélképekből létrehozott egyesített gélkép 473 foltot tartalmazott, amelyből 41 folt mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a kontroll és deléciós mutáns csoportok között (3. ábra).

A 41 foltot kivágtuk a Mix gélből, és fehérje analízisnek vetettük alá, de csak 27 folt esetében tudtunk a mintákban fehérjét azonosítani (1. táblázat). A (9), (15), (25) és (35) foltokban nem csak egy fehérjére jellemző szekvenciát azonosítottunk, ezért ezeket kizártuk a további elemzésekből.



3. ábra. A kontroll és mutáns törzsekből származó minták kétdimenziós elektroforézisével elválasztott, ProQ Diamond-al festett, foszforilált fehérjéket megjelenítő gélképekből nyert egyesített gélkép.
A számok azokat a foltokat mutatják, amelyek intenzitása statisztikailag szignifikáns módon különbözött a kontroll és mutáns gélképek között. A P elnevezés a ProQ Diamond festésre utal. A *-al jelölt foltok esetében nem csak egy fehérjét azonosítottunk az adott foltban, ezért ezeket kizártuk a további elemzésekből (l. szöveg).

1. táblázat. A CaPpz1 hiányában statisztikailag szignifikáns módon megváltozott intenzitású, ProQ Diamond-al festett foltokban azonosított foszforilált fehérjék

Folt száma	Fehérjenév	Fehérje azonosító	Génnév	Használt rövidítés	Változás mértéke (fold change)	p érték
22	40S riboszómális fehérje S0	O42817	*YST1*	Yst1	-2,79	0,041
4	40S riboszómális fehérje S7-A	Q5AJ93	*RPS7A*	Rps7A	-2,58	0,047
34	D-laktát dehidrogenáz	A0A1D8PJK5	*AIP2*	Aip1	-2,05	0,026
27	Elongációs faktor 3	P25997	*CEF3*	Cef3	-2,38	0,008
2	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz	Q5ALM6	*CPR3*	Cpr3	-2,59	0,018
7	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz	A0A1D8PKL0	*CYP5*	Cyp5	-2,02	0,0003

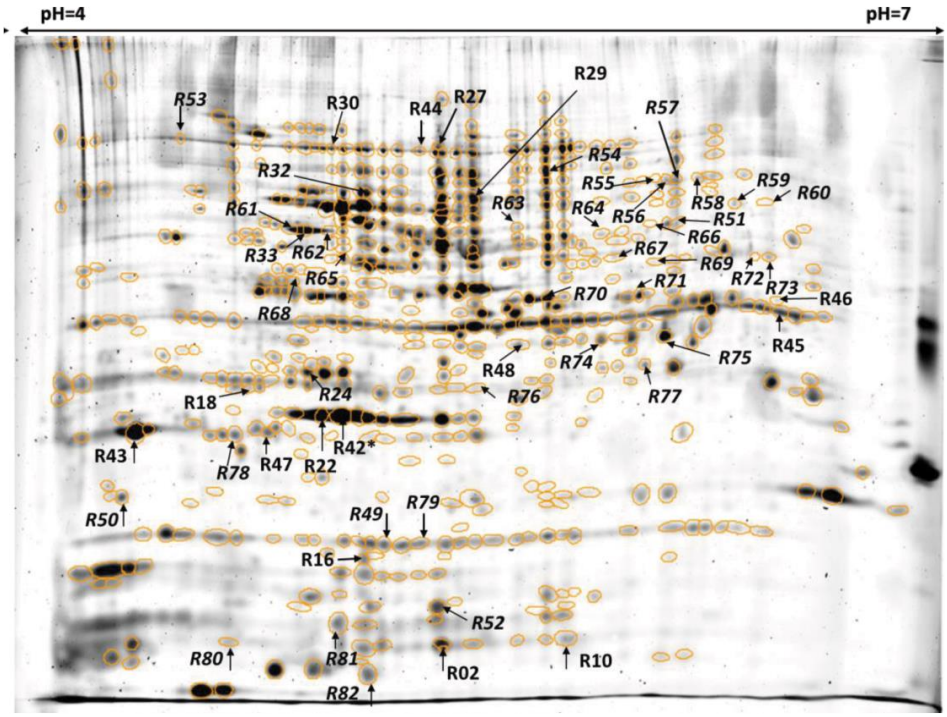
36	Cys-Gly metallodipeptidáz DUG1	Q5AKA5	*C5_04300C*	Dug1-szerű**	1,37	0,008
28	Elongációs faktor 2	Q5A0M4	*EFT2*	Eft2	2,79	0,008
3	Guanilát kináz	A0A1D8PNS0	*GUK1*	Guk1	-4,57	0,003
1	Inozin trifoszfát pirofoszfatáz	Q59N80	*HAM1*	Ham1	-2,79	0,034
32	Hő sokk fehérje SSA1	P41797	*HSP70*	Hsp70/Ssa1	-3,32	0,024
17	Deoxihipuzin hidroxiláz*	Q59Z14	*C2_07290W*	Lia1-szerű**	-3,09	0,019
18					-2,32	0,008
39	Rad23p	A0A1D8PGE3	*RAD23*	Rad23	1,95	0,006
10	60S riboszómális fehérje L20	A0A1D8PLC9	*RPL20B*	Rpl20B	-4,81	0,019
13	Riboszómális 60S alegység L9B fehérje	Q5AEN2	*RPL9B*	Rpl9B	-3,23	0,049
20	60S riboszómális fehérje P0*	A0A1D8PQS0	*RPP0*	Rpp0	2,56	0,046
21					2,63	0,005
23	ATP-függőt RNS helikáz eIF4A	P87206	*TIF1*	Tif1	-2,05	0,014
29	Transzketoláz 1	Q5A750	*TKL1*	Tkl1	1,78	0,045
16	Peroxiredoxin TSA1	Q9Y7F0	*TSA1*	Tsa1	-2,18	0,028
30	Ubikvitin aktiváló enzim E1*	Q5A2X3	*UBA1*	Uba1	1,90	0,006
31					-2,31	0,037

A táblázatban a foltok száma mellett az egyes foltokban tömegspektrométer segítségével azonosított fehérjék neve, a fehérje azonosítója, a génnév, a fehérje rövidítése, az intenzitás változás mértéke a kontrollhoz képest és a p érték van feltüntetve. A fehérje- és génneveket a UniProt adatbázis és a http://www.candidagenome.org/ alapján állapítottuk meg. A * arra utal, hogy ugyanazt a fehérjét két különböző foltban is azonosítottuk. A **-al jelölt neveket az *S. cerevisiae* ortológ neve alapján adtuk meg.

A Lia1-szerű, Rpp0, és Uba1 fehérjék mindegyike két foltban volt megtalálható, így összesen 20 egyedi fehérjét tudtunk azonosítani, amelyek foszforilációja statisztikailag szignifikáns módon változott meg a *cappz1* deléció hatására. A várakozásoknak megfelelően, a foszfatáz hiányában bizonyos fehérjék, mint a Dug 1-szerű fehérje, Eft2, Rad23, Rpp0, és Tkl1 esetében a foszforiláció növekedett. Az Uba1 fehérje esetében egy érdekes jelenséget figyelhettünk meg, ugyanis a foszforiláció mértéke növekedett a (30) foltban és ugyanakkor

csökkent a (31) foltban. Tekintve, hogy ezek a foltok többé-kevésbé azonos móltömeggel, de eltérő töltéssel rendelkező fehérjéket tartalmaznak (3. ábra), feltehetően ugyanannak a fehérjének a hiper-, ill. hipofoszforilált formáival állunk szemben. A többi 14 fehérje esetében a foszforiláció csökkent a CaPpz1 hiányában, ami egyéb indirekt hatásokra, vagy okokra utal.

A ProQ Diamonddal festett gélek elemzése után a gélekre RuBPS-el ráfestettünk. A kontroll és mutáns törzsekből származó kétdimenziós elektroforézissel elválasztott fehérjéket RuBPS festéssel megjelenítő gélképekből nyert egyesített gélképen 519 foltot detektáltunk (4. ábra), amelyből 52 mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a két csoport között. A több mint 1,5-szörös különbséget mutató 20 foltot kivágtuk a Mix gélből, a bennük lévő fehérjéket tripszinnel megemésztettük, majd tömegspektrometriás fehérjeazonosítást végeztünk.



4. ábra. A kontroll és mutáns törzsekből származó minták kétdimenziós elektroforézisével elválasztott, RuBPS-el festett, összes fehérjét megjelenítő gélképekből nyert egyesített gélkép.

A számok azokat a foltokat mutatják, amelyek intenzitása statisztikailag szignifikáns módon különbözött a kontroll és mutáns gélképek között. Az R elnevezés a RuBPS festésre utal. A *-al jelölt foltok esetében nem csak egy fehérjét azonosítottunk az adott foltban, ezért ezeket kizártuk a további elemzésekből. Azoknak a foltoknak, amelyek a ProQ Diamond festéssel is statisztikailag szignifikáns változást mutattak, a ProQ Diamond festéssel megállapított folt számát adtuk. Mivel nem minden szignifikáns foszforilációs változást mutató folt esetében detektáltunk a fehérje szinten is statisztikailag szignifikáns különbséget, ezért a számozás nem folytonos.

A fehérje azonosítás 15 folt esetében volt sikeres, ezekben a foltokban 14 fehérjét sikerült azonosítani, ugyanis a Cef3 elongációs faktor két foltban (27) és (44) is jelen volt (2. táblázat).

2. táblázat. A CaPpz1 hiányában statisztikailag szignifikáns módon megváltozott intenzitású, RuBPS-el festett foltokban azonosított fehérjék

Folt száma	Fehérjenév	Fehérje azonosító	Génnév	Használt rövidítés	Változás mértéke (fold change)	p érték
46	Adeniloszukcinát szintetáz	P0CH96	*ADE12*	Ade12	2,60	0,045
47	14-3-3 protein homológ	O42766	*BMH1*	Bmh1	-1,97	0,006
27	Elongációs faktor 3*	P25998	*CEF3*	Cef3	-3,63	0,020
44					-7,08	0,004
2	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz	Q5ALM6	*CPR3*	Cpr3	-2,20	0,006
43	Elongációs faktor 1-beta	A0A1D8PM35	*EFB1*	Efb1	-2,37	0,002
32	Hő sokk fehérje SSA1	P41797	*HSP70*	Hsp70/ Ssa1	-1,52	0,042
45	Izocitrát dehidrogenáz [NAD] alegység 1 (mitokondriális)	A0A1D8PEM5	*IDH1*	Idh1	2,76	0,017
18	Deoxihipuzin hidroxiláz	Q59Z14	*C2_07290W*	Lia1-szerű**	-1,59	0,019
10	60S riboszómális fehérje L20	A0A1D8PLC9	*RPL20B*	Rpl20B	-2,21	0,021
29	Transzketoláz 1	Q5A750	*TKL1*	Tkl1	1,84	0,012
16	Peroxiredoxin TSA1	Q9Y7F0	*TSA1*	Tsa1	-2,23	0,002
30	Ubikvitin aktiváló enzim E1	A0A1D8PKJ3	*UBA1*	Uba1	1,59	0,029
48	Protein URE2	Q96WL3	*URE2*	Ure2	1,95	0,0004
22	40S riboszómális fehérje S0	O42817	*YST1*	Yst1	-2,35	0,042

A táblázatban a foltok száma mellett az egyes foltokban tömegspektrométer segítségével azonosított fehérjék neve, a fehérje azonosítója, a génnév, a fehérje rövidítése, az intenzitás változás mértéke a kontrollhoz képest és a p érték van feltüntetve. A fehérje- és génneveket a UniProt adatbázis és a http://www.candidagenome.org/ alapján állapítottuk meg. A * arra utal, hogy ugyanazt a fehérjét két különböző foltban is azonosítottuk. A **-al jelölt nevet az *S. cerevisiae* ortológ neve alapján adtuk meg.

Megfigyeléseink szerint az Ade12, Idh1, Tkl1, Uba1 és Ure2 mennyisége növekedett a *cappz1* deléció hatására, míg a Bmh1, Cef3, Crp3, Efb1, Hsp70, Lia 1-like, Rpl20B, Tsa1 és Yst1 mennyisége csökkent.

Összesen tehát 25 olyan fehérjét sikerült azonosítani, amely mennyisége vagy foszforilációja (vagy mindkettő) statisztikailag szignifikáns változást mutatott a CaPpz1 hiányában. A foszfoproteineket megfestő festék segítségével megjelenített foszforilációban megfigyelt változásokat több okra vezethetjük vissza:

1) a foszforilációban nem történik változás, de a fehérje mennyiségében igen,

2) a fehérje mennyiségében nem történik változás, és a megfigyelt változás a foszforiláció megváltozott mértékének tudható be, vagy

3) változás történik mind a fehérje mennyiségében, mind a foszforilációjában.

Ahhoz, hogy a megfigyelt foszforilációs változások mögött meghúzódó folyamatokat megismerjük, összevetettük a foszforilációs profil és a fehérje mennyiségek változásait (3. táblázat).

3. táblázat. A CaPpz1 hiányában statisztikailag szignifikáns módon megváltozott intenzitású foltokban azonosított fehérjék csoportosítása

Fehérje	Folt száma	RuBPS festés		ProQ Diamond festés	
		Változás mértéke	p érték	Változás mértéke	p érték
I. csoport					
Ade12	46	**2,60**	**0,04**	NA	-
Bmh1	47	**-1,97**	**0,01**	NA	-
Efb1	43	**-2,37**	**0,00**	NA	-
Idh1	45	**2,76**	**0,02**	NA	-
Ure2	48	**1,95**	**0,0004**	NA	-
II. csoport					
Cef3*	44	**-7,08**	**0,004**	NA	-
	27	**-3,63**	**0,02**	**-2,38**	**0,008**
Cpr3	2	**-2,20**	**0,01**	**-2,59**	**0,018**
Hsp70/Ssa1	32	**-1,52**	**0,04**	**-3,32**	**0,024**
Rpl20B	10	**-2,21**	**0,02**	**-4,81**	**0,019**
Tkl1	29	**1,84**	**0,01**	**1,78**	**0,045**
Tsa1	16	**-2,23**	**0,002**	**-2,18**	**0,028**

Yst1	22	**-2,35**	**0,04**	**-2,79**	**0,04**
III. csoport					
Aip2	34	-1,25	0,51	**-2,05**	**0,03**
Cyp5	7	-2,62	0,09	**-2,02**	**0,0003**
Dug1-like	36	-1,25	0,51	**1,37**	**0,008**
Eft2	28	-1,11	0,69	**2,79**	**0,008**
Guk1	3	-1,84	0,13	**-4,57**	**0,003**
Ham1	1	1,34	0,46	**-2,79**	**0,03**
Rad23	39	-1,24	0,37	**1,95**	**0,006**
Rpl9B	13	-1,69	0,19	**-3,23**	**0,049**
Rpp0	20	1,74	0,15	**2,56**	**0,046**
	21	-1,08	0,82	**2,63**	**0,005**
Rps7A	4	-4,98	0,12	**-2,58**	**0,047**
Tif1	23	1,09	0,77	**-2,05**	**0,014**
IV. csoport					
Lia1- szerű*	17	-1,06	0,75	**-3,09**	**0,02**
	18	**-1,59**	**0,02**	**-2,32**	**0,008**
Uba1*	30	**1,59**	**0,03**	**1,90**	**0,006**
	31	1,20	0,56	**-2,31**	**0,04**

A foltokban azonosított fehérjék esetében a fehérjék száma mellett a kontrollhoz képest meghatározott intenzitás változás mértéke a RuBPS-el ill. a ProQ Diamond-al festett géleken. A változás mértéke mellett a p érték is fel van feltüntetve. A * arra utal, hogy az adott fehérjét két különböző foltban is azonosítottuk. A vastagon szedett számok a statisztikailag szignifikáns mértékű változást jelzik. NA – nincs adat.

Az összehasonlítás eredményeként négy csoportot tudtunk elkülöníteni:

I. csoport: azokat a fehérjéket soroltuk ide, amelyek mennyiségében változás történt, de a foszforilációjuk nem volt kimutatható;

II. csoport: azokat a fehérjéket soroltuk ide, ahol mind a fehérje mennyiségben, mind a foszforiláció mértékében történt változás;

III. csoport: azokat a fehérjéket soroltuk ide, ahol a fehérje mennyisége nem változott, viszont a foszforiláció igen;

IV. csoport: azokat a fehérjéket soroltuk ide, ahol a fehérje két foltban is kimutatható volt, de a változás a két foltban nem egy irányba mutatott.

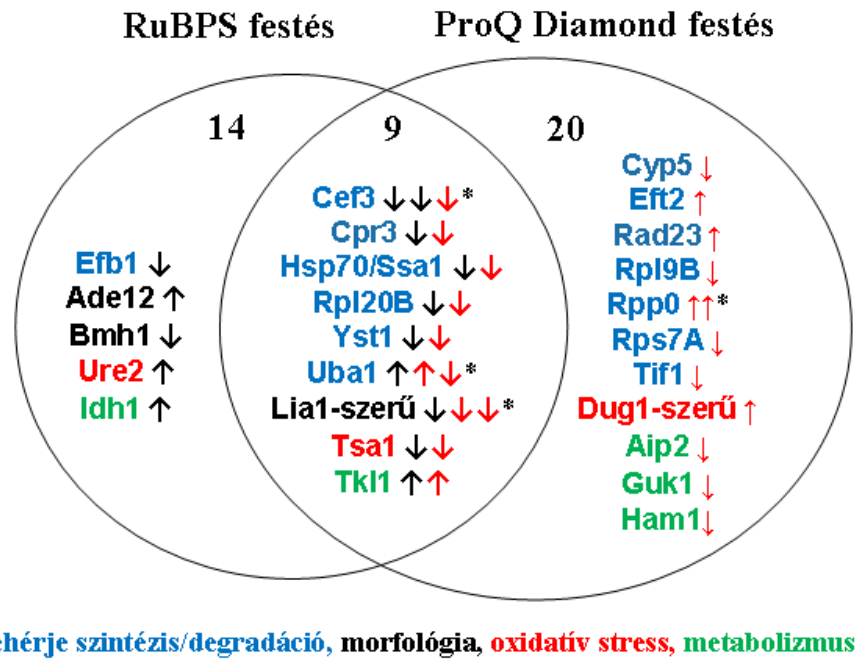
Ez utóbbi csoportba a Lia 1-szerű és az Uba1 fehérjét soroltuk. A Lia 1-szerű fehérje a (17) és (18) foltokban volt kimutatható. Mindkét foltban szignifikáns csökkenést mutatott a foszforilációja, viszont csak a (18) foltban mutatott szignifikáns csökkenést a fehérje

mennyisége. Az Uba1 fehérje mennyisége és foszforilációja szignifikáns növekedést mutatott a (30) foltban, ezzel szemben nem mutatott szignifikáns változást a fehérje mennyiségében a (31) foltban, ugyanakkor a foszforilációban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk.

A IV. csoportba sorolt fehérjék különböző foltokban tapasztalt eltérő viselkedésére feltehetően az a magyarázat, hogy különböző proteoformákat sikerült detektálni az egyes foltokban, amelyek eltérő módon szabályzódnak.

Kollaborációs partnerünk elvégezte az azonosított fehérjék génexpressziós szintű vizsgálatát, és azt találta, hogy a Cef3 és Rps7A fehérjék kivételével, ahol a deléció hatására növekedett a génexpresszió, nem volt statisztikailag szignifikáns a változás.

Elvégeztük a fehérjék funkcionális elemzését és az eredmények a 5. ábrán illetve a 4. táblázatban láthatók.



5. ábra. A CaPpz1 hiányában megváltozott mennyiségi vagy foszforiláltsági állapotú fehérjék.

A fehérjék GO szerinti funkcióját színkóddal jelöltük: a kék szín a fehérje szintézis vagy degradációban résztvevő fehérjéket, a fekete a morfológiai szereppel bíró fehérjéket, míg a piros az oxidatív stress, és a zöld a metabolizmusban szerepet játszó fehérjéket jelöli. A fekete nyílak a fehérje mennyiségi változásait, a piros pedig a foszforiláltsági állapot változásait mutatják. A * arra utal, hogy a jelzett fehérjét két különböző foltban is azonosítottuk. A két azonos színű nyíl a két különálló foltban észlelt változás irányát mutatja.

A fehérjék majdnem fele (12 fehérje) a fehérje szintézisben (1 transzkripciós iniciációs faktor, 3 transzlációs elongációs faktor, 5 riboszómális fehérje, 3 chaperon), kettő pedig a fehérjék proteoszómában történő degradációjában játszik szerepet. A fehérje szintézisben

szereppel bíró fehérjék mennyisége csökkent, míg az ubikvitin aktiváló enzim 1 (Uba1) mennyisége nőtt a deléciós mutáns *C. albicans* mintákban.

4. táblázat. A CaPpz1 deléció hatására változást mutató fehérjék funkcionális elemzése

C. albicans **fehérje**	***C. albicans*** **fehérje neve**	***S. cerevisiae*** **ortológ**	**Fehérje funkciója**
I. csoport			
Ade12	Adeniloszukcinát szintetáz	Ade12	adeniloszukcinát szintetáz aktivitás, *de novo* AMP bioszintézis, biofilm
Bmh1	14-3-3 protein homológ	Bmh2	foszfoszerin kötés, DNS replikációs origó kötés, Spider biofilm
Efb1	Elongációs faktor 1-beta	Efb1	transzlációs elongációs faktor aktivitás, guanil-nukleotid kicserélő faktor aktivitás, Spider biofilm
Idh1	Izocitrát dehidrogenáz [NAD] alegység 1 (mitokondriális)	Idh1	izocitrát dehidrogenáz (NAD+) aktivitás, szolubilis fehérje a hifában
Ure2	Protein URE2	Ure2	glutation peroxidáz aktivitás, glutation transzferáz aktivitás, foszfoprotein kötés, transzkripciós ko-represszor aktivitás
II. csoport			
Cef3	Elongációs faktor 3	Yef3	transzlációs elongációs faktor aktivitás, ATPáz aktivitás
Cpr3	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz	Cpr3	peptidil-prolil cisz-transz izomeráz aktivitás, protein folding, apoptózis, biofilm mátrix komponens
Hsp70/Ssa1	Hő sokk fehérje SSA1	Ssa4	chaperon, fel nem tekeredett fehérje kötése, Spider biofilm
Rpl20B	60S riboszómális fehérje L20	Rpl20B	riboszóma alkotó, transzláció, Spider biofilm
Tkl1	Transzketoláz 1	Tkl1	transzketoláz aktivitás, pentóz foszfát útvonal, szolubilis fehérje a hifában, biofilm mátrix komponens
Tsa1	Peroxiredoxin TSA1	Tsa1	tioredoxin peroxidáz aktivitás, fel nem tekeredett fehérje kötés, oxidatív stressz válasz, filament növekedés

Yst1	40S riboszómális fehérje S0	Rps0A	riboszóma alkotó / transzláció, Spider biofilm
III. csoport			
Aip2	D-laktát dehidrogenáz	Dld2	dehidrogenáz aktivitás, aktin kötés/ flow modell biofilm
Cyp5	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz	Cpr5	peptidil-prolil cisz-transz izomeráz aktivitás/ protein folding, biofilm mátrix komponens
Dug1-like	Cys-Gly metallodipeptidáz DUG1	Dug1	metallodipeptidáz aktivitás, omega peptidáz aktivitás, glutation katabolizmus, Spider biofilm
Eft2	Elongációs faktor 2	Eft1	transzlációs elongációs faktor aktivitás, GTPáz aktivitás
Guk1	Guanilát kináz	Guk1	guanilát kináz aktivitás, biofilm mátrix komponens
Ham1	Inozin trifoszfát pirofoszfatáz	Ham1	dezoxiribonukleozid-trifoszfát pirofoszfatáz aktivitás
Rad23	Rad23p	Rad23	károsodott DNS kötés, hozzájárul az amidáz aktivitáshoz, proteoszóma kötés, fehérje kötés, ubikvitin kötés
Rpl9B	Citoszólikus riboszómális fehérje L9-szerű	Rpl9B	riboszóma alkotó, transzlációs, Spider biofilm
Rpp0	60S riboszómális fehérje P0	Rpp0	riboszóma alkotó, rRNS kötés, transzláció, Spider biofilm
Rps7A	40S riboszómális fehérje S7-A	Rps7A	riboszóma alkotó, transzláció, Spider biofilm
Tif1	ATP-függő RNS helikáz eIF4A	Tif2	transzlációs iniciációs faktor aktivitás, ATP-függő RNS helikáz aktivitás, Spider biofilm
IV. csoport			
Lia1-like	Deoxihipuzin hidroxiláz	Lia1	deoxihipuzin monooxigenáz aktivitás, filament növekedés, Spider biofilm
Uba1	Ubikvitin aktiváló enzim E1	Uba1	ubikvitin aktiváló enzim aktivitás

A táblázatban a négy csoportba sorolt változást mutató *C. albicans* fehérje rövidítése mellett feltüntettük a fehérje nevét, a *S. cerevisiae* ortológ rövidítését és a fehérje funkcióját. A neveket, ill. a funkciókat a http://www.candidagenome.org/, http://www.uniprot.org/, és http://www.yeastgenome.org/ adatbázisokból gyűjtöttük ki.

Eredményeink arra utalnak, hogy a CaPpz1 deléciónak gátló hatása van a fehérje szintézisre. Ehhez hasonló eredményeket kaptak más kutatócsoportok *S. cerevisiae*

vizsgálatával, ahol kimutatták, hogy a PPZ1-nek szerepe van a transzláció szabályozásában és az EF1Ba/Efb1 transzlációs elongációs faktor a PPZ1 szubsztrátja [171,172]. A *C. albicans*-ban az Efb1 ortológja statisztikailag szignifikáns csökkenést mutatott a mutáns mintákban, de a foszforilált formáját nem tudtuk kimutatni a ProQ Diamond festéssel. A Cef3 elongációs faktor esetében a fehérje mennyiségének és a foszforiláció mértékének a csökkenését mutattuk ki a foszfatáz hiányos mintákban. Az elongációban résztvevő többi fehérje foszforilációja eltérő módon változott: az Eft2, Rad32, és Rpp0 esetében a foszforiláció nőtt, míg a Rpl6B, Rps7A, Tif1 és Uba1 egyik proteoformája esetében a foszforiláció csökkent a deléció hatására. Eredményeink arra utalnak, hogy az Eft2, a még nem karakterizált Rad32, a 60S riboszómális fehérje Rpp0, a Tif1 és az Uba1 egyik proteoformája, direkt szubsztrátjai lehetnek a CaPpz1-nek. Ismert tény, hogy az Eft2 az antifungális szordarinok támadáspontja [173], amelyek a fehérje szintézist gátolják, valamint az Eft2 hasonló szereppel bír, mint az *S. cerevisiae*-ben található ortológjai, ugyanis az Eft2 helyettesíteni tudta funkciójukat az *ef1*, *efb2* dupla mutáns *S. cerevisiae* törzsekben [174]. Kollaborációs partnereink Motif scan analízissel számos lehetséges foszforilációs helyet azonosítottak a Eft2 és Rpp0 fehérjében. Ezek az adatok megmagyarázzák a különböző foltokban megjelenő fehérjék eredetét is, ugyanis az eltérő foszforiláltság eltérő töltéshez és eltérő izoelektromos ponthoz vezet. Az eltérő foszforiláltsági állapot egy kismértékű móltömeg-változást is előidéz, de a fehérje tömegéhez képest ez elenyésző és a gél feloldó képessége nem teszi lehetővé a foszforiláció-defoszforilációból adódó tömegkülönbség alapján az elválasztást.

Eredményeink alapján a CaPpz1 foszfatáz a *C. albicans*-ban módosítja a fehérje szintézist. Mivel mindkét feltételezett szubsztrát, az Eft2 transzlációs faktor és az Rpp0 riboszómális fehérje a transzlációban játszik szerepet, elképzelhető, hogy a foszfatáz ezek révén fejti ki hatását (vö. 6. ábra). A Rad32-szerű fehérje is szerepet játszhat a folyamatban, mint CaPpz1 szubsztrát, de mivel *Candida*-ban még nem karakterizálták, szerepét nem tudtuk irodalmi adatok alapján tárgyalni.

A CaPpz1 oxidatív stresszben betöltött szerepével megegyezően 3 oxidatív stresszel kapcsolatos fehérje mennyiségében és/vagy foszforilációjában figyeltünk meg változásokat. Az Ure 2 az I. csoportba tartozik, foszforilációja nem változott, míg fehérje mennyisége szignifikánsan nőtt a mutáns törzsben. A Tsa 1 a II. csoportba tartozik, mind mennyisége, mind foszforilációja csökkent, míg a Dug 1-szerű Cys-Gly metallopeptidázt a III. csoportba soroltuk, mivel mennyisége nem változott szignifikáns mértékben, de a foszforilációja nőtt a deléció hatására. Funkciójukat tekintve, az Ure 2 glutation peroxidáz aktivitással rendelkezik,

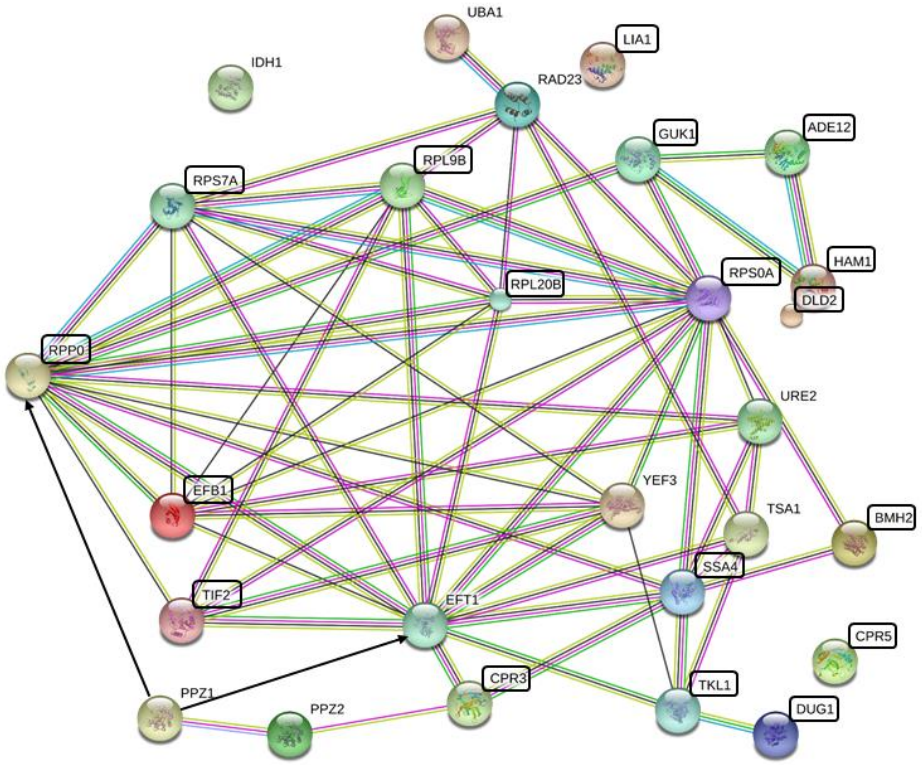
a Dug 1-szerű Cys-Gly metallopeptidáznak a glutation metabolizmusában van szerepe, míg a Tsa 1 tioredoxin peroxidáz aktivitással bír (4. táblázat).

Ugyanakkor, a CaPpz1 foszfatáz hiánya következtében öt metabolikus enzim változását is megfigyeltük (5. ábra). A mitokondriális izocitrát dehidrogenáz Idh1 és a citoszólikus transzketoláz Tkl1 mennyisége nőtt, míg a guanilát kináz Guk1, a D-laktát dehidrogenáz Aip2 és az inozin trifoszfát pirofoszfatáz Ham1 foszforilációja csökkent a mutáns törzsben.

A foszfatáz hiányában nem várt fehérje foszforiláció csökkenés feltehetően a *CaPPZ1* gén és a MAPK útvonal közötti pozitív interakciónak [175], vagy a CaPpz1 és a Sit4 protein foszfatáz közötti ellentétes genetikai interakciójának [176] köszönhető. A metabolikus enzimek esetében megfigyelt változásokat értelmezve fontos megemlíteni, hogy egy új hipotézis szerint az egyébként citoszólikus enzimek, riboszómális fehérjék vagy chaperonok, amint a sejt felszínére kerülnek, más „moonlighting" funkciókat fognak ellátni [177]. Az általunk azonosított fehérjék közül hármat, a Hsp70/Ssa1, Tsa1 és Tkl1-t korábban már kimutatták a *C. albicans* felszínén [178,179].

Ezzel párhuzamosan 3 olyan fehérje mennyiségében detektáltunk változást, amelyek a *C. albicans* sejtek morfológiai transzformációjában játszanak szerepet. Az adeniloszukcinát szintáz Ade12 mennyiségének növekedését, a 14-3-3 homológ Bmh1 és a Lia-szerű deoxihipuzin hidroxiláz mennyiségének csökkenését figyeltük meg CaPpz1 hiányában. Ezek az adatok összhangban állnak más munkák eredményeivel, amelyek a Spider biofilm képződés során változó géneket vizsgálták [180], és felvetették annak a lehetőségét, hogy a CaPpz1 foszfatáznak a biofilm képződés során lehet jelentősége. Miután kollaborációs partnerünk megvizsgálta a statisztikailag szignifikáns változást mutató fehérjék funkcióját, azt találta, hogy a 25 fehérjéből 17 szerepet játszik a biofilm képződésében (4. táblázat). Ez alapján, a kollaborációs partnerünk megvizsgálta a vad és mutáns *C. albicans* törzsek biofilm képző képességét. Eredményeik szerint a szelektív Spider médiumban a CaPpz1 hiányos törzsek jobb biofilm képző tulajdonságokkal rendelkeztek, mint a kontroll, vad törzsek, ami arra utal, hogy a laboratóriumi kísérleti körülmények között a CaPpz1-nek valóban szerepe van a biofilm képződésében.

Ahhoz, hogy jobban megérthessük a CaPpz1 hiányában bekövetkező proteóm szintű változásokat, elkészítettük a változást mutató fehérjék interakciós hálózatát. Tekintve, hogy a *Candida* interakciós hálózatát vizsgálataink idején még nem dolgozták ki alaposan, a *S. cerevisiae* ortológokat használtuk fel a String segítségével történő hálózat rajzolásra és elemzésre (6. ábra).



6. ábra. A CaPpz1 deléció hatására változást mutató *C. albicans* fehérjék intereakciós hálózata.

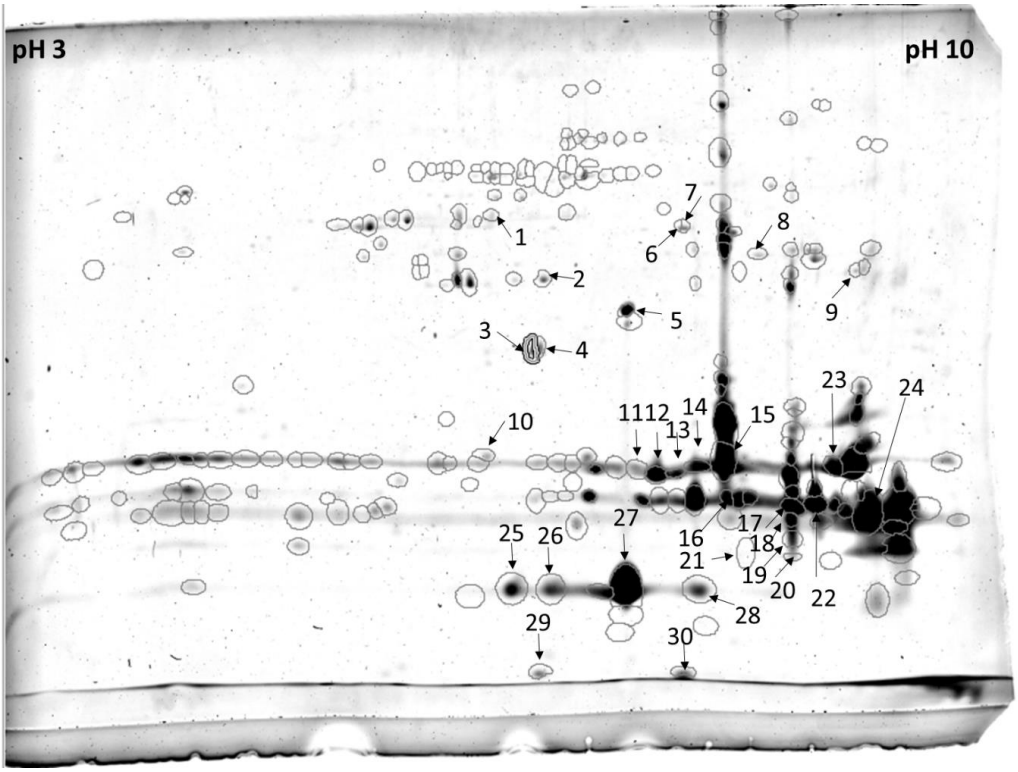
A fehérje-fehérje interakciós hálózat elkészítéséhez a változást mutató *C. albicans* fehérjék *S. cerevisiae* ortológjait és a két foszfatáz paralógot, a Ppz1 és Ppz2 fehérjéket használtuk. A hálózat a String segítségével készült, szokásos beállításokkal. A golyók a fehérjéket, míg a köztük lévő vonalak a fehérje-fehérje interakciókat jelentik. Fekete kerettel azokat a fehérjéket emeltük ki, amelyeknek szerepük van a biofilm képződésében. A fekete nyilak a két potenciális Ppz1 szubsztrát fehérjére mutatnak.

A riboszómális fehérjék (Rpp0, Rps7A, Rpl9B, Rpl20B, Rps0A) egy szorosan kapcsolt csoportot, klasztert alkotnak, amely szorosan kapcsolódik a négy transzlációs faktorhoz (Efb1, Eft1, Yef3, Tif2), a Rad23-n keresztül az Uba1 fehérjéhez és a Guk1 fehérjén keresztül a Guk1-Ade12-Ham1 nukleotid metabolizmusban szerepet játszó enzim triádhoz. Az Ssa4, Tsa1 és Crp3 chaperonok és a Bmh2 és Ure2 fehérjék is kapcsolatot létesítenek a riboszómális és a transzlációs faktorok klaszterével. A Dug1 metalloproteináz a transzketoláz Tlk1-n keresztül kapcsolódik a hálózathoz. Érdekes megfigyelni, hogy a metabolikus enzimek nem kapcsolódnak a hálózat többi eleméhez, valószínűleg más módon, pl. a metabolikus fluxus módosításával járulnak hozzá a mutáns sejtekben megfigyelt változásokhoz.

Feltételezésünk szerint a Ppz1 foszfatáz a hálózatban két központi szereppel bíró fehérjét, az Eft1 transzlációs faktor és Rpp0 riboszómális fehérjék ortológjait képes defoszforilálni, így érthető a CaPpz1 transzlációban betöltött szerepe. Ezen túl a CaPpz1-nek egy új funkcióját sikerült kideríteni: elsőként igazoltuk, hogy szerepe van a biofilm képződésében. Ez egy fontos felfedezés, ugyanis a gomba adhéziója a különböző felületekhez az orvosi eszközök szennyezését okozhatja, és a biofilm speciális elrendeződése miatt a felületen ható gombaölő szerek nem jutnak el a mélyebb rétegekbe, ami lehetetlenné teszi a teljes dekontaminációt. A biofilm képződésében szerepet játszó fehérjék nagy része a hálózatelemzés szerint direkt kapcsolatban áll az Eft1 és/vagy a Rpp0 Ppz1 szubsztrátokkal, így magyarázható, hogy a CaPpz1 hiánya hogyan kapcsolódik a fehérje szintézishez és a biofilm képződéséhez. Ezen kívül egyes metabolikus enzimek, akár különállók, akár a hálózathoz kapcsolódnak, részt vehetnek a biofilm képzésében metabolikus vagy más funkcióik révén. Mivel a teljes hálózatelemzés a *S. cerevisiae* ortológokkal történt, további vizsgálatok szükségesek a fenti hipotézis megerősítésére. Ugyanakkor fontos azt is szem előtt tartani, hogy a Spider táptalajon megfigyelt változások nem biztos, hogy fiziológiásan is jelentősek, ami tovább növeli a megerősítő vizsgálatok szükségességét. Mindenesetre eredményeink mutatják, hogy a kétdimenziós elektroforézissel nyert proteomikai és foszfoproteomikai eredmények hogyan segíthetnek új lehetséges foszfatáz szubsztrátok, és új lehetséges biológiai funkciók (biofilm képzés) azonosításában.

5.2. Proliferatív vitreoretinopátia tanulmányozása kétdimenziós elektroforézis segítségével

A PVR patogenezisének tanulmányozására egy egér modellt [181] alkalmazott a kollaborációs partnerünk. Az egerekben intravitreális diszpáz befecskendezéssel a PVR-hez morfológiailag hasonló állapotot idézett elő. A PVR-szerű állapot megjelenését OCT (Optical Coherence Tomography) vizsgálattal bizonyították, majd a diszpáz kezelést követő 14. napon, amikor igazoltan megjelentek a PVR-re jellemző elváltozások, az egerek szemét eltávolították és az üvegtestet izolálták. Az izolált üvegtest fehérje profilját kétdimenziós elektroforézis segítségével vizsgáltuk és összehasonlítottuk a kontrolként szolgáló, fiziológiás sóoldattal kezelt egerek üvegtesti mintáiban tapasztalt fehérje profillal. Mindkét csoport esetében három biológiai párhuzamossal dolgoztunk, és a három gél átlag értékeit vettük figyelembe a kvalitatív és kvantitatív változások elemzésekor. A Delta 2D szoftver által létrehozott egyesített gélképen 698 foltot tudtunk detektálni (7. ábra).



7. ábra. A kontroll és diszpáz-kezelt üvegtesti minták kétdimenzós elektroforézisével elválasztott fehérjéket megjelenítő gélképekből nyert egyesített gélkép.
A számok azokat a foltokat mutatják, amelyek intenzitása statisztikailag szignifikáns módon különbözött a kontroll és diszpáz-kezelt gélképek között.

A 698 foltból 30 mutatott statisztikailag szignifikáns mértékű ($p<0,05$) intenzitás-változást a két csoport között. Ezeket a foltokat kivágtuk és a foltokban levő fehérjéket tömegspektrométer segítségével azonosítottuk (5. táblázat).

5. táblázat. A kontroll és diszpáz-kezelt üvegtesti minták között statisztikailag szignifikáns módon különböző intenzitású foltokban található fehérjék

Folt száma	UniProt azonosító	Fehérje neve	Azonosított peptidek száma	Változás mértéke a kontroll-hoz képest	p érték
1	P99024	Tubulin beta-5 lánc	6	- 0,23	0,03
2	Q04447	Kreatin kináz B	15	- 0,27	0,03
3	P62874	Guanin nukleotid kötő fehérje G(I)/G(S)/G(T) beta-1alegység	11	- 0,11	0,02
4	P62874	Guanin nukleotid kötő fehérje G(I)/G(S)/G(T) beta-1alegység	8	- 0,08	0,03

5	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	7	- 0,23	0,02
6	O35737	Heterogén nukleáris ribonukleoprotein H	4	- 0,09	0,049
7	O35737	Heterogén nukleáris ribonukleoprotein H	3	- 0,11	0,04
8	P17182	Alfa-enoláz	11	- 0,21	0,049
9	P15105	Glutamin szintetáz	8	- 0,41	0,049
10	P14602	Hősokk fehérje beta-1	5	- 0,32	0,02
11	P02525	Beta-krisztallin A1	3	- 0,17	0,01
	P62696	Beta-krisztallin B2	3		
12	P02525	Beta-krisztallin A1	3	- 0,37	0,046
	P62696	Beta-krisztallin B2	3		
13	P62696	Beta-krisztallin B2	4	- 0,46	0,01
	P02525	Beta-krisztallin A1	3		
	Q9JJV1	Beta-krisztallin A2	2		
14	P02525	Beta-krisztallin A1	3	- 0,37	0,04
	P62696	Beta-krisztallin B2	3		
15	P02525	Beta-krisztallin A1	4	- 0,41	0,01
16	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	7	- 0,51	0,02
	Q9JJV1	Beta-krisztallin A2	4		
17	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	8	- 0,50	0,001
	P02525	Beta-krisztallin A1	5		
18	P02525	Beta-krisztallin A1	5	- 0,32	0,04
	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	4		
19	P02525	Beta-krisztallin A1	3	- 0,25	0,01
20	P02525	Beta-krisztallin A1	3	- 0,11	0,03
21	P23927	Alfa-krisztallin B lánc	2	0,27	0,02
22	O35486	Beta-krisztallin S	2	- 0,34	0,01
	P04344	Gamma-krisztallin B	2		
23	P62696	Beta-krisztallin B2	7	- 0,36	0,0002
24	P2392	Alfa-krisztallin B lánc	8	- 0,44	0,03
	O35486	Beta-krisztallin S	7		
	Q61597	Gamma-krisztallin C	5		
25	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	9	- 047	0,03
26	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	9	- 0,28	0,02
27	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	10	- 0,49	0,02
28	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	10	- 0,25	0,02
29	Q9D1U0	Griffin	3	- 0,53	0,003
30	Q05816	Zsírsav kötő fehérje	4	- 0,25	0,004

A táblázatban a foltok száma mellett az egyes foltokban tömegspektrométer segítségével azonosított fehérjék neve és UniProt azonosítója, az azonosításhoz használt egyedi peptidek száma, az intenzitás változás mértéke (fold change) a kontrollhoz képest és a p érték van feltüntetve.

A (11), (12), (13), (14), (16), (17), (18), (22) és (24) számú foltok nem csak egy fehérjét tartalmaztak. A foltban azonosított peptid szekvenciák száma alapján feltehetően nagyjából

ugyanabban a mennyiségben voltak jelen az azonosított fehérjék az egyes foltokban (5. táblázat), emiatt nem tudtuk eldönteni, hogy a szignifikáns mennyiségi változást mely fehérje okozta. Így ezeket a foltokat és a bennük található fehérjéket kihagytuk a további kvantitatív vizsgálatokból.

A legnagyobb változást a krisztallinok esetében tapasztaltuk, ugyanis 19 folt tartalmazott valamilyen krisztallin variánst. Nyolc foltban találtunk alfa A krisztallint és megállapítottuk, hogy a mennyiségük csökkent a diszpáz kezelés hatására. Ez alól kivételt az alfa B krisztallin jelentett, amelynek mennyisége emelkedett a kezelés eredményeként.

A krisztallinok chaperonként működnek és védő szerepük van [182]. Kimutatták, hogy mennyiségük megnövekszik intenzív sejtosztódás hatására. A krisztallin alfa B-t megtalálták exoszómákban, mennyiségét emelkedettnek találták nyelvdaganatban, és antiapoptotikus szerepét mutatták ki a retina epitél sejtek stressz indukálta apoptózisa során [183,184].

Eredményeink igazolták a szakirodalomban közölt adatokat. Az általunk tanulmányozott modellben feltehetően a PVR-t megelőző retina leválás okozta stressz hatására fellépő apoptózis, illetve a PVR-re jellemző proliferatív állapotok markere lehet az emelkedett alfa B krisztallin. Az nem ismert, hogy mennyiségének növekedése okozza-e az RPE sejtek apoptózisának gátlását kaszpáz 3 vagy 6 gátlásával [185], így elbillentve az egyensúlyt az RPE sejtek proliferációja irányába, vagy a proliferáló RPE sejtek termelnek több krisztallint, ami stimulálja és fenntartja az RPE sejtek proliferációját [183]. Tulajdonképpen mindkét esetben ugyanaz a megfigyelhető változás: megnő az RPE sejtek proliferációja.

Tekintve, hogy nagyon sok foltban találtunk alfa A krisztallint, feltehetően az alfa A krisztallin kiterjedt poszt-transzlációs módosításokat szenved. Így magyarázható, hogy nyolc foltban azonosítottuk ezt a fehérjét. A (25), (26), (27), (28) foltokban megfigyelhető alfa A krisztallinok más izoelektromos ponttal, de nagyjából azonos móltömeggel rendelkeznek. Ezzel szemben a (17) és (18) foltokban jelen levő alfa A krisztallin izoelektromos pontja azonos, móltömege különböző. Az (5) és (16) foltokban azonosított alfa A krisztallinok a gélkép alapján mind izoelektromos pont, mind móltömeg szerint különböznek egymástól. Az iszkémia-reperfuzió során fellépő oxidatív stressz hatására megfigyelték a krisztallinok mennyiségének és poszt-transzlációs módosításainak a megváltozását [185]. Az alfa A krisztallint érintő jelentős poszt-transzlációs módosítások pontos hátterét a kísérleti rendszerünkben nem ismerjük. Feltételezhetjük, hogy ez valamilyen módon a MMP-ok,

pontosabban a diszpáz hatásával hozható összefüggésbe, de erre vonatkozó kísérleti bizonyítékokkal nem rendelkezünk.

Az α, β és γ krisztallinok mennyiségének növekedését megfigyelték a retinában sérülés után [186–188]. A mi rendszerünkben az egyes krisztallinok szintje csökkent. A krisztallinokon kívül alfa enoláz, béta 1 hő sokk fehérje, G-fehérje, glutamin szintetáz, griffin, heterogén nukleáris ribonukleoprotein, kreatin kináz B, tubulin, és zsírsav kötő fehérje (Fabp5) volt jelen a foltokban. Ezen fehérjék szintje szintén csökkent a diszpáz kezelés következtében.

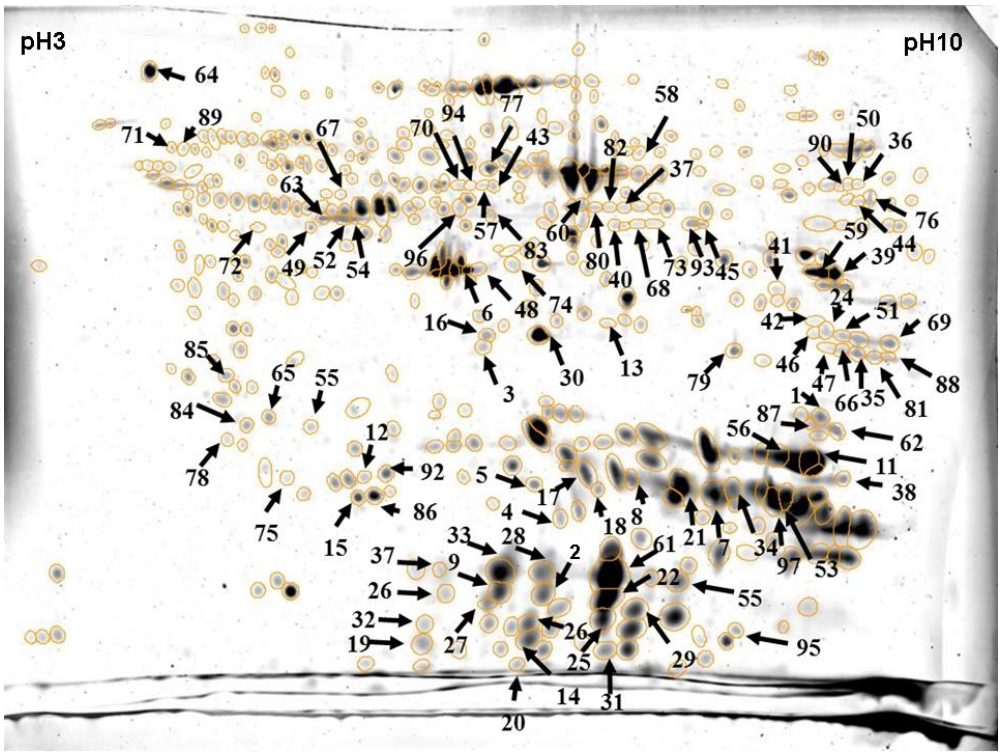
Szakirodalomban közölt adatok alapján nyúlban előidézett PVR-ben kollagén I α1, α1-antiproteináz és peroxiredoxin 2 kifejeződésének csökkenését figyelték meg, valamint különböző krisztallin formák, transzferrin és MMP3 kifejeződésének növekedését tapasztalták [189,190]. Az enoláz 1, vimentin, albumin és prohibitin szintje nőtt, míg a tubulin béta 2C, fruktóz-biszfoszfát aldoláz A és más fehérjék szintje csökkent retina leválást követően [191]. Fontos kiemelni, hogy ezen modellek esetében a PVR indukciója nem diszpázzal, hanem műtéti retina leválasztással vagy mechanikai sérüléssel történt, a vizsgált minta retina vagy üvegtest volt, és az állatmodell minden esetben nyúl volt [189–191].

Az általunk azonosított fehérjék jelentős része megtalálható a humán mintákban is [192]. PVR-ben szenvedő betegek és balesetben sérültek retináját vizsgálva azt találták, hogy a különböző krisztallinok csak a kontroll mintákban vannak jelen [193]. Diabéteszes retinopátiában szenvedő betegek üvegtestét vizsgálva az alfa A krisztallin, béta S krisztallin, béta tubulin és kreatin kináz B mennyiségének csökkenését figyelték meg [194]. Ezek az eredmények az általunk kapott eredményekkel együtt arra utalnak, hogy az említett fehérjéknek szerepük lehet a proliferatív állapotok létrejöttében, de pontos funkciójuk, valamint az, hogy kiváltói, avagy következményei a proliferációnak, nem ismert.

Ahhoz, hogy jobban megértsük a PVR hatásmechanizmusát, és kihasználjuk az egérmodell adta lehetőségeket egy olyan knock-out (KO) egeret alkalmaztak kollaborációs partnereink, amely nem tartalmazta a transzglutamináz 2 (TG2) enzimet. Intézetünkben a Fésüs László akadémikus úr által vezetett munkacsoport hosszú ideje foglalkozik a TG2 szerepének és működésének tanulmányozásával. Tekintve, hogy kimutatták a TG2 szerepét bizonyos szembetegségekben [195–198], jelenlétét a PVR membránban [199], és figyelembe véve a Fésüs munkacsoport által felhalmozott széleskörű technikai és elméleti tudást, KO egérmodellként kollaborációs partnereink a TG2 hiányos egerek vizsgálata mellett döntöttek.

Az előzőekben ismertetett diszpáz kezelést elvégezték TG2 hiányos egereken is, így egy olyan vizsgálati rendszert kaphattunk, amely kiváló lehetőséget biztosít többféle hatás

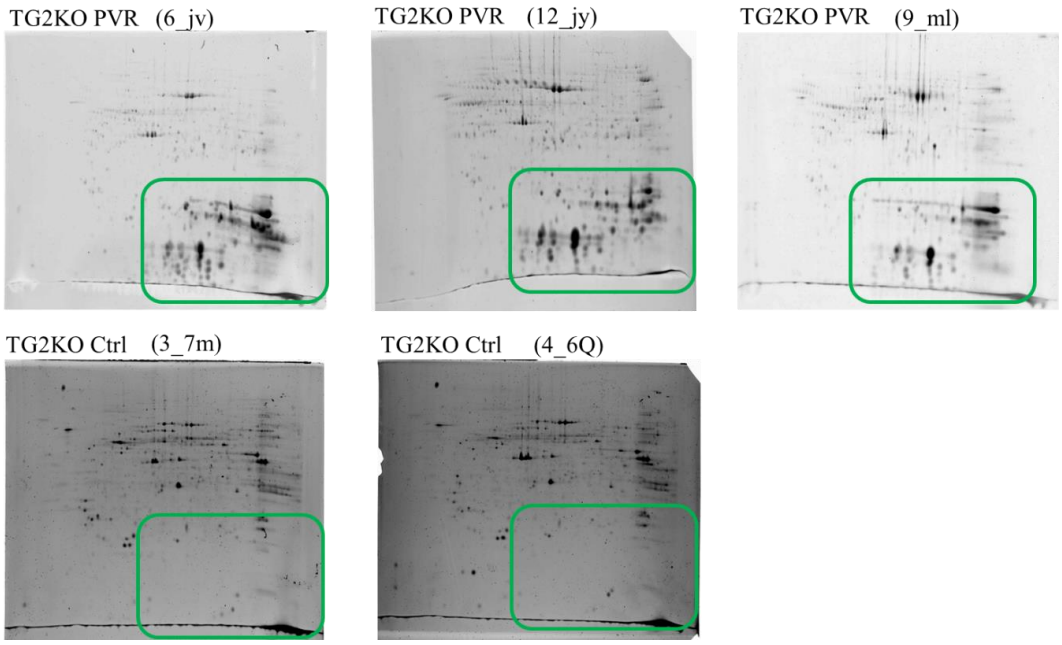
együttes tanulmányozására. A normál egerek üvegtestének vizsgálatával egyidejűleg elvégeztük a TG2 KO egerek üvegtesti mintáinak kétdimenziós elektroforézisét is (8. ábra).



8. ábra. A kontroll és diszpáz-kezelt TG2 KO egerekből származó üvegtesti minták kétdimenzós elektroforézisével elválasztott fehérjéket megjelenítő gélképekből nyert egyesített gélkép.
A számok azokat a foltokat mutatják, amelyek intenzitása statisztikailag szignifikáns módon különbözött a kontroll és diszpáz-kezelt gélképek között.

A TG2 KO egerekből származó minták gélkép elemzése során létrehozott egyesített gélkép 866 foltot tartalmazott, ebből 97 mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a két állapot között. 64 folt esetében csökkenést, míg 33 folt esetében növekedést tapasztaltunk a foltok intenzitásában diszpáz kezelés hatására.

Bizonyos foltok a bázikus és kis móltömegű fehérjéket tartalmazó régióban csak a diszpázzal kezelt mintákból származó gélképeken voltak jelen, mutatva, hogy a TG2 hiányában jelentős változások történnek diszpáz hatására (9. ábra).



9. ábra. A bázikus, kis móltömegű régió az egyes gélképeken.
A zöld téglalap a bázikus, kis móltömegű régiót jelöli az egyes gélképeken. A gélképek felett a minta típusa és a gél azonosítója van feltüntetve.

A foltok közül a legnagyobb mértékű változást mutató 37 foltot kivágtuk és tömegspektrometriás analízis segítségével azonosítottuk a bennük levő fehérjéket (6. táblázat).

6. táblázat. A kontroll és diszpáz-kezelt TG2KO egerek üvegtesti mintái között statisztikailag szignifikáns módon különböző intenzitású foltokban található fehérjék

Folt száma	UniProt azonosító	Fehérje	Azonosított peptidek száma	Változás mértéke a kontrollhoz képest	p érték
1	P99024	Tubulin beta-5 lánc	6	-5,57	0,003
	P68373	Tubulin alfa-1C lánc	3		
3	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	9	76,45	0,01
7	P70333	Heterogén nukleáris ribonukleoprotein H2	2	-9,51	0,003
14	P09528	Ferritin H lánc	3	5,82	0,04
15	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	3	-6,28	0,005
16	Q8BFZ3	Beta-aktin-szerű fehérje 2	4	-7,01	0,01
18	P02525	Beta-krisztallin A1	4	41,04	0,05
19	P02525	Beta-krisztallin A1	3	5,13	0,01
20	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	3	49,71	0,01
26	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	7	128,66	0,02

27	P02525	Beta-krisztallin A1	3	4,25	0,03
31	P34057	Rekoverin	2	-18,9	0,02
33	P16125	L-laktát dehidrogenáz B lánc	2	-7,59	0,007
34	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	8	106,31	0,005
38	Q61171	Peroxiredoxin-2	3	-7,51	0,001
42	Q61838	Alfa-2-makroglobulin	2	-20,54	0,0002
44	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	7	196,24	0,006
47	P29391	Ferritin L lánc 1	6	56,65	0,04
48	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	2	9,03	0,01
49	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	3	17,14	0,02
	Q9D1U0	Griffin	2		
50	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	3	8,92	0,02
51	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	6	83,15	0,003
55	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	4	31,65	0,03
60	P16858	Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz	3	-13,74	0,0002
64	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	5	42,28	0,0005
67	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	8	18,79	0,02
70	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	5	22,95	0,0005
74	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	5	88,39	0,03
77	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	3	31,74	0,005
83	P62880	Guanin nukleotid kötő fehérje G(I)/G(S)/G(T) beta-2 alegység	3	-16,39	0,0001
84	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	5	12,72	0,01
87	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	3	21,14	0,0006
88	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	5	36,78	0,0007
90	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	10	11,36	0,004
	P02525	Beta-krisztallin A1	2		
	P35700	Peroxiredoxin-1	2		
91	P06151	L-laktát dehidrogenáz A lánc	2	-22,83	0,0005
94	Q921I1	Szerotranszferrin	3	-7,4	0,0005
96	P24622	Alfa-krisztallin A lánc	6	23,98	0,0002

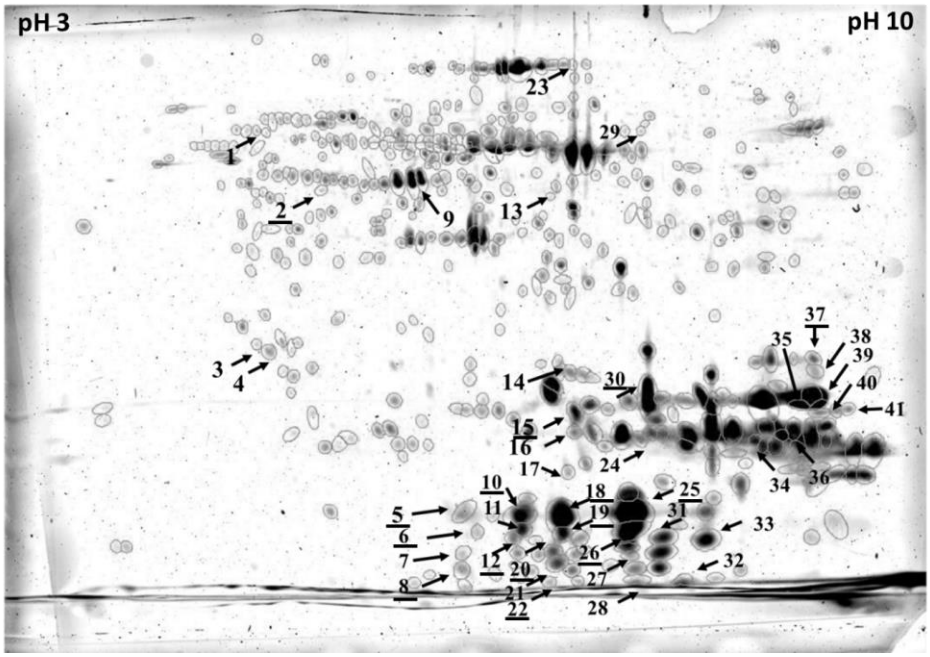
A táblázatban a foltok száma mellett az egyes foltokban tömegspektrométer segítségével azonosított fehérjék neve és UniProt azonosítója, az azonosításhoz használt egyedi peptidek száma, az intenzitás változás mértéke (fold change) a kontrollhoz képest és a p érték van feltüntetve.

A foltok jelentős része alfa krisztallint tartalmazott, de emellett más fehérjék mennyisége is megváltozott. A diszpáz kezelés hatására az alfa-2 makroglobulin, béta aktin-szerű fehérje, G fehérje, gliceraldehid-3 foszfát dehidrogenáz, heterogén nukleáris ribonukleoprotein, laktát dehidrogenáz, peroxiredoxin, rekoverin, szerotranszferrin és tubulin mennyisége csökkent, míg a béta krisztallin A1, griffin, ferritin L és H lánc mennyisége emelkedett. Az alfa krisztallin A lánc esetében egyes foltokban növekedést, míg másokban csökkenést tapasztaltunk a diszpáz kezelés hatására (6. táblázat).

A diszpáz kezelés hatására a TG2 KO egérben, a vad típusú egérhez hasonlóan egy jelentős, krisztallinokat érintő poszt-transzlációs módosítás történt, viszont itt a mértéke nagyobb, mint a vad típusú egérben. A (3), (20), (26), (34), (44), (48), (50), (51), (55), (64), (67), (70), (74), (77), (84), (87), (88) és (96) foltban az alfa A krisztallin mennyiségének növekedését, a (15) foltban a csökkenését figyeltük meg. A módosítások pontos hátterét nem ismerjük, de tekintve, hogy a diszpáz egy proteáz, a TG2 pedig keresztkötő enzim, a krisztallin pedig TG2 szubsztrát [200], előfordulhat, hogy a TG2 által létrehozott keresztkötések egyfajta védelmet biztosítanak a diszpáz általi hasítással szemben. Természetesen, ezek csak feltételezések, mert kísérleti rendszerünk által biztosított adatok nem nyújtanak elegendő információt a kérdés megválaszolásához. További kísérletek szükségesek a diszpáz és TG2 együttes hatásának kiderítésére.

A ferritin a vas megfelelő szintjének biztosításával és a szabadgyök képződést és oxidatív károsodást okozó Fe (II) megkötésével hozzájárul az oxidatív stressz elleni védelemhez [201]. Kísérleteinkben a könnyű lánc kb. 10x nagyobb mennyiségben volt jelen, mint a nehéz lánc, ami utalhat az oxidatív stressz jelenlétére.

A gélképek elemzésekor lehetőségünk volt arra, hogy több csoportot hozzunk létre és megvizsgáljuk az egyes csoportok közötti különbségeket. Így vad típusú és TG2 KO egereken a diszpáz kezelés hatásának vizsgálata mellett tanulmányozhattuk a diszpáz által indukált változásokat TG2 hiányában. A diszpáz kezelés hatását összehasonlítva a vad típusú és a TG2 KO egerek esetében 41 folt intenzitásában tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns különbséget (10. ábra).

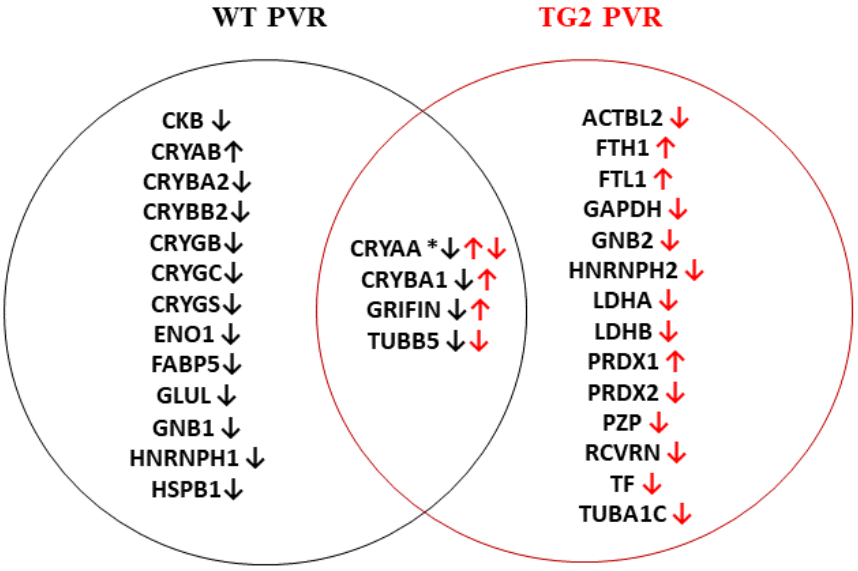


10. ábra. A diszpáz-kezelt vad típusú és TG2 KO egerekből származó üvegtesti minták kétdimenzós elektroforézisével elválasztott fehérjéket megjelenítő gélképekből nyert egyesített gélkép.

A számok azokat a foltokat mutatják, amelyek intenzitása statisztikailag szignifikáns módon különbözött a diszpáz-kezelt vad típusú és TG2KO gélképek között. Az aláhúzott foltokban levő fehérjék azonosítása történt meg.

15 foltban levő fehérjét azonosítottunk korábban, ebből 12 foltban alfa vagy béta krisztallin volt jelen, a maradék 3 folt pedig ferritin H láncot, griffint, illetve tubulint tartalmazott. Az eddig azonosított fehérjéket megvizsgálva azt találtuk, hogy a tubulin béta-5 mennyisége csökkent a diszpáz kezelés eredményeként mind a vad típusú, mind a TG2 KO egerekben, tehát ez a fehérje független a TG2 szabályozó szerepétől. A griffin, alfa krisztallin A és béta krisztallin A1 esetében a vad típusú egérben csökkenést, míg a TG2 KO egérben növekedést tapasztaltunk a diszpáz hatására (11. ábra). Az alfa krisztallin A-t tartalmazó foltok intenzitása a diszpázzal kezelt TG2 KO egérben nőtt, de az egyik folt intenzitása csökkenést mutatott.

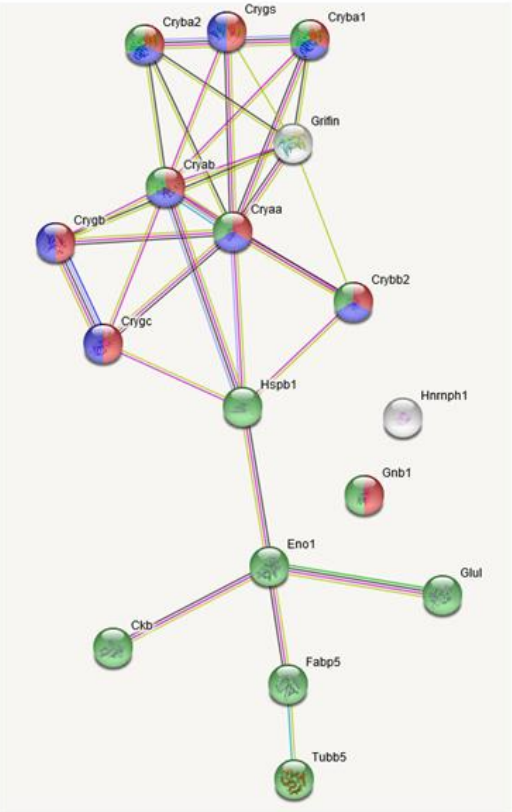
A TG2 KO és a vad típusú egerekben indukált PVR markáns fehérje profilbeli különbségei ellenére a szemészeti vizsgálat során kollaborációs partnereink nem tapasztaltak megfigyelhető változást a két csoport között. Mindezek ellenére, előfordulhat, hogy a TG2 hiányában a diszpáz hatására bekövetkező változás más dinamikával történt, de ezt a lehetőséget nem vizsgáltuk a kísérletek során. Érdekes lenne a diszpáz-hatás időfüggését megvizsgálni, annak érdekében, hogy választ kaphassunk az előző kérdésre.



11. ábra. A diszpáz-kezelés hatására változást mutató fehérjék a vad típusú (WT PVR) és TG2 KO (TG2 PVR) egerekből származó üvegtesti mintákban.
A fekete nyílak a vad típusú, a piros nyílak pedig a TG2 KO egerekben a diszpáz kezelés hatására változást mutató fehérjékre utalnak. A fehérjék nevét a génnevek segítségével rövidítettük. A * a CRYAA esetében a két azonos színű nyíl két különálló foltban észlelt változásának irányát mutatja.

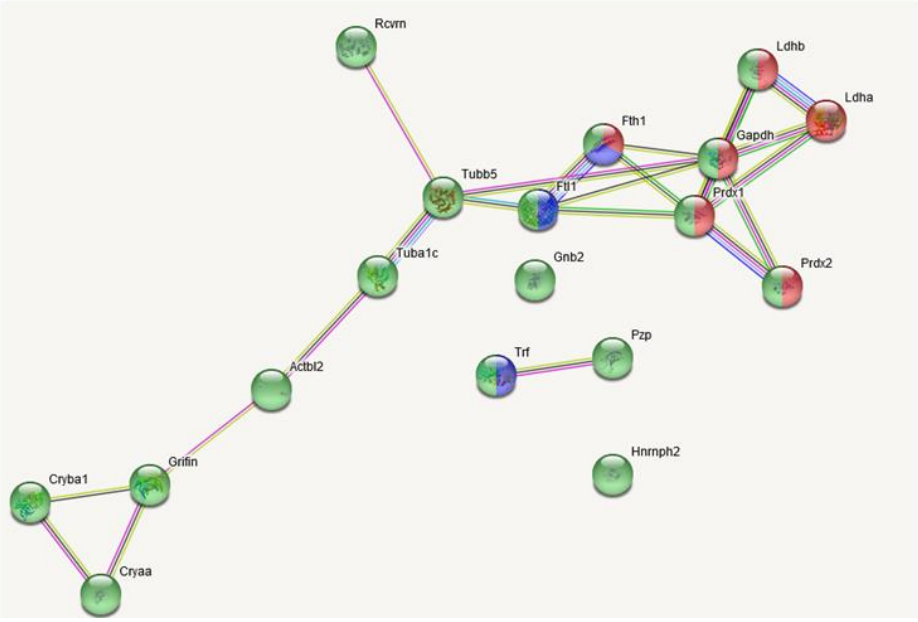
A TG2 egy kalcium-függő pleiotrópikus enzim, amely a transzglutamináz aktivitás mellett, izopeptidáz, deamidáz, kináz funkciókkal is rendelkezik, valamint kapcsolatba léphet 7-transzmembrán receptorokkal G fehérjeként működve, integrin receptorokkal, illetve az ECM különböző komponenseivel [202–204]. Kimutatták szerepét a sebgyógyulásban, ECM átrendeződésben, sejtadhézióban stb. [204]. A szemben való jelenlétét változatos szembetegségekben igazolták, mint az allergiás konjunktivitisz, szürke- ill. zöldhályog. Megtalálták a PVR membránokban, kimutatták, hogy módosítja az RPE sejtek fenotípusát és migrációját, valamint szabályozza az ECM átalakulást a PVR során [195–198]. Fontos kiemelni, hogy a TG2 sok fehérjével képes kapcsolatba kerülni, több mint 300 interakciós partnert illetve szubsztrátot írtak le eddig [200]. Nem tudjuk, hogy pontosan mely fehérjéket módosítja, vagy mely fehérjékkel lép kapcsolatba a diszpáz kezelés során, de a jelentős fehérje profilbeli különbség, különösen a krisztallin fehérjék mennyiségében és módosításaiban bekövetkező változás a vad típusú és TG2 hiányos egerekben nem ért váratlanul. A TG2 KO egerekben az alfa A és B krisztallinok mennyisége megnőtt a diszpáz kezelés hatására. Mindkét krisztallinról kimutatták, hogy képes az apoptózis gátlására [185], és feltehetően kiegészítik egymás hatását.

Annak érdekében, hogy jobban megértsük a TG2 hiányában diszpáz hatására bekövetkező változásokat a különbséget mutató fehérjéket funkcionális analízisnek vetettük alá. A String szoftver és adatbázis segítségével megrajzoltuk a vizsgálatunkban különbségnek adódó fehérjék fehérje-fehérje interakciós hálózatait, majd a String által statisztikailag szignifikánsnak ítélt feldúsult útvonalakat és GO funkciókat tanulmányoztuk. A vad típusú egerek esetében a hálózat 17 fehérjét tartalmazott (12. ábra), míg a TG2 KO egerek esetében 18 fehérjét (13. ábra).



12. ábra. A vad típusú egérben diszpáz hatására változást mutató fehérjék hálózata. A fehérjék hálózatát a String adatbázis segítségével rajzoltuk meg. A golyók a fehérjéket, a vonalak a fehérjék közötti interakciókat jelentik, míg a fehérjék színe a funkciójukra utal. A piros szín a szem kialakulásában résztvevő fehérjékre utal, a kék szín a lencsealkotó fehérjéket jelzi, míg a zöld a fehérje kötésben szerepet játszó fehérjékre vonatkozik. A fehérjéket a génnevek segítségével jelöltük.

A vad típusú minták esetében a 17 fehérje között 14 lehetséges kapcsolatot térképezett fel a String, míg a TG2 KO egerek esetében a 18 fehérje között 25 lehetséges kapcsolat volt megfigyelhető. A feldúsult funkciók tekintetében a vad típusú egereknél a PVR során a szem normális fejlődésében szerepet játszó funkciók kerültek előtérbe.



13. ábra. A TG2 KO egérben diszpáz hatására változást mutató fehérjék hálózata. A fehérjék hálózatát a String adatbázis segítségével rajzoltuk meg. A golyók a fehérjéket, a vonalak a fehérjék közötti interakciókat jelentik, míg a fehérjék színe a funkciójukra utal. A piros szín az oxidoredukciós folyamatokban résztvevő fehérjékre utal, a kék szín a vas homeosztázisában szerepet játszó fehérjékre vonatkozik, a zöld pedig a kötő funkcióval rendelkező fehérjéket jelöli. A fehérjéket a génnevek segítségével jelöltük.

Ezzel szemben a TG2 KO egereknél a homeosztatikus, védekező és energianyerő metabolikus funkciók dúsultak fel. Ez utóbbi hálózatban a piruvát és laktát metabolizmus, az oxidoredukciós folyamatok és a vas homeosztázis bizonyultak a leggyakoribb funkcióknak. A kapcsolati rendszer meghatározó csomópontjait a vad típusú egereknél a krisztallinok, míg a TG2 KO egereknél a metabolikus enzim GAPDH, illetve az oxidatív stressz elleni védekezésben szerepet játszó peroxiredoxin 1 képezték.

Mindkét állatmodell esetében jól látható, hogy a diszpáz által előidézett PVR állapotban a krisztallinok különböző módosulatai változtak meg nagyobb számban. A TG2KO egérmodell esetében a PVR folyamata során más krisztallin formák jelentek meg, mint a vad típus esetében, és ezek expressziója ellentétesen is változott, mint a vad típusú egereknél előidézett PVR esetében. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a TG2 szerepet játszik a fehérjehálózatok átalakításában, így lehetséges, hogy a PVR kórfejlődésében a stressz oldásért felelős, védekező feladatot lát el.

Munkánk további eredményeket szolgáltatott a diszpáz hatására módosuló fehérje profilokra vonatkozóan és kimutattuk a krisztallinokat érintő nagymértékű változásokat. Ugyanakkor a TG2 hiányában a diszpáz hatására jellemző információt is sikerült gyűjteni,

amely bizonyítja a TG2 aktív szerepét a PVR patomechanizmusában. A PVR tanulmányozására alkalmazott egér modell lehetőséget biztosít a dinamikus gyógyszerfejlesztési és tesztelési lépések kivitelezésére, reményeink szerint elősegítve a hatékony terápiás eljárások kifejlesztését.

5.3. A könnyben, nyálban, verejtékben levő kémiai barrier vizsgálata és potenciális biomarkerek azonosítása

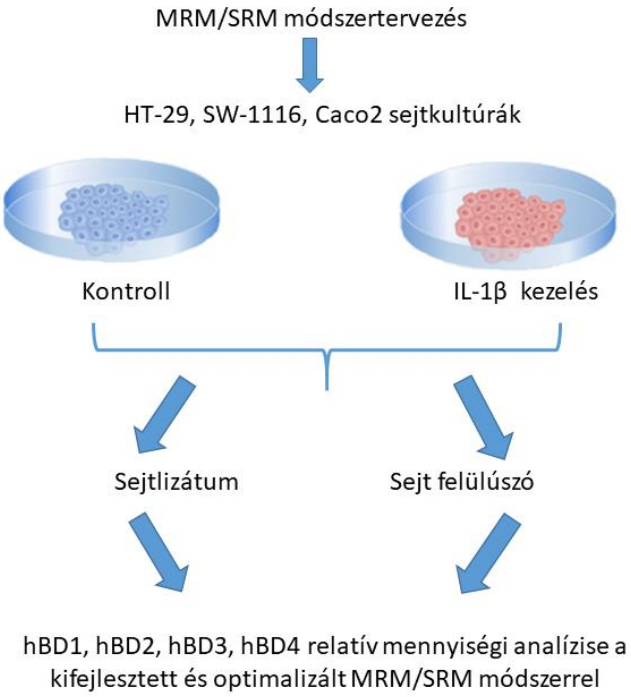
A különböző testfolyadékok, úgymint a verejték, nyál, könny stb. a testünket védő kémia barrier részét képezik és jelentős mennyiségű AMP fehérjét tartalmaznak. Az egyes testfolyadékokban biomarkerként azonosított fehérjék kb. 30%-a az AMP csoportba tartozik. Az a tény, hogy eddig kevesebb, mint 200 fehérjéről mutatták ki az antimikrobiális és immunmodulátor tulajdonságokat, és hogy az eddig azonosított számos biomarker majdnem 1/3-a AMP, egy figyelemreméltó tulajdonságokkal rendelkező csoportra utal. Természetesen ennek egyik oka lehet az is, hogy bizonyos testfolyadékok esetében csak az abundáns, főként AMP tulajdonsággal bíró fehérjéket tudtuk tanulmányozni, a kisebb mennyiségben jelen lévő fehérjékről nem volt alkalmunk kellő mennyiségű és minőségű információt gyűjteni. Erre a kérdésre néhány év múlva tudunk ténylegesen választ adni, amikor az érzékeny tömegspektrometriás módszerek alkalmazásával összegyűl elegendő adat a proteóm mélyebb rétegeiről és a kisebb mennyiségben jelen levő fehérjékről is megfelelő minőségű kvalitatív és kvantitatív információ lesz elérhető.

Munkám során az egyik fő célom a kémiai barrier tanulmányozása volt. Kutatócsoportommal olyan proteomikai technikákat fejlesztettünk és optimalizáltunk, amelyek alkalmazhatók a kémiai barrier komponenseinek vizsgálatára. Módszerfejlesztésünket először a nagyobb mennyiségben hozzáférhető és a komplex biológiai rendszerekhez képest kevésbé heterogén sejtkultúra felülúszón kezdtük el, majd az *in vitro* rendszeren megszerzett tudást használtuk a kisebb mennyiségben gyűjthető, betegektől származó testfolyadékokban levő kémiai barrier komponenseinek vizsgálatára.

5.3.1. Humán béta defenzinek vizsgálatára alkalmas MRM/SRM-alapú célzott tömegspektrometriás módszer kifejlesztése

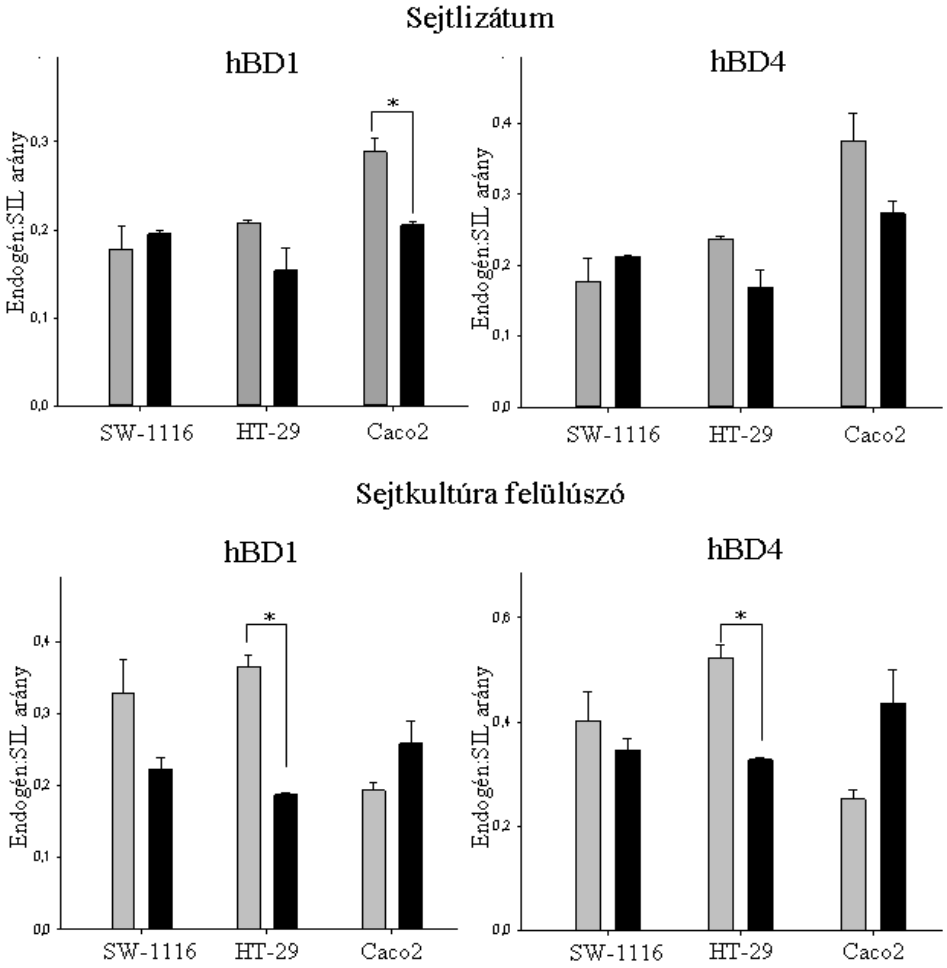
A defenzinek a veleszületett immunitás fontos elemei és nagy mennyiségben találhatók meg a különböző testfolyadékokban [126,134]. Annak érdekében, hogy a

defenzinek könnyebben vizsgálhatók legyenek, egy célzott tömegspektrometriás módszer fejlesztésébe kezdtünk, amely segítségével a humán alfa és béta defenzinek mennyisége vizsgálható. Célunk az volt, hogy a kifejlesztett módszert IL-1β kezeléssel stimulált, illetve nem kezelt kontroll HT-29, SW-116, Caco2 bél epitél sejteken és sejtkultúra felülúszókon teszteljük (14. ábra).



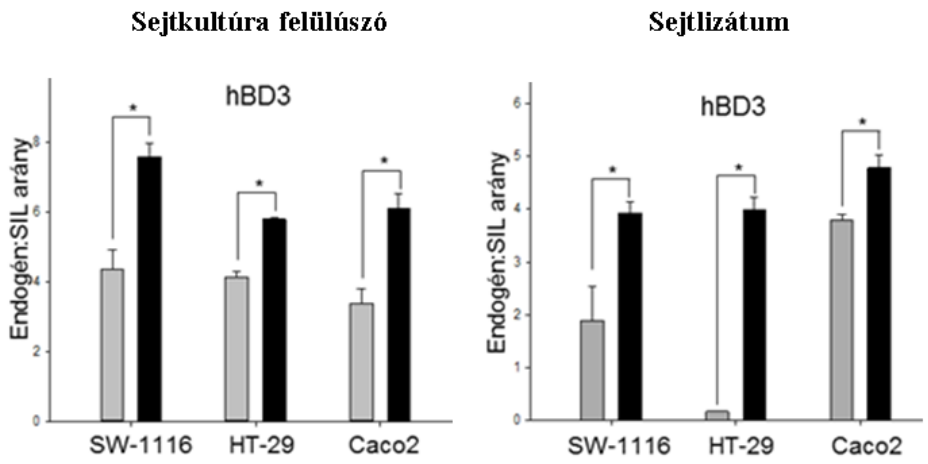
14. ábra. A kutatás során alkalmazott munkafolyamat.

Módszertervezésünk első lépéseként megpróbáltunk olyan triptikus peptid szekvenciákat azonosítani, amelyek egyediek az adott defenzinre. Sajnos a humán alfa defenzinek esetében nem sikerült ilyen szekvenciát azonosítani, ezért a módszerfejlesztés további részében csak a béta defenzinekre koncentráltunk. Az MRM/SRM-alapú módszer kifejlesztésével és a paraméterek optimalizálásával sikerült egy jól működő, szemikvantitatív célzott proteomikai módszert kifejleszteni, amelynek segítségével lehetővé válik a humán béta defenzin (hBD) 1, 2, 3 és 4 mennyiségének egyidejű analízise. Az MRM/SRM-alapú tömegspektrometriás analízis során az IQGTCYT hBD1 peptidet, a GIGDPVTCLK hBD2 peptidet, a GIINTLQK hBD3 peptidet és az ICGYGTAR hBD4 peptidet vizsgáltuk.
A nem indukálható hBD1 és hBD4 [139,140] esetében a várt hatást tapasztaltuk (15. ábra).



15. ábra. A humán béta defenzin 1 és 4 mennyiségének vizsgálata bélhámsejt kultúrák lizátumában és sejtkultúra felülúszókban.
Az oszlopdiagramok három kísérlet során nyert értékek átlagát jelenítik meg. Az „y" tengelyen az endogén:stabil izotóppal jelezett (SIL) peptid arányt, míg az „x" tengelyen a sejttípusokat tüntettük fel. Szürke színnel a kontroll, míg feketével az indukált sejtekből származó mintákból nyert értékeket jelöltük. A * a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket mutatja.

A hBD1 és hBD4 mennyisége az IL-1β kezelés hatására nem növekedett, sőt a hBD1 szintje a Caco2 sejtekben, és a szekretált hBD4 mennyisége a HT-29 sejtek esetében statisztikailag szignifikánsan csökkent a kezelés hatására Az indukálható béta defenzinek esetében a várt eredményt kaptuk; az intracelluláris és szekretált hBD2, és hBD3 szintje megnőtt az IL-1β kezelés hatására (16., 17. ábra).



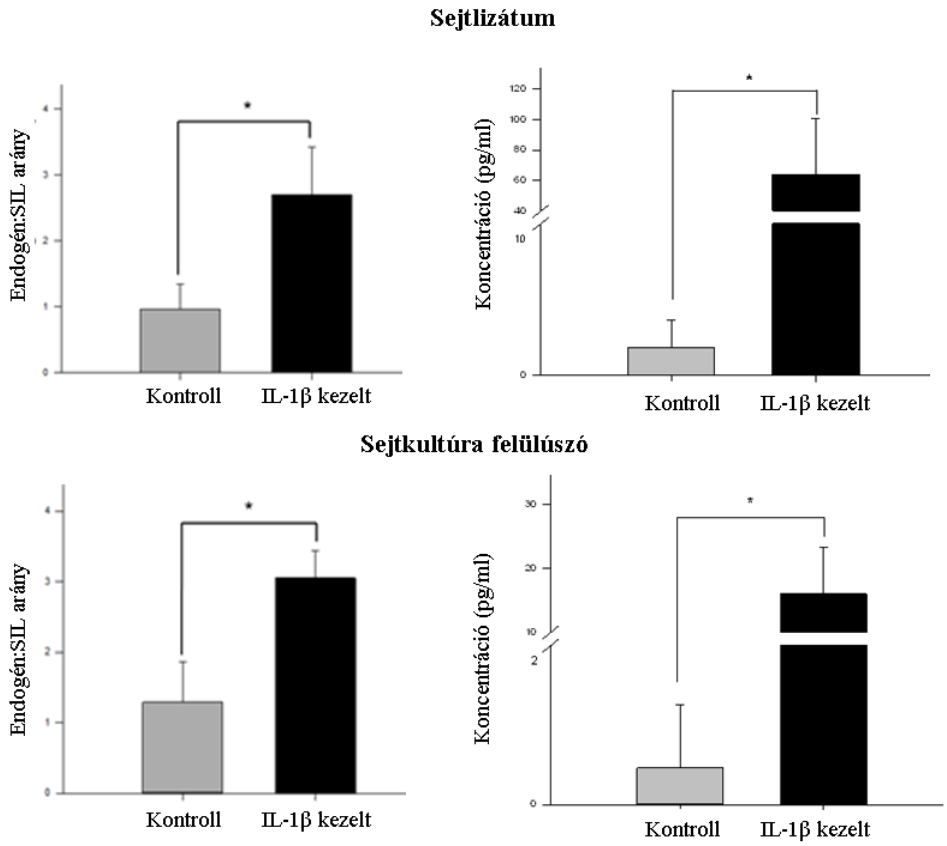
16. ábra. A humán béta defenzin 3 mennyiségének vizsgálata bélhámsejt kultúrák lizátumában és sejtkultúra felülúszókban.
Az oszlopdiagramok három kísérlet során nyert értékek átlagát jelenítik meg. Az „y" tengelyen az endogén:SIL peptid arányt, míg az „x" tengelyen a sejttípusokat tüntettük fel. Szürke színnel a kontroll, míg feketével az indukált sejtekből származó mintákból nyert értékeket jelöltük. A * a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket mutatja.

A kifejlesztett tömegspektrometriás módszert kollaborációs partnerünk hBD2-re specifikus RT-qPCR és ELISA analízisekkel ellenőrizte, és a különböző vizsgálatokban nagyságrendileg hasonló értékeket kaptunk (17. ábra).

A tömegspektrometriás módszerrel, valamint az ELISA-val kapott érték korrelációs analízisét elvégezve azt tapasztaltuk, hogy az ELISA és a kifejlesztett tömegspektrometriás módszerrel mért hBD2 szintek jó egyezést mutattak ($R=0,9636$, $p<0,0001$).

Az optimalizált módszer a klasszikus antitest alapú vizsgálatok egy reális alternatívájaként szolgálhat, elsősorban olyan esetekben, amikor a minta mennyisége nem teszi lehetővé az egymást követő ELISA analízisek elvégzését.

A szakirodalomban fellelhető adatoknak megfelelően, sikerült igazolni a hBD2 és hBD3 indukálható jellegét [139,140], ugyanis a vizsgált kísérleti rendszerekben az IL-1β gyulladásos citokin hatására megnőtt mind a szekretált, mind a sejten belüli mennyiségük.



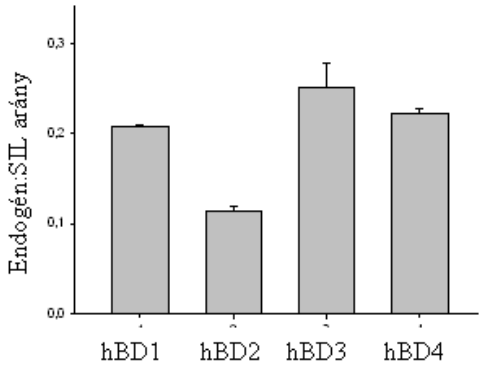
17. ábra. A humán béta defenzin 2 mennyiségének vizsgálata Caco2 bélhámsejt kultúrák lizátumában és sejtkultúra felülúszókban a kifejlesztett MRM/SRM illetve ELISA módszer segítségével.

Az oszlopdiagramok három kísérlet során nyert értékek átlagát jelenítik meg. Az „y" tengelyen az MRM/SRM módszerrel mért endogén:SIL peptid arányt, illetve az ELISA-val mért koncentráció (pg/ml) értékeket, míg az „x" tengelyen a minta típusát tüntettük fel. Szürke színnel a kontroll, míg feketével az indukált sejtekből származó mintákból nyert értékeket jelöltük. A * a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket mutatja.

A következő lépésben a kifejlesztett MRM/SRM-alapú kvantitálási módszert humán mintákon alkalmaztuk. Tekintve, hogy az általam vezetett kutatócsoport egyik fő érdeklődési területe a könny kémiai barrierjének vizsgálata, a kifejlesztett módszerrel megvizsgáltuk a humán béta defenzinek mennyiségét könnyben. A módszerünk megfelelőségének ellenőrzésére két könny poolt alkalmaztunk, egészséges felnőttektől és Alzheimer kórban szenvedőktől származó könnymintákat vizsgáltunk meg.

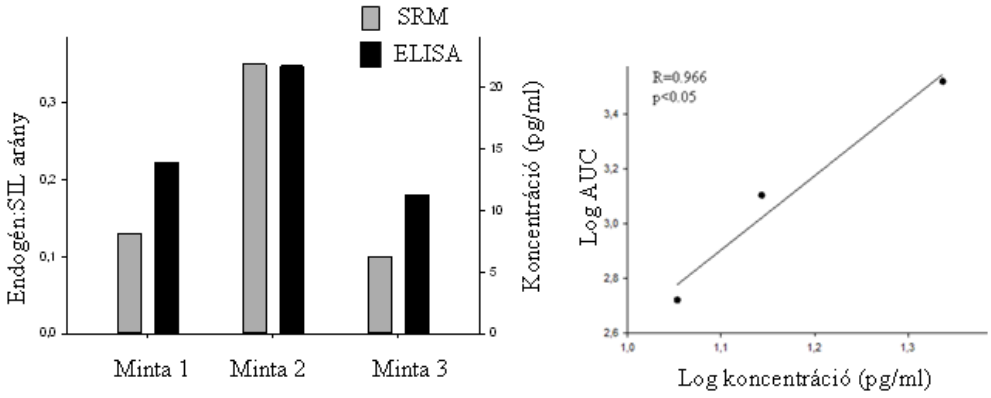
Az Alzheimer kóros betegektől származó agyszövetben kimutatták a humán béta defenzin 1, 2 és 3 emelkedett szintjét, valamint szérum és agy-gerincvelői folyadékban igazolták a humán béta defenzin 2 emelkedett mennyiségét [205,206], viszont az általunk kifejlesztett módszer segítségével nem sikerült a humán béta defenzineket kimutatni Alzheimer kóros betegektől származó könnymintákban. Ezzel szemben az egészséges

felnőttektől származó könnymintákban mind a négy vizsgált defenzint ki tudtuk mutatni, igazolva a módszerünk használhatóságát humán könnyminták vizsgálatára. Az egymáshoz viszonyított relatív mennyiségüket megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a hBD3 mennyisége a legmagasabb, a hBD2 mennyisége a legalacsonyabb, míg a hBD1 és hBD4 mennyisége majdnem azonos volt az egészséges felnőttektől származó könnyben (18. ábra).



18. ábra. A humán béta defenzinek mennyiségének vizsgálata könnyben.
Az oszlopdiagram három kísérlet során nyert értékek átlagát jeleníti meg. Az „y" tengelyen az endogén:SIL peptid arányt, míg az „x" tengelyen a vizsgált béta defenzineket tüntettük fel.

A könnyben található hBD2 mennyiségét ELISA segítségével is meghatároztuk, és a sejtkultúrás vizsgálatokhoz hasonlóan, a könnyben is jó egyezést mutat a két módszerrel mért hBD2 mennyisége (19. ábra).



19. ábra. Könnymintákban mért hBD2 mennyisége MRM/SRM és ELISA módszer segítségével.
Az MRM/SRM és ELSIA analízissel nyert értékeket oszlopdiagramon ábrázoltuk. Az „x" tengelyen a mintákat, a bal oldali „y" tengelyen az endogén:SIL peptid arányt, míg a jobb oldali „y" tengelyen az ELISA-val mért fehérje koncentrációt ábrázoltuk. Szürkével az MRM/SRM, míg feketével az ELISA módszer alkalmazásával kapott értékeket tüntettük fel. A korreláció analízis eredményét bemutató ábrán az „x" tengelyen az ELISA-val, míg az „y" tengelyen a kifejlesztett MRM/SRM módszer segítségével kapott AUC értékeket ábrázoltuk. Az ábra e részén az értékek ábrázolásához log skálát használtunk.

Eredményeink alapján a kifejlesztett tömegspektrometriás módszer megfelelően működik sejtkultúrás vizsgálatokban, és használhatónak bizonyult hBD1, hBD2, hBD3 és hBD4 egyidejű mennyiségi analízisére humán könnymintákban.

5.3.2. A könny, mint potenciális biomarker forrás

A könny egy folyamatosan termelődő testfolyadék, amely fehérjéket, lipideket és kismolekulákat tartalmaz. Fő feladata a szaruhártya nedvesen tartása, a fénytörő közeg biztosítása, valamint a szaruhártya táplálása és védelme [207]. A könny fehérje tartalma viszonylag magas, tipikusan 6-11 mg/ml és hozzávetőlegesen 2 mikroliternyi termelődik percenként [208]. A könnyben eddig több mint 1500 fehérjét azonosítottak [209–211]. A fehérjék nagy részét a könnymirigyek termelik, de jelentős számban találhatók az epitél sejtekből származó fehérjék, valamint feltehetően a szérumból transzudációval is jutnak át fehérjék a könnybe [212,213]. A nagy mennyiségben jelen levő fehérjék pl. lizozim C, laktotranszferrin, lipokalin, lakritin, prolaktin indukált fehérje, mind a kémiai barrier részeiként működő AMP, amelyek az elsődleges védelmi vonalként védenek a potenciális patogének ellen biztosítva a könny antimikrobiális hatását [210].

A könny az egyik legkutatottabb biomarker forrás, mivel folyamatosan termelődik és nem invazív módon gyűjthető. Eddig több mint 60 biomarkert azonosítottak a könnyben elsősorban különböző szembetegségek esetében, de szisztémás betegségek pl. szklerózis multiplex, Sjögren szindróma, melldaganat esetében is találtak betegség-specifikus könny biomarkereket [214].

5.3.3. A könny kémiai barrierjének vizsgálata és Alzheimer kór-specifikus potenciális könny biomarkerek azonosítása

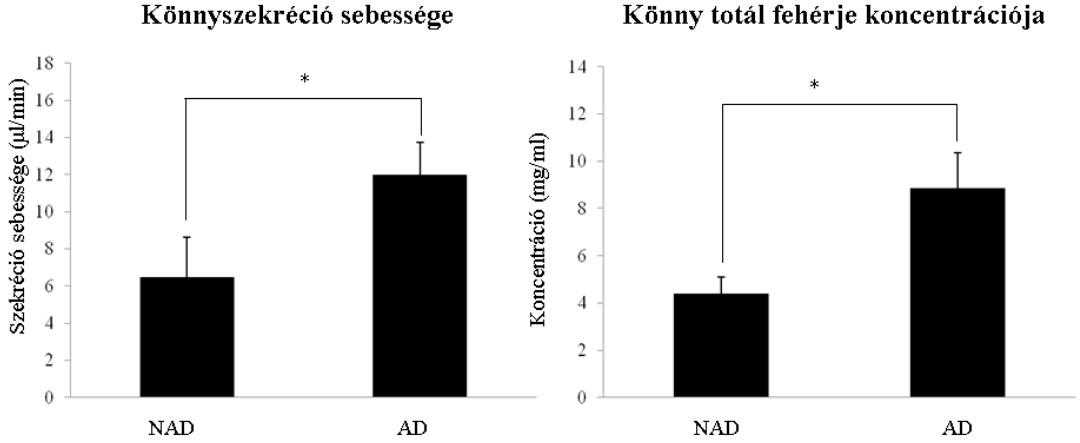
Az Alzheimer kór etiológiája nem ismert pontosan, de főként a fejlett országok öregedő lakossága körében egyre gyakoribb az előfordulása, mely jelentős terheket ró a társadalom egészére [215]. Az Alzheimer kór során a szinapszisok száma jelentősen csökken és az agyban amiloid depozitumok jelennek meg. A betegség hátterében kimutatták a gyulladásos folyamatok és az oxidatív stressz jelentőségét [216–219].

Az Alzheimer kór az agyhoz hasonlóan a retinát is érinti. Amiloid lerakódásokat figyeltek meg Alzheimer kórban szenvedő betegek retinájában és lencséjében [220,221]. A betegségben csökkent a retina ganglion sejtjeinek a száma, elvékonyodott az idegsejtek

rétege, valamint a látóideg atrófiája és a nagyobb átmérőjű axonok számának csökkenése is megfigyelhető volt. Az érhálózatban és a retina morfológiájában bekövetkező változások alátámasztják az Alzheimer kórban szenvedő betegek rosszabb látását, a csökkent látásélességet, a fixáció nehézségeit, a színlátás és a kontraszt érzékelésének problémáit, illetve a szakkadikus szemmozgások késését [220–224]. A szemben levő elváltozások vizsgálata az egyik diagnosztikai lehetőség az Alzheimer kór nem invazív diagnózisára [220,223]. Az ilyen jellegű vizsgálatokhoz általában korszerű, sokszor igen drága műszerek és megfelelően képzett szakemberek szükségesek, amelyek nem állnak minden egészségügyi egység rendelkezésére. Annak érdekében, hogy egyszerűbb, betegágy mellett használható, vagy a beteg küldözgetése nélkül, háziorvosi rendelőben is megvalósítható vizsgálatot lehessen kifejleszteni, marker fehérjéket szerettünk volna azonosítani.

Tekintve, hogy a könny nem invazív módon gyűjthető, folyamatosan termelődő testfolyadék, és figyelembe véve a betegségre jellemző, szemet érintő elváltozásokat, munkánk során a könny fehérjéit, mint potenciális biomarker forrást vizsgáltuk meg azzal a céllal, hogy Alzheimer kórra jellemző potenciális biomarkereket azonosítsunk.

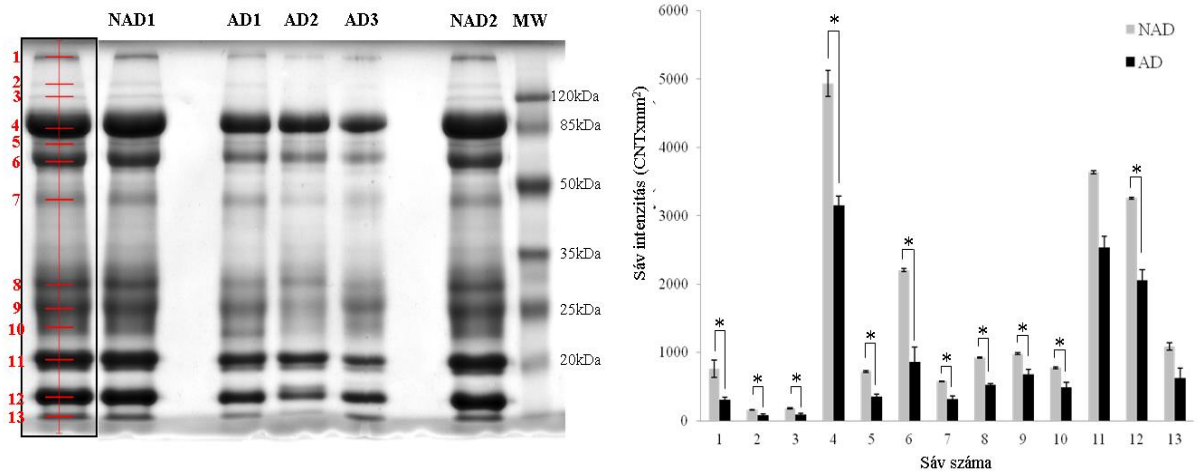
Vizsgálatainkat 14 beteg és 9 kontroll donor 37 mintájának analízisével kezdtük. Először megvizsgáltuk a könnytermelődés sebességét, valamint a begyűjtött könny fehérje tartalmát (20. ábra).



20. ábra. A könnytermelés sebessége és a könny totál fehérje koncentrációja.
A könnyszekréció sebességét, ill. a könny teljes fehérje koncentrációját ábrázoltuk az „y” tengelyen, míg az „x” tengelyen a csoportokat tüntettük fel. NAD a kontroll csoportra, AD az Alzheimer kórban szenvedők csoportjára vonatkozik. A * a statisztikailag szignifikáns ($p<0.05$) különbséget mutatja.

A könny termelődési sebessége és a termelődött könny koncentrációja is nagyobb volt a betegek esetében a kontrollokhoz képest. Eredményeink szerint az Alzheimer kór hatására több és koncentráltabb könny termelődött. A könny összetételének és mennyiségének ilyen mértékű változása feltehetően a szemben Alzheimer kór során megfigyelt változásokkal áll összhangban [220–223]. Nincs adatunk az ok-okozati összefüggés megállapítására, viszont logikusnak tűnik, hogy a betegségben megfigyelt szemet érintő jelentős változások a könny termelés szintjén is tükröződjenek.

A következő lépésben a termelődött könny fehérje összetételét kívántuk megvizsgálni. Ehhez három véletlenszerűen kiválasztott betegtől és két kontrolltól származó minta SDS-poliakrilamid gélelektroforézisét végeztük el. A festés után megjelenített sávok denzitometriás vizsgálata azt mutatta, hogy két sáv kivételével a betegektől származó mintákban a fehérje sávok intenzitása statisztikailag szignifikáns módon csökkent a kontrolloktól származó mintákban megfigyelt sávok intenzitásához képest (21. ábra).



21. ábra. Könnyminták vizsgálata SDS-PAGE segítségével.
A gélkép a 3 Alzheimer kórban szenvedő betegtől (AD) és a 2 korban illesztett kontrolltól (NAD) származó könnymintában elválasztott fehérje sávokat mutatja. Az oszlopdiagram „y” tengelyén a gélkép bal oldalán levő számozás alapján elnevezett sávok („x” tengely) intenzitását ábrázoltuk. Szürkével a kontrolloktól (NAD), míg feketével az Alzheimer kórban szenvedőktől származó minták elemzése során kapott értékeket ábrázoltuk. A * a statisztikailag szignifikáns ($p<0.05$) különbséget mutatja.

A sávokat kivágtuk, majd tömegspektrometriás fehérje azonosításnak vetettük alá. Az azonosított fehérjék (7. táblázat) funkcióját megvizsgálva azt találtuk, hogy főként a kémiai barrier felépítésében vesznek részt [214].

A fehérjék közül kiválasztottuk a laktotranszferrin, lizozim, Zn-alfa-2 glikoprotein, lipokalin A, prolaktin indukált fehérje, Ig λ lánc C régió, lakritin és lipofilin-1 fehérjéket, valamint

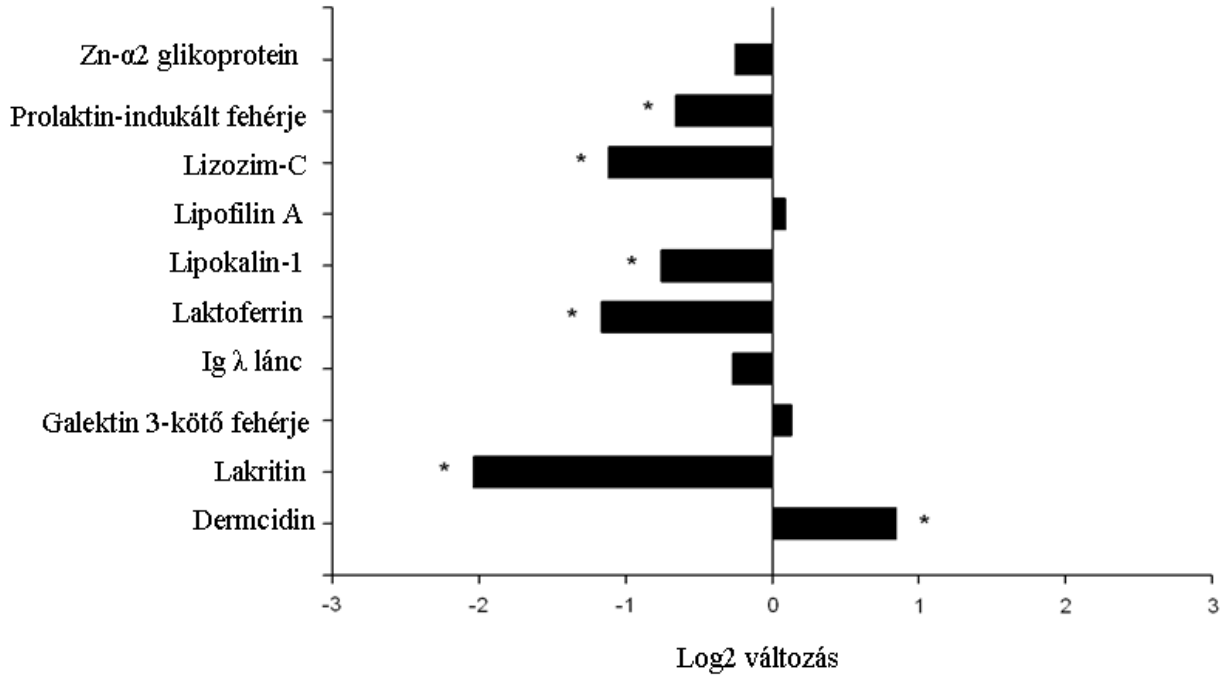
hozzátettük a dermcidint és galektin-3 kötő fehérjét mint további kémiai barrier komponenseket. A kiválasztott 10 fehérjére MRM/SRM-alapú célzott proteomikai módszert terveztünk és optimalizáltunk, majd az optimalizált paramétereket (Függelék 1. táblázat) felhasználva elvégeztük a célzott proteomikai analíziseket 37 könnymintán.

7. táblázat. A gél sávokban levő fehérjék azonosítása MS/MS spektrumok alapján

Sávok száma	Azonosított fehérje	Génnév	Azonosításhoz használt egyedi peptidek száma
1	NA	NA	NA
2	Laktotranszferrin	LTF	4
3	Laktotranszferrin	LTF	2
4	Laktotranszferrin	LTF	17
5	Szérum albumin	ALB	5
	Immunglobulin alfa-1 lánc	IGHA1	3
	Laktotranszferrin	LTF	3
6	Laktotranszferrin	LTF	2
	Immunglobulin alfa-1 lánc	IGHA1	2
7	Lakritin	LACRT	4
	Zn-alfa2-glikoprotein	AZGP1	13
	Keratin 1	KRT1	3
8	Keratin 1	KRT1	5
	Keratin 10	KRT10	3
9	Immunglobulin lambda lánc	IGLC	2
10	Immunglobulin lambda lánc	IGLC	3
	Immunglobulin kappa lánc	IGKC	6
	Zimogén granulum protein 16 homológ	ZG16B	5
	Prolin gazdag fehérje 4	PRR4	3
11	Lipokalin-1	LCN1	10
	Prolaktin indukált fehérje	PIP	4
12	Lizozim C	LYZ	9
	Prolaktin indukált fehérje	PIP	5
	Cisztatin S	CST4	2
	Lipofilin C	LPNC	6
	Lipofilin A	LPNA	4
13	Lizozim C	LYZ	5

A táblázatban az egyes sávokban azonosított fehérjék nevét, az azonosításhoz felhasznált peptidek számát és az azonosított fehérjék génnevét tüntettük fel.

Az MRM/SRM analízissel nyert eredményeket statisztikai elemzésnek vetettük alá, és hat fehérje esetében tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns változást a betegség hatására (22. ábra).



22. ábra. Az MRM/SRM-alapú célzott proteomikai módszerrel történő könnyfehérje kvantitálás.

Az „x" tengelyen a beteg és a kontroll csoportok közötti változás mértékét (log2 skála) ábrázoltuk az „y" tengelyen megjelölt fehérjék esetében. A * a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket mutatja.

Eredményeink azt mutatják, hogy a könnymirigy által szekretált fehérjék, mint a lakritin, laktoferrin, lipokalin-1, prolaktin indukált fehérje és lizozim C [214] mennyisége statisztikailag szignifikáns módon csökken az Alzheimer kórban szenvedő betegek mintáiban, a korban és nemben illesztett kontrollok könnymintáihoz képest. Ugyanakkor az epitél eredetű dermcidin [145] mennyisége statisztikailag szignifikáns módon megnőtt a betegektől származó mintákban.

Az SDS-PAGE és a célzott tömegspektrometriával végzett kvantitálás eredményei egybevágnak, és a könnyfehérjék csökkenését mutatják a betegek mintáiban, ami ellentmond a totál fehérje mérés során kapott magasabb fehérje koncentrációknak. A dermcidin mennyisége nőtt, viszont a rendelkezésre álló adatok alapján nem tudjuk biztosan állítani, hogy a dermcidin, és a hozzá hasonló kisebb móltömegű peptidek magasabb mennyisége lehet-e felelős a megfigyelt jelenségért. Kísérleteinkben 10%-os akrilamid gélt használtunk, amely nem tudta megtartani a 4,7 kDa nagyságú dermcidint. Annak eldöntésére, hogy peptidek vagy más kis móltömegű fehérjék fokozott jelenléte, vagy esetleg teljesen más jelenség áll az általunk tapasztalt ellentmondás hátterében, további kísérletek szükségesek.

A neurodegeneratív betegségben szenvedőknél csökkent korneális érzékenységet és abnormális könny funkciókat írtak le [225], amit okozhat a könnymirigyek által termelt fehérjék csökkent szintje. Az alacsony könnymirigy eredetű AMP fehérje szintet feltehetően a magasabb dermcidin, és esetlegesen egyéb epitél eredetű, általunk nem vizsgált fehérjék mennyisége ellensúlyozza, így biztosítva a megfelelő antibakteriális védelmet az Alzheimer kórban szenvedő betegek esetében is.

Annak eldöntésére, hogy melyik potenciális biomarkert vagy biomarker kombinációt érdemes tovább vizsgálni, ROC (Receiver-Operator Characteristic) statisztikát végeztünk (8. táblázat).

8. táblázat. Potenciális biomarkerek és biomarker kombinációk ROC analízise

Potenciális biomarkerek és biomarker kombinációk	Szenzitivitás (%)	Specificitás (%)	AUC
LCN1	53	80	0,68
LTF	78	52	0,67
LYZ	91	50	0,68
PIP	72	56	0,6
LACRT	91	58	0,71
DCD	62,5	77	0,7
LCN1+DCD	53	89	0,74
LYZ+LACRT	91	59	0,715
LCN1+DCD+LACRT	91	66	0,8
LCN1+DCD+LTF	53	89	0,735
LCN1+DCD+LYZ	59	83	0,75
LCN1+LTF+LYZ	87,5	50	0,72
LYZ+LACRT+DCD	91	66	0,79
LYZ+LACRT+LCN1	87,5	59	0,72
PIP+LACRT+DCD	94	61	0,79
DCD+LCN1+LTF+PIP	62,5	77	0,74
LCN1+DCD+LYZ+LACRT	81	77	0,8

Minden vizsgált potenciális biomarker és biomarker kombináció esetében feltüntettük a szenzitivitás, specificitás és AUC értékeket. A fehérjéket a génnevek segítségével jelöltük.

A ROC analízisben a 0,5 körüli AUC érték azt mutatja, hogy az illető marker a véletlennél nem teljesít jobban; az 1-hez közeli érték pedig nagyon jól teljesítő markert mutat. A 0,7 körüli AUC érték megfelelően teljesítő markerre utal. Gyakorlatilag mindegyik potenciális marker vagy marker kombináció 0,7 körüli AUC értéket mutatott. A szenzitivitást és specificitást is figyelembe véve az AUC értékek mellett, a legkiegyensúlyozottabb értékeket a lipokalin-1-t, dermcidint, lizozim C-t és lakritint tartalmazó kombináció mutatta 81% szenzitivitással, 77% specificitással és 0,8 AUC értékkel.

Eredményeink egyrészt további bizonyítékot szolgáltattak a kémiai barrier változásaira kóros állapotokban és sikerült bizonyítani, hogy az Alzheimer kórban szenvedő betegek könnyében a kémiai barrier összetétele lényegesen eltér a korban és nemben illesztett kontrollok könnymintáiban megfigyelt kémiai barrier összetételéhez képest. Ugyanakkor a könnytermelődés sebességét, valamint a lakritin, lipokalin-1, lizozim C és dermcidin kombinációját figyelembe véve kísérleti adataink alapján a beteg és a kontroll csoport elkülöníthető egymástól. Amennyiben nagy mintaszámon is sikerül validálni az általunk azonosított potenciális biomarkereket, ki lehet fejleszteni egy könnyen használható gyorstesztet, amely segítségével a betegség diagnosztizálása felgyorsítható, a terápia hamarabb megkezdhető, és reményeink szerint a betegek életminősége javítható.

5.3.4. A szemben zajló sebgyógyulási folyamatok tanulmányozása, és olyan potenciális biomarkerek azonosítása, amelyek előrejelezhetik a trabekulektómia utáni komplikációk kialakulását

A zöldhályog vagy glaukóma – a 40 év feletti populációban – a vakság vezető okai közé tartozik. Tulajdonképpen a látóideg degenerációjával járó kórkép, amelynek pontos oka a mai napig nem ismert [226]. A zöldhályog csoportosítása több szempont szerint történhet, így beszélhetünk nyíltzugú vagy zártzugú, primer vagy szekunder, akut vagy krónikus zöldhályogról [227]. A normotenzív glaukóma kivételével, a szemnyomás növekedése jellemző a betegségre, de nem kizáró ok vagy tünet, ugyanis olyan állapotokat is leírtak, amikor a zöldhályog normál szemnyomás mellett is kialakul [228]. A betegség prevalenciája a korral növekszik, de az etnikai hovatartozás és az életmód is fontos tényező lehet [229]. Egyes becslések szerint hamarosan a zöldhályogban szenvedő betegek száma eléri a 14 milliót [230,231]. Patogenezise nem ismert pontosan; intenzív kutatások több lehetséges okot és útvonalat tártak fel, mint a TGFβ szintálút, a glutamát excitotoxicitás, az oxidatív stressz fokozott jelenléte stb. [232–234]. A genetikai kutatások alapján a C*DKN2B, ATOH7* és *SIX1* SNP variánsok is felelősek lehetnek a zöldhályog kialakulásáért [235]. A zöldhályogban a látóideg neuropátiája és a retina ganglion sejtjeinek progresszív és irreverzibilis elhalása a látóideg atrófiáját okozza, ami kezeletlenül, akár vaksághoz is vezethet [236,237].

Jelentős kutatási potenciált mozgósítottak a zöldhályogra jellemző biomarkerek azonosítására. Az esetek nagy részében a retinát, a csarnokvizet, a látóideget és a trabekuláris hálózatot tanulmányozták [238–242]. Proteomikai technikák alkalmazásával több száz olyan fehérjét sikerült azonosítani, amely kapcsolatba hozható a zöldhályoggal [234,241,250–

252,242–249]. Ezen fehérjék jelentős része invazív módon gyűjtött biológiai mintából származik, emiatt nem alkalmazható biomarkerként a betegség előrejelzésére, vagy diagnózisára. A nem invazív módon gyűjthető könnyminták analíziséről viszonylag kevés adat áll rendelkezésre.

A zöldhályog terápiája során jelenleg az egyetlen befolyásolható tényező a szemnyomás. A szemnyomás csökkentése késleltetheti a betegség progresszióját és a látás elvesztését [237]. Annak ellenére, hogy sokféle terápiás megközelítést alkalmaznak (peptideket tartalmazó szemcseppek, szemnyomást csökkentő készítmények, műtéti beavatkozás stb.), sajnos, még nem sikerült megfelelő gyógymódot találni. Az általánosan elfogadott protokoll szerint a szemnyomás csökkentésére a szemcseppeket alkalmazzák, de amikor a hatóanyagok kombinációja sem hozza meg a kívánt eredményt, műtéti beavatkozás válik szükségessé. Az arany standard műtéti eljárás a trabekulektómia [253], amely során az operatőr egy csatornát alakít ki a trabekuláris hálózatban a szubkonjunktiválisrész és az elülső szegmens között, amely segíti a felgyülemlett csarnokvíz ellenőrzött elfolyását így csökkentve a szemnyomást [254]. A műtét hosszú távú kimenetelét nagymértékben meghatározza a sebgyógyulás. Amennyiben a műtét során kialakított lebeny letapad, az új filtrációs út gyorsan bezárul és akkor funkcióját már nem tudja többé ellátni [253,254]. A páciensek sebgyógyulási hajlama eltérő lehet, így bizonyos betegek hajlamosabbak arra, hogy a lebeny letapad a műtétet követő fél-egy évben. Sok ilyen esetben a műtét megismétlése szükséges. Egyes kutatások azt feszegetik, hogy a trabekulektómia túl nagy mértékű beavatkozás, és ha minimálisan invazív beavatkozást alkalmaznak a műtét során, akkor a műtét sikertelensége sokkal kisebb eséllyel következik be [254,255]. Az operatőr tapasztalata nagymértékben hozzájárul a műtét sikeres hosszú távú kimeneteléhez [254,255].

Tekintve, hogy a műtét során több réteg (sclera, trabekuláris hálózat) is sérül, egy komplex sebgyógyulási mechanizmust kell figyelembe venni.

A bőrben a sebgyógyulás öt fázisra osztható [256]. Az első fázis a véralvadás fázisa, amikor a sérülés helyén létrejön a stabil hemosztatikus dugó, amely elzárja a véredények sérüléseit megakadályozva a vérveszteséget és a potenciális patogének bejutását. A második fázis a gyulladásos fázis, ekkor az immunrendszer elemei aktiválódnak, citokineket termelnek, amelyek hatására további immunrendszeri aktiváció következik be. Ekkor történik a sérült sejtek és sejttörmelékek eltávolítása, a bejutott patogének elpusztítása, valamint elkezdődik a fibroblasztok és egyéb, extracelluláris mátrix (ECM) elemeket termelő sejtek aktiválása. A harmadik vagy proliferációs fázisban megtörténik a regeneráció, új sejtek képződnek és/vagy differenciálódnak a megfelelő funkció ellátására. A javítási fázisban új extracelluláris mátrix

képződik, ami a sérült részt kitölti és újraindul a károsodott és kijavított rész működése. A sérült struktúrák kijavítása az első fázisban keletkezett hemosztatikus dugó lebontását vonja maga után. A remodelling vagy helyreállítás fázisa hosszú ideig eltarthat, ekkor alakulnak ki a sérülés előtti állapotra jellemző finomabb szerkezetek és a sérült terület teljes mértékben visszanyeri a sérülés előtti funkcióját [256]. Megfigyelték, hogy a gyulladásos fázisban, a sérülést követő pár órán belül megjelenő citokineknek nagy hatásuk van a sebgyógyulás kimenetelére. Bizonyos citokinek, pl. az IP-10 szükséges ahhoz, hogy hegmentes gyógyulás következzen be, ami a magzati élet során és újszülött korban előfordul [257]. Több próbálkozás van arra vonatkozóan, hogy a sebgyógyulás kimenetelét módosítsák bizonyos citokinek pótlásával, elsősorban krónikus sebek esetében. Kisebb-nagyobb sikereket elértek ezen a téren, de a sebgyógyulás befolyásolása még mindig nem megfelelő mértékű, ami arra utal, hogy egy sokkal komplexebb folyamat játszódik le, és nem is feltétlenül az egyes citokinek jelenléte/hiánya, hanem feltehetően a különböző citokinek együttes hatása a fontos [257].

A szem vonatkozásában a sebgyógyulás komplexebb és nagyban különbözik a bőrben megfigyelt folyamattól, ugyanis itt figyelembe kell venni a szaruhártya és a sclera epitél és endotél rétegeit, valamint a mélyebb struktúrákban lejátszódó folyamatokat is.

A sebgyógyulás fázisainak magas szintű összehangolását a különböző citokinek és növekedési faktorok nagyon pontos szabályozása teszi lehetővé. Gyakorlatilag bármelyik fázisban bekövetkezhet hiba, ami komplikációk megjelenéséhez, és a sebészi beavatkozás sikertelenségéhez vezethet. A sebgyógyulás folyamata a beavatkozás után azonnal elkezdődik, a reeptielizáció általában a műtétet követő 3-5 napban történik [258], de a komplikációk megjelenésére későn, gyakran a beavatkozás utáni több hónap elteltével kell számítani [259,260]. Ezért lehet nagyon fontos a korai események ismerete, amely feltehetően kihatással van a később megjelenő komplikációkra.

Ahhoz, hogy megfelelően nyomon lehessen követni a sebgyógyulás egyes fázisaira jellemző molekuláris eltéréseket, követéses vizsgálatok szükségesek. Ilyen jellegű követéses vizsgálatok nem kivitelezhetők invazív módon gyűjtött minták pl. csarnokvíz, trabekuláris hálózat, retina stb. alkalmazásával. Munkám során a könnyet mint potenciális biomarker forrást alkalmaztam, hogy több információt gyűjthessek a trabekulektómia utáni komplikációkat megelőző/kísérő fehérje változásokra vonatkozóan.

Tekintve, hogy a trabekulektómia hosszú távú sikere nagyban függ a sebgyógyulási folyamattól [254,255], fontosnak tartottam a folyamat részletesebb vizsgálatát biokémiai szempontból. Figyelembe véve azt, hogy a lebenyhez kapcsolt komplikációk általában a

trabekulektómia után hónapokkal vagy akár évekkel később jelennek meg, nagy hangsúlyt fektettem a potenciális biomarkerek azonosítására, amelyek előrejelezhetik a késői komplikációk kialakulását. Ahhoz, hogy a klinikumban megfelelően használható tesztet lehessen kifejleszteni, fontos, hogy a biomarker könnyen hozzáférhető mintából legyen kimutatható, amit nem- vagy minimálisan invazív módszerrel lehet gyűjteni.

A zöldhályogra jellemző fehérjék tanulmányozására legáltalánosabban használt biológiai minta a csarnokvíz, melynek fokozott termelése vagy akadályozott elvezetése, illetve a fentiek egyensúlyának megbomlása okozza a megnövekedett szemnyomást. A csarnokvíz vizsgálatával számos zöldhályogra jellemző fehérjét azonosítottak [241,246,261,262], azonban a csarnokvíz csak műtét során hozzáférhető, ezért szűrésre, műtét utáni követésre nem alkalmazható. Ebben a kontextusban első lépéseként meg kívántam vizsgálni, hogy a könny - mint állandóan termelődő és nem invazív módon gyűjthető biológiai minta - fehérje összetétele milyen mértékben tér el a műtét során gyűjtött csarnokvíz fehérje összetételéhez képest. A kérdés megválaszolására 20 trabekulektómiára előjegyzett páciens mintáját vizsgáltuk meg. Minden donortól a műtét előtt könnymintát vettünk és a műtét során csarnokvíz mintát gyűjtöttünk. Egy kereskedelmi forgalomban levő multiplex citokin kit (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay) segítségével 27 citokin koncentrációját vizsgáltuk meg a könnyben és a műtét során gyűjtött csarnokvízben. A vizsgálatba bevont páciensek adatait (kor, nem, zöldhályog típusa, gyűjtött könny mennyisége, gyűjtött könny koncentrációja, szemnyomás stb.) a Függelék 2. táblázat tartalmazza.

5.3.4.1. Citokinek mennyiségének vizsgálata könnyben

27 citokinből 25 a páciensek legalább 90%-ban kimutatható volt, csak két citokin jelent meg kevesebb betegben; az IL-2 a betegek 45%-ban, míg az IL-10 a betegek 85%-ban volt detektálható. Tekintve, hogy vizsgálatunkban ugyanabból a páciensből származó kétféle minta összehasonlítását céloztuk meg, nem vontunk be kontrollokat ebbe a fázisba, így a méréseink helyességének ellenőrzését irodalmi adatok alapján kellett elvégezzük. Teljesen egyértelmű és pontos összehasonlítást nem lehetett kivitelezni, mivel a különböző mintagyűjtési és analitikai módszerekkel keletkezett adatok nem hasonlíthatók össze egy az egyben. Ennek ellenére a szakirodalomban közölt adatok referenciaként használhatók, a hasonló vizsgálati módszerekkel dolgozó kutatócsoportok eredményei nagyságrendileg azonosak kell legyenek. Az általunk mért citokin szintek megegyeztek a szakirodalomban

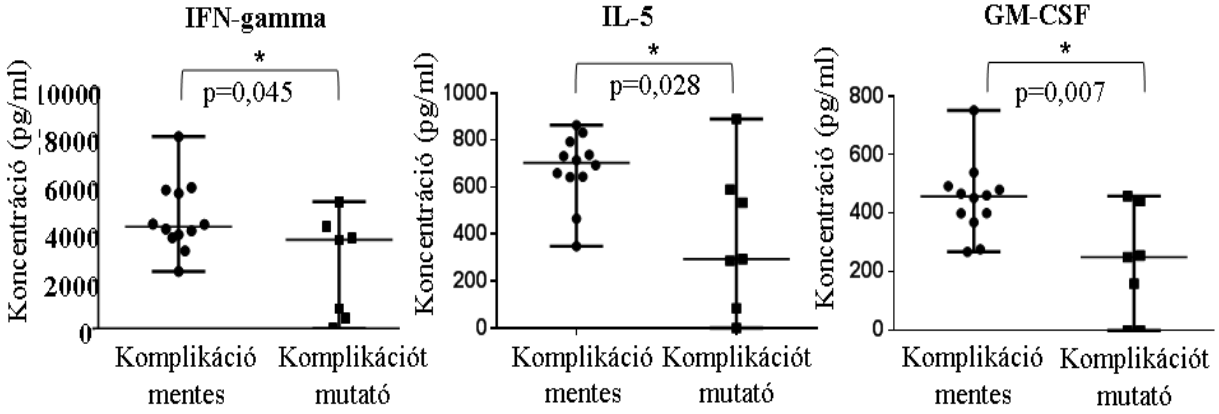
közölt, hasonló eredményekkel (9. táblázat), ezért úgy gondoltuk, hogy felhasználhatjuk a további vizsgálatainkhoz.

9. táblázat. Könnyben mért citokin szintek összehasonlítása

Citokinek	**Jelen vizsgálatban mért citokin koncentrációk (pg/ml)**	**Martinez de la Casa és mtsai.** [263] **által mért citokin koncentrációk (pg/ml)**		
	Könny	**Kontroll Könny**	**Könny Xalatan használóktól**	**Könny Monoprost használóktól**
bFGF	725,5±114,5	303,7±215,9	547±355,8	358,5±435,1
Eotaxin	388,04±71,7	396,8±251,7	512,4±327,5	385,5±352,
G-CSF	774,5±131,2	621,7±483,1	700,7±489,7	596,7±722,3
GM-CSF	359±73,9	168,9±124,4	227±136,4	162,2±201,8
IFN-γ	3763±680	2034,3±1331,9	2677,1±1857,3	1989,4±1852,7
IL-10	497,45±116,4	2431±182,8	392,7±295,5	290,7±351,4
IL-12	450,2±72,9	334,3±222,3	505,9±328,4	377,2±443,2
IL-13	293,5±52,7	121±95,3	193,6±129,5	138,7±160,5
IL-15	211,7±43,7	149,3±107,1	228,4±130,4	122,9±76,1
IL-17	1670,9±352,3	343,8±332,8	634,4±472,5	295,5±280,2
IL-1b	64,2±13,6	52±44,4	73,7±60	53,1±67
IL-1ra	3236 ±824	18120 ±17296	14150 ±10067	14069 ±10054
IL-2	12,7±7,5	79,5±67,8	130,2±84,7	68,7±63,2
IL-4	63,9±9,9	58,9±40,3	75,1±53,4	57,5±54,1
IL-5	553,5±102,4	150,6±133,5	258,9±221,34	181,6±217,6
IL-6	94,6±17,75	161,8±150,4	185,9±131,4	162,5±171,1
IL-7	686,7±109,	442,3±343,3	631,1±475,9	488,2±461,7
IL-8	315,4±55,3	573,9±465,3	475,8±314,4	428,5±289,5
IL-9	210,35±57,3	230,6±168,1	340±244,8	272,7±281,4
IP-10	7816,7±2268,7	25632 ±28754	14131 ±15142	21530 ±20542
MCP-1	1004,4±179	489,7±304,5	633,3±388,6	560±463
MIP-1α	67,1±11,1	54,9±38,4	70,1±44	53±56
MIP-1β	45,4±13,1	174±176,8	124,1±78	107,3±129,7
PDGF-BB	707,1±173,6	126,2±113,4	235±201	166,6±248,6
RANTES	210,2±35,7	320±218,7	394,3±228,7	305,1±308,7
TNFα	1466,1±265,4	317,1±263,1	602,4±502	265,7±263,8
VEGF	805,7±200,4	476,4±286,3	495,5±282,8	464,4±312,8

Az általunk vizsgált citokinek mennyiségének összehasonlítása kontroll, ill. két különböző szemcseppet használó zöldhályogban szenvedő betegek könnyében. Az oszlopokban a különböző könnymintákban mért átlag koncentrációk és a szórás értékek vannak feltüntetve minden egyes citokin esetében.

A citokin szinteket, valamint a betegekről rendelkezésre álló egyéb adatokat felhasználva statisztikai elemzést végeztünk. Megnéztük, hogy a zöldhályog típusa, a nem, a háromnál több vagy kevesebb hatóanyagot tartalmazó szemcseppek alkalmazása, a könnytermelés sebessége, a begyűjtött könny fehérje mennyisége, valamint a késői komplikációk megjelenése alapján képzett csoportok között van-e szignifikáns eltérés a citokinek koncentrációjában. Azt találtuk, hogy három citokin esetében statisztikailag szignifikáns, alacsonyabb értékeket tudtunk kimutatni a komplikációt mutató csoportban. Eredményeink alapján az IFN-γ , az IL-5 és GM-CSF szintje a műtét után egy évvel komplikációt mutató páciensek műtét előtt vett könnyében alacsonyabb értéket mutatott, mint a komplikáció-mentes betegek esetében (23. ábra).



23. ábra. A komplikációt mutató és komplikáció mentes csoportok között statisztikailag szignifikáns különbséget mutató citokinek koncentrációja.
Az „x" tengelyen a csoportok, az „y" tengelyen pedig a pg/ml-ben kifejezett koncentráció értékek vannak feltüntetve. Mindegyik citokin esetében a p értéket is feltüntettük. A * a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket mutatja.

Az IFN-gammát a T helper és a citotoxikus T limfociták, valamint az NK sejtek termelik. A citokin vírusellenes, tumor ellenes és immunmoduláló szereppel is rendelkezik [264]. Megfigyelték, hogy az emelkedett IFN-γ szint gátolja a kollagén szintézist és az epidermális sebgyógyulás elhúzódásához vezet [265,266]. Egy másik tanulmány szerint a mesenchimális őssejtek csökkentették az IFN-γ termelésüket kémiai ágens által kiváltott szaruhártya sérülés során, így csökkentve a gyulladást és az érujdonképződést, ami kevesebb epitél hibával végbemenő sebgyógyulást eredményezett [267].

Az IL-5-t főként a Th2 típusú helper T limfociták termelik, és fontos szerepe van a B sejtek differenciációjában, valamint az eozinofilok aktiválásában, proliferációjában és

túlélésében [268]. Azt figyelték meg, hogy olyan egerekben, amelyek túltermelik az IL-5-t a sebgyógyulás késleltetett és a reepitelizáció nem megfelelő módon megy végbe [269].

A GM-CSF a granulocita és makrofág sejtvonalakat aktiválja, de emellett fontos serkentője a keratinocita proliferációnak, illetve az epitél sejtek vándorlásának, ezáltal elősegíti a sebgyógyulást [270]. Krónikus sebek esetén rekombináns GM-CSF alkalmazása segítheti a sebgyógyulás folyamatát. Kimutatták, hogy a GM-CSF-nek szerepe van a korai szemet érintő sebgyógyulási folyamatokban, és azt találták, hogy a rekombináns GM-CSF nem a sejtproliferációt, hanem a migrációt segíti [271,272].

Mindhárom citokin megnövekedett mennyisége elősegíti a sebgyógyulást, csökkent értékük egyfajta ellenhatás lehet a túl gyors sebgyógyulás ellensúlyozására. Adataink alapján úgy gondoljuk, hogy egy nagyon komplex folyamattal állunk szemben, ahol a hosszú távú kimenetet a korai fázisban megjelenő citokinek és egyéb faktorok együttes, feltehetően egymást kiegészítő hatása határozza meg.

Folyamatban van egy felmérés, amely a szervezet többi részében egyébként végbemenő sebgyógyulási sajátosságokat vizsgálja a komplikációt mutató és komplikációmentes betegek esetében, de ez az információ még nem áll rendelkezésünkre. Előfordulhat, hogy a trabekulektómia hosszú távú komplikációit okozó megváltozott sebgyógyulás nem csak a zöldhályogban szenvedő egyes betegek esetében jelenik meg, hanem ez egyéni sajátosság, amely bizonyos körülmények között előnyt jelent a gyorsabb sebgyógyulási folyamatok révén, viszont a trabekulektómia esetén hátrányos lehet.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a három citokin szintjének vizsgálata segíthet a komplikációk megjelenése szempontjából nagyobb kockázatú csoportba történő besorolásnál. Természetesen további vizsgálatok szükségesek e potenciális biomarker citokinek validálására, mert a kis mintaszám alapján nem vonhatunk le egyértelmű következtetéseket a teljes populációra vonatkozóan. Az ilyen jellegű biomarkerek azonosítása azért kiemelten fontos, mert a műtét során bizonyos esetekben alkalmazhatnak mitomicin C-t vagy végezhetnek ún. Ex-press shunt beültetést [273,274]. Amennyiben sikerül egy komplikációk megjelenése szempontjából magasabb kockázatú csoportot elkülöníteni, az ő esetükben, a műtés során kialakított lebeny korai letapadásának megelőzésében jelentős szerepet kaphat a mitomicin C alkalmazása [275].

Érdekes módon a többi vizsgált faktor esetében nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltéréseket.

5.3.4.2. Citokinek mennyiségének vizsgálata csarnokvízben

A könny esetében említett vizsgálatokat elvégeztük a műtét során gyűjtött csarnokvíz mintákból is. A csarnokvízben nem mind a 27 citokin kimutatása volt lehetséges minden mintában; az IL-1β, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, G-CSF és IFN-γ a minták kevesebb, mint a felében, míg az IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, bFGF és MIP-1α a minták 70-85%-ában volt kimutatható. Eredményeinket, a könnymintákhoz hasonlóan, összevetettük az irodalomban közölt adatokkal, és itt is egyezést találtunk (10. táblázat).

10. táblázat. Csarnokvízben mért citokin szintek összehasonlítása

Citokin	**Jelen vizsgálatban mért citokin koncentráció (pg/ml)**	**Duvesh és mtsai.** [276] **által mért citokin koncentráció (pg/ml)**		**Sharma és mtsai.** [251] **által mért citokin koncentráció (pg/ml)**	**Garweg és mtsai.** [277] **által mért citokin koncentráció (pg/ml)**		
	Csarnokvíz	**POAG csarnok-víz**	**Szürke-hályog csarnok-víz**	**Szürkehályog csarnokvíz**	**Kontroll csarnok-víz**	**Korai PEX csarnok-víz**	**Késői PEX csarnok-víz**
bFGF	75,86±26,1	4,92	7,22	20,66±2,6	NS	NS	NS
Eotaxin	5,95±2	10,41	7,9	11,73±1,6	5,7	8,2	9,8
G-CSF	25,58±20,4	2,55	3,14	1,26	NS	NS	NS
GM-CSF	174,5±49	287,22	462,08	NS	69	98	111,7
IFN-γ	6,75±4,8	ND	ND	NS	NS	NS	NS
IL-10	5,96±4,7	8,27	10,86	NS	0,3	3,8	4,7
IL-12	16,98±4,6	30,93	31,18	NS	NS	NS	NS
IL-13	4,90±1,9	3,42	2,83	NS	NS	NS	NS
IL-15	26,80±5,7	16,13	18,42	NS	NS	NS	NS
IL-17	47,26±20,2	7,5	14,61	NS	NS	NS	NS
IL-1b	0,23±0,1	0,32	0,37	NS	0,6	0,4	0,5
IL-1ra	1113 ±504	7,16	12,73	5,81±0,9	NS	NS	NS
IL-2	6,58±3,2	ND	ND	NS	0,5	1,1	1
IL-4	0,72±0,4	ND	ND	NS	3,4	32	48,6
IL-5	4,82±2,4	0,36	0,58	NS	NS	NS	NS
IL-6	43,77±31,1	26,9	47,33	5,81±3,6	4,1	2,2	3,1
IL-7	9,85±7,5	3,7	3,69	NS	NS	NS	NS
IL-8	2,74±2,3	19,6	10,6	4,94±1	3,7	3,7	6,5
IL-9	2,13±1,7	1,3	2,66	NS	NS	NS	NS

IP-10	384±157	386,2	61,91	NS	42	33,4	64,2
MCP-1	365±82	809,68	598,16	308±95	244,5	368,1	361,6
MIP-1α	1,05±0,39	1,43	0,91	7,13±1,2	0,8	0,9	1,1
MIP-1β	9,98±3,95	51,29	20,77	21,70±6,97	NS	NS	NS
PDGF-BB	22,7±14,3	ND	ND	NS	NS	NS	NS
RANTES	34,91±22,3	ND	ND	2,33±0,7	NS	NS	NS
TNFα	13,49±6,8	4,4	6,95	NS	6,8	5,1	6,6
VEGF	131±37	135,35	144,85	215±45	NS	NS	NS

Az általunk vizsgált citokinek mennyiségének összehasonlítása más munkacsoportok által zöldhályogban szenvedő betegek csarnokvizében mért értékekkel. Az oszlopokban a különböző mintákban mért átlag citokin koncentrációk és a szórás értékek vannak feltüntetve minden egyes citokin esetében. Az „NS” az adott kísérletben nem vizsgált, míg az „ND” a vizsgált, de nem kimutatható citokinre vonatkozik.

A könnynél ismertetett csoportosításokat és statisztikai elemzéseket elvégeztük a csarnokvízben mért citokinek esetében is, de statisztikailag szignifikáns változást sehol sem tapasztaltunk.

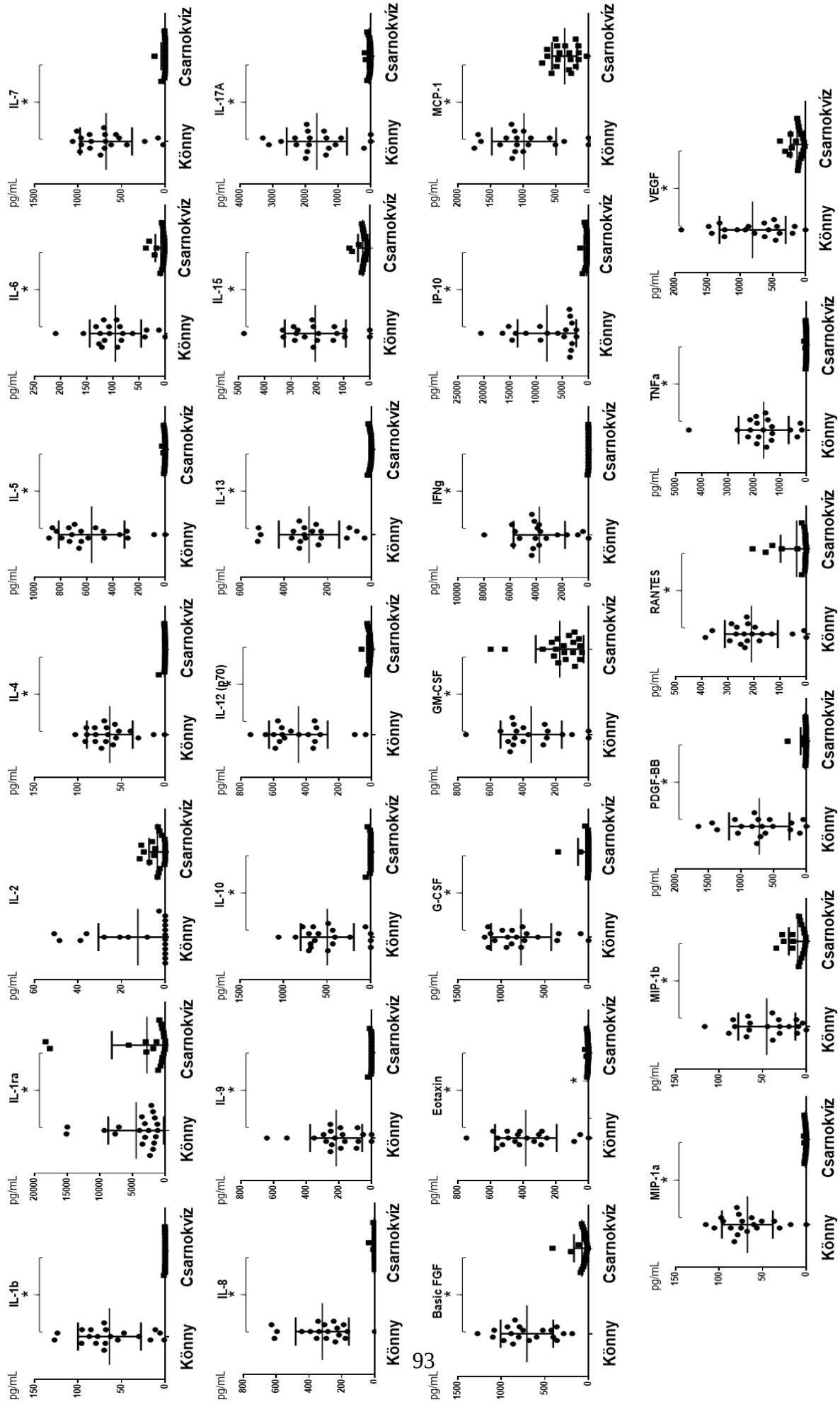
5.3.4.3. Könny és csarnokvíz citokin tartalmának összehasonlítása

Ezután a következő lépésben összehasonlítottuk egymással a könnyben és csarnokvízben mért citokin szinteket, és az IL-2 kivételével minden esetben statisztikailag szignifikáns növekedést tapasztaltunk a könnyben mért citokinek koncentrációjában a csarnokvízben mért értékekhez képest (24. ábra).

Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy a citokinek mennyiségének változása nem korrelál a könny és csarnokvíz minták között, feltehetően más faktorok szabályozzák a kétféle biológiai közegben a citokinek mennyiségét.

24. ábra. A műtét előtt gyűjtött könnyben, ill. a műtét során gyűjtött csarnokvízben mért citokinek és kemokinek koncentrációja zöldhályog műtéten átesett betegektől gyűjtött mintákban.

Az „x” tengelyen a minta típusát, míg az „y” tengelyen az adott citokin pg/ml-ben mért koncentrációját tüntettük fel. A * statisztikailag szignifikáns ($p<0,05$) különbséget jelöl.


IL-1b
IL-1ra
IL-2
IL-4
IL-5
IL-6
IL-7
IL-8
IL-9
IL-10
IL-12 (p70)
IL-13
IL-15
IL-17A
Basic FGF
Eotaxin
G-CSF
GM-CSF
IFNg
IP-10
MCP-1
MIP-1a
MIP-1b
PDGF-BB
RANTES
TNFa
VEGF
pg/mL
Könny
Csarnokvíz

Zöldhályogban szenvedő betegek könnyében más kutatócsoportok is magasabb gyulladásos citokin koncentrációkat mértek, és ezt a hatást a szemcseppekben levő tartósítószer jelenlétének tulajdonították [250]. Figyelembe véve, hogy a vizsgálatunkba bevont betegek esetében a trabekulektómiára éppen azért volt szükség, mert a több hónapig tartó, többféle szemcseppet és több hatóanyagot tartalmazó topikális terápia sikertelen volt, érthető a csarnokvízhez képest mért magasabb gyulladásos citokin koncentráció. Ugyanakkor, a háromnál több, vagy kevesebb hatóanyagot tartalmazó cseppet alkalmazó csoportok között nem volt szignifikáns különbség a könnyben mérhető citokinek koncentrációjában. Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy aki kevesebb féle hatóanyagot kapott, az is tartósítószer tartalmú szemcsepp formájában kapta azokat. Érdemes lenne elvégezni a kísérletet nagyobb betegpopuláción, olyan betegeket is bevonva, akik használnak szemcseppet, de tartósítószer-mentes változatot. Olyan jellegű vizsgálatokat, hogy mely szemcseppekben található adalékanyag vagy anyagok okozhatják az emelkedett gyulladásos citokin szinteket és esetlegesen ezek mivel helyettesíthetők, tudtommal nem végeztek.

Eredményeink alapján a könny és a csarnokvíz nem egyenértékű minták, és a könny vizsgálata feltehetően nem helyettesítheti a csarnokvíz vizsgálatát. Viszont olyan esetekben, amikor ugyanazon beteg több időpontban vett mintáját hasonlítjuk össze (pl. trabekulektómia utáni követéses vizsgálatok), a könny megfelelően használható potenciális biomarker forrás lehet.

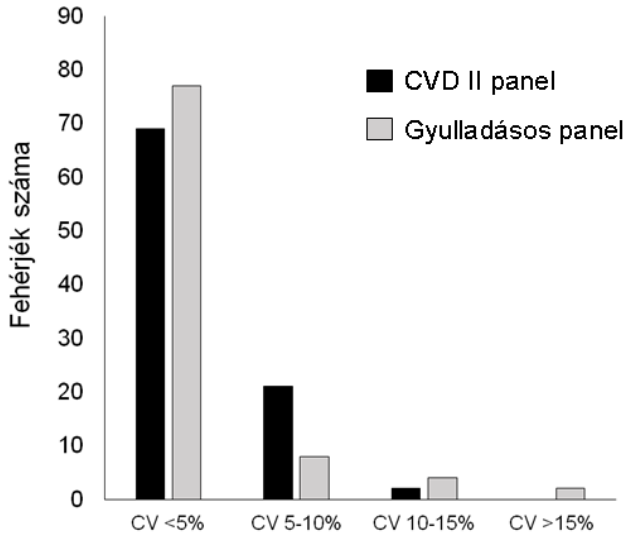
5.3.4.4. Könny fehérje profil változások tanulmányozása trabekulektómia után bekövetkező sebgyógyulás során

A műtét által indukált sérülés után az első néhány órában elkezdődik a sebgyógyulás pontosan szabályozott folyamata [278–280]. Az egyes fázisok közötti határok nem élesek és nagyban átfednek egymással.

Azért, hogy több információt nyerhessünk a szemben végbemenő sebgyógyulás komplex folyamatáról, a citokineken kívül más anyagok mennyiségét is meg kívántuk vizsgálni. Először egy MRM/SRM-alapú célzott proteomikai módszert terveztünk növekedési faktorok vizsgálatára, de módszerünk nem bizonyult kellőképpen érzékenynek. A standardokban és a referencia mintákban a hepatocita-, keratinocita-, epidermális- és inzulin-szerű növekedési faktor (HGF, KGF, EGF, IGF-1) kimutatható volt, viszont a betegektől származó egyedi könnymintákban nem tudtuk ezeket a molekulákat detektálni. Vizsgálataink eredménye arra ösztönözött, hogy más multiplex módszereket keressek a kis mennyiségben rendelkezésre álló egyedi könnyminták vizsgálatára. Az egyik ilyen lehetséges módszer az

ún. proximity extension assay (PEA), amely segítségével lehetőség van 1 µl mintából 96 fehérje relatív mennyiségi analízisére [281–283]. Tekintve, hogy betegenként átlagosan 3-5 µl könnyminta állt rendelkezésre, ezt a módszert választottam a további vizsgálatokhoz. A módszer hátránya az, hogy nem akármilyen fehérje, hanem fehérjék előre meghatározott kombinációja (analízis panel) vizsgálható. Alaposan megvizsgálva a lehetőségeket, két panel mellett döntöttem, amely korábbi eredményeink és az irodalmi adatok alapján számunkra érdekes fehérjék közül a legtöbbet tartalmazták. Ez a két panel a gyulladásos (https://www.olink.com/products/inflammation/) és a kardiovaszkuláris (CVD) II panel (https://www.olink.com/products/cvd-ii-panel/) volt. A két panel segítségével 184 fehérje relatív mennyiségét tudtuk megvizsgálni a betegektől származó könnymintákban. A vizsgálat kissé kockázatos volt, ugyanis nem állt rendelkezésre információ arra vonatkozóan, hogy a módszer könnyminták vizsgálatára alkalmazható-e.

A PEA analízis megbízhatósága megfelelőnek bizonyult, ugyanis a legtöbb fehérje mennyiségi analízise <5% varianciával volt kivitelezhető (25. ábra).



25. ábra. Mennyiségi analízis megbízhatóságának vizsgálata az egyes panelek esetében.
Az "x" tengelyen feltüntetett variancia (CV%) értékekkel kvantitálható fehérjék számát az "y" tengely mutatja a CVDII és Gyulladásos panelek esetében. A fekete szín a CVDII, míg szürke szín a Gyulladásos panelt jelöli.

Vizsgálatunk sikeres volt, ugyanis a 60 mintából 57 a gyulladásos panel esetén, ill. 55 a CVDII panel esetén megfelelt a módszer során alkalmazott szigorú minőségellenőrzési feltételeknek. A CVDII panel esetében a fehérjék 60%-a a minták több mint 75%-ban kimutatható volt, míg a gyulladásos panel esetében a fehérjék 45%-a volt detektálható a minták legalább 75%-ban.

Ezen eredmények tükrében kijelenthetjük, hogy a PEA módszer megfelelően használható könnyminták vizsgálatára.

Annak érdekében, hogy több információt nyerhessünk a sebgyógyulás során bekövetkező változásokról, megvizsgáltuk a PEA módszerrel nyert eredményeket. Vizsgálataink ezen szakaszában 8 pácienstől különböző időpontokban gyűjtött 60 mintát vontunk be (Függelék 3. táblázat). A mintagyűjtést a műtét előtti napon (D0) gyűjtött könnymintával kezdtük, majd mintát vettük a trabekulektómia utáni első (D1) és negyedik napon (D4), valamint három hónappal később (D90). Egy páciens nem jelent meg a három hónapos kontrollon, és csak 10 hónappal a műtét után tudtunk tőle mintát venni. Csak olyan betegeket vontunk be ebbe a vizsgálatba, akiknek nem volt szisztémás gyulladásuk, autoimmun betegségük vagy a zöldhályogon kívül, egyéb szemet érintő betegségük. A pácienseket két csoportba soroltuk: „komplikációt mutató" és „komplikáció mentes". A „komplikáció mentes" csoportba tartoztak azok, akiknél a művi lebeny jól filtrált, és az időközi ellenőrző vizsgálatoknál, valamint az egy éves kontroll során nem mutattak ki lebenyhez kapcsolódó komplikációt (vékony, vagy cisztózus lebeny, lebeny letapadás) vagy blebitiszt. 3 páciens esetében a műtét nem tudta megfelelően csökkenteni a szemnyomást, ezért szemnyomás csökkentő szemcseppek ismételt alkalmazása vált szükségessé. Ezt a 3 beteget a „komplikációt mutató" csoportba soroltuk.

A könnyfehérjék minőségi analízise

A PEA módszerrel meghatározott fehérjék minőségi és mennyiségi analízisét e két csoport viszonylatában vizsgáltuk. Először egy minőségi összehasonlítást végeztünk és meghatároztuk azokat a fehérjéket, amelyek nagyobb eséllyel jelentek meg egyik vagy másik csoportban (11. táblázat). Azokat a fehérjéket, ahol a megjelenés %-a a mintákban legalább 20%-nyi különbséget mutatott a két csoport között, tovább vizsgáltuk.

11. táblázat. A két csoportban eltérő gyakorisággal előforduló fehérjék listája

String adatbázis által használt fehérje kód (génnév)	Olink által használt fehérje kód	A minták %-a ahol a fehérje megjelent a komplikáció mentes csoportban	A minták %-a ahol a fehérje megjelent a komplikáci-ót mutató csoportban	Az előfordulási gyakoriság változásának iránya a komplikáció-mentes csoporthoz képest	Biológiai szerep	Szerep a sebgyógyulás-ban
ADAMTS 13	ADAM-TS13	68	45	csökkenés	kötődés receptorhoz*	hiánya növeli a neutrofilek extravazációját

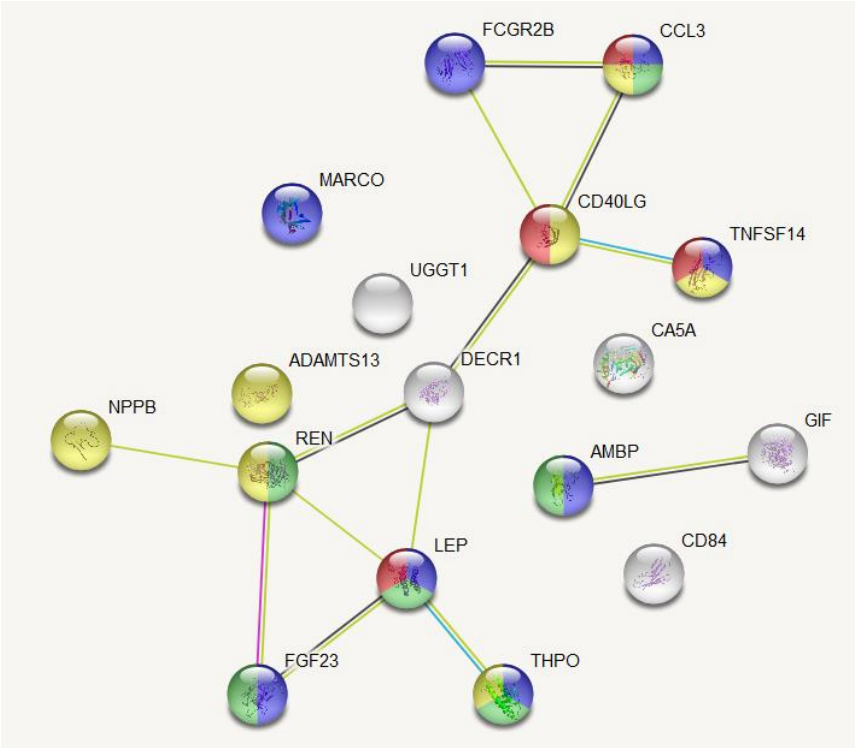
AMBP	AMBP	84	64	csökkenés	immun-folyamatok szabályozása, MAPK kaszkád szabályozása *	hiánya szignifikánsan több patológiás sejt megjelenését eredményezi a légutak sérülése során
ARTN	ARTN	47	91	növekedés	neurotróf faktor, RET receptor ligand #	segíti a sebgyógyulást
CA5A	CA5A	32	0	csökkenés	metabolizmus #	keloid típusú sebekben mutattak ki alacsony szénsav anhidráz szintet
CCL3	CCL3	89	64	csökkenés	immun-folyamatok szabályozása, MAPK kaszkád szabályozása, citokin–citokin receptor interakció, kötődés receptorhoz *	elősegíti a makrofágok bevonását; csökkent CCL3 szinteket figyeltek meg sebgyógyulási problémák során
CD40LG	CD40-L	74	45	csökkenés	citokin–citokin receptor interakció, kötődés receptorhoz *	hiánya túlzott kollagén lerakódáshoz vezet
CD84	CD84	74	27	csökkenés	az immunsejtek differenciációjának módosítása és aktiválása, immunsejtek szabályozása #	még nem azonosították
DECR1	DECR1	95	73	csökkenés	metabolizmus #	még nem azonosították
FCGR2B	IgG Fc receptor II-b	47	18	csökkenés	immun-folyamatok szabályozása *	még nem azonosították
FGF19	FGF-19	37	64	növekedés	epesav szintézis szabályozása #	más FGF-ek segítik a sebgyógyulást
FGF23	FGF-23	89	55	csökkenés	immun-folyamatok szabályozása, MAPK kaszkád szabályozása *	más FGF-ek segítik a sebgyógyulást

GIF	GIF	68	45	csökkenés	cianokobala-min felszívódás#	még nem azonosították
IL-10RA	IL-10RA	5	36	növekedés	citokin–citokin receptor interakció *	elősegíti a mieloid sejtek túlélését
IL-17C	IL-17C	37	64	növekedés	citokin–citokin receptor interakció #	túlzott kifejeződését figyelték meg psoriasis-ban
IL-20RA	IL-20RA	53	82	növekedés	citokin–citokin receptor interakció *	elősegíti a korneális epiteliális sebgyógyulást
LEP	LEP	79	36	csökkenés	immun-folyamatok szabályozása, MAPK kaszkád szabályozása, citokin–citokin receptor interakció *	elősegíti a sebgyógyulást
MARCO	MARCO	42	9	csökkenés	immun-folyamatok szabályozása *	még nem azonosították
NPPB	BNP	47	18	csökkenés	kötődés receptorhoz *	elősegíti a sebgyógyulást
REN	REN	84	55	csökkenés	MAPK kaszkád szabályozása, kötődés receptorhoz *	körülményektől függően elősegíti vagy gátolja a sebgyógyulást
THPO	THPO	42	0	csökkenés	immun-folyamatok szabályozása, MAPK kaszkád szabályozása, kötődés receptorhoz *	THPO receptor agonista enyhén elhúzódó sebgyógyulást eredményez
TNFSF11	TRANCE	16	36	növekedés	citokin–citokin receptor interakció*, sejtproliferá-ció #	még nem azonosították
TNFSF14	TNFSF14	100	73	csökkenés	immun-folyamatok szabályozása, citokin–citokin receptor interakció, kötődés receptorhoz *	hiánya elősegíti az immunsejtek felhalmozódását növeli a citokin szinteket, rontja a sebgyógyulást

UGGT1	GT	26	0	csökkenés	fehérje feltekeredés, minőségelle-nőrzés #	még nem azonosították

A komplikáció mentes és komplikációt mutató csoportban megfigyelt előfordulás százalékát tüntettük fel minden olyan fehérje esetében, ahol az előfordulásbeli különbség a két csoport között legalább 20% volt. Feltüntettük a fehérje előfordulási gyakoriság változásának irányát a komplikáció mentes csoporthoz képest, a fehérje biológiai szerepét a génontológia (GO) szerint, valamint a sebgyógyulásban betöltött szerepét. A * a String adatbázis által listázott feldúsult GO funkcióra, míg a # a String adatbázisban listázott funkcióra vonatkozik. A fehérjéket a génnevek alapján jelöltük.

Kikerestük biológiai funkcióikat, és megkerestük a szakirodalomban közölt információk között a sebgyógyulásban betöltött szerepüket. Hogy jobban megérthessük a megfigyelt jelenséget, a fehérjéket a String segítségével fehérje-fehérje interakciós hálózatokba rendeztük és megvizsgáltuk a String által szignifikánsnak jelölt feldúsult GO funkciókat (26. ábra, 27. ábra).

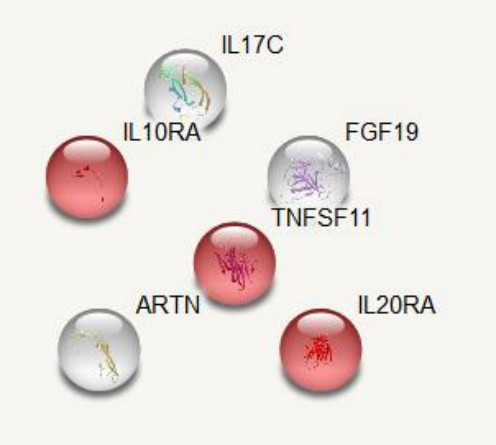


26. ábra. A komplikációt mutató csoportban kisebb gyakorisággal előforduló fehérjék hálózata.
A fehérjék hálózatát a String adatbázis segítségével rajzoltuk meg. A golyók a fehérjéket, a vonalak a fehérjék közötti interakciókat jelentik, míg a fehérjék színe a funkciójukra utal. A piros szín citokin-citokin receptor interakcióban résztvevő fehérjékre utal, a kék szín az immunfolyamatok szabályozásában résztvevő fehérjékre, a zöld szín a MAPK kaszkád szabályozásában, a sárga pedig a receptorhoz való kötődésben szerepet játszó fehérjékre vonatkozik. A fehérjéket a génnevek segítségével jelöltük.

Azok a fehérjék, amelyek kisebb valószínűséggel jelentek meg a komplikációt mutató csoportban főként a receptorhoz való kötődésben, MAPK kaszkád szabályozásában és immunregulációban vettek részt (26. ábra). Ezen funkciók mellett a 2,4-dienoil CoA reduktáz 1 és a szénsav anhidráz 5a fontos metabolikus szereppel rendelkezik. Kimutatták, hogy a szénsav anhidráz bizonyos formái kifejeződnek a bőrben sebgyógyulás során, és a normál bőrben nagyobb mennyiségben mutatták ki, mint a sebgyógyulási komplikációt mutató keloidos sebekben [284]. Az UDP-glükóz glikozil-transzferáz 1 enzimnek fontos szerepe van a fehérje feltekeredés minőségellenőrzésében. Felismeri a kisebb hibákat tartalmazó glikozilált fehérjéket, újra glikozilálja őket, elősegítve újrahasznosításukat az endoplazmatikus retikulumban [285]. A gyomorban található intrinzik faktor (GIF) elsődleges szerepe a cianokobalamin felszívásában van, és ez idáig nem hozták összefüggésbe a sebgyógyulással. Ugyanakkor az atriális nátriuretikus peptid (NPPB), leptin, renin és ADMTS13 szerepét már leírták a sebgyógyulásban: az ADAMTS13 hiánya a sebgyógyulás korai fázisában segíti a neutrofilek extravazációját [286], a leptin és az atriális nátriuretikus peptid elősegíti a sebgyógyulást [287–289], míg a renin-angiotenzin rendszer esetében az adatok nem egyértelműek. Egyes kutatások szerint elősegíti a gyulladást, a proliferációt és a fibrózist, míg más kutatások szerint gyulladáscsökkentő, anti proliferációs és antifibrotikus hatása van [290].

Ezzel szemben hat fehérje gyakrabban jelent meg a komplikációt mutató mintákban, és elsősorban a citokinek kötésében vettek részt (27. ábra).

Az IL-10 receptor antigén, IL-20 receptor antigén, tumor nekrózis faktor (TNF) szupercsalád tag 11 (TNFSF11) és IL-17C elsősorban az immunválasz szabályozásában vesz részt, a fibroblaszt növekedési faktor 19 (FGF19) és artemin (ARTN) pedig fontos szerepet tölt be a sebgyógyulásban [291,292]. Az IL-17C esetében kimutatták, hogy elősegíti az epitél sejtek veleszületett immunválaszát azáltal, hogy az NF-kappa-B és MAPK szignálutakon keresztül serkenti az antimikrobiális és immunmodulátor molekulák termelését [293].



27. ábra. A komplikációt mutató csoportban nagyobb gyakorisággal előforduló fehérjék hálózata.
A fehérjék hálózatát a String adatbázis segítségével rajzoltuk meg. A golyók a fehérjéket, a vonalak a fehérjék közötti interakciókat jelentik, míg a fehérjék színe a funkciójukra utal. A piros szín a citokin-citokin receptor interakcióban résztvevő fehérjékre utal. A fehérjéket a génnevek segítségével jelöltük.

Érdekes megfigyelni, hogy míg a komplikációt mutató mintákban kisebb valószínűséggel megjelenő fehérjék egy viszonylag aktív interakciós hálózat részeként működnek (17 fehérje, 13 kapcsolat), addig a nagyobb valószínűséggel megjelenő fehérjék nem alkotnak interakciós hálózatot, pontosabban más, általunk nem vizsgált fehérjékkel alkothatnak interakciós hálózatot.

A könnyfehérjék mennyiségi analízise

A minőségi analízissel nyert információk kiegészítésére és az adatsorban levő információk kiaknázására elvégeztük a vizsgált fehérjék mennyiségi analízisét is. Tekintve, hogy 46 fehérje csak a minták kevesebb, mint 30%-ban volt jelen, további vizsgálatainkból ezeket a fehérjéket kihagytuk.

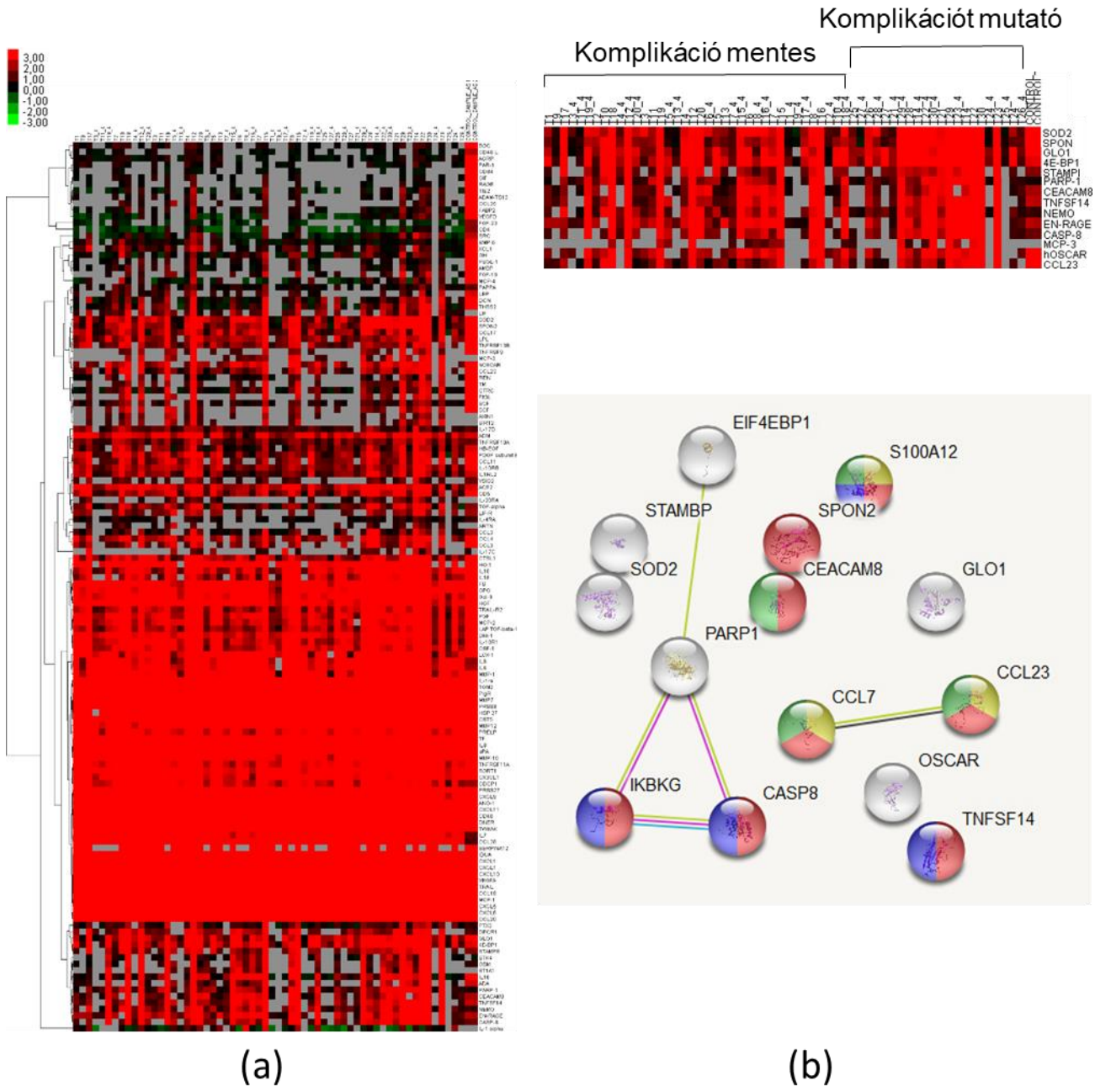
A mennyiségi információk figyelembe vételével elvégzett hierarchikus klaszterezés során nyert hőtérkép (heatmap) (28. ábra) alapján nem lehet egyértelműen elkülöníteni a két csoportot egymástól, aminek egyik lehetséges oka a viszonylag kis mintaszám. Jobban megnézve, azonban vannak olyan régiók, ahol különbségeket lehet kimutatni a két csoport között. A komplikációt mutató csoportban 13 fehérje mennyiségének növekedése figyelhető meg az ábra alapján. Ezen fehérjék funkcionális analízise azt mutatja, hogy a fehérjéknek főként az immunválaszban (GO:0006955) van szerepük. A kaszpáz 8, protein S100A12, TNF szupercsalád tag 14, karcinoembrionális antigén-szerű sejtadhéziós molekula 8, NF-kappa B esszenciális modulátor, spondin 2, MCP-3/CCL7 és CCL23 az immunmodulációban és az

immunválasz kialakításában játszanak szerepet. Ugyanakkor a szuperoxid diszmutáz 2 (SOD2) és a glioxaláz 1 (GLO1) megakadályozzák a szabadgyökök és az előrehaladott glikációs végtermékek (AGE) mennyiségnek felszaporodását. Alacsony kifejeződésüket figyelték meg a korral járó sebgyógyulási elégtelenség esetén [294–297]. Viszont nem mindegyik fehérje esetében egyértelmű a sebgyógyulásban betöltött szerepe. Egy szaruhártya sebgyógyulási modellben azt találták, hogy fibronektin hatására megemelkedett a poli-ADP ribóz polimeráz 1 (PARP 1) szintje, ugyanakkor a bőrben a PARP 1 aktivációt a sebgyógyulás elhúzódásával hozták összefüggésbe [298,299]. A PARP-1, SOD2, GLO1 és oszteoklaszt-asszociált immunglobulin-szerű receptor megnövekedett mennyisége további stressz faktorok jelenlétére utalhat a komplikációt mutató csoportban, amelyek megnövelik ezen védekezésben szerepet játszó fehérjék mennyiségét. A szignál transzdukcióba résztvevő adapter fehérjét kötő fehérjéről (STAMBP) kimutatták, hogy elősegíti a sejtek növekedését és proliferációját, míg az EIF-4EBP1 eukarióta iniciációs faktor szerepet játszik a transzlációban. Mindkét fehérje jelenléte szükséges a sebgyógyulás során bekövetkező megnövekedett sejtproliferációhoz [300].

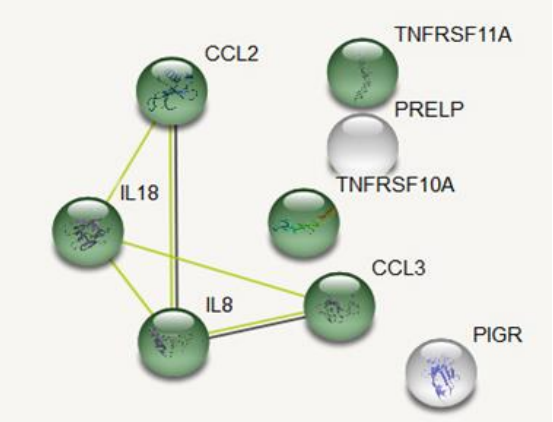
A megbízhatóbb mennyiségi analízis elvégzéséhez nem parametrikus Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. Az elemzés eredményeként 9 fehérje mennyisége mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoport között. A polimer immunglobulin receptor (PIGR) mennyisége kisebb, míg a többi 8 fehérje mennyisége nagyobb volt a komplikációt mutató csoportban a komplikáció-mentes csoporthoz viszonyítva.

A szignifikáns változást mutató fehérjék hálózatanalízise, és a feldúsuló biológiai funkciók elemzése azt mutatta, hogy egy viszonylag kevés interakciót tartalmazó hálózattal állunk szemben, és a hálózatot alkotó fehérjék fő funkciója az immunválaszban való részvétel (29. ábra).

Az ábrán az MMP-12-t nem tudtuk feltüntetni, mert a String adatbázis nem tartalmazta. Az IL-8, IL-18, CCL2, CCL3, TNF receptor szupercsalád-tag 10A és 11A a citokin-citokin receptor interakcióban, a PIGR az IgA és IgM kötésében, míg a prolin/arginin-gazdag és leucin-gazdag ismétlődésű fehérje (PRELP) az extracelluláris mátrix összeszerelésében játszik szerepet [301]. Az MMP-12 szerepet játszik a szemben végbemenő sebgyógyulás korai szakaszában, elősegíti a korneális epitél sejtek vándorlását és a neutrofilek infiltrációját [302].



28. ábra. A PEA módszerrel vizsgált fehérjék mennyiségi analízise.
(**a**) A minták legalább 30%-ában megjelenő fehérjék relatív mennyisége (NPX) alapján felrajzolt hőtérkép. A szürke szín azokat a mintákat jelöli, ahol az adott fehérje mennyisége a detektálási határ alatt volt. (**b**) A komplikációt mutató csoportban nagyobb mennyiségben megjelenő fehérjéket tartalmazó kinagyított kép, illetve a fehérjék String segítségével rajzolt hálózata. A golyók a fehérjéket, a vonalak a fehérjék közötti interakciókat jelentik, míg a fehérjék színe a funkciójukra utal. A piros szín az immunválasz szabályozásában, a sárga szín a monociták kemotaxisában, a kék szín az NF-kappa B szignálútban, míg a zöld a leukocita migrációban szerepet játszó fehérjéket jelöli. A fehérjéket a génnevek alapján jelöltük. Az a és b ábrarészben szereplő eltérő rövidítéssel jelölt ugyanazon fehérjék (4E-BP1 – EIF4EBP1, EN-RAGE – S100A12, NEMO – IKBKG) a különböző adatbázisokban, az egyes szoftverek által használt eltérő rövidítések eredményei.

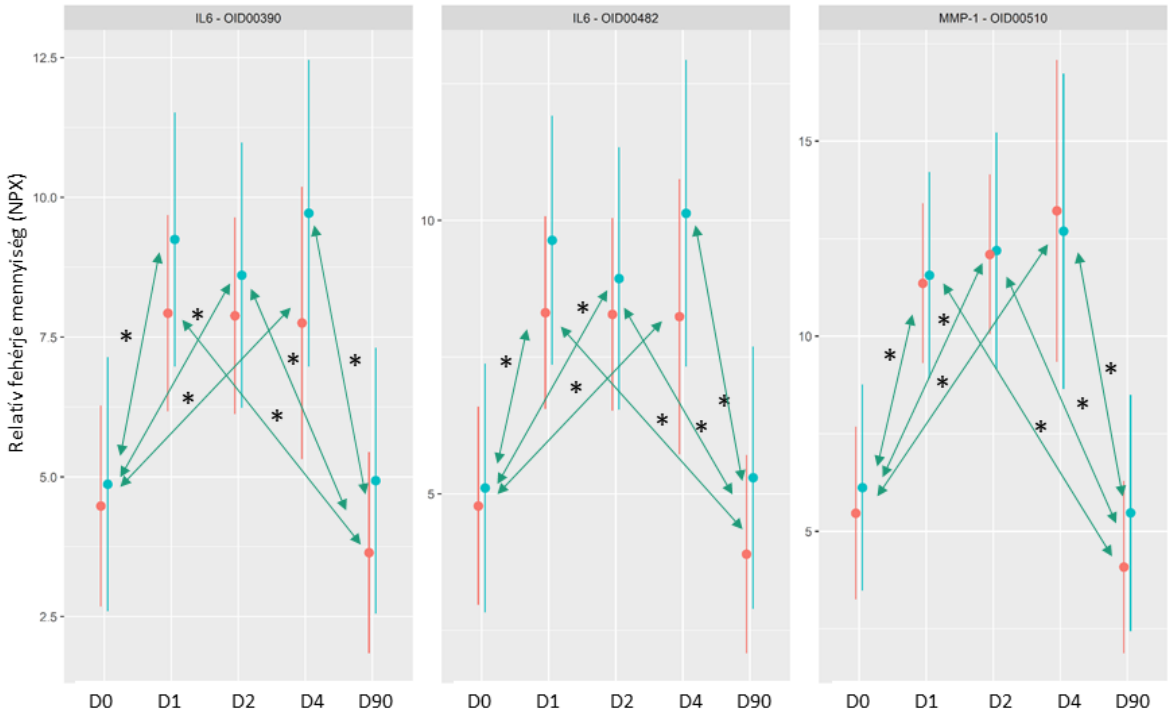


29. ábra. A komplikációt mutató csoportban statisztikailag szignifikáns mértékben megnövekedett mennyiségben megjelenő fehérjék fehérje-fehérje interakciós hálózata. A golyók a fehérjéket, a vonalak a fehérjék közötti interakciókat jelentik, míg a fehérjék színe a funkciójukra utal. A zöld szín a leukocita migrációban szerepet játszó fehérjéket jelöli. A fehérjéket a génnevek alapján jelöltük.

Mind a kvalitatív, mind a kvantitatív analízis eredményei olyan fehérjék szerepét mutatták fontosnak a komplikáció kialakulásában, amelyek az immunválasz és a sebgyógyulás komplex folyamatában vesznek részt.

Annak érdekében, hogy még több információt nyerjünk, lineáris kevert modellt és ANOVA analízist alkalmaztunk, amely a csoportok jelenléte mellett figyelembe vette az időfüggést is (30. ábra).

Korábbi citokin vizsgálati eredményeinket megerősítve, a citokinek mennyisége nőtt a korai posztoperatív időszakban, de ezek a változások nem voltak statisztikailag szignifikánsak. Két fehérje, az IL-6 és a MMP-1 esetében találtunk statisztikailag szignifikáns változásokat az egyes időpontok között. A műtét előtti állapothoz képest mindkét fehérje esetében egy statisztikailag szignifikáns növekedés volt megfigyelhető az 1. posztoperatív napon, amely megmaradt a 2. és 4. napon is, majd 3 hónap után a műtét előtti szinteket mértük ismét. Az IL-6 szintje magasabb volt a komplikációt mutató csoportban az összes vizsgált posztoperatív időpontban a komplikáció mentes csoporthoz viszonyítva, de ez a különbség nem mutatkozott statisztikailag szignifikánsnak. Hasonló jelenséget tapasztaltunk az MMP-1 esetében is, de ott a két csoport közötti nagyobb különbség csak a legkésőbbi vizsgált posztoperatív időpontban volt megfigyelhető.



30. ábra. A két csoport között statisztikailag szignifikáns különbségeket mutató fehérjék relatív mennyiségének változása az idő függvényében.
Az „x" tengelyen a mintagyűjtés időpontjait, míg az „y" tengelyen a relatív fehérje mennyiségek (NPX) átlagát és szórását tüntettük fel. Kékkel a komplikációt mutató csoportban, míg pirossal a komplikáció mentes csoportban mért értékeket ábrázoltuk. A * a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket mutatja a zöld nyíllal jelzett összehasonlítás esetében.

Ahhoz, hogy megértsük az IL-6 és MMP-1 mennyiségének változását, megvizsgáltuk ezen molekulák szemben bekövetkező sebgyógyulásban betöltött szerepét.

A szakirodalomban fellelhető információk elsősorban a szaruhártya sebgyógyulására vonatkoznak, kevés információ áll rendelkezésre a scleraban végbemenő folyamatokat illetően.

A szaruhártya esetében a sérülés következtében az első, latencia fázisban a felszabaduló IL-1, IL-6, IL-8 és TNF-α szabályozzák a sebgyógyulás kezdeti szakaszát. Ez a szabályzás nem csak az epitél sejtek rétegére vonatkozik, hanem a sérült határfelületek miatt a citokinek a stróma sebgyógyulását is elindítják. Ekkor jelentős az apoptózis, valamint a bevont immunsejtek nagy erőkkel takarítják el a sérülés következtében létrejött sejttörmeléket. Az IL-1 és más faktorok aktiválják a MMP-okat, amelyek jelentős extracelluláris mátrix átrendeződést idéznek elő. Ebben a fázisban meglevő sejtek közötti kapcsolatok szakadnak fel elősegítve ezáltal a fibronektin polimerizációt és a sejtek

migrációját. Eközben a sérülés helyén EGF, HGF, KGF, trombocita eredetű- és idegi növekedési faktorok (PDGF, NGF) szabadulnak fel a citokinek hatására, és segítik a sebgyógyulást. A seb szélén fokális kapcsolatok alakulnak ki, megteremtve a feltételeket a sejtek migrációjához. A migrációs fázisban a sejtek a sérülés helyére vándorolnak és befedik a sebet. A migrációs fázis a sérülés után kb. 5 órával alakul ki és az IL-6, KGF, HGF és PDGF irányítják. Erős mitogén hatásukra elindul a sejtproliferáció, hogy elegendő sejt álljon rendelkezésre a sérülés kiküszöbölésére. Ezzel egy időben a bazális membrán újraképződése és a barrier funkciók visszaállítása is elkezdődik [278,279,303].

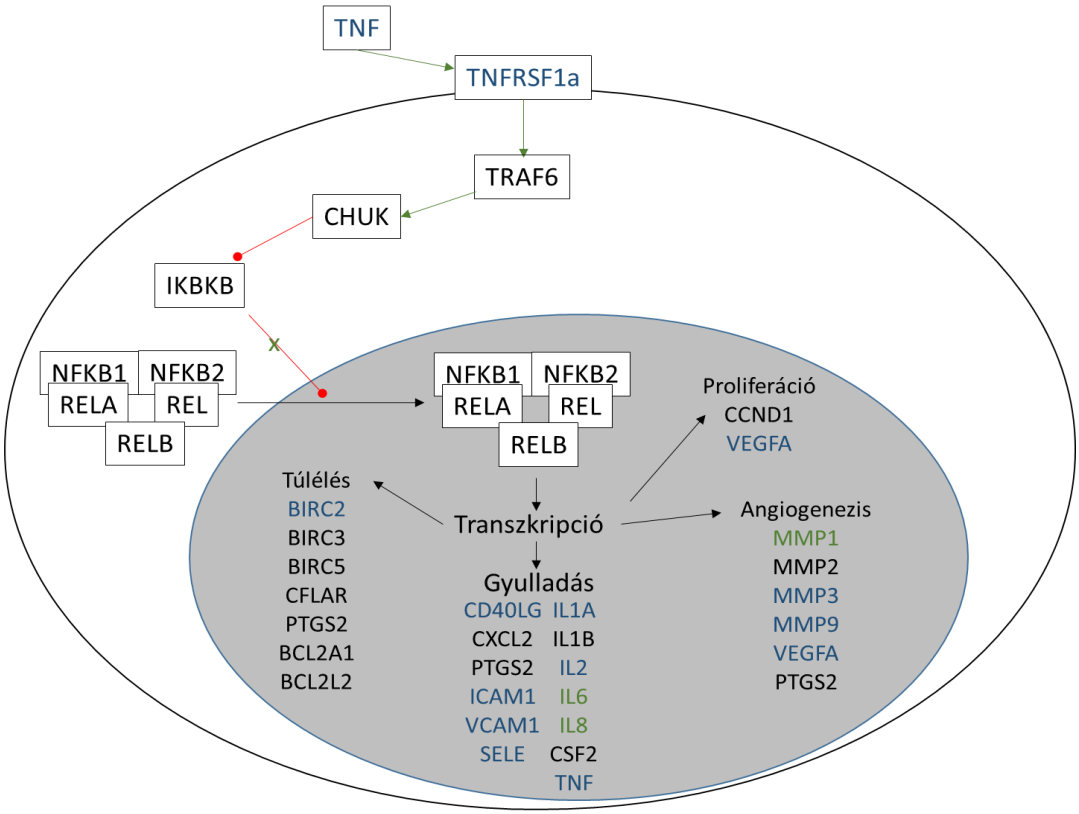
A műtét során előfordulhat szaruhártya sérülés is, de a vizsgálatunkba bevont páciensek esetében leginkább a sclera-t érintő sebgyógyulással kellett számolnunk. Figyelembe véve a sclera és a szaruhártya felépítését [304], feltételeztük, hogy a scleraban is hasonló folyamatok játszódnak le, mint a szaruhártya esetében, habár az egyes folyamatok időtartama és időzítése valószínűleg más. Eredményeink információt szolgáltattak elsősorban a sclera sebgyógyulási folyamataira vonatkozóan. Az általunk vizsgált időpontok a korai fázisokra koncentráltak: az első posztoperatív napon gyűjtött minta feltehetően a migrációs fázis végéről és proliferációs fázis elejéről szolgáltatott adatokat, a 2. és 4. nap gyűjtött minta a valószínűleg a proliferációs fázis későbbi szakaszait mutatta, amikor a seb záródott, feltöltődött fibrózus anyaggal, illetve endotél sejtekkel, valamint a bazális membrán újraképződött és a barrier funkciók helyreálltak. A három hónapos minta a lassú helyreállítási fázis történéseiről nyújtott információt. Ebben a szakaszban felthetetően már a citokinek domináns szerepe lecsengett, és más faktorok szabályozták a lassú, sebgyógyulást.

Az IL-6-nak elsősorban a sebgyógyulás korai szakaszaiban van szerepe [279]. Más kitatócsoportok kimutatták, hogy hatására megnő az integrin típusú fibronektin receptor expressziója, ami segíti az epitél sejtek migrációját és letapadását a IV típusú kollagén és laminin tartalmú mátrixokhoz [305]. Az általunk megfigyelt megnövekedett IL-6 szint a posztoperatív 1., 2. és 4. napon a migrációs és proliferációs fázisokra jellemző fiziológiás reakció része lehet.

Ezzel egy időben a MMP-ok is fontos szerepet játszanak a megfigyelt időszakban. Segítik a migrációs fázist, az immunsejtek bevonását és az új fibrotikus anyag képződését [258,279]. Az általunk megfigyelt növekedés, az IL-6 szintjéhez hasonlóan, feltehetően a sérülésre adott normál fiziológiás válasz része. Érdekes, hogy az MMP-1 a három hónapos mintában nagyobb mennyiségben volt jelen a komplikációt mutató betegek esetében. Mivel sem az IL-6, sem az MMP-1 esetében a komplikációt mutató csoportban megfigyelt növekedés nem volt statisztikailag szignifikáns, további vizsgálatok szükségesek annak

eldöntésére, hogy itt egy valós patofiziológiai állapotnak, vagy csak a kis mintaszámból adódó véletlen egybeesésnek köszönhető a megfigyelt jelenség.

Az adatok komplex értelmezéséhez egy útvonal analízist is elvégeztünk. Olyan útvonalat kerestünk, amely a lehető legtöbb, általunk szignifikáns változást mutató fehérjét tartalmazta. A legjobb találat az ún. fotodinamikus terápia által indukált útvonal volt (31. ábra). Az útvonal szerint az NF-kappa B szignálút bekapcsol, és aktiválja citokinek (pl. IL-6), angiogenezishez vezető faktorok (pl. MMP-1), proliferációt stimuláló fakorok és túlélési faktorok kifejeződését. Ez az útvonal főként tumor sejtekben aktiválódik, ilyenkor gyulladáshoz, fehérvérsejtek tumorba történő vándorlásához, ezáltal a tumor sejtek pusztulásához vezet [306].



31. ábra. Fotodinamikus terápia által indukált útvonal.
A kékkel jelölt fehérjék az általunk vizsgált fehérje panel részei, míg a zöld színnel jelölt fehérjék esetében statisztikailag szignifikáns különbségeket tudtunk kimutatni a csoportok között. A zöld nyíl aktivációt, a piros nyíl pedig gátlást jelent. Az útvonalat a Wikipathway WP3617 (www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP3617) alapján rajzoltuk meg.

A szemben sérülés hatására bekövetkező sebgyógyulás során a sérült sejtek apoptózissal és nekrózissal halnak el, immunsejtek vándorolnak a sérülés helyre, hogy segítsék a sejttörmelékek és elhalt sejtek eltakarítását és a szöveti regenerációt [279].

Eredményeink alapján a korai posztoperatív időszakban az útvonal aktivitása megnövekedett; ez lehetett a felelős a sebgyógyulás során bekövetkező gyulladásos folyamatok elindításáért.

Figyelembe véve az eddigi eredményeket és az irodalomban közölt információkat, a sebgyógyulás pontosan szabályozott, több szinten finomhangolt törékeny egyensúlya feltehetően megbomlik a korai fázisokban, ez vezethet a később megjelenő komplikációkhoz. Eredményeink alapján az immunválaszt elősegítő, proliferációt, illetve sebgyógyulást serkentő és extracelluláris mátrix átrendeződést előidéző molekulák előfordulási gyakorisága és/vagy mennyisége megemelkedett a komplikációt mutató csoportban. Ezzel egy időben azon molekulák mennyisége is emelkedett, amelyek alacsony szintje vagy hiánya a sebgyógyulás elhúzódását eredményezi (pl. SOD2, GLO1). Ugyanakkor a sebgyógyulás szabályozásában szerepet játszó fehérjék kevésbé jelentek meg a komplikációt mutató csoportban, akárcsak a szénsav anhidráz, amely alacsony szintje a keloidos sebgyógyulásra jellemző. Ezen információk arra engednek következtetni, hogy a sebgyógyulás egyensúlya a komplikációt mutató csoportban elbillen a kifejezettebb sebgyógyulás irányába, hozzájárulva ezzel a késői műtéti komplikációk megjelenéséhez.

Könnyfehérje vizsgálatainkkal adatokat gyűjtöttünk a sclera sebgyógyulási folyamataira vonatkozóan, és sikerült olyan könny biomarkereket azonosítani, amelyek előrejelezhetik a trabekulektómia után bekövetkező, lebennyel kapcsolatos problémákhoz köthető késői komplikációkat.

5.3.5. A nyál kémiai barrierjének vizsgálata és szájüregi laphámrák-specifikus potenciális biomarkerek azonosítása

A nyál egy állandóan termelődő, komplex testfolyadék, amelyet főként a nyálmirigyek termelnek [307]. Összetételének igen jelentős része víz (99%), de számos fehérje, elektrolit, mucinok, urea stb. van jelen [308]. Eddig több mint 3500 fehérjét azonosítottak a nyálban; a nagy mennyiségben jelen levő fehérjék az α amiláz, mucinok, cisztatinok, prolin gazdag fehérjék és a szérum albumin [309–313]. A könnyhöz hasonlóan a nagy mennyiségben jelen levő fehérjék az AMP fehérjék családjába tartoznak, ill. a nyálban az amiláz a keményítő emésztésében vesz részt. A nyál fehérje koncentrációja viszonylag tág

határok között változik (0,7-2,4 mg/ml) a kor, nem, egészségi állapot, vagy a napszak függvényében [314,315]. Eddig több mint 350 potenciális biomarkert azonosítottak a nyálban, többnyire szájüreghez kötődő elváltozások esetében, de Sjögren szindróma, reumatoid artritisz, melldaganat, Alzheimer kór, ill. autizmus esetében is több potenciális nyál biomarkert találtak [313,316].

A szájüregi laphámrák (Oral Squamous Cell Carcinoma – OSCC) világszerte a leggyakoribb fejnyak-táji daganat, amelyből évente több százezer esetet diagnosztizálnak [317,318]. Sajnos a modern terápiás eljárások ellenére is az 5 éves túlélés alig haladja meg az 50%-t [319]. A halálozás kb. tízszer gyakoribb a férfiak esetében, mint a nőknél, habár az utóbbi évtizedekben a fiatalabb korosztályt és a nőket is nagyobb arányban érinti a betegség [320]. A legfontosabb rizikófaktorok a dohányzás, alkoholfogyasztás, HPV fertőzés és a rossz száj higiéné [321–324].

Az OSCC jelenlétét a szájüregi biopsziából rutin szövettani vizsgálattal (Haematoxilyn-eosin-festett metszetek) és immunhisztokémiai módszerekkel mutatják ki, ezen alapul a daganat besorolása és a terápiás beavatkozás módjának megtervezése is [318,319,325]. Sajnos a kimutatás már az esetek nagy részében későn történik meg, ez az egyik oka annak, hogy a szájüregi laphámrákban szenvedők 5 éves túlélési aránya alacsony [319]. Emiatt nagyon fontos lenne olyan biomarkerek azonosítása, amely segítségével hamarabb nyílik lehetőség az OSCC diagnózisára. Magyarország vezető helyet foglal el az OSCC előfordulása és halálozása tekintetében, ezért kiemelten fontos számunkra a megfelelő diagnosztikai és terápiás eljárások kidolgozása [326,327].

A nyál kiváló lehetőséget kínál a potenciális OSCC biomarkerek azonosítására, ugyanis állandóan termelődik és nem invazív módon gyűjthető [328–330]. Tekintve, hogy direkt kontaktus van a daganat és a nyál között, a betegséggel kapcsolatos megváltozott fehérje profilok nagyobb eséllyel detektálhatók a nyálban, mint egyéb testfolyadékban, pl. szérumban [331]. A különböző kutatócsoportok több nyálfehérjét OSCC-re jellemző potenciális biomarkernek találtak az egyes országokban [309,332–334]. Az egyik fő kérdésünk, hogy a világ különböző helyein azonosított fehérjék milyen mértékben lehetnek diagnosztikus értékűek Magyarországon?

Amennyiben a nyálban tudunk azonosítani egy megfelelő, OSCC-specifikus biomarkert, azt alkalmazni lehet a korai diagnózis felállításában és akár szűrésre is lehet használni.

5.3.5.1. Az OSCC-re jellemző nyálfehérje profil vizsgálata

A nyálfehérjék tanulmányozására több módszert alkalmaztunk. Három OSCC-ben szenvedő beteg és három kontroll nyálmintáját jelölés nélküli kvantitálás segítségével vizsgáltuk azzal a céllal, hogy a betegségre jellemző fehérjéket azonosíthassunk. A nyálminták vizsgálatával több, mint 500 fehérjét sikerült azonosítani. Az azonosított fehérjék közül kiválogattuk azokat, amelyek legalább kétszeres mennyiségi változást mutattak a két csoport között (12. táblázat), és ezeket tovább vizsgáltuk. Szakirodalmi és tudományos adatbázisokban elhelyezett, szabadon hozzáférhető adatok alapján megvizsgáltuk a fehérjék funkcióját, illetve azt, hogy már azonosították-e korábban OSCC mintákban. Az OSCC-ben mások által azonosított fehérjék esetében azt is megvizsgáltuk, hogy milyen típusú mintában (nyál, szövet, szérum) találták meg eddig.

12. táblázat. A kontroll (CTL) és beteg (OSCC) csoportok között legalább kétszeres különbséggel kimutatott fehérjék listája

Fehérje azonosító (UniProt kód)	Fehérje név	OSCC /CTL arány	p érték	Besorolás	Funkció	Vizsgált minta típusa
O60218	Aldo-keto reduktáz 1 B10	0,10	0,22	nyálfehérje	metabolikus enzim	nyál* [335]
P02763	Alfa-1 savas glikoprotein 1	3,14	0,36	akut fázis fehérje, nyálfehérje	immunválasz, transzport	nyál [329]
P01011	Alfa-1-antikimotripszin	3,29	0,27	akut fázis fehérje, nyálfehérje	proteáz inhibitor	NA
P01009	Alfa-1-antitripszin	3,70	0,10	nyálfehérje	proteáz inhibitor	nyál [336]
P04217	*Alfa-1B-glikoprotein*	3,25	*0,00*	nyálfehérje	immunválasz	nyál [329]
P02765	*Alfa-2-HS-glikoprotein*	2,70	*0,01*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	proteáz inhibitor, immunválasz, transzport	NA
P01023	*Alfa-2-makroglobulin*	2,16	*0,01*	nyálfehérje	proteáz inhibitor	NA
P04745	Alfa-amiláz 1	0,21	0,05	nyálfehérje	metabolikus enzim	nyál [330]
P01019	*Angiotenzinogén*	8,50	*0,04*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	renin-angiotenzin rendszer	NA
P01008	Antitrombin-III	2,08	0,41	akut fázis fehérje, nyálfehérje	proteáz inhibitor, véralvadás	NA
P02647	*Apolipoprotein A-I*	2,14	*0,02*	nyálfehérje	lipid metabolizmus	nyál [335]
P02652	Apolipoprotein A-II	3,85	0,08	nyálfehérje	lipid metabolizmus	nyál [335]
P06727	Apolipoprotein A-IV	3,55	0,07	nyálfehérje	lipid metabolizmus	nyál [335]

P04114	*Apolipoprotein B-100*	8,12	*0,00*	nyálfehérje	lipid metabolizmus	NA
P02649	Apolipoprotein E	csak OSCC-ben	0,13	nyálfehérje	lipid metabolizmus	nyál [335]
P17213	Baktericid permeabilitást növelő fehérje	0,24	0,32	nyálfehérje	immunválasz	NA
P02749	Beta-2-glikoprotein 1	3,02	0,09	nyálfehérje	lipid metabolizmus, véralvadás	nyál [333]
P61769	*Beta-2-mikroglobulin*	0,46	*0,04*	nyálfehérje	immunválasz	NA
Q96DR5	*BPI fold-tartalmú fehérje A 2*	0,49	*0,02*	nyálfehérje	immunválasz, védekezés	NA
P00450	*Cöruloplazmin*	3,65	*0,02*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	fém kötés	vér [337]
P04080	Cisztatin-B	0,39	0,05	nyálfehérje	proteáz inhibitor	NA
P01034	*Cisztatin-C*	0,33	*0,02*	nyálfehérje	proteáz inhibitor	NA
P09228	*Cisztatin-SA*	0,35	*0,02*	nyálfehérje	proteáz inhibitor	nyál [330]
P99999	Citokróm c	0,00	0,12	akut fázis fehérje	elektron transzport lánc, apoptózis	tumor szövet [338]
Q02413	Dezmoglein-1	0,40	0,15	nyálfehérje	dezmoszóma komponens	NA
Q01469	Epidermális zsírsavkötő fehérje	0,49	0,20	nyálfehérje	lipid metabolizmus	nyál* [335]
P61916	*Epididimális szekretoros fehérje E1*	0,30	*0,07*	nyálfehérje	lipid metabolizmus, koleszterol transzport	NA
P02671	*Fibrinogén alfa lánc*	2,67	*0,00*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	véralvadás	vér [339]
P02675	*Fibrinogén béta lánc*	2,91	*0,00*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	véralvadás	vér [339]
P02679	*Fibrinogén gamma lánc*	2,43	*0,00*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	véralvadás	vér [339]
B7ZLE5	FN1 protein	5,73	0,10	nyálfehérje	sejtadhézió	tumor szövet [340]
P00558	Foszfoglicerát kináz 1	0,44	0,13	nyálfehérje	metabolikus enzim	nyál [333]
Q96G03	Foszfo-glukomutáz-2	0,40	0,23	nyálfehérje	metabolikus enzim	NA
P36871	Foszfo-glukomutáz-1	0,08	0,14	nyálfehérje	metabolikus enzim	NA
P00738	*Haptoglobin*	2,61	*0,04*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	hem kötés	vér [341]
P69905	*Hemoglobin alfa alegység*	3,37	*0,03*	nyálfehérje	oxigén transzport	nyál* [335]
P68871	Hemoglobin béta alegység	4,41	0,07	nyálfehérje	oxigén transzport	nyál* [335]
P02790	*Hemopexin*	2,41	*0,00*	akut fázis fehérje,	hem kötés	nyál [329,333]

				nyálfehérje		
P05546	Heparin kofaktor 2	csak OSCC-ben	0,17	akut fázis fehérje	véralvadás	nyál [335]
Q9Y6R7	IgGFc-kötő fehérje	0,49	0,65	nyálfehérje	immunválasz	NA
P11215	Integrin alfa-M	2,01	0,54	nyálfehérje	immunválasz	tumor szövet [342]
P19827	*Inter-alfa-tripszin inhibitor nehéz lánc H1*	3,76	*0,01*	nyálfehérje	proteáz inhibitor	nyál [335]
P19823	*Inter-alfa-tripszin inhibitor nehéz lánc H2*	11,23	*0,02*	nyálfehérje	proteáz inhibitor	nyál [335]
Q14624	*Inter-alfa-tripszin inhibitor nehéz lánc H4*	5,33	*0,03*	nyálfehérje	proteáz inhibitor	nyál [335]
Q14CN2	Kalcium aktivált klorid csatorna regulátor 4	0,23	0,21	nyálfehérje	transzport	NA
P27482	Kalmodulin-szerű fehérje 3	0,37	0,08	nyálfehérje	fém kötés, chaperon	NA
P27797	Kalretikulin	0,37	0,39	nyálfehérje	chaperon	NA
Q9NQ38	Kazal típusú szerin proteáz inhibitor 5	0,32	0,14	nyálfehérje	lipid metabolizmus	NA
P02538	Keratin II 6A	0,44	0,31	nyálfehérje	citoszkeleton	NA
P01042	*Kininogén-1*	2,89	*0,00*	nyálfehérje	proteáz inhibitor, véralvadás	nyál [335]
P35326	Kis prolin gazdag fehérje 2A	0,29	0,33	nyálfehérje	elszarusodás	nyál* [335]
O00299	Klorid csatorna fehérje 1	0,31	0,06	nyálfehérje	transzport, sejtciklus szabályozás	NA
P01024	*Komplement C3*	2,77	*0,01*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	immunválasz	nyál [336]
P0C0L5	*Komplement C4-B*	6,69	*0,02*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	immunválasz	nyál [336]
P01031	Komplement C5	csak OSCC-ben	0,12	akut fázis fehérje, nyálfehérje	immunválasz	NA
B4E1Z4	*Komplement faktor B*	5,44	*0,01*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	immunválasz	nyál [336]
P08603	Komplement faktor H	csak OSCC-ben	0,06	akut fázis fehérje, nyálfehérje	immunválasz	NA
P05156	*Komplement faktor I*	6,42	*0,01*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	immunválasz	NA
P22528	Kornifin-B	0,45	0,24	nyálfehérje	elszarusodás	NA
P08185	*Kortikoszteroid-kötő globulin*	csak OSCC-ben	*0,03*	akut fázis fehérje, nyálfehérje	proteáz inhibitor	nyál [335]
P61626	Lizozim C	0,47	0,20	nyálfehérje	védekezés	NA

P40926	Malát dehidrogenáz, mitokondriális	0,37	0,24	nyálfehérje	metabolikus enzim	NA
Q8TAX7	Mucin-7	0,00	0,15	nyálfehérje	védekezés	NA
P80303	Nucleobindin-2	0,32	0,06	nyálfehérje	fém kötés	nyál [335]
Q6UX06	Olfaktomedin-4	0,47	0,40	nyálfehérje	sejtadhézió	NA
P36955	Pigment epitélium eredetű faktor	7,17	0,18	nyálfehérje	tumorfejlődés, angiogenezis	NA
P05155	*Plazma proteáz C1 inhibitor*	5,95	*0,01*	nyálfehérje	proteáz inhibitor, véralvadás	NA
P00747	Plazminogén	5,11	0,08	akut fázis fehérje, nyálfehérje	véralvadás	NA
P02760	*Protein AMBP*	5,41	*0,03*	nyálfehérje	proteáz inhibitor, védekezés	nyál [335]
O60888	*Protein CutA*	0,43	*0,05*	nyálfehérje	fém kötés, enzim kötés	NA
P02753	Retinol-kötő fehérje 4	2,54	0,10	nyálfehérje	proteáz inhibitor, védekezés	vér [341]
P00915	*Szénsav anhidráz 1*	8,55	*0,01*	nyálfehérje	metabolikus enzim, sav-bázis egyensúly	nyál [333]
P36952	*Szerpin B5*	2,63	*0,04*	nyálfehérje	tumor szuppresszor	vér [343]
P02768	Szérum albumin	2,53	0,11	nyálfehérje	transzport	nyál [333]
P27169	Szérum paraoxonáz/arilészteráz 1	csak OSCC-ben	0,12	akut fázis fehérje	méregtelenítés	nyál [335]
Q6UWP8	*Szuprabazin*	0,05	*0,05*	nyálfehérje	sejtproliferáció	NA
P62328	Timozin beta-4	0,42	0,20	nyálfehérje	aktin kötés, sejtproliferáció	NA
O60235	Transzmembrán proteáz szerin 11D	0,20	0,06	nyálfehérje	proteáz, védekezés	NA
P68363	Tubulin alfa-1B lánc	0,40	0,20	nyálfehérje	mikrotubulus komponens	nyál* [335]
O75083	*WD ismétlés tartalmú fehérje 1*	0,13	*0,02*	nyálfehérje	sejt migráció	NA

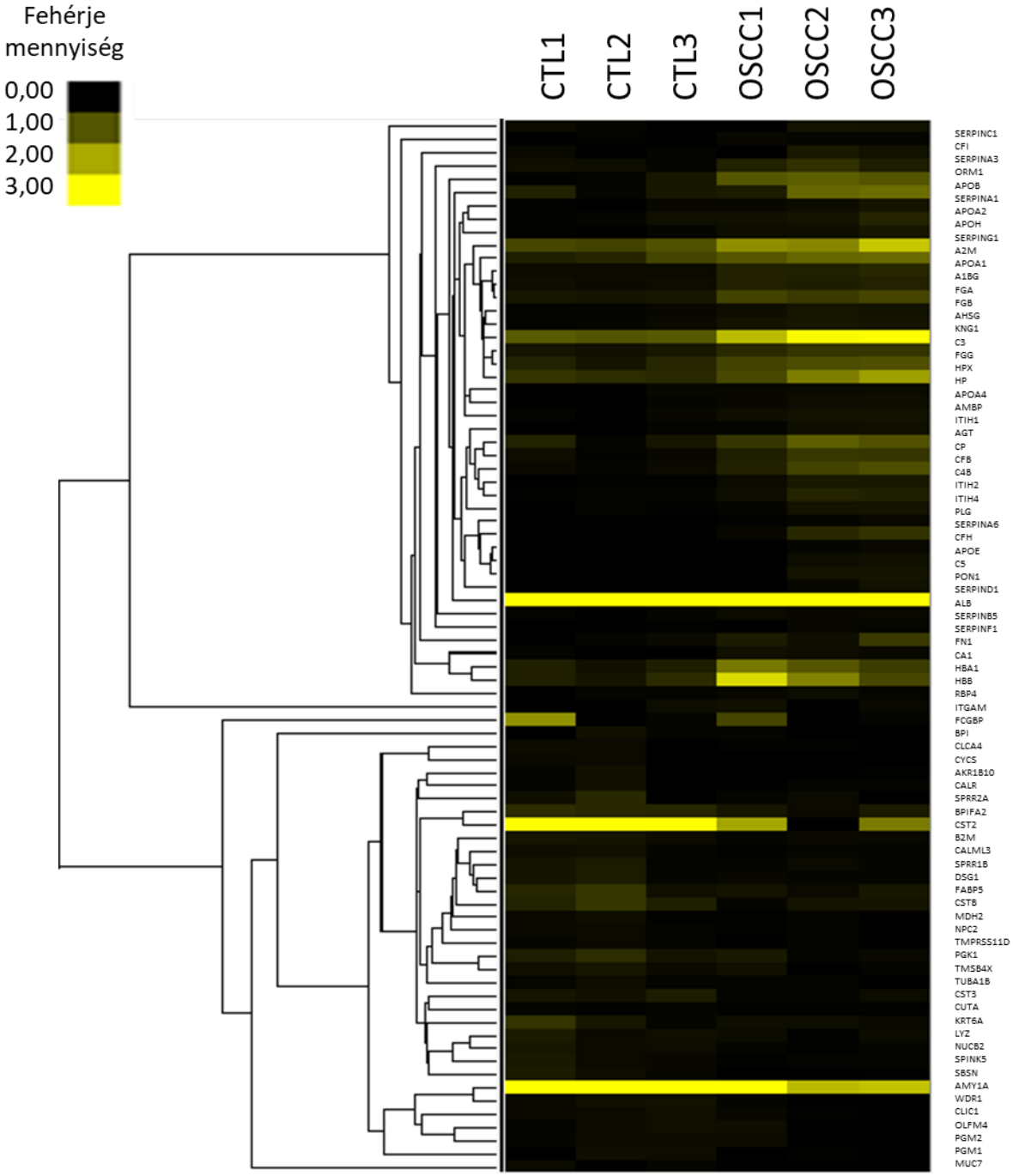
Minden fehérje esetében feltüntettük az UniProt azonosítót, a fehérje nevét, besorolását aszerint, hogy nyálfehérje vagy akut fázis fehérje és a funkcióját. A besoroláshoz a Sys-Body Fluid adatbázist és irodalmi adatokat használtunk [312,332,344–348], a funkciót a Gene Ontology alapján állapítottuk meg. Ugyanakkor az azonosításhoz használt egyedi peptidek száma, az OSCC/CTL arány és a megfelelő p érték is feltüntetésre került. A korábban OSCC-ben azonosított fehérjék esetében a minta típusát is feltüntettük. A * arra utal, hogy nem az általunk azonosított fehérjét, hanem egy másik, de ugyanabba a családba tartozó változatát azonosították más kutatások a betegséggel összefüggésben, míg az „NA” azt jelenti, hogy korábban nem azonosították a fehérjét a betegségben. A dőlt betűvel szedett fehérjék esetében statisztikailag szignifikáns volt a változás a két csoport között.

Az általunk azonosított fehérjék jelentős részét már korábban vizsgálták OSCC-ben és 32 fehérjét kimutattak OSCC-ben szenvedő betegektől származó nyálmintákban (12. táblázat). Egy célzott proteomikai módszereket alkalmazó kutatás már korábban összefüggésbe hozta a komplement C4B (C4B), a komplement faktor B, komplement C3 és alfa-1 antitripszint az OSCC-vel: úgy találták, hogy a fehérjék magasabb szintje az OSCC megjelenésének magasabb kockázatával jár együtt [336]. Shotgun proteomikai analízisek eredményeként egy másik kutatócsoport az apolipoprotein A és E, a paraoxonáz (PON) 1, inter-alfa tripszin inhibitor H1, H2, H4 láncok, kininogén 1, AMBP protein, nukleobindin 2, SERPIND1 és SERPINA6 mennyiségét emelkedettnek találta OSCC-ben szenvedő betegek nyálában [335]. Megfigyelték azt is, hogy az ApoE jelenléte az OSCC invazívabb formáival jár együtt [349]. Ugyanakkor, az alfa-1 savas glikoproteint, alfa-1B glikoproteint, alfa amilázt, béta-2 glikoproteint, szénsav anhidráz 1-t, cisztatin SA-t, hemopexint, foszfoglicerát kinázt és szérum albumint ígéretes OSCC markerként azonosították [329,330,333]. Tanulmányunkban az OSCC-re jellemző fehérjének talált fibrinogén alfa, béta és gamma láncot, haptoglobint, SERPINB5-t, retinol kötő fehérje 4-t és a cöruloplazmint korábban szérum OSCC markerként azonosították, míg az integrin alfa-M-t és a fibronektin FN1-t kimutatták a tumor szövetben [337,339–343].

36 általunk OSCC-re jellemző fehérjeként azonosított fehérjét nem vizsgáltak, vagy vizsgáltak, de esetükben nem találtak összefüggést a fehérje mennyisége/jelenléte és a betegség között. A plazminogént és angiotenzinogént nem azonosították OSCC-ben, viszont azt megfigyelték, hogy a plazminogén aktivátor rendszer a korai OSCC prediktív markere lehet, illetve az angiotenzinogén konvertáló enzim a malignus epiteliális neopláziákra jellemző [350,351]. Hat fehérje esetében nem az általunk azonosított forma, hanem a fehérje egy másik izoformája, vagy ugyanabba a családba tartozó rokon fehérje jelenlétét találták OSCC-re jellemzőnek. A SERPINB5 esetében ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre, ugyanis mi azt találtuk, hogy mennyisége megnő OSCC-ben, viszont más kutatások szerint a SERPINB5 és más SERPINB formák mRNS szintje alacsonyabb az OSCC-ben, illetve a magasabb SERPINB5 szint jobb prognózissal társul [352,353]. A plazma proteáz C1 inhibitor (SERPING1), antitrombin III és fibronektin jelenlétét kimutatták ugyan daganatokban, de szájüregi daganatokkal eddig nem hozták összefüggésbe [354,355]. Az apoB100 és komplement faktor H (CFH) jelenlétét sem igazolták eddig szájüregi laphámrákban, viszont a CFH-t tüdő adenokarcinómában, illetve bőr laphám daganatokban, az apoB100-t pedig fejnyaki laphámrákban szenvedő betegek szérumában megtalálták [356–358]. A komplement C5 és mucin 7 daganatokban való jelenlétéről nincs információnk, de a

komplement rendszer komponensei és más mucin formák gyakran kimutathatók különböző daganatokban, köztük az OSCC-ben is [336,359].

Következő lépésként a megállapított mennyiségek alapján egy hierarchikus klaszterezést végeztünk és az eredményeket hőtérkép formájában jelenítettük meg (32. ábra).



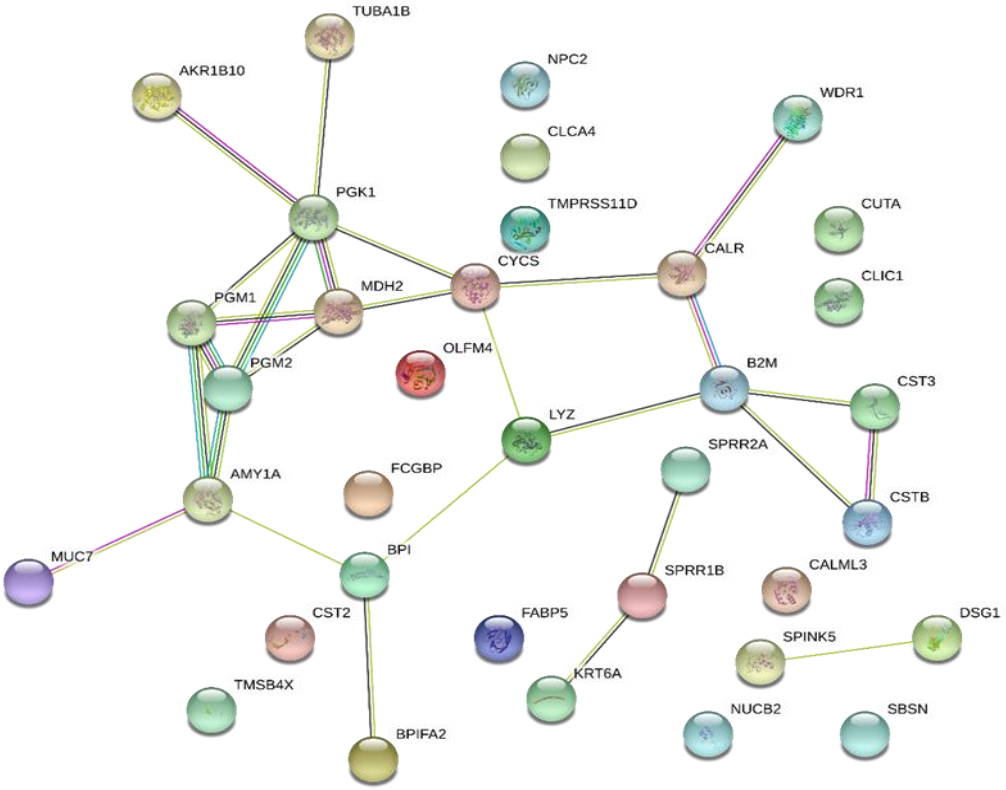
32. ábra. A nyálmintákban a két csoport között legalább kétszeres különbséggel kimutatott fehérjék mennyiségi analízise.
A kontroll (CTL) és OSCC mintákban azonosított fehérjék relatív peptid számai alapján végzett klaszter analízis és a felrajzolt hőtérkép. A fehérjéket a génnevek alapján jelöltük.

Az eredmények azt mutatták, hogy az OSCC és a kontroll csoportok elkülöníthetők egymástól, bizonyos fehérjék csak az egyik, vagy csak a másik állapotra jellemzők. Nyolc olyan fehérjét találtunk, amelyek csak az egyik csoportban jelennek meg. Az ApoE, a komplement C5, komplement faktor H, SERPINA6, SERPIND1 és paraoxonáz 1 a kontroll mintákban nem volt kimutatható, csak az OSCC-ben szenvedő betegek mintáiban. Ezzel szemben a citokróm c és a mucin 7 csak a kontroll mintákban volt detektálható.

A citokróm c-ről kimutatták, hogy felszabadulása gátolt OSCC-ben; a HIF-1alfa-függő apoptózis gátlás az OSCC-ben a citokróm c felszabadulásának gátlásával valósul meg [338].

Eredményeink alapján az OSCC csoportban növekedést vagy csökkenést mutató fehérjék interakciós hálózatait a String segítségével rajzoltuk meg és elvégeztük funkcionális analízisüket.

Az OSCC-ben csökkenést mutató fehérjék egy kevés interakciót mutató hálózatba rendeződnek, funkcionális szempontból diverzek (33. ábra).



33. ábra. Az OSCC-ben kisebb mennyiségben előforduló fehérjék hálózata.
A hálózatot a String segítségével rajzoltuk meg. A golyók a fehérjéket, a vonalak pedig a fehérjék közötti interakciókat jelentik. A fehérjéket a génnevek alapján jelöltük.

A String analízis nem mutatott ki feldúsult GO funkciót. Feldúsulás csak a lokalizációban mutatkozott (13. táblázat).

13. táblázat. Az OSCC-ben kisebb mennyiségben előforduló fehérjék esetében a feldúsult GO funkciók

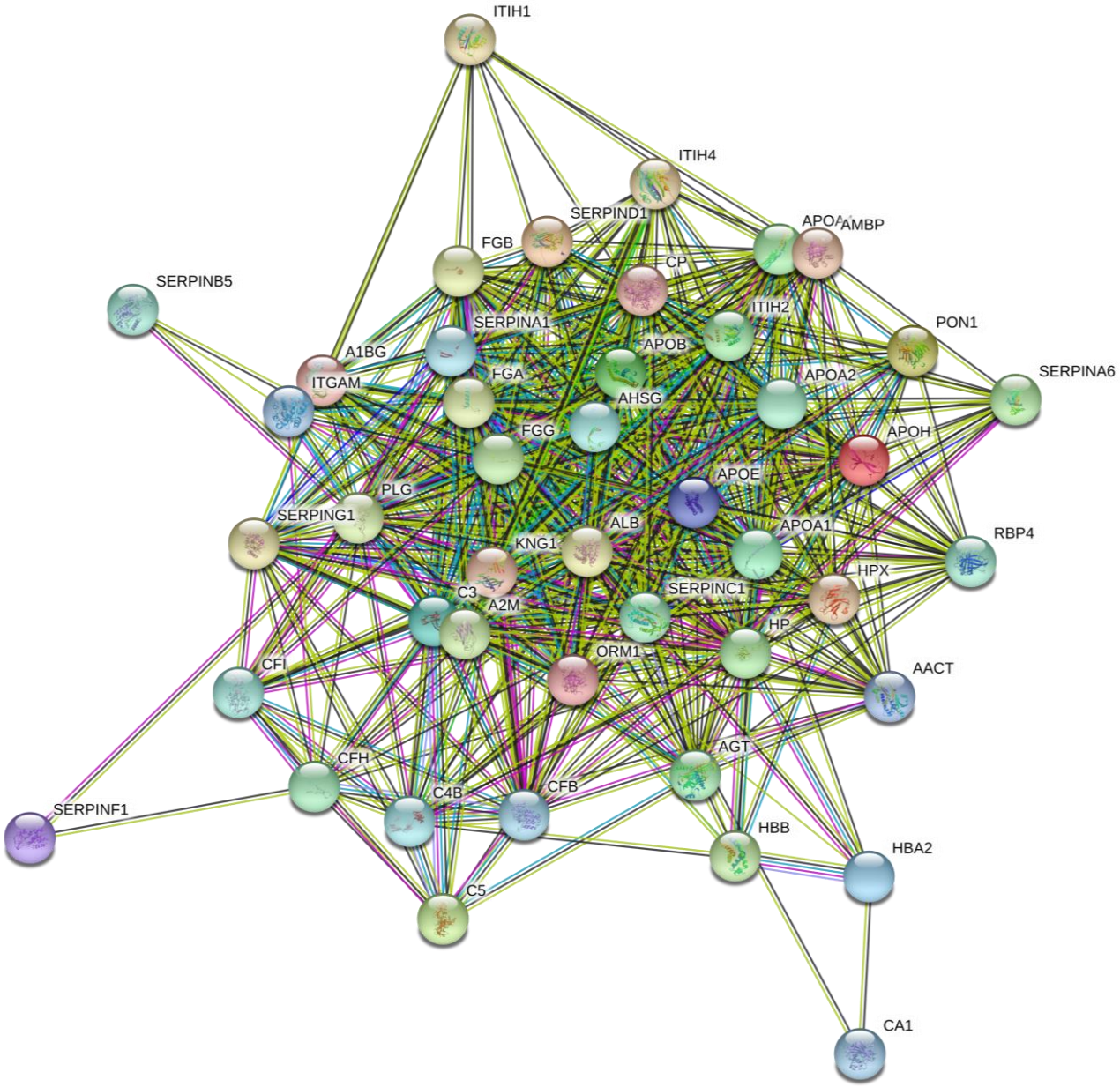
GO funkció azonosító	GO funkció megnevezés	Megfigyelt fehérjék száma	FDR
I. Lokalizáció			
GO.0070062	Extracelluláris régió rész	24	3.56e-09
GO.0005576	Extracelluláris régió	26	1.69e-09
GO.0031988	Extracelluláris exoszóma	25	1.11e-12
GO.0044421	Membrán-kötött vezikula	25	1.09e-10

A táblázatban a GO funkciók azonosítója mellett feltüntettük a GO funkciók megnevezését, valamint az adott funkcióhoz tartozó fehérjék számát a hálózatban. Ezen kívül feltüntetésre kerültek az FDR értékek is.

A fehérjék döntően extracelluláris térben lokalizálódnak, ami a fehérje azonosításunk minőség ellenőrzésére is szolgálhat, utalva annak helyességére, mivel nyálfehérjéket vizsgálva ez a várt eredmény.

Ezzel szemben az OSCC-ben növekedést mutató fehérjék egy nagyon kapcsolt, sok interakcióval rendelkező hálózatba rendezhetők (34. ábra).

Bizonyos fehérjék, mint az inter alfa-tripszin inhibitor H1 és H2 láncok (ITIH1, ITIH2), paraoxonáz 1, ApoA4, retinol kötő fehérje 4 (RBP4), hemoglobin alfa és béta láncok (HBA1, HBB), SERPINA6, antikimotripszin (AACT), AMBP a periférián helyezkednek el, de számos kapcsolatot alakítanak ki a hálózat központibb elhelyezkedésű fehérjéivel. Ezzel szemben más fehérjék, mint a SERPINB5, szénsav anhidráz 1 (CA1) és SERPINF1 a periférián helyezkednek el, és kevés interakciót alakítanak ki a hálózatban szereplő többi fehérjével. Ugyanakkor megfigyelhető a komplement faktorok klasztere, amely számos interakcióval kapcsolódik a hálózat központi elhelyezkedésű, sok kapcsolattal rendelkező elemeihez.



34. ábra. Az OSCC-ben nagyobb mennyiségben előforduló fehérjék hálózata.
A hálózatot a String segítségével rajzoltuk meg. A golyók a fehérjéket, a vonalak pedig a fehérjék közötti interakciókat jelentik. A fehérjéket a génnevek alapján jelöltük.

A funkcionális elemzés szerint az immunreguláció és a lipid transzporthoz kapcsolódó funkciók dúsultak fel (14. táblázat).

14. táblázat. Az OSCC-ben nagyobb mennyiségben előforduló fehérjék esetében a feldúsult GO funkciók

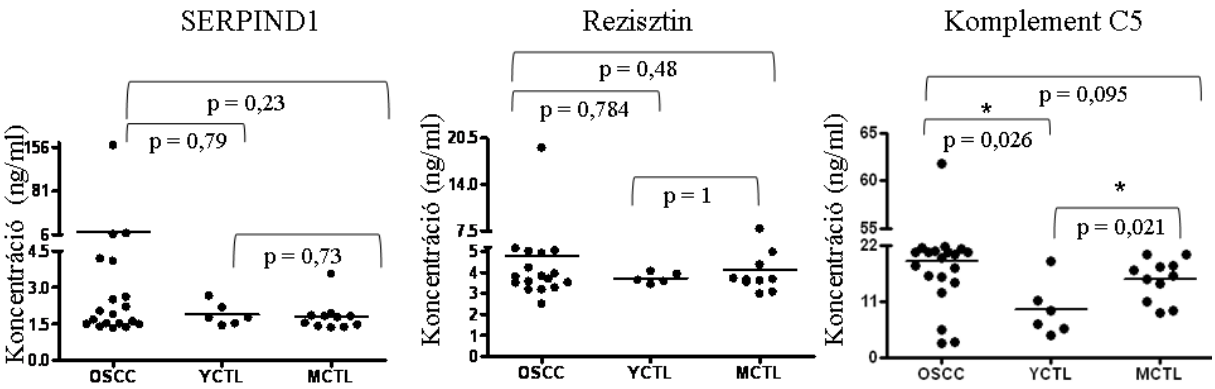
GO funkció azonosító	GO funkció megnevezés	Megfigyelt fehérjék száma	FDR
I. Biológiai folyamat			
GO.0002697	Effektor immunfunkciókat szabályozó folyamat	10	9.91e-07
GO.0031639	Plazminogén aktiváció	4	9.91e-07
GO.0034370	Triglicerid-gazdag lipoprotein módosulás	4	9.91e-07
GO.0034374	Alacsony denzitású lipoprotein (LDL) módosulás	4	9.91e-07
GO.0019216	Lipid metabolizmus szabályozása	8	9.53e-06
II. Molekuláris funkció			
GO.0005319	Lipid transzporter aktivitás	6	9.06e-06
GO.0017127	Koleszterol transzporter aktivitás	5	7.23e-08
GO.0016209	Antioxidáns aktivitás	5	6.64e-05
GO.0004857	Enzim gátló aktivitás	19	4.76e-20
GO.0004867	Szerin endopeptidáz inhibitor aktivitás	14	4.76e-20
III. Lokalizáció			
GO.0070062	Extracelluláris exoszóma	43	9.48e-34
GO.0034364	Nagy sűrűségű lipoprotein (HDL)	6	8.65e-10
GO.0005577	Fibrinogén komplex	4	8.3e-08
GO.0005576	Extracelluláris régió	43	7.68e-26
GO.0031091	Vérlemezke alfa granulum	10	6.88e-15

A táblázatban a GO funkciók azonosítója mellett feltüntettük a GO funkciók megnevezését, valamint az adott funkcióhoz tartozó fehérjék számát a hálózatban. Ezen kívül feltüntetésre kerültek az FDR értékek is.

Eredményeink igazolták az irodalmi adatok alapján leírt, OSCC-re jellemző folyamatokat, és a csak OSCC-re jellemző komplement C5 vagy a csak kontrollra jellemző mucin 7 által támpontot szolgáltathatnak a további kutatásokhoz.

A felfedező jellegű vizsgálatok a biomarkerek kutatása során általában ennél a pontnál megállnak, és az adatok a potenciális biomarkerekkel közlésre kerülnek. Tekintve, hogy rendelkezésünkre álltak további nyálminták, elvégeztük a kapott eredmények ellenőrzését.

A kereskedelmi forgalomban lévő antitestek, valamint vizsgálati eredményeink figyelembevételével ELISA kiteket rendeltünk. Vizsgálataink tárgyául a komplement C5-t és a SERPIND1-t választottuk. Mindkét fehérje csak az általunk vizsgált OSCC-ben szenvedő betegek nyálában volt kimutatható, de míg a komplement C5 jelenlétét más vizsgálat nem mutatta ki OSCC-ben, addig a SERPIND1-t már más kutatók azonosították OSCC-ben szenvedő betegek nyálmintáiban [335]. Ezen kívül, referenciaként, egy tajvani vizsgálatban biomarkerként azonosított és ellenőrzött, de a mi mintáinkban nem detektált fehérje, a rezisztin jelenlétét is meg kívántuk vizsgálni [335]. A megfelelő, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitek megrendelése után 20 OSCC-ben szenvedő beteg (átlagéletkor 57 év), 11 korban illesztett (átlagéletkor 59 év) és 6 fiatal kontroll (átlagéletkor 24 év) nyálmintájában a gyártó utasításainak megfelelően elvégzett vizsgálattal megállapítottuk a SERPIND1, rezisztin és komplement C5 koncentrációját (35. ábra).



35. ábra. A potenciális nyál biomarkerek vizsgálata ELISA módszerrel.
A SERPIND1, rezisztin és komplement C5 fehérjék nyálban mérhető koncentrációi („y" tengely) az OSCC-ben szenvedő betegektől (OSCC), fiatal kontrolloktól (YCTL) és illesztett kontrolloktól (MCTL) származó mintákban. Minden összehasonlítás esetén feltüntettük a p értéket, a * a statisztikailag szignifikáns ($p<0.05$) különbségre utal.

Sajnos az eredmények nem a vártnak megfelelő értékeket mutatták. Vizsgálataink szerint a rezisztin és SERPIND1 nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget egyetlen csoport között sem. A komplement C5 szintje statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a fiatal kontroll és a betegek között, viszont hasonló irányú, statisztikailag szignifikáns különbség volt kimutatható a fiatal és korban illesztett kontrollok között is. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a komplement C5 szintje, legalábbis az általunk vizsgált betegminták esetében, nem a betegséggel, hanem inkább a korral összefüggően változik. Egy másik lehetőség - ami a vizsgálatok alapján nem zárható ki az -, hogy a korban illesztett kontrollokra az általában tapasztalható rosszabb száj higiéné miatt egy, a fiatalokhoz képest emelkedettebb,

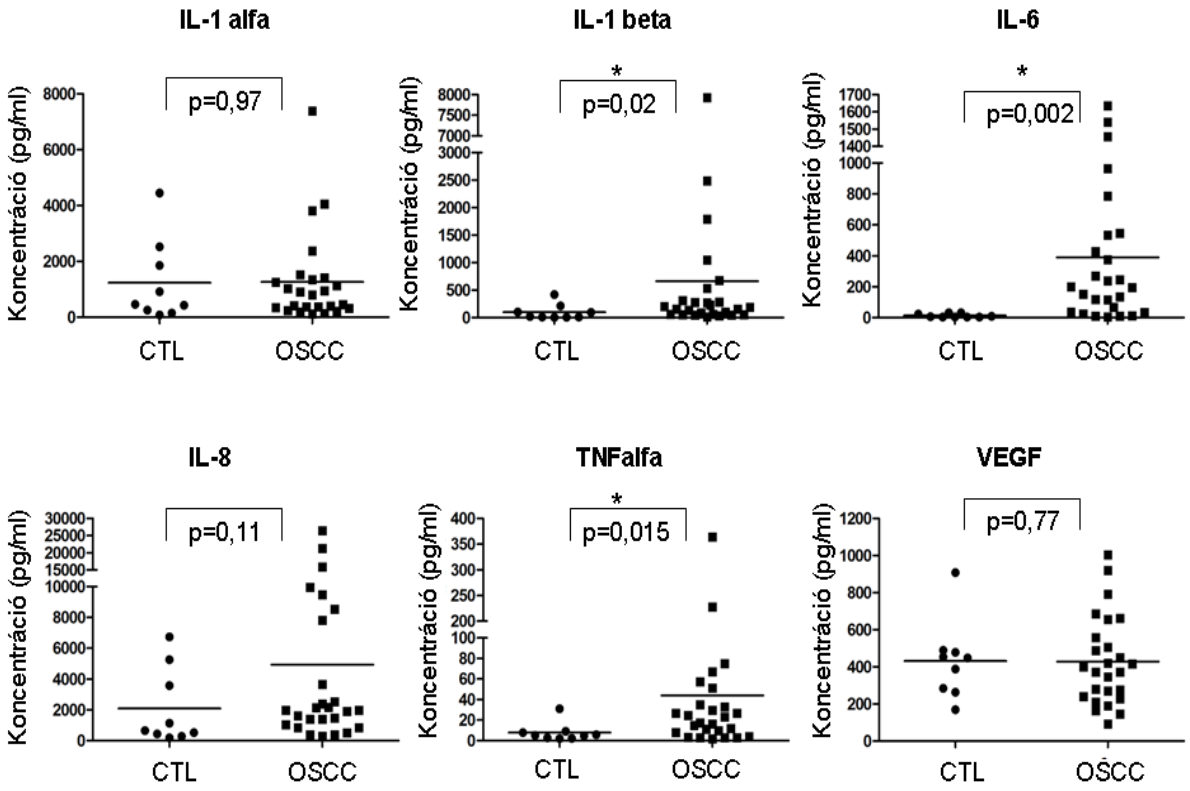
szubklinikus gyulladásos állapot jellemző, ami még nem nyilvánul meg szemmel látható elváltozásokban. Amennyiben ezt a magasabb gyulladásos szintet jelzi a komplement C5, akkor viszont a negatív eredményünk igenis pozitív, és a komplement C5 egy korai marker lehet; az emelkedett értéket mutató pácienseket többször és célzottabban kell vizsgálni az OSCC tüneteit keresve. A rendelkezésre álló adatokból ez a kérdés nem dönthető el, további vizsgálatok szükségesek a kérdés jobb és pontosabb körbejárására.

A várakozással ellentétes eredményeink nagyon elgondolkodtatóak és tanulságosak voltak számunkra. Kihangsúlyozták a felfedezés során kapott eredmények ellenőrzésének a fontosságát és további magyarázatot szolgáltattak a szakirodalomban megjelenő potenciális biomarkerek viszonylag nagy száma és az amerikai Food and Drug Administration által elfogadott, vagy használatban lévő diagnosztikai és prognosztikai biomarkerek alacsony száma közötti jelentős különbségre. Ugyanakkor, eredményeink azt is hangsúlyozták, hogy a világ egyes részein biomarkerként azonosított fehérjéket [335] nem lehet egy az egyben felhasználni más populációk vizsgálatára. A rezisztin esete rávilágított a regionális kutatások fontosságára.

5.3.5.2. A magyarországi populációban diagnosztikus jelentőségű potenciális nyálbiomarkerek azonosítása

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a magyarországi populációra jellemző potenciális biomarkereket, egy másik stratégiát követtünk. Szakirodalomban közölt, fehérje vagy RNS szinten OSCC-vel összefüggésbe hozható fehérjéket választottunk vizsgálatunk tárgyául. Összesen 14 fehérje vizsgálata mellett döntöttünk. Ezeket a fehérjéket, vagy az őket kódoló génekről képződött mRNS-eket mások már potenciális OSCC biomarkerként azonosították [360–367]. Vizsgálatainkban egy kétlépcsős stratégiát alkalmaztunk: a mintákat teszt és referencia csoportokra osztottuk (Függelék 4. táblázat). Először megvizsgáltuk a teszt csoportot, majd a kapott eredményeket a referencia csoporton ellenőriztük.

A teszt csoportba sorolt minták esetében először megvizsgáltuk a 14 fehérje mennyiségét. A vizsgálatokat két részletben végeztük el. Az IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α és VEGF citokinekre találtunk egy kereskedelmi forgalomban lévő multiplex módszert és az említett citokinek koncentrációját ezzel a mikrogyöngy-alapú multiplex kittel határoztuk meg. Ehhez a vizsgálathoz 26 beteg és 9 korban illesztett kontroll nyálmintáját használtuk fel (36. ábra).



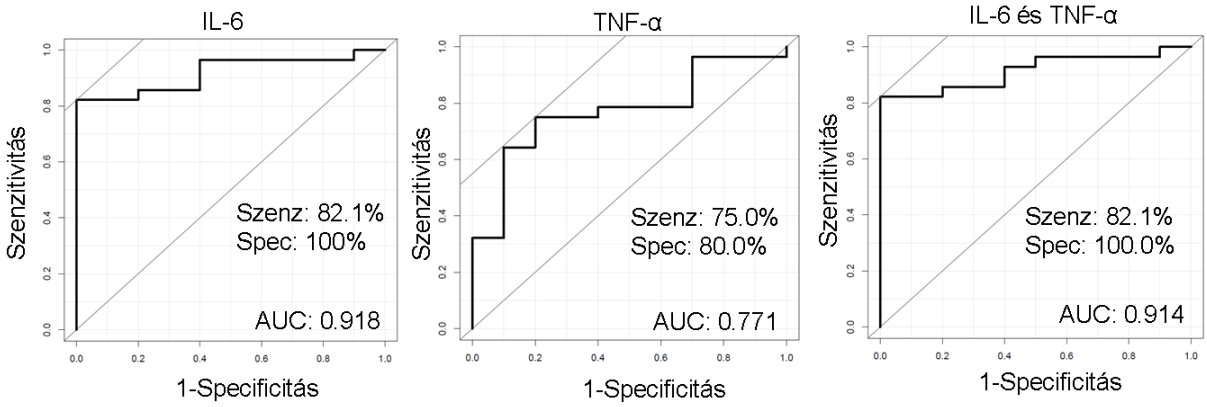
36. ábra. Citokinek mennyiségének vizsgálata nyálban mikrogyöngy-alapú multiplex immunesszé segítségével.

Az „x” tengelyen a csoportokat, míg az „y” tengelyen a citokinek nyálban mért koncentrációját tüntettük fel. A CTL a kontroll-, míg az OSCC a beteg csoportra vonatkozik. Minden citokin esetében feltüntettük a p értékeket is, a * a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségekre utal.

Eredményeink alapján az IL-1β, IL-6 és TNF-α mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoport között. Korábbi vizsgálatok már kimutatták az IL-6-t a tumor szövetben és azt találták, hogy fontos szerepet játszik az OSCC kifejlődésében, progressziójában és kiújulásában az IL-6 receptor - STAT3 útvonalon [368–370]. Egy másik jelátviteli utat aktiválva az NF-kappa B bekapcsolásával a TNF-α-ról is kimutatták, hogy szerepet játszik a szájüregi daganatok megjelenésében [371]. Tulajdonképpen elmondható, hogy a rossz száj higiénével és szájüregi gyulladással együtt járó tényezők, mint az időskor, dohányzás, magasabb IL-6 szintekkel járnak együtt [372]. A mintagyűjtéskor a bevont donorok alapos szájüregi vizsgálaton és státuszfelvételen estek át. A korban illesztett kontrollok esetében nem találtak semmilyen prekancerózus állapotra utaló elváltozást, de ennek ellenére előfordulhat, hogy ebben a korcsoportban magasabb a gyulladásos állapot, és emiatt nem látunk több citokin esetében statisztikailag szignifikáns különbséget az OSCC és kontroll csoportok között.

Egyes kutatások azt találták, hogy az IL-6 és IL-8 szintje szignifikánsan magasabb volt OSCC-ben szenvedő betegek nyálában, mint krónikus periodontitiszes betegekében [373]. Azt is megfigyelték, hogy az IL-8 magasabb expressziója a tumor sejtekben rosszabb prognózissal járt együtt [374]. Eredményeink alátámasztják az irodalmi adatokat az IL-6 tekintetében. Az OSCC-ben szenvedők nyálában statisztikailag szignifikáns növekedést figyeltünk meg az IL-6 koncentrációban a kontrollokhoz képest. Az IL-8 esetében gyakorlatilag két populációt tudtunk elkülöníteni; 7 beteg esetében átlag fölötti magas értékeket, míg 19 beteg esetében átlag alatti értékeket mértünk. Eredményeink alapján, a szakirodalomban közölt adatokkal ellentétben, az IL-8 esetében nem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns változást. Fujita és munkatársai a mienkhez hasonló megfigyelésre jutottak; OSCC-ben szenvedő betegek szérum és tumor mintáiban mért IL-8 szintek egy kétcsúcsú eloszlást mutattak [374]. Az IL-8-hoz hasonlóan, az IL-1β esetében is elég jelentős átfedés mutatkozott a beteg és a kontroll csoportok között az alacsonyabb koncentráció tartományban; a statisztikailag szignifikáns különbséget feltehetően a néhány nagyon magas érték miatt láttuk. Ezek alapján úgy gondoltuk, hogy az IL-1β valószínűleg nem fog tudni különbséget tenni a csoportok között, ezért a további analízisekből kizártuk.

Annak eldöntésére, hogy melyik a jobb biomarker, vagy esetleg a kombinációjuk ad-e használhatóbb eredményt, ROC statisztikát végeztünk (37. ábra).



37. ábra. A potenciális biomarker citokinek prediktív erejének vizsgálata ROC analízis segítségével.
A szenzitivitást az „y” tengelyen, a specificitást pedig az „x” tengelyen ábrázoltuk. A görbe alatti területet (AUC), a szenzitivitást és a specificitást minden vizsgált potenciális biomarker vagy biomarker-kombináció esetében feltüntettük.

A ROC analízis során az IL-6 82% szenzitivitás és 100% specificitás mellett 0,918 AUC értékkel jó biomarkernek minősült. A TNF-α ezzel szemben csak 75% szenzitivitást, 80%

specificitást és 0,77 AUC értéket mutatott. A két marker kombinációját megvizsgálva az IL-6-hoz nagyon hasonló értékeket kaptunk, tehát az IL-6 jó értékeit a TNF-α nem tudta tovább erősíteni. Mindkét fehérje a gyulladásos folyamatokban vesz részt, feltehetően nem tumor specifikusak, sokkal inkább a tumoros elváltozással kapcsolt vagy az azt megelőző gyulladás markerei lehetnek. Tekintve, hogy biomarker vizsgálatoknál fontos szem előtt tartani a költséghatékonyságot, és itt két hasonló szerepű molekuláról van szó, további vizsgálatainkban csak az IL-6-ra koncentráltunk. Választásunkat az is indokolta, hogy elemezve a szakirodalomban közölt OSCC tanulmányok eredményeit, azt találtuk, hogy a különböző országokban, különböző beteganyagon, más-más technikával kivitelezett vizsgálatok esetében nagyfokú heterogenitás volt megfigyelhető az eredményekben (15. táblázat). Ezzel szemben, ahol vizsgálták az IL-6-t, ott mindenütt pozitívnak találták.

15. táblázat. Az egyes országokban vizsgált nyál OSCC biomarkerek

Ország	Vizsgált fehérjék	Hivatkozás
Amerikai Egyesült Államok	**ACT, FGF2**, **CAT**, **CD44, CD59, EDN1,** H1F0, **IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-8**, INL, KRT19, **LGALS3BP**, MSN, **MYL, PROF1**, RAB7A, S100A12, S100A7, **S100A9,** S100P, **TNF, VEGFA**	[333,361,380,381,362,363,373,375–379]
Brazília	**C1R, C3, C4B, CFB, FAM49B, LCN2, LRG1, SERPINA1, SLPI, TAGLN2**	[382]
Egyesült királyság	**P53ab**	[383]
Horvátország	**FGF2, IL-6**	[384]
India	**LDH, MUC16, IL-8**	[385–387]
Irán	IL-1A, **IL-6**, IL-8, TNF	[367]
Izrael	**ALB, CEACAM5**, **CCNDBP1, KRT19,** EGFR, **IGG, IGF1, LDH, MKI67**, **MMP2, MMP9, MUC16, OGG1, SRC, SERPINB5**, **sIgA, SERPINB3**,	[388–390]

	TPA	
Japán	**DEFA1, IL-1B**, **IL-6,** IL-8, SPP1	[365,366,391]
Kína	**CEACAM5, S100A7, S100A8**, S100A9	[392,393]
Magyarország	CAT, CD44, CD59, IL-1A, IL-1B, **IL-6,** IL-8, KRT19, **LGALS3BP**, PROF1, **S100A9**, TNF, TXN, VEGF	jelen vizsgálat
Olaszország	**STATH, BIRC5**	[394,395]
Szerbia	**IL-1B, IL-8, M2BP**	[364]
Tajvan	**ALB, AMY, ANXA2, APOA1, APOA2, APOA4, C4BPA, C6, C9, CCNDBP1, CD109, CHIT1**, **EGFR, EPHX1, FSCN1, FABP, GSTM1, HEP2, HEXA, HIST1H2AA, HPRT, HSD17B4, ICAM3, IGHA2, IGHV1-2, IGKV1D-12, IGKV4-1, IGLV1-47, ITIH2, ITIH4, NKIRAS1, KNG1, PRCP, RETN, RPL7, S100A8, SERPINA6, SLC4A1, TF, TMEM132A, TUBA1C, VTN, ZN497, ZN501**	[335,396–398]

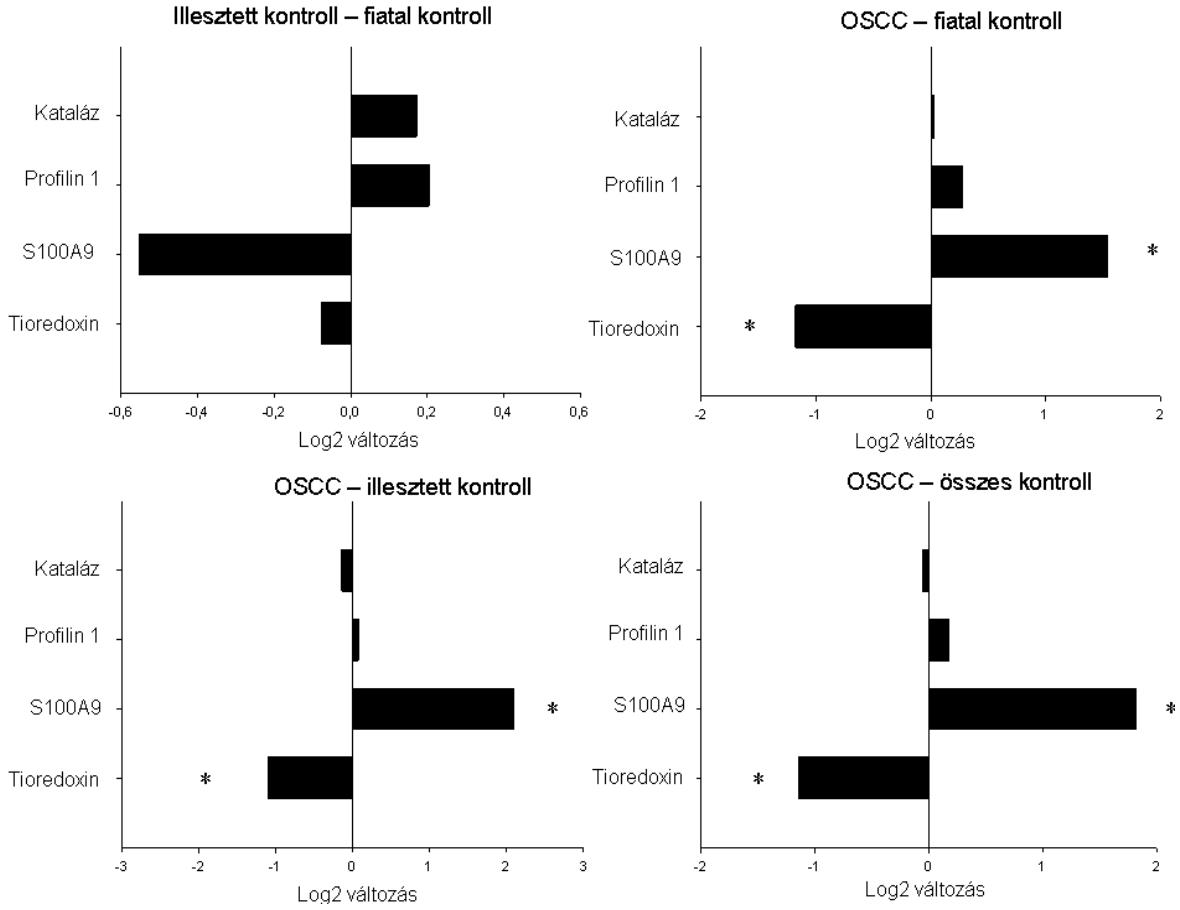
Az egyes országokban különböző módszerekkel, nyálban vizsgált fehérjék listája. A vastagon szedett fehérjéket potenciális OSCC biomarkerként azonosították. A fehérjék jelölése a génnevek használatával történt.

MRM/SRM-alapú célzott tömegspektrometriás módszer fejlesztése és alkalmazása nyálfehérjék vizsgálatára

A citokineken kívül a többi vizsgálni kívánt fehérjére nem volt kereskedelmi forgalomban kapható multiplex módszer, ezért tömegspektrometriás módszerfejlesztésbe kezdtünk. MRM/SRM-alapú tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk ki és optimalizáltunk CD59, CD44, galektin-3-kötő fehérje, kataláz, keratin-19, profilin-1, S100A9 és tioredoxin fehérjék egyidejű vizsgálatára.

Az optimalizált paraméterek (Függelék 5. táblázat) felhasználásával meghatároztuk a fent említett fehérjék relatív mennyiségét a nyálban 13 OSCC-ben szenvedő beteg, 15 korban

illesztett kontroll és 8 fiatal kontroll esetében. Az eredményeket szigorú statisztikai analíziseknek vetettük alá, és négy olyan fehérjét találtunk, amelyek mennyisége jelentősen változott az egyes csoportok között 38. ábra).



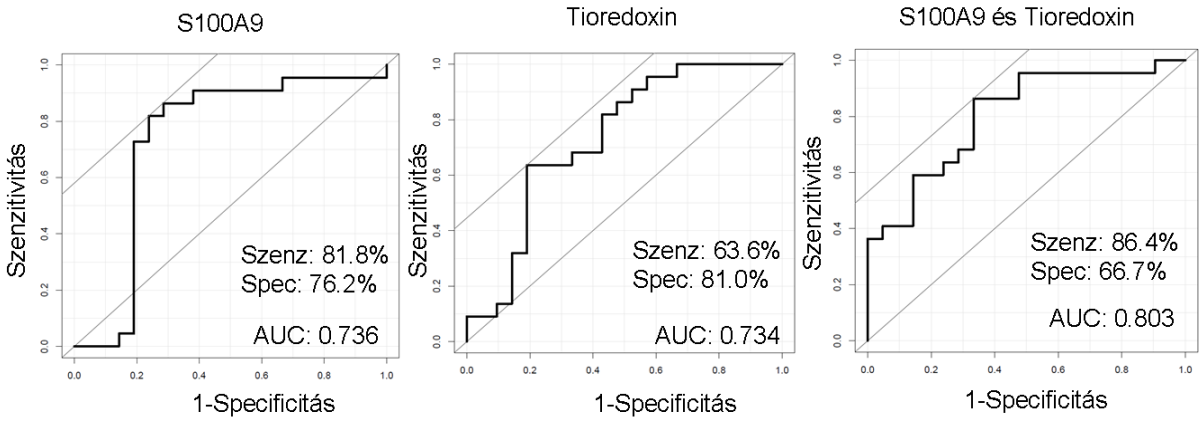
38. ábra. Az MRM/SRM-alapú célzott proteomikai módszerrel történő kvantitálás során jelentős változást mutató nyálfehérjék.
Az „x" tengelyen az egyes csoportok közötti változás mértékét (log2 skála) ábrázoltuk az „y" tengelyen megjelölt fehérjék esetében. A * a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket mutatja.

Két fehérje mennyisége mutatott statisztikailag szignifikáns változást; a tioredoxin szintje csökkent, míg az S100A9 fehérje mennyisége nőtt az OSCC csoportban a kontrollokhoz képest. Az összehasonlítást elvégeztük az OSCC - korban illesztett kontroll, OSCC - fiatal kontroll, fiatal kontroll - korban illesztett kontroll viszonylatban és úgy találtuk, hogy a két fehérje konzisztensen, kortól függetlenül mutatja a különbséget a beteg és kontroll csoportok között.

Az S100A9 fehérje a tumoros léziók egy általános markere, amelyet több tumor típusban azonosítottak, és jelenleg az antitumor terápiás gyógyszerfejlesztés egyik fontos

célpontja [184,399–403]. A tioredoxin az intracelluláris antioxidáns rendszer része, és emelkedett szintjét kimutatták tumoros szövetmintákban [404–407]. Nincs információnk a tioredoxin mennyiségéről a nyálmirigyben, a nyálban vagy a tumoros szövetben, de nem kizárható, hogy a tioredoxin mennyiségnek csökkenése a nyálban, a tumoros szövetben való feldúsulásának következménye.

Annak érdekében, hogy eldönthessük, hogy melyik fehérje lehet alkalmas biomarker, ebben az esetben is ROC analízist végeztünk (39. ábra).



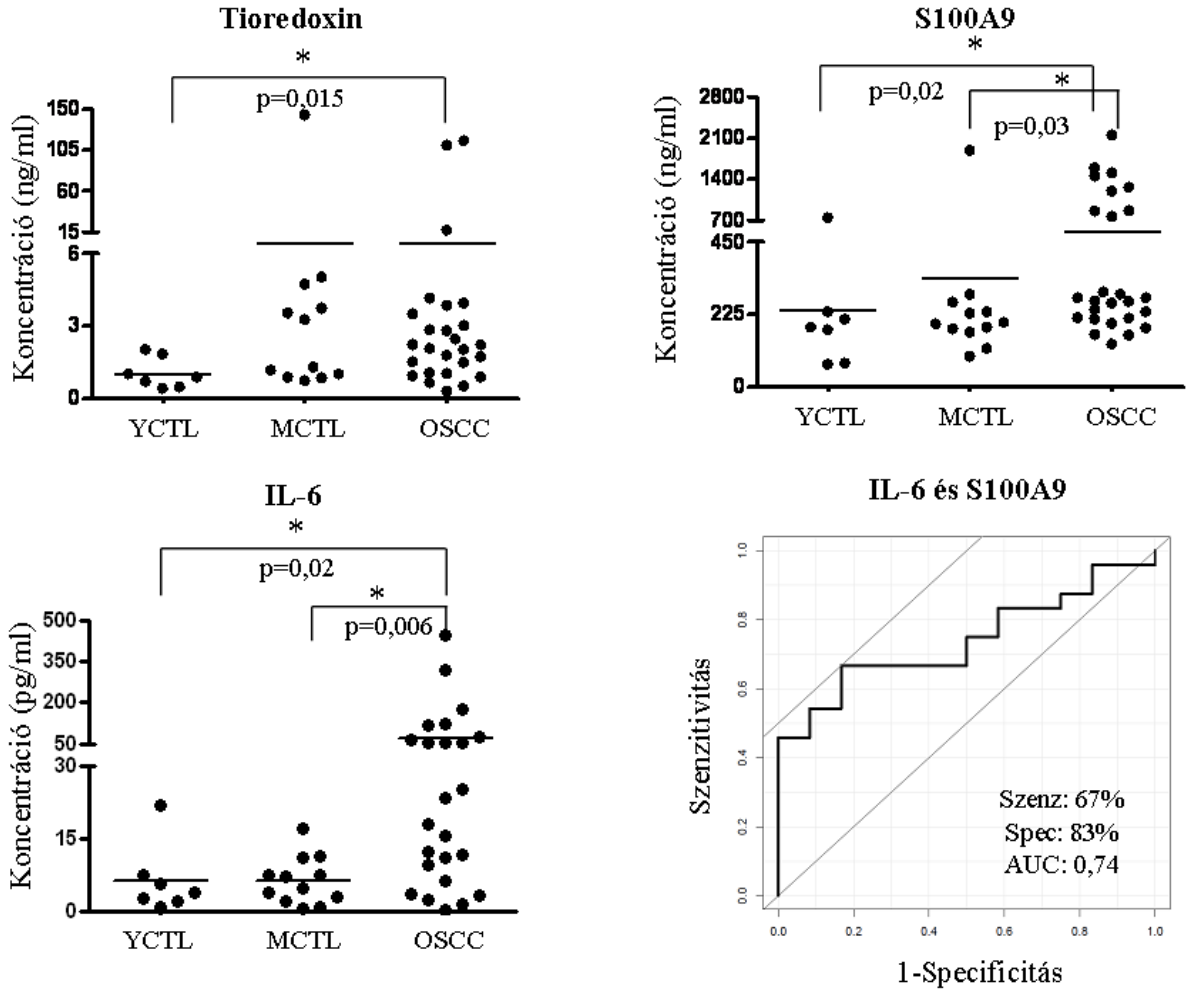
39. ábra. A potenciális biomarkerek prediktív erejének vizsgálata ROC analízis segítségével.
A szenzitivitást az „y” tengelyen, a specificitást pedig az „x” tengelyen ábrázoltuk. A görbe alatti területet (AUC), a szenzitivitást és a specificitást minden vizsgált potenciális biomarker vagy biomarker-kombináció esetében feltüntettük.

Mindkét fehérje esetében az AUC érték 0,73 volt, de míg a tioredoxin 64% szenzitivitást és 81% specificitást mutatott, addig az S100A9 szenzitivitása 82%, specificitása 76% volt. A két fehérje kombinációja viszont erősítette egymást; együttes alkalmazásuk 86%-ra növelte a szenzitivitást, de 67%-ra csökkentette a specificitást 0,8 AUC értéket mutatva.
Eredményeink alapján mindkét fehérje jól használható potenciális biomarker lehet.

Potenciális nyál biomarkerek ellenőrzése ELISA módszerrel

Ismerve az ellenőrzés fontosságát, a következő lépésben egy másik gyűjtésből származó mintasorozaton kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitek segítségével meghatároztuk 26 OSCC-ben szenvedő beteg, 13 korban illesztett kontroll és 7 fiatal kontroll nyálában az IL-6, S100A9 és tioredoxin koncentrációját (40. ábra).
A tioredoxin csak a fiatal kontroll és OSCC csoport között mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget, de a korban illesztett kontroll és OSCC csoport között nem. Az

eddigi vizsgálatok alapján úgy gondoljuk, hogy a tioredoxin nem használható biomarkerként az OSCC diagnózisára.



40. ábra. A potenciális nyál biomarkerek ellenőrzése ELISA módszerrel.
A tioredoxin, S100A9 és IL-6 fehérjék nyálban mérhető koncentrációi („y" tengely) az OSCC-ben szenvedő betegektől (OSCC), fiatal kontrolloktól (YCTL) és illesztett kontrolloktól (MCTL) származó mintákban. Feltüntettük minden esetben a p értéket, a * a statisztikailag szignifikáns ($p<0.05$) különbségre utal. A ROC analízis az IL-6 és az S100A9 fehérje kombinációjának prediktív értékét mutatja.

.

Az IL-6 és S100A9 fehérjék esetében mind a fiatal kontroll, mind a korban illesztett kontroll illetve az OSCC csoport között statisztikailag szignifikáns volt a különbség. A ROC analízist elvégeztük ezen a mintasoron is, viszont a korábbi teszt sorozaton kapott jól teljesítő biomarkerek ROC analízissel kapott értékei rosszabbak voltak a referencia mintasoron. Az IL-6 AUC értéke 0,78, a szenzitivitás 50% és a specificitás 100% volt, az S100A9 esetében az AUC 0,46, a szenzitivitás 96% és a specificitás 16% volt. Az IL-6 és S100A9 kombinációja az elfogadható tartományba tolta az értékeket: az AUC érték 0,74-re, a

szenzitivitás 67%-ra és a specificitás 83%-ra módosult. Eredményeink alapján az IL-6 és S100A9 kombinációja potenciális biomarkernek ígérkezik az OSCC diagnózisában. Kutatócsoportunk egy másik kutatásában az IL-6 fehérje és mRNS szinteket vizsgálta multi centrikus gyűjtésből származó OSCC-ben szenvedő betegek és kontrollok nyálmintáiban, és azt tapasztaltuk, hogy az IL-6 mind mRNS, mind fehérje szinten jól teljesítő biomarker, amely potenciális markerként használható lehet az OSCC diagnosztikájában, sőt akár szűrésre is alkalmazható [408].

Természetesen ehhez szükséges a validálás elvégzése ezres mintaszámon, de eredményeink és az irodalomban közölt adatok mind arra mutatnak, hogy az IL-6 lehet az általunk keresett biomarker, amely óriási segítséget nyújthat az OSCC korai stádiumban történő diagnózisához.

5.3.6. A normál verejték tömegspektrometriás analízise, és a nagy mennyiségben jelen levő verejtékfehérjék azonosítása

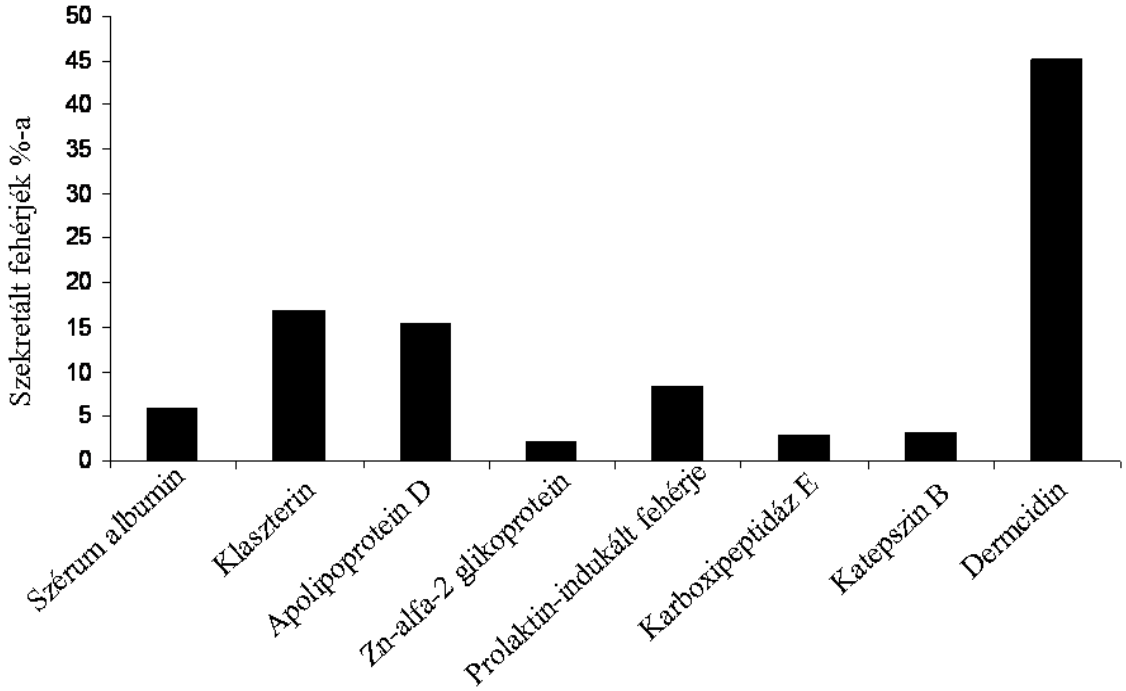
A verejték a bőrben levő verejtékmirigyek által folyamatosan termelt folyadék, amely a bőr által biztosított fizikai barrier mellett az első védelmi vonal részét képező kémiai barrierként véd a potenciális patogénekkel szemben [145,409,410]. A könnyhöz és a nyálhoz hasonlóan a verejték egy állandóan termelődő testfolyadék, amely fontos szerepet játszik a test hűtésében, valamint az antimikrobiális védekezésben, illetve sérüléskor szerepe van a szöveti regenerációban [149,411]. Mennyiségének és összetételének változása diagnosztikus jelentőségű, használják például cisztás fibrózis diagnosztizálására, valamint speciális szenzorok segítségével a vércukorszint változását tudják nyomon követni a verejtékben mérhető glükóz mennyiségének vizsgálatával [412,413]. Több mint 1000 fehérjét azonosítottak eddig a verejtékben, illetve a verejtékből izolált exoszómákban [409,410]. Számos bőrproblémában vizsgálták fehérje összetételét, és több potenciális biomarkert azonosítottak bőrbetegségek pl. atópiás dermatitisz estében, de skizofréniára jellemző verejték fehérjéket is leírtak [414–416].

A humán verejték analízise jelenleg még viszonylag kiaknázatlan diagnosztikai potenciállal rendelkezik. A verejték mennyisége és összetétele nagymértékben változik a különböző hatásokra (nyugalmi állapot, sportaktivitás, hő, stressz stb.) [411], és megfelelő mennyiségű gyűjtése is nehézségekbe ütközhet. Figyelembe véve, hogy a verejték összetételének változása információt adhat a bőr állapáról, valamint a szervezet egészét érintő

történésekről, érdemes jobban megismerni az egyes fiziológiás állapotokra jellemző verejték összetételét.

A megfelelő mintamennyiség érdekében stimulált verejtéket gyűjtöttünk. 20 egészséges önkéntes (10 férfi, 10 nő, életkor: 22-35 év) szaunában, hő hatására termelődő verejték mintáját gyűjtöttük össze, majd ezeket összekevertük, és ezt az egységes minta poolt használtuk fel a további vizsgálatainkhoz. Tekintve, hogy viszonylag kevés információ áll rendelkezésre a normál verejték fehérje összetételére vonatkozóan, célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk és azonosítjuk a nagy mennyiségben jelen levő fehérjéket.

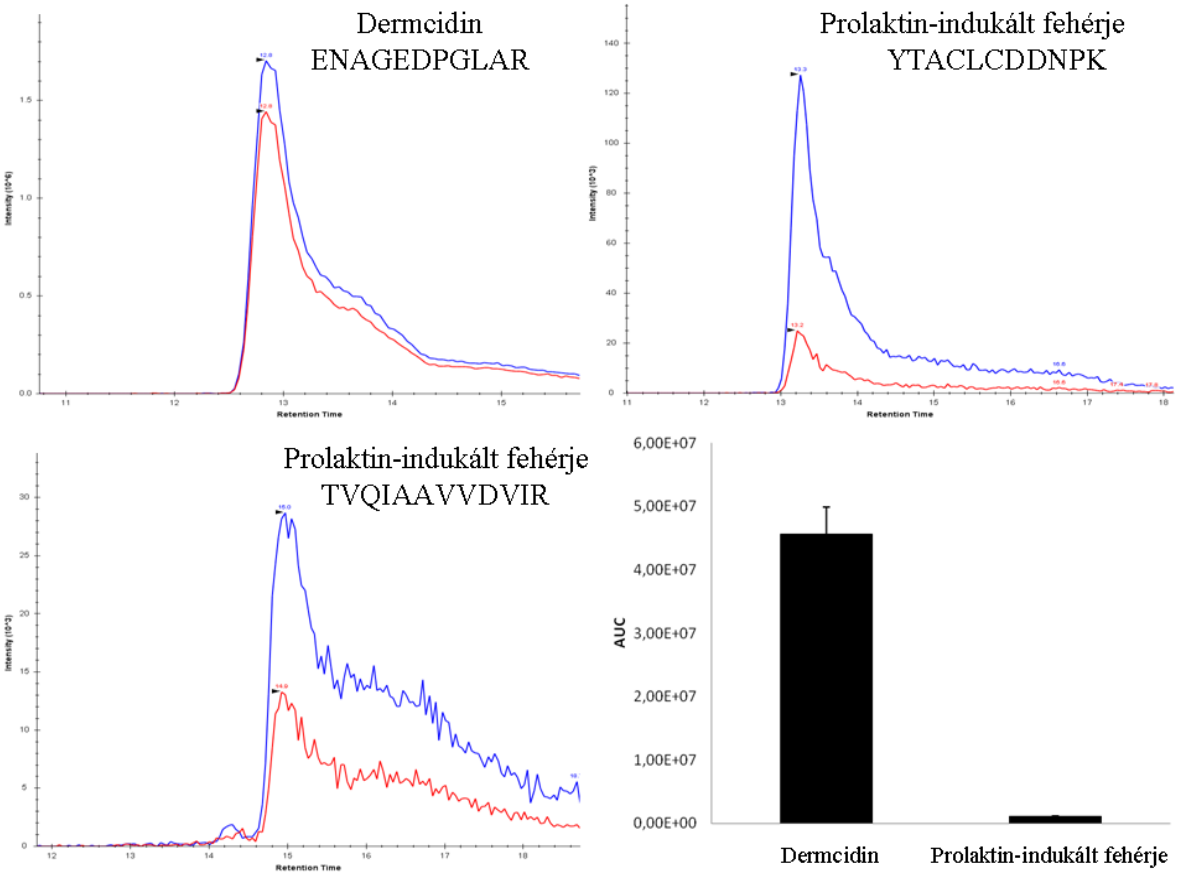
Tömegspektrometriás analízis segítségével 95 verejték fehérjét azonosítottunk (Függelék 6. táblázat), amelyből 20 új, a verejtékben addig még nem azonosított fehérje volt, valamint elvégeztük a fehérjék jelölés nélküli relatív mennyiségi analízisét is. A verejtékfehérjék tömegspektrometriás vizsgálatát kollaborációs partnerünk végezte el az Arizonai Egyetemen. A kvantitáláshoz a mintához adott mennyiségben hozzáadott T33V *Rhodobacter capsulatus* citokróm c-t használtunk referenciaként. A citokróm c mennyiségének alapján megbecsültük a dermcidin, a verejtékben legnagyobb intenzitással megjelenő fehérje mennyiségét. Számításaink szerint a dermcidin koncentrációja a verejtékben kb. 1,14 pmol/µg totál fehérje, ami hasonló a mások által megállapított értékhez [417]. Elvégeztük a szekretált fehérjék relatív mennyiségi analízisét (41. ábra).



41. ábra. A szekretált fehérjék százalékos megoszlása a verejtékben.
A jelölés nélküli kvantitálás során meghatározott mennyiségek alapján kiszámoltuk, hogy az „x” tengelyen feltüntetett fehérjék a szekretált fehérjék hány százalékát képezik („y” tengely).

A dermcidin szint mellett az apolipoprotein D és kluszterin mennyisége mutatkozott magasnak. A dermcidin az összes szekretált fehérje 46%-át, a kluszterin 17%-át, az apolipoprotein D 15%-át, a prolaktin indukált fehérje 8%-át tette ki, míg a szérum albumin csak a fehérjék 6%-át jelentette (41. ábra). Összesen, a verejték leggyakoribb öt fehérjéje a szekretált verejtékfehérjék 91%-t adta.

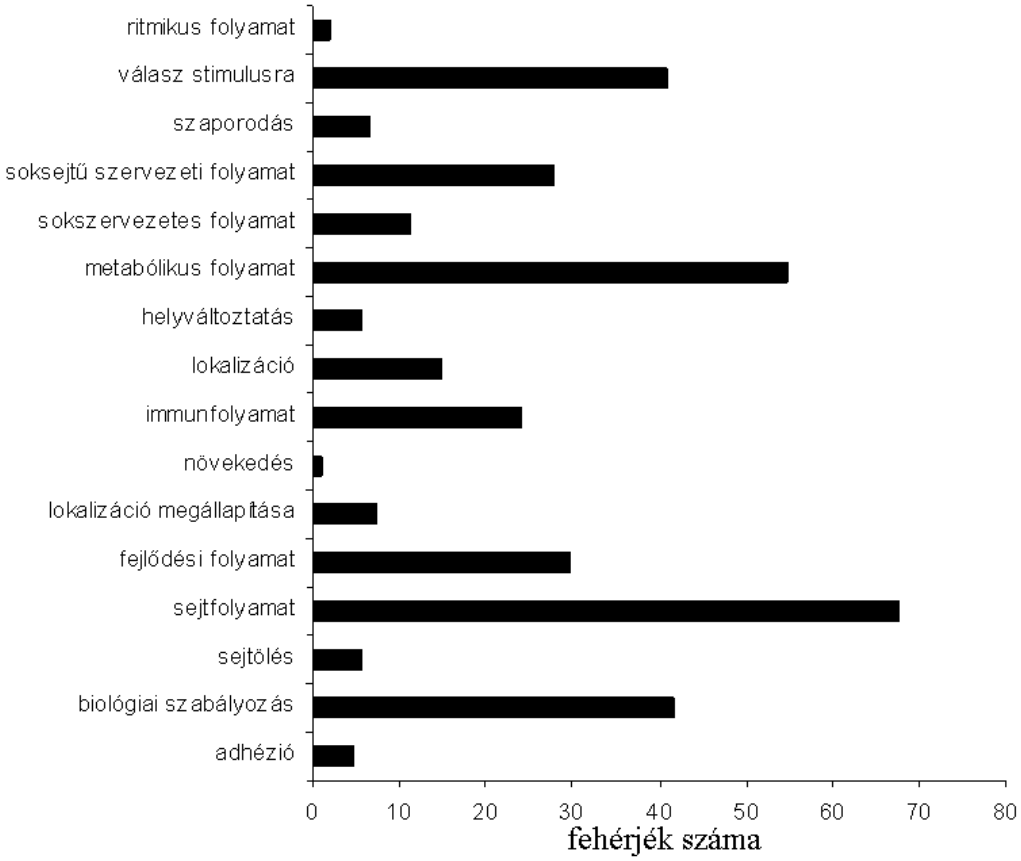
Ahhoz, hogy eredményeinket validáljuk egy MRM/SRM-alapú tömegspektrometriás kísérletet terveztünk. A megfelelő proteotipikus peptidek kiválasztása után a paraméterek optimalizálása következett, majd felhasználva az optimalizált módszert és a stabil izotóppal jelölt ENAGEDPGLAR dermcidin peptidet és YTACLCDDNPK és TVQIAAVVDVIR prolaktin indukált fehérje peptideket, elvégeztük a vizsgálatokat (42. ábra).



42. ábra. A dermcidin és prolaktin indukált fehérje peptidek relatív mennyiségi meghatározása.
A kromatogrammok az egyes peptidekre tervezett MRM/SRM-alapú célzott proteomikai analízis eredményeit mutatják. Piros színnel a verejtékben levő endogén peptidről, míg kék színnel a szintetikus, stabil izotóppal jelölt formájáról nyertünk információt. Az oszlopdiagram a dermcidin és prolaktin indukált fehérje egymáshoz viszonyított relatív mennyiségét mutatta. A kromatogrammok esetében az „x" tengelyen a retenciós időt (min), míg az „y" tengelyen a detektált jel intenzitását tüntettük fel. Az oszlopdiagramon az „y" tengelyen a kromatogrammokon mért görbe alatti területeket (AUC) tüntettük fel az „x" tengelyen jelezett fehérjék esetében.

A tervezett módszerrel meghatároztuk a dermcidin, mint legnagyobb mennyiségben jelen levő fehérje és egy másik fehérje, a prolaktin indukált fehérje mennyiségét. Mind a jelölés nélküli kvantitálási, mind az MRM/SRM-alapú célzott proteomikai kísérletek azt mutatták, hogy a dermcidin a verejték karakterisztikus abundáns fehérjéje.

Ahhoz információt nyerjünk a fő verejtékfehérjék szerepéről, funkcionális analízist végeztünk (43. ábra).



43. ábra. A GO szerinti biológiai folyamatokban résztvevő verejtékfehérjék száma. Az „y” tengelyen a GO szerinti funkciókat, míg az „x” tengelyen az adott funkcióval rendelkező verejték fehérjék számát tüntettük fel.

A verejtékfehérjék jelentős száma vesz részt a metabolikus folyamatokban, immunfolyamatokban, fejlődési folyamatokban vagy stimulusra adott válasz kialakításában, ill. rendelkezik biológiai szabályozó szereppel. A fő verejtékfehérjék funkcióját alaposabban megvizsgálva úgy találtunk, hogy főként az immunrendszer működésében, valamint a patogének elleni védekezésben játszanak fontos szerepet.

A dermcidinről, mint legnagyobb mennyiségben megjelenő verejtékfehérjéről, ismert a széles spektrumú antibiotikus aktivitása [145]. A dermcidinből származó peptidek stabilak, aktivitásukat nem módosítja a verejtékre jellemző savas pH vagy a magas só koncentráció,

így feltehetően nem csak mennyiségéből, de funkciójából és stabilitásából adódóan is a legfőbb verejték fehérjének tekinthető [126,145]. Munkánk során kétféle tömegspektrometriás eljárás alkalmazásával sikerült is bizonyítani, hogy a dermcidin a legnagyobb mennyiségben jelen levő verejték fehérje egészséges önkéntesek szaunában gyűjtött verejtékében.

A prolaktin indukált fehérje funkciója nem teljesen tisztázott. Ismert, hogy képes bizonyos baktériumokhoz hozzákötődni és megtalálták már gyakorlatilag minden olyan testfolyadékban, amely potenciális patogénekkel kapcsolatba kerülhet, mint pl. a verejték, nyál, könny [418–420]. Kimutatták egerekben, és úgy gondolják, hogy a korai embrionális állapotban, amikor az immunrendszer még nem fejlődött ki megfelelően, feltehetően a prolaktin indukált fehérje biztosítja az antibakteriális védelmet [420]. Ugyanakkor azt is kimutatták, hogy képes kapcsolatba lépni sejtfelszíni CD4 receptorokkal, ill. megnövekedett mennyisége egyes daganatokra pl. melldaganat jellemző [156,421].

A kluszterin szekretált formája az extracelluláris chaperonok közé tartozik és majdnem minden testfolyadékban megtalálható. Fő funkciója a testfolyadék-epitél sejtek határfelület homeosztázisának fenntartása és a gyulladásos állapotok megelőzése [152,155]. A rendelkezésre álló adatok alapján úgy tűnik, hogy a kluszterin kapcsolatba lép a mátrix metalloproteinázokkal és gátolja aktivitásukat. Nagyon valószínű, hogy mérsékelni tudja a keratinociták károsodását és a bőr gyulladását [152].

Az albumin jelenlétét a verejtékben már több kutatás is igazolta, viszont nem tisztázott, hogy honnan származik [422]. Lehet a verejtékmirigyek terméke vagy származhat a vérből, mint ahogy a könny esetében is megfigyelték, hogy transzudációval átjut a vérből a könnybe. Az albumin fontos kötő fehérje, amely számos anyag megkötéséért és transzportjáért felelős, de azt is megfigyelték, hogy az N-terminális részéről lehasadó DHAK peptid jelentős antioxidáns aktivitással rendelkezik [423,424].

Az apolipoprotein D a lipokalinok családjába tartozik, sokféle ligandot képes megkötni és elsősorban a hidrofób molekulák szállításáért felelős. Kimutatták, hogy fontos szerepe van a lipidek peroxidációjának a megakadályozásában, védelmet biztosítva a sejtek számára az oxidatív stresszel szemben [425,426]. Jelenléte a verejtékben utalhat az első vonalbeli védekező szerepére antioxidáns védelmet biztosítva a peroxidáció káros hatásai ellen.

A szakirodalomban közölt információkat és a funkcionális analízis adatait egybevetve úgy tűnik, hogy a verejték nagy mennyiségben jelen levő abundáns fehérjéi elsősorban védekező szereppel bírnak és a verejtékben is megtalálható ún. kémiai barrier részét képezik.

A dermcidin és prolaktin indukált fehérje feltehetően a mikrobák elleni védekezésben játszik szerepet, a kluszterin chaperonként és MMP inhibitorként, az apolipoprotein D pedig antioxidánsként viselkedik. Az albumin egyrészt kötő-, másrészt antioxidáns funkciójával segíti a kémiai barrier működését. Ezek a fehérjék biztosítják az első vonalbeli védekezést, és mennyiségük változása patológiás állapotok kialakulásához vezethet.

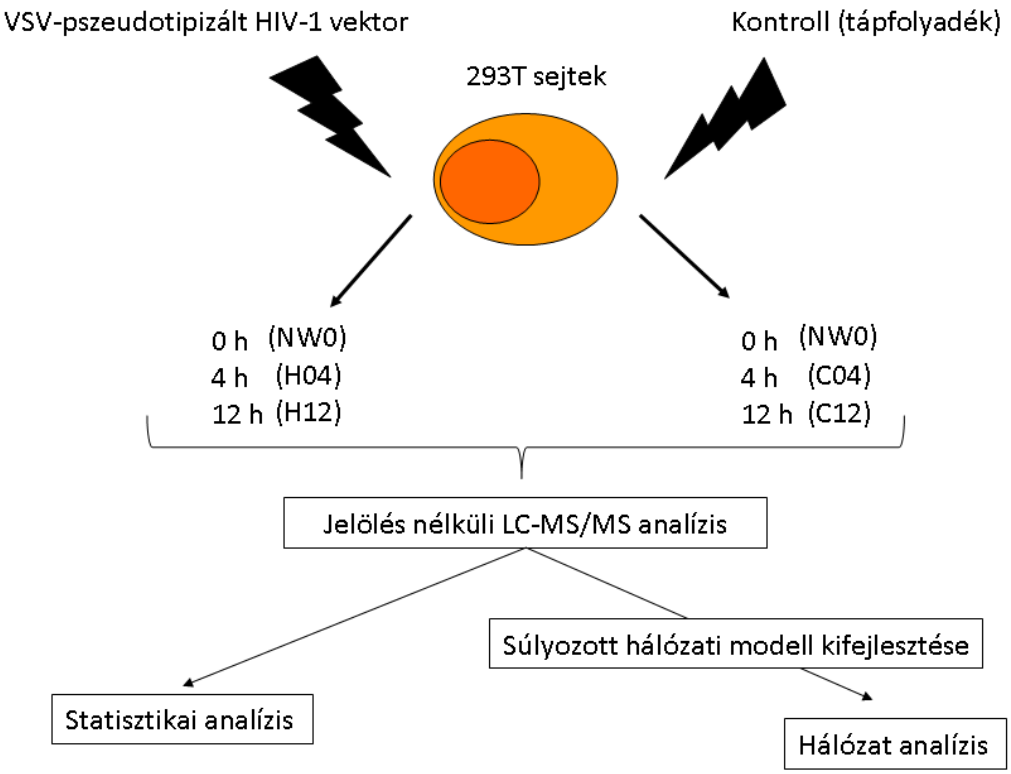
5.4. Komplex, rendszerszintű hálózatelemzési módszerek kidolgozása és alkalmazása a minőségi és mennyiségi proteomikai adatok együttes elemzésére

A modern proteomikai technikák alkalmazásával világszerte a proteomikai laboratóriumok naponta több GB-nyi adatot generálnak. Ezek igen jelentős része nem csak kvalitatív, hanem kvantitatív információkat is tartalmaz. Sok csoport dolgozik azon, hogy olyan szoftveres hátteret teremtsenek meg, amely segítségével az adatok értelmezhetők és az adatokban levő biológiai információk kinyerhetők. Egyik ilyen megközelítési lehetőség a minél teljesebb adatelemzéshez az adatok hálózatban történő megjelenítése és elemzése [427–432]. Különböző adatbázisokban tárolt információk alapján felrajzolható a mintában azonosított fehérjék fehérje-fehérje interakciós hálózata [72,75]. Azonban ezek a hálózatok az esetek nagy részében csak bináris hálózatok, azaz a kapcsolat meglétét, vagy hiányát tudjuk vizsgálni, mivel a kvantitatív adatokat kevésbé veszik figyelembe. Munkánk elkezdésekor voltak próbálkozások a kvantitatív adatok beépítésére a hálózatok rajzolásakor [433,434], de ezek elég bonyolult matematikai módszereket alkalmaztak, és nem voltak könnyen kivitelezhetők. Munkánk során a cél az volt, hogy az adattudományban gyakran használt súlyozott hálózatot [435] alkalmazzuk a proteomikai adatok elemzésére, és egy egyszerűbb matematikai megközelítés segítségével a hálózatokba építsük be a kvantitatív adatokat is. Ily módon lehetőségünk nyílhat árnyalni az interakciók által felrajzolt képet, és pontosabb, vagy akár korábban rejtve maradó következtetéseket levonni.

Vizsgálatainkhoz, Tőzsér professzor úr laboratóriumával együttműködve, a HIV-1 által megváltoztatott gazdasejt proteómot vizsgáltuk és a HIV-1 transzdukció hatására bekövetkező proteomikai változásokat próbáltuk nyomon követni a hálózatokban bekövetkező módosulások tanulmányozásával.

A HIV-1 hatására a gazdasejtben egy jelentős átprogramozódás kezdődik; leáll a fehérjék szintézise, kivéve a vírus számára szükséges fehérjéké, illetve a sejtek elkezdik termelni a vírusokat [436,437]. A folyamatot korai és késői fázisokra lehet felosztani, és míg az utóbbit intenzíven vizsgálták, addig az előbbiről kevés információ áll rendelkezésre. Ezért

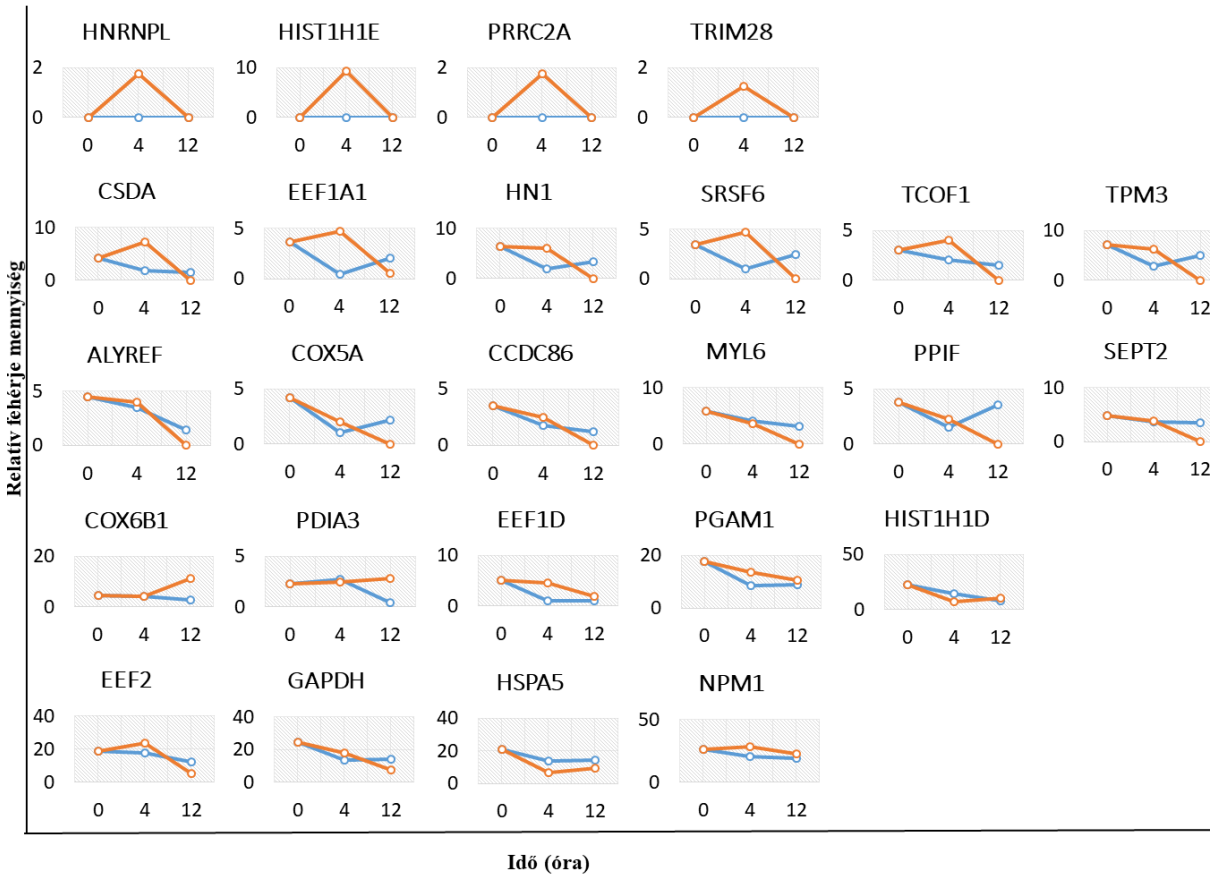
a 293T sejteket VSV pszeudotipizált HIV-1 vírusokkal transzdukáltuk, és a bekövetkező proteomikai változásokat azonnal (0 óra), 4 óra, ill. 12 óra elteltével vizsgáltuk jelölés nélküli kvantitálás segítségével (44. ábra).



44. ábra. Az alkalmazott munkafolyamat sémája.

A kapott adatokat először klasszikus munkafolyamatot követve elemeztük: megvizsgáltuk az egyes állapotok közötti kvalitatív különbségeket, az eltűnő vagy megjelenő fehérjéket, majd a kvantitatív analízis következett. Figyelembe véve az adatok eloszlását, egy módosított lineáris modellt használtunk a csoportok közötti különbségek megjelenítésére (45. ábra).

A HIST1H1E, HNRNPL, PRRC2A és TRIM28 fehérjéket csak a HIV-1 kezelés után 4 órával tudtuk kvantitálni. A String adatbázisban tárolt funkcionális adatokat felhasználva megvizsgáltuk az egyes fehérjék funkcióját. A HIST1H1E a nukleoszómák közötti linker régióval létesít kapcsolatot és a DNS kondenzációban játszik szerepet, míg a HNRNPL, PRRC2A és TRIM28 a transzlációban, illetve a transzkripcióban vesz részt (16. táblázat). Az ALYREF, CCDC86, CSDA, COX5A, HN1, MYL6, PPIF, SEPT2, SRSF6, TCOF1 és TPM3 fehérjék a HIV-1 kezelés után 12 órával nem voltak kvantitálhatók, de minden más időpontban igen.



45. ábra. A statisztikailag szignifikáns változást mutató fehérjék relatív mennyiségének alakulása az egyes mintavételi időpontokban.
Az „x” tengelyen a mintavétel idejét, míg az „y” tengelyen a tömegspektrometriás analízis révén meghatározott relatív fehérje mennyiséget ábrázoltuk. A kék színnel jelölt adatok a kontrollra, míg a piros színnel jelöltek a HIV-1-el kezelt mintára vonatkoznak. A fehérjéket a génnevekkel jelöltük.

A fehérjék funkcióját megvizsgálva (16. táblázat) azt találtuk, hogy az ALYREF, CCDC86, SRSF6 és TCOF1 az RNS kötésben vesz részt, a CSDA-nak a DNS kötésben van szerepe, a PPIF a fehérje feltekeredésben, a HN1 a szignalizációban, a COX5A az energia nyerésben, és a MYL6, SEPT2 és TPM3 a citoszkeleton összeszerelésében játszik szerepet.
A statisztikai elemzés azt mutatta, hogy a CSDA, EEF1A1, EEF1D, HN1, NPM1, PGAM1 és SRSF6 mennyisége statisztikailag szignifikáns módon megnőtt, míg a HIST1H1D és HSPA5 szintje csökkent a HIV-1 kezelés után 4 órával. Fontos azt is kiemelni, hogy a CSDA, HN1 és SRSF6 mennyisége miután megemelkedett a HIV-1 kezelést követő 4 órás időpontban, nem volt kvantitálható 12 óra elteltével.

12 órával a kezelést követően a COX6B1 és PDIA3 mennyisége megnőtt, míg az EEF2 és GAPDH mennyisége csökkent a HIV-1 kezelt mintákban a kontroll mintákhoz képest.

16. táblázat. A HIV-1 transzdukció hatására jelentős változást mutató fehérjék

Génnév	Fehérje neve	Funkció
ALYREF	THO komplex alegység 4	RNS kötés
CCDC86	Coiled-coil domén tartalmú 86	RNS kötés
COX5A	Citokróm c oxidáz alegység 5A	energia nyerés, metabolizmus
COX6B1	Citokróm c oxidáz alegység 6B1	energia nyerés, metabolizmus
CSDA	Y-box-kötő fehérje 3	DNS kötés
EEF1A1	Elongációs faktor 1 alfa 1	transzláció
EEF1D	Elongációs faktor 1 delta	transzláció
EEF2	Elongációs faktor 2	transzláció
GAPDH	Gliceraldehid-3 foszfát dehidrogenáz	metabolizmus
HIST1H1D	Hiszton H1.3	DNS kondenzáció
HIST1H1E	Hiszton H1.4	DNS kondenzáció
HN1	Jupiter mikrotubulus asszociált homológ 1	szignalizáció
HNRNPL	Heterogén nukleáris ribonukleoprotein L	splicing, RNS kötés
HSPA5	78 kDa glükóz-regulált fehérje	fehérje feltekeredés
MYL6	Miozin könnyű polipeptid 6	citoszkeleton összeszerelés
NPM1	Nukleofoszmin	RNS kötés
PDIA3	Protein diszulfid izomeráz A3	fehérje feltekeredés
PGAM1	Foszfoglicerát mutáz 1	metabolizmus
PPIF	Peptidil-prolil cisz-transz izomeráz F	fehérje feltekeredés
PRRC2A	PRRC2A fehérje	splicing
SEPT2	Szeptin 2	citoszkeleton összeszerelés
SRSF6	Szerin/arginin-gazdag splicing faktor 6	RNS kötés, splicing
TCOF1	Treacle protein	transzláció, RNS polimeráz I kötés
TPM3	Tropomiozin alfa-3	citoszkeleton összeszerelés
TRIM28	Transzkripciós köztes faktor béta 1	transzkripció

A táblázat a fehérjék nevét, a rövidítéshez használt génneveket és a String adatbázisból kinyert funkciókat tartalmazza.

A statisztikailag szignifikáns változásokat mutató fehérjék funkcióját megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy HIV-1 hatására a 4 órás időpontban az RNS kötésben résztvevő fehérjék mennyisége megnőtt, majd 12 óra után lecsökkent vagy teljesen el is tűnt.

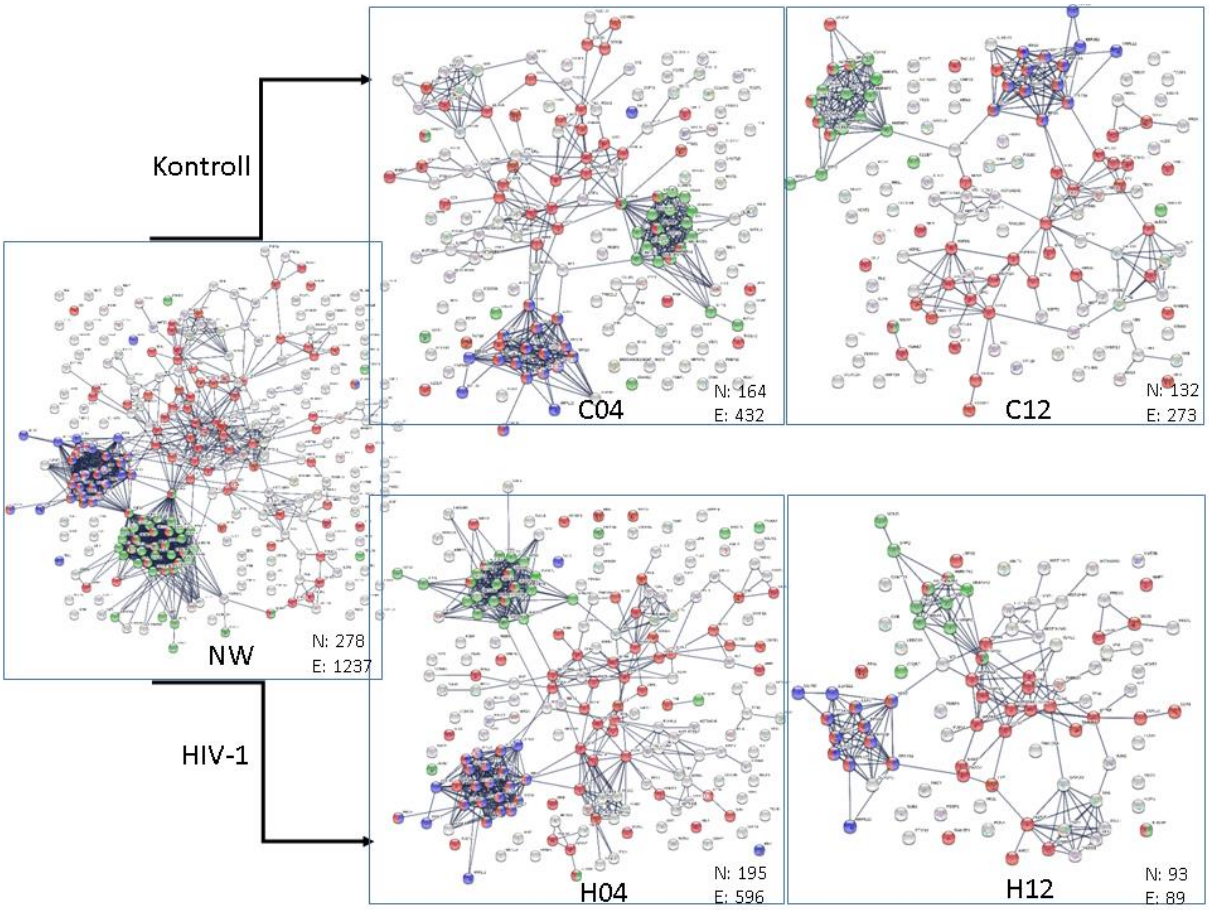
Eredményeink összhangban vannak a génexpressziós vizsgálatokkal nyert korai fázisra jellemző eredményekkel [438].

5.4.1. Fehérje-fehérje interakciós hálózatok analízise

Annak érdekében, hogy az adatsorban levő többi információt is fel tudjuk használni, a String adatbázis segítségével, szigorú kritériumok alkalmazásával, felrajzoltuk az egyes csoportokban azonosított fehérjék interakciós hálózatát (46. ábra).
A rajzoláshoz a kontroll és a HIV-1 kezelt sejtek esetében a 0 óra időpontban begyűjtött mintákból származó információkat kombináltuk és az ebből felrajzolt hálózatot neveztük el kiindulási hálózatnak (NW). A C04 ill. C12 hálózatok a kontroll, míg a H04 és H12 hálózatok a transzdukált sejtek különböző időpontokban begyűjtött mintáinak elemzéséből származó fehérjék hálózatai.
A hálózatok elemzéséből jól látható, hogy a kezdeti állapothoz képest az idő elteltével csökken a fehérjék, és a fehérje-fehérje interakciók száma.

Mivel a String vagy Cytoskape által felrajzolt bináris hálózat csak azt mondja meg, hogy az adatbázisban felhalmozott információk szerint lehet-e kapcsolat a két fehérje között (46. ábra), az adatok alapján létrehozott hálózatban figyelembe kell venni az adatsorban levő mennyiségi információkat is. Az Arizonai Egyetem Proteomika Laboratóriumában végzett analízisek mennyiségi adatot is szolgáltattak; az egyes fehérjék MS/MS alapú analízise során a felvett MS/MS spektrumok száma, megfelelő normalizálás után, megadta a fehérjék relatív mennyiségét a mintákban. A mennyiségi adatokat egy egyszerű statisztikai modell segítségével beillesztettük a hálózatba.
Ebben a formában a hálózat már nem csak az elméleti kapcsolódási lehetőséget mutatta, hanem a kapcsolatokat átalakítottuk az adott fehérje pár becsült kapcsolati intenzitásává, amely egyenesen arányos a kapcsolatba lépő fehérjék mennyiségével és fordítottan arányos a kapcsolatok számával (47. ábra).

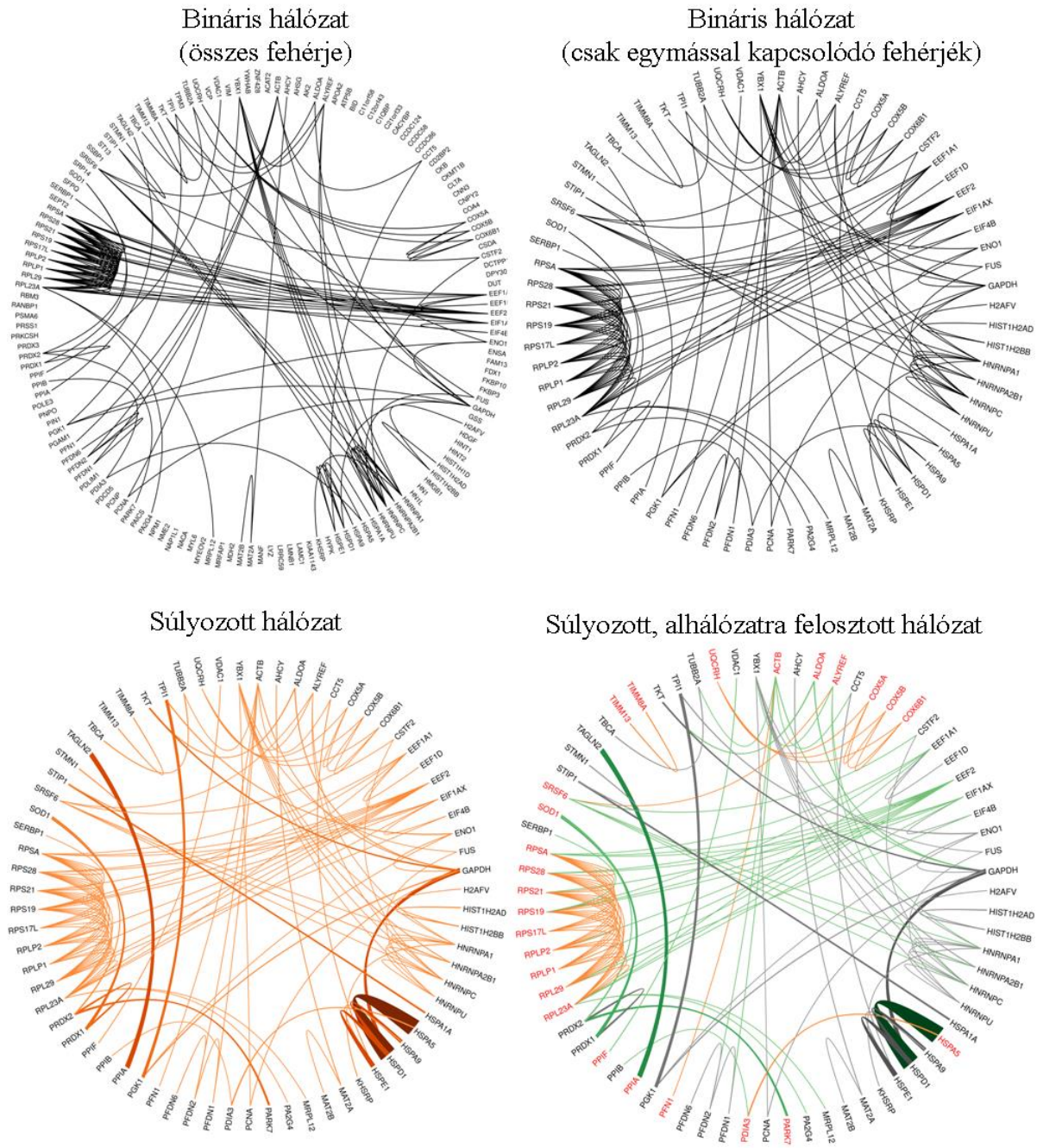
Tekintve, hogy százas nagyságrendű fehérje és fehérje-fehérje interakció elemzését kellett elvégezni, a hálózatokat tovább bontottuk alhálózatokra a fehérjék funkciói szerint. A String adatbázis képes kilistázni a feldúsult GO funkciókat. Ezt felhasználva a String által kilistázott összes olyan statisztikailag szignifikáns módon feldúsuló GO funkciót figyelembe vettük, ahol a fehérjék száma meghaladta a 10-t.



46. ábra. Az egyes mintákban tömegspektrométerrel azonosított fehérjék hálózata. A gömbök a fehérjéket, míg a vonalak a fehérjék közötti interakciókat jelzik. A zöld szín az RNS splicing, a kék szín a transzláció, míg a piros szín a transzport GO funkciókra utal. Mindegyik hálózat esetében feltüntettük a fehérjék számát (N) és az interakciók számát (E).

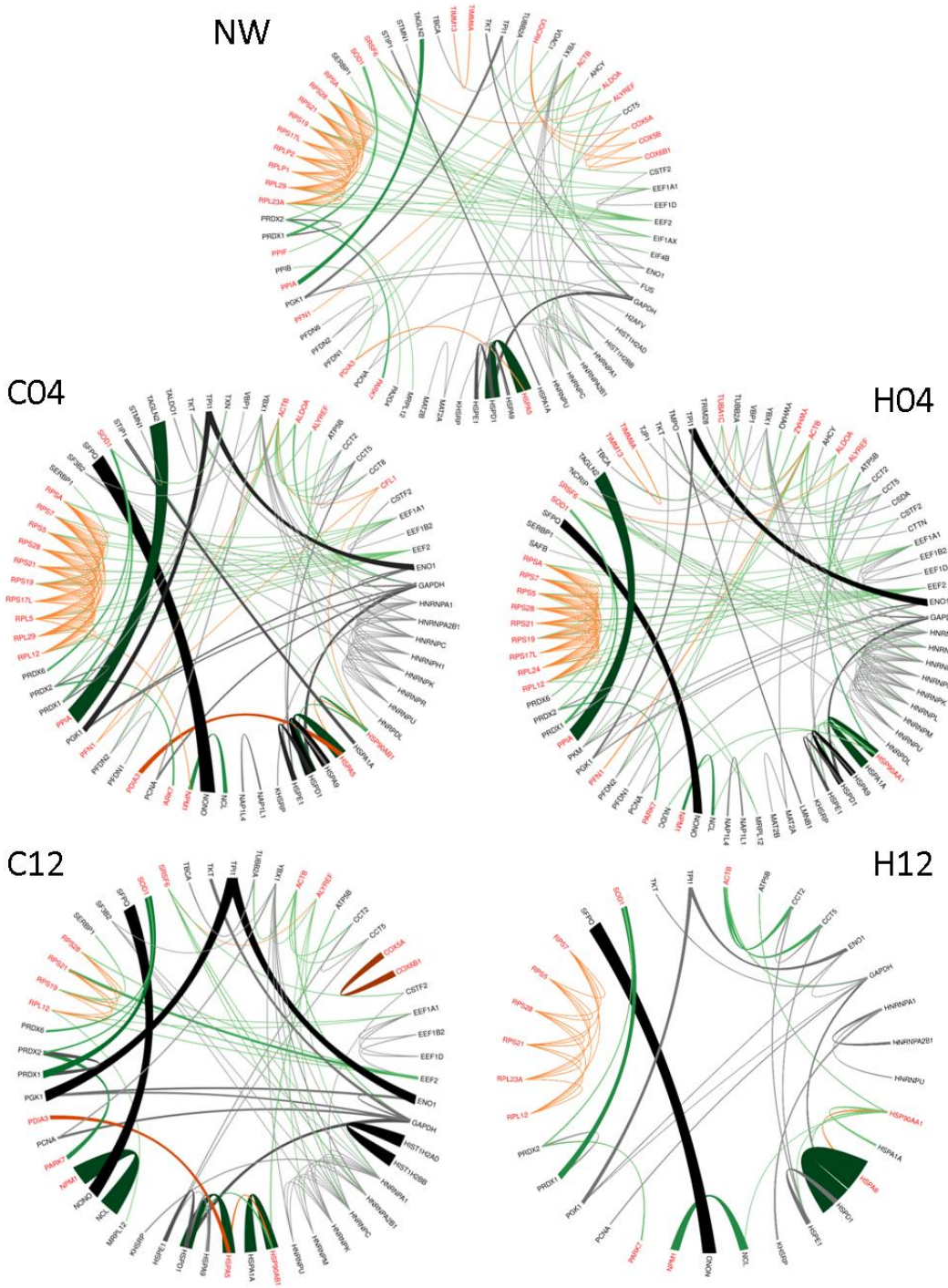
Az így kapott, legalább 10 tagot számláló hálózatot funkcionális alhálózatnak (f) neveztük el, és a String által listázott GO funkció kódjával jelöltük. A fehérje hálózat többi tagját az adott GO funkcióra nézve a nem funkcionális alhálózat (n) tartalmazta.

Mivel előfordult olyan eset is, hogy egy funkcionális hálózatban levő fehérje nem funkcionális hálózatban levő fehérjével alakított ki kapcsolatot, bevezettük a funkcionális-nem funkcionális hálózatok közötti, ún. kereszt (cross) kapcsolatok vizsgálatát is (47., 48. ábra).



47. ábra. Hálózat típusok.

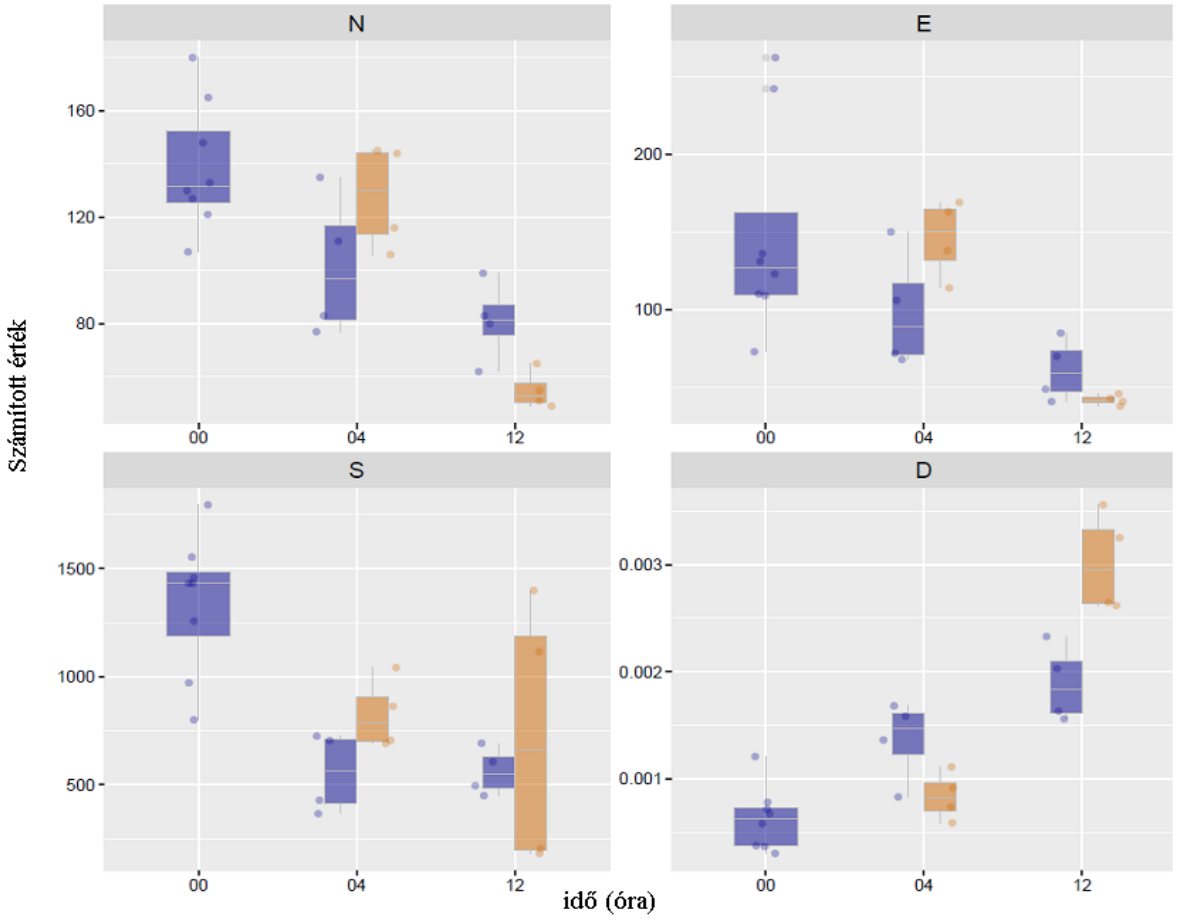
A String által generált fehérje-fehérje interakciós adatokat felhasználva circlize szoftver segítségével rajzoltuk meg a reprezentatív hálózatokat. A körök a fehérjék jelölésére használt génneveket ABC sorrendben tartalmazzák. A vonalak az egyes fehérjék közötti interakciókat jelzik. A vonalak vastagsága a súlyozott hálózatokban az interakcióra utal; minél vastagabb a vonal, annál nagyobb az interakció valószínűsége. A súlyozott alhálózat esetén a színeknek jelentőségük van: a vörös színnel jelölt fehérjék a véletlenszerűen kiválasztott GO funkcióhoz (GO:0044765) tartoznak, ezáltal a funkcionális alhálózat részei. A funkcionális alhálózatban résztvevő fehérjék közötti interakciókat piros színnel, a funkcionális hálózatban részt nem vevő fehérjék közötti interakciókat szürke színnel, míg a funkcionális, ill. nem funkcionális hálózat elemei közötti interakciókat zöld színnel jelöltük.



48. ábra. Hálózati változások megjelenítése a GO:0044765 funkcionális alhálózat esetében.

A piros színnel jelölt fehérjék a véletlenszerűen kiválasztott GO funkcióhoz (GO:0044765) tartoznak, ezáltal a funkcionális alhálózat részei. A funkcionális alhálózatban résztvevő fehérjék közötti interakciókat piros színnel, a funkcionális hálózatban részt nem vevő fehérjék közötti interakciókat szürke színnel, míg a funkcionális, ill. nem funkcionális hálózat elemei közötti interakciókat zöld színnel jelöltük. A vonalak vastagsága az interakcióra utal; minél vastagabb a vonal, annál nagyobb az interakció valószínűsége. Az NW hálózat a kezdeti (0 óra) időpontra utal, a C04 és C12 a kontroll 4 órás, ill. 12 órás, míg a H04 és H12 a HIV-1 kezelt 4 órás, ill. 12 órás időpontokban megfigyelt fehérje-fehérje interakciós hálózatra vonatkozik.

A továbbiakban már a súlyozott hálózatokkal dolgoztunk és megvizsgáltuk a fehérjéket jelentő csomópontok számát (N), az interakciókat szimbolizáló élek számát (E), a hálózati erősséget (S) és az élsűrűséget (D) (49. ábra).

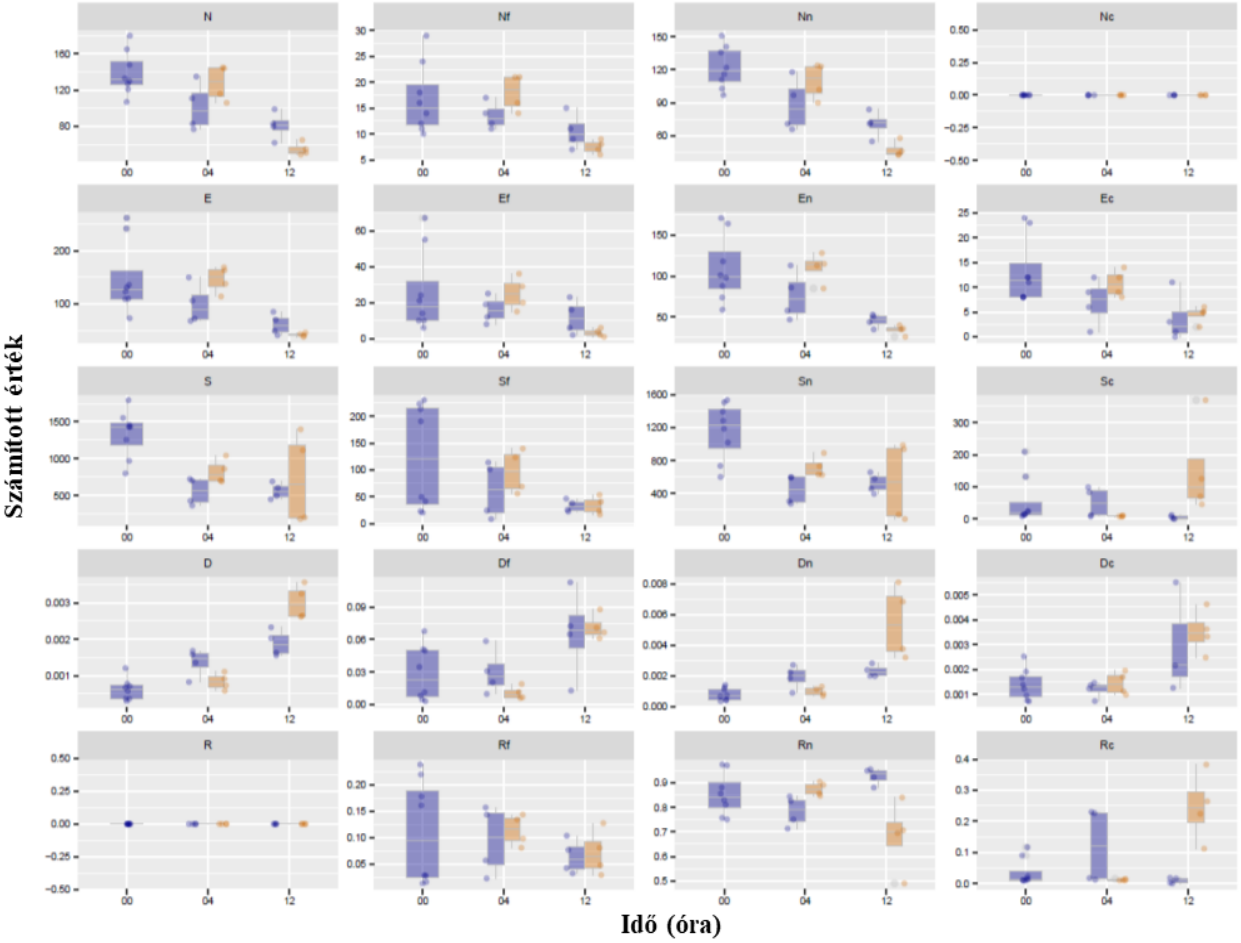


49. ábra. Hálózati paraméterek.
Az ábrákon az „x” tengelyen a mintavételi időpontokat tüntettük fel, míg az „y” tengely az egyes paraméterek esetében számított értékeket tartalmazza. Az „N” a csomópontok számára, míg az „E” az interakciók számára utal. Az „S” a hálózati erősséget és „D” az élsűrűséget jelöli. Kék színnel a kontroll, míg piros színnel a HIV-1 kezelt állapotot jelöltük.

A hálózatok esetében kiszámolt hálózati paramétereket felhasználva statisztikai elemzést végeztünk. A fő hálózatot vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a H12-ben a fehérjék száma (N) statisztikailag szignifikáns módon csökkent, utalva a bináris hálózat esetében is megfigyelhető zsugorodásra (vö. 46., 49. ábra). Ennek ellenére az interakciók száma (E) és a hálózati erősség (S) nem változott statisztikailag szignifikáns módon, míg az élsűrűség (D) statisztikailag szignifikáns módon megemelkedett. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a HIV-1 transzdukciót követően 12 óra elteltével kevesebb, de egymással több kapcsolatot kialakító fehérje látja el a feladatát. Ezzel szemben a 4 órás időpontban egy kissé másabb képet

láttunk: a fehérjék és a kapcsolatok száma, valamint a hálózati erősség nem változott statisztikailag szignifikáns mértékben, viszont az élsűrűség statisztikailag szignifikáns mértékben csökkent a HIV-1 transzdukciót követően.

Ezeket a számolásokat elvégeztük minden funkcionális, nem funkcionális és kereszt alhálózat esetében, így megkaptuk az adott funkcionális hálózatra jellemző Nf, Ef, Sf és Df értékeket, valamint a nem funkcionális hálózatra jellemző Nn, En, Sn és Dn értékeket. A funkcionális-nem funkcionális hálózatok közötti keresztkapcsolatok esetében az élek számát és az ebből származtatott paramétereket számoltuk ki, így megkaptuk az Ec, Sc és Dc paramétereket. Ezen kívül a funkcionális-nem funkcionál hálózatok közötti kapcsolatokra bevezettük a funkcionális-nem funkcionális él arányt (R) (50. ábra).



50. ábra. A GO:0008380 (RNS splicing) funkcióra jellemző hálózati paraméterek. Az ábrákon az „x” tengelyen a mintavételi időpontokat tüntettük fel, míg az „y” tengely az egyes paraméterek esetében számított értékeket tartalmazza. Az „N” a csomópontok számára, míg az „E” az interakciók számára utal. Az „S” a hálózati erősséget és „D” az élsűrűséget, míg az „R” a funkcionális-nem funkcionális élarányt jelöli. Az „f” a funkcionális alhálózatra, az „n” a nem funkcionális hálózatra, míg a „c” a funkcionális és nem funkcionális alhálózat elemei közötti kersztkapcsolatokra utal. Kék színnel a kontroll, míg piros színnel a HIV-1 kezelt állapotot jelöltük.

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy mely funkcionális hálózatokhoz köthetők a főhálózaton megfigyelt változások, a funkcionális alhálózatok tanulmányozásába kezdtünk. A H4 és H12 hálózatokban kilistáztuk azokat a GO funkciókat, ahol az egyes hálózati paraméterek statisztikailag szignifikáns mértékű változást mutattak. Az volt az elképzelésünk, hogy azon funkcionális alhálózatok segítségével lehetünk képesek megmagyarázni a főhálózaton megfigyelt jelenséget, amelyek esetében statisztikailag szignifikáns változás van a funkcionális hálózati paraméterekben, és nincs statisztikailag szignifikáns mértékű változás a nem funkcionális hálózati paraméterekben.

Csak öt olyan alhálózatot találtunk, ahol a fehérjék száma (Nf) csökkent a funkcionális hálózatokban: GO.0005759, GO.0016604, GO.0044451, GO.0044712 és GO.0071705. Az Ef és Sf értékekben viszont sehol sem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns változást. A D és R értékeket figyelembe véve már több lehetőség kínálkozott. Azokat a funkcionális alhálózatokat listáztuk ki, ahol i) a statisztikailag szignifikáns változás csak a funkcionális alhálózatban volt megfigyelhető (Df, Rf), illetve ahol ii) a változás a funkcionális és a kereszt hálózatokban (Df és Dc, Rf és Rc) is statisztikailag szignifikáns volt (Függelék 7. táblázat).

Eredményeink alapján 4 órával a transzdukció után az általános alacsony interaktivitás ellenére bizonyos funkcionális alhálózatok, mint a virális folyamatok, protein kináz kötődés, több szervezetet érintő folyamatok, *de novo* fehérje feltekeredés, stb. statisztikailag szignifikáns mértékben megnövekedett interaktivitás mutattak.

12 órával a transzdukció után a kép változott, ugyanis a hálózat méretének csökkenése ellenére az interaktivitás nőtt, amely többek között olyan funkcionális alhálózatoknak volt tulajdonítható, mint az RNS kötés, RNS katabolikus folyamatok, virális életciklus, virális folyamatok, fehérje feltekeredés, metabolizmus, sejthalál gátlása stb.

A szakirodalomban számos publikáció taglalja a HIV-1 – gazdasejt kapcsolatot, és annak megváltozását a fertőzés során. RNS interferencia segítségével több mind ezer génterméket azonosítottak eddig, mint fontos faktort, a HIV-1 fertőzés során [439–444]. Egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy HIV-1 fertőzés után a korai időpontokban egy általános represszió figyelhető meg; a sejtmagi fehérjéket, DNS replikációban és fehérje szintézisben résztvevő fehérjéket kódoló gazdasejt gének gátlódnak [438]. Ezt az általános gátlást a mi adataink is bizonyítják. Génaktivációt általában csak a vírusfertőzés későbbi időpontjaiban sikerült kimutatni; a fertőzés után 22 órával volt a legmagasabb a génkifejeződés a fertőzött gazdasejtben [438,445]. T limfociták elemzésekor a fertőzés után 24 órával figyelték meg a legnagyobb változások a sejt proteómjában [445]. Különböző tanulmányokban eddig

körülbelül 300 gazdasejt gént azonosítottak, amelyek a HIV-1 életciklusához elengedhetetlenek, de az egyes munkacsoportok eredményei között jelentős eltérések tapasztalhatók [441–443,446,447].

Mivel a kutatások nagy része a későbbi időpontokat célozza meg, munkánk során a korai időpontokra, a 0-12 óra intervallumra vonatkozóan próbáltunk adatokat gyűjteni. A súlyozott hálózat generálása és a funkcionális alhálózatok tanulmányozása segítségével információt nyerhettünk a fehérje változások dinamikájáról a 4 óra és 12 óra időpontokban. A várakozásoknak megfelelően, a nagyon korai fázisokban a transzlációban, transzkripcióban, DNS kondenzációban részt vevő fehérjék (HIST1H1E, HNRNPL, PRRC2A, TRIM28) mennyisége megnőtt. Az RNS kötésben, citoszkeleton összeszerelésben/átrendeződésben és szignalizációban szerepet játszó fehérjék (ALYREF, CCDC86, CSDA, COX5A, HN1, MYL6, PPIF, SEPT2, SRSF6, TCOF1, TPM3) pedig nem voltak kvantitálhatók a HIV-1 kezelt, 12 órás mintákban.

A hálózatelemzés adatait értelmezve az „RNS kötés”, „RNS katabolizmus”, „sejtkomponens összeszerelés” és „virális folyamatok” funkciók megnövekedett aktivitását figyelhettük meg. Ugyanakkor az „apoptotikus folyamatok negatív regulációjának” növekedését is sikerült megfigyelni, ami tulajdonképpen egyenértékű az apoptózis gátlásával. Más kutatócsoportok is kimutatták a megnövekedett RNS kötést a vírusfertőzés hatására; Garcia-Moreno és mtsai. nagy aktivitású RNS kötő fehérjéket azonosítottak sindbis vírus (SINV) fertőzés hatására a fertőzés után 18 órával [448]. Azt is kimutatták, hogy megnő az RNS kötő fehérjék kötődése a vírus RNS-hez. Ez azt jelenti, hogy a gazdasejt mRNS-ei jelentős mértékben gátlódnak, ami elsősorban a sejt normál működéséért felelős homeosztatikus géneket érinti [448]. siRNS kísérletekkel bizonyították, hogy a gazdasejt fehérjéinek jelentős része az mRNS transzportban vesz részt [443].

A HIV-1-el fertőzött sejtek általában apoptózis révén elhalnak, de az apoptózis gátlása a vírus által segíthet a vírus rezervoir fenntartásában [449]. A fertőzött immunsejtek egy része túlél, jelezve, hogy menyire fontos a vírus rezervoár kialakításában és fenntartásában az apoptózistól való megszabadulás [449]. Mohammadi és mtsai. a fertőzés utáni korai időpontokban nem egyértelmű gátlást vagy aktiválást, hanem egy kevert mintázatot figyeltek meg az antivirális védekezésben és sejthalál szignalizációban szerepet játszó gének esetében [438]. Az apoptózis gátlása elősegíti a vírustermelést a HIV-1 által fertőzött sejtekben [450] és amennyiben lehetőség nyílik rá, a fertőzött sejtek apoptózisának módosítása egy jó terápiás megközelítés lehet [451].

A gazdasejt genomjának kijátszása a HIV-1 által a fertőzés egy komplex folyamata. A korai szakaszban a vírus a sejt fehérjéit használja a saját replikációjához. 15 órával a fertőzés után már a fertőzött sejt által termelt összes transzrkiptum a vírus genomjáról származott és 18 órával a fertőzés után a sejt elkezdte kibocsátani a vírusokat [440]. Új generációs szekvenálás segítségével kimutatták, hogy 12 órával a fertőzés után jelentősen megnő a virális mRNS szint a fertőzött sejtekben [452]. A vírus RNS és fehérjék termeléséhez a vírus a gazdasejt fehérjéit használja. Eredményeink is azt mutatták, hogy az RNS kötés, RNS katabolizmus és fehérje feltekeredés megnövekedett a HIV-1 kezelt sejtekben 12 órával a kezelés után. Kleinmann és mtsai. újraelemezték Chang és mtsai. által közölt adatsorokat és azt találták, hogy a fertőzés utáni 12 órás minták génexpressziós profilja nem tér el jelentősen a kontroll génexpressziós profiljától. Szerintük, az adatokból egyértelmű következtetéseket csak 24 órával a fertőzés után lehet levonni [453]. Eredményeik felhívják a figyelmet az érzékenyebb technikák kifejlesztésének szükségességére.

Nagyon nehéz megfelelően összehasonlítani eredményeinket az irodalomban közölt adatokkal, ugyanis a kutatások jelentős része a fertőzés utáni későbbi időpontokat (2 nap, 6 nap) vizsgálja, és kevés adat áll rendelkezésre a 12 óra körüli vagy előtti időpontokról [441,454,455]. A rendelkezésre álló adatokat felhasználva eredményeink jó egyezést mutatnak a szakirodalomban közölt adatokkal a fertőzés korai szakaszát illetően. Ugyanakkor azt is ki kell hangsúlyozni, hogy kísérleteinket humán embrionális vesesejteken és nem immunsejteken végeztük el. Mivel bizonyítani tudtuk, hogy a módszerünk megfelelően működik, a továbbiakban meg kívánjuk ismételni transzdukciós kísérleteinket Jurkat vagy THP-1 sejtek felhasználásával.

A munkánk során kifejlesztett súlyozott hálózatkészítő- és elemző módszer megfelelően használható biológiai minták proteómjának elemzésére, a kvalitatív és kvantitatív adatok együttes kezelésére és ezáltal hozzásegíthet a komplex biológiai jelenségek megértéséhez.

6. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

Kidolgoztam és továbbfejlesztettem több kvantitatív proteomikai és adatelemző módszert, amelyeket sikerrel alkalmaztam komplex biológiai kérdések tanulmányozására. A kidolgozott és optimalizált módszerek segítségével vizsgáltam a CaPpz1 szerepét, a PVR patomechanizmusát, a szemben zajló sebgyógyulási folyamatokat, valamint a kémiai barrier összetételét könnyben, nyálban és verejtékben. Munkám során több fehérje vizsgálatára alkalmas módszert dolgoztam ki, és potenciális biomarkereket azonosítottam nem invazív módon gyűjthető biológiai mintkából.

Vizsgálataimmal a következő új eredményeket értem el:

- Kutatótársaimmal módszert dolgoztam ki számos fehérje célzott tömegspektrometriás analízisére. A kidolgozott MRM/SRM-alapú célzott proteomikai módszerek tetszőleges biológiai mintában levő fehérjék kvalitatív és kvantitatív vizsgálatára alkalmasak.
- Megvizsgáltuk a patogén *Candida albicans* CaPpz1 protein foszfatáz hiányának a hatását a proteómra és a foszfoproteómra. Két potenciális CaPpz1 szubsztrátot azonosítottunk és felvetettük a foszfatáz szerepét a biofilm képződésben. Utóbbi hipotézisünket független kísérletekkel támasztottuk alá, és így igazoltuk a gombaspecifikus CaPpz1 enzim egy eddig még nem ismert funkcióját.
- A PVR patomechanizmusát vizsgálva kimutattuk a krisztallinokat érintő nagymértékű változásokat és igazoltuk a TG2 aktív, feltehetően védő szerepét, a PVR kialakulása során.
- Vizsgáltuk a kémiai barrier változásait patológiás körülmények között és számos potenciális biomarkert azonosítottunk könnyben és nyálban:
    - potenciális könny biomarker panelt (lipokalin 1, lakritin, lizozim C, dermcidin) azonosítottunk, amely elősegítheti az Alzheimer kór diagnosztizálását,
    - a preoperatív könnyben az IL5, IFN-γ és GM-CSF fehérjéket korai potenciális prediktív biomarkerként azonosítottuk, amelyek segítségével előre jelezhetők a trabekulektómia után fellépő késői komplikációk,
    - megvizsgáltuk az OSCC-ben szenvedő betegektől és korban, nemben illesztett kontrolloktól származó nyálminták fehérje tartalmát, és olyan nyálfehérjéket azonosítottunk (IL-6, S100A9), amelyek potenciális biomarkerként diagnosztikus jelentőségűek lehetnek a magyarországi populációban.
- Összehasonlítva a könny és csarnokvíz citokin profilját azt találtuk, hogy a két minta nem egyenértékű a gyulladásos állapot szempontjából. Adataink alapján a könny nem

helyettesítheti a csarnokvizet, viszont jól alkalmazható követéses vizsgálatokra. Továbbá igazoltuk a „Proximity Extension Assay” (PEA) alkalmazhatóságát a könnyminták elemzése során.

- Információt gyűjtöttünk a szemben történő, elsősorban sclera-t érintő sebgyógyulási folyamatokról. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a késői komplikációk megjelenését előidéző legfontosabb folyamatok a sebgyógyulás korai fázisaiban történnek, amikor a gyulladásos folyamatok dominálnak. Valószínűleg a felborult pro- és antiinflamatórikus egyensúly, valamint a sebgyógyulásban szerepet játszó fehérjék mennyiségének és előfordulásának a megváltozása vezet a késői műtéti komplikációk megjelenéséhez.
- Egészséges önkéntesektől származó verejték vizsgálatával azonosítottuk a verejtékben nagy mennyiségben előforduló fehérjéket. Azt találtuk, hogy a kémiai barrier felépítésében részt vevő dermcidin, kluszterin, apolipoprotein D, prolaktin indukált fehérje és a szérum albumin alkotja az egészséges önkéntesektől származó szekretált verejték fehérjék több mint 90%-át.
- Kifejlesztettünk egy súlyozott hálózatkészítő- és elemző módszert, amely felhasználható a kvalitatív és kvantitatív adatok együttes elemzésére. A módszer segítségével információt gyűjtöttünk a HIV-1 gazdasejtbe történő bejutása után bekövetkező korai szakaszra jellemző fehérje szintű változásokról.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Robinson SW, Fernandes M, Husi H. Current advances in systems and integrative biology. Comput Struct Biotechnol J. 2014;11: 35–46. doi:10.1016/j.csbj.2014.08.007
2. Manzoni C, Kia DA, Vandrovcova J, Hardy J, Wood NW, Lewis PA, et al. Genome, transcriptome and proteome: The rise of omics data and their integration in biomedical sciences. Brief Bioinform. 2018;19: 286–302. doi:10.1093/BIB/BBW114
3. Callebaut W. Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences Scientific perspectivism : A philosopher of science ' s response to the challenge of big data biology. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2012;43: 69–80. doi:10.1016/j.shpsc.2011.10.007
4. Enríquez JA, Sánchez-Cabo F, Vázquez J. Hypothesis Driven versus Hypothesis-free: Filling the Gaps in CoQ Biosynthesis. Cell Metab. 2016;24: 525–526. doi:10.1016/j.cmet.2016.09.021
5. Koontz L. Agarose gel electrophoresis. Methods Enzymol. 2013;529: 35–45. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00004-5
6. Gallagher SR. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. Curr Protoc Mol Biol. 2012;97: 10.2A.1-10.2A.44. doi:10.1002/0471142727.mb1002as97
7. Gallagher SR. One-Dimensional Electrophoresis Using Nondenaturing Conditions. Curr Protoc Mol Biol. 1999;47: 10.2B.1-10.2B.11. doi:10.1002/0471142727.mb1002bs47
8. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik. 1975;26: 231–243. doi:10.1007/bf00281458
9. O'Farrell PH. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of PRoteins. J Biol Chem. 1975;250: 4007–4021.
10. Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. J Proteomics. 2011;74: 1829–1841. doi:10.1016/j.jprot.2011.05.040
11. Hames BD. Gel Electrophoresis of Proteins. 3rd editio. New York: Oxford University Press; 1998.
12. Rabilloud T. The whereabouts of 2D gels in quantitative proteomics. Methods Mol Biol. 2012;893: 25–35. doi:10.1007/978-1-61779-885-6_2
13. Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A, Lunardi J. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent

stains for protein detection in gels. Proteomics. 2001;1: 699–704. doi:10.1002/1615-9861(200104)1:5<699::AID-PROT699>3.0.CO;2-C

14. Jastorff AM, Turck CW. Detection of Posttranslational Modifications by Fluorescent Staining of Two-Dimensional Gels. Methods Mol Biol. 2019;1934: 21–32. doi:10.1007/978-1-4939-9055-9_2
15. Millioni R, Miuzzo M, Sbrignadello S, Murphy E, Puricelli L, Tura A, et al. Delta2D and Proteomweaver: Performance evaluation of two different approaches for 2-DE analysis. Electrophoresis. 2010;31: 1311–1317. doi:10.1002/elps.200900766
16. Meleady P. Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE. Methods Mol Biol. 2018;1664: 3–14. doi:10.1007/978-1-4939-7268-5_1
17. Gulyás G, Czeglédi L, Prokisch J, Csősz É, Szabó Z. Effect of Selenium Supplement on Proteome of Chicken Egg White and Yolk. 2014;47: 83–88.
18. Gulyas G, Pohoczky K, Csosz E, Simon A, Javor A, Czegledi L. Comparative proteome analysis of skeletal muscle between Merino and Tsigai lambs. Small Rumin Res. 2018;158. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.12.003
19. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Fully denaturing two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a critical update. Proteomics. 2008;8: 3965–3973. doi:10.1002/pmic.200800043
20. Gulyás G, Czeglédi L, Béri B, Harangi S, Csosz E, Szabó Z, et al. Proteomic analysis of skeletal muscle at different live weights in charolais bulls. Acta Aliment. 2015;44: 132–138. doi:10.1556/AAlim.44.2015.1.14
21. Dass C. Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
22. Vékey K, Telekes A, Vertes A. Medical Applications of Mass Spectrometry. Elsevier; 2008.
23. Dassati S, Waldner A, Schweigreiter R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. Neurobiology of Aging. 2014. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.148
24. Kinter M, Sherman NE. Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Ltd; 2000.
25. Ho C, Lam C, Chan M, Cheung R, Law L, Lit L, et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. Clin Biochem Rev. 2003;24: 3–12.
26. O'Rourke MB, Padula MP. An Inexpensive, simple calibration method for MALDI TOF/TOF systems. J Mass Spectrom. 2019;54: 1003–1007. doi:10.1002/jms.4467

27. Buchanan W V. Fourier Transform Mass Spectrometry: Evolution, Innovation and Applications. Washington DC: ACS; 1987.
28. Zubarev RA, Makarov A. Orbitrap mass spectrometry. Anal Chem. 2013;85: 5288–5296. doi:10.1021/ac4001223
29. Syka JEP, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101: 9528–9533. doi:10.1073/pnas.0402700101
30. Polfer NC, Haselmann KF, Zubarev RA, Langridge-Smith PRR. Electron capture dissociation of polypeptides using a 3 Tesla Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. Rapid Commun Mass Spectrom. 2002;16: 936–943. doi:10.1002/rcm.664
31. Koppenaal DW, Barinaga CJ, Denton MB, Sperline RP, Hieftje GM, Schilling GD, et al. MS detectors. Anal Chem. 2005;77. doi:10.1021/ac053495p
32. Maurer HH, Kraemer T, Ledvinka O, Schmitt CJ, Weber AA. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in toxicological analysis. J Chromatogr B Biomed Appl. 1997;689: 81–89. doi:10.1016/S0378-4347(96)00348-9
33. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. Outlook. 2001;70: 437–473. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.437
34. Horvath C. Reversed-phase chromatography. Trends Anal Chem. 1981;1: 6–12.
35. Zhang X, Fang A, Riley CP, Wang M, Regnier FE, Buck C. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics. Anal Chim Acta. 2010;664: 101–113. doi:10.1016/j.aca.2010.02.001
36. Kulak NA, Geyer PE, Mann M. Loss-less nano-fractionator for high sensitivity, high coverage proteomics. Mol Cell Proteomics. 2017;16: 694–705. doi:10.1074/mcp.O116.065136
37. Mann M, Højrup P, Roepstorff P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. Biol Mass Spectrom. 1993;22: 338–345. doi:10.1002/bms.1200220605
38. Medzihradszky KF, Leffler H, Baldwin MA, Burlingame AL. Protein identification by in-gel digestion, high-performance liquid chromatography, and mass spectrometry: Peptide analysis by complementary ionization techniques. J Am Soc Mass Spectrom. 2001;12: 215–221. doi:10.1016/S1044-0305(00)00214-2
39. Baldwin MA. Protein identification by mass spectrometry: Issues to be considered.

Mol Cell Proteomics. 2004;3: 1–9. doi:10.1074/mcp.R300012-MCP200

40. Medzihradszky KF. Peptide sequence analysis. Methods Enzymol. 2005;402: 209–244. doi:10.1016/S0076-6879(05)02007-0
41. Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. Journal of Proteomics. 2011. doi:10.1016/j.jprot.2011.05.014
42. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5: 699–711. doi:10.1038/nrm1468
43. Adamczyk M, Gebler JC, Wu J, Yu Z. Complete sequencing of anti-vancomycin fab fragment by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry with a combination of database searching and manual interpretation of the MS/MS spectra. J Immunol Methods. 2002;260: 235–249. doi:10.1016/s0022-1759(01)00552-x
44. Pevtsov S, Fedulova I, Mirzaei H, Buck C, Zhang X. Performance evaluation of existing de novo sequencing algorithms. J Proteome Res. 2006;5: 3018–3028. doi:10.1021/pr060222h
45. Horn DM, Zubarev RA, McLafferty FW. Automated de novo sequencing of proteins by tandem high-resolution mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97: 10313–10317. doi:10.1073/pnas.97.19.10313
46. Dagda RK, Sultana T, Lyons-Weiler J. Evaluation of the consensus of four peptide identification algorithms for Tandem mass spectrometry based proteomics. J Proteomics Bioinforma. 2010;3: 39–47. doi:10.4172/jpb.1000119
47. Gupta N, Pevzner PA. False Discovery Rates of Protein Identifications: A Strike against the Two-Peptide Rule. J Prote. 2009;8: 4173–4181. doi:10.1038/jid.2014.371
48. Higdon R, Kolker E. A predictive model for identifying proteins by a single peptide match. Bioinformatics. 2007;23: 277–280. doi:10.1093/bioinformatics/btl595
49. Jeong K, Kim S, Bandeira N. False discovery rates in spectral identification. BMC Bioinformatics. 2012;13 Suppl 1. doi:10.1186/1471-2105-13-S16-S2
50. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 2003;422: 198–207. doi:10.1038/nature01511
51. Tabb DL, Vega-Montoto L, Rudnick PA, Mulayath A, Ham AL, Bunk DM, et al. Repeatability and Reproducibility in Proteomic Identifications by Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry. J Proteome Res. 2010;9: 761. doi:10.1021/pr9006365.Repeatability
52. Amodei D, Egertson J, MacLean BX, Johnson R, Merrihew GE, Keller A, et al. Improving Precursor Selectivity in Data-Independent Acquisition Using Overlapping

Windows. J Am Soc Mass Spectrom. 2019;30: 669–684. doi:10.1007/s13361-018-2122-8

53. Koopmans F, Ho JTC, Smit AB, Li KW. Comparative Analyses of Data Independent Acquisition Mass Spectrometric Approaches: DIA, WiSIM-DIA, and Untargeted DIA. Proteomics. 2018;18: 1–6. doi:10.1002/pmic.201700304
54. Doerr A. DIA mass spectrometry. Nat Methods. 2014;12: 35. doi:10.1038/nmeth.3234
55. Searle BC, Pino LK, Egertson JD, Ting YS, Lawrence RT, MacLean BX, et al. Chromatogram libraries improve peptide detection and quantification by data independent acquisition mass spectrometry. Nat Commun. 2018;9. doi:10.1038/s41467-018-07454-w
56. Domon B, Aebersold R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. Nat Biotechnol. 2010;28: 710–721. doi:10.1038/nbt.1661
57. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. Mol Syst Biol. 2008;4: 222. doi:10.1038/msb.2008.61
58. Bantscheff M, Schirle M. Quantitative mass spectrometry in proteomics : a critical review. 2007; 1017–1031. doi:10.1007/s00216-007-1486-6
59. Gallien S, Bourmaud A, Kim SY, Domon B. Technical considerations for large-scale parallel reaction monitoring analysis. J Proteomics. 2014;100: 147–159. doi:10.1016/j.jprot.2013.10.029
60. Peterson AC, Russell JD, Bailey DJ, Westphall MS, Coon JJ. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. Mol Cell Proteomics. 2012;11: 1475–1488. doi:10.1074/mcp.O112.020131
61. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. Mol Cell Proteomics. 2004;3: 1154–1169. doi:10.1074/mcp.M400129-MCP200
62. Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, et al. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. Anal Chem. 2003;75: 1895–1904. doi:10.1021/ac0262560
63. Liu H, Sadygov RG, Yates JR 3rd. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. Anal Chem. 2004;76: 4193–4201. doi:10.1021/ac0498563

64. Chang C-Y, Picotti P, Huttenhain R, Heinzelmann-Schwarz V, Jovanovic M, Aebersold R, et al. Protein Significance Analysis in Selected Reaction Monitoring (SRM) Measurements. Mol Cell Proteomics. 2011;11: M111.014662-M111.014662. doi:10.1074/mcp.M111.014662
65. Martens L, Hermjakob H, Jones P, Adamski M, Taylor C, States D, et al. PRIDE: the proteomics identifications database. Proteomics. 2005;5: 3537–3545. doi:10.1002/pmic.200401303
66. Desiere F, Deutsch EW, King NL, Nesvizhskii AI, Mallick P, Eng J, et al. The PeptideAtlas Project. Nucleic Acids Res. 2006;34: D655–D658. doi:10.1093/nar/gkj040
67. Sharma V, Eckels J, Taylor GK, Shulman NJ, Stergachis AB, Joyner SA, et al. Panorama: A Targeted Proteomics Knowledge Base. J Proteome Res. 2014;13: 4205–4210. doi:10.1021/pr5006636
68. Sharma V, Eckels J, Schilling B, Ludwig C, Jaffe JD, MacCoss MJ, et al. Panorama public: A public repository for quantitative data sets processed in skyline. Mol Cell Proteomics. 2018;17: 1239–1244. doi:10.1074/mcp.RA117.000543
69. Deutsch EW, Bandeira N, Sharma V, Perez-Riverol Y, Carver JJ, Kundu DJ, et al. The ProteomeXchange consortium in 2020: enabling “big data” approaches in proteomics. Nucleic Acids Res. 2020;48: D1145–D1152. doi:10.1093/nar/gkz984
70. Xia J, Benner MJ, Hancock REW. NetworkAnalyst - Integrative approaches for protein-protein interaction network analysis and visual exploration. Nucleic Acids Res. 2014;42: 167–174. doi:10.1093/nar/gku443
71. Stoney R, Robertson DL, Nenadic G, Schwartz JM. Mapping biological process relationships and disease perturbations within a pathway network. npj Syst Biol Appl. 2018;4. doi:10.1038/s41540-018-0055-2
72. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. Genome Res. 1971;13: 426. doi:10.1101/gr.1239303.metabolite
73. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. Nucleic Acids Res. 2017;45: D362–D368. doi:10.1093/nar/gkw937
74. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life.

Nucleic Acids Res. 2015;43: D447-52. doi:10.1093/nar/gku1003

75. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. Nucleic Acids Res. 2017;45: D362–D368. doi:10.1093/nar/gkw937
76. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res. 2019;47: D607–D613. doi:10.1093/nar/gky1131
77. Rieckmann JC, Geiger R, Hornburg D, Wolf T, Kveler K, Jarrossay D, et al. Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics. Nat Immunol. 2017;18: 583–593. doi:10.1038/ni.3693
78. Frauenstein A, Meissner F. Quantitative Proteomics of Secreted Proteins. Methods Mol Biol. 2018;1714: 215–227. doi:10.1007/978-1-4939-7519-8_14
79. Jimenez CR, Zhang H, Kinsinger CR, Nice EC. The cancer proteomic landscape and the HUPO Cancer Proteome Project. Clin Proteomics. 2018;15: 1–7. doi:10.1186/s12014-018-9180-6
80. Hernandez Duran A, Greco TM, Vollmer B, Cristea IM, Grunewald K, Topf M. Protein interactions and consensus clustering analysis uncover insights into herpesvirus virion structure and function relationships. PLoS Biol. 2019;17: e3000316. doi:10.1371/journal.pbio.3000316
81. Peters DL, Wang W, Zhang X, Ning Z, Mayne J, Figeys D. Metaproteomic and Metabolomic Approaches for Characterizing the Gut Microbiome. Proteomics. 2019;19: e1800363. doi:10.1002/pmic.201800363
82. Lai LA, Tong Z, Chen R, Pan S. Metaproteomics Study of the Gut Microbiome. Methods Mol Biol. 2019;1871: 123–132. doi:10.1007/978-1-4939-8814-3_8
83. Ang MY, Low TY, Lee PY, Wan Mohamad Nazarie WF, Guryev V, Jamal R. Proteogenomics: From next-generation sequencing (NGS) and mass spectrometry-based proteomics to precision medicine. Clin Chim Acta. 2019;498: 38–46. doi:10.1016/j.cca.2019.08.010
84. Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Blal HA, et al. A subcellular map of the human proteome. 2017;3321. doi:10.1126/science.aal3321
85. Dunkley TPJ, Watson R, Griffin JL, Dupree P, Lilley KS. Localization of organelle proteins by isotope tagging (LOPIT). Mol Cell Proteomics. 2004;3: 1128–1134.

doi:10.1074/mcp.T400009-MCP200

86. Robbins J. Gene targeting. The precise manipulation of the mammalian genome. Circ Res. 1993;73: 3–9. doi:10.1161/01.res.73.1.3
87. Yan Q, Zhang Z, Yang Y, Chen F, Shao Y. Proteome analysis reveals global response to deletion of mrflbA in Monascus ruber. J Microbiol. 2018;56: 255–263. doi:10.1007/s12275-018-7425-8
88. Jacob AM, Turck CW. Detection of post-translational modifications by fluorescent staining of two-dimensional gels. Methods Mol Biol. 2008;446: 21–32. doi:10.1007/978-1-60327-084-7_2
89. Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. Curr Opin Chem Biol. 2004;8: 33–41. doi:10.1016/j.cbpa.2003.12.009
90. Bhullar KS, Lagarón NO, McGowan EM, Parmar I, Jha A, Hubbard BP, et al. Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions. Mol Cancer. 2018;17: 1–20. doi:10.1186/s12943-018-0804-2
91. Singh V, Ram M, Kumar R, Prasad R, Roy BK, Singh KK. Phosphorylation: Implications in Cancer. Protein J. 2017;36: 1–6. doi:10.1007/s10930-017-9696-z
92. Ariño J, Velázquez D, Casamayor A. Ser/thr protein phosphatases in fungi: Structure, regulation and function. Microb Cell. 2019;6: 217–256. doi:10.15698/mic2019.05.677
93. Cohen PT. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. Trends Biochem Sci. 1997;22: 245–251. doi:10.1016/s0968-0004(97)01060-8
94. Ariño J. Novel protein phosphatases in yeast: An update. Eur J Biochem. 2002;269: 1072–1077. doi:10.1046/j.0014-2956.2002.02753.x
95. Balcells L, Gomez N, Casamayor A, Clotet J, Arino J. Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. Eur J Biochem. 1997;250: 476–483. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.0476a.x
96. Szoor B, Feher Z, Zeke T, Gergely P, Yatzkan E, Yarden O, et al. pzl-1 encodes a novel protein phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase in Neurospora crassa. Biochim Biophys Acta. 1998;1388: 260–266. doi:10.1016/s0167-4838(98)00201-5
97. Leiter E, Gonzalez A, Erdei E, Casado C, Kovacs L, Adam C, et al. Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi. Fungal Genet Biol. 2012;49: 708–716. doi:10.1016/j.fgb.2012.06.010
98. Kovacs L, Farkas I, Majoros L, Miskei M, Pocsi I, Dombradi V. The polymorphism of protein phosphatase Z1 gene in Candida albicans. J Basic Microbiol. 2010;50 Suppl 1:

S74-82. doi:10.1002/jobm.200900434

99. Adam C, Erdei E, Casado C, Kovacs L, Gonzalez A, Majoros L, et al. Protein phosphatase CaPpz1 is involved in cation homeostasis, cell wall integrity and virulence of Candida albicans. Microbiology. 2012;158: 1258–1267. doi:10.1099/mic.0.057075-0
100. Nagy G, Hennig GW, Petrenyi K, Kovacs L, Pocsi I, Dombradi V, et al. Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of Candida albicans strains. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98: 5185–5194. doi:10.1007/s00253-014-5696-5
101. Noble SM, French S, Kohn LA, Chen V, Johnson AD. Systematic screens of a Candida albicans homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. Nat Genet. 2010;42: 590–598. doi:10.1038/ng.605
102. Pastor JC, de la Rua ER, Martin F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. Prog Retin Eye Res. 2002;21: 127–144. doi:10.1016/s1350-9462(01)00023-4
103. Pastor JC, Rojas J, Pastor-Idoate S, Di Lauro S, Gonzalez-Buendia L, Delgado-Tirado S. Proliferative vitreoretinopathy: A new concept of disease pathogenesis and practical consequences. Prog Retin Eye Res. 2016;51: 125–155. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.005
104. Yang S, Li H, Li M, Wang F. Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. Discov Med. 2015;20: 207–217.
105. Tosi GM, Marigliani D, Romeo N, Toti P. Disease pathways in proliferative vitreoretinopathy: an ongoing challenge. J Cell Physiol. 2014;229: 1577–1583. doi:10.1002/jcp.24606
106. Kaczmarek R, Misiuk-Hojlo M. Patomechanisms in proliferative vitreoretinopathy. Klin Oczna. 2011;113: 64–67.
107. Group BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001;69: 89–95. doi:10.1067/mcp.2001.113989
108. Rodriguez H, Rivers R, Kinsinger C, Mesri M, Hiltke T, Rahbar A, et al. Reconstructing the pipeline by introducing multiplexed multiple reaction monitoring mass spectrometry for cancer biomarker verification: An NCI-CPTC initiative perspective. Proteomics - Clin Appl. 2010;4: 904–914. doi:10.1002/prca.201000057
109. Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical

biomarker discovery. 2009;3: 33–44. doi:10.1016/j.molonc.2008.12.001

110. Oberg AL, Vitek O. Statistical design of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. J Proteome Res. 2009;8: 2144–2156. doi:10.1021/pr8010099
111. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nat Rev Cancer. 2005;5: 845–856. doi:10.1038/nrc1739
112. Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. Nat Clin Pract Oncol. 2008;5: 588–599. doi:10.1038/ncponc1187
113. Füzéry AK, Levin J, Chan MM, Chan DW, Fuzery AK, Levin J, et al. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. Clin Proteomics. 2013;10: 13. doi:10.1186/1559-0275-10-13
114. Zhang Z, Chan DW. The road from discovery to clinical diagnostics: lessons learned from the first FDA-cleared in vitro diagnostic multivariate index assay of proteomic biomarkers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010;19: 2995–2999. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0580
115. Maddalena A, Papassotiropoulos A, Muller-Tillmanns B, Jung HH, Hegi T, Nitsch RM, et al. Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide42. Arch Neurol. 2003;60: 1202–1206. doi:10.1001/archneur.60.9.1202
116. Corrie SR, Coffey JW, Islam J, Markey KA, Kendall MAF. Blood, sweat, and tears: developing clinically relevant protein biosensors for integrated body fluid analysis. Analyst. 2015;140: 4350–4364. doi:10.1039/c5an00464k
117. Nguyen A V, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. Int J Mol Sci. 2019;20. doi:10.3390/ijms20081811
118. Eyerich S, Eyerich K, Traidl-hoffmann C, Biedermann T. Cutaneous Barriers and Skin Immunity : Differentiating A Connected Network. Trends Immunol. 2018;39: 315–327. doi:10.1016/j.it.2018.02.004
119. Zahoor M, Bahadar H, Ayaz M, Khan A, Shah MJ. In vitro Study on the Antimicrobial Activity of Human Tears with Respect to Age. 2018;50: 93–99.
120. Jeon YJ, Jo A, Won J, Lee K-M, Yoon SS, Choi JY, et al. IL-17C Protects Nasal Epithelium from Pseudomonas aeruginosa Infection. Am J Respir Cell Mol Biol. 2020;62: 95–103. doi:10.1165/rcmb.2018-0377OC
121. Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. Periodontol 2000. 2016;70: 80–92. doi:10.1111/prd.12098

122. Steinstraesser L, Kraneburg U, Jacobsen F, Al-Benna S. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. Immunobiology. 2011;216: 322–333. doi:10.1016/j.imbio.2010.07.003
123. Schommer N, Gallo R. Structure and function of the human skin microbiome. Trends Microbiol. 2013;21: 660–668.
124. Rieg S, Steffen H, Seeber S, Humeny A, Kalbacher H, Dietz K, et al. Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. J Immunol. 2005;174: 8003–8010. doi:10.4049/jimmunol.174.12.8003
125. Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24: 202–208. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05772.x
126. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. Virulence. 2010;1: 440–464. doi:10.4161/viru.1.5.12983
127. Jhong J-H, Chi Y-H, Li W-C, Lin T-H, Huang K-Y, Lee T-Y. dbAMP: an integrated resource for exploring antimicrobial peptides with functional activities and physicochemical properties on transcriptome and proteome data. Nucleic Acids Res. 2019;47: D285–D297. doi:10.1093/nar/gky1030
128. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Res. 2016;44: D1087–D1093. doi:10.1093/nar/gkv1278
129. Pirtskhalava M, Gabrielian A, Cruz P, Griggs HL, Squires RB, Hurt DE, et al. DBAASP v.2: an enhanced database of structure and antimicrobial/cytotoxic activity of natural and synthetic peptides. Nucleic Acids Res. 2016;44: D1104-12. doi:10.1093/nar/gkv1174
130. Zhao X, Wu H, Lu H, Li G, Huang Q. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. PLoS One. 2013;8: 6–11. doi:10.1371/journal.pone.0066557
131. Metz-Boutigue M-H, Shooshtarizadeh P, Prevost G, Haikel Y, Chich J-F. Antimicrobial peptides present in mammalian skin and gut are multifunctional defence molecules. Curr Pharm Des. 2010;16: 1024–1039. doi:10.2174/138161210790963823
132. Harder J, Schroder J-M, Glaser R. The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks. Exp Dermatol. 2013;22: 1–5. doi:10.1111/exd.12046
133. Garcia JR, Krause A, Schulz S, Rodriguez-Jimenez FJ, Kluver E, Adermann K, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive

spectrum of antimicrobial activity. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2001;15: 1819–1821.

134. Gupta S, Bhatia G, Sharma A, Saxena S. Host defense peptides: An insight into the antimicrobial world. J Oral Maxillofac Pathol. 2018;22: 239–244. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_113_16
135. Chen H, Xu Z, Peng L, Fang X, Yin X, Xu N, et al. Recent advances in the research and development of human defensins. Peptides. 2006;27: 931–940. doi:10.1016/j.peptides.2005.08.018
136. Ganz T. Defensins and other antimicrobial peptides: a historical perspective and an update. Comb Chem High Throughput Screen. 2005;8: 209–217. doi:10.2174/1386207053764594
137. Jarczak J, Kosciuczuk EM, Lisowski P, Strzalkowska N, Jozwik A, Horbanczuk J, et al. Defensins: natural component of human innate immunity. Hum Immunol. 2013;74: 1069–1079. doi:10.1016/j.humimm.2013.05.008
138. Torres AM, Kuchel PW. The beta-defensin-fold family of polypeptides. Toxicon. 2004;44: 581–588. doi:10.1016/j.toxicon.2004.07.011
139. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J Biol Chem. 2001;276: 5707–5713. doi:10.1074/jbc.M008557200
140. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. J Immunol. 1999;163: 6718–6724.
141. Winter J, Wenghoefer M. Human Defensins: Potential Tools for Clinical Applications. Polymers (Basel). 2012;4: 691–709. doi:10.3390/polym4010691
142. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science. 1999;286: 525–528. doi:10.1126/science.286.5439.525
143. Langhorst J, Junge A, Rueffer A, Wehkamp J, Foell D, Michalsen A, et al. Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. Am J Gastroenterol. 2009;104: 404–410. doi:10.1038/ajg.2008.86
144. Rahman A, Fahlgren A, Sitohy B, Baranov V, Zirakzadeh A, Hammarstrom S, et al. Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2007;13: 847–855. doi:10.1002/ibd.20141

145. Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. Nat Immunol. 2001;2: 1133–1137. doi:10.1038/ni732
146. Koczulla AR, Bals R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. Drugs. 2003;63: 389–406. doi:10.2165/00003495-200363040-00005
147. Jacobsen F, Mittler D, Hirsch T, Gerhards A, Lehnhardt M, Voss B, et al. Transient cutaneous adenoviral gene therapy with human host defense peptide hCAP-18/LL-37 is effective for the treatment of burn wound infections. Gene Ther. 2005;12: 1494–1502. doi:10.1038/sj.gt.3302568
148. Jacobsen F, Baraniskin A, Mertens J, Mittler D, Mohammadi-Tabrisi A, Schubert S, et al. Activity of histone H1.2 in infected burn wounds. J Antimicrob Chemother. 2005;55: 735–741. doi:10.1093/jac/dki067
149. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. J Immunol. 2002;169: 3883–3891. doi:10.4049/jimmunol.169.7.3883
150. Shaykhiev R, Beisswenger C, Kandler K, Senske J, Puchner A, Damm T, et al. Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005;289: L842-8. doi:10.1152/ajplung.00286.2004
151. Steinstraesser L, Ring A, Bals R, Steinau H-U, Langer S. The human host defense peptide LL37/hCAP accelerates angiogenesis in PEGT/PBT biopolymers. Ann Plast Surg. 2006;56: 93–98. doi:10.1097/01.sap.0000190883.30005.91
152. Jeong S, Ledee DR, Gordon GM, Itakura T, Patel N, Martin A, et al. Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation. Am J Pathol. 2012;180: 2028–2039. doi:10.1016/j.ajpath.2012.01.025
153. Ragland SA, Criss AK. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. PLoS Pathog. 2017;13: 1–22. doi:10.1371/journal.ppat.1006512
154. Gonzalez-Chavez SA, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. Int J Antimicrob Agents. 2009;33: 301.e1–8. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020
155. Rizzi F, Bettuzzi S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. Endocr Relat Cancer. 2010;17: R1-17. doi:10.1677/ERC-09-0140

156. Urbaniak A, Jablonska K, Podhorska-Okolow M, Ugorski M, Dziegiel P. Prolactin-induced protein (PIP)-characterization and role in breast cancer progression. Am J Cancer Res. 2018;8: 2150–2164. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30555735
157. Gaubin M, Autiero M, Basmaciogullari S, Metivier D, Mis hal Z, Culerrier R, et al. Potent inhibition of CD4/TCR-mediated T cell apoptosis by a CD4-binding glycoprotein secreted from breast tumor and seminal vesicle cells. J Immunol. 1999;162: 2631–2638.
158. Bradford MM. A rapid and sensitive methode for the quantitation of microgram quantites of proiteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72: 248–254.
159. Choi M, Chang C-Y, Clough T, Broudy D, Killeen T, MacLean B, et al. MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. Bioinformatics. 2014;30: 2524–2526. doi:10.1093/bioinformatics/btu305
160. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem. 1993;39: 561–577. doi:10.1093/clinchem/39.4.561
161. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. Genome Res. 2008;18: 1509–1517. doi:10.1101/gr.079558.108
162. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. Genome Biol. 2010;11: R25. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25
163. Searle SR, Speed FM, Milliken GA. Population marginal means in the linear model: An alternative to least squares means. Am Stat. 1980;34: 216–221. doi:10.1080/00031305.1980.10483031
164. Benjamini Y, Hochberg Y. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc B. 1995;57: 289–300. doi:10.2307/2346101
165. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res. 2015;43: D447–D452. doi:10.1093/nar/gku1003
166. Venables WN, Ripley BD. Modern Applied Statistics with S. Springer-Verlag New York; 2002. doi:10.1007/978-0-387-21706-2
167. Lenth R V. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. J Stat Softw. 2016;69:

9332.

168. Hadley W. Reshaping Data with the reshape Package. J Stat Softw. 2007;21: 122291.
169. Hadley W. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer Nature Switzerland AG; 2019.
170. Hollander M, Wolfe D, Chicken E. Nonparametric statistical methods. John Wiley & Sons, Ltd; 2013.
171. de Nadal E, Fadden RP, Ruiz A, Haystead T, Arino J. A role for the Ppz Ser/Thr protein phosphatases in the regulation of translation elongation factor 1Balpha. J Biol Chem. 2001;276: 14829–14834. doi:10.1074/jbc.M010824200
172. Aksenova A, Munoz I, Volkov K, Arino J, Mironova L. The HAL3-PPZ1 dependent regulation of nonsense suppression efficiency in yeast and its influence on manifestation of the yeast prion-like determinant [ISP(+)]. Genes Cells. 2007;12: 435–445. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01064.x
173. Dominguez JM, Martin JJ. Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42: 2279–2283.
174. Mendoza A, Serramia MJ, Capa L, Garcia-Bustos JF. Translation elongation factor 2 is encoded by a single essential gene in Candida albicans. Gene. 1999;229: 183–191. doi:10.1016/s0378-1119(99)00024-4
175. Lee KS, Hines LK, Levin DE. A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. Mol Cell Biol. 1993;13: 5843–5853. doi:10.1128/mcb.13.9.5843
176. Clotet J, Gari E, Aldea M, Arino J. The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. Mol Cell Biol. 1999;19: 2408–2415. doi:10.1128/mcb.19.3.2408
177. Karkowska-Kuleta J, Kozik A. Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. Mol Oral Microbiol. 2014;29: 270–283. doi:10.1111/omi.12078
178. Hernaez ML, Ximenez-Embun P, Martinez-Gomariz M, Gutierrez-Blazquez MD, Nombela C, Gil C. Identification of Candida albicans exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. J Proteomics. 2010;73: 1404–1409. doi:10.1016/j.jprot.2010.02.008
179. Vialas V, Perumal P, Gutierrez D, Ximenez-Embun P, Nombela C, Gil C, et al. Cell surface shaving of Candida albicans biofilms, hyphae, and yeast form cells.

Proteomics. 2012;12: 2331–2339. doi:10.1002/pmic.201100588

180. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in Candida albicans. Cell. 2012;148: 126–138. doi:10.1016/j.cell.2011.10.048
181. Canto Soler MV, Gallo JE, Dodds RA, Suburo AM. A mouse model of proliferative vitreoretinopathy induced by dispase. Exp Eye Res. 2002;75: 491–504. doi:10.1006/exer.2002.2031
182. Andley UP. Crystallins in the eye: Function and pathology. Prog Retin Eye Res. 2007;26: 78–98. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.10.003
183. Alge CS, Priglinger SG, Neubauer AS, Kampik A, Zillig M, Bloemendal H, et al. Retinal pigment epithelium is protected against apoptosis by alphaB-crystallin. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43: 3575–3582.
184. He Q-Y, Chen J, Kung H-F, Yuen AP-W, Chiu J-F. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. Proteomics. 2004;4: 271–278. doi:10.1002/pmic.200300550
185. Hong SM, Yang YS. A potential role of crystallin in the vitreous bodies of rats after ischemia-reperfusion injury. Korean J Ophthalmol. 2012;26: 248–254. doi:10.3341/kjo.2012.26.4.248
186. Sakaguchi H, Miyagi M, Darrow RM, Crabb JS, Hollyfield JG, Organisciak DT, et al. Intense light exposure changes the crystallin content in retina. Experimental eye research. England; 2003. pp. 131–133. doi:10.1016/s0014-4835(02)00249-x
187. Yoshimura N, Kikuchi T, Kuroiwa S, Gaun S. Differential temporal and spatial expression of immediate early genes in retinal neurons after ischemia-reperfusion injury. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44: 2211–2220. doi:10.1167/iovs.02-0704
188. Vazquez-Chona F, Song BK, Geisert EEJ. Temporal changes in gene expression after injury in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45: 2737–2746. doi:10.1167/iovs.03-1047
189. Mandal N, Lewis GP, Fisher SK, Heegaard S, Prause JU, la Cour M, et al. Proteomic Analysis of the Vitreous following Experimental Retinal Detachment in Rabbits. J Ophthalmol. 2015;2015: 583040. doi:10.1155/2015/583040
190. Zhou Q, Xu G, Zhang X, Cao C, Zhou Z. Proteomics of post-traumatic proliferative vitreoretinopathy in rabbit retina reveals alterations to a variety of functional proteins. Curr Eye Res. 2012;37: 318–326. doi:10.3109/02713683.2011.635397
191. Mandal N, Lewis GP, Fisher SK, Heegaard S, Prause JU, la Cour M, et al. Protein

changes in the retina following experimental retinal detachment in rabbits. Mol Vis. 2011;17: 2634–2648.

192. Aretz S, Krohne TU, Kammerer K, Warnken U, Hotz-Wagenblatt A, Bergmann M, et al. In-depth mass spectrometric mapping of the human vitreous proteome. Proteome Sci. 2013;11: 22. doi:10.1186/1477-5956-11-22
193. Yu J, Peng R, Chen H, Cui C, Ba J. Elucidation of the pathogenic mechanism of rhegmatogenous retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy by proteomic analysis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53: 8146–8153. doi:10.1167/iovs.12-10079
194. Wang H, Feng L, Hu J, Xie C, Wang F. Differentiating vitreous proteomes in proliferative diabetic retinopathy using high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Exp Eye Res. 2013;108: 110–119. doi:10.1016/j.exer.2012.11.023
195. Raghunath M, Cankay R, Kubitscheck U, Fauteck JD, Mayne R, Aeschlimann D, et al. Transglutaminase activity in the eye: cross-linking in epithelia and connective tissue structures. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999;40: 2780–2787.
196. Sohn J, Kim T-I, Yoon Y-H, Kim J-Y, Kim S-Y. Novel transglutaminase inhibitors reverse the inflammation of allergic conjunctivitis. J Clin Invest. 2003;111: 121–128. doi:10.1172/JCI15937
197. Wan XH, Lee EH, Koh HJ, Song J, Kim EK, Kim CY, et al. Enhanced expression of transglutaminase 2 in anterior polar cataracts and its induction by TGF-beta in vitro. Br J Ophthalmol. 2002;86: 1293–1298. doi:10.1136/bjo.86.11.1293
198. Tovar-Vidales T, Roque R, Clark AF, Wordinger RJ. Tissue transglutaminase expression and activity in normal and glaucomatous human trabecular meshwork cells and tissues. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49: 622–628. doi:10.1167/iovs.07-0835
199. Priglinger SG, May CA, Neubauer AS, Alge CS, Schonfeld C-L, Kampik A, et al. Tissue transglutaminase as a modifying enzyme of the extracellular matrix in PVR membranes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44: 355–364. doi:10.1167/iovs.02-0224
200. Csosz É, Meskó B, Fésüs L. Transdab wiki: The interactive transglutaminase substrate database on web 2.0 surface. Amino Acids. 2009;36: 615–617. doi:10.1007/s00726-008-0121-y
201. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti S V. Serum ferritin: Past, present and future. Biochim Biophys Acta. 2010;1800: 760–769. doi:10.1016/j.bbagen.2010.03.011
202. Fesus L, Szondy Z. Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. FEBS

Lett. 2005;579: 3297–3302. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.063

203. Fesus L, Piacentini M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Trends Biochem Sci. 2002;27: 534–539. doi:10.1016/s0968-0004(02)02182-5
204. Aeschlimann D, Thomazy V. Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. Connect Tissue Res. 2000;41: 1–27. doi:10.3109/03008200009005638
205. Williams WM, Torres S, Siedlak SL, Castellani RJ, Perry G, Smith MA, et al. Antimicrobial peptide beta-defensin-1 expression is upregulated in Alzheimer's brain. J Neuroinflammation. 2013;10: 127. doi:10.1186/1742-2094-10-127
206. Szekeres M, Ivitz E, Datki Z, Kalman J, Pakaski M, Varhelyi ZP, et al. Relevance of defensin beta-2 and alpha defensins (HNP1-3) in Alzheimer's disease. Psychiatry Res. 2016;239: 342–345. doi:10.1016/j.psychres.2016.03.045
207. Tiffany JM. Tears in health and disease. Eye (Lond). 2003;17: 923–926. doi:10.1038/sj.eye.6700566
208. Zhou L, Beuerman RW. The power of tears: how tear proteomics research could revolutionize the clinic. Expert Rev Proteomics. 2017;14: 189–191. doi:10.1080/14789450.2017.1285703
209. Souza GA De, Godoy LMF, Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. 2006; 1–11. doi:10.1186/gb-2006-7-8-r72
210. Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, Chen L, Vaz C, Tanavde V, et al. In-depth analysis of the human tear proteome. J Proteomics. 2012;75: 3877–3885. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.053
211. Li N, Wang N, Zheng J, Liu XM, Lever OW, Erickson PM, et al. Characterization of human tear proteome using multiple proteomic analysis techniques. J Proteome Res. 2005;4: 2052–2061. doi:10.1021/pr0501970
212. Janssen PT, van Bijsterveld OP. Origin and biosynthesis of human tear fluid proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983;24: 623–630.
213. Walcott B. The Lacrimal Gland and Its Veil of Tears. News Physiol Sci an Int J Physiol Prod jointly by Int Union Physiol Sci Am Physiol Soc. 1998;13: 97–103. doi:10.1152/physiologyonline.1998.13.2.97
214. Jung JH, Ji YW, Hwang HS, Oh JW, Kim HC, Keun H, et al. Proteomic analysis of human lacrimal and tear fluid in dry eye disease. Sci Rep. 2017; 1–11.

doi:10.1038/s41598-017-13817-y

215. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. Neurology. 2013;80: 1778–1783. doi:10.1212/WNL.0b013e31828726f5
216. Bali J, Halima S Ben, Felmy B, Goodger Z, Zurbriggen S, Rajendran L. Cellular basis of Alzheimer's disease. Ann Indian Acad Neurol. 2010;13: S89-93. doi:10.4103/0972-2327.74251
217. Crews L, Tsigelny I, Hashimoto M, Masliah E. Role of synucleins in Alzheimer's disease. Neurotox Res. 2009;16: 306–317. doi:10.1007/s12640-009-9073-6
218. Wyss-Coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2: a006346. doi:10.1101/cshperspect.a006346
219. Korolainen MA, Goldsteins G, Nyman TA, Alafuzoff I, Koistinaho J, Pirttila T. Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. Neurobiol Aging. 2006;27: 42–53. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.11.010
220. Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov A V, Miller CA, Ko MK, Black KL, et al. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. Neuroimage. 2011;54 Suppl 1: S204-17. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.06.020
221. Goldstein LE, Muffat JA, Cherny RA, Moir RD, Ericsson MH, Huang X, et al. Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. Lancet (London, England). 2003;361: 1258–1265. doi:10.1016/S0140-6736(03)12981-9
222. Armstrong R, Kergoat H. Oculo-visual changes and clinical considerations affecting older patients with dementia. Ophthalmic Physiol Opt. 2015;35: 352–376. doi:10.1111/opo.12220
223. Berisha F, Feke GT, Trempe CL, McMeel JW, Schepens CL. Retinal abnormalities in early Alzheimer's disease. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2007;48: 2285–2289. doi:10.1167/iovs.06-1029
224. Laske C, Sohrabi HR, Frost SM, López-De-Ipiña K, Garrard P, Buscema M, et al. Innovative diagnostic tools for early detection of Alzheimer's disease. Alzheimer's Dement. 2015;11: 561–578. doi:10.1016/j.jalz.2014.06.004
225. Ornek N, Dag E, Ornek K. Corneal sensitivity and tear function in neurodegenerative diseases. Curr Eye Res. 2015;40: 423–428. doi:10.3109/02713683.2014.930154

226. Kingman S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally. Bull World Health Organ. 2004;82: 887–888. doi:/S0042-96862004001100019
227. Andersson Geimer S. Glaucoma diagnostics. Acta Ophthalmologica. 2013. pp. 390–391. doi:10.1111/aos.12099
228. Killer HE, Pircher A. Normal tension glaucoma: review of current understanding and mechanisms of the pathogenesis. Eye (Lond). 2018;32: 924–930. doi:10.1038/s41433-018-0042-2
229. Friedman DS, Jampel HD, Munoz B, West SK. The prevalence of open-angle glaucoma among blacks and whites 73 years and older: the Salisbury Eye Evaluation Glaucoma Study. Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960). 2006;124: 1625–1630. doi:10.1001/archopht.124.11.1625
230. Resnikoff S, Keys TU. Future trends in global blindness. Indian J Ophthalmol. 2012;60: 387–395. doi:10.4103/0301-4738.100532
231. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. Br J Ophthalmol. 2006;90: 262–267. doi:10.1136/bjo.2005.081224
232. Sapitro J, Dunmire JJ, Scott SE, Sutariya V, Geldenhuys WJ, Hewit M, et al. Suppression of transforming growth factor-beta effects in rabbit subconjunctival fibroblasts by activin receptor-like kinase 5 inhibitor. Mol Vis. 2010;16: 1880–1892.
233. Yang Z, Zack DJ. What has gene expression profiling taught us about glaucoma? Exp Eye Res. 2011;93: 191–195. doi:10.1016/j.exer.2010.10.001
234. Yang X, Hondur G, Li M, Cai J, Klein JB, Kuehn MH, et al. Proteomics analysis of molecular risk factors in the ocular hypertensive human retina. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2015;56: 5816–5830. doi:10.1167/iovs.15-17294
235. Ramdas WD, van Koolwijk LME, Lemij HG, Pasutto F, Cree AJ, Thorleifsson G, et al. Common genetic variants associated with open-angle glaucoma. Hum Mol Genet. 2011;20: 2464–2471. doi:10.1093/hmg/ddr120
236. Križaj D, Ryskamp DA, Tian N, Tezel G, Mitchell CH, Slepak VZ, et al. From Mechanosensitivity to Inflammatory Responses: New Players in the Pathology of Glaucoma. Curr Eye Res. 2014;39: 105–119. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage
237. Chang EE, Goldberg JL. Glaucoma 2.0: Neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement. Ophthalmology. 2012;119: 979–86. doi:10.1016/j.ophtha.2011.11.003
238. Bollinger KE, Crabb JS, Yuan X, Putliwala T, Clark AF, Crabb JW. Quantitative

proteomics: TGFβ2 signaling in trabecular meshwork cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52: 8287–94. doi:10.1167/iovs.11-8218

239. Crabb JW, Yuan X, Dvoriantchikova G, Ivanov D, Crabb JS, Shestopalov VI. Preliminary quantitative proteomic characterization of glaucomatous rat retinal ganglion cells. Exp Eye Res. 2010;91: 107–110. doi:10.1016/j.exer.2010.04.004
240. Bollinger KE, Crabb JS, Yuan X, Putliwala T, Clark AF, Crabb JW. Proteomic similarities in steroid responsiveness in normal and glaucomatous trabecular meshwork cells. Mol Vis. 2012;18: 2001–2011.
241. Funke S, Perumal N, Bell K, Pfeiffer N, Grus FH. The potential impact of recent insights into proteomic changes associated with glaucoma. Expert Rev Proteomics. 2017;14: 311–334. doi:10.1080/14789450.2017.1298448
242. Tezel G. A proteomics view of the molecular mechanisms and biomarkers of glaucomatous neurodegeneration. Prog Retin Eye Res. 2013;35: 18–43. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.01.004
243. Hagan S, Martin E, Enríquez-de-Salamanca A, Aass C, Norheim I, Eriksen E, et al. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. EPMA J. 2016;7: 15. doi:10.1186/s13167-016-0065-3
244. Pieragostino D, Agnifili L, Fasanella V, D'Aguanno S, Mastropasqua R, Di Ilio C, et al. Shotgun proteomics reveals specific modulated protein patterns in tears of patients with primary open angle glaucoma naïve to therapy. Mol Biosyst. 2013;9: 1108–16. doi:10.1039/c3mb25463a
245. Höhn R, Mirshahi A, Nickels S, Schulz A, Wild PS, Blettner M, et al. Cardiovascular medication and intraocular pressure: results from the Gutenberg Health Study. Br J Ophthalmol. 2017;101: 1633–1637. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309993
246. Kaeslin MA, Killer HE, Fuhrer CA, Zeleny N, Huber AR, Neutzner A. Changes to the aqueous humor proteome during glaucoma. PLoS One. 2016;11: 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0165314
247. Du, Shaolin et al. Multiplex cytokine levels of aqueous humor in acute primary angle-closure patients: fellow eye comparison. BMC Ophthalmol. 2016;16: 1–8. doi:10.1186/s12886-016-0182-8
248. Gu R, Zhou M, Jiang C, Yu J, Xu G. Elevated concentration of cytokines in aqueous in post-vitrectomy eyes. Clin Exp Ophthalmol. 2016;44: 128–134. doi:10.1111/ceo.12638

249. Pieragostino D, D'Alessandro M, di Ioia M, Di Ilio C, Sacchetta P, Del Boccio P. Unraveling the molecular repertoire of tears as a source of biomarkers: beyond ocular diseases. Proteomics - Clin Appl. 2015;9: 169–86. doi:10.1002/prca.201400084
250. Malvitte L, Montange T, Vejux A, Baudouin C, Bron AM, Creuzot-Garcher C, et al. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. Br J Ophthalmol. 2007;91: 29–32. doi:10.1136/bjo.2006.101485
251. Sharma RK, Rogojina AT, Chalam K V. Multiplex immunoassay analysis of biomarkers in clinically accessible quantities of human aqueous humor. Mol Vis. 2009;15: 60–69. doi:6 [pii]
252. Borkenstein A, Faschinger C, Maier R, Weger M, Theisl A, Demel U, et al. Measurement of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, Fas ligand, interleukin-1α, and interleukin-1β in the aqueous humor of patients with open angle glaucoma using multiplex bead analysis. Mol Vis. 2013;19: 2306–11.
253. Lin S. Building a safer trabeculectomy. Br J Ophthalmol. 2006;90: 4–5. doi:10.1136/bjo.2005.078568
254. Van Bergen T, Van de Velde S, Vandewalle E, Moons L, Stalmans I. Improving patient outcomes following glaucoma surgery: state of the art and future perspectives. Clin Ophthalmol. 2014;8: 857–67. doi:10.2147/OPTH.S48745
255. Bar-David L, Blumenthal EZ. Evolution of Glaucoma Surgery in the Last 25 Years. Rambam Maimonides Med J. 2018;9. doi:10.5041/RMMJ.10345
256. Gonzalez ACDO, Andrade ZDA, Costa TF, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. An Bras Dermatol. 2016;91: 614–620. doi:10.1590/abd1806-4841.20164741
257. Balaji S, Watson CL, Ranjan R, King A, Bollyky PL, Keswani SG. Chemokine Involvement in Fetal and Adult Wound Healing. Adv Wound Care. 2015;4: 660–672. doi:10.1089/wound.2014.0564
258. Maycock NJR, Marshall J. Genomics of corneal wound healing: a review of the literature. Acta Ophthalmol. 2014;92: e170–e184. doi:10.1111/aos.12227
259. Olayanju JA, Hassan MB, Hodge DO, Khanna CL. Trabeculectomy-Related Complications in Olmsted County, Minnesota, 1985 Through 2010. JAAMA Ophthalmol. 2015;133: 574–580. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.037.Reactivity
260. Csutak A, Tőzsér J, Békési L, Hassan Z, Berta A, Silver DM, et al. Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy. Invest

Ophthalmol Vis Sci. 2000;41: 3743–7. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053271

261. Takai Y, Tanito M, Ohira A. Multiplex cytokine analysis of aqueous humor in eyes with primary open-angle glaucoma, exfoliation glaucoma, and cataract. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2012;53: 241–247. doi:10.1167/iovs.11-8434
262. Khalef N, Labib H, Helmy H, Abd M, Hamid E, Moemen L, et al. Levels of cytokine in the aqueous humor of eyes with primary open angle glaucoma, pseudoexfoliation glaucoma and cataract. Electron Physician. 2017;9: 3833–3837. doi:http://dx.doi.org/10.19082/3833
263. Martinez-de-la-Casa JM, Perez-Bartolome F, Urcelay E, Santiago JL, Moreno-Montañes J, Arriola-Villalobos P, et al. Tear cytokine profile of glaucoma patients treated with preservative-free or preserved latanoprost. Ocul Surf. 2017;15: 723–729. doi:10.1016/j.jtos.2017.03.004
264. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol. 2004;75: 163–189. doi:10.1189/jlb.0603252
265. Granstein RD, Flotte TJ, Amento EP. Interferons and collagen production. J Invest Dermatol. 1990;95: 75S-80S.
266. Laato M, Heino J, Gerdin B, Kahari VM, Niinikoski J. Interferon-gamma-induced inhibition of wound healing in vivo and in vitro. Ann Chir Gynaecol. 2001;90 Suppl 2: 19–23.
267. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. Stem Cells. 2008;26: 1047–1055. doi:10.1634/stemcells.2007-0737
268. Lee S-J, Lee E-J, Kim S-K, Jeong P, Cho Y-H, Yun SJ, et al. Identification of pro-inflammatory cytokines associated with muscle invasive bladder cancer; the roles of IL-5, IL-20, and IL-28A. PLoS One. 2012;7: e40267. doi:10.1371/journal.pone.0040267
269. Leitch VD, Strudwick XL, Matthaei KI, Dent LA, Cowin AJ. IL-5-overexpressing mice exhibit eosinophilia and altered wound healing through mechanisms involving prolonged inflammation. Immunol Cell Biol. 2009;87: 131–140. doi:10.1038/icb.2008.72
270. Groves RW, Schmidt-Lucke JA. Recombinant human GM-CSF in the treatment of poorly healing wounds. Adv Skin Wound Care. 2000;13: 107–112.

271. Seet L-F, Finger SN, Chu SWL, Toh LZ, Wong TT. Novel insight into the inflammatory and cellular responses following experimental glaucoma surgery: a roadmap for inhibiting fibrosis. Curr Mol Med. 2013;13: 911–928.
272. Rho CR, Park M, Kang S. Effects of Granulocyte-Macrophage Colony- Stimulating (GM-CSF) Factor on Corneal Epithelial Cells in Corneal Wound Healing Model. PLoS One. 2015;10(9): 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0138020
273. Hollo G. Wound healing and glaucoma surgery: modulating the scarring process with conventional antimetabolites and new molecules. Dev Ophthalmol. 2012;50: 79–89. doi:10.1159/000334790
274. Hoang TKH, Kim YK, Jeoung JW, Park KH. Relationship between age and surgical success after trabeculectomy with adjunctive mitomycin C. Eye. 2018;32: 1321–1328. doi:10.1038/s41433-018-0071-x
275. Kotrappa R, Yakkundi A, Khangavi B, Meena A, Shah D. The safety and efficacy of minimal dose of mitomycin C in trabeculectomy. J Sci Soc. 2016;43: 135. doi:10.4103/0974-5009.190526
276. Duvesh R, Puthuran G, Srinivasan K, Rengaraj V, Krishnadas SR, Rajendrababu S, et al. Multiplex Cytokine Analysis of Aqueous Humor from the Patients with Chronic Primary Angle Closure Glaucoma. Curr Eye Res. 2017;42: 1608–1613. doi:10.1080/02713683.2017.1362003
277. Garweg JG, Zandi S, Pfister IB, Skowronska M, Gerhardt C. Comparison of cytokine profiles in the aqueous humor of eyes with pseudoexfoliation syndrome and glaucoma. PLoS One. 2017;12: 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0182571
278. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen. 2008;16: 585–601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
279. Ashby BD, Garrett Q, Willcox MD. Corneal Injuries and Wound Healing – Review of Processes and Therapies. Austin J Clin Ophthalmol. 2014;1: 1–25. doi:10.1073/pnas.1019055108
280. Agrawal VB, Tsai RJF. Importance of Corneal Epithelial Wound Healing. Indian J Ophthalmol. 2003;51: 5–15. Available: http://www.ijo.in/text.asp?2003/51/1/5/14743
281. Lind L, Elmståhl S, Ingelsson E. Cardiometabolic proteins associated with metabolic syndrome. Metab Syndr Relat Disord. 2019;17: 272–279. doi:10.1089/met.2018.0123
282. Larsson A, Carlsson L, Lind A-L, Gordh T, Bodolea C, Kamali-Moghaddam M, et al. The body mass index (BMI) is significantly correlated with levels of cytokines and

chemokines in cerebrospinal fluid. Cytokine. 2015;76: 514–518. doi:10.1016/j.cyto.2015.07.010

283. Björkesten J, Enroth S, Shen Q, Wik L, Hougaard DM, Cohen AS, et al. Stability of Proteins in Dried Blood Spot Biobanks. Mol Cell Proteomics. 2017;16: 1286–1296. doi:10.1074/mcp.RA117.000015
284. Barker H, Aaltonen M, Pan P, Vahatupa M, Kaipiainen P, May U, et al. Role of carbonic anhydrases in skin wound healing. Exp Mol Med. 2017;49: e334. doi:10.1038/emm.2017.60
285. Roversi P, Marti L, Caputo AT, Alonzi DS, Hill JC, Dent KC, et al. Interdomain conformational flexibility underpins the activity of UGGT, the eukaryotic glycoprotein secretion checkpoint. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114: 8544–8549. doi:10.1073/pnas.1703682114
286. Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, Walsh MT, Scheiflinger F, Wagner DD. ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. J Exp Med. 2008;205: 2065–2074. doi:10.1084/jem.20080130
287. Tadokoro S, Ide S, Tokuyama R, Umeki H, Tatehara S, Kataoka S, et al. Leptin promotes wound healing in the skin. PLoS One. 2015;10: 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0121242
288. Kook H, Itoh H, Choi BS, Sawada N, Doi K, Hwang TJ, et al. Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;284: H1388-97. doi:10.1152/ajpheart.00414.2002
289. Lee TW, Kwon YW, Park GT, Do EK, Yoon JW, Kim S-C, et al. Atrial natriuretic peptide accelerates human endothelial progenitor cell-stimulated cutaneous wound healing and angiogenesis. Wound Repair Regen. 2018;26: 116–126. doi:10.1111/wrr.12641
290. Bernasconi R, Nystrom A. Balance and circumstance: The renin angiotensin system in wound healing and fibrosis. Cell Signal. 2018;51: 34–46. doi:10.1016/j.cellsig.2018.07.011
291. Hui Q, Jin Z, Li X, Liu C, Wang X. FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. Int J Mol Sci. 2018;19. doi:10.3390/ijms19071875
292. Song Z, Yang F, Du H, Li X, Liu J, Dong M, et al. Role of artemin in non-small cell lung cancer. Thorac cancer. 2018;9: 555–562. doi:10.1111/1759-7714.12615
293. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. Nat

Immunol. 2011;12: 1159–1166. doi:10.1038/ni.2156

294. Fujiwara T, Dohi T, Maan ZN, Rustad KC, Kwon SH, Padmanabhan J, et al. Age-associated intracellular superoxide dismutase deficiency potentiates dermal fibroblast dysfunction during wound healing. Exp Dermatol. 2017. doi:10.1111/exd.13404
295. Fleming TH, Theilen T-M, Masania J, Wunderle M, Karimi J, Vittas S, et al. Aging-dependent reduction in glyoxalase 1 delays wound healing. Gerontology. 2013;59: 427–437. doi:10.1159/000351628
296. Fleming T, Nawroth PP. Reactive metabolites as a cause of late diabetic complications. Biochem Soc Trans. 2014;42: 439–442. doi:10.1042/BST20130265
297. Treiber N, Maity P, Singh K, Ferchiu F, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. Dermatoendocrinol. 2012;4: 232–235. doi:10.4161/derm.21819
298. Zaniolo K, Gingras M-E, Audette M, Guerin SL. Expression of the gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase-1 is modulated by fibronectin during corneal wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47: 4199–4210. doi:10.1167/iovs.06-0176
299. El-Hamoly T, Hegedus C, Lakatos P, Kovacs K, Bai P, El-Ghazaly MA, et al. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 delays wound healing by regulating keratinocyte migration and production of inflammatory mediators. Mol Med. 2014;20: 363–371. doi:10.2119/molmed.2014.00130
300. Rodrigues M, Gurtner G. Black, White, and Gray: Macrophages in Skin Repair and Disease. Curr Pathobiol Rep. 2017;5: 333–342. doi:10.1007/s40139-017-0152-8
301. Li H, Cui Y, Luan J, Zhang X, Li C, Zhou X, et al. PRELP (proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein) promotes osteoblastic differentiation of preosteoblastic MC3T3-E1 cells by regulating the β-catenin pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2016;470: 558–562. doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.106
302. Wolf M, Maltseva I, Clay SM, Pan P, Gajjala A, Chan MF. Effects of MMP12 on cell motility and inflammation during corneal epithelial repair. Exp Eye Res. 2017;160: 11–20. doi:10.1016/j.exer.2017.04.007
303. Ljubimov A, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. Prog Retin Eye Res. 2016;49: 17–45. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.002.Progress
304. Pradeep T, Divy M, Le PH. Histology, Eye. StatPearls. Treasur Island; 2020.
305. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. J Cell Physiol. 1992;153: 1–5. doi:10.1002/jcp.1041530102

306. Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L, et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. Br J Cancer. 2003;88: 1772–1779. doi:10.1038/sj.bjc.6600864
307. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85: 162–169. doi:10.1067/mpr.2001.113778
308. de Almeida PDV, Gregio AMT, Machado MAN, de Lima AAS, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. J Contemp Dent Pract. 2008;9: 72–80.
309. Schulz BL, Cooper-White J, Punyadeera CK. Saliva proteome research: current status and future outlook. Crit Rev Biotechnol. 2013;33: 246–259. doi:10.3109/07388551.2012.687361
310. Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo RR, Li Y, Loo JA, et al. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. Proteomics. 2005;5: 1714–1728. doi:10.1002/pmic.200401037
311. Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M, et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. J Proteome Res. 2008;7: 1994–2006. doi:10.1021/pr700764j
312. Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, Devoe DL, Balgley BM. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS. J Proteome Res. 2006;5: 1469–1478. doi:10.1021/pr060065m
313. Lorenzo-Pouso AI, Pérez-Sayáns M, Bravo SB, López-Jornet P, García-Vence M, Alonso-Sampedro M, et al. Protein-Based Salivary Profiles as Novel Biomarkers for Oral Diseases. Dis Markers. 2018;2018. doi:10.1155/2018/6141845
314. Lin LY, Chang CC. [Determination of protein concentration in human saliva]. Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi. 1989;5: 389–397.
315. Shaila M, Pai GP, Shetty P. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis. J Indian Soc Periodontol. 2013;17: 42–46. doi:10.4103/0972-124X.107473
316. Gleerup HS, Hasselbalch SG, Simonsen AH. Biomarkers for Alzheimer's Disease in Saliva: A Systematic Review. Dis Markers. 2019;2019: 4761054. doi:10.1155/2019/4761054

317. Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102: 67–76. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.038
318. Argiris A, Karamouzis M V, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. Lancet (London, England). 2008;371: 1695–1709. doi:10.1016/S0140-6736(08)60728-X
319. Zhang H, Dziegielewski PT, Biron VL, Szudek J, Al-Qahatani KH, O'Connell DA, et al. Survival outcomes of patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma treated with multimodal therapy: a multi-institutional analysis. J Otolaryngol Head Neck Surg. 2013;42: 30. doi:10.1186/1916-0216-42-30
320. Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. Otolaryngol Head Neck Surg. 2000;122: 44–51. doi:10.1016/S0194-5998(00)70142-2
321. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. Int J cancer. 2008;122: 155–164. doi:10.1002/ijc.23033
322. Tramacere I, Negri E, Bagnardi V, Garavello W, Rota M, Scotti L, et al. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 1: overall results and dose-risk relation. Oral Oncol. 2010;46: 497–503. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.03.024
323. Turati F, Garavello W, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, et al. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 2: results by subsites. Oral Oncol. 2010;46: 720–726. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.07.010
324. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. Swed Dent J Suppl. 2005; 1–66.
325. Walsh T, Liu JLY, Brocklehurst P, Glenny A-M, Lingen M, Kerr AR, et al. Clinical assessment to screen for the detection of oral cavity cancer and potentially malignant disorders in apparently healthy adults. Cochrane database Syst Rev. 2013; CD010173. doi:10.1002/14651858.CD010173.pub2
326. Bonifazi M, Malvezzi M, Bertuccio P, Edefonti V, Garavello W, Levi F, et al. Age–period–cohort analysis of oral cancer mortality in Europe: The end of an epidemic? Oral Oncol. 2011;47: 400–407. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.06.010
327. Suba Z, Mihalyi S, Takacs D, Gyulai-Gaal S. [Oral cancer: morbus Hungaricus in the 21st century]. Fogorv Sz. 2009;102: 63–68.

328. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DTW. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. Clin Microbiol Rev. 2013;26: 781–791. doi:10.1128/CMR.00021-13

329. Winck F V, Prado Ribeiro AC, Ramos Domingues R, Ling LY, Riano-Pachon DM, Rivera C, et al. Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivary extracellular vesicles. Sci Rep. 2015;5: 16305. doi:10.1038/srep16305

330. Khan RS, Khurshid Z, Akhbar S, Moin SF. Advances of Salivary Proteomics in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Detection: An Update. PROTEOMES. 2016;4. doi:10.3390/proteomes4040041

331. Nagler R. Concomitant Analysis of Salivary Tumor Markers--A New Diagnostic Tool for Oral Cancer. Clin Cancer Res. 2006;12: 3979–3984. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2412

332. Grassl N, Kulak NA, Pichler G, Geyer PE, Jung J, Schubert S, et al. Ultra-deep and quantitative saliva proteome reveals dynamics of the oral microbiome. Genome Med. 2016;8: 44. doi:10.1186/s13073-016-0293-0

333. Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. Clin Cancer Res. 2008;14: 6246–6252. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5037

334. Yu J-S, Chen Y-T, Chiang W-F, Hsiao Y-C, Chu LJ, See L-C, et al. Saliva protein biomarkers to detect oral squamous cell carcinoma in a high-risk population in Taiwan. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113: 11549–11554. doi:10.1073/pnas.1612368113

335. Wu C-C, Chu H-W, Hsu C-W, Chang K-P, Liu H-P. Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma. Proteomics. 2015;15: 3394–3404. doi:10.1002/pmic.201500157

336. Kawahara R, Bollinger JG, Rivera C, Ribeiro ACP, Brandao TB, Paes Leme AF, et al. A targeted proteomic strategy for the measurement of oral cancer candidate biomarkers in human saliva. Proteomics. 2016;16: 159–173. doi:10.1002/pmic.201500224

337. Jayadeep A, Raveendran Pillai K, Kannan S, Nalinakumari KR, Mathew B, Krishnan Nair M, et al. Serum levels of copper, zinc, iron and ceruplasmin in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. J Exp Clin Cancer Res. 1997;16: 295–300.

338. Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T, Osaki T. Mechanism of HIF-1alpha-

dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. Cancer Sci. 2005;96: 394–402. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00065.x

339. Tung C-L, Lin S-T, Chou H-C, Chen Y-W, Lin H-C, Tung C-L, et al. Proteomics-based identification of plasma biomarkers in oral squamous cell carcinoma. J Pharm Biomed Anal. 2013;75: 7–17. doi:10.1016/j.jpba.2012.11.017
340. Yen C-Y, Huang C-Y, Hou M-F, Yang Y-H, Chang C-H, Huang H-W, et al. Evaluating the performance of fibronectin 1 (FN1), integrin alpha4beta1 (ITGA4), syndecan-2 (SDC2), and glycoprotein CD44 as the potential biomarkers of oral squamous cell carcinoma (OSCC). Biomarkers Biochem Indic Expo response, susceptibility to Chem. 2013;18: 63–72. doi:10.3109/1354750X.2012.737025
341. Chen Y, Azman SN, Kerishnan JP, Zain RB, Chen YN, Wong Y-L, et al. Identification of host-immune response protein candidates in the sera of human oral squamous cell carcinoma patients. PLoS One. 2014;9: e109012. doi:10.1371/journal.pone.0109012
342. Ohara T, Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Kitahara H, Okamune A, et al. Integrin Expression Levels Correlate with Invasion, Metastasis and Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. Pathol Oncol Res. 2009;15: 429–436. doi:10.1007/s12253-008-9142-9
343. Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, Feinmesser R, Savulescu D, Borovoi I, et al. Salivary analysis of oral cancer biomarkers. Br J Cancer. 2009;101: 1194–1198. doi:10.1038/sj.bjc.6605290
344. Li S-J, Peng M, Li H, Liu B-S, Wang C, Wu J-R, et al. Sys-BodyFluid: a systematical database for human body fluid proteome research. Nucleic Acids Res. 2009;37: D907-12. doi:10.1093/nar/gkn849
345. Swaak AJ, Visch LL, Zonneveld A. Diagnostic significance of salivary levels of beta 2-microglobulin in Sjogren's syndrome. Clin Rheumatol. 1988;7: 28–34. doi:10.1007/bf02284053
346. Rossetti DV, Martelli C, Longhi R, Iavarone F, Castagnola M, Desiderio C. Quantitative analysis of thymosin beta4 in whole saliva by capillary electrophoresis-mass spectrometry using multiple ions monitoring (CE-MIM-MS.). Electrophoresis. 2013;34: 2674–2682. doi:10.1002/elps.201300165
347. Morzel M, Chabanet C, Schwartz C, Lucchi G, Ducoroy P, Nicklaus S. Salivary protein profiles are linked to bitter taste acceptance in infants. Eur J Pediatr. 2014;173: 575–582. doi:10.1007/s00431-013-2216-z

348. Alves DBM, Bingle L, Bingle CD, Lourenco SV, Silva AA, Pereira DL, et al. BPI-fold (BPIF) containing/plunc protein expression in human fetal major and minor salivary glands. Braz Oral Res. 2017;31: e6. doi:10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0006
349. Jayakar SK, Loudig O, Brandwein-Gensler M, Kim RS, Ow TJ, Ustun B, et al. Apolipoprotein E Promotes Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma. Am J Pathol. 2017;187: 2259–2272. doi:10.1016/j.ajpath.2017.06.016
350. Magnussen S, Rikardsen OG, Hadler-Olsen E, Uhlin-Hansen L, Steigen SE, Svineng G. Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) are potential predictive biomarkers in early stage oral squamous cell carcinomas (OSCC). PLoS One. 2014;9: e101895. doi:10.1371/journal.pone.0101895
351. de Carvalho Fraga CA, Farias LC, Jones KM, Batista de Paula AM, Guimaraes ALS. Angiotensin-Converting Enzymes (ACE and ACE2) as Potential Targets for Malignant Epithelial Neoplasia: Review and Bioinformatics Analyses Focused in Oral Squamous Cell Carcinoma. Protein Pept Lett. 2017;24: 784–792. doi:10.2174/0929866524666170815161621
352. Shiiba M, Nomura H, Shinozuka K, Saito K, Kouzu Y, Kasamatsu A, et al. Down-regulated expression of SERPIN genes located on chromosome 18q21 in oral squamous cell carcinomas. Oncol Rep. 2010;24: 241–249. doi:10.3892/or_00000852
353. Xia W, Lau YK, Hu MC, Li L, Johnston DA, Sheng S j, et al. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. Oncogene. 2000;19: 2398–2403. doi:10.1038/sj.onc.1203535
354. Kocsis J, Meszaros T, Madaras B, Toth EK, Kamondi S, Gal P, et al. High levels of acute phase proteins and soluble 70 kDa heat shock proteins are independent and additive risk factors for mortality in colorectal cancer. Cell Stress Chaperones. 2011;16: 49–55. doi:10.1007/s12192-010-0220-z
355. Daly M, O'Meara A, Hallinan FM. Identification and characterization of a new antithrombin III familial variant (AT Dublin) with possible increased frequency in children with cancer. Br J Haematol. 1987;65: 457–462. doi:10.1111/j.1365-2141.1987.tb04150.x
356. Cui T, Chen Y, Knosel T, Yang L, Zoller K, Galler K, et al. Human complement factor H is a novel diagnostic marker for lung adenocarcinoma. Int J Oncol. 2011;39: 161–168. doi:10.3892/ijo.2011.1010
357. Riihila PM, Nissinen LM, Ala-Aho R, Kallajoki M, Grenman R, Meri S, et al.

Complement factor H: a biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma. J Invest Dermatol. 2014;134: 498–506. doi:10.1038/jid.2013.346

358. Li G, Da M, Zhang W, Wu H, Ye J, Chen J, et al. Alteration of serum lipid profile and its prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. J oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol. 2016;45: 167–172. doi:10.1111/jop.12344
359. Li P, Xiao LY, Tan H. Muc-1 promotes migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via PI3K-Akt signaling. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8: 10365–10374.
360. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Miller L, Ho V, Ondrey F. The feasibility of monitoring NF-kappaB associated cytokines: TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6, and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus. Mol Carcinog. 2005;44: 77–82. doi:10.1002/mc.20113
361. St. John MAR, Li Y, Zhou X, Denny P, Ho C-M, Montemagno C, et al. Interleukin 6 and Interleukin 8 as Potential Biomarkers for Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. Arch Otolaryngol Neck Surg. 2004;130: 929. doi:10.1001/archotol.130.8.929
362. Arellano-Garcia M, Hu S, Wang J, Henson B, Zhou H, Chia D, et al. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. Oral Dis. 2008;14: 705–712. doi:10.1111/j.1601-0825.2008.01488.x
363. Elashoff D, Zhou H, Reiss J, Wang J, Xiao H, Henson B, et al. Prevalidation of Salivary Biomarkers for Oral Cancer Detection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2012;21: 664–672. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-1093
364. Brinkmann O, Kastratovic DA, Dimitrijevic M V., Konstantinovic VS, Jelovac DB, Antic J, et al. Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. Oral Oncol. 2011;47: 51–55. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.10.009
365. Sato J, Goto J, Murata T, Kitamori S, Yamazaki Y, Satoh A, et al. Changes in saliva interleukin-6 levels in patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. 2010;110: 330–336. doi:10.1016/j.tripleo.2010.03.040
366. Katakura A, Kamiyama I, Takano N, Shibahara T, Muramatsu T, Ishihara K, et al. Comparison of salivary cytokine levels in oral cancer patients and healthy subjects. Bull Tokyo Dent Coll. 2007;48: 199–203. doi:10.2209/tdcpublication.48.199
367. SahebJamee M, Eslami M, AtarbashiMoghadam F, Sarafnejad A. Salivary

concentration of TNFalpha, IL1 alpha, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008;13: E292-5.

368. JINNO T, KAWANO S, MARUSE Y, MATSUBARA R, GOTO Y, SAKAMOTO T, et al. Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2015;33: 2161–2168. doi:10.3892/or.2015.3838
369. Huang J-S, Yao C-J, Chuang S-E, Yeh C-T, Lee L-M, Chen R-M, et al. Honokiol inhibits sphere formation and xenograft growth of oral cancer side population cells accompanied with JAK/STAT signaling pathway suppression and apoptosis induction. BMC Cancer. 2016;16: 245. doi:10.1186/s12885-016-2265-6
370. Skrinjar I, Brailo V, Vidovic-Juras D, Vucicevic-Boras V, Milenovic A. Evaluation of pretreatment serum interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha as a potential biomarker for recurrence in patients with oral squamous cell carcinoma. Med Oral Patol Oral y Cir Bucal. 2015; e402–e407. doi:10.4317/medoral.20373
371. Piva MR, De Souza LB, Martins-Filho PRS, Nonaka CFW, De Santana Santos T, De Souza Andrade ES, et al. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF-α, TGF-β and NF-κB expression. Oncol Lett. 2013;5: 1909–1914. doi:10.3892/ol.2013.1302
372. Arduino PG, Menegatti E, Cappello N, Martina E, Gardino N, Tanteri C, et al. Possible role for interleukins as biomarkers for mortality and recurrence in oral cancer. Int J Biol Markers. 2015;30: 262–266. doi:10.5301/jbm.5000142
373. Lisa Cheng Y-S, Jordan L, Gorugantula LM, Schneiderman E, Chen H-S, Rees T. Salivary interleukin-6 and -8 in patients with oral cancer and patients with chronic oral inflammatory diseases. J Periodontol. 2014;85: 956–965. doi:10.1902/jop.2013.130320
374. Fujita Y, Okamoto M, Goda H, Tano T, Nakashiro K, Sugita A, et al. Prognostic Significance of Interleukin-8 and CD163-Positive Cell-Infiltration in Tumor Tissues in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. Franco R, editor. PLoS One. 2014;9: e110378. doi:10.1371/journal.pone.0110378
375. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF-κB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. Cancer Detect Prev. 2005;29: 42–45. doi:10.1016/j.cdp.2004.10.003
376. Korostoff A, Reder L, Masood R, Sinha UK. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. Oral Oncol. 2011;47: 282–287.

doi:10.1016/j.oraloncology.2011.02.006

377. Gorugantula LM, Rees T, Plemons J, Chen H-S, Cheng Y-SL. Salivary basic fibroblast growth factor in patients with oral squamous cell carcinoma or oral lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012;114: 215–222. doi:10.1016/j.oooo.2012.03.013
378. Pickering V, Jordan RCK, Schmidt BL. Elevated salivary endothelin levels in oral cancer patients—A pilot study. Oral Oncol. 2007;43: 37–41. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.12.027
379. Cheng Y-SL, Rees T, Jordan L, Oxford L, O'Brien J, Chen H-S, et al. Salivary endothelin-1 potential for detecting oral cancer in patients with oral lichen planus or oral cancer in remission. Oral Oncol. 2011;47: 1122–6. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.07.032
380. Franzmann EJ, Reategui EP, Pedroso F, Pernas FG, Karakullukcu BM, Carraway KL, et al. Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16: 1348–55. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0011
381. de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen X-B, Kooren JA, et al. Quantitative Proteomics Reveals Myosin and Actin as Promising Saliva Biomarkers for Distinguishing Pre-Malignant and Malignant Oral Lesions. Bernhard EJ, editor. PLoS One. 2010;5: e11148. doi:10.1371/journal.pone.0011148
382. Kawahara R, Bollinger JG, Rivera C, Ribeiro ACP, Brandão TB, Paes Leme AF, et al. A targeted proteomic strategy for the measurement of oral cancer candidate biomarkers in human saliva. Proteomics. 2016;16: 159–73. doi:10.1002/pmic.201500224
383. Warnakulasuriya S, Soussi T, Maher R, Johnson N, Tavassoli M. Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. J Pathol. 2000;192: 52–57. doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH669>3.0.CO;2-C
384. Vucicević Boras V, Cikes N, Lukać J, Virag M, Cekić-Arambasin A. Salivary and serum interleukin 6 and basic fibroblast growth factor levels in patients with oral squamous cell carcinoma. Minerva Stomatol. 2005;54: 569–73.
385. Van Raemdonck G, Zegels G, Coen E, Vuylsteke B, Jennes W, Van Ostade X. Increased Serpin A5 levels in the cervicovaginal fluid of HIV-1 exposed seronegatives suggest that a subtle balance between serine proteases and their inhibitors may

determine susceptibility to HIV-1 infection. Virology. 2014;458–459: 11–21. doi:10.1016/j.virol.2014.04.015

386. Shetty SR, Chadha R, Babu S, Kumari S, Bhat S, Achalli S. Salivary lactate dehydrogenase levels in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: a biochemical and clinicopathological study. J Cancer Res Ther. 2012;8 Suppl 1: S123-5. doi:10.4103/0973-1482.92226
387. Punyani SR, Sathawane RS. Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. Clin Oral Investig. 2013;17: 517–524. doi:10.1007/s00784-012-0723-3
388. Nagler R, Bahar G, Shpitzer T, Feinmesser R. Concomitant analysis of salivary tumor markers--a new diagnostic tool for oral cancer. Clin Cancer Res. 2006;12: 3979–3984. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2412
389. Shpitzer T, Bahar G, Feinmesser R, Nagler RM. A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. J Cancer Res Clin Oncol. 2007;133: 613–617. doi:10.1007/s00432-007-0207-z
390. Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, Feinmesser R, Savulescu D, Borovoi I, et al. Salivary analysis of oral cancer biomarkers. Br J Cancer. 2009;101: 1194–1198. doi:10.1038/sj.bjc.6605290
391. Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J, Ueno T, Mishima K, Takagi S, et al. Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. Anticancer Res. 18: 4645–9.
392. Jou Y-J, Hua C-H, Lin C-D, Lai C-H, Huang S-H, Tsai M-H, et al. S100A8 as potential salivary biomarker of oral squamous cell carcinoma using nanoLC–MS/MS. Clin Chim Acta. 2014;436: 121–129. doi:10.1016/j.cca.2014.05.009
393. He H, Chen G, Zhou L, Liu Y. A joint detection of CEA and CA-50 levels in saliva and serum of patients with tumors in oral region and salivary gland. J Cancer Res Clin Oncol. 2009;135: 1315–1321. doi:10.1007/s00432-009-0572-x
394. Contucci A, Inzitari R, Agostino S, Vitali A, Fiorita A, Cabras T, et al. Statherin levels in saliva of patients with precancerous and cancerous lesions of the oral cavity: a preliminary report. Oral Dis. 2005;11: 95–99. doi:10.1111/j.1601-0825.2004.01057.x
395. Mascitti M SA. Detection Level of Salivary Survivin in Patients with OSCC. J Carcinog Mutagen. 2013;2013. doi:10.4172/2157-2518.S5-004
396. Chen Y-C, Li T-Y, Tsai M-F. Analysis of the saliva from patients with oral cancer by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid

Commun Mass Spectrom. 2002;16: 364–369. doi:10.1002/rcm.588

397. Jou Y-J, Lin C-D, Lai C-H, Chen C-H, Kao J-Y, Chen S-Y, et al. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. Anal Chim Acta. 2010;681: 41–48. doi:10.1016/j.aca.2010.09.030
398. Jou Y-J, Lin C-D, Lai C-H, Tang C-H, Huang S-H, Tsai M-H, et al. Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages. Clin Chim Acta. 2011;412: 1357–1365. doi:10.1016/j.cca.2011.04.004
399. Leanderson T, Liberg D, Ivars F. S100A9 as a Pharmacological Target Molecule in Inflammation and Cancer. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2015;15: 97–104. doi:10.2174/1871530315666150316123854
400. Leanderson T, Ivars F. S100A9 and tumor growth. Oncoimmunology. 2012;1: 1404–1405. doi:10.4161/onci.21027
401. Kawai H, Minamiya Y, Takahashi N. Prognostic impact of S100A9 overexpression in non-small cell lung cancer. Tumor Biol. 2011;32: 641–646. doi:10.1007/s13277-011-0163-8
402. Shabani F, Farasat A, Mahdavi M, Gheibi N. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. Inflamm Res. 2018;67: 801–812. doi:10.1007/s00011-018-1173-4
403. Markowitz J, Carson WE. Review of S100A9 biology and its role in cancer. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. 2013;1835: 100–109. doi:10.1016/j.bbcan.2012.10.003
404. Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, et al. Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. J Lab Clin Med. 2003;142: 46–51. doi:10.1016/S0022-2143(03)00068-4
405. Noike T, Miwa S, Soeda J, Kobayashi A, Miyagawa S. Increased expression of thioredoxin-1, vascular endothelial growth factor, and redox factor-1 is associated with poor prognosis in patients with liver metastasis from colorectal cancer. Hum Pathol. 2008;39: 201–208. doi:10.1016/j.humpath.2007.04.024
406. Grogan TM, Fenoglio-Prieser C, Zeheb R, Bellamy W, Frutiger Y, Vela E, et al. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. Hum Pathol. 2000;31: 475–481. doi:10.1053/hp.2000.6546
407. Zhang J, Li X, Han X, Liu R, Fang J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer

Therapy. Trends Pharmacol Sci. 2017;38: 794–808. doi:10.1016/j.tips.2017.06.001

408. Marton IJ, Horvath J, Labiscsak P, Markus B, Dezso B, Szabo A, et al. Salivary IL-6 mRNA is a Robust Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma. J Clin Med. 2019;8. doi:10.3390/jcm8111958
409. Yu Y, Prassas I, Muytjens CMJ, Diamandis EP. Proteomic and peptidomic analysis of human sweat with emphasis on proteolysis. J Proteomics. 2017;155: 40–48. doi:10.1016/j.jprot.2017.01.005
410. Wu C-X, Liu Z-F. Proteomic Profiling of Sweat Exosome Suggests its Involvement in Skin Immunity. J Invest Dermatol. 2018;138: 89–97. doi:10.1016/j.jid.2017.05.040
411. Baker LB. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. Temperature. 2019;6: 211–259. doi:10.1080/23328940.2019.1632145
412. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics. 1959;23: 545–549.
413. Heikenfeld J, Jajack A, Feldman B, Granger SW, Gaitonde S, Begtrup G, et al. Accessing analytes in biofluids for peripheral biochemical monitoring. Nat Biotechnol. 2019;37: 407–419. doi:10.1038/s41587-019-0040-3
414. Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Chieosilapatham P, Ogawa H. Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. Exp Dermatol. 2017;26: 989–998. doi:10.1111/exd.13314
415. Pavel AB, Zhou L, Diaz A, Ungar B, Dan J, He H, et al. The proteomic skin profile of moderate-to-severe atopic dermatitis patients shows an inflammatory signature. J Am Acad Dermatol. 2020;82: 690–699. doi:10.1016/j.jaad.2019.10.039
416. Raiszadeh MM, Ross MM, Russo PS, Schaepper MA, Zhou W, Deng J, et al. Proteomic analysis of eccrine sweat: implications for the discovery of schizophrenia biomarker proteins. J Proteome Res. 2012;11: 2127–2139. doi:10.1021/pr2007957
417. Schittek B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. J Innate Immun. 2012;4: 349–360. doi:10.1159/000336844
418. Nistor A, Bowden G, Blanchard A, Myal Y. Influence of mouse prolactin-inducible protein in saliva on the aggregation of oral bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2009;24: 510–513. doi:10.1111/j.1399-302X.2009.00543.x
419. Lee B, Bowden GHW, Myal Y. Identification of mouse submaxillary gland protein in mouse saliva and its binding to mouse oral bacteria. Arch Oral Biol. 2002;47: 327–

332. doi:10.1016/s0003-9969(01)00113-3

420. Hassan MI, Waheed A, Yadav S, Singh TP, Ahmad F. Prolactin inducible protein in cancer, fertility and immunoregulation: structure, function and its clinical implications. Cell Mol Life Sci. 2009;66: 447–459. doi:10.1007/s00018-008-8463-x
421. Gangadharan A, Nyirenda T, Patel K, Jaimes-Delgadillo N, Coletta D, Tanaka T, et al. Prolactin Induced Protein (PIP) is a potential biomarker for early stage and malignant breast cancer. The Breast. 2018;39: 101–109. doi:10.1016/J.BREAST.2018.03.015
422. Nakayashiki N. Sweat protein components tested by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting. Tohoku J Exp Med. 1990;161: 25–31. doi:10.1620/tjem.161.25
423. Gum ET, Swanson RA, Alano C, Liu J, Hong S, Weinstein PR, et al. Human serum albumin and its N-terminal tetrapeptide (DAHK) block oxidant-induced neuronal death. Stroke. 2004;35: 590–595. doi:10.1161/01.STR.0000110790.05859.DA
424. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. FEBS Lett. 2008;582: 1783–1787. doi:10.1016/j.febslet.2008.04.057
425. Bajo-Graneras R, Sanchez D, Gutierrez G, Gonzalez C, Do Carmo S, Rassart E, et al. Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum. J Neurochem. 2011;117: 949–960. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07266.x
426. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. Aging Cell. 2008;7: 506–515. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00395.x
427. Kawata K, Hatano A, Yugi K, Kubota H, Sano T, Fujii M, et al. Trans-omic Analysis Reveals Selective Responses to Induced and Basal Insulin across Signaling, Transcriptional, and Metabolic Networks. iScience. 2018; 1–18. doi:10.1016/J.ISCI.2018.07.022
428. Köberlin MS, Snijder B, Heinz LX, Baumann CL, Fauster A, Vladimer GI, et al. A Conserved Circular Network of Coregulated Lipids Modulates Innate Immune Responses. Cell. 2015;162: 170–183. doi:10.1016/j.cell.2015.05.051
429. Oldham MC, Konopka G, Iwamoto K, Langfelder P, Horvath S, Geschwind DH. Functional organization of the transcriptome in human brain. 2009;11: 1271–1282. doi:10.1038/nn.2207.Functional
430. Konopka G, Friedrich T, Davis-Turak J, Winden K, Oldham MC, Gao F, et al. Human-specific transcriptional networks in the brain. Neuron. 2012;75: 601–617.

doi:10.1016/j.neuron.2012.05.034

431. Ferguson SW, Wang J, Lee CJ, Liu M, Neelamegham S, Canty JM, et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. Sci Rep. 2018;8: 1419. doi:10.1038/s41598-018-19581-x
432. Szilagyi A, Nussinov R, Csermely P. Allo-network drugs: extension of the allosteric drug concept to protein- protein interaction and signaling networks. Curr Top Med Chem. 2013;13: 64–77.
433. Celaj A, Schlecht U, Smith JD, Xu W, Suresh S, Miranda M, et al. Quantitative analysis of protein interaction network dynamics in yeast. Mol Syst Biol. 2017;13: 934. doi:10.15252/msb.20177532
434. Sardiu ME, Cai Y, Jin J, Swanson SK, Conaway RC, Conaway JW, et al. Probabilistic assembly of human protein interaction networks from label-free quantitative proteomics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105: 1454–1459. doi:10.1073/pnas.0706983105
435. Boccaletti S, Latora V, Moreno Y, Chavez M, Hwang D-U. Complex networks: Structure and dynamics. Phys Rep. 2006;424: 175–308. doi:https://doi.org/10.1016/j.physrep.2005.10.009
436. Kirchhoff F. HIV Life Cycle: Overview. In: Hope TJ, Stevenson M, Richman D, editors. Encyclopedia of AIDS. New York, NY: Springer New York; 2021. pp. 1–9. doi:10.1007/978-1-4614-9610-6_60-1
437. Lehmann-Che J, Saib A. Early stages of HIV replication: how to hijack cellular functions for a successful infection. AIDS Rev. 2004;6: 199–207.
438. Mohammadi P, Desfarges S, Bartha I, Joos B, Zangger N, Munoz M, et al. 24 hours in the life of HIV-1 in a T cell line. PLoS Pathog. 2013;9: e1003161. doi:10.1371/journal.ppat.1003161
439. Zhou H, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XD, Castle JC, et al. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. Cell Host Microbe. 2008;4: 495–504. doi:10.1016/j.chom.2008.10.004
440. Arhel N, Kirchhoff F. Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets. Biochim Biophys Acta. 2010;1802: 313–321. doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.003
441. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. Science. 2008;319: 921–926. doi:10.1126/science.1152725

442. Konig R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GMC, Irelan JT, et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. Cell. 2008;135: 49–60. doi:10.1016/j.cell.2008.07.032
443. MacPherson JI, Dickerson JE, Pinney JW, Robertson DL. Patterns of HIV-1 protein interaction identify perturbed host-cellular subsystems. PLoS Comput Biol. 2010;6: 2. doi:10.1371/journal.pcbi.1000863
444. Bushman FD, Malani N, Fernandes J, D'Orso I, Cagney G, Diamond TL, et al. Host cell factors in HIV replication: Meta-analysis of genome-wide studies. PLoS Pathog. 2009;5. doi:10.1371/journal.ppat.1000437
445. Nemeth J, Vongrad V, Metzner KJ, Strouvelle VP, Weber R, Pedrioli P, et al. In Vivo and in Vitro Proteome Analysis of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1-infected, Human CD4(+) T Cells. Mol Cell Proteomics. 2017;16: S108–S123. doi:10.1074/mcp.M116.065235
446. Goff SP. Knockdown screens to knockout HIV-1. Cell. 2008;135: 417–420. doi:10.1016/j.cell.2008.10.007
447. Yeung ML, Houzet L, Yedavalli VSRK, Jeang K-T. A genome-wide short hairpin RNA screening of jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. J Biol Chem. 2009;284: 19463–19473. doi:10.1074/jbc.M109.010033
448. Garcia-Moreno M, Noerenberg M, Ni S, Jarvelin AI, Gonzalez-Almela E, Lenz CE, et al. System-wide Profiling of RNA-Binding Proteins Uncovers Key Regulators of Virus Infection. Mol Cell. 2019;74: 196-211.e11. doi:10.1016/j.molcel.2019.01.017
449. Lum JJ, Badley AD. Resistance to apoptosis: mechanism for the development of HIV reservoirs. Curr HIV Res. 2003;1: 261–274. doi:10.2174/1570162033485203
450. Antoni BA, Sabbatini P, Rabson AB, White E. Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection. J Virol. 1995;69: 2384–2392.
451. Badley AD, Sainski A, Wightman F, Lewin SR. Altering cell death pathways as an approach to cure HIV infection. Cell Death Dis. 2013;4: e718. doi:10.1038/cddis.2013.248
452. Chang ST, Sova P, Peng X, Weiss J, Law GL, Palermo RE, et al. Next-generation sequencing reveals HIV-1-mediated suppression of T cell activation and RNA processing and regulation of noncoding RNA expression in a CD4+ T cell line. MBio. 2011;2. doi:10.1128/mBio.00134-11
453. Kleinman CL, Doria M, Orecchini E, Giuliani E, Galardi S, De Jay N, et al. HIV-1

infection causes a down-regulation of genes involved in ribosome biogenesis. PLoS One. 2014;9: e113908. doi:10.1371/journal.pone.0113908

454. Rato S, Rausell A, Munoz M, Telenti A, Ciuffi A. Single-cell analysis identifies cellular markers of the HIV permissive cell. PLoS Pathog. 2017;13: e1006678. doi:10.1371/journal.ppat.1006678

455. Rao S, Amorim R, Niu M, Breton Y, Tremblay MJ, Mouland AJ. Host mRNA decay proteins influence HIV-1 replication and viral gene expression in primary monocyte-derived macrophages. Retrovirology. 2019;16: 3. doi:10.1186/s12977-019-0465-2

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kifejezetten szerencsésnek érzem magam, mert kiváló emberekkel, nagy szakértelmű kutatókkal és oktatókkal kerültem kapcsolatba kutatómunkám során. Szaktudásukkal, világnézetükkel, feladatvállalásukkal és hozzáállásukkal meghatározták szemléletemet, egész kutatói pályafutásomat. Sokat tanultam tőlük, ezért szeretnék ezúton is köszönetet mondani Nekik!

Köszönöm tanáraimnak a kolozsvári Babes-Bolyai Tudományegyetemen - külön kiemelve Dr. Kósa Ferencet, Dr. Tótfalusi Veress Évát és Dr. Ioan Popescut -, hogy elindítottak kutatói pályámon! Köszönetet szeretnék mondani Fésüs László akadémikus úrnak, PhD témavezetőmnek, aki mindvégig támogatott debreceni tanulmányaim során! Megtiszteltetés számomra vele dolgozni.

Külön köszönetet mondok Dr. Szabó Pálnak, aki nélkül biztosan nem készülhetett volna el ez a dolgozat! Ő volt az, aki végtelen türelemmel, humorral és óriási szakértelemmel segített elindulni a tömegspektrometriás analízisek útján. Hasonlóképpen hálás vagyok Dr. Medzihradszki Katalinnak és kutatócsoportjának, Dr. Darula Zsuzsannának, Dr. Hunyadi-Gulyás Évának és Dr. Klement Évának, akik bevezettek a proteomika és a szolgáltató laboratóriumi analízisek világába.

Köszönöm Tőzsér József professzor úrnak a lankadatlan támogatást, bátorítást és a bizalmat! Nagyon sokat tanultam és folyamatosan tanulok tőle. Szerencsésnek érzem magam, hogy a vezetésével dolgozhatok.

Hálás vagyok, hogy olyan kiváló mentorokkal kerültem kapcsolatba, mint Márton Ildikó, Kiss Csongor, Rajnavölgyi Éva, Balla József és Balla György professzorok, akiktől igazán sokat tanulhattam szakmailag és emberileg egyaránt. Kiemelten köszönöm Dombrádi Viktor és Prókai László professzoroknak szakmai segítségüket és, azt is, hogy tanácsaikkal, észrevételeikkel segítettek jobbá tenni a dolgozatot. Köszönöm Pongor Ildikónak a nyelvi korrektúrát!

Külön köszönet illeti Dr. Csutak Adrienne-t, akivel együtt kezdtem el a könnyproteomikai munkákat. Köszönöm, hogy kutatóként és barátként szívvel-lélekkel mindig segített! Általa rengeteg információval lettem gazdagabb.

Köszönöm Dr. Emri Gabriellának a sok segítséget és Dr. Emri Miklósnak a tisztázó és megvilágosító beszélgetéseket, valamint az adatok elemzésében nyújtott segítséget!

Köszönöm tanítványaimnak és kollégáimnak, hogy társaim voltak a kutatómunka során, kérdéseikkel, észrevételeikkel és jelenlétükkel segítettek!

Köszönöm családomnak a végtelen sok türelmet, és bátorítást! Köszönöm, hogy kitartottak mellettem. Egy ilyen munka közös vállalkozás, még akkor is, ha ez nem mindig nyilvánvaló. Az ő támogatásuk és türelmük nélkül nem juthattam volna el idáig.

Köszönettel tartozom a Debreceni Egyetemnek, hogy befogadott, lehetőséget és teret biztosított a kutatásaimhoz.

Hálás vagyok, hogy sok olyan kutatóval kerültem kapcsolatba, akik jelenlétükkel, gondolataikkal, problémamegoldásukkal példaként álltak/állnak előttem. Sajnos e dolgozat terjedelme nem biztosít lehetőséget mindannyiuk nevének felsorolására. A kutatómunkám során kapott rengeteg támogatást és segítséget nem tudom mindenkinek viszonozni, de remélem, hogy a tanulmányaim és kutatásaim során kapott útmutatásokat a sajátjaimmal együtt, jól kamatoztatott tallérok gyanánt, továbbadhatom tanulni vágyó hallgatóknak és munkatársaknak.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

1. **Csősz É**, Tóth F, Mahdi M, Tsaprailis G, Emri M, Tőzsér J. Analysis of networks of host proteins in the early time points following HIV transduction. BMC Bioinformatics. 2019; 20:398. doi: 10.1186/s12859-019-2990-3.
2. **Csősz É**, Deák E, Tóth N, Traverso CE, Csutak A, Tőzsér J. Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications. FEBS Open Bio. 2019;9:1020-1028. doi: 10.1002/2211-5463.12637.
3. **Csősz É**, Tóth N, Deák E, Csutak A, Tőzsér J. Wound-Healing Markers Revealed by Proximity Extension Assay in Tears of Patients following Glaucoma Surgery. Int J Mol Sci. 2018;19. pii: E4096. doi: 10.3390/ijms19124096.
4. **Csősz É¶,** Márkus B¶, Darula Z, Medzihradszky KF, Nemes J, Szabó E, Tőzsér J, Kiss C, Márton I. Salivary proteome profiling of oral squamous cell carcinoma in a Hungarian population. FEBS Open Bio. 2018;8:556-569. doi: 10.1002/2211-5463.12391.
5. Márkus B, Szabó K, Pfliegler WP, Petrényi K, Boros E, Pócsi I, Tőzsér J, **Csősz É§**, Dombrádi V§. Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from Candida albicans. PLoS One. 2017;12:e0183176. doi: 10.1371/journal.pone.0183176.
6. Márkus B, Pató Z, Sarang Z, Albert R, Tőzsér J, Petrovski G§, **Csősz É§**. The proteomic profile of a mouse model of proliferative vitreoretinopathy. FEBS Open Bio. 2017 ;7:1166-1177. doi: 10.1002/2211-5463.12252.
7. **Csősz É¶**, Lábiscsák P¶, Kalló G, Márkus B, Emri M, Szabó A, Tar I, Tőzsér J, Kiss C, Márton I. Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers. PLoS One. 2017;12:e0177282. doi: 10.1371/journal.pone.0177282.
8. **Csősz É**, Kalló G, Márkus B, Deák E, Csutak A, Tőzsér J. Quantitative body fluid proteomics in medicine - A focus on minimal invasiveness. J Proteomics. 2017;153:30-43. doi: 10.1016/j.jprot.2016.08.009.
9. Kalló G, Emri M, Varga Z, Ujhelyi B, Tőzsér J, Csutak A, **Csősz É**. Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers. PLoS One. 2016;11:e0158000. doi: 10.1371/journal.pone.0158000.

10. Kalló G, Chatterjee A, Tóth M, Rajnavölgyi É, Csutak A, Tőzsér J, **Csősz É**. Relative quantification of human β-defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring. Rapid Commun Mass Spectrom. 2015 ;29:1623-31. doi: 10.1002/rcm.7259.
11. **Csősz É**, Emri G, Kalló G, Tsaprailis G, Tőzsér J. Highly abundant defense proteins in human sweat as revealed by targeted proteomics and label-free quantification mass spectrometry. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015;29:2024-31. doi: 10.1111/jdv.13221.

[¶]Megosztott első szerzők

[§]Megosztott utolsó szerzők

FÜGGELÉK

Függelék 1. táblázat. A könnyfehérék vizsgálatára kifejlesztett célzott proteomikai módszer módszerfejlesztése során optimalizált, és az analízisek során használt paraméterek

A táblázat a fehérjék nevét, a kiválasztott proteotipikus peptideket, az MRM/SRM átmenetet jelentő Q1 m/z ill. Q3 m/z értékeket, a kiválasztott fragmens iont, az ún. „dwell time", DP („declustering" potenciál) és ütközési energia értékeket tartalmazza. A * a stabil izotóppal jelölt aminosavat jelöli.

Fehérje	Peptid	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Frag-mens ion	Dwell time (msec)	DP (eV)	Ütközési energia (eV)
Lipokalin-1 (LCN1)	VTMLISGR	438,7	676,4	y6	20	63,1	20,7
			432,2	y4	20	63,1	20,7
	VTMLISGR*	443,7	686,4	y6	20	63,1	20,7
			442,2	y4	20	63,1	20,7
	HVAYIIR	436,3	564,3	y4	20	62,9	20,6
			175,1	y1	20	62,9	20,6
	HVAYIIR*	441,3	574,3	y4	20	62,9	20,6
			185,1	y1	20	62,9	20,6
	GLSTESILIPR	593,3	498,3	y4	20	74,4	29,6
			272,1	y2	20	74,4	29,6
	GLSTESILIPR*	598,3	508,3	y4	20	74,4	29,6
			282,2	y2	20	74,4	29,6
Lakto-transzferrin (LTF)	**C**GLVPVLAENYK	681,8	737,4	y6	20	80,8	34,6
			553,3	y4	20	80,8	34,6
	CGLVPVLAENYK*	685,8	745,4	y6	20	80,8	34,6
			632,3	y5	20	80,8	34,6
	CLAENAGDVAFVK	697,3	920,5	y9	20	82,0	35,5
			735,4	y7	20	82,0	35,5
	CLAENAGDVAFVK*	701,3	928,5	y9	20	82,0	35,5
			743,4	y7	20	82,0	35,5
Lakritin (LACRT)	QELNPLK	421,2	584,4	y5	20	61,8	19,7
			357,2	y3	20	61,8	19,7
	QELNPLK*	425,2	592,4	y5	20	61,8	19,7
			365,3	y3	20	61,8	19,7
	SILLTEQALAK	593,8	873,5	y8	20	74,4	29,6
			760,4	y7	20	74,4	29,6
	SILLTEQALAK*	597,9	881,5	y8	20	74,4	29,6
			768,4	y7	20	74,4	29,6
Lizozim-C (LYZ)	GISLANWM**C**LAK	682,3	993,5	y8	20	80,9	34,6
			922,4	y7	20	80,9	34,6
	GISLANWM**C**LAK*	686,3	1001,5	y8	20	80,9	34,6
			930,4	y7	20	80,9	34,6
	WESGYNTR	506,7	826,4	y7	20	68,1	24,6
			697,3	y6	20	68,1	24,6

	WESGYNTR*	511,7	836,4	y7	20	68,1	24,6
			707,3	y6	20	68,1	24,6
Lipofilin A (LPNA)	QIFGDYK	435,7	629,3	y5	20	62,9	20,6
			310,2	y2	20	62,9	20,6
	QIFGDYK*	439,7	637,3	y5	20	62,9	20,6
			318,2	y2	20	62,9	20,6
Ig λ-lánc (IGLC)	SYS**C**QVTHEGSTVEK	856,4	987,5	y9	20	93,5	44,5
			276,1	y2	20	93,5	44,5
	SYS**C**QVTHEGSTVEK*	860,4	995,5	y9	20	93,5	44,5
			284,2	y2	20	93,5	44,5
Prolaktin indukált fehérje (PIP)	YTA**C**L**C**DDNPK	678,8	1092,4	y9	20	80,6	34,4
			748,3	y6	20	80,6	34,4
	YTA**C**L**C**DDNPK*	682,8	1100,4	y9	20	80,6	34,4
			756,3	y6	20	80,6	34,4
	TVQIAAVVDVIR	642,4	842,5	y8	20	77,9	32,4
			771,5	y7	20	77,9	32,4
	TVQIAAVVDVIR*	647,4	852,5	y8	20	77,9	32,4
			781,5	y7	20	77,9	32,4
Zn α2 glikoprotein (AZGP1)	DYIEFNK	464,7	650,3	y5	20	65,0	22,2
			537,3	y4	20	65,0	22,2
	DYIEFNK*	468,7	658,4	y5	20	65,0	22,2
			545,3	y4	20	65,0	22,2
	IDVHWTR	463,7	599,3	y4	20	64,9	22,2
			462,2	y3	20	64,9	22,2
	IDVHWTR*	468,7	609,3	y4	20	64,9	22,2
			472,2	y3	20	64,9	22,2
Galektin 3-kötő fehérje (GAL3BP)	LADGGATNQGR	530,3	575,3	y5	20	69,8	26,0
			175,1	y1	20	69,8	26,0
	LADGGATNQGR*	535,3	585,3	y5	20	69,8	26,0
			185,1	y1	20	69,8	26,0
	LASAYGAR	404,7	624,3	y6	20	60,6	18,8
			175,1	y1	20	60,6	18,8
	LASAYGAR	409,7	634,3	y6	20	60,6	18,8
			185,1	y1	20	60,6	18,8
Dermcidin (DCD)	ENAGEDPGLAR	564,8	628,3	y6	20	72,3	27,9
			513,3	y5	20	72,3	27,9
	ENAGEDPGLAR*	569,8	638,3	y6	20	72,3	27,9
			523,3	y5	20	72,3	27,9

Függelék 2. táblázat. A vizsgálatba bevont betegek klinikai adatai

Minden vizsgálatba bevont beteg esetében feltüntetésre került a zöldhályog típusa, a beteg kora, neme, a műtét előtt használt hatóanyagok száma, a könnytermelődés sebessége, a gyűjtött könny mennyisége és fehérje koncentrációja, a gyűjtött csarnokvíz mennyisége és koncentrációja, valamint a műtét után megjelenő komplikációk. ND – nincs adat, NA – nem alkalmazható, # - az eredmény csak egy mintából származik.

Mintakód	Preoperatív terápia (alkalmazott hatóanyagok száma)	Poszto-peratív kompli-káció	Nem	Minta típusa	Zöldhályog típusa	Életkor (év)	Könny-termelés sebessége (µl/min)	Gyűjtött könny/ csarnokvíz térfogata (µl)	Könny/ csarnokvíz fehérje koncentrá-ciója (mg/ml)
G0150 OD	max. terápia	Van	Férfi	Könny	PACG	60	4,15	8,30	4,52
G0021 OS	2	Nincs	Nő	Könny	POAG	23	4,75	9,50	4,42
G0182 OS	max. terápia	Nincs	Nő	Könny	POAG	83	6,25	12,50	2,88
G0067 OS	2	ND	Férfi	Könny	POAG	46	5,00	10,00	6,40
G0188 OD	max. terápia	Van	Férfi	Könny	PACG	46	2,50	5,00	4,71
G0009 OD	max. terápia	Van	Férfi	Könny	POAG	73	3,25	6,50	1,68
G0176 OS	max. terápia	Nincs	Férfi	Könny	POAG	62	2,75	5,50	3,48
G0176 OD	max. terápia	Nincs	Férfi	Könny	POAG	62	6,00	9,00	2,29
G0100 OS	3	Nincs	Férfi	Könny	POAG	71	3,25	6,50	8,38
G0184 OD	max. terápia	Nincs	Nő	Könny	PACG	73	5,75	11,50	2,49
G0170 OS	max. terápia	Nincs	Férfi	Könny	POAG	67	2,75	5,50	9,29
G0187 OD	max. terápia	Nincs	Férfi	Könny	POAG	67	9,50	19,00	6,50
G0186 OD	3	Van	Nő	Könny	POAG	61	7,25	14,50	1,35
G0148 OS	max. terápia	Van	Férfi	Könny	PACG	70	3,50	7,00	6,89
G0107 OS #	0	Nincs	Nő	Könny	POAG	22	1,75	3,50	2,53
G0190 OD	max. terápia	Nincs	Nő	Könny	PACG	43	2,50	5,00	4,20
G0039 OS	max. terápia	Nincs	Férfi	Könny	PACG	67	4,75	9,50	3,38
G0041 OD #	max. terápia	Van	Férfi	Könny	PACG	59	2,60	3,70	4,48
G0093 OS	max. terápia	Nincs	Nő	Könny	POAG	64	2,50	5,00	3,29
G0002 OS	3	Van	Nő	Könny	PACG	64	1,50	4,50	5,20
G0150 OD	max. terápia	Van	Férfi	Csarnokvíz	PACG	60	NA	52	0,15
G0021 OS	2	Nincs	Nő	Csarnokvíz	POAG	23	NA	91	1,20
G0182 OS	max. terápia	Nincs	Nő	Csarnokvíz	POAG	83	NA	59	0,16
G0067 OS	2	ND	Férfi	Csarnokvíz	POAG	46	NA	58	1,82
G0009 OD	max. terápia	Van	Férfi	Csarnokvíz	PACG	46	NA	40	0,17
G0188 OD	max. terápia	Van	Férfi	Csarnokvíz	POAG	73	NA	12	1,77
G0176 OS	max. terápia	Nincs	Férfi	Csarnokvíz	POAG	62	NA	4	1,27
G0176 OD	max. terápia	Nincs	Férfi	Csarnokvíz	POAG	62	NA	36	0,17
G0100 OS	3	Nincs	Férfi	Csarnokvíz	POAG	71	NA	15	2,05
G0184 OD	max. terápia	Nincs	Nő	Csarnokvíz	PACG	73	NA	5	0,41
G0170 OS	max. terápia	Nincs	Férfi	Csarnokvíz	POAG	67	NA	19	0,55
G0187 OD	max. terápia	Nincs	Férfi	Csarnokvíz	POAG	67	NA	24	0,03
G0186 OD	3	Van	Nő	Csarnokvíz	POAG	61	NA	39	0,04
G0148 OS	max. terápia	Van	Férfi	Csarnokvíz	PACG	70	NA	13	3,05
G0107 OS	0	Nincs	Nő	Csarnokvíz	POAG	22	NA	36	0,48
G0190 OD	max. terápia	Nincs	Nő	Csarnokvíz	PACG	43	NA	17	1,21
G0039 OS	max. terápia	Nincs	Férfi	Csarnokvíz	PACG	67	NA	13	3,62
G0041 OD	max. terápia	Van	Férfi	Csarnokvíz	PACG	59	NA	136	0,15
G0093 OS	max. terápia	Nincs	Nő	Csarnokvíz	POAG	64	NA	25	3,78
G0002 OS	3	Van	Nő	Csarnokvíz	PACG	64	NA	90	2,70

Függelék 3. táblázat. A vizsgálatba bevont betegek klinikai adatai

Minden vizsgálatba bevont beteg esetében feltüntetésre került a beteg kora, neme, a zöldhályog típusa, a mintagyűjtés időpontja, a posztoperatív szemnyomás és a trabekulektómia utáni komplikáció jelenléte vagy hiánya. NA – nem alkalmazható.

Betegkód	Nem	Életkor (év)	Zöldhályog típusa	Időpont	Poszt-operatív szemnyomás (Hgmm)	Trabekulektómia utáni komplikáció
1	Férfi	73	PEX	0. nap	22	NA
				1. nap	26	Nincs
				2. nap	10	Nincs
				4. nap	10	Nincs
				1 hónap	14	Nincs
				3 hónap	12	Nincs
2	Nő	66	PACG	0. nap	32	NA
				1. nap	41	Van
				2. nap	37	Van
				4. nap	21	Van
				1 hónap	15	Van
				3 hónap	18	Van
3	Férfi	57	PACG	0. nap	44	NA
				1. nap	42	Nincs
				2. nap	37	Van
				4. nap	30	Van
				1 hónap	20	Van
				3 hónap	15	Van
4	Nő	64	PACG	0. nap	18	Nincs
				1. nap	17	Nincs
				2. nap	21	Nincs
				4. nap	18	Nincs
				1 hónap	15	Nincs
				3 hónap	7	Nincs
5	Nő	63	POAG	0. nap	22	NA
				1. nap	16	Nincs
				2. nap	12	Nincs
				4. nap	12	Nincs
				1 hónap	18	Nincs
				10 hónap	17	Nincs
6	Nő	22	PACG	0. nap	48	NA
				1. nap	6	Nincs
				2. nap	6	Nincs
				4. nap	5	Nincs
				1 hónap	17	Nincs
				3 hónap	13	Nincs
7	Nő	76	POAG	0. nap	20	NA
				1. nap	6	Nincs
				2. nap	6	Nincs
				4. nap	5	Nincs
				1 hónap	17	Nincs
				3 hónap	18	Nincs

8	Nő	49	POAG	0. nap	46	NA
				1. nap	16	Nincs
				2. nap	17	Nincs
				4. nap	13	Nincs
				1 hónap	28	Van
				3 hónap	20	Van

Függelék 4. táblázat. A vizsgálatba bevont betegek klinikai adatai

A vizsgált csoportok esetében feltüntettük a donorok számát, a donorok átlag életkorát, a férfi:nő arányt, a dohányzási és alkoholfogyasztási szokásokat. Ezen kívül a fogászati vizsgálat során megállapított gingiválisindexet (GI) és plakk indexeket (PI), valamint a DMFT (decay-missing filled teeth) ill. DMFS (decay-missing-filled surfeces) értékeket.

	Csoport	Be-vont donor szám	Életkor (év)	Férfi: Nő arány	Nem dohányos	Ex dohányos	Dohányos	Nem fogyaszt alkoholt	Naponta fogyaszt alkoholt	GI	PI	DMFT	DMFS
Teszt csoport	OSCC csoport (Bioplex)	22	62±8	18:4	5%	22%	68%	9%	37%	0,7	1,4	23,1	99,8
	Illesztett kontroll (Bioplex)	10	63.5±7	9:1	40%	10%	50%	20%	0%	0,3	0,4	19,7	81,6
	OSCC csoport (MRM/ SRM)	13	61±7	11:2	7.7%	23%	61.6%	8%	46%	0,9	1,6	23	67,5
	Illesztett kontroll (MRM/ SRM)	15	65±10	11:4	79%	21%	0%	27%	0%	0,5	0,3	18,9	79,9
	Fiatal kontroll (MRM/ SRM)	8	24±2	3:5	62.5%	12.5%	12.5%	0%	0%	0,5	0,2	7,5	17,5
Refe-rencia csoport	OSCC csoport (ELISA)	26	58±10	20:6	4%	23%	69%	15%	15%	0,7	1,3	26,9	121,6
	Illesztett kontroll (ELISA)	12	59± 6	3:9	41%	25%	17%	30%	0%	0,2	0,6	26	117,8
	Fiatal kontroll (ELISA)	7	24± 1	4:3	43%	14%	14%	0%	0%	0,3	0,3	8,3	18

Függelék 5. táblázat. A nyálfehérjék vizsgálatára kifejlesztett célzott proteomikai módszer módszerfejlesztése során optimalizált és az analízisek során használt paraméterek

A táblázat a fehérjék nevét, a kiválasztott proteotipikus peptideket, az MRM/SRM átmenetet jelentő Q1 m/z ill. Q3 m/z értékeket, a kiválasztott fragmens iont, az ún. „dwell time", DP („declustering" potenciál) és ütközési energia értékeket tartalmazza. A * a stabil izotóppal jelölt aminosavat jelöli.

Fehérje	Peptid	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Frag-mens ion	Dwell time (msec)	DP (eV)	Ütközési energia (eV)
Kataláz	LNVITVGPR	484.8	642.4	y6	20	63.0	23.4
		484.8	529.3	y5	20	63.0	23.4
		484.8	428.3	y4	20	63.0	23.4
	LNVITVGPR*	489.8	652.4	y6	20	63.0	23.4
		489.8	539.3	y5	20	84.8	23.4
		489.8	438.3	y4	20	84.8	23.4
CD44 antigén	NDVTGGR	359.7	489.3	y5	20	84.8	16.2
		359.7	390.2	y4	20	84.8	16.2
	NDVTGGR*	364.7	499.3	y5	20	84.8	16.2
		364.7	400.2	y4	20	84.8	16.2
	TEAADLCK	425.7	620.3	y6	20	63.1	20.0
		425.7	549.3	y5	20	63.1	20.0
		425.7	478.2	y4	20	63.1	20.0
	TEAADLCK*	429.7	628.3	y6	20	63.1	20.0
		429.7	557.3	y5	20	66.6	20.0
		429.7	486.2	y4	20	66.6	20.0
CD59 glikoprotein	AGLQVYNK	446.7	651.3	y5	20	66.6	21.2
		446.7	523.3	y4	20	66.6	21.2
	AGLQVYNK*	450.7	659.4	y5	20	66.6	21.2
		450.7	531.3	y4	20	66.6	21.2
Keratin-19	APSIHGGSGGR	498.2	627.3	y7	20	79.9	24.1
		498.2	490.2	y6	20	79.9	24.1
		498.2	433.2	y5	20	79.9	24.1
		498.2	376.2	y4	20	79.9	24.1
	APSIHGGSGGR*	503.2	637.3	y7	20	64.3	24.1
		503.2	500.2	y6	20	64.3	24.1
		503.2	443.2	y5	20	64.3	24.1
		503.2	386.2	y4	20	64.3	24.1
Profilin-1	TLVLLMGK	437.8	660.4	y6	20	60.6	20.7
		437.8	561.3	y5	20	60.6	20.7
		437.8	448.2	y4	20	60.6	20.7
	TLVLLMGK*	441.8	668.4	y6	20	60.6	20.7
		441.8	569.3	y5	20	63.0	20.7
		441.8	456.3	y4	20	63.0	20.7
	SSFYVNGLTLGGQK	735.9	887.5	y9	20	63.0	37.7
		735.9	773.4	y8	20	63.0	37.7
		735.9	603.3	y6	20	84.8	37.7

	SSFYVNGLTLGGQK*	739.9	895.5	y9	20	84.8	37.7
		739.9	781.5	y8	20	84.8	37.7
		739.9	611.4	y6	20	84.8	37.7
S100A9	DLQNFLK	439.2	649.4	y5	20	84.8	20.8
		439.2	521.3	y4	20	84.8	20.8
	DLQNFLK*	443.2	657.4	y5	20	63.1	20.8
		443.2	529.3	y4	20	63.1	20.8
	LTWASHEK	486.2	757.4	y6	20	63.1	23.5
		486.2	571.3	y5	20	63.1	23.5
		486.2	500.2	y4	20	66.6	23.5
	LTWASHEK*	490.2	765.4	y6	20	66.6	23.5
		490.2	579.3	y5	20	66.6	23.5
		490.2	508.3	y4	20	66.6	23.5
Tioredo-xin	TAFQEALDAAGDK	668.8	760.4	y8	20	66.6	33.9
		668.8	689.3	y7	20	66.6	33.9
	TAFQEALDAAGDK*	672.8	768.4	y8	20	79.9	33.9
		672.8	697.4	y7	20	79.9	33.9
	VGEFSGANK	454.7	623.3	y6	20	79.9	21.7
		454.7	476.2	y5	20	79.9	21.7
	VGEFSGANK*	458.7	631.3	y6	20	64.3	21.7
		458.7	484.3	y5	20	64.3	21.7
Galektin-3-kötő fehérje	LASAYGAR	404.7	624.3	y6	20	64.3	18.8
		404.7	466.2	y4	20	64.3	18.8
	LASAYGAR*	409.7	634.3	y6	20	60.6	18.8
		409.7	476.2	y4	20	60.6	18.8

Függelék 6. táblázat. A verejtékben azonosított fehérjék listája

A fehérje neve mellett a fehérje azonosító kódja, valamint a lokalizációja is feltüntetésre került. A félkövérrel kiemelt fehérjék az azonosítás időpontjában addig még verejtékben nem azonosított, új fehérjeként szerepeltek.

Fehérje neve	Fehérje kód (UniProt vagy IPI kód)	Lokalizáció
10 kDa fehérje	IPI:IPI00939521.1	ismeretlen
11 kDa fehérje	IPI:IPI00641244.1	ismeretlen
111 kDa fehérje	IPI:IPI00798140.1	ismeretlen
17 kDa fehérje	IPI:IPI00924795.1	ismeretlen
20 kDa fehérje	IPI:IPI00877930.1	ismeretlen
21 kDa fehérje	IPI:IPI00795527.1	ismeretlen
21 kDa fehérje	IPI:IPI00877807.1	ismeretlen
32 kDa fehérje	IPI:IPI00795257.3	ismeretlen
44 kDa fehérje	IPI:IPI00448925.6	ismeretlen
7 kDa fehérje	IPI:IPI00639910.1	ismeretlen
Alfa aktin 1, vázizom izoforma	Q5T8M8	sejten belül
Anti-RhD monoklonális T125 kappa könnyű lánc	Q5EFE6	szekretált
ATP szintáz béta alegység l	P06576	sejten belül
Dipeptidil peptidáz 1	P53634	sejten belül
Dipeptidil peptidáz 2	Q9UHL4	szekretált
DNS-kötő fehérje RFX5	P48382	sejten belül
ETS domén-tartalmú fehérje Elk-4	P28324	sejten belül
Feltételezett karboxipeptidáz PM20D1	Q6GTS8	szekretált
Foszfolipáz B-szerű 1	Q6P4A8	szekretált
Furin	P09958	sejten belül/ sejthártya
Gamma-glutamil transzpeptidáz 1	E7ERN9	sejten belül
Gamma-glutamil transzpeptidáz 3	A6NGU5	sejten belül
Glutamát receptor delta 2 alegység	O43424	sejthártya
GTPáz IMAP család fehérje 2	Q9UG22	sejthártya
Hipotetikus fehérje XP_002342414	IPI:IPI00792164.1	ismeretlen
Hipotetikus fehérje XP_002343025	IPI:IPI00936835.1	ismeretlen
Hiszton H4	P62805	sejten belül
Ig gamma-2 lánc C régió	P01859	szekretált
Ig gamma-3 lánc C régió	P01860	szekretált
Ig kappa lánc V-III régió GOL	P04206	szekretált
IGL@ fehérje	Q567P1	szekretált
JRK fehérje	Q86XJ5	szekretált
Kation független mannóz-6-foszfát receptor	P11717	sejten belül/ sejthártya
Keratin II citoszkeletális 6B	P04259	sejten belül
Kitináz-3-szerű fehérje 2	Q15782-5	szekretált
Komplement C4 gamma lánc	F5H2J9	szekretált
Konzervált hipotetikus fehérje	IPI:IPI00644497.4	ismeretlen
Limfocita antigén 6D	Q14210	szekretált

Melanotranszferrin	P08582	szekretált/ sejthártya
Miozin-reaktív immunoglobulin könnyű lánc variábilis régió	Q9UL77	szekretált
N-acetilglukózamin-6-szulfatáz	P15586	sejten belül
Neutrofil defenzin 1	P59665	szekretált
Neutrofil zselatináz-asszociált lipokalin	P80188	szekretált
Proaktivátor polipeptid-szerű 1	Q6NUJ1	szekretált
Prolin-gazdag fehérje 2	Q7Z5N0	szekretált
PSAP fehérje	Q5BJH1	sejten belül
RNS-kötő fehérje 4B	Q9BQ04	sejten belül
S100-A8 fehérje	P05109	szekretált
Szarkoplazmatikus/endoplazmatikus retikulum kalcium ATPáz 1	O14983	sejten belül/ sejthártya
Szerpin B3	P29508	sejten belül
Szerpin B8	P50452	sejten belül
Szerpin peptidáz inhibitor, B klád (Ovalbumin) 4, CRA_a izoforma	Q9BYF7	sejten belül
Transzformer-2 fehérje homológ alfa	Q13595	sejten belül
Trombocita eredetű növekedési faktor	P19971	szekretált
Tubulin alfa-3C/D lánc	Q13748	sejten belül

Függelék 7. táblázat. A GO funkciók listája, amelyek esetében a hálózati paraméterek statisztikailag szignifikáns módon változtak

Minden GO funkció esetében feltünettük a GO kódot, a funkció nevét, ahogy a GO adatbázisban szerepel, a statisztikailag szignifikás módon változó paramétert és a feltünetett paraméter változásának irányát a kontrollhoz képest a H04, ill. H12 hálózatok esetében.

GO kód	GO funkció	Statisztikailag szignifikáns mértékben változó hálózati paraméter	Változás iránya a H04 hálózatban
GO.0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	Df	csökkenés
GO.0000228	nuclear chromosome	Df	csökkenés
GO.0000375	RNA splicing, via transesterification reactions	Df	csökkenés
GO.0000398	mRNA splicing, via spliceosome	Df	csökkenés
GO.0000956	nuclear-transcribed mRNA catabolic process	Df	csökkenés
GO.0003735	structural constituent of ribosome	Df	csökkenés
GO.0005198	structural molecule activity	Df	csökkenés
GO.0005515	protein binding	Df	csökkenés
GO.0005524	ATP binding	Df, Dc	csökkenés
GO.0005622	intracellular	Df	csökkenés
GO.0005737	cytoplasm	Df	csökkenés
GO.0005739	mitochondrion	Df	csökkenés
GO.0005840	ribosome	Df	csökkenés
GO.0006351	transcription, DNA-templated	Df, Dc	csökkenés
GO.0006366	transcription from RNA polymerase II promoter	Df, Dc	csökkenés
GO.0006367	transcription initiation from RNA polymerase II promoter	Df	csökkenés
GO.0006396	termination of RNA polymerase II transcription	Df	csökkenés
GO.0006397	mRNA processing	Df	csökkenés
GO.0006401	RNA catabolic process	Df	csökkenés
GO.0006402	mRNA catabolic process	Df	csökkenés
GO.0006412	translation	Df	csökkenés
GO.0006413	translational initiation	Df, Dc	csökkenés
GO.0006414	translational elongation	Df, Dc	csökkenés
GO.0006415	translational termination	Df	csökkenés
GO.0006417	regulation of translation	Df, Dc	csökkenés
GO.0006518	peptide metabolic process	Df	csökkenés
GO.0006605	protein targeting	Df	csökkenés
GO.0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	Df	csökkenés
GO.0006732	coenzyme metabolic process	Df, Dc	csökkenés

GO.0006886	intracellular protein transport	Df	csökkenés
GO.0008104	protein localization	Rf	csökkenés
GO.0008152	metabolic process	Df	csökkenés
GO.0008380	RNA splicing	Df	csökkenés
GO.0009056	catabolic process	Df	csökkenés
GO.0009892	negative regulation of metabolic process	Df	csökkenés
GO.0009987	cellular process	Df	csökkenés
GO.0010468	regulation of gene expression	Df	csökkenés
GO.0010556	regulation of macromolecule biosynthetic process	Df	csökkenés
GO.0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	Df, Dc	csökkenés
GO.0010941	regulation of cell death	Df	csökkenés
GO.0015031	protein transport	Df	csökkenés
GO.0016032	viral process	Df	növekedés
GO.0016043	cellular component organization	Df	csökkenés
GO.0016070	RNA metabolic process	Df, Dc	csökkenés
GO.0016071	mRNA metabolic process	Df	csökkenés
GO.0016482	cytoplasmic transport	Df	csökkenés
GO.0016604	nuclear body	Df, Dc	csökkenés
GO.0017076	purine nucleotide binding	Df, Dc	csökkenés
GO.0018130	heterocycle biosynthetic process	Df, Dc	csökkenés
GO.0019058	viral life cycle	Df	csökkenés
GO.0019080	viral gene expression	Df	csökkenés
GO.0019083	viral transcription	Df	csökkenés
GO.0019222	regulation of metabolic process	Df	csökkenés
GO.0019438	aromatic compound biosynthetic process	Df, Dc	csökkenés
GO.0019538	aromatic compound biosynthetic process	Df	csökkenés
GO.0019899	enzyme binding	Df	csökkenés
GO.0019900	kinase binding	Df Dc	növekedés csökkenés
GO.0019901	protein kinase binding	Df	növekedés
GO.0022607	cellular component assembly	Df	csökkenés
GO.0022626	cytosolic ribosome	Df	csökkenés
GO.0030554	adenyl nucleotide binding	Df, Dc	csökkenés
GO.0031625	ubiquitin protein ligase binding	Df, Dc	csökkenés
GO.0031974	membrane-enclosed lumen	Df	csökkenés
GO.0032550	purine ribonucleoside binding	Df, Dc	csökkenés
GO.0032553	ribonucleotide binding	Df, Dc	csökkenés
GO.0032555	purine ribonucleotide binding	Df, Dc	csökkenés
GO.0032774	RNA biosynthetic process	Df, Dc	csökkenés
GO.0034248	regulation of cellular amide metabolic process	Df	csökkenés
GO.0034613	cellular protein localization	Rf	csökkenés
GO.0034622	cellular macromolecular complex assembly	Df	csökkenés
GO.0034645	cellular macromolecule biosynthetic process	Df	csökkenés
GO.0034654	nucleobase-containing compound	Df, Dc	csökkenés

	biosynthetic process		
GO.0034655	nucleobase-containing compound catabolic process	Df	csökkenés
GO.0035639	purine ribonucleoside triphosphate binding	Df, Dc	csökkenés
GO.0036094	small molecule binding	Df, Dc	csökkenés
GO.0042981	regulation of apoptotic process	Df	csökkenés
GO.0043065	positive regulation of apoptotic process	Df	csökkenés
GO.0043066	negative regulation of apoptotic process	Df, Dc	csökkenés
GO.0043226	organelle	Df	csökkenés
GO.0043227	membrane-bounded organelle	Df, Dc	csökkenés
GO.0043229	intracellular organelle	Df	csökkenés
GO.0043231	intracellular membrane-bounded organelle	Df	csökkenés
GO.0043233	organelle lumen	Df	csökkenés
GO.0044085	cellular component biogenesis	Df	csökkenés
GO.0044237	cellular metabolic process	Df	csökkenés
GO.0044238	primary metabolic process	Df	csökkenés
GO.0044248	cellular catabolic process	Df	csökkenés
GO.0044249	cellular biosynthetic process	Df	csökkenés
GO.0044260	cellular macromolecule metabolic process	Df	csökkenés
GO.0044265	cellular macromolecule catabolic process	Df	csökkenés
GO.0044267	cellular protein metabolic process	Df	csökkenés
GO.0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	Df, Dc	csökkenés
GO.0044391	ribosomal subunit	Df	csökkenés
GO.0044422	organelle part	Df	csökkenés
GO.0044424	intracellular part	Df	csökkenés
GO.0044444	cytoplasmic part	Df	csökkenés
GO.0044446	intracellular organelle part	Df	csökkenés
GO.0044451	nucleoplasm part	Df, Dc	csökkenés
GO.0044454	nuclear chromosome part	Df	csökkenés
GO.0044802	single-organism membrane organization	Df, Dc	csökkenés
GO.0045184	establishment of protein localization	Df	csökkenés
GO.0046907	intracellular transport	Df, Dc	csökkenés
GO.0051084	de novo posttranslational protein folding	Df	növekedés
GO.0051704	multi-organism process	Df Dc	növekedés csökkenés
GO.0060255	regulation of macromolecule metabolic process	Df	csökkenés
GO.0060548	negative regulation of cell death	Df, Dc	csökkenés
GO.0065003	macromolecular complex assembly	Df	csökkenés
GO.0070013	intracellular organelle lumen	Df	csökkenés
GO.0070972	protein localization to endoplasmic reticulum	Rf	csökkenés
GO.0071013	catalytic step 2 spliceosome	Df	csökkenés
GO.0071702	organic substance transport	Df, Dc	csökkenés
GO.0071704	organic substance metabolic process	Df	csökkenés
GO.0071705	nitrogen compound transport	Df, Dc	csökkenés

GO.0071822	protein complex subunit organization	Df	növekedés
GO.0071840	cellular component organization or biogenesis	Df	csökkenés
GO.0072594	establishment of protein localization to organelle	Df	csökkenés
GO.0080090	regulation of primary metabolic process	Df	csökkenés
GO.0080135	regulation of cellular response to stress	Df, Dc	csökkenés
GO.0090304	nucleic acid metabolic process	Df, Dc	csökkenés
GO.0097367	carbohydrate derivative binding	Df, Dc	csökkenés
GO.1901362	organic cyclic compound biosynthetic process	Df, Dc	csökkenés
GO.1901566	organonitrogen compound biosynthetic process	Df	csökkenés
GO.1901575	organic substance catabolic process	Df	csökkenés
GO.1901576	organic substance biosynthetic process	Df	csökkenés
GO.1902580	single-organism cellular localization	Df	csökkenés
GO kód	**GO funkció**	**Statisztikailag szignifikáns mértékben változó hálózati paraméter**	**Változás iránya a H12 hálózatban**
GO.0005759	mitochondrial matrix	Nf	csökkenés
GO.0003674	molecular function	Df, Dc	növekedés
GO.0003723	RNA binding	Rf, Rc	növekedés
GO.0005488	binding	Df, Dc	növekedés
GO.0005615	extracellular space	Rf, Rc	növekedés
GO.0005634	nucleus	Df, Dc	növekedés
GO.0005654	nucleoplasm	Df, Dc	növekedés
GO.0005739	mitochondrion	Df	növekedés
GO.0005743	mitochondrial inner membrane	Df, Dc	növekedés
GO.0005759	mitochondrial matrix	Df	növekedés
GO.0005856	cytoskeleton	Df, Dc	növekedés
GO.0006401	RNA catabolic process	Df, Dc	növekedés
GO.0006402	mRNA catabolic process	Df, Dc	növekedés
GO.0009058	biosynthetic process	Rf, Rc	csökkenés
GO.0009987	cellular process	Df, Dc	növekedés
GO.0010467	gene expression	Rf, Rc	növekedés
GO.0016032	viral process	Rf	növekedés
GO.0016604	nuclear body	Nf	csökkenés
GO.0017076	purine nucleotide binding	Df, Dc	növekedés
GO.0019058	viral life cycle	Df, Dc	növekedés
GO.0022607	cellular component assembly	Df	növekedés
GO.0030054	cell junction	Df	növekedés
GO.0031966	mitochondrial membrane	Df, Dc	növekedés
GO.0031981	nuclear lumen	Df, Dc	növekedés
GO.0043066	negative regulation of apoptotic process	Df	növekedés

GO.0043209	myelin sheath	Df	növekedés
GO.0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	Df	növekedés
GO.0043933	macromolecular complex subunit organization	Rf, Rc	növekedés
GO.0044237	cellular metabolic process	Df	növekedés
GO.0044265	mitochondrial nucleoid	Df, Dc	növekedés
GO.0044428	nuclear part	Df, Dc	növekedés
GO.0044430	cytoskeletal part	Df, Dc	növekedés
GO.0044451	nucleoplasm part	Nf	csökkenés
GO.0044712	single-organism catabolic process	Nf	csökkenés
GO.0044765	single-organism transport	Df, Dc	növekedés
GO.0044822	poly(A) RNA binding	Rf	növekedés
GO.0051084	de novo posttranslational protein folding	Rf, Rc	növekedés
GO.0051704	multi-organism process	Rf, Rc	növekedés
GO.0060548	negative regulation of cell death	Df	növekedés
GO.0071013	catalytic step 2 spliceosome	Df	növekedés
GO.0071705	nitrogen compound transport	Nf	csökkenés
GO.0071822	protein complex subunit organization	Rf	növekedés
GO.1901575	organic substance catabolic process	Df	növekedés

doi:1779.20

RESEARCH ARTICLE

Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*

Bernadett Márkus[1☯‡], Krisztina Szabó[2☯‡], Walter P. Pfliegler[3], Katalin Petrényi[2], Enikő Boros[3], István Pócsi[3], József Tőzsér[1], Éva Csősz[1‡*], Viktor Dombrádi[2‡*]

1 Proteomics Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, **2** Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, **3** Department of Biotechnology and Microbiology, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

☯ These authors contributed equally to this work.
‡ BM and KS authors are co-first authors on this work. EC and VD equally contributing co-last authors on this work.
* cseva@med.unideb.hu (EC); dombradi@med.unideb.hu (VD)

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Márkus B, Szabó K, Pfliegler WP, Petrényi K, Boros E, Pócsi I, et al. (2017) Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. PLoS ONE 12(8): e0183176. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183176

Editor: Thierry Rabilloud, Centre National de la Recherche Scientifique, FRANCE

Received: May 17, 2017

Accepted: July 31, 2017

Published: August 24, 2017

Copyright: © 2017 Márkus et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Our original data were uploaded to http://bmbi.med.unideb.hu/en/proteomics-core-facility and to https://figshare.com/articles/Proteomic_analysis_of_protein_phosphatase_Z1_from_Candida_albicans/5302957, where along with the gel images all the raw data can be accessed.

Funding: This work was supported by the National Research, Development and Innovation Office—NKFIH K108989 grant. The funders had no role in

Abstract

Protein phosphatase Z is a "novel type" fungus specific serine/threonine protein phosphatase. Previously our research group identified the *CaPPZ1* gene in the opportunistic pathogen *Candida albicans* and reported that the gene deletion had several important physiological consequences. In order to reveal the protein targets and the associated mechanisms behind the functions of the phosphatase a proteomic method was adopted for the comparison of the *cappz1* deletion mutant and the genetically matching QMY23 control strain. Proteins extracted from the control and deletion mutant strains were separated by two-dimensional gel electrophoresis and the protein spots were stained with RuBPS and Pro-Q Diamond in order to visualize the total proteome and the phosphoproteome, respectively. The alterations in spot intensities were determined by densitometry and were analysed with the Delta2D (Decodon) software. Spots showing significantly different intensities between the mutant and control strains were excised from the gels and were digested with trypsin. The resulting peptides were identified by LC-MS/MS mass spectrometry. As many as 15 protein spots were found that exhibited significant changes in their intensity upon the deletion of the phosphatase and 20 phosphoproteins were identified in which the level of phosphorylation was modified significantly in the mutant. In agreement with previous findings we found that the affected proteins function in protein synthesis, oxidative stress response, regulation of morphology and metabolism. Among these proteins we identified two potential CaPpz1 substrates (Eft2 and Rpp0) that may regulate the elongation step of translation. RT-qPCR experiments revealed that the expression of the genes coding for the affected proteins was not altered significantly. Thus, the absence of CaPpz1 exerted its effects *via* protein synthesis/degradation and phosphorylation/dephosphorylation. In addition, our proteomics data strongly suggested a role for CaPpz1 in biofilm formation, was confirmed experimentally. Thus our unbiased proteomic approach lead to the discovery of a novel function for this phosphatase in *C. albicans*.

study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Protein phosphatase Z (PPZ) is a novel member of the Ser/Thr specific phosphoprotein phosphatase family that was identified by molecular cloning [1]. This phosphatase has a distinctive phylogenetic distribution as it is specific for fungi. It was discovered and has been extensively characterized in the model organism *Saccharomyces cerevisiae* that possesses two paralogs, Ppz1 and Ppz2 phosphatase [2]. PPZ orthologs have been also described in *Schizosaccharomyces pombe* [3], *Neurospora crassa* [4], *Debaryomyces hansenii* [5], *Aspergillus nidulans* [6] and the opportunistic pathogen *Candida albicans* [7].

All of the known PPZ enzymes consists of a well conserved C-terminal catalytic domain, and a more variable intrinsically disordered N-terminal regulatory domain. Based on its amino acid sequence and the recently determined three dimensional structure [8] the catalytic domain of *C. albicans* CaPpz1 is very similar to the catalytic subunit of protein phosphatase 1 (PP1c), suggesting that the PPZ subfamily evolved from PP1c *via* the fusion with a flexible N-terminal segment. However, due to several unique structural features—including a specific C-terminal helix—a number of point mutations in important binding sites, and the presence of its N-terminal tail [8] CaPpz1 exhibits distinct regulation and has different physiological functions in comparison to the classical PP1c termed Glc7 in *C. albicans*.

The analysis of the *cappz1* deletion mutant revealed that the *Candida* phosphatase, like its budding yeast counterpart, was involved in the regulation of cation homeostasis, cell wall biosynthesis, and membrane potential [9], as well as in the oxidative stress response [6]. In addition to the yeast-specific functions the absence of the CaPpz1 enzyme affected the adherence, morphogenesis [10] and the virulence of the pathogenic fungus [9,11]. Thus in the past few years the pertinent functions of CaPpz1 were identified, and its regulation by the CaCab3 protein was also revealed [12]. However, practically nothing is known about the mechanisms of its action.

Based on analogies with *S. cerevisiae* and other tested fungal species we may pinpoint some of the potential PPZ targets. In an earlier study the translational elongation factor 1Bα (eEF1Bα) was identified as the direct substrate of Ppz1,2 after *in vivo* phosphorylation of budding yeast cells, and classical Edman protein sequencing of a selected protein spot [13]. Furthermore, a number of protein substrates have been utilized for the *in vitro* assay of PPZ activity that include: myelin basic protein, histone 2A [14], Reg1 [15], and myosin light chain 20 [12], although the physiological relevance of these substrate proteins is questionable.

The detailed analysis of budding yeast deletion mutants may also reveal some of the physiological targets of PPZ phosphatases. For example the tolerance of the *ppz1* and *ppz1,2* budding yeast mutants to Na^+ and Li^+ ions was explained in part by the elevated expression of the *ENA1* gene that codes for the major Na^+-transporter, and the enhancement of the Ena1 mediated cation efflux rate [16]. On the other hand, in the salt tolerant *D. hansenii* the deletion of the *DhPPZ1* increased the expression of the *DhEHA1* Na^+/H^+ antiporter gene [5]. In addition, an *ENA1*-independent component of cation tolerance in the *ppz1,2* mutant *S. cerevisiae* was attributed to the activation of Trk1 and Trk2 K^+ transporters [17]. The tolerance of the phosphatase deficient strain to the toxic cations, like spermine and hygromycin B was explained by the reduced membrane potential that was related to the altered K^+ transport [17]. Finally, the sensitivity of the mutant to the cell wall biosynthesis blocking agents like caffeine and calcofluor white was associated with the elevated turgor pressure and osmotic instability caused by the increased intracellular K^+ concentration [17]. According to this unifying model the absence of the *PPZ1,2* gene products facilitates K^+ influx; that changes membrane potential, results in osmotic instability, and induces compensatory Na^+ and H^+ efflux; the latter is responsible for alkalinization inside the cells and a subsequent change in the pH-dependent

gene expression. A genetic interaction between *S. cerevisiae PPZ1,2* phosphatases and the protein kinase C regulated *SLT2/MPK1* mitogen-activated protein kinase [18] that is regulating the cell wall integrity (CWI) pathway [19], explains the negative correlation between the cell wall integrity and osmotic stability phenotypes of the *ppz1* and *slt2* mutants [20].

Previously we have reported that the *C. albicans* CaPpz1 was able to complement the missing *S. cerevisiae* Ppz1 phosphatase in the *ppz1* mutant and mimicked the effect of Ppz1 in a MAP kinase deficient *slt2* deletion strain [9]. It was also found that the PPZ phosphatase orthologs in *A. nidulans*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae* [6] as well as in *Aspergillus fumigatus* [21] were involved in the oxidative stress response.

Thus, from the available literature one can suggest a score of possible CaPpz1 targets in *C. albicans* that may explain the observed physiological functions of the phosphatase. However, it has to be kept in mind that these analogy-based assumptions have to be proven by solid experimental evidence. For the identification of the protein targets for CaPpz1 we initiated an unbiased proteomic approach that reveals the proteins whose phosphorylation or expression level is affected by the deletion of the *CaPPZ1* gene.

Materials and methods

Fungal strains and growth conditions

We compared two genetically matching *C. albicans* strains in the present study. The control strain QMY23 [22] was kindly provided by Alexander Johnson, and has the following genotype: *his1Δ/his1Δ*, *leu2Δ*::*C. dubliniensis HIS1/leu2Δ*::*C. maltosa LEU2*, *URA3/ura3Δ*::*imm434*, *IRO1/iro1Δ*::*imm434*. The *cappz1* deletion mutant with the genotype: *ura3Δ-iro1Δ*::*imm434/URA3-IRO1*, *his1Δ/his1Δ*, *leu2Δ/leu2Δ*, *ppz1Δ*::*C. dubliniensis HIS1/ppz1Δ*::*C. maltosa LEU2* was generated in our laboratory [9]. Thus, in the KO strain both alleles of the *CaPPZ1* gene are deleted, otherwise its genetic background would have been identical to the control strain. Precultures of the two strains were grown overnight from single colonies in YPD medium (10 g yeast extract, 20 g peptone, and 20 g glucose in 1 L solution) at 37˚C without shaking. The main cultures were diluted to OD_{640} 0.1 with YPD and were grown under identical conditions with shaking (140 rpm) until the OD_{640} of the *cappz1* strain reached 0.8. Then the cells were collected by centrifugation at 3273 x g, 4˚C for 10 min. A typical growth curve is presented in the S1 Fig. The pellets were resuspended and washed twice with 1 ml cold phosphate-buffered saline (PBS). The washed cells were collected by centrifugation at 7750 x g, 4˚C for 10 min, were quick-frozen in liquid nitrogen, and were stored at -70˚C until use. The deletion of the *CaPPZ1* gene has been confirmed in all of the samples by PCR performed according to Ádám *et al.* [9].

Proteomics and phosphoproteomics

Protein sample preparation and purification. Three independent samples originating from control and mutant cells, respectively, were resuspended in 1 ml lysis buffer containing 50 mM NaH_2PO_4 (pH = 7.4) 1 mM EDTA, 5% glycerol, complete EDTA-free protease inhibitor mixture (Roche), 5 mM benzamidine, 10 nM leupeptine, 1 mM PMSF, and 1 mM $MnCl_2$. To the cell suspension 500 μl glass beads (1 mm ∅, Marienfeld) were added, and were vortexed at the maximal speed 3 times for 1 min, with 2 min intervals cooling in ice. Cell debris were collected by centrifugation (500 x g, 10 min, 4˚C), and the protein concentration of the supernatants was determined with the method of Bradford [23]. Samples containing 450 μg protein underwent a cleanup by Ready-Prep 2-D CleanUp Kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol. After precipitation and centrifugation, each pellet was dried and resuspended in 450 μl rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4 m/v% CHAPS, 1% DTT, 2 v/v% Bio-Lyte

and 0.001% bromophenol blue) and used immediately for two-dimensional electrophoresis. In order to have preparative gels for spot picking a mix group was also created by the combination of equal amounts of control and mutant protein samples and was processed as described before.

Two-dimensional (2D) gel electrophoresis. 24 cm, pH 4–7 IPG strips with immobilized pH gradient (Bio-Rad) were passively rehydrated with 450 μl sample at 20˚C overnight. The isoelectric focusing (IEF) was performed by applying 300 V for 3 hours, gradually increased to 3500 V in 5 hours and then held at 3500 V for 18 hours. After IEF the IPG strips were equilibrated in equilibration buffer (500 mM Tris-HCl, pH = 8.5, 6 M urea, 2% SDS, 20% glycerol) containing 0.6% dithiothreitol (DTT) for 15 min, and then in equilibration buffer containing 1.2% iodoacetamide (IAA) for 15 min. In the second dimension the strips were laid on the top of 12% SDS-polyacrylamide gels and covered with agarose (Bio-Rad). No molecular weight marker was applied. In a Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) the electrophoresis was carried out simultaneously for each gel at 100 mA per gel for 24 hours until the bromophenol blue dye reached the bottom of the gel. Proteins were first stained with Pro-Q Diamond dye (Thermo Life Technologies) according to manufacturer's instructions, washed with water and scanned with Pharos FX Plus Molecular Imager (Bio-Rad) in order to visualize the phosphoproteome. For excitation 532 nm wavelength light was used and the image was recorded at 615 nm; the scanning was done at 100 micrometres resolution. The gels were stained again with in-house prepared RuBPS fluorescent protein staining dye solution in 20% ethanol overnight [24] to reveal the total proteome, than were washed in post-fix solution containing 7% acetic acid and 10% methanol. Gel images were recorded as before. The three biological replicates of the control and mutant samples as well as the mix groups were processed together on the same day.

Quantitative analysis of 2D gels. Protein spot patterns were detected using Delta2D (Decodon) software version 4.4. The gel images were grouped as follows: the control (Ctrl), the *cappz1* deletion mutant (Mut) and finally, the mix group (Mix). Three projects were created: (i) in the first project the Pro-Q Diamond-stained Ctrl and Mut gel images were studied, (ii) in the second project the RuBPS-stained Ctrl and Mut gel images were examined, while (iii) in the third project all spots were transferred to Mix gel images for spot excision. Protein spots from all of the Ctrl and Mut gels were matched using the exact mode matching protocol and the group warping strategy of Delta2D software. The union mode was used to generate the fused images containing each spot present on all of the gels included into each project. All spots were quantified and the total quantity in all of the spots was taken as 100%. The spot intensity was normalized according to the total intensity of each spot in all gels and was given as normalized spot volume (%v) compared to the total intensity. The fold change of mean normalized spot volume of three Mut and three Ctrl gels (Mut/Ctrl) was calculated and the significance of differences was assessed automatically by the Delta2D software using Student's t-test. The Quantitation table generated automatically by the software was exported to Microsoft Excel 2010 (Microsoft Inc.). All the relevant raw data are publicly accessible at the following link under https://figshare.com/account/home#/projects/23773.

In-gel digestion of proteins. Those protein spots that exhibited significantly different ($p < 0.05$) normalized spot volumes between the Ctrl and Mut groups using either Pro-Q Diamond or RuBPS staining were cut out manually from the mix gel with a pipette tip and were subjected to in-gel digestion. Initially, the gel spots were destained using a 1:1 ratio of 25 mM ammonium bicarbonate pH = 8.5 and 50% acetonitrile, than were reduced by 20 mM DTT for 1 hour at 56˚C. Next alkylation was accomplished by 55 mM IAA for 45 min at room temperature in the dark, then an overnight digestion was performed with 100 ng stabilized MS grade trypsin (ABSciex) at 37˚C. The reaction was stopped by concentrated formic acid (FA). The

tryptic peptides diffused out of the gel pieces were dried in speed-vac concentrator (Thermo Scientific).

Protein identification by mass spectrometry. For protein identification the peptides were re-dissolved in 10 μl 1% FA and were separated on Easy nLCII (Bruker) nanoHPLC using a 90 min water/acetonitrile gradient at 300 nl/min flow rate. The peptide mixture was loaded onto a Zorbax 300SB-C18 desalting column (5 mm x 0.3 mm, 5 μm particle size, Agilent). Thereafter, the peptides were separated on a Zorbax 300SB-C18 analytical column (150 mm x 75 μm, 3.5 μm particle size, 300 Å pore size, Agilent). The mobile phase A: 0.1% FA in LC-MS grade water (Sigma), was mixed with the mobile phase B: acetonitrile (Sigma) containing 0.1% FA. During the separation the percentage of phase B was increased from 0% to 100% in 60 min, then held at 100% for 10 min, decreased to 0% in 2 min, and finally was held at 0% for 18 min.

The peptides eluted from the analytical column were analyzed in a 4000 QTRAP (ABSciex) mass spectrometer recording positive ion mode MS/MS spectra. The Information Dependent Acquisition (IDA) method was selected. After the first mass scan (mass range 400–1700 amu), an enhanced resolution separation was carried out to establish the charge state of the two most intensive precursor ions. For protein identification collision-induced dissociation (CID) spectra were obtained in enhanced product-ion mode (mass range 100–1900 amu) at scan rate of 4000 amu/s and the rolling collision energy was applied with the maximum of 85 eV. The cycle time was 5.4 sec. The spray voltage was 2800 V, ion source gas was 50 psi, the curtain gas was 20 psi and the source temperature was 70˚C.

Based on the acquired MS/MS spectra proteins were identified with the ProteinPilot 4.5 software (ABSciex) that used the UniProt/Swiss-Prot database (2015. 07. version, 548872 sequence entries) and the Biological modification table implemented in the software, containing more than 70 frequent biological protein modifications. A minimum of two peptides identified with at least 95% confidence, where at least four b or y ions in ion series were present, were used for protein identification. In those cases where the protein identification was not successful with ProteinPilot, a MASCOT search was carried out using the NCBInr database. The type of cleavage enzyme was determined as trypsin. The missed cleavage in both cases was set to maximum 1. The following variable modifications were defined: oxidation of methionine (Met) and carbamidomethylation of cysteine (Cys). In those cases where the identified protein was not assigned to the *C. albicans* strain used in our analyses, or was identified as hypothetical protein, a blastp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) search was performed on the NCBI non-redundant protein database to identify the same peptide sequences in the *C. albicans* SC5314/ATCC MYA-2876 strain. All of our sequence annotations were confirmed by an independent data-mining of the CGD database (http://www.candidagenome.org/; *C. albicans* SC5314 Assembly 22 version s06-m01-r01, posted on February 2, 2016) in two steps. First a blastp search was carried out at customs settings, than the 13 short peptide sequences that were missed in the first screen were one by one manually located in the individual protein sequences.

Gene expression studies

RNA isolation. Cells (QMY23, *cappz1*) were lyophilized for 4 hours. The lyophilized samples were first milled by sterile toothpick, then were suspended in 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen) and finally vortexed for 3 minutes at 25˚C. Cell debris were removed by centrifugation (11750 x g, 10 min, 4˚C) and the lysates were extracted by the addition 0.2 volume of chloroform (VWR) for 10 minutes. After centrifugation (11750 x g, 10 min, 4˚C) the upper aqueous phase was transferred into a new tube and isopropanol (VWR) was added in

1:1 ratio. After 10 min incubation at 25˚C, the precipitated RNA was collected by centrifugation (11750 x g, 10 min, 4˚C) and the pellet was washed by cold 70% ethanol. After air-drying the pellets in sterile box, samples were dissolved in nuclease free water (VWR) for 10 min at 55˚C. RNA concentration and purity were checked by NanoDrop (Thermo Scientific) and agarose gel electrophoresis.

RT-qPCR. 3 μg RNA were treated with RNase free DNase I (Fermentas) according to the protocol of the manufacturer. For cDNA synthesis 2 μg DNase-treated RNA was incubated with 1 μl Oligo (dT) Primer (Promega) for 5 min at 70˚C in 11 μl final volume. Then 5 μl 5 x M-MLV Reaction buffer, 5 μl 2 mM dNTP, 1 μl Recombinant RNasin ® Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl) (Promega), 1.5 μl M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μl) (Promega) and nuclease free water were added and samples were incubated for 1 hour at 37˚C. cDNA samples were stored at -20˚C until use. For each cDNA to be tested specific primer pairs were designed with the Primer3 version 0.4.0 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/) and Oligo Analyser version 1.0.2 softwares, and were purchased from Sigma. Each primer pair was tested by PCR (S2 Fig). The oligonucleotide sequences and optimal PCR conditions are summarised in S1 Table. For quantitative real time PCR primers were diluted in nuclease free water to 10 μM. For one reaction 5 μl Master Mix (2x qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX, Nucleotest BIO), 1 μl primer mix (forward and reverse primers), and 2 μl nuclease free water was mixed. 8 μl of the reaction mix was added to 2 μl 10 ng/μl cDNA in one well of the 4titude Framestar® 480/384 plate that was covered with qPCR Adhesive Seal (Nucleotest BIO). Three parallel measurements were made with every sample in the LightCycler®480 II instrument (Roche). The template program consisted of the following steps: pre-incubation (1 cycle), amplifications (40 cycles), melting curve (1 cycle) and cooling. The acquisitions were achieved at 60˚C and the target temperature was 95˚C (Ramp Rate: 4.8˚C/s). Real time detection was achieved by SYBR Green intercalation, and the T_m (melting temperature) as well as Cp (cycle number at detection threshold /crossing point) data were determined by the built in LCS480 1.5.0.39 Software. The data were normalized to Actin (*ACT1* gene) expression. SD, p values and fold change (*cappz1*/QMY23 Control) values were calculated and the statistical analysis was performed in Microsoft Excel 2010 (Microsoft Inc).

Investigation of biofilm formation

Biofilm formation assay. *In vitro* biofilm formation was measured in Spider medium (1% mannitol, 1% nutrient broth, 0.2% K_2HPO_4, pH = 7.2) and bicarbonate-free RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) by growing the biofilm on the bottom of untreated 12-well polystyrene plates (Multiwell Cell Culture Plates, VWR), as follows. *C. albicans* strains were grown for 18 hours in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) at 37˚C and wells were inoculated with 2 x 10^6 yeast cells in 2 ml Spider or RPMI medium. Incubation of the plates was carried out at 37˚C for 24 hours with 50 rpm agitation. A subsequent washing step after initial adhesion was not applied, as the two strains were shown to have different adhesion characteristics [10], consequently washing would have affected the results of the biofilm assay. After incubation, planctonic and easily detaching cells as well as the medium were carefully removed, and biofilms were washed twice with 1 ml PBS. Planktonic cells were collected in microcentrifuge tubes. The dry biofilm mass and the mass of planktonic/detached cells were measured according to the method of Nobile *et al.* [25]. Biofilm assays were carried out in triplicates from three independent inocula and each strain/medium combination was tested on an individual plate in all 12 wells. Thus, for each combination, biofilm dry biomass to total dry biomass ratios were calculated for 36 individual wells.

Crystal violet staining. As an independent way to measure biofilm growth Crystal violet (CV) staining was used. Strains were grown under the conditions described above, for 24

hours with 50 rpm agitation, in 24-well polystyrene plates (Linbro Tissue Culture Multiwell Plates, ICN Biomedicals). CV staining assays were carried out in triplicates from three different inocula and each strain/medium combination was tested in 12 wells of the tissue culture plates. Staining, washing, distaining and absorbance measurements were conducted as described by Jin *et al.* [26].

Microscopy. Samples of biofilms formed in 12-well plates were temporary mounted on microscope slides and photographed using an Olympus BD40 microscope equipped with an Olympus 40X lens and a digital microscope camera, with the Olympus DP Controller software, with phase contrast illumination.

Statistical analysis. To compare the values obtained for biofilm dry biomass, biofilm to total biomass ratio, and absorbance values after CV staining, Student's 2-sample t-test or Welch's test (depending on the equality of variance) was applied. A p value < 0.05 was considered significant.

Bioinformatics

Potential protein phosphorylation sites were identified in *C. albicans* proteins by Motif scan (http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml) screening at high and medium stringency settings [27]. Interactions between the *S. cerevisiae* orthologs of the *C. albicans* proteins were analyzed by the String version 10.5 (https://string-db.org) with default settings at medium stringency [28].

Results and discussion

Examination of CaPpz1 by proteomic methods

Two dimensional (2D) electrophoresis is an unbiased method for the examination of proteins present in adequate amount in biological samples [29]. After separation differential staining procedures facilitate the detection of native and post-translationally modified proteins in the same 2D gel [30]. In this study we investigated the functional consequences of the deletion of the *CaPPZ1* gene in *C. albicans* by using the combination of phosphoprotein and general protein staining of control QMY23 (Ctrl) and deletion mutant *cappz1* (Mut) strains.

Effects of CaPPZ1 deletion on protein phosphorylation. Phosphoproteins were visualized by the Pro-Q Diamond staining of 2D gels. By the combination of three independent Ctrl as well as Mut gel images a fused image was generated that contains all of the 473 Pro-Q Diamond stained spots present in Ctrl and Mut gels (Fig 1A). Then the mean normalized spot volume for each corresponding spots of Ctrl and Mut gels was determined and all of the 41 spots which exhibited significant ($p < 0.05$) difference between the two samples were excised from the Mix gel and were subjected to LC-MS/MS-based protein identification. The peptide sequences found in 27 separate spots could be determined (S2 Table). In most of these spots a single *C. albicans* protein was detected but four spots (9, 15, 25 and 35) contained two or more polypeptides. The latter were excluded from further analyses as it was impossible to judge that the phosphorylation of which protein was responsible for the observed intensity changes. The unambiguously identified proteins are listed in S3 Table in an alphabetical order. Our data revealed that four of the phosphorylated proteins were detected in two separate spots. Identical gene products (Rpp0, Lia1-like and Uba1) were found in three pairs of the spots, while the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase was represented by two distinct isoenzymes (Cpr3 and Cyp5 in spots 2 and 7, respectively). Thus, in 23 spots we identified 20 individual proteins whose phosphorylation was significantly altered in the absence of the CaPpz1 phosphatase. It should be noted that in five of these proteins (Rpp0, Dug1-like, Eft2, Rad23 and Tkl1) a clearcut increase of phosphorylation was observed, as it can be expected when a phosphatase is knocked out.

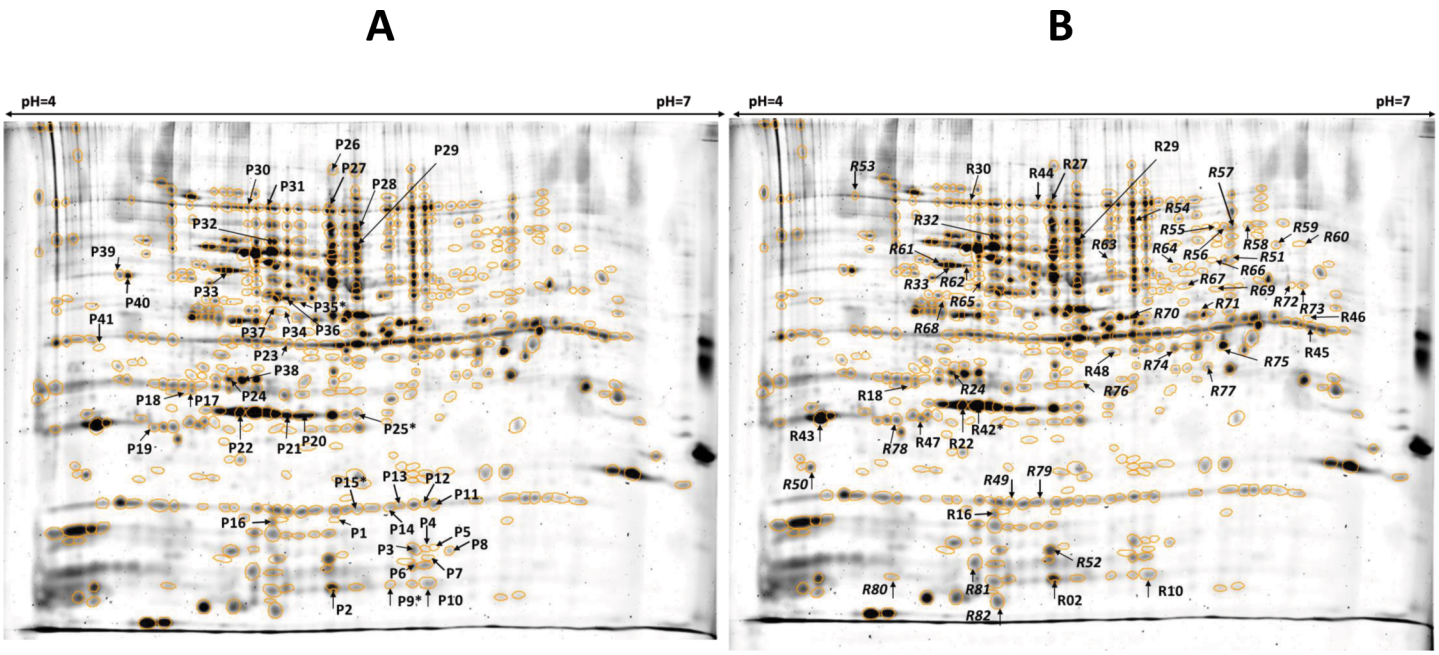


Fig 1. Fused images of three Pro-Q Diamond (a) and three RuBPS (b) stained gels. The arrows point to spots with significantly altered normalized spot volumes in the *cappz1* mutant *C. albicans* strain. Letters P or R in front of spot IDs indicate the staining methods. In the spots labelled with * more than one protein was found.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183176.g001

The case of ubiquitin-activating enzyme E1 (Uba1) was more complicated since in the Mut sample the phosphoprotein specific staining was more intensive in one spot (30) and was diminished in another (31). It is possible that these spots represent hyperphosphorylated and hypophosphorylated forms of the enzyme, respectively, in agreement with a pI shift between the two spots (Fig 1A). In the additional 14 proteins tested a reduced Pro-Q Diamond staining was recorded that may reflect some indirect effects of CaPpz1. However, one can not exclude the possibility that changes in the protein levels may mask or distort the changes caused by phosphorylation.

Effects of CaPPZ1 deletion on protein levels. In order to examine the changes in the protein levels upon *CaPPZ1* deletion the Pro-Q Diamond stained Ctrl and Mut gels were washed and then stained with RuBPS, a dye that labels the proteins regardless of the post-translational modifications. For the evaluation of the results the same strategy was applied as described in the previous section. The fused image generated from three replicates of Ctrl and Mut RuBPS-stained gels contained 519 spots, from which 52 exhibited statistically significant changes in normalized spot volumes between the two experimental groups (Fig 1B). 20 spots with more than 1.5 fold change were excised from the Mix gel and were analyzed by mass spectrometry. In 15 of the spots the protein identification was successful; 13 contained a single protein, while the elongation factor Cef3 was found in spots 27 and 44 (S2 Table). Thus, in 15 spots we identified 14 individual proteins that have a more than 1.5 fold change of their cellular level after the elimination of the *CaPPZ1* gene (S4 Table).

Evaluation of the proteomic results. The results of Pro-Q Diamond and RuBPS staining were combined and summarised in Table 1. Based on the changes in the protein content and protein phosphorylation the proteins were divided into four main categories. In Group 1 there are 5 proteins that have no phosphorylated counterparts. In this group the amount of Bmh1

Table 1. Summary of changes in protein levels, protein phosphorylation and gene expression in *Candida albicans* in response to *CaPPZ1* gene deletion.

Protein[1,2]	Spot ID	RuBPS staining		Pro-Q Diamond staining		Gene expression	
		Ratio	p value	Ratio	p value	Ratio	p value
Group 1							
Ade12	46	**2.60**	**0.04**	n.a.	-	1.09	0.82
Bmh1	47	**-1.97**	**0.01**	n.a.	-	-1.07	0.44
Efb1	43	**-2.37**	**0.002**	n.a.	-	1.38	0.33
Idh1	45	**2.76**	**0.02**	n.a.	-	-1.02	0.95
Ure2	48	**1.95**	**0.0004**	n.a.	-	-1.28	0.36
Group 2							
Cef3*	44	**-7.08**	**0.004**	n.a.	-	**1.43**	**0.01**
	27	**-3.63**	**0.02**	**-2.38**	**0.008**		
Cpr3	02	**-2.20**	**0.01**	**-2.59**	**0.018**	1.05	0.36
Hsp70/Ssa1	32	**-1.52**	**0.04**	**-3.32**	**0.024**	1.17	0.59
Rpl20B	10	**-2.21**	**0.02**	**-4.81**	**0.019**	1.50	0.10
Tkl1	29	**1.84**	**0.01**	**1.78**	**0.045**	-1.19	0.44
Tsa1	16	**-2.23**	**0.002**	**-2.18**	**0.028**	1.14	0.23
Yst1	22	**-2.35**	**0.04**	**-2.79**	**0.041**	1.79	0.06
Group 3							
Aip2	34	-1.25	0.51	**-2.05**	**0.026**	1.67	0.18
Cyp5	07	-2.62	0.09	**-2.02**	**0.0003**	1.61	0.15
Dug1-like	36	-1.25	0.51	**1.37**	**0.008**	1.13	0.29
Eft2	28	-1.11	0.69	**2.79**	**0.008**	1.10	0.63
Guk1	03	-1.84	0.13	**-4.57**	**0.003**	1.87	0.05
Ham1	01	1.34	0.46	**-2.79**	**0.034**	1.17	0.49
Rad23	39	-1.24	0.37	**1.95**	**0.006**	-1.26	0.17
Rpl9B	13	-1.69	0.19	**-3.23**	**0.049**	1.32	0.10
Rpp0*	20	1.74	0.15	**2.56**	**0.046**	1.20	0.67
	21	-1.08	0.82	**2.63**	**0.005**		
Rps7A	04	-4.98	0.12	**-2.58**	**0.047**	**1.22**	**0.03**
Tif1	23	1.09	0.77	**-2.05**	**0.014**	1.44	0.16
Group 4							
Lia1-like*	17	-1.06	0.75	**-3.09**	**0.019**	1.54	0.10
	18	**-1.59**	**0.02**	**-2.32**	**0.008**		
Uba1*	30	**1.59**	**0.03**	**1.90**	**0.006**	1.03	0.98
	31	1.21	0.56	**-2.31**	**0.037**		

* The protein was identified in two separate spots of 2D gels. n.a. not applicable, as no phosphoprotein specific staining can be detected. Significant changes ($p < 0.05$) are shown in bold face.

Based on

[1] http://www.uniprot.org/ and

[2] http://www.candidagenome.org/.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183176.t001

and Efb1 decreased, while the amount of Ade12, Idh1 and Ure2 proteins increased in the knock out strain.

The members of a Group 2 have been characterized as phosphoproteins (Table 1). In these 7 proteins the Pro-Q Diamond and RuBPS staining of the coinciding spots changed in the same way, indicating that only the amount of the phosphoprotein was affected without changing the level of phosphorylation. The phosphatase deletion diminished the amount of one

isoform of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Cpr3), the heat shock protein Hsp70, two ribosomal proteins (Rpl20B and Yst1) and the peroxiredoxin Tsa1, while increased the amount of the phosphoprotein Tkl1. The translational elongation factor Cef3 is a unique member of this group, since the normalized spot volume of its nonphosphorylated (spot 44) and phosphorylated (spot 27) forms were drastically reduced in the Mut samples.

In Group 3 we placed 11 phosphoproteins whose protein content was not affected significantly, but their phosphorylation changed in the knock out strain (Table 1). The phosphorylation sensitive Pro-Q Diamond staining intensity was reduced in 7 of these proteins (Aip2, Cyp5, Guk1, Ham1, Rpl9B, Rps7A and Tif1) and was enhanced in 4 of them (Eft2, Dug1-like, Rad23 and Rpp0) to a statistically significant level. To support our data the original gel images are shown for Eft2 in S3A Fig, as a typical example. It should be noted that the phosphorylation of the acidic ribosomal protein Rpp0 increased in both spots 20 and 21. A pI shift between the two spots (S3B and S3C Fig) indicates a post-translational modification leading to a more acidic pI of the protein present in spot 21 as compared to the content of spot 20. This can be explained by the differential phosphorylation states of the protein that can be phosphorylated at Ser302 and Thr205 by casein kinase 2 with high and medium probability, respectively, while Thr292 can be phosphorylated either by DNA-dependent protein kinase or casein kinase 2 with the same medium level of probability according to Motif scan analysis.

The two members of Group 4 were identified in two separate spots (Fig 1) that exhibit different tendencies in phosphorylation (Table 1). The deoxyhypusine hydroxylase Lia1-like was found in spots 17 and 18 with the same MW (S3D and S3E Fig) indicating the presence of two different post-translationally modified protein forms, so-called proteoforms. Concerning the more acidic proteoform (spot 18) the apparent decrease in phosphorylation resulted from the decrease in the protein amount, while in the proteoform in spot 17 a decrease in the phosphorylation without any significant change in the protein level was observed. It is likely that this protein has multiple sites for phosphorylation as Motif scan suggests that Tyr85 is a strong Abl kinase site, while Ser12 and Ser178 can be phosphorylated by the DNA-dependent and AMP-dependent protein kinases, respectively, with a medium level of probability. As mentioned before, phosphorylated ubiquitin-activating enzyme Uba1 was identified in spots 30 and 31 (S3F and S3G Fig). The phosphorylation increased significantly in spot 30 in correlation with the increase in the RuBPS protein staining, while in spot 31 the phosphorylation level decreased but the protein level remained unchanged. The pI shift observed between spots 30 and 31 indicates different phosphorylation states of the same protein; suggesting that a hyperphosphorylated form is present in spot 30 and a hypophosphorylated form is in spot 31. In correlation with this explanation a Motif scan search indicated three strong phosphorylation sites in the Uba1 protein: Tyr245, Ser587, and Ser987 can be phosphorylated by Src kinase, DNA-dependent protein kinase, and PKC mu isoform with high probability. Taken together our data revealed that the absence of CaPpz1 decreased the phosphorylation of one specific form of Lia1-like and Uba1 enzymes.

In summary, we found that the protein level of 9 proteins (including 7 phosphoproteins) decreased and 5 proteins (including 2 phosphoproteins) showed an opposite tendency in the *cappz1* mutant *C. albicans*. We tested the expression of the genes coding for all of the investigated proteins by quantitative RT-PCR and did not detect significant gene expression changes larger than 1.5 fold upon *CaPPZ1* deletion in any of them (Table 1). Thus, we concluded that the observed changes in protein levels can not be explained by the effect of the CaPpz1 phosphatase on the expression of the selected genes. Rather, it can be attributed to the effect of gene deletion on protein synthesis and protein phosphorylation/dephosphorylation.

Discussion of the proteomic results

Based on datamining from two fungal databases the known biochemical and physiological functions of the 25 CaPpz1 affected proteins are listed in Table 2. As many of these functions were deduced by analogy, the names of the better characterised *S. cerevisiae* orthologs were also included in the table. According to the GO terms the proteins were grouped in 4 broad functional categories and are presented alongside with the overall proteomic changes in Fig 2. For comparison with Table 1, please, note that Group 1 proteins are in the left side, Group 3 representatives are in the right side; while Group 2 as well as Group 4 members fall in the middle intersecting section of the figure.

According to their functions 12 out of the 25 proteins (including 1 transcriptional initiation factor, 3 translational elongation factors, 5 ribosomal components and 3 chaperons) are involved in protein synthesis and 2 of them are related to proteasomal protein degradation. The left and middle sections of Fig 2. show, that the level of 7 proteins that are related to protein synthesis decreases, and the level of the ubiquitin-activating enzyme E1 (Uba1) increases in the knock out strain. This suggests that the deletion of *CaPPZ1* has a negative effect on protein synthesis in the mutant. The role of *S. cerevisiae* Ppz1 in translation has been reported previously [31] in association with the regulation of nonsense suppression efficiency. The phosphorylation of the proteins in this functional category was affected in a more diverse manner in the deletion mutant samples; the level of phosphorylation increased in Eft2, Rad32 and Rpp0 (in two separate forms of the latter) and decreased in ribosomal proteins Rpl6B and Rps7A, as well as in the transcription initiation factor Tif1 and one of the proteoforms of the ubiquitin ligase Uba1. The data suggest that translational elongation factor-2, the up till now uncharacterised Rad32 protein and 60S acidic ribosomal proteins may be direct substrates of CaPpz1 phosphatase. In comparison with *S. cerevisiae*, where the EF1Bα/Efb1 translational elongation factor was reported to be a Ppz1 substrate/target [13], we found that the amount of the *C. albicans* ortholog of the Efb1 was significantly reduced in the phosphatase mutant, but the phosphorylated form of this protein we were not able to detect by the Pro-Q Diamond staining (Table 1). We identified the phosphorylated form of elongation factor 3 (Cef3) and detected decreasing protein (in spots 27 and 44) as well as phosphorylation levels (in spot 27) upon the phosphatase deletion (Table 1). On the other hand, we noted a significant enhancement of the phosphorylation of elongation factor 2 (Eft2) under the same conditions suggesting that the latter factor is the target of CaPpz1 in *C albicans* (S3A Fig). It is important to note that Eft2 was shown to be a direct target of sordarins, the antifungal agents that inhibit protein synthesis [32]. The functional equivalence between the orthologous *C. albicans* Eft2 and *S. cerevisiae* Efb1/Efb2 elongation factors was proven by the fact, that Eft2 complemented the *efb1 efb2* double mutant [33]. Our Motif scan analysis identified Tyr175 as a preferred site for Lck kinase and revealed that Thr713, Thr404, as well as Ser579 can be phosphorylated by the second messenger regulated PKA and PKC, as well as by the cell cycle associated Cdk2 or Cdk5 protein kinases, respectively. As it was mentioned in the previous section from a similar motif search, we know that the ribosomal protein Rpp0 exhibits several casein kinase 2 consensus sites. It was reported, that the phosphorylation of the budding yeast Rpp0 ortholog by casein kinase is not essential for translation but may regulate the expression of some genes that are involved in osmoregulation [34]. Since both Rpp0 and Eft2 are related to translation, it is possible that CaPpz1 could regulate protein synthesis *via* these two targets. Unfortunately, the Rad32-like protein has not been characterized yet, so the significance of its phosphorylation can not be predicted at the moment.

In agreement with the role of CaPpz1 in the oxidative stress response of the fungus we detected significant changes in three oxidative stress related proteins in the Mut samples

Table 2. Functional characterization of the *CaPPZ1* deletion affected *C. albicans* proteins.

C. albicans protein[1]	*C. albicans* protein name[2]	*S. cerevisiae* ortholog[3]	Molecular function[1,3] / Biological process[1]
Group 1			
Ade12	Adenylosuccinate synthetase	Ade12	adenylosuccinate synthase activity, 'de novo' AMP biosynthesis / upregulated in **biofilm**; decreased expression in hyphae vs yeast-form cells
Bmh1	14-3-3 protein homolog	Bmh2	phosphoserine binding, DNA replication origin binding / hyphal growth, Spider **biofilm** repressed
Efb1	Elongation factor 1-beta	Efb1	translation elongation factor activity guanyl-nucleotide exchange factor activity / Spider **biofilm** repressed
Idh1	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1 (mitochondrial)	Idh1	isocitrate dehydrogenase (NAD^+) activity / soluble protein in hyphae; protein level decrease in stationary phase cultures
Ure2	Protein URE2	Ure2	glutathione peroxidase activity, glutathione transferase activity, phosphoprotein binding, transcription co-repressor activity
Group 2			
Cef3	Elongation factor 3	Yef3	translation elongation factor activity, ATPase activity / higher protein amount in stationary phase
Cpr3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Cpr3	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity / protein folding, apoptotic process, **biofilm** matrix component
Hsp70/Ssa1	Heat shock protein SSA1	Ssa4	chaperon, unfolded protein binding / farnesol-downregulated in **biofilm**, Spider **biofilm** induced
Rpl20B	60S ribosomal protein L20	Rpl20B	structural constituent of ribosome / translation, Spider **biofilm** repressed
Tkl1	Transketolase 1	Tkl1	transketolase activity/pentose phosphate shunt, soluble protein in hyphae, **biofilm** matrix component
Tsa1	Peroxiredoxin TSA1	Tsa1	thioredoxin peroxidase activity, unfolded protein binding / cellular response to oxidative stress, filamentous growth
Yst1	40S ribosomal protein S0	Rps0A	structural constituent of ribosome / translation, Spider **biofilm** repressed
Group 3			
Aip2	D-lactate dehydrogenase	Dld2	dehydrogenase activity, actin binding/ flow model **biofilm** repressed
Cyp5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Cpr5	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity/ protein folding, **biofilm** matrix componenet
Dug1-like	Cys-Gly metallodipeptidase DUG1	Dug1	metallodipeptidase activity, omega peptidase activity/ glutathione catabolism, Spider **biofilm** repressed
Eft2	Elongation factor 2	Eft1	translation elongation factor activity, GTPase activity / higher protein amount in stationary phase
Guk1	Guanylate kinase	Guk1	guanylate kinase activity / **biofilm** matrix component
Ham1	Inosine triphosphate pyrophosphatase	Ham1	deoxyribonucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase activity
Rad23	Rad23p	Rad23	damaged DNA binding, contributes to amidase activity, proteasome binding, protein binding, protein bridging, ubiquitin binding
Rpl9B	Likely cytosolic ribosomal protein L9	Rpl9B	structural constituent of ribosome, cytoplasmic translation / protein levels decrease in stationary phase, Spider **biofilm** repressed
Rpp0	60S acidic ribosomal protein P0	Rpp0	structural constituent of ribosome, large ribosomal subunit rRNA binding / cytosolic translation, Spider **biofilm** repressed
Rps7A	40S ribosomal protein S7-A	Rps7A	structural constituent of ribosome / translation, Spider **biofilm** repressed
Tif1	ATP-dependent RNA helicase eIF4A	Tif2	translation initiation factor activity, ATP-dependent RNA helicase activity / Spider **biofilm** repressed
Group 4			
Lia1-like	Deoxyhypusine hydroxylase	Lia1	deoxyhypusine monooxygenase activity / filamentous growth, Spider **biofilm** repressed
Uba1	Ubiquitin-activating enzyme E1	Uba1	ubiquitin activating enzyme activity/ protein levels decrease in stationary phase yeast cultures

Based on

[1]http://www.candidagenome.org/

[2]http://www.uniprot.org/, and

[3]http://www.yeastgenome.org/. Biofilm related functions are highlighted in bold face.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183176.t002

(Fig 2). Ure2 has glutathione peroxidase activity, the Dug1-like Cys-Gly metallopeptidase takes part in glutathione metabolism and Tsa1 exhibits thioredoxin peroxidase activity (Table 2).

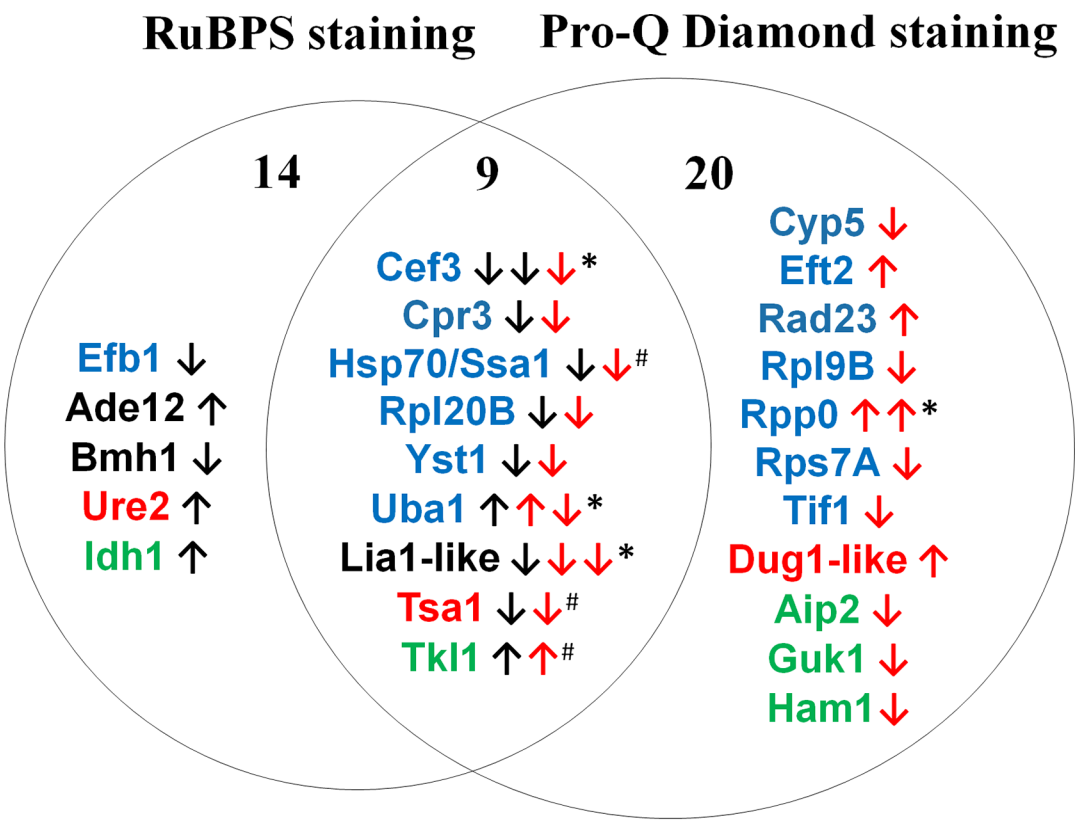


Fig 2. Summary of proteomic results and functional characterisation of the proteins showing significant alterations at protein or phosphorylation level upon *CaPPZ1* deletion. GO functions are indicated by the following color coding: blue: protein synthesis/degradation black: morphology, red: oxidative stress response, green: metabolism. Black and red arrows indicate the directions of changes in RuBPS staining (reflecting protein amounts) and Pro-Q Diamond staining (indicating protein phosphorylation levels), respectively. Numbers indicate the regulated proteins that were stained by either one or both the two dyes. *marks proteins found in two spots (hence the changes are shown by two arrows), and # labels possible moonlighting proteins.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183176.g002

In addition, we identified 5 metabolic enzymes that were affected by the deletion of the CaPpz1 phosphatase (Fig 2). The amounts of the mitochondrial isocitrate dehydrogenase Idh1 and the cytosolic transketolase Tkl1 increased in the knockout cells (Table 1). Meanwhile, the phosphorylation of the uncharacterized dehydrogenase Aip1, guanylate kinase Guk1 and inosine triphosphate pyrophosphatase Ham1 decreased in the mutant (Table 1). These and other cases of protein dephosphorylation effects in the phosphatase mutant are most probably related to the interplay between PPZ and the MAP-kinase pathway [18] as well as by the opposite genetic interactions between PPZ and the Sit4 protein phosphatases [35] in fungi. Concerning the changes in common metabolic enzymes it should be noted, that according to a recent hypothesis several common enzymes may play additional moonlighting functions. For example in the pathogenic fungi *bona fide* cytosolic enzymes, ribosomal proteins and chaperons may acquire novel functions after transportation to the cell surface [36]. From this point of view three of the proteins identified in the present study Hsp70/Ssa1, Tsa1 and Tkl1 have been detected on the cell surface of *C. albicans* by proteomic methods [37,38].

Finally, in the Mut strain we found a significant change in the levels of 3 proteins that were previously reported to be involved in the morphological transition of *C. albicans* (Table 2). The amount of Ade12 adenylosuccinate synthase, an enzyme that is upregulated in biofilm, increased in the absence of CaPpz1, while the amounts of the 14-3-3 scaffolding protein homolog Bmh1 and that of the Lia1-like deoxyhypusine hydroxylase decreased in the mutant in correlation with the fact that both of them are repressed in Spider biofilm [25]. These observations revealed the possibility of a functional role for the phosphatase in biofilm formation. After noting a coincidence between morphology related proteins and biofilm we carried out a careful database search and found that out of the 25 proteins examined 17 were biofilm matrix components or their genes showed altered expression levels during biofilm formation (Table 2). The proteins Cpr3, Cyp5, Guk1 and Tkl1 were localized to the biofilm matrix. According to Table 1 the amount of Tkl1 was elevated, and the amount of Cpr3 diminished in the phosphatase knockout strain, while the Cyp5 and Guk1 proteins displayed decreased phosphorylation levels without significant changes in their protein amounts. The original study that identified these four proteins as biofilm matrix components [39] concluded that in general terms the *Candida* strains with normal *versus* impaired biofilm forming capabilities had an almost identical extracellular matrix proteome. However, the phosphorylation state of the biofilm forming proteins has not been investigated before. In addition, the transcript levels of 13 CaPpz1 affected proteins identified in this study (Table 2) were reported to change during biofilm formation [25].

Effects of *CaPPZ1* deletion on biofilm formation

Although, under our experimental conditions we did not observe a significant change in the expression of the corresponding genes (Table 1), the coincidences between our proteomic results and the localization or expression of biofilm related proteins (Table 2) prompted us to investigate if CaPpz1 was indeed involved in biofilm formation. For this purposes we compared the biofilm forming capability of the Ctrl and Mut strains under different conditions. First we conducted experiments in RPMI-1640, that has been used in most of the biofilm studies, because it promotes an almost uniform filamentous growth. In this medium both strains showed excessive biofilm production and very small or negligible amount of planktonic cells. Biofilm accounted for the majority of total biomass after incubation in RPMI. The total dry biomass of Mut was significantly higher, but biofilm to total biomass ratio of the Ctrl only slightly exceeded that of the knockout strain. Crystal violet (CV) staining did not show any significant differences between the two strains' biofilm formation either (Table 3). Next, we carried out the same tests in the Spider medium, which was used in one of the key studies in the field [25]. Under this condition the extent of biofilm formation was much lower for both strains in comparison to the RPMI medium (Table 3). In contrast with the previous results, in the Spider medium the knockout strain showed significantly drier biofilm mass; the mean

Table 3. Effect of *CaPPZ1* deletion on the biofilm formation. Differences between the control QMY23 (Ctrl) and *cappz1* knockout mutant (Mut) strain's ability to form biofilms in RPMI-1640 and Spider medium were assessed by determining total biomass, biofilm mass to total biomass ratio, and by crystal violet (CV) staining of biofilms. n = 36 for each condition, and each strain, in three independent experiments.

	Biofilm Biomass (mg)				Biofilm/Total Biomass ratio				CV staining (A 595 nm)			
Medium	**RPMI-1640**		**Spider medium**		**RPMI-1640**		**Spider medium**		**RPMI-1640**		**Spider medium**	
Strain	**Ctrl**	**Mut**	**Ctrl**	**Mut**	**Ctrl**	**Mut**	**Ctrl**	**Mut**	**Ctrl**	**Mut**	**Ctrl**	**Mut**
Mean	6.30	7.60	0.30	1.20	0.97	0.94	0.12	0.24	0.25	0.23	0.06	0.14
SD	1.39	1.80	0.23	0.52	0.04	0.05	0.09	0.15	0.04	0.03	0.02	0.04
Significance	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.042$		$p < 0.001$		$p < 0.071$		$p < 0.001$	

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183176.t003

biomass per well value was approximately 4 times higher in the Mut than in the Ctrl strain. The better biofilm forming capability of the knockout strain in this medium was demonstrated the by biofilm to total biomass ratio as well as by CV staining (Table 3). The differences between biofilms of a given strain in different media are well documented. In a recent publication [40] it was reported that *C. albicans* in contrast to RPMI in Spider medium did not form a uniform yeast cell polylayer at the substrate. Also in Spider medium, hyphae did not display the high degree of vertical orientation they did in biofilms formed in RPMI medium. Note that this observation was made with strains of a/α mating type, and the strains used in this study have the same mating type. Thus, apparently the specific differences in the architecture of Spider biofilms magnified the differences between the control and KO strains.

Microscopic examination of biofilms formed in 12-wells showed excessive hyphal growth for both strains in RPMI medium with few detectable yeast cells (S4A and S4B Fig). In this medium, blastospore formation was more pronounced in the case of the knockout strain (S4B Fig). In Spider medium, yeast cells in the biofilm were more abundant among the hyphae in both strains (S4C and S4D Fig). However, the Ctrl strain merely formed small, isolated patches of adherent biofilm in this medium (fragile biofilm sensu [41]), whereas the Mut strain's biofilm formation was more pronounced, with biofilms covering larger areas of the plastic wells. Our qualitative observations cannot be supported by quantitative data as statistical image analysis was prevented by the technical constraints of the phase contrast imaging applied to thick biofilms. Despite this limitation we can state that the CaPpz knockout strain showed better biofilm forming capability in the selective Spider medium than the corresponding Ctrl strain indicating that Cappz1 has a direct or indirect role in the biofilm formation of *C. albicans*.

Conclusions

Our proteomic and phosphoproteomic investigations revealed that the deletion of the fungus-specific CaPpz1 from *C. albicans* affected the amount and phosphorylation of proteins involved in protein synthesis/degradation, morphological transitions, oxidative stress response and metabolism. We identified two putative substrates of the phosphatase Eft2 and Rpp0 that are critical regulators of translational elongation. These proteins are interlocked according to their functions and localizations (Table 2). The interactome of *C. albicans* proteins has not been worked out yet, but the interrelationships of these proteins can be anticipated by the analysis of their *S. cerevisiae* orthologs (listed in Table 2) with the aid of the String software. As shown in Fig 3. the five ribosomal proteins (Rpp0, Rps7A, Rpl9B, Rpl20B, and Rps0A) form a strongly associated cluster that interacts extensively with the four translation factors (Efb1, Tif2, Eft1, and Yef3) and connects to the ubiquitin activating enzyme Uba1 *via* Rad23, as well as to the triade of the nucleotide metabolising enzymes (Guk1, Ade12, and Ham1) *via* Guk1. The chaperon (Ssa4, Tsa1, and Crp3) and scaffold (Bmh2 and Ure2) proteins interact with the members of either the ribosomal protein cluster or the translation factor cluster or with both of them. Dug1 metalloproteinase connects to the main block through the transketolase Tlk1. Many of the metabolic enzymes like Idh1, Lia1, and Dld2 are outliers, indicating that they are most likely indirectly related to the rest *via* the altered metabolic fluxes in the mutant cells. According to the String database the Ppz2 phosphatase isoenzyme connects to the translation factor cluster *via* the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Cpr3, while the other isomerase isoform Cpr5 remains isolated. Based on our results with the *C. albicans* proteins we suggest that the Ppz1 phosphatase dephosphorylates two of the hub proteins of the cluster, namely the orthologs of the translation elongation factor Eft1 and the ribosomal protein Rpp0, which are also connected to each other. This hypothesis could explain the effects of protein phosphatase Z on protein synthesis and also would rationalize its effects on the associated proteins. Due to

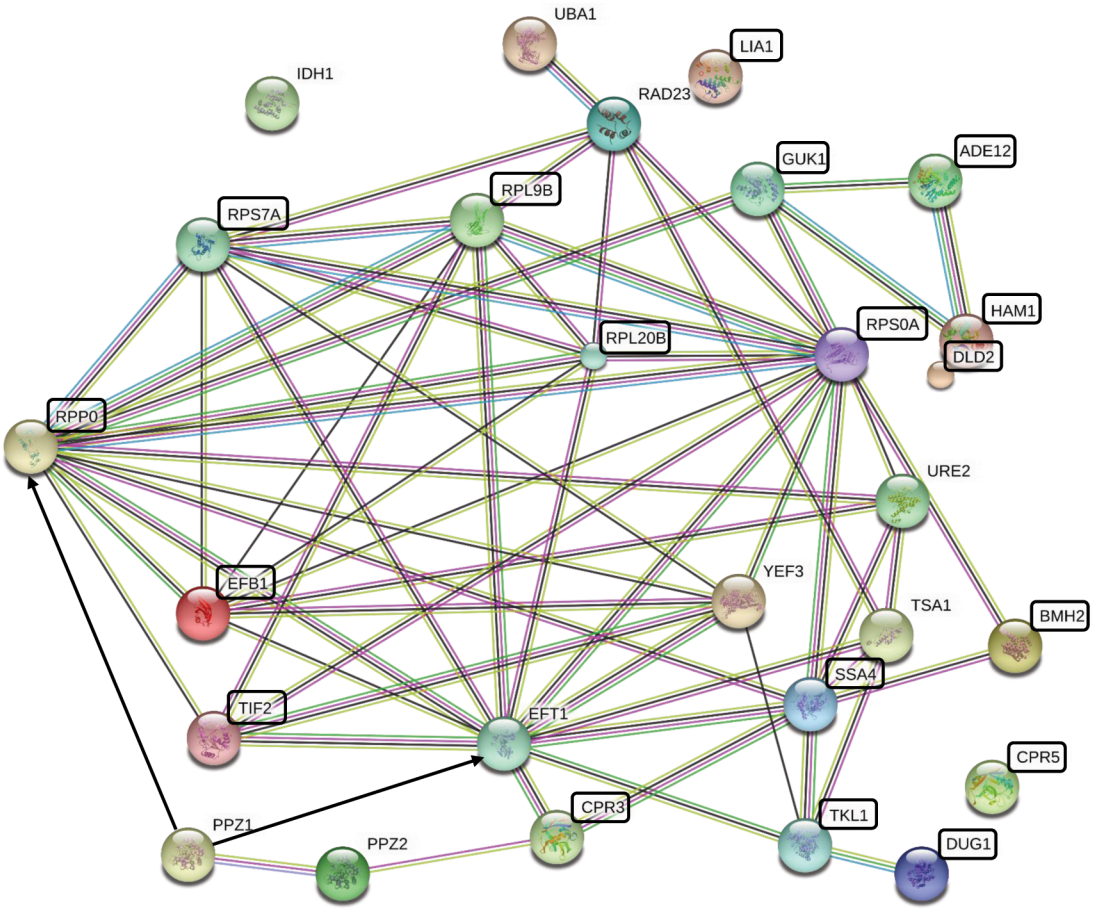


Fig 3. Protein-protein interaction network of the *S. cerevisiae* orthologs of the *C. albicans* proteins affected by CaPpz1 deletion. The network of proteins listed in Table 3 and the two budding yeast phosphatase paralogs Ppz1 and Ppz2 was generated using String 10.5 with default settings at medium stringency. The network nodes are proteins identified by the gene name, while the lines are edges representing functional associations based on different types of evidence according to the String color coding scheme. The black boxes highlight the proteins which are associated with biofilm formation. The black arrows represent the two putative substrates of Ppz1.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183176.g003

the complicated genetic manipulation of *C. albicans*, it would be more realistic to test our suggestion in *S. cerevisiae*.

Our observations are in good agreement with the results of previous genetic studies in terms of PPZ functions in the *C. albicans* and the much better characterised budding yeast *S. cerevisiae*. In addition, we found a strong correlation between the proteomic consequences of CaPPZ1 gene deletion and biofilm formation. We tested this assumption experimentally and found that in the selective Spider medium the knock out mutant showed more pronounced biofilm formation than the genetically matching control strain. Thus, by the application of the unbiased proteomic approach we identified a novel function for the phosphatase in *C. albicans*. This is an important observation, since the adhesion of the fungi to plastic surfaces can result in the contamination of medical equipment and the tight packing of the biofilm may prevent the eradication of the fungal pathogen by conventional antifungal agents that cannot reach the protected cells in the deep layer of the film [42,43]. Fig 3 shows that the orthologs of most of the biofilm related proteins are associated with the network of the potential phosphatase regulated proteins. They include all of the five ribosomal proteins, two of the translation factors, as

well as many chaperon and scaffolding proteins suggesting a connection between protein synthesis and biofilm formation. In addition, several metabolic enzymes, either associated to the main cluster (Guk1, Ade12, Ham1, and Tkl1) or isolated outliners (Lia1 and Dld2) may be involved in biofilm deposition through their metabolic activities or moonlighting functions. The reasons behind this associations is presently unknown, but our observation illustrates well how proteome data can be used to identify previously not researched processes, such as the role of CaPpz1 in biofilm formation.

Supporting information

S1 Fig. Growth curves for the *C. albicans* strains. The genetically matching control QMY23 (●) and the *cappz1* phosphatase deletion mutant (o) strains were cultivated under identical conditions as described in the Materials and methods. The optical density (OD) of the samples was monitored at 640 nm wavelength in three parallel experiments. The mean and standard deviation of a representative preparation are shown. Similar results were obtained in five independent preparations, confirming that the growth rate of the mutant strain is somewhat reduced in comparison to that of the control strain.
(TIF)

S2 Fig. Testing oligonucleotide primers. All of the primer pairs that were designed for RT-qPCR were tested on QMY23 cDNA target by PCR with Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific). The temperature profile started with a single denaturation step for 2 min at 95˚C that was followed by 30 cycles of 30 s at 95˚C, 30 s at 60˚C, and 10 s at 72˚C, and was concluded with a polishing step at 72˚C for 10 min. The amplicons were separated in 1% agarose by gel electrophoresis and were stained with GelRed (Biotium). The sizes of the DNA standards (St.) are given in base pairs. The properties of the primers as well as the sizes of the expected PCR products are summarized in S1 Table. The figure demonstrates that all of the gene specific primer pairs produce a single DNA band of the calculated size under the simulated qPCR conditions.
(TIF)

S3 Fig. Magnified image of the three gel regions containing the highlighted spots of selected proteins. Original gel sections are labelled as C1-3 for Ctrl and M1-3 for Mut samples after RuBPS protein and Pro-Q Diamond phosphoprotein staining. Spot numbers (see Table 1 and S2 Table) and the corresponding protein names (in parenthesis) are listed on the right side of each panel. All of the original data and their individual densitometric evaluation can be found at http://bmbi.med.unideb.hu/en/proteomics-core-facility.
(TIF)

S4 Fig. Microscopic morphology of the biofilms. Examples of biofilms formed by the QMY23 control (Ctrl) and *cappz1* mutant (Mut) strains after 24 hours incubation at 37˚C either in RPMI-1640 or in Spider medium. a: Ctrl in RPMI medium. b: Mut in RPMI. c: Ctrl in Spider medium. d: Mut in Spider medium. Scale bar: 100 μm.
(TIF)

S1 Table. Oligonucleotide primers used for RT-qPCR analysis. Oligonucleotide sequences are given in 5' to 3' direction. The calculated Tm points (in the order of upper to lower primers) and the expected amplicon sizes are also given for each primer pair.
(PDF)

S2 Table. Identification of *C. albicans* proteins by MS/MS. The peptide sequences identified in all of the analyzed protein spots are listed with the protein name, the Uniprot accession

number and the protein identification details in the format characteristic for the search engine used. All MS/MS spectra were analyzed by ProteinPilot, and in those cases where the analysis did not give sufficient data for protein identification a Mascot search was also performed.
(XLSX)

S3 Table. Identification of proteins in spots that exhibit significant Pro-Q Diamond staining intensity changes in the absence of CaPpz1.
(PDF)

S4 Table. Identification of proteins in spots that exhibit significant RuBPS staining intensity changes in the absence of CaPpz1.
(PDF)

Acknowledgments

Thanks are due to Dr Alexander Johnson (University of California, San Francisco, USA) for the QMY23 control strain. The authors are indebted for the expert technical assistance of Ms Andrea Farkas Tankáné (University of Debrecen, Debrecen, Hungary). This work was supported by the National Research, Development and Innovation Office—NKFIH K108989 grant.

The authors declare they have no conflict of interest.

Author Contributions

Conceptualization: István Pócsi, Éva Csősz, Viktor Dombrádi.

Data curation: Bernadett Márkus, Krisztina Szabó, Walter P. Pfliegler, Éva Csősz, Viktor Dombrádi.

Funding acquisition: Viktor Dombrádi.

Methodology: Bernadett Márkus, Krisztina Szabó, Walter P. Pfliegler, Katalin Petrényi, Enikő Boros.

Project administration: Éva Csősz, Viktor Dombrádi.

Resources: József Tőzsér, Éva Csősz, Viktor Dombrádi.

Software: Bernadett Márkus, Walter P. Pfliegler, Viktor Dombrádi.

Supervision: Éva Csősz.

Visualization: Bernadett Márkus, Krisztina Szabó, Walter P. Pfliegler, Katalin Petrényi.

Writing – original draft: Bernadett Márkus, Walter P. Pfliegler, Katalin Petrényi, Éva Csősz, Viktor Dombrádi.

Writing – review & editing: István Pócsi, József Tőzsér.

References

1. Cohen PT. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. Trends Biochem Sci. 1997; 22: 245–51. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9255065 PMID: 9255065
2. Ariño J. Novel protein phosphatases in yeast. Eur J Biochem. 2002; 269: 1072–7. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856338 PMID: 11856338
3. Balcells L, Gómez N, Casamayor A, Clotet J, Ariño J. Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. Eur J Biochem. 1997; 250: 476–83. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9428701 PMID: 9428701

4. Szöor B, Fehér Z, Zeke T, Gergely P, Yatzkan E, Yarden O, et al. pzl-1 encodes a novel protein phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase in Neurospora crassa. Biochim Biophys Acta. 1998; 1388: 260–6. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774742 PMID: 9774742
5. Minhas A, Sharma A, Kaur H, Rawal Y, Ganesan K, Mondal AK. Conserved Ser/Arg-rich Motif in PPZ Orthologs from Fungi Is Important for Its Role in Cation Tolerance. J Biol Chem. 2012; 287: 7301–7312. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299438 PMID: 22232558
6. Leiter É, González A, Erdei É, Casado C, Kovács L, Ádám C, et al. Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi. Fungal Genet Biol. 2012; 49: 708–716. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.010 PMID: 22750657
7. Kovács L, Farkas I, Majoros L, Miskei M, Pócsi I, Dombrádi V. The polymorphism of protein phosphatase Z1 gene in Candida albicans. J Basic Microbiol. 2010; 50: S74–S82. https://doi.org/10.1002/jobm.200900434 PMID: 20473966
8. Chen E, Choy MS, Petrényi K, Kónya Z, Erdődi F, Dombrádi V, et al. Molecular Insights into the Fungus-Specific Serine/Threonine Protein Phosphatase Z1 in Candida albicans. MBio. American Society for Microbiology (ASM); 2016; 7. https://doi.org/10.1128/mBio.00872-16 PMID: 27578752
9. Adam C, Erdei E, Casado C, Kovacs L, Gonzalez A, Majoros L, et al. Protein phosphatase CaPpz1 is involved in cation homeostasis, cell wall integrity and virulence of Candida albicans. Microbiology. 2012; 158: 1258–1267. https://doi.org/10.1099/mic.0.057075-0 PMID: 22343349
10. Nagy G, Hennig GW, Petrenyi K, Kovacs L, Pocsi I, Dombradi V, et al. Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of Candida albicans strains. Appl Microbiol Biotechnol. 2014; 98: 5185–5194. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5696-5 PMID: 24691869
11. Noble SM, French S, Kohn LA, Chen V, Johnson AD. Systematic screens of a Candida albicans homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. Nat Genet. 2010; 42: 590–598. https://doi.org/10.1038/ng.605 PMID: 20543849
12. Petrényi K, Molero C, Kónya Z, Erdődi F, Ariño J, Dombrádi V. Analysis of Two Putative Candida albicans Phosphopantothenoylcysteine Decarboxylase / Protein Phosphatase Z Regulatory Subunits Reveals an Unexpected Distribution of Functional Roles. Sturtevant J, editor. PLoS One. 2016; 11: e0160965. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160965 PMID: 27504636
13. de Nadal E, Fadden RP, Ruiz A, Haystead T, Arino J. A Role for the Ppz Ser/Thr Protein Phosphatases in the Regulation of Translation Elongation Factor 1B. J Biol Chem. 2001; 276: 14829–14834. https://doi.org/10.1074/jbc.M010824200 PMID: 11278758
14. Posas F, Bollen M, Stalmans W, Ariño J. Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. FEBS Lett. 1995; 368: 39–44. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615085 PMID: 7615085
15. García-Gimeno MA, Muñoz I, Ariño J, Sanz P. Molecular Characterization of Ypi1, a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Type 1 Protein Phosphatase Inhibitor. J Biol Chem. 2003; 278: 47744–47752. https://doi.org/10.1074/jbc.M306157200 PMID: 14506263
16. Posas F, Camps M, Ariño J. The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. J Biol Chem. 1995; 270: 13036–41. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768897 PMID: 7768897
17. Yenush L, Mulet JM, Ariño J, Serrano R. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K+ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. EMBO J. 2002; 21: 920–929. https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.920 PMID: 11867520
18. Lee KS, Hines LK, Levin DE. A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. Mol Cell Biol. 1993; 13: 5843–53. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395014 PMID: 8395014
19. Levin DE. Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol Mol Biol Rev. American Society for Microbiology (ASM); 2005; 69: 262–91. https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005 PMID: 15944456
20. Merchan S, Bernal D, Serrano R, Yenush L. Response of the Saccharomyces cerevisiae Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. Eukaryot Cell. American Society for Microbiology (ASM); 2004; 3: 100–7. https://doi.org/10.1128/EC.3.1.100-107.2004 PMID: 14871941
21. Muszkieta L, Aimanianda V, Mellado E, Gribaldo S, Alcàzar-Fuoli L, Szewczyk E, et al. Deciphering the role of the chitin synthase families 1 and 2 in the *in vivo* and *in vitro* growth of *A spergillus fumigatus* by multiple gene targeting deletion. Cell Microbiol. 2014; 16: 1784–1805. https://doi.org/10.1111/cmi.12326 PMID: 24946720
22. Mitrovich QM, Tuch BB, Guthrie C, Johnson AD. Computational and experimental approaches double the number of known introns in the pathogenic yeast Candida albicans. Genome Res. 2007; 17: 492–502. https://doi.org/10.1101/gr.6111907 PMID: 17351132

23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248–54. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051 PMID: 942051

24. Rabilloud T, Strub J-M, Luche S, Dorsselaer A van, Lunardi J. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. Proteomics. 2001; 1: 699–704. https://doi.org/10.1002/1615-9861(200104)1:5<699::AID-PROT699>3.0.CO;2-C PMID: 11678039

25. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A Recently Evolved Transcriptional Network Controls Biofilm Development in Candida albicans. Cell. 2012; 148: 126–138. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.048 PMID: 22265407

26. Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of Candida albicans is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol. 2003; 41: 2961–7. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843027 https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2961-2967.2003 PMID: 12843027

27. Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. Nucleic Acids Res. 2003; 31: 3635–41. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824383 PMID: 12824383

28. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. Nucleic Acids Res. Oxford University Press; 2017; 45: D362–D368. https://doi.org/10.1093/nar/gkw937 PMID: 27924014

29. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. J Proteomics. 2010; 73: 2064–2077. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.016 PMID: 20685252

30. Gauci VJ, Wright EP, Coorssen JR. Quantitative proteomics: assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. J Chem Biol. 2011; 4: 3–29. https://doi.org/10.1007/s12154-010-0043-5 PMID: 21686332

31. Aksenova A, Muñoz I, Volkov K, Ariño J, Mironova L. The HAL3-PPZ1 dependent regulation of nonsense suppression efficiency in yeast and its influence on manifestation of the yeast prion-like determinant [ISP(+)]. Genes Cells. 2007; 12: 435–45. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01064.x PMID: 17397392

32. Domínguez JM, Martín JJ. Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42: 2279–83. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9736549 PMID: 9736549

33. Mendoza A, Serramía MJ, Capa L, García-Bustos JF. Translation elongation factor 2 is encoded by a single essential gene in Candida albicans. Gene. 1999; 229: 183–91. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10095118 PMID: 10095118

34. Rodriguez-Gabriel MA, Remacha M, Ballesta JPG. Phosphorylation of Ribosomal Protein P0 Is Not Essential for Ribosome Function but Can Affect Translation †. Biochemistry. 1998; 37: 16620–16626. https://doi.org/10.1021/bi981396i PMID: 9843429

35. Clotet J, Garí E, Aldea M, Ariño J. The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. Mol Cell Biol. 1999; 19: 2408–15. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022927 PMID: 10022927

36. Karkowska-Kuleta J, Kozik A. Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. Mol Oral Microbiol. 2014; 29: 270–83. https://doi.org/10.1111/omi.12078 PMID: 25131723

37. Hernáez ML, Ximénez-Embún P, Martínez-Gomariz M, Gutiérrez-Blázquez MD, Nombela C, Gil C. Identification of Candida albicans exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. J Proteomics. 2010; 73: 1404–9. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.02.008 PMID: 20167299

38. Vialás V, Perumal P, Gutierrez D, Ximénez-Embún P, Nombela C, Gil C, et al. Cell surface shaving of Candida albicans biofilms, hyphae, and yeast form cells. Proteomics. 2012; 12: 2331–9. https://doi.org/10.1002/pmic.201100588 PMID: 22685022

39. Martínez JP, Blanes R, Casanova M, Valentín E, Murgui A, Domínguez Á. Null mutants of *Candida albicans* for cell-wall-related genes form fragile biofilms that display an almost identical extracellular matrix proteome. Calderone R, editor. FEMS Yeast Res. 2016; 16: fow075. https://doi.org/10.1093/femsyr/fow075 PMID: 27609602

40. Daniels KJ, Park Y-N, Srikantha T, Pujol C, Soll DR. Impact of Environmental Conditions on the Form and Function of Candida albicans Biofilms. Eukaryot Cell. 2013; 12: 1389–1402. https://doi.org/10.1128/EC.00127-13 PMID: 23954841

41. Pérez A, Pedrós B, Murgui A, Casanova M, López-Ribot JL MJ. Biofilm formation by Candida albicans mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain. FEMS Yeast Res. Blackwell Publishing Ltd; 2006; 6: 1074–1084. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00131.x PMID: 17042757

42. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol. 2015; 69: 71–92. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330 PMID: 26488273

43. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. Pathog Dis. 2016; 74: ftw018. https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018 PMID: 26960943

dc_1779_20

FEBS openbio

FEBS PRESS science publishing by scientists

The proteomic profile of a mouse model of proliferative vitreoretinopathy

Bernadett Márkus[1,*], Zsuzsanna Pató[1,*], Zsolt Sarang[1], Réka Albert[2], József Tőzsér[1], Goran Petrovski[2,3,†] and Éva Csősz[1,†]

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary
2 Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Szeged, Hungary
3 Department of Ophthalmology, Oslo University Hospital and University of Oslo, Norway

Keywords
2D electrophoresis; animal model; mass spectrometry; PVR; TG2

Correspondence
É. Csősz, Proteomics Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4010 Debrecen, Egyetem ter. 1, Hungary
Fax: +36 52 314989
Tel: +36 52 416432
E-mail: cseva@med.unideb.hu

*Equally contributing first authors.
†Equally contributing last authors.

(Received 14 December 2016, revised 2 May 2017, accepted 27 May 2017)

doi:10.1002/2211-5463.12252

Proliferative vitreoretinopathy (PVR) develops as a complication of retinal detachment surgery and represents a devastating condition leading to serious vision loss. A good animal model that permits extensive functional studies and drug testing is crucial in finding better therapeutic modalities for PVR. A previously established mouse model, using dispase injection, was analyzed from the proteomic point of view, examining global protein profile changes by 2D electrophoresis, image analysis and HPLC–tandem mass spectrometry-based protein identification. The easy applicability of the mouse model was used to study the role of transglutaminase 2 (TG2) in PVR formation by proteomic examination of dispase-induced TG2 knockout vitreous samples. Our data demonstrate that, despite the altered appearance of crystallin proteins, the lack of TG2 did not prevent the development of PVR.

Proliferative vitreoretinopathy (PVR) develops as a complication in 8–25% of patients undergoing primary retinal detachment surgery. It is a multifactorial disease induced by a variety of factors [1]. A hallmark of PVR is the aggressive proliferation of glial and retinal pigment epithelium (RPE) cells originating from retinal breaks or holes, making PVR an unsolved challenge. The epithelial-to-mesenchymal transition activated by different serum-derived or vitreal factors is responsible for the formation of epiretinal membrane and hence PVR pathogenesis [2,3]. Recently, we have shown activation of neural progenitor cells in human eyes with PVR near the pars plana region, from which only the glial population seemed to respond to retinal injury by targeted migration into the vitreous [4].

Extracellular matrix (ECM) deposition in PVR appears with the concomitant release of matrix-degrading enzymes including matrix metalloproteases (MMPs) with a likely function to prevent excess protein deposition [5].

Abbreviations
2-DE, 2D gel electrophoresis; Ctrl, control; ECM, extracellular matrix; FA, formic acid; IPG, immobilized pH gradient; KO, knock-out; LC, liquid chromatography; MMP, matrix metalloprotease; MS/MS, tandem mass spectrometry; MS, mass spectrometry; OCT, optical coherence tomography images; PVR, proliferative vitreoretinopathy; RPE, retinal pigment epithelium; TG2, transglutaminase 2; WT, wild-type.

FEBS Open Bio 7 (2017) 1166–1177 © 2017 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Transglutaminase 2 (TG2), the most widely studied member of the transglutaminase family [6], has various functions: it can participate in the apoptosis process; it can be present on the cell surface and in the ECM; and it can modulate tissue stability and cell–matrix interactions [7,8]. TG2 plays an important role in wound healing; its absence may cause delayed wound closure that, to a certain extent, can be valuable in reducing scar formation [9,10]. Transglutaminases are expressed in many types of normal ocular tissues [11,12] and TG2 is present in human PVR membranes. In PVR membranes, TG2 crosslinking of ECM proteins could prevent their degradation by the elevated protease activities and therefore may have an important role in the onset of PVR [5].

Although a number of proteins were identified in normal human vitreous [13,14] and the potential contribution of genetic components to PVR has been recently described by some research groups, only the alterations of a few proteins and genes has been clarified in PVR formation [15,16]. 2D gel electrophoresis (2-DE) coupled with mass spectrometry (MS)-based protein identification, the widely used proteomic tool for the analysis of protein profile changes [17], has been applied to study the human vitreal proteins characteristic of PVR formation, and the presence of extracellular proteins, such as zinc finger protein 670 and prostaglandin D2 synthase, was demonstrated [18]. In human vitreous samples originating from patients with PVR, 516 proteins have been identified by MS and increased levels of extracellular proteins and reduced levels of cytoskeletal proteins have been observed [19].

Considering the serious sight-threatening feature and high incidence of PVR, there is increasing pressure to develop better medications for the treatment of this eye condition. In order to facilitate drug discovery, various animal models have been generated in the past. Most of the models induce PVR in rabbit, rat or piglet eyes either by injecting cells or by performing very invasive surgical procedures such as retinotomy [20–22]. Our group used a suitable mouse model for PVR by injecting dispase into mouse eyes, since it is fast, reproducible and avoids use of more invasive surgical approaches [4]. The presence of PVR in mice was demonstrated by imaging techniques in our wider collaborative network [4], but the exact proteomic signature was not examined in detail.

In this work, as a continuation of the previous study, we have analyzed the vitreal protein profile of dispase-treated mice in order to examine the protein profile changes. A good animal model is increasingly important to elucidate the exact molecular pathomechanism of the PVR and can help foster drug discovery and drug testing providing suitable drug candidates for successful PVR therapy.

Materials and methods

All chemicals used for 2-DE and MS were of electrophoresis or liquid chromatography (LC)–MS grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise.

Animal samples

A mouse model of PVR was used by applying an intravitreal injection of a proteolytic enzyme, dispase. This model is known to induce glial activation as well as both epi- and subretinal membrane formation [23,24]. All animal experiments were performed according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Study protocols were approved by the Animal Care Committee of the University of Debrecen. Female 4- to 6-month-old wild-type (WT; C57/BL6, $n = 6$) and TG2KO mice ($n = 6$) were anesthetized with pentobarbital (90 $mg \cdot kg^{-1}$, i.p.), and also received one drop of 1% procaine hydrochloride (Novocaine, EGIS, Budapest, Hungary) for local anesthesia and one drop of tropicamide (Mydrum, Chauvin Aubeans, Montpellier, France) for iris dilation. Four microliters of dispase (Sigma-Aldrich; 0.4 $U \cdot \mu L^{-1}$, dissolved in sterile physiological saline solution) was injected intravitreally into the right eyes under stereomicroscopic control (Ctrl) using an automatic pipette fitted with a 30G 1/6 needle, as previously described [23]. Ctrl animals received 4 μL of sterile physiological saline solution. Stratus optical coherence tomography images (OCT; Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA) were taken following injections to confirm PVR induction and monitor disease progression (results not shown here). Ctrl and dispase-treated mice were sacrificed at the 14th day following injections when signs of PVR formation were evident: presence of epiretinal membrane and/or retinal detachment on OCT examination.

Sample preparation and purification

The vitreous bodies of mice were isolated after guillotine removal of the cornea together with a scleral galler using a scalpel blade, followed by removal of the lens. After solubilization of the vitreous body with lysis buffer (pH 8.5) containing 7 M urea, 30 mM Tris, 2 M thiourea and 4% CHAPS, the lysates were sonicated in an ice-cold water bath for 5 min and centrifuged at 16 900 ***g*** for 10 min at 4 °C. The supernatants were transferred to LoBind Eppendorf tubes and purified by Ready-Prep 2-D CleanUp Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to

the manufacturer's protocol. Briefly, following precipitation and centrifugation, the pellets were dried and resuspended in 240 μL rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 1% dithiothreitol (DTT), 2% v/v Bio-Lyte (Bio-Rad) and 0.001% bromophenol blue, and used immediately for isoelectric focusing.

2D gel electrophoresis

Three vitreous samples originating from each group (WT Ctrl, WT PVR, TG2 knock-out (KO) Ctrl, TG2 KO PVR) were subjected to 2-DE. First immobilized pH gradient (IPG) strips with an IPG (24 cm, pH 4–7; Bio-Rad) were rehydrated with extracted vitreous proteins using passive rehydration at 20 °C overnight. This was followed by isoelectric focusing performed by applying 300 V for 3 h, which was gradually increased to 3500 V in 5 h and then held at 3500 V for 18 h. After isoelectric focusing, the IPG strips were immediately placed at −70 °C until equilibration. The IPG strips were equilibrated for 15 min in equilibration buffer (500 mM Tris/HCl, pH 8.5, 6 M urea, 2% SDS, 20% glycerol) containing 0.6% DTT and for 15 min in equilibration buffer containing 1.2% iodoacetamide. In the second dimension, the strips were laid on top of 12% polyacrylamide gels and covered with agarose. Using a Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) the electrophoresis was carried out at 100 mA per gel for 24 h until the bromophenol blue dye reached the bottom of the gel. All 12 gels were run together under the same conditions. Proteins were stained using in-house prepared ruthenium II tris(bathophenanthroline disulfonate) fluorescent dye [25] and gel images were recorded using Pharos FX Plus Molecular Imager (Bio-Rad). Three biological replicates were analyzed in all cases, the samples from the Ctrl and the dispase-treated groups were processed together on the same day.

Quantitative analysis of protein expression profile using Delta2D software

Protein spot patterns were evaluated with DELTA2D (Decodon, Greifswald, Germany) software version 4.4. Briefly, the gel images were grouped as follows: (a) dispase-treated WT (WT PVR), (b) physiological saline-treated WT (WT Ctrl), (c) dispase-treated TG2 KO (TG2 KO PVR) and (d) physiological saline-treated TG2 KO (TG2 KO Ctrl). Gel images of three biological replicates were included in each group having altogether 12 images. Two data analysis sets were created: (a) in the first set, the WT Ctrl vs. WT PVR gel images were studied, while (b) in the second set, the TG2 KO Ctrl vs. TG2 KO PVR gel images were examined. Protein spot patterns of gels from each of the Ctrl and PVR groups were matched using the exact mode matching protocol and the group warping strategy. Using union mode, a fused image containing all spots present on all of the gels included in the data analysis set was generated. Every spot on each gel was quantified and the total quantity of the spots was considered as 100. The spot intensity was normalized according to the total intensity of all spots in each gel and was given as normalized spot volume (%V) compared with the total intensity. The mean of the normalized volume was calculated in the PVR group and divided by the mean of the normalized volume over the Ctrl group and the fold change values were calculated.

Statistical analysis

The quantification table was generated by the Delta2D software and the level of significance was determined automatically using Student's t test. Those spots were considered significant where the $P < 0.05$ criterion was valid.

In-gel digestion

The protein spots showing significantly different intensities upon dispase treatment were excised manually from the 2D gels using a pipette tip and were digested in-gel with trypsin. First, the gel spots were cut into 1 × 1 mm pieces and were destained using a 1 : 1 ratio of 25 mM ammonium bicarbonate pH 8.5 and 50% acetonitrile, followed by reduction with 20 mM DTT for 1 h at 56 °C. The alkylation was performed using 55 mM iodoacetamide for 45 min at room temperature in the dark, followed by digestion with 100 ng stabilized MS grade trypsin (ABSciex, California, USA) overnight at 37 °C. The reaction was stopped by adding formic acid (FA). The tryptic peptides were extracted from the gel pieces, dried in a vacuum concentrator and kept at −20 °C until MS analysis.

Protein identification by HPLC–tandem mass spectrometry

For protein identification, the samples were redissolved in 10 μL 1% FA, separated on Easy nLCII (Bruker, Coventry, UK) nanoHPLC and analyzed using a 4000QTRAP (ABSciex) mass spectrometer. The chromatographic separation was performed at a flow rate of 300 $nL \cdot min^{-1}$ in a 90 min water/acetonitrile gradient. The mobile phase A was 0.1% FA in LC-MS grade water (Sigma), while the mobile phase B was acetonitrile with 0.1% FA. The peptide mixture was loaded onto a 5 mm × 0.3 mm Zorbax 300SB desalting column packed with 5 μm particle size C18 resin (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Thereafter, the peptides were separated on a 150 mm × 75 μm Zorbax 300SB analytical column (300 Å particle size, 3.5 μm pore size C18 resin; Agilent).

The tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis was performed in positive ion mode and the information-dependent acquisition method was applied. For protein

identification, collision-induced dissociation spectra were obtained in enhanced product-ion mode at a scan rate of 4000 amu·s^{-1} and the rolling collision energy was utilized with the maximum of 80 eV. After the first mass scan (mass range 400–1700 amu), the charge state of the precursor ions was established by enhanced resolution and the MS/MS spectra of the two most intensive ions were recorded (mass range 100–1900 amu). The cycle time was 5.5 s, the spray voltage was 2800 V, the ion source gas was 50 psi, the curtain gas was 20 psi and the source temperature was 70 °C.

For protein identification based on the recorded MS/MS spectra, the PROTEINPILOT 4.5 software (ABSciex) and the UniProtKB/Swiss-Prot database (version 2014.06.11, 545536 entry) was used. The minimum criteria for protein identification were the presence of two peptides per protein with at least 95% confidence.

Results

Proteins characteristic for PVR induction upon dispase treatment in WT mice

To study the proteins involved in the pathogenesis of PVR in mice, WT C57/BL6 mice were used and PVR was induced by dispase injection. 2-DE was carried out on vitreous samples originating from three Ctrl and three dispase-treated WT mice. Gels were stained with homemade ruthenium II tris(bathophenanthroline disulfonate) [25] and the gel images were analyzed using DELTA2D (Decodon) software. The WT Ctrl group was created from the three gel images originating from physiological saline-treated samples and the WT PVR group was created from the three gel images originating from dispase-treated samples. A fused image was generated by superimposing all gel images, and altogether 698 spots could be detected on the fused image (Fig. 1). The intensity of each spot on each gel was determined and the fold change between the groups was calculated. The intensity of 30 out of 698 spots showed significant ($P < 0.05$) changes as a result of dispase treatment and these 30 spots were excised from the gel, subjected to in-gel trypsin digestion and subsequent HPLC-MS/MS-based protein identification (Tables 1 and S1). The comparison between the WT Ctrl vs. WT PVR group aimed to get information about the proteins for which altered appearance is associated with PVR.

In case of 19 spots, different forms of crystallins were identified. Crystallins are known as stress proteins, from which three main types, α, β and γ, can be distinguished. The number of spots containing α-crystallin A was the highest (eight out of 19) and the amount of various forms of crystallins except α-crystallin B (Cryab) decreased. The level of some intracellular proteins, such as α-enolase (Eno1), tubulin, creatine kinase B-type (Ckb), glutamine synthetase (Glul), G protein, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (Hnrnph1), heat shock protein β-1 (Hspb1), grifin (Grifin) and fatty-acid binding protein 5, was reduced in the dispase-treated WT samples compared with the physiological saline treated ones (Table 1). In case of spots 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 22 and 24, more than one protein with similar peptide counts reflecting almost equal quantities of each protein was detected. Therefore, the combined effect of these proteins could be monitored in such cases, and no information on the contribution of each individual protein to the spot intensity changes could be observed.

Proteins characteristic for PVR induction upon dispase treatment in TG2KO mice

Mice models are widely used to examine the function of well-defined proteins as far as the KO animals for the studied protein can easily be created. Our group previously studied TG2, a multifunctional enzyme having diverse roles in different physiological and pathological conditions [26]. TG2 has been shown to be present in PVR membranes [5], but the role of this enzyme in PVR has not been examined in detail. In order to demonstrate the feasibility of the mouse PVR model in elucidating the role of TG2 in PVR, dispase and physiological saline, respectively, were injected into the eyes of TG2 KO animals. The strategy for the study of WT Ctrl and WT PVR samples was applied in the case of TG2 KO samples as well; the vitreous samples were subjected to 2D electrophoresis followed by protein staining and image analysis. Due to a technical problem, on one of the gel images from the physiological saline-treated TG2 KO mouse eyes very few spots could be detected, so this gel image was excluded from further analyses. The images from the TG2 KO Ctrl group created from the two gel images originating from physiological saline-treated TG2 KO mouse eyes and from the TG2 KO PVR group created from the three gel images originating from dispase-treated TG2 KO mouse eyes were superimposed to generate the fused image (Fig. 2). Altogether 866 spots were detected, out of which 97 showed significant ($P < 0.05$) changes in their intensities upon dispase treatment. The amount of proteins in 33 spots increased, while in 64 spots it decreased. Interestingly, some spots within the basic pH and lower molecular mass region of the gels could be detected only in case of TG2 KO PVR samples; in spite of otherwise good quality of protein

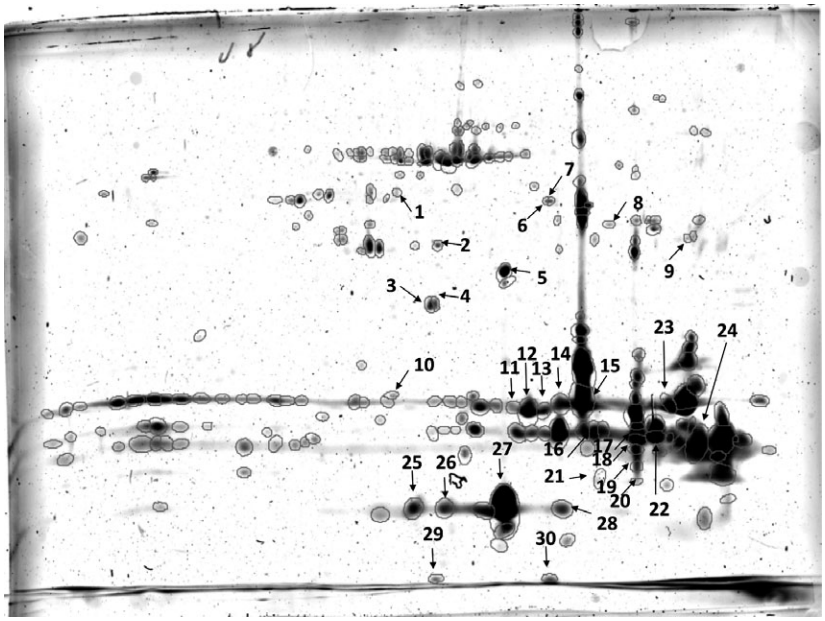


Fig. 1. Fused image generated by the superposition of WT Ctrl and WT PVR gel images using DELTA2D software. The numbered spots were found to have significantly different intensities between the groups.

separation, very few spots were visible in the gel region corresponding to basic, low molecular mass proteins in the case of the saline-treated samples (Fig. 2B). The spots showing significantly different intensities were cut out and 37 of them were subjected to protein identification using HPLC-MS/MS (Table S1).

In accordance with the previous results, most of the spots showing altered intensity changes upon dispase treatment contained α-crystallin, but in this case, their level was increased upon the treatment (Table 2 and Fig. 3). The amount of tubulin, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein and G-protein was reduced upon dispase treatment, being in accordance with previous results obtained by the analysis of WT mice. The amount of the glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase (Gapdh), cytoskletal protein β-actin-like protein 2 (Actbl2), recoverin (Rcvrn), peroxiredoxin 2, serotransferrin (Tf) and α-2-macroglobulin (Pzp) was also reduced. At the same time the level of Grifin, ferritin L and H chains and β-crystallin A1 (Cryba1) increased in TG2 KO PVR samples. When the changes upon dispase injection in WT and TG2KO mice were compared (Fig. 3), among the studied proteins four of them were changed in both WT and TG2 KO mice. The level of tubulin β-5 decreased upon dispase treatment independently of the presence of TG2, while the decrease in the level of Grifin, Cryba1 and α-crystallin A observed in WT mice changed to an increase in the TG2 KO mice as a response to dispase injection. In the case of α-crystallin A there was one spot where reduction in the protein amount could be detected in dispase-treated TG2 KO mice.

Discussion

Based on current knowledge, many cell types and various factors appear to have a role in PVR pathogenesis. RPE cells exposed to the vitreous upon retinal detachment or retinal injury, migrate and proliferate giving rise to fibroblast-like cells that are responsible for production of ECM components and a repair membrane [27–29]. Collagen, fibronectin and growth factors are then produced by activated cells (Müller glia, macrophages, modified RPE cells) or originate from the serum itself to further enhance the proliferation and migration of RPE cells and hence the epithelial-to-mesenchymal transition – a key phenomenon in PVR formation [4,29,30].

In a mouse model of PVR the intravitreal injection of the proteolytic enzyme was used to activate RPE cells [23]. Upon dispase treatment, the most prominent changes were related to different forms of crystallins. They function as chaperones, have protective roles [31] and their increased levels were found to be associated with intensive cell proliferation. Expression of Cryab has been found to be higher in tongue carcinoma compared with normal Ctrl tissue [32], overexpression of Cryab was found to be protective in retinal epithelial cells against stress-induced apoptosis [33], while at gene expression level, the amount of α-, β- and γ-crystallin increased in the retina after injury [34–36]. Secretion of Cryab in exosomes has recently been

Table 1. List of identified proteins in spots showing significantly changed intesity upon dispase injection in WT mice. The name of the identified protein, the spot number and fold change (WT PVR vs. WT Ctrl) value are indicated.

Spot ID	Protein ID	Protein name	Fold change	*P*
WT1	P99024	Tubulin β-5 chain	−0.23	0.03
WT2	Q04447	Ckb	−0.27	0.03
WT3	P62874	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β-1	−0.11	0.02
WT4	P62874	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β-1	−0.08	0.03
WT5	P24622	α-Crystallin A chain	−0.23	0.02
WT6	O35737	Hnrnph1	−0.09	0.049
WT7	O35737	Hnrnph1	−0.11	0.04
WT8	P17182	Eno1	−0.21	0.049
WT9	P15105	Glul	−0.41	0.049
WT10	P14602	Hspb1	−0.32	0.02
WT11	P02525	Cryba1	−0.17	0.01
	P62696	Crybb2		
WT12	P02525	Cryba1	−0.37	0.046
	P62696	Crybb2		
WT13	P62696	Crybb2	−0.46	0.01
	P02525	Cryba1		
	Q9JJV1	β-Crystallin A2		
WT14	P02525	Cryba1	−0.37	0.04
	P62696	Crybb2		
WT15	P02525	Cryba1	−0.41	0.01
WT16	P24622	α-Crystallin A chain	−0.51	0.02
	Q9JJV1	β-Crystallin A2		
WT17	P24622	α-Crystallin A chain	−0.50	0.001
	P02525	Cryba1		
WT18	P02525	Cryba1	−0.32	0.04
	P24622	α-Crystallin A chain		
WT19	P02525	Cryba1	−0.25	0.01
WT20	P02525	Cryba1	−0.11	0.03
WT21	P23927	Cryab	0.27	0.02
WT22	O35486	Crygs	−0.34	0.01
	P04344	γ-Crystallin B		
WT23	P62696	Crybb2	−0.36	0.0002
WT24	P2392	Cryab	−0.44	0.03
	O35486	Crygs		
	Q61597	γ-Crystallin C		
WT25	P24622	α-Crystallin A chain	−0.47	0.03
WT26	P24622	α-Crystallin A chain	−0.28	0.02
WT27	P24622	α-Crystallin A chain	−0.49	0.02
WT28	P24622	α-Crystallin A chain	−0.25	0.02
WT29	Q9D1U0	Grifin	−0.53	0.003
WT30	Q05816	Fatty acid-binding protein, epidermal	−0.25	0.004

demonstrated [37], and thus it seems logical to have this protein released into the vitreous after retinal detachment, a phenomenon that often precedes the PVR formation. We here demonstrate for the first time increased levels of Cryab in the vitreous upon dispase treatment. It is not clear whether the increased crystallin level inhibits apoptosis of RPE cells via caspase 3 and 6 inhibition [38] and thus shifts the balance toward RPE cell proliferation or if the proliferating RPE cells produce and release more crystallin into the vitreous, which further enhances and sustains the RPE cell proliferation; in both scenarios, however, the result is a decreased apoptosis and increased RPE cell proliferation [33]. In our study, the crystallins, especially α-crystallin A, show an extensive post-translational modification upon dispase treatment; almost half of the spots containing some forms of crystallin contained α-crystallin A. There is evidence that in oxidative stress conditions following ischemia–reperfusion injury the amount and post-translational modifications of

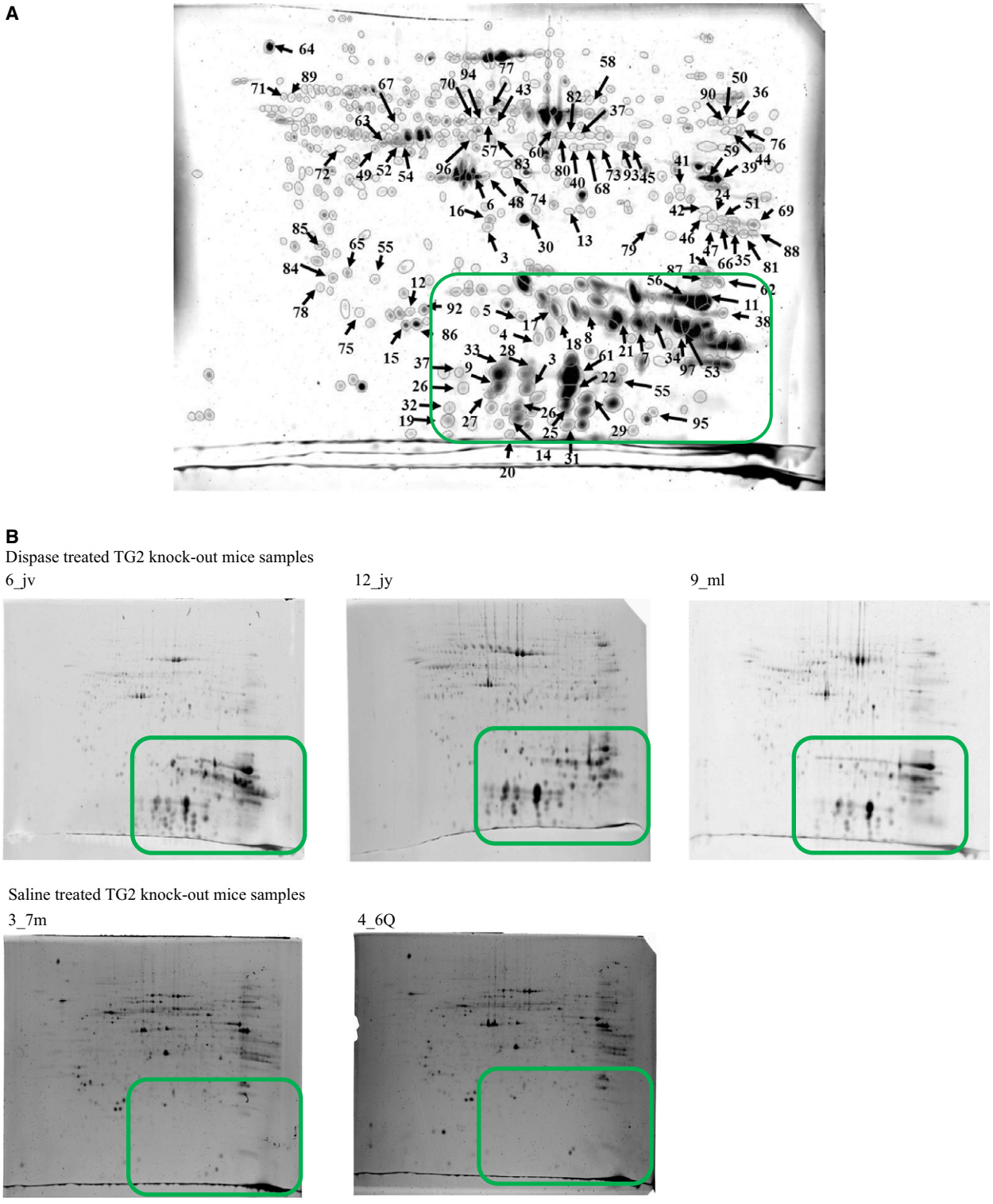


Fig. 2. Fused image generated by the superposition of TG2KO Ctrl and TG2KO PVR gel images using DELTA2D software. (A) Image containing all spots. The numbered spots were found to have significantly different intensities between the groups. (B) Different spot pattern observed on the individual examined gels with emphasis on basic pH and lower molecular mass region.

Table 2. List of identified proteins in spots showing significantly changed intesity upon dispase injection in TG2KO mice. The name of the identified protein, the spot number and the fold change (TG2KO PVR vs. TG2KO Ctrl) value are indicated.

Spot ID	Protein ID	Protein name	Fold change	*P*
TG2KO1	P99024	Tubulin β-5 chain	−5.57	0.003
	P68373	Tubulin α-1C chain		
TG2KO3	P24622	α-crystallin A chain	76.45	0.01
TG2KO7	P70333	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	−9.51	0.003
TG2KO14	P09528	Fth1	5.82	0.04
TG2KO15	P24622	α-Crystallin A chain	−6.28	0.005
TG2KO16	Q8BFZ3	Actbl2	−7.01	0.01
TG2KO18	P02525	Cryba1	41.04	0.05
TG2KO19	P02525	Cryba1	5.13	0.01
TG2KO20	P24622	α-Crystallin A chain	49.71	0.01
TG2KO26	P24622	α-Crystallin A chain	128.66	0.02
TG2KO27	P02525	Cryba1	4.25	0.03
TG2KO31	P34057	Rcvrn	−18.90	0.02
TG2KO33	P16125	L-Lactate dehydrogenase B chain	−7.59	0.007
TG2KO34	P24622	α-Crystallin A chain	106.31	0.005
TG2KO38	Q61171	Prdx2	−7.51	0.001
TG2KO42	Q61838	Pzp	−20.54	0.0002
TG2KO44	P24622	α-Crystallin A chain	196.24	0.006
TG2KO47	P29391	Ferritin light chain 1	56.65	0.04
TG2KO48	P24622	α-Crystallin A chain	9.03	0.01
TG2KO49	P24622	α-Crystallin A chain	17.14	0.02
	Q9D1U0	Grifin		
TG2KO50	P24622	α-Crystallin A chain	8.92	0.02
TG2KO51	P24622	α-Crystallin A chain	83.15	0.003
TG2KO55	P24622	α-Crystallin A chain	31.65	0.03
TG2KO60	P16858	Gapdh	−13.74	0.0002
TG2KO64	P24622	α-Crystallin A chain	42.28	0.0005
TG2KO67	P24622	α-Crystallin A chain	18.79	0.02
TG2KO70	P24622	α-Crystallin A chain	22.95	0.0005
TG2KO74	P24622	α-Crystallin A chain	88.39	0.03
TG2KO77	P24622	α-Crystallin A chain	31.74	0.005
TG2KO83	P62880	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β-2	−16.39	0.0001
TG2KO84	P24622	α-Crystallin A chain	12.72	0.01
TG2KO87	P24622	α-Crystallin A chain	21.14	0.0006
TG2KO88	P24622	α-Crystallin A chain	36.78	0.0007
TG2KO90	P24622	α-Crystallin A chain	11.36	0.004
	P02525	Cryba1		
	P35700	Peroxiredoxin-1		
TG2KO91	P06151	L-Lactate dehydrogenase A chain	−22.83	0.0005
TG2KO94	Q921I1	Tf	−7.40	0.0005
TG2KO96	P24622	α-Crystallin A chain	23.98	0.0002

crystallins are changed [38]. The pathophysiological conditions leading to post-translational modifications can only be speculated upon, hypothesizing the effect of MMPs and dispase, respectively, but to best of our knowledge, no experiments aiming to elucidate the phenomena behind the crystallin profile changes have been carried out.

The proteomic analysis of rat and rabbit PVR models have revealed the down-regulation of collagen-Iα1, α-1-antiproteinase and peroxiredoxin-2 (Prdx2) in rabbit vitreous, and up-regulation of different forms of α-crystallin A, Tf, β-crystallin B2 (Crybb2), matrix metalloproteinase-3 and other proteins in rabbit retina [39,40]. The amount of the Eno1, vimentin, albumin and prohibitin was increased, while the amount of tubulin β-2C, fructose-bisphosphate aldolase A and other proteins was reduced in the retina of animals after retinal detachment [22]. In the case of these models the PVR induction was done either by mechanical injury or by retinal detachment surgery and the examined sample was rabbit retina or vitreous [22,39,40].

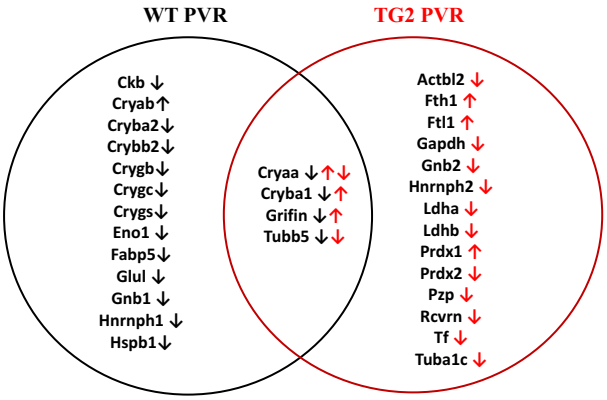


Fig. 3. Summary of proteomic results of the proteins showing significant alterations in their amount upon dispase treatment. Black and red arrows show the direction of changes in WT and in TG2 KO samples, respectively, upon dispase treatment, compared with the physiological saline treated samples. The black arrows refer to the changes in the WT mice while the red arrows show the changes in the TG2 KO mice upon dipsase treatment. The abbreviations of protein names are used according to gene name. Cryaa, α-crystallin A chain; Cryba2, β-crystallin A2; Crygb, γ-crystallin B; Crygc, γ-crystallin C; Fabp5, fatty acid-binding protein, epidermal; Ftl1, ferritin light chain 1; Gnb1, guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β-1; Gnb2, guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β-2; Hnrnph2, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2; Ldha, L-lactate dehydrogenase A chain; Ldhb, L-lactate dehydrogenase B chain; Prdx1, peroxiredoxin-1; Tuba1c, tubulin α-1C chain; Tubb5, tubulin β-5 chain.

The differentially expressed proteins upon dispase injection in WT mice, except Hnrnph1, Glul, ferritin H chain, Cryba1 and Grifin, were also found in human vitreous proteome [13]. The level of Crybb2 and S was reduced in mice in accordance with published human data; using MS the above-mentioned crystallin forms were detected in donors but not in patients with PVR [19]. In human vitreous proteome of patients with proliferative diabetic retinopathy, a decrease in the amount of α-crystallin A, β-crystallin S (Crygs), tubulin β and creatin kinase B was observed [41] suggesting the possible implication of these proteins in the proliferative conditions; however, it is not known if their reduced level is the cause or the consequence of the proliferative state.

One of the methods used to examine the function of a gene or protein is by removing the gene by knocking it out from the genome [42]. This KO technology can be used to study the function of various genes [43] and in our study we have chosen to examine the function of TG2 in PVR.

TG2, having transglutaminase, kinase and deamidase activities, can modify more than 300 different substrates [44], and can interact with numerous proteins (http://genomics.dote.hu/wiki) having a role in different physiological processes such as ECM remodeling [5] and wound healing [45]. Transglutaminase activity is known to be present in the eye [46]; as a protein crosslinker, TG2 may participate in cell adhesion in various ocular diseases such as allergic conjunctivitis [47], abrasion, cataract [48] and glaucoma [49]. TG2 was found in PVR membranes and it was shown to modulate the phenotype and migration of RPE cells and Ctrl the ECM remodeling in PVR [5,50]. Our working hypothesis was that the crosslinking activity of TG2 may prevent the appropriate degradation of ECM proteins by the elevated protease activities, and therefore may contribute to the PVR development.

In order to study the role of TG2, a TG2 KO animal was created and PVR formation was examined in the absence of TG2. Interestingly, in spite of the marked protein profile changes (see below), OCT examinations suggested the formation of PVR (data not shown). It is not excluded, however, that TG2 may affect the timing of PVR formation but we do not have such information as we examined the already formed PVR condition only.

In the TG2 KO animals, the dispase treatment resulted in altered crystallin network; the α-crystallin A and Cryab levels were increased. Both α crystallin A and B have been previously shown to be capable of inhibiting apoptosis [38], and they might supplement each other's function.

In the TG2 KO PVR samples, compared with the WT PVR samples, a different crystallin profile change was seen, yet the pathological outcome appeared to be the same at the time point of the analysis. TG2 has different substrates that it can bind to [44,51], and therefore, depending on which one of these substrates is available for binding to it under different pathological conditions, it is not unexpected to induce an altered crystallin profile. These data indicate that more than one type of change in the profile of crystallins might be associated with PVR in mice. Crystallin changes have been observed in general in the case of proliferative diseases [31] and most probably the crystallin profile changes are not specific to PVR. According to the data presented in the literature, it cannot be judged if the crystallin profile changes are the cause or the consequence of a proliferative disease.

The crystallins identified in the different spots, having various pI values and sizes, most probably are the result of extensive post-translational modifications affecting both the size and the net charge of the protein [52]. Such modifications might result in spots

showing opposite intensity changes containing the same protein. In TG2 KO PVR mice, the dispase injection led to increased α-crystallin A amounts observed in spots 2, 9, 10, 14, 17, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33 and 37 and decreased amounts observed in spot 5 indicating the presence of the extensive post-translational modifications.

Taking into account that dispase is a protease and TG2 is a crosslinking enzyme generating protease-resistant isopeptide bonds, one may speculate that in the absence of TG2, the proper crosslinks cannot be formed, which might result in increased crystallin cleavage by dispase. This may be the reason why some spots containing α-crystallin are present in the lower molecular mass region of the TG2 KO PVR gels. The present study did not test this possibility; further research is needed to clarify the situation. It is likely that these differences will shine light on the different substrates that may play a role in the pathogenesis of PVR *in vivo*.

In the TG2 KO mice the dispase injection led to increased amounts of ferritin heavy and light chains. Ferritin maintains the iron homeostasis by limiting the level of Fe (II) able to participate in the formation of reactive oxygen species, thus protecting against oxidant toxicity [53]. In the TG2 KO PVR samples, the intensity of ferritin light chain-containing spots exceeded by almost 10 times the intensity of ferritin heavy chain (Fth1)-containing spots, which can be indicative of oxidative stress.

Conclusion

The examination of protein profile changes in the dispase-induced mouse model of PVR by 2D electrophoresis followed by image analysis and subsequent HPLC-MS/MS-based protein identification has shown extensive changes related to crystallin proteins in dispase-injected mice vitreous. To demonstrate the utility of this mouse model for functional studies, the dispase treatment was carried out on TG2KO mice and the model was used successfully to get more information on the protein profile changes in PVR in the lack of TG2. TG2 appears to be responsible for the remodeling of protein networks with alterations in stress management, indicating a possible protective role of TG2 in the resolution of stress during PVR pathogenesis. The study provides further evidence on the utility and applicability of the dispase-induced mouse model for studying PVR, which can further help in understanding the pathomechanism of the disease, and provide a dynamic system for drug discovery and testing.

Acknowledgements

This work was supported in part by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences for Éva Csősz, TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 and TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 project implemented through the New Széchenyi Plan co-financed by the European Social Fund. Zsuzsanna Pató is the receiver of an Astellas Pharma Ltd fellowship. The work of Dr Ivan Uray in the critical review of the manuscript is greatly acknowledged.

Author contributions

EC, JT and GP designed the experiments, AR, GP and ZS carried out the animal treatment, intravitreal dispase injection and vitreous sample collection, BM and PZ performed the experiments, BM, PZ and EC evaluated the data and prepared the figures and tables, EC wrote the manuscript, and JT and GP reviewed the manuscript. The authors declare they have no conflict of interest.

References

1 Pastor JCC, de la Rúa ERR, Martín F and Martín F (2002) Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* **21**, 127–144.
2 Yang S, Li H, Li M and Wang F (2015) Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Discov Med* **20**, 207–217.
3 Tosi GM, Marigliani D, Romeo N and Toti P (2014) Disease pathways in proliferative vitreoretinopathy: an ongoing challenge. *J Cell Physiol* **229**, 1577–1583.
4 Johnsen EO, Frøen RC, Albert R, Omdal BK, Sarang Z, Berta A, Nicolaissen B, Petrovski G and Moe MC (2012) Activation of neural progenitor cells in human eyes with proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res* **98**, 28–36.
5 Priglinger SG, May CA, Neubauer AS, Alge CS, Schönfeld CL, Kampik A and Welge-Lussen U (2003) Tissue transglutaminase as a modifying enzyme of the extracellular matrix in PVR membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 355–364.
6 Fesus L and Piacentini M (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci* **27**, 534–539.
7 Aeschlimann D and Thomazy V (2000) Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res* **41**, 1–27.
8 Fésüs L and Szondy Z (2005) Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Lett* **579**, 3297–3302.

9 Tong L, Png E, Aihua H, Yong SS, Yeo HL, Riau A, Mendoz E, Chaurasia SS, Lim CT, Yiu TW *et al.* (2013) Molecular mechanism of transglutaminase-2 in corneal epithelial migration and adhesion. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 1304–1315.
10 Verderio EAM, Johnson T and Griffin M (2004) Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. *Amino Acids* **26**, 387–404.
11 Lorand L and Graham RM (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 140–156.
12 Samuelsson B, Stenberg P and Pandolfi M (1982) Localization and characteristics of transglutaminase in the rabbit and human eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **218**, 233–236.
13 Aretz S, Krohne TU, Kammerer K, Warnken U, Hotz-Wagenblatt A, Bergmann M, Stanzel BV, Kempf T, Holz FG, Schnölzer M *et al.* (2013) In-depth mass spectrometric mapping of the human vitreous proteome. *Proteome Sci* **11**, 22.
14 Skeie JM, Roybal CN and Mahajan VB (2015) Proteomic insight into the molecular function of the vitreous. *PLoS ONE* **10**, e0127567.
15 Sanabria Ruiz-Colmenares MR, Pastor Jimeno JC, Garrote Adrados JA, Telleria Orriols JJ and Yugueros Fernández MI (2006) Cytokine gene polymorphisms in retinal detachment patients with and without proliferative vitreoretinopathy: a preliminary study. *Acta Ophthalmol Scand* **84**, 309–313.
16 Rojas J, Fernandez I, Pastor JC, Garcia-Gutierrez M-TT, Sanabria R-MM, Brion M, Sobrino B, Manzanas L, Giraldo A, Rodriguez-de la Rua E *et al.* (2009) Development of predictive models of proliferative vitreoretinopathy based on genetic variables: the retina 4 project. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 2384–2390.
17 Rabilloud T, Chevallet M, Luche S and Lelong C (2010) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *J Proteomics* **73**, 2064–2077.
18 Kuo H-K, Chen Y-H, Huang F, Wu Y-C, Shiea J and Wu P-C (2016) The upregulation of zinc finger protein 670 and prostaglandin D2 synthase in proliferative vitreoretinopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* **254**, 205–213.
19 Yu J, Peng R, Chen H, Cui C and Ba J (2012) Elucidation of the pathogenic mechanism of rhegmatogenous retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy by proteomic analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 8146–8153.
20 Agrawal RN, He S, Spee C, Cui JZ, Ryan SJ and Hinton DR (2007) *In vivo* models of proliferative vitreoretinopathy. *Nat Protoc* **2**, 67–77.
21 Ding X, Bai Y, Zhu X, Li T, Jin E, Huang L, Yu W and Zhao M (2017) The effects of pleiotrophin in proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **255**, 873–884.
22 Mandal N, Lewis GP, Fisher SK, Heegaard S, Prause JU, la Cour M, Vorum H and Honoré B (2011) Protein changes in the retina following experimental retinal detachment in rabbits. *Mol Vis* **17**, 2634–2648.
23 Cantó Soler MV, Gallo JE, Dodds RA and Suburo AM (2002) A mouse model of proliferative vitreoretinopathy induced by dispase. *Exp Eye Res* **75**, 491–504.
24 Frenzel EM, Neely KA, Walsh AW, Cameron JD and Gregerson DS (1998) A new model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 2157–2164.
25 Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A and Lunardi J (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**, 699–704.
26 Wang Z and Griffin M (2012) TG2, a novel extracellular protein with multiple functions. *Amino Acids* **42**, 939–949.
27 Hiscott P, Sheridan C, Magee RM and Grierson I (1999) Matrix and the retinal pigment epithelium in proliferative retinal disease. *Prog Retin Eye Res* **18**, 167–190.
28 Vidaurri-Leal J, Hohman R and Glaser BM (1984) Effect of vitreous on morphologic characteristics of retinal pigment epithelial cells. A new approach to the study of proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* **102**, 1220–1223.
29 Kirchhof B and Sorgente N (1989) Pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. Modulation of retinal pigment epithelial cell functions by vitreous and macrophages. *Dev Ophthalmol* **16**, 1–53.
30 Campochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM, Cardin A and Michels RG (1985) Vitreous aspirates from patients with proliferative vitreoretinopathy stimulate retinal pigment epithelial cell migration. *Arch Ophthalmol* **103**, 1403–1405.
31 Andley UP (2007) Crystallins in the eye: function and pathology. *Prog Retin Eye Res* **26**, 78–98.
32 He Q-Y, Chen J, Kung H-F, Yuen AP-W and Chiu J-F (2004) Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics* **4**, 271–278.
33 Alge CS, Priglinger SG, Neubauer AS, Kampik A, Zillig M, Bloemendal H and Welge-Lussen U (2002) Retinal pigment epithelium is protected against apoptosis by alphaB-crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3575–3582.
34 Sakaguchi H, Miyagi M, Darrow RM, Crabb JS, Hollyfield JG, Organisciak DT and Crabb JW (2003) Intense light exposure changes the crystallin content in retina. *Exp Eye Res* **76**, 131–133.

35 Yoshimura N, Kikuchi T, Kuroiwa S and Gaun S (2003) Differential temporal and spatial expression of immediate early genes in retinal neurons after ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 2211–2220.
36 Vázquez-Chona F, Song BK and Geisert EE (2004) Temporal changes in gene expression after injury in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 2737–2746.
37 Bhat SP and Gangalum RK (2011) Secretion of αB-Crystallin via exosomes: new clues to the function of human retinal pigment epithelium. *Commun Integr Biol* **4**, 739–741.
38 Hong SM and Yang YS (2012) A potential role of crystallin in the vitreous bodies of rats after ischemia-reperfusion injury. *Korean J Ophthalmol* **26**, 248.
39 Mandal N, Lewis GP, Fisher SK, Heegaard S, Prause JU, la Cour M, Vorum H and Honoré B (2015) Proteomic analysis of the vitreous following experimental retinal detachment in rabbits. *J Ophthalmol* **2015**, 583040.
40 Zhou Q, Xu G, Zhang X, Cao C and Zhou Z (2012) Proteomics of post-traumatic proliferative vitreoretinopathy in rabbit retina reveals alterations to a variety of functional proteins. *Curr Eye Res* **37**, 318–326.
41 Wang H, Feng L, Hu J, Xie C and Wang F (2013) Differentiating vitreous proteomes in proliferative diabetic retinopathy using high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Exp Eye Res* **108**, 110–119.
42 Hall B, Limaye A and Kulkarni AB (2009) Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 19**, Unit 19.12, 1–17.
43 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2002) Studying Gene Expression and Function. *Molecular Biology of the Cell*. Chapter 8, 4th edn. Garland Science, New York, NY, USA.
44 Csősz É, Meskó B and Fésüs L (2009) Transdab wiki: the interactive transglutaminase substrate database on web 2.0 surface. *Amino Acids* **36**, 615–617.
45 Haroon ZA, Hettasch JM, Lai TS, Dewhirst MW and Greenberg CS (1999) Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *FASEB J* **13**, 1787–1795.
46 Raghunath M, Cankay R, Kubitscheck U, Fauteck JD, Mayne R, Aeschlimann D and Schlötzer-Schrehardt U (1999) Transglutaminase activity in the eye: cross-linking in epithelia and connective tissue structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2780–2787.
47 Sohn J, Kim T-I, Yoon Y-H, Kim J-Y and Kim S-Y (2003) Novel transglutaminase inhibitors reverse the inflammation of allergic conjunctivitis. *J Clin Invest* **111**, 121–128.
48 Wan XH, Lee EH, Koh HJ, Song J, Kim EK, Kim CY, Lee JB, Kim S-Y, Yao K and Lee JH (2002) Enhanced expression of transglutaminase 2 in anterior polar cataracts and its induction by TGF-beta *in vitro*. *Br J Ophthalmol* **86**, 1293–1298.
49 Tovar-Vidales T, Roque R, Clark AF and Wordinger RJ (2008) Tissue transglutaminase expression and activity in normal and glaucomatous human trabecular meshwork cells and tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 622–628.
50 Priglinger SG, Alge CS, Neubauer AS, Kristin N, Hirneiss C, Eibl K, Kampik A and Welge-Lussen U (2004) TGF-beta2-induced cell surface tissue transglutaminase increases adhesion and migration of RPE cells on fibronectin through the gelatin-binding domain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 955–963.
51 Csosz E, Bagossi P, Nagy Z, Dosztanyi Z, Simon I and Fesus L (2008) Substrate preference of transglutaminase 2 revealed by logistic regression analysis and intrinsic disorder examination. *J Mol Biol* **383**, 390–402.
52 Fort PE and Lampi KJ (2011) New focus on alpha-crystallins in retinal neurodegenerative diseases. *Exp Eye Res* **92**, 98–103.
53 Torti FM (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* **99**, 3505–3516.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. List of proteins identified based upon recorded MS/MS spectra.

Journal of Proteomics 153 (2017) 30–43

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Review

Quantitative body fluid proteomics in medicine — A focus on minimal invasiveness

Éva Csősz [a], Gergő Kalló [a], Bernadett Márkus [a], Eszter Deák [a,b], Adrienne Csutak [b], József Tőzsér [a,*]

[a] Proteomics Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1, 4032 Debrecen, Hungary
[b] Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1, 4032 Debrecen, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 March 2016
Received in revised form 27 July 2016
Accepted 8 August 2016
Available online 16 August 2016

Keywords:
Body fluid
Quantitative proteomics
Targeted proteomics
Biomarker
AMP

ABSTRACT

Identification of new biomarkers specific for various pathological conditions is an important field in medical sciences. Body fluids have emerging potential in biomarker studies especially those which are continuously available and can be collected by non-invasive means. Changes in the protein composition of body fluids such as tears, saliva, sweat, etc. may provide information on both local and systemic conditions of medical relevance. In this review, our aim is to discuss the quantitative proteomics techniques used in biomarker studies, and to present advances in quantitative body fluid proteomics of non-invasively collectable body fluids with relevance to biomarker identification. The advantages and limitations of the widely used quantitative proteomics techniques are also presented. Based on the reviewed literature, we suggest an ideal pipeline for body fluid analyses aiming at biomarkers discoveries: starting from identification of biomarker candidates by shotgun quantitative proteomics or protein arrays, through verification of potential biomarkers by targeted mass spectrometry, to the antibody-based validation of biomarkers. The importance of body fluids as a rich source of biomarkers is discussed.

Significance: Quantitative proteomics is a challenging part of proteomics applications. The body fluids collected by non-invasive means have high relevance in medicine; they are good sources for biomarkers used in establishing the diagnosis, follow up of disease progression and predicting high risk groups. The review presents the most widely used quantitative proteomics techniques in body fluid analysis and lists the potential biomarkers identified in tears, saliva, sweat, nasal mucus and urine for local and systemic diseases.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 31
2. Biomarkers . . . 31
3. Tear fluid as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases . . . 33
4. Saliva – the easily accessible, continuously available source for biomarkers . . . 33
5. Sweat biomarkers for local and systemic conditions . . . 33
6. Nasal secretion as a valuable source of potential biomarkers . . . 35
7. Cervicovaginal fluid as source for biomarkers for obstetrics and gynecology . . . 35
8. Urine biomarkers for systemic and urogenital diseases . . . 35
9. Body fluids as part of the innate immune system . . . 36
10. Extracellular vesicles – future perspectives . . . 37
11. Conclusion . . . 37
Transparency document . . . 39
Acknowledgement . . . 39
References . . . 39

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4010 Debrecen, Egyetem ter. 1, Hungary.
E-mail address: tozser@med.unideb.hu (J. Tőzsér).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.009
1874-3919/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

With the advances of diagnostic techniques there is an increasing demand for non- or minimally invasive methods in medical diagnosis. The constantly produced and continuously available body fluids which can be collected by non-invasive means such as tears, saliva, sweat etc. can provide a feasible alternative to cerebrospinal fluid, amniotic fluid, synovial fluid, bronchoalveolar lavage fluid, serum etc. for diagnostic purposes. In some cases the analysis of body fluids collected by invasive means cannot be avoided but considering the need for well-trained medical workers, the possibility of infections and complications, and costs of medical interventions required for the collection of the body fluids increase the need for utilization of non-invasively collectable body fluids. In this review we will present the diagnostic utility of those body fluids which can be collected without medical intervention, such as tears, saliva, sweat, nasal secretion, cervicovaginal secretion and urine and we will discuss the biomarkers discovered with the administration of proteomics techniques.

Quantitative proteomics is a challenging part of proteomics, providing information not only on the presence or absence of proteins or protein isoforms, but also on their quantities. Typically, mass spectrometry, electrophoresis or immunological assays are utilized to give the relative or absolute quantities of proteins of interest. Absolute quantification determines the exact concentration of proteins, while in relative quantifications, only the relative change in protein quantity is compared in different conditions [1]. In most cases, relative quantification is sufficient to answer biological questions regarding changes in the amount of proteins following treatment, or when comparing two or more states. Relative quantification can give us an idea about protein-level changes in different states and conditions, and can show us differentially expressed proteins. The semi-quantitative ELISA, one- or two-dimensional gel electrophoresis [2] and most of mass spectrometry-based techniques are suitable for relative quantification (Table 1).

For absolute quantification, a more elaborate experimental setup is needed. The simplest method for absolute quantification is the quantitative ELISA and the multiplex immunobead assay [3], however, these are rather expensive methods. Regarding mass spectrometry-based techniques, SRM-based targeted proteomics using various dilutions of purified, stable isotope labeled peptides is the method of choice [4]. Absolute quantification is required when the exact protein amount has biological significance, as in the case of stoichiometry analysis of protein complexes, biopharmaceutical applications for quality control or drug safety, inter- or intra-laboratory cross-validations, biomarker studies, or when the amount of various proteins within the same sample is required [1].

It is very hard to find the ideal quantitative proteomics technique applicable for the body fluid analysis; researchers willing to administrate such techniques should find the optimal solution matching their needs, considering the biological question, sample availability, costs, workload, and availability of mass spectrometers (Table 1). The presence of highly abundant proteins, such as α-amylase in saliva, dermcidin is sweat, lactotransferrin, lysozyme-C, etc. in tears and the low amount of available sample, especially when posttranslational modifications are to be studied, may require the administration of protein depletion and/or enrichment [5,6]. However the possible loss of quantitative information may hinder the wide application of these methods in the examination of non-invasively collectable body fluids. The administration of antibodies and the use of well-defined standards to monitor for example phosphoprotein enrichment [7] make possible the utilization of quantitative data. Another variation of protein enrichment is the utilization of antibodies against the digested peptides in the samples [8]. The Stable Isotope Standards with Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA) approach can be utilized to enrich specific peptides from different samples by using anti-peptide antibodies to capture endogenous peptides and spiked stable isotope-labeled internal standard peptides [9].

2. Biomarkers

The two major fields utilizing quantitative proteomics in medicine are biomarker studies and identification of therapeutic targets; however, these two fields sometimes overlap. In some conditions, proteins are considered biomarkers when identified as having a central role in the normal or pathological function of the cells/tissues, and their presence or absence causes a malfunction leading to disease [10]. Consequently, biomarkers are at the same time targets for drug design and therapy [11]. In other cases, although the biomarkers can give information regarding alterations related to disease, they are not suitable targets for therapeutic intervention; their presence, absence or differential expression may be the consequence and not the cause of the pathological condition, hence, they cannot be used as target for therapies, nor can they explain the pathophysiological phenomena [12]. In this review, our aim is to show advances in the biomarker field aided by quantitative proteomics. According to the National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group, a biomarker is “a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention” [13]. In recent years, studies aiming to identify biomarkers specific for different pathological conditions emerged, and hundreds of proteins were shown to be potential biomarkers specific for various diseases [14].

In this review the potential biomarker term will be used for proteins whose level is significantly different between the disease and control groups, while the validated biomarker will refer to those proteins which were validated using an independent antibody-based technique.

Despite the fact that advances in research techniques and intensive efforts in biomarker studies had led to identification of high numbers of potential biomarkers in the discovery phase, the number of FDA approved biomarkers is much less [15–21]. One reason for drastically decreasing the number of validated biomarkers as they go through the verification and validation processes can be the lack of standardized workflows [14]. Comparative studies examining protein profiles usually include less than ten samples per group, with different analytical methods detecting many differentially expressed proteins between the diseased and control groups. The number and identity of the differentially expressed proteins can vary from study to study, depending on the sensitivity of the applied analytical method, the size of the groups, and the patients enrolled in the study. Ideally, the only difference between the diseased and control groups should be the presence or absence of the disease [22]. In small groups, this is possible, however, when larger patient cohorts are enrolled, the presence of secondary disorders serves as hindrance to the analysis.

The Clinical Proteomic Technologies for Cancer (CPTC) initiative established by the National Cancer Institute recommends a workflow for cancer biomarker development [14]. They suggest the use of SRM-based targeted proteomics method for verification of hundreds of potential biomarkers identified in the discovery phase. For verification, a large sample number is required. Ideally, hundreds of samples are analyzed, and after verification, the biomarkers can be subjected to the next step, the validation step. For validation, only few proteins should be chosen and tested on thousands of samples. Statistical analysis, including ROC curves [23] for biomarkers proved to be convenient in the verification process can help identify the proteins with the highest specificity and sensitivity in discriminating between the control and diseased groups.

Immunoassays are also very suitable for biomarker validation, allowing for analysis of large sample numbers in a short period of time. When multiple proteins have to be validated, the utilization of multiplex immunobead assays are more cost effective [3].

One of the bottlenecks of biomarker studies is sample availability. From pathophysiological point of view, it is of critical importance to analyze the tissue or the biological material in which the alteration happens, as well as the proximity of the material to the site of

Table 1
Benefits and shortcomings of the widely used quantitative proteomics methods.

Major consideration on method selection	2DE	Metabolic labeling	Chemical labeling	Label-free quantification	SRM	HR-SRM	PRM	SWATH	Multiplex immunobead assay	SELDI-TOF
Relative quantification	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible
Absolute quantification	Not suitable	Not suitable	Not suitable	Possible	Possible	Possible	Possible	Not suitable	Possible	Not suitable
Reproducibility	Fair	Very good	Good	Very good	Very good	Very good	Very good	Good	Very good	Fair
Sensitivity	Good, depends on the type of dye applied	Good, depends on the type of instrument applied	Good, depends on the type of instrument applied	Very good	Very good	Very good	Very good	Very good	Very good	Good
Possibility to analyze multiple samples in one run	Possible	Possible	Possible	Not possible	Not possible	Not possible	Not possible	Not possible	Not possible	Not possible
Possibility to analyze multiple analytes in one run	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible	Possible
Type of mass spectrometer required	No specific requirement	No specific requirement	No specific requirement	Preferably Orbitrap	Triple quadrupole, QTRAP	Q-TOF	Quadrupole-Orbitrap	Preferably Q-TOF	Not applicable	SELDI-TOF
Manual work requirement	Very high	High	High	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Low
Special advantages	• Global changes of protein profiles can be examined •Post-ranslational modifications can be detected • Any kind of sample can be analyzed	• 100% label incorporation efficiency	• Any kind of sample can be analyzed	• Any kind of sample can be analyzed	• Wide dynamic range • Availability of databases containing SRM transitions	• High resolution • All transitions can be monitored	• High resolution • High mass accuracy	• High throughput • Allows the recording of the complete fragment ion spectrum • Allows retrospective protein analysis	• High specificity provided by the administration of antibodies	• Separation on the surface of the protein chip
Limitation	• In case of body fluids with low sample volume sample pooling may be needed • Highly abundant proteins can overload the gel • Proteins with low abundance may be undetectable	• Typically limited to cell culture experiments	• Labeling efficiency is condition dependent and requires optimization • The presence of byproducts may cause problems during data evaluation	• Many technical replicates are needed which increases instrument time and costs	• Availability of peptide MS/MS spectra is essential to develop SRM methods • SIL peptides may be required	• Availability of *m/z* of peptide precursors and their retention times are essential to develop HR-SRM methods	• Availability of m/z of peptide precursors and their retention times are essential to develop PRM methods	• Low level of automation • Data analysis	• Although there is possibility to construct custom kits, the circumstances such as cost, time, optimization difficulty due to the highly different concentration of the individual analytes in the samples, favor the utilization of already available kits, in this way analysis may be limited to what is provided by the vendors	• Lack of information on the identified proteins • Has not been supported by the manufacturer for many years
Utility in body fluid analysis	Suitable	Not suitable	Suitable	Suitable, ideal for screens	Suitable, ideal for validations	Suitable	Suitable	Suitable, ideal for screens	Suitable, ideal for validations	Suitable with serious limitations

pathological alteration. In many cases however, these types of samples are not available for biomarker studies. For example, in case of pathological conditions affecting the retina; such as diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy, etc., the study of proteome changes of the retina would be important to understand the pathological mechanisms underlying the disease. On the other hand, for diagnostic purposes, the retina; which can be obtained only with highly invasive surgical intervention, is not an acceptable source for minimally- or non-invasive biomarker studies.

In spite of the availability of advanced imaging methods, there is a high demand for laboratory diagnostic assays using biological samples or body fluids acquired by non-invasive or minimally invasive methods. Advances in proteomics and metabolomics techniques had led to improved sensitivity, and provided the possibility to detect protein or metabolite changes in body fluids which are not necessarily in proximity to the diseased area. For example, studies of tear or serum composition could identify potential biomarkers specific for retinal diseases [24,25].

The emerging "omics" technologies provide new possibilities for identification of biomarkers form the continuously available body fluids that can be collected by non-invasive means, shifting the focus from the study of tissue material obtained by autopsy and biopsy to the study of easily collectable and continuously available body fluids such as tears, saliva, sweat, etc.

3. Tear fluid as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases

Tear fluid is a complex mixture of proteins, lipids, salts and other organic molecules produced by the lacrimal glands. Normally, the tear production rate is approximately 2 μl/min [26] and its typical protein concentration is 5–7 μg/μl [27]. Functions of the tear film are lubrication of the eye, delivery of nutrients and maintenance of the refractivity of the cornea [28]. Beside these roles, tear provides an effective chemical barrier on the surface of the eye via the secreted antimicrobial and immunomodulatory proteins (AMP), which provide protection against infections [29]. Currently, more than 1500 tear proteins have been identified by proteomics techniques [30–32]. Major tear proteins; such as lactotransferrin, lysozyme-C, prolactin-inducible protein, lacritin etc., are involved in the defense against pathogens [31], and their relatively high abundance makes these proteins the major antimicrobial proteins of tear. While many of the tear proteins are produced by the lacrimal glands, some of them originate from epithelial cells; such as dermcidin, defensins, etc., and there are also proteins filtered from the blood such as albumin [33,34].

The human tear has become one of the most investigated body fluids, being a possible source of biomarkers [30,31]. Tear fluid is one of the non-invasively obtainable body fluids that is relatively easy to collect, and its study may help understand the pathogenesis of ocular and some systemic diseases, in addition to aiding in the prediction of the outcome and scheduling follow-ups for therapeutic sessions. Based on localization, tear can primarily reflect pathological conditions related to the anterior segment of the eye, but it can also provide information on the retinal or vitreal status, and more broadly, information related to systemic changes can also be acquired by analysis of tear proteins (reviewed by [35,36]). The protein composition of tear was examined in various pathological conditions, and proteome-level changes were observed in case of contact lens wearers as well [37]. Analysis of tear protein profile can provide useful biological information on understanding the molecular mechanisms of ocular diseases; such as dry eye syndrome [38–41], blepharitis [42], climatic droplet keratopathy [43], diabetic retinopathy [25], keratoconus [44,45], mycotic keratitis [46] and vernal keratoconjunctivitis [47]. Changes in the tear proteome can also reflect systemic diseases such as multiple sclerosis [48] and Alzheimer's disease [49]. SELDI-TOF data are available on tears of patients with Sjögren's syndrome [50] and breast cancer [51,52], but the exact protein composition of the peaks characteristic for the pathological conditions is missing. Biomarkers for these pathological conditions identified by quantitative proteomics are listed in Table 2.

Various immunological tests exist to study the concentration of pro- or anti-inflammatory markers in tears, in order to assess the inflammatory status in ocular or systemic diseases [53–55]. Inflammatory changes were shown to be associated with glaucoma and neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease and multiple sclerosis [48,56–59]. The 47 potential and the 10 validated biomarkers for various ocular or systematic diseases identified by quantitative proteomics experiments predict the clinical application of some of the identified biomarkers in the near future.

4. Saliva – the easily accessible, continuously available source for biomarkers

Saliva is a complex mixture secreted from major and minor salivary glands and from the gingival crevice [60]. It is composed of more than 99% water, making it a very dilute body fluid. The remaining part of saliva is composed of various electrolytes, proteins, mucins and nitrogenous products such as urea [61]. Saliva contains more than 2000 proteins [62], the most abundant of which are α-amylase [63], mucins [64], proline rich peptides [65], cystatins [64] and serum albumin [66]. Although high variability in protein content was observed depending on collection time, sex, age, pathological conditions, the typical protein concentration of saliva is 0.7–2.4 mg/ml [67–69]. Similarly to tear fluid, the abundant salivary proteins are part of the innate immune system, due to their antimicrobial activity, and their protective role from microbial proteases. The non-invasive collection and the continuous availability of the saliva make it an excellent source of biomarker studies; unsurprisingly, the protein composition of saliva has been analyzed by several workgroups, indicating its relevance to medical applications. A classical 2D gel electrophoresis-based study of saliva obtained from children with autism spectrum disorder revealed 8 down-regulated and 8 up-regulated salivary proteins as potential biomarkers for the disorder [70]. The advantage of multiplex measurements by chemical labeling with iTRAQ and label free quantification mass spectrometry of salivary proteins have been used for analysis of patients with breast cancer [71,72], malignant oral lesions [73], oral squamous cell carcinoma [74,75], chronic graft-versus-host disease [76,77], Sjögren's syndrome [78] and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw [79]. Differentially expressed proteins have been identified in these studies (Table 3), providing potential biomarkers to aid diagnosis and possibly enable for a deeper understanding of the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of the studied diseases. SRM-based quantitative proteomics method for the analysis of O-glycosylated forms of salivary protein MUC7 in saliva of patients with rheumatoid arthritis has been developed and used to demonstrate the altered O-glycosylation pattern in rheumatoid arthritis, with a proposed role in diagnosis and treatment follow-up [80]. SELDI-TOF mass spectrometry method was used to identify biomarkers for fibromyalgia [81], oral squamous cell carcinoma [82,83] and Sjögren's syndrome [84] (Table 3), and peaks showing significant differences are available for breast cancer [85] and oral mucositis [86]. From the so far identified 347 potential biomarkers for various diseases only 10 were validated by antibody-based techniques and are indeed suitable for population screening. This is highly relevant, especially in case of oral cancers, given the high prevalence of orals squamous cell carcinoma and its increasing tendency in the younger population [87,88].

5. Sweat biomarkers for local and systemic conditions

The skin acts as an effective barrier against pathogens in the first line of host defense. Besides providing a physical barrier, the skin also creates a chemical barrier via antimicrobial and immunomodulatory proteins secreted by keratinocytes, sebocytes and epithelial cells [89]. Like saliva, sweat is a continuously secreted and highly diluted body fluid,

Table 2
Tear protein biomarkers identified by quantitative proteomics methods. The proteins in italic have antimicrobial and immunomodulatory effects, while the bold face refers to validated biomarkers. The other font settings (normal, underline, asterisk) refer to the method by which the biomarkers were identified.

Disease	Method	Potential biomarkers (gene symbol)	References
Alzheimer's disease	SRM	*LACRT*, *LCN1*, *LYZ*, *DCD*	[49]
Blepharitis	2D SDS-PAGE	**ALB, *CST2*, *IGKCVIII*, *LACRT*, *LYZ*, *PIP*, PKLR, SERPINA1**	[42]
Climatic droplet keratopathy	iTRAQ	DKFZp686M08189, *HP*, *JCHAIN*, *LACRT*, *PIGR*	[43]
Diabetic retinopathy	iTRAQ	*IGLC1*, *LACRT*, *LCN1*, *LTF*, *LYZ*, SCGB1D1	[25]
Dry eye syndrome	iTRAQ	ALDH1A1, APOA1, *AZGP1*,*C3*, *CST4*, ENO1, EZR, GC, *HP*, *IGHA1*, *IGHA2*, *IGHG3*, *IGLC1*, *JCHAIN*, *LACRT*,	[38,39,40,41]
	2D SDS-PAGE	*LCN1**, *LTF*, *LYZ**, *ORM1*, *PIGR*, *PIP*, *PRDX1*, PRP1, **PRR4***, *S100A11*, *S100A4*, *S100A8**, *S100A9*, SCGB2A1,	
	SELDI-TOF*	SERPINA1*, SMR3B*, TCN1, ZG16	
Keratoconus	Label-free quantification	*AZGP1*, *B2M*, *CLU*, *CTSB*, *CST1*, *CST4*, FGA, *IGHA1*, *IGHA2*, *IGKC*, *IGLC1*, *JCHAIN*, KRT14, KRT5, *LACRT*, *LCN1*, *LCN1P1*, *LGALS3BP*, *LTF*, *LYZ*, *PIGR*, *PIP*, PROL1, PRR4, *SLPI*, ZG16B	[44,45]
Multiple sclerosis	TMT	**SERPINA3**	[48]
Mycotic keratitis	2D SDS-PAGE	ALB, *CST1*, *CST4*, GLRX5, *LCN1*, *PIP*	[46]
Vernal keratoconjunctivitis	iTRAQ	ALB, HPX, SCGB1D1, SCGB2A1, TF	[47]

its protein content provides an effective defense against pathogens, and is involved in tissue regeneration after injury [90]. The most abundant human sweat protein is dermcidin, though clusterin, prolactin-inducible protein, apolipoprotein D and serum albumin are highly expressed in sweat as well [91]. These proteins are essential to the formation of the chemical barrier of the skin, due to their antimicrobial activity [90,92], chaperone function [93] and antioxidant effect [94,95]. Sweat samples from patients with skin or systemic diseases such as ectodermal

Table 3
Salivary proteins identified as biomarkers revealed by quantitative proteomics. The proteins in italic have antimicrobial and immunomodulatory effects, while the bold face refers to validated biomarkers. The other font settings (normal, underline, asterisk) refer to the method by which the biomarkers were identified.

Disease	Method	Potential biomarkers (gene symbol)	References
Autism spectrum disorder	2D SDS-PAGE	ALB, AMY1A, ATP6V1C1, *BPIFA2*, CA6, *CST5*, FRAT1, GRTP1, *IGHA1*, *JCHAIN*, *LCN1P1*, *MUC16*, *PIP*, TF	[70]
Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw	iTRAQ	A1BG, *A2ML1*, ACTG2, ADH7, AKR1B10, ALDH3A1, ALDH9A1, *ANXA1*, ANXA2, ANXA4, APOA2, *ARPC3*, *ARPC4*, ATP5A1, ATP5B, BASP1, *C1R*, *C5*, CA2, CAB39L, CALML5, CAPN1, CARHSP1, *CCT5*, CCT8, CEACAM5, CHAD, CHI3L2, *CLTC*, CRABP2, CRNN, *CSTA*, *CTSA*, CUTA, DSP, *ECM1*, EEF1A1, EEF1G, EIF5A, EVPL, FAM49B, FKBP1A, FLG, *GBP6*, GNB2, GSTP1, H2AFY, HBD, HBG2, *HIST1H1B*, *HIST1H2AA*, *HIST1H4A*, *HIST2H2BE*, *HIST2H2BF*, *HIST3H2A*, *HIST3H3*, *HSP90AA1*, *HSP90AB1*, *HSP90B1*, HSPA1L, *HSPB1*, *HSPD1*, *HTN1*, *IGHD*, *IGHG1*, *IGLC2*, *IL36A*, *IQGAP1*, ITIH2, IVL, JUP, KRT10, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT19, KRT25, KRT3, KRT4, KRT5, KRT6A, KRT73, KRT76, KRT78, LGALS7, LMNA, MGP, MMP9, MYH14, MYH9, MYL6, NPEPPS, *ORM1*, *PCBP2*, PDIA6, PFKL, PKP1, PLA2G2A, PLEC, PLS3, PPL, *PRB3*, *PRDX1*, PRDX6, *RAB10*, RDX, RHOA, RHOB, *RNASE4*, *RNASET2*, RNH1, RPLP0, *RPS12*, *RPS25*, *RPS8*, *S100A14*, *S100A16*, SAA4, SCEL, SCGB2A1, SERPINA1, *SERPINA4*, *SERPINB2*, *SERPINB5*, *SERPIND1*, SFN, TGM1, TGM3, TPM2, *TPT1*, TUBB1, UGP2, VCP, YWHAZ	[79]
Breast cancer	iTRAQ	AKR1E2, ALB, ALDOA, AMY1A, *ANXA1*, ANXA3, APOA1, *ARHGDIB*, *AZGP1*, *B2M*, *BPIFA2*, *BPIFB2*, *C3*, CA1, CA6, *CALM1*, CAT, *CRISP3*, *CST1*, *CST2*, *CST3*, *CST4*, *CST5*, *CSTA*, *CSTB*, *DMBT1*, ENO1, FABP5, FAM25A, FAM25B, FAM25C, FAM25G, FGA, GSTP1, HBA1, HBB, H*IST1H2BL*, *HIST1H4A*, *HIST2H2AB*, *HP*, HPX, *HTN1*, *IGHA1*, *IGHA2*, *IGHG1*, *IGHG2*, *IGHM*, *IGKC*, *IGLC1*, *JCHAIN*, KLK1, KRT1, KRT13, KRT16, KRT4, KRT6C, KRT9, *LCN1*, *LCN2*, *LPO*, *LTF*, *LYZ*, *MPO*, *MUC5B*, NUCB2, PFN1, *PIGR*, *PIP*, PPIB, PRB2, *PRDX1*, PRH1, *RPS27A*, *S100A4*, *S100A6*, *S100A7*, *S100A8*, *S100A9*, *S100A11*, SPRR1A, SPRR3, TALDO1, TCN1, TF, TGM3, TKT, TMSB4X, TPM3, *UBA52*, *UBB*, *UBC*, VIM	[71,72]
Chronic graft-versus-host disease	iTRAQ, Label-free quantification	*A2ML1*, ACTB, ALDH3A1, ALDOA, AMY1A, ATP6AP1, *AZGP1*, *B2M*, *BPIFA1*, *BPIFA2*, *BPIFB1*, *BPIFB2*, C4orf40, C6orf58, C6A, *CALM1*, CALML5, *CAMP*, CEACAM5, CHI3L2, *CRISP3*, CRNN, *CST1*, ***CST2***, *CST3*, *CST4*, *CST5*, *CST6*, *CSTB*, *CTSB*, *CTSD*, CYCS, DBI, *DEFA1*, DKFZp686C15213, DKFZp686K18196, *DMBT1*, DSC2, DSG1, DSG3, *ELANE*, ENO1, ERO1A, EZR, FAM3B, FAM3D, FCGBP, FGA, FGB, FGG, GAPDH, GOLM1, GRN, GSTP1, HBA2, HBB, *HP*, HRP, HSPA5, *HTN1*, *HTN3*, *IGHA1*, *IGHA2*, *IGHM*, *IGHV3-23*, *IGHV3-49*, *IGKC*, *IGKV4*, *IGL@*, ***IL1RN***, *IGLC2*, *IGLL5*, *JCHAIN*, KLK1, KRT1, KRT10, KRT16, KRT2, KRT6A, KRT9, KTR1, *LCN1*, *LCN2*, LEG1, *LGALS3BP*, LOC652694, LOC654188, *LPO*, LTA4H, *LTF*, LYPD3, *LYZ*, *MPO*, *MUC5B*, *MUC7*, NUCB2, P4HB, PGD, PGK1, PI3, *PIGR*, *PIP*, PKM, PKM2, PLTP, PPIB, PRB2, PRB3, PRB4, PRDX5, PRDX6, PRH1, PRR27, PRR4, PRTN3, PSAP, *S100A7*, *S100A9*, *SCGB1A1*, SERPINA3, SERPINB3, SERPINB5, SFN, *SLPI*, SMR3B, SPARCL1, SPINK7, SPRR2B, SPRR3, TALDO1, TCN1, TGM3, TIMP1, TKT, TTN, *TXN*, TXNDC17, VK3, YWHAZ, ZG16B	[76,77]
Fibromyalgia	SELDI-TOF	*ARHGDIB*, *S100A8*, *S100A9*	[81]
Malignant lesions	iTRAQ	**ACTB, MRLC2**	[73]
OSCC	Label-free quantification	A1BG, A2M, *AHSG*, APOA1, APOA2, APOA4, *AZGP1*, *BPIFB2*, *C3*, *C4B*, *C4BPA*, *C6*, *C9*, CD109, *CFB*,	[74,75,82,83]
	SELDI-TOF*	CHIT1, *CRISP3*, *CST1**, *CST2*, *CST4*, *CSTB*, DSG1, DSG3, EGF, EPHX1, FABP4, FAM49B, FGB, FGG, FSCN1, GSTM1, HBA1, HEXA, *HIST1H2AA*, HK3, *HP*, HPR, HPX, HSD17B4, ICAM3, *IGHA1*, *IGHA2*, *JCHAIN*, *ILV102*, *ITIH2*, *ITIH4*, *IKVI*, *IKVIV*, KLK1, *KNG1*, *LCN2*, LCP1, LPA, *MIF*, *MUC5B*, *ORM1*, PPIA, PRCP, PRTN3, RAC2, RETN, RPL7, SERPINA1, SERPINA6, SERPIND1, SLC4A1, SPINK5, TF, TLN1, TMEM132A, TPI1, TTR, TUBA1C, VIM, *VTN*, YWHAZ	
Rheumatoid arthritis	SRM	MUC7	[80]
Sjögren's syndrome	2D SDS-PAGE	ALB, AMY1A, AMY2B, *ANXA1*, APOA1, *AZGP1*, ***B2M****, *BPIFA2*, *BPIFB2*, *C3*, *CA6**, *CFB*, CLU, *CST1*,	[78,84]
	Label-free quantification	*CST2*, ***CST3***, *CST5*, *DMBT1*, HBA1, HBB, *HTN1*, *HTN3*, *IGHA1*, *IGHA2*, *IGHG1*, *IGHG3*, *IGHM*, ***IGKC***,	
	SELDI-TOF*	*IGLC2*, *IGLL5*, *JCHAIN*, KLK1, KRT1, KRT10, KRT13, KRT16, KRT4, KRT5, KRT6C, KRT9, *LCN2*, *LGALS3BP*, *LPO*, ***LTF****, ***LYZ***, MGP, *MUC5B*, NUCB1, NUCB2, ***PIGR****, *PIP*, PLTP, PRB1, PRB2, RR27, PSAP, *S100A8*, *S100A9*, SERPINA1, SFN, SLPI, SMR3B, *STATH*, TF, ZG16B	

dysplasia, cystic fibrosis, atopic dermatitis and schizophrenia were analyzed using quantitative proteomics [96–99]. It was demonstrated that in case of skin disorders, the level of proteins involved in the host defense and tissue regeneration were reduced in the samples of patients with ectodermal dysplasia and atopic dermatitis [96,99]. The typical concentration of sweat proteins is 0.1–0.4 mg/ml [97,100] but it can vary depending on the exterior and interior conditions such as temperature, stress etc. [101,102]. It was proposed that reduction in the amount of proteins involved in the immune homeostasis may contribute to the development of ectodermal dysplasia; therefore, they are classified as potential biomarkers and possible therapeutic targets in this disease. In case of systemic conditions, analysis of the sweat proteome has revealed proteins which were differentially expressed in schizophrenia (Table 4) [97]. In spite of the 180 potential and two validated (dermcidin and RNase7) biomarkers identified, many open questions remain in connection to the properties of sweat. Only limited information is available regarding (1) the normal rate of the sweat production, (2) the basal protein composition of the sweat collected at various body surfaces, (3) possible diurnal variations of the protein content, (4) the protein composition depending on the collection method etc., highlighting the role of proteomics in utilizing this continuously available, but very dilute and sometimes not so easy-to-collect body fluid for diagnostic purposes.

6. Nasal secretion as a valuable source of potential biomarkers

The nasal secretion has a protective role in the airways; its production rate and the protein content can vary substantially. Protein amounts produced between 0.8 and 32.7 mg/ml were observed depending on the collection methods [103,104]. Nasal discharge contains a lot of antimicrobial proteins; such as lysozyme-C, lactotransferrin, several types of defensins [105], also in addition to components of the adaptive immune system, such as immunoglobulins [106]. Compared to the other body fluids, a few number of publications report nasal mucus as a source of biomarkers; by quantitative proteomics only six potential biomarkers have been identified and only one of them has been validated so far (Table 5) [107]. As a result of various studies, more than 451 proteins were identified in the nasal mucus, and many of them are related to the immune system [107–109]. Because of the anatomical localization, nasal mucus is the easily collectable body fluid with the closest proximity to the nervous system. This property is exemplified by the nasal administration of drugs, enabling their direct delivery through the olfactory neurons or trigeminal nerve endings to the central nervous system [110,111]. Considering the fact that parts of the olfactory neurons are embedded into the nasal mucosa, their secretions should be detectable in the mucus. Based on the high sensitivity and versatility provided by the state-of-the-art quantitative proteomics methods, the easy-to-collect nasal discharge is predicted to be a very valuable source for further biomarker studies.

Table 5
Biomarkers in nose water revealed by quantitative proteomics. The proteins in italic have antimicrobial and immunomodulatory effects, while the bold face refers to validated biomarkers.

Disease	Method	Potential biomarkers (gene symbol)	References
Chronic rhinosinusitis	Label-free quantification	BP1A, *BPIFB1*, CHI3L1, LCP1, ***MUC5B***, *SERPINB10*	[107]

7. Cervicovaginal fluid as source for biomarkers for obstetrics and gynecology

Vaginal fluid is a non-invasively collectable body fluid which may secrete from vagina, cervix or upper genital tract [112]. Vaginal discharge has an important function in the innate immunity and homeostasis and pathological conditions can significantly influence the balance in normal vaginal milieu leading to qualitative and quantitative protein alterations in vaginal secretion [113–115]. Many factors can influence the protein composition of the vaginal fluid, for example the varying levels and ratios of estrogens and progesterone resulting in variable amounts of protein yield, therefore it is practically impossible to quantify the normal amount of total protein compound in healthy cervicovaginal fluid [116]. Currently, more than 680 proteins have been identified in vaginal fluid and the majority of the identified proteins have a role in host defense [117]. The proteomic analysis of vaginal fluid can provide more information about the pathophysiological conditions affecting the female genital tract [118,119]. 63 potential biomarkers for pregnancy-related problems such as intra-amniotic inflammation [112,120] and preterm labour/preeclampsia [121–125], cervical cancer [126] and HIV infection [127] were identified (Table 6) using quantitative proteomics techniques and six biomarkers were validated.

8. Urine biomarkers for systemic and urogenital diseases

Urine is formed in the kidneys as a result of ultrafiltration of the plasma to eliminate waste products; such as urea and metabolites. Serum proteins are filtered based on their size and charge at the glomeruli, and are thereafter reabsorbed in the proximal renal tubules [128,129], thus, protein concentration in urine under physiological conditions is very low, usually between 0 and 0.2 mg/ml [130] and the normal protein excretion is less than 150 mg/day [131]. This is about 1000 times less compared to other body fluids such as plasma [132]. Excretion of more than 150 mg/day protein is defined as proteinuria, and is indicative of glomerular or metabolic dysfunction [129].

Table 4
Sweat proteins identified as biomarkers by quantitative proteomics analyses. The proteins in italic have antimicrobial and immunomodulatory effects, while the bold face refers to validated biomarkers. The other font settings (normal, underline, asterisk) refer to the method by which the biomarkers were identified.

Disease	Method	Potential biomarkers (gene symbol)	References
Atopic dermatitis	SELDI-TOF	***DCD***	[99]
Ectodermal dysplasia	Label-free quantification	A1BG, A2ML1, ACTN4, AHSG, ALAD, AMY1A, ANXA2, *AP1B1*, ARG1, *ARHGDIB*, ASAH1, ATP5B, *ATRN*, *AZU1*, *BPIFA1*, *BPIFB1*, BRN, *CALM2*, CAPG, CAT, CD44, CEACAM5, CHIT1, *CLU*, CNTRL, COPB2, *COTL1*, CPA4, CPE, CPM, CPNE3, CREG1, *CRISP3*, *CTSA*, *CTSB*, *CTSD*, CTSV, CYB5R2, *CST1*, *CST2*, *CST4*, *CST5*, *CSTB*, ***DCD***, DDAH1, DDAH2, DDB1, DMD, DSC1, DSG1, DTD1, *ECM1*, EEF2, *ELANE*, ENDOD1, FABP5, FAHD1, FASN, *FCGBP*, FLNA, GBA, GGCT, GM2A, GPI, GSS, GSTP1, HARS2, HBA1, HEBP2, HRSP12, HSD17B4, HSPA5, IDS, *IGHA2*, *IGHM*, *IGLL5*, *IL1RN*, *IL37*, INTS7, JUP, KLK10, KLK11, KLK5, KLK7, KLK8, KRT33B, KRT35, KRT4, KRT73, KRT77, KRT82, KRT83, KRT85, *LACRT*, *LAMP1*, *LCN1*, *LCN15*, LDHA, LDHC, LEG1, LGALSL, LRG1, LYNX1, LYPD3, LYPD5, LYPLA1, *LYZ*, MDH1, MDH2, MMP8, MMP9, MUC5AC, MUC7, MYDGF, MYH9, NQO2, NUDT5, NUTF2, *ORM2*, *PEBP1*, PFN1, PGAM1, PGK1, PGM2, *PIP*, PITHD1, PLBD1, *PM20D1*, *PNP*, PPIB, PRCP, *PSMA7*, QPCT, RAB7A, REXO2, ***RNASE7***, RNASET2, *S100A18*, *S100A6*, *S100A8*, *S100A9*, SBSN, SCGB1D2, SCGB2A2, SCPEP1, SERPINA12, SERPINB1, SERPINB13, SERPINB2, SERPINB8, SERPINC1, *SIAE*, *SLPI*, TALDO1, TF, TGM1, *TOLLIP*, VPS26A, ZG16B	[96]
Schizophrenia	Label-free quantification, SRM*	ANXA5*, ARG1*, *AZGP1**, *BLMH**, CALML3, CALML5*, CASP14*, CDSN*, *CSTA**, *DCD*, DSG1*, FLNB, GAPDH*, GOT1, KLK11*, KRT10, KRT1B, KRT2, KRT6A, KRT9, MDH2, NUCB1, *PARK7**, PEBP1*, *PIP**, PKM, *PRDX1**, *S100A7**, TPI1, *TXN**	[97]

Table 6
Vaginal fluid protein biomarkers identified by quantitative proteomics methods. The proteins in italic have antimicrobial and immunomodulatory effects, while the bold face refers to validated biomarkers. The other font settings (normal, underline, asterisk) refer to the method by which the biomarkers were identified.

Disease	Method	Potential biomarkers (gene symbol)	References
Cervical cancer	Label-free quantification	**ACTN4,** *ACTR3*, *CFH*, CRABP2, EEF1A1P5, GC, NAMPT, PGK1, SERPINB13, SERPINB3, *YWHAE*	[126]
HIV-infection	iTRAQ	***PRTN3*, SERPINA5**	[127]
Intra-amniotic inflammation	Label-free quantification SELDI-TOF*	A1BG, *C3*, *CSTA*, *DEFA1**, *DEFA2**, *DEFA3**, DSG3, DSP, FABP5, FN1, GC, *HP*, IGFBP1, IVL, KLK13, LMNA, *LTF*, *LYZ*, MMP9, *ORM1*, PPL, ***S100A7*,** *S100A8**, *S100A9**, SERPINA1, SERPINB3, SERPINB13, SPRR3, VCL	[112,120]
Preterm labour/preeclampsia	2D-SDS-PAGE SELDI-TOF SRM*	**ACBP, ACTB, ALB,** *AMBP*, ***ANXA1*, ANXA3, APOA1, COL,** ***CSTA*, DSP*, FABP5,** ***FGB*, GC, GGCT, GSTP1,** ***HP*, *IL1RN*,** ***MICA*,** ***ORM1*, *PRDX1*,** **PRDX2, RBP,** *S100A7*, ***S100A9*, SERPINA1, SERPINB1, SERPINB3, SFN*, SOD1, TCEA2, TF,** ***THBS1**, TPM1,** ***TXN***	[121, 122, 123, 124, 125]

Urine can be collected in large quantity and non-invasively. Therefore, despite the low protein concentration, adequate amounts of proteins can be collected from a single sample [131,133]. Another advantage of using urine as a body fluid for diagnosis is the possibility of collection of samples repeatedly, even over long periods of time. Under normal conditions, urine contains proteins originating from the blood and kidneys [134–139], making urine a good source for analysis of diseases affecting the kidney or the urogenital tract; such as kidney failure resulting from high blood pressure and diabetic nephropathy [140,141], prostate cancer [142,143], polycystic kidney disease [144], kidney chronic allograft dysfunction [145], chronic allograft nephropathy [146], congenital obstructive nephropathy [147], lupus nephritis [148], urolithiasis [149], in addition to urinary, renal and bladder cancer [150–161]. Besides urogenital and kidney dysfunctions, urinary proteomics has a great potential in biomarker studies of coronary artery atherosclerosis [162,163], obstructive sleep apnea [164], ovarian cancer [165], breast cancer [166] and sepsis [167,168].

Urine has become one of the most attractive body fluids in clinical proteomics [155], nevertheless, variability in protein concentration poses a hindrance to the analysis of samples. This can be compensated for by standardization based on urinary creatinine [169] or urinary housekeeping peptides, which are present almost ubiquitously in human urine independently of age, sex, health, or drug administration [170]. Details on urine sample preparation have already been discussed in some recently published reviews [171–175]. However, urine samples require handling through a set of methods; such as centrifugal filtration, ultrafiltration, lyophilization or precipitation. Removal of albumin is sometimes required to improve identification of low-abundance proteins [176].

Urine proteome analysis may potentially unravel markers for cancers of urogenital or systemic origin including bladder [150–154,156,157,160,161], prostate [170], renal [158,159], breast [166] and ovarian cancers [165] (Table 7). There has been an increasing interest in developing urine biomarkers for the detection of renal allograft rejection as an alternative to percutaneous needle biopsy, which is costly and associated with significant patient morbidity and mortality [79]. The 245 identified potential and 10 validated biomarkers for kidney-related and systemic diseases make urine a rich source of easy-to-collect, and continuously available source of biomarkers.

9. Body fluids as part of the innate immune system

The localization of the above mentioned body fluids correlates with the possible entry sites for microorganisms, implying the presence of a well-defined defense system. Besides mediating their physiological functions; body fluids also partake in the protection of the organism by providing a chemical barrier [29]. This chemical barrier is made up of the secretions of various glands and epithelial cells, and the characteristic composition of antimicrobial and immunomodulatory peptides (AMP) makes the AMP cocktail specific for different body fluids [177]. The composition of the AMP cocktail may determine which microbes can colonize our body, providing unfavorable conditions for pathogen growth under physiological conditions. It was demonstrated that skin microbiome changes in response to various stimuli such as food, drugs, age, gender, physiological status etc., implying changes of the AMP cocktail [178]. These changes can be examined by the sensitive quantitative proteomics techniques, which are well suited to monitor AMP levels at various sites of the body in different physiological or pathological conditions [179].

Proteomic analyses have revealed that highly abundant proteins observed in some body fluids; such as tears and sweat, are part of the first line defense. Biomarkers identified from body fluids by different research groups have enriched the library of proteins possessing antimicrobial or immunomodulatory properties (proteins with italics in the Tables 2–7). More than half of the identified tear biomarkers for eight pathological conditions have antimicrobial or immunomodulatory functions. A similar phenomenon can be observed in case of vaginal fluid and nasal mucus as well, though only one proteomic study is available for the nasal mucus. In case of saliva and sweat, the number of the proteins having a role in host defense is high, making up in; most of the cases, more than half of the identified biomarkers, in some instances, where more than 130 proteins were identified approx. only 30% of the proteins belonged to the AMP family (Table 8). From an analytical point of view, this can also mean that utilizing mass spectrometers with high resolution mass analyzers or extensive sample fractionation, enrichment or depletion and identifying more than 100 proteins can reveal the proteome masked by the highly abundant proteins. The urine is unique in a sense that its distinct anatomical and physiological properties imply the presence of a different chemical barrier as compared to that of other body fluids [180]. The number of AMPs among the identified urine biomarkers is high but fall far less than those of other body fluids (Table 8).

Analysis of the chemical barrier components can provide valuable information; our group has identified lipocalin 1, lactotransferrin, lacritin, lysozyme-C, lipophilin A and immunoglobulin lambda chain as potential biomarkers for the proliferative stage of diabetic retinopathy [25], lipocalin 1, lacritin, lysozyme-C and dermcidin for Alzheimer's disease [49]. Lactotransferrin, lipocalins, lysozyme-C, lacritin and dermcidin are involved in the immunologic and inflammatory processes and defense against pathogens [30,31,35,36]. It has been shown that lactotransferrin found in all body fluids is an active agent against microbes and parasites, and has been implicated in protection against cancer [90]. Lysozyme-C is a hydrolytic enzyme with muraminidase activity required for degradation of the bacterial cell wall [90], has antifungal activity [181] and protects against HIV infection [182]. Lipocalins are a family of lipid binding proteins, they play a role in host defense because of their protease inhibitor activity [183] and by sequestrating iron, they limit bacterial growth [184]. Lacritin is a secreted protein found in tears and saliva, it promotes secretion [185], epithelial cell proliferation [186], corneal wound healing [187], additionally, its C-terminal fragment has bactericidal activity [188]. Changes of tear AMP levels are likely not the cause but rather the consequence of diabetic retinopathy

Table 7
Protein biomarkers identified in urine by quantitative proteomics techniques. The proteins in italic have antimicrobial and immunomodulatory effects, while the bold face refers to validated biomarkers. The other font settings (normal, underline, asterisk, etc.) refer to the method by which the biomarkers were identified.

Disease	Method	Potential biomarkers (gene symbol)	References
Bladder cancer	2D SDS-PAGE iTRAQ Label-free quantification* SRM#	A2M, ALB, AFM#, AGT#, AHSG#, APOA1, APOA2#, **APOA4**, APOB, APOC2, APOC3, APOE, APOH APOL1#, *AXL*, *AZGP1*, BCAN, *C2*, *C3*, *C9*#, *CADM1**, CALR, CD44*, *CDH2*, CEL, *CLEC4G*, CNTN1, COL15A1, CP, CPQ, *CST3*, CTSA, **EGF,** F2#, FABP5, FBN1, FGA, FGB, FGG, FN1, GAA, GC, GGH, GUCA2A, GUSB, HPX*, HSPG2, IGFBP7, ITIH4#, GALS7, MGAM, MMP2, MMP9, NID1, *ORM1*, PGA5, PLG#, PRCP, PRG4, PROZ, PSAP*, QPCT*, QSOX1, RBP4, ROBO4, *S100A7*, *S100P*, **SAA4,** SDC4, SERPINA1*#, SERPINC1, SOD3, *SPP1**, TF*#, *THBS1*#, TNXB, TTR, UMOD*, YIPF3	[150,151,152,153,154, 156,157,160,161]
Breast cancer	Label-free quantification	ALB, AGRN, *ANXA1*, AHSG, APOA4, *C3*, C9orf131, CA1, *CSTA*, DNAH8, HBA1, *IGHG2*, *IκV*, ITIH4, *LCN2*, LRRC36, *LTF*, **MAST4,** NEGR1, *ORM1*, PGA3, SPARCL1, SULF2, *VTN*	[166]
Chronic allograft nephropathy	SELDI-TOF	*B2M*	[146]
Congenital obstructive nephropathy	Label-free quantification SRM	**ARG1**, AMY1A, AMY2B, CASP14, CDH1, CUBN, EGF, FLNB, IGFBP7, KLK1, LRRC15, *PDCD1LG2*, PTGDS, SERPINA5, TGM3, VCAN	[147]
Coronary artery atherosclerosis	Label-free quantification	COL1A1, COL1A3	[163]
Diabetic nephropathy	2D SDS-PAGE iTRAQ	APOA4, CP, EGF, *PIP*, SERPINA1, TTR	[140,141]
Kidney chronic allograft dysfunction	Label-free quantification	*KNG1*, UMOD	[145]
Lupus nephritis	2D SDS-PAGE	AMBP, *AZGP1*, *IGKC*	[148]
Obstructive sleep apnea	2D SDS-PAGE	AMBP, EGLN2, KAT2B, **KLK1, *ORM2*,** TNC, TRIB2, **UCN3, UMOD,** ZFP36, ZNF81	[164]
Ovarian cancer	2D SDS-PAGE	**RNASE2**	[165]
Polycystic kidney disease	iTRAQ SRM	A2M, ADGRF5, ADGRL1, *ADM*, AGT, AFM, ALB, AMY1A, AMY2A, ANGPTL2, ANPEP, *ANXA11*, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOD, APOE, ART3, *AXL*, *B2M*, B3GNT2, B4GAT1, BHMT, BLMH, *C1RL*, *C3*, *C4B*, *C5*, *C7*, CA1, CADM1, CASP14, *CD14*, CD248, CDH11, CDH13, CDH2, CDH6, CDHR5, CEL, CETP, CFB, CFD, CFH, CHL1, CILP, CILP2, CNTN1, COL15A1, COL6A1, CPN2, CRB2, CRYAB, CRYM, *CST6*, DPEP1, DSC1, EGF, FAT4, FBN1, FBP1, *FCGR3B*, FGB, FGG, FLG, FLRT2, FN1, FREM2, GAA, GALNS, GAS6, GC, GGCT, GOLM1, GP5, GPC1, GPC3, GPC4, GSTM3, GSTT1, GUCA2B, *HP*, HPX, *HRG*, *HSPB1*, HSPG2, *HYAL1*, ICAM2, IGFBP6, IGFBP7, ISLR, ITFG1, ITIH1, ITIH2, KRT4, KRT6A, LCAT, *LGALS3BP*, LRRC15, MAN1A1, MB, MCAM, MFI2, MME, MMRN2, MUC20, MXRA8, MYOC, OGN, OLR1, *ORM1*, OSCAR, PCDH1, PCDHGC3, PDCD6, PFN1, PHPT1, PON1, PROM2, PSAP, PSG11, PSG9, PVALB, PVR, PVRL1, PVRL3, QPCT, QSOX1, RBP4, REG1A, ROBO4, SDF4, SDK1, SERPINA1, SERPINA4, SERPINA5, SERPINC1, SERPIND1, SERPINF1, SERPINI1, SH3BGRL, SPRR3, *SUSD2*, TF, TGM4, TNXB, TPP1, TTR, VASN, XPNPEP2	[144]
Prostate cancer	2D SDS-PAGE	*S100A9*	[143]
Renal cell carcinoma	SELDI-TOF	ALB, *IGLC*, *MASP2*, *SECTM1*, VMO1	[158,159]
Sepsis	iTRAQ	A1BG, AFM, AMY2A, CDH1, *CEACAM8*, *DPP4*, GM2A, *HP*, HSPG2, *IκV*, KRT1, KRT10, KRT16, KRT5, KRT9, LAMP1, *LCN1*, MUC1, SELENBP1	[167,168]

progression, hence, it can be used to develop bedside test for screening purposes. Currently, photographic methods and retinal image analysis to track neovascularization and increased vascular permeability in the retina can be used for screening [189–191], this, however, requires proper instruments, software, and well-trained human graders, making diagnosis available only in big screening centers. In order to make the screening widely accessible, easy-to-implement tests; which can be used by general practitioners, are needed. Potential biomarkers for different stages of diabetic retinopathy were identified, and their validation is in progress, making tear biomarkers novel tools for population screening, based on the pre-screening of a large number of patients and involving human graders only in positive or ambiguous cases [192].

The composition of the AMP cocktail changes constantly, implying both qualitative and quantitative changes of the cocktail components, in order to adapt to various conditions. Most probably, composition of the chemical barrier is characteristic to the stimulus to which the organism has to adapt. Thus, changes of the composition of the host defense proteins in body fluids as a response to pathological conditions provide a feasible source for biomarker studies, which can be implemented using cutting edge quantitative proteomics analyses.

10. Extracellular vesicles – future perspectives

Different types of membrane vesicles of endosomal and plasma membrane origin are released in an evolutionally conserved manner into the extracellular environment by cells. These circulating microvesicles found in many types of body fluid and in extracellular space play an important role in cell signaling and intercellular communication [193–195]. According to their biogenesis, the extracellular vesicles can be grouped as apoptotic blebs, exosomes and microparticles, but the nomenclature is not clear for the latter two [196].

Exosomes, the membrane vesicles of endocytic origin are fragments from 40 to 100 nm secreted by most cell types. There are studies regarding exosome analysis of plasma [197], urine [198], amniotic fluid [199], saliva [200], bronchoalveolar lavage fluid [201], breast milk [202] etc.

Microparticles are of cellular membrane origin shed from stressed or damaged cells. Their diameters ranges from 0.1 to 1.0 μm [203]. Almost 3700 proteins were identified in total plasma microparticles using proteomic methods [204,205].

Proteomics has traditionally focused on the study of extracellular vesicle (EVs) proteins found in body fluids, but the proteomic profiles are highly dependent on how EVs were isolated [206]. Alterations in EV protein levels observed in pathological conditions make exosomes a good source for biomarker investigations [207]. More than 35,000 proteins were found in the extracellular vesicles (http://www.microvesicles.org/) and using quantitative proteomics techniques 32 potential biomarkers for bladder and prostate cancer, kidney diseases, deep vein thrombosis and brain tumors were identified in body fluids. 10 of the potential biomarkers were validated using antibody-based methods (Table 9) [208–215].

11. Conclusion

Based on the reviewed literature, hundreds of biomarker candidates have been identified, mainly from shotgun quantitative proteomic studies. Experiments using 2D electrophoresis, SELDI-TOF, label-free quantification, iTRAQ and TMT labeling on various body fluids have already provided more than 800 soluble potential biomarkers specific for

Table 8
Number of antimicrobial peptides/proteins among the identified potential biomarkers.

Disease	Body fluid	Technique	Number of potential biomarkers	Number of AMPs	MS instrument type
Blepharitis	Tear	2D SDS-PAGE	8	5	Q-TOF
Climatic droplet keratopathy	Tear	iTRAQ	5	4	Q-TOF
Diabetic retinopathy	Tear	iTRAQ	6	5	4000QTRAP
Dry eye syndrome	Tear	iTRAQ SELDI-TOF	33	21	Q-TOF LTQ-Orbitrap PBS-IIc ProteinChip Reader
Keratoconus	Tear	Label-free quantification	26	19	LTQ-Orbitrap
Multiple sclerosis	Tear	TMT	1	0	LTQ-Orbitrap
Mycotic keratitis	Tear	2D SDS-PAGE	6	4	MALDI-TOF
Vernal keratoconjunctivitis	Tear	iTRAQ	5	0	MALDI TOF-TOF
Autism spectrum disorder	Saliva	2D SDS-PAGE	14	7	Q-TOF
Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw	Saliva	iTRAQ	135	41	LTQ-Orbitrap
Breast cancer	Saliva	iTRAQ	92	50	Q-TOF
Chronic graft-versus-host disease	Saliva	iTRAQ Label-free quantification	140	46	TOF-TOF LTQ-Orbitrap
Fibromyalgia	Saliva	SELDI-TOF	3	2	ProteinChip SELDI system
Malignant lesions	Saliva	iTRAQ	2	0	LTQ-LIT
Rheumatoid arthritis	Saliva	SRM	1	0	5500QTRAP
OSCC	Saliva	Label-free quantification SELDI-TOF	76	30	LTQ-Orbitrap ProteinChip biology system
Sjögren's syndrome	Saliva	Label-free quantification	65	35	LTQ-Orbitrap
Atopic dermatitis	Sweat	SELDI-TOF	1	1	Protein Chip Array
Ectodermal dysplasia	Sweat	Label-free quantification	159	42	LTQ-Orbitrap
Schizophrenia	Sweat	Label-free quantification SRM	30	9	LTQ-Orbitrap TSQ Quantum Ultra
Chronic rhinosinusitis	Nose water	Label-free quantification	6	3	LTQ-Orbitrap
Bladder cancer	Urine	2D SDS-PAGE iTRAQ Label-free quantification SRM	79	14	MALDI-TOF LTQ-Orbitrap 4000QTRAP
Chronic allograft nephropathy	Urine	SELDI-TOF	1	1	Protein Chip Array
Breast cancer	Urine	Label-free quantification	24	9	LTQ-Orbitrap
Congenital obstructive nephropathy	Urine	Label-free quantification	16	1	LTQ-Orbitrap
Coronary artery atherosclerosis	Urine	Label-free quantification	2	1	LTQ-Orbitrap
Diabetic nephropathy	Urine	2D SDS-PAGE	6	1	SELDI-TOF 5600Triple-TOF
Kidney chronic allograft dysfunction	Urine	Label-free quantification	2	1	LTQ-Orbitrap
Lupus nephritis	Urine	2D SDS-PAGE	3	2	TOF-TOF
Obstructive sleep apnea	Urine	2D SDS-PAGE	11	1	MALDI-TOF
Polycystic kidney disease	Urine	iTRAQ	151	19	LTQ-Orbitrap
Prostate cancer	Urine	2D SDS-PAGE	1	1	MALDI-TOF
Renal cell carcinoma	Urine	SELDI-TOF	5	3	ProteinChip Reader PCS 4000
Sepsis	Urine	iTRAQ	19	4	LTQ-Orbitrap
Cervical cancer	Vaginal fluid	Label-free quantification	11	3	LTQ-Orbitrap
HIV-infection	Vaginal fluid	iTRAQ	2	1	MALDI-TOF-TOF
Intra-amniotic inflammation	Vaginal fluid	Label-free quantification SELDI-TOF	29	12	LTQ-Orbitrap Protein Chip Array
Preterm labour/preeclampsia	Vaginal fluid	2D-SDS-PAGE SELDI-TOF SRM	34	13	LTQ-LIT MALDI-TOF Linear ion trap

different diseases. The number of verified potential biomarkers using targeted; preferentially SRM-based, approach in examined body fluids is 40, and the number of biomarkers validated by antibody-based methods is 34, highlighting the need for verification and validation studies. In our opinion, the NCI-CPTC Biomarker Development Pipeline suggested for cancer biomarker identification [14] should be used in all biomarker studies involving body fluids, regardless of the nature of the examined pathological condition. In some diseases, there are hundreds of potential biomarkers identified; in such cases the verification step using targeted proteomics followed by validation step using antibodies should be carried out (Fig. 1). In those diseases where there are no data available, shotgun proteomics studies followed by targeted methods have to be applied in order to identify new biomarkers with high diagnostic value. In the field of body fluid proteomics, the need for non-invasively obtained, readily available biomarkers with diagnostic significance imposes pressure on state-of-

Table 9
Extracellular vesicle biomarkers identified by quantitative proteomics methods. The proteins in italic have antimicrobial and immunomodulatory effects, while the bold face refers to validated biomarkers. The other font settings (normal, underline) refer to the method by which the biomarkers were identified.

Disease	Method	Potential biomarkers (gene symbol)	References
Bladder cancer	Label-free quantification, Dimethyl labeling	**TACSTD2, GSA, *RETN*, GPRC5A**	[211,212]
Brain tumor	2D-DIGE	EEF1B, **PSMA1,** 3DPGH, ARRDC2, NANS, CENP-P, *EIF3B*, *PCNA*, MTAP, **GPNMB, EGFR, *HSC70*, HSPD1**	[215]
Deep venous thrombosis	2D SDS-PAGE, iTRAQ,	*Gal3BP*, *A2M*	[213,214]
Nephropathy/nephrotic syndrome	Label-free quantification	***ANPEP*, VASN, *SERPINA1*, CP,**	[209,210]
Prostate cancer	Label-free quantification	***FASN*, XPO1, PDCD6IP, *CD9*,** *ENO1*	[208]

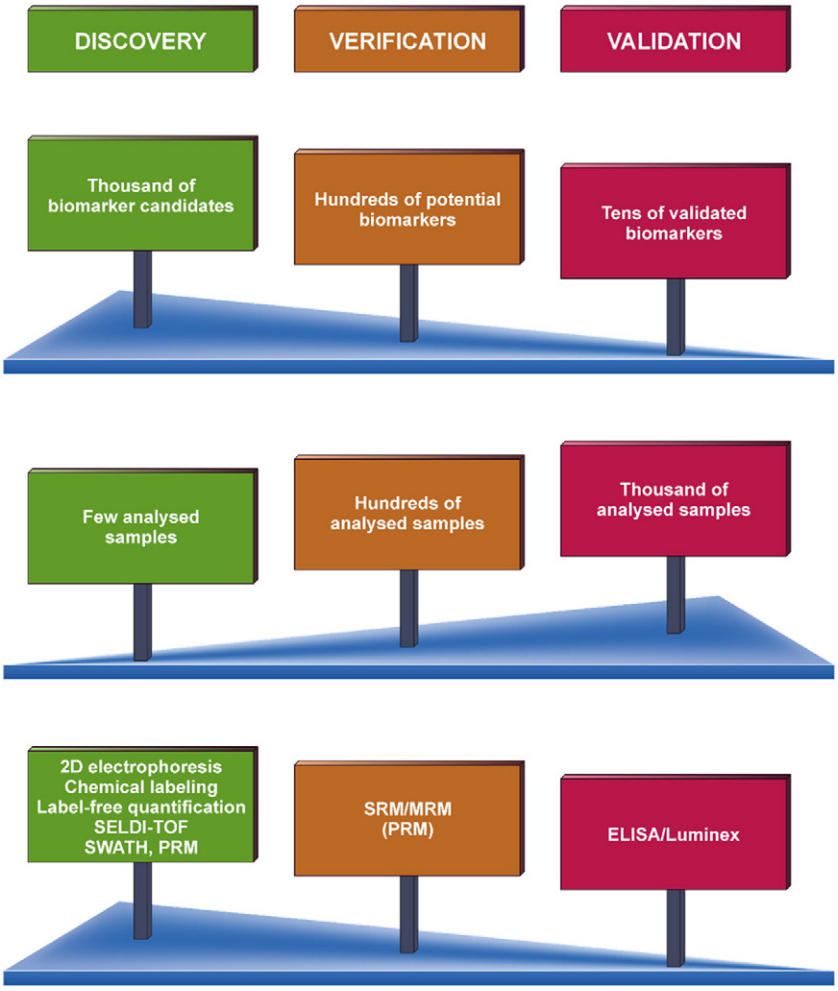


Fig. 1. Body fluid analysis workflow for biomarker discoveries.

the-art quantitative proteomics to utilize more body fluids, a rich source of yet undiscovered biomarkers.

Transparency document

The Transparency document associated to this article can be found, in the online version.

Acknowledgement

This paper was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences for Éva Csősz and Adrienne Csutak, TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016, TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 and OTKA PD116817. Gergő Kalló is receiver of Astellas Pharma Ltd. Fellowship and Adrienne Csutak is receiver of Lajos Szodoray Postdoctoral Fellowships. The work of Dr. Mohamed Mahdi for English proofreading of the manuscript is greatly acknowledged.

References

[1] P. Picotti, R. Aebersold, Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions, Nat. Methods 9 (2012) 555–566, http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2015.
[2] T. Rabilloud, C. Lelong, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial, J. Proteomics 74 (2011) 1829–1841, http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.040.
[3] J.P. Nolan, F. Mandy, Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems, Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology 69 (2006) 318–325, http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20266.
[4] V. Lange, P. Picotti, B. Domon, R. Aebersold, Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial, Mol. Syst. Biol. 4 (2008) 222, http://dx.doi.org/10.1038/msb.2008.61.
[5] M. Ramström, C. Hagman, J.K. Mitchell, P.J. Derrick, P. Håkansson, J. Bergquist, Depletion of high-abundant proteins in body fluids prior to liquid chromatography fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry., J. Proteome Res. 4 410–6. doi:http://dx.doi.org/10.1021/pr049812a.
[6] M. Caragata, A.K. Shah, B.L. Schulz, M.M. Hill, C. Punyadeera, Enrichment and identification of glycoproteins in human saliva using lectin magnetic bead arrays, Anal. Biochem. 497 (2016) 76–82, http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.11.024.
[7] M. Grønborg, T.Z. Kristiansen, A. Stensballe, J.S. Andersen, O. Ohara, M. Mann, et al., A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate, Molecular & Cellular Proteomics : MCP. 1 (2002) 517–527.
[8] J.R. Whiteaker, A.G. Paulovich, Peptide immunoaffinity enrichment coupled with mass spectrometry for peptide and protein quantification, Clin. Lab. Med. 31 (2011) 385–396, http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2011.07.004.
[9] N.L. Anderson, N.G. Anderson, L.R. Haines, D.B. Hardie, R.W. Olafson, T.W. Pearson, Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA), J. Proteome Res. 3 (2004) 235–244.
[10] A. Maddalena, A. Papassotiropoulos, B. Müller-Tillmanns, H.H. Jung, T. Hegi, R.M. Nitsch, et al., Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide, Arch. Neurol. 60 (2003) 1202–1206, http://dx.doi.org/10.1001/archneur.60.9.1202.
[11] I. Churcher, Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease, Curr. Top. Med. Chem. 6 (2006) 579–595.
[12] Y.-Y. Hu, S.-S. He, X.-C. Wang, Q.-H. Duan, S. Khatoon, K. Iqbal, et al., Elevated levels of phosphorylated neurofilament proteins in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients, Neurosci. Lett. 320 (2002) 156–160.
[13] B.D.W. Group, Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, Clin. Pharmacol. Ther. 69 (2001) 89–95, http://dx.doi.org/10.1067/mcp.2001.113989.

[14] H. Rodriguez, R. Rivers, C. Kinsinger, M. Mesri, T. Hiltke, A. Rahbar, et al., Reconstructing the pipeline by introducing multiplexed multiple reaction monitoring mass spectrometry for cancer biomarker verification: an NCI-CPTC initiative perspective, Proteomics Clin. Appl. 4 (2010) 904–914, http://dx.doi.org/10.1002/prca.201000057.
[15] J.A. Ludwig, J.N. Weinstein, Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection, Nat. Rev. Cancer 5 (2005) 845–856, http://dx.doi.org/10.1038/nrc1739.
[16] N.L. Anderson, The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum, Clin. Chem. 56 (2010) 177–185, http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2009.126706.
[17] V. Kulasingam, E.P. Diamandis, Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies, Nat. Clin. Pract. Oncol. 5 (2008) 588–599, http://dx.doi.org/10.1038/ncponc1187.
[18] A.K. Füzéry, J. Levin, M.M. Chan, D.W. Chan, Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges, Clinical Proteomics 10 (2013) 13, http://dx.doi.org/10.1186/1559-0275-10-13.
[19] Z. Zhang, D.W. Chan, The road from discovery to clinical diagnostics: lessons learned from the first FDA-cleared in vitro diagnostic multivariate index assay of proteomic biomarkers, Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 19 (2010) 2995–2999, http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0580.
[20] Z. Zhang, R.C. Bast, Y. Yu, J. Li, L.J. Sokoll, A.J. Rai, et al., Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer, Cancer Res. 64 (2004) 5882–5890, http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0746.
[21] A.J. Rai, Z. Zhang, J. Rosenzweig, I.-M. Shih, T. Pham, E.T. Fung, et al., Proteomic approaches to tumor marker discovery, Arch. Pathol. Lab. Med. 126 (2002) 1518–1526, http://dx.doi.org/10.1043/0003-9985(2002)126<1518:PATTMD>2.0.CO;2.
[22] A.L. Oberg, O. Vitek, Statistical design of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments, J. Proteome Res. 8 (2009) 2144–2156, http://dx.doi.org/10.1021/pr8010099.
[23] E.K. Shultz, Multivariate receiver-operating characteristic curve analysis: prostate cancer screening as an example, Clin. Chem. 41 (1995) 1248–1255.
[24] Z.-Z. Li, X.-Z. Lu, J.-B. Liu, L. Chen, Serum retinol-binding protein 4 levels in patients with diabetic retinopathy., J. Int. Med. Res. 38. 95–9.
[25] É. Csősz, P. Boross, A. Csutak, A. Berta, F. Tóth, S. Póliska, et al., Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy, J. Proteomics 75 (2012) 2196–2204, http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.019.
[26] J.L. Prabha, Tear Secretion-A Short Review 6 (2014) 155–157.
[27] R.J. Fullard, C. Snyder, Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 31 (1990) 1119–1126.
[28] J.M. Tiffany, Tears in health and disease, Eye (Lond.) 17 (2003) 923–926, http://dx.doi.org/10.1038/sj.eye.6700566.
[29] S. Contents, F. Contents, P.I. An, I. Immunity, The front line of host defense, Search (2009) 1–9.
[30] G.A. de Souza, L.M.F. Godoy, M. Mann, Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors, Genome Biol. 7 (2006) R72, http://dx.doi.org/10.1186/gb-2006-7-8-R72.
[31] L. Zhou, S.Z. Zhao, S.K. Koh, L. Chen, C. Vaz, V. Tanavde, et al., In-depth analysis of the human tear proteome, J. Proteomics 75 (2012) 3877–3885, http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.053.
[32] N. Li, N. Wang, J. Zheng, X.M. Liu, O.W. Lever, P.M. Erickson, et al., Characterization of human tear proteome using multiple proteomic analysis techniques, J. Proteome Res. 4 (2005) 2052–2061, http://dx.doi.org/10.1021/pr0501970.
[33] P.T. Janssen, O.P. van Bijsterveld, Origin and biosynthesis of human tear fluid proteins, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 24 (1983) 623–630.
[34] B. Walcott, The lacrimal gland and its veil of tears, News Physiol. Sci. 13 (1998) 97–103.
[35] L. Zhou, R.W. Beuerman, Tear analysis in ocular surface diseases, Prog. Retin. Eye Res. 31 (2012) 527–550, http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.06.002.
[36] N. von Thun und Hohenstein-Blaul, S. Funke, F.H. Grus, Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases, Exp. Eye Res. 117 (2013) 126–137, http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2013.07.015.
[37] M.D.P. Willcox, Z. Zhao, T. Naduvilath, P. Lazon de la Jara, Cytokine changes in tears and relationship to contact lens discomfort, Mol. Vis. 21 (2015) 293–305.
[38] L. Zhou, R.W. Beuerman, C.M. Chan, S.Z. Zhao, X.R. Li, H. Yang, et al., Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics, J. Proteome Res. 8 (2009) 4889–4905, http://dx.doi.org/10.1021/pr900686s.
[39] S. Srinivasan, M. Thangavelu, L. Zhang, K.B. Green, K.K. Nichols, iTRAQ quantitative proteomics in the analysis of tears in dry eye patients, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 53 (2012) 5052–5059, http://dx.doi.org/10.1167/iovs.11-9022.
[40] S.V. Aluru, S. Agarwal, B. Srinivasan, G.K. Iyer, S.M. Rajappa, U. Tatu, et al., Lacrimal proline rich 4 (LPRR4) protein in the tear fluid is a potential biomarker of dry eye syndrome, PLoS One 7 (2012), e51979 http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051979.
[41] F.H. Grus, V.N. Podust, K. Bruns, K. Lackner, S. Fu, E.A. Dalmasso, et al., SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46 (2005) 863–876, http://dx.doi.org/10.1167/iovs.04-0448.
[42] B.-S. Koo, D.-Y. Lee, H.-S. Ha, J.-C. Kim, C.-W. Kim, Comparative analysis of the tear protein expression in blepharitis patients using two-dimensional electrophoresis, J. Proteome Res. 4 (2005) 719–724, http://dx.doi.org/10.1021/pr0498133.
[43] Z. Lei, R.W. Beuerman, A.P. Chew, S.K. Koh, T.A. Cafaro, E.A. Urrets-Zavalia, et al., Quantitative analysis of N-linked glycoproteins in tear fluid of climatic droplet keratopathy by glycopeptide capture and iTRAQ, J. Proteome Res. 8 (2009) 1992–2003, http://dx.doi.org/10.1021/pr800962q.
[44] A. Acera, E. Vecino, I. Rodríguez-Agirretxe, K. Aloria, J.M. Arizmendi, C. Morales, et al., Changes in tear protein profile in keratoconus disease, Eye (Lond.) 25 (2011) 1225–1233, http://dx.doi.org/10.1038/eye.2011.105.
[45] S.A. Balasubramanian, V.C. Wasinger, D.C. Pye, M.D.P. Willcox, Preliminary identification of differentially expressed tear proteins in keratoconus, Mol. Vis. 19 (2013) 2124–2134.
[46] S. Ananthi, T. Chitra, R. Bini, N.V. Prajna, P. Lalitha, K. Dharmalingam, Comparative analysis of the tear protein profile in mycotic keratitis patients, Mol. Vis. 14 (2008) 500–507.
[47] A. Leonardi, A. Palmigiano, E.A. Mazzola, A. Messina, E.M.S. Milazzo, M. Bortolotti, et al., Identification of human tear fluid biomarkers in vernal keratoconjunctivitis using iTRAQ quantitative proteomics, Allergy 69 (2014) 254–260, http://dx.doi.org/10.1111/all.12331.
[48] C. Salvisberg, N. Tajouri, A. Hainard, P.R. Burkhard, P.H. Lalive, N. Turck, Exploring the human tear fluid: discovery of new biomarkers in multiple sclerosis, Proteomics Clin. Appl. 8 (2014) 185–194, http://dx.doi.org/10.1002/prca.201300053.
[49] G. Kalló, M. Emri, Z. Varga, B. Ujhelyi, J. Tőzsér, A. Csutak, et al., Changes in the chemical barrier composition of tears in Alzheimer's disease reveal potential tear diagnostic biomarkers, PLoS One 1–14 (2016) http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0158000.
[50] N. Tomosugi, K. Kitagawa, N. Takahashi, S. Sugai, I. Ishikawa, Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjögren's syndrome, J. Proteome Res. 4 (2005) 820–825, http://dx.doi.org/10.1021/pr0497576.
[51] A. Lebrecht, D. Boehm, M. Schmidt, H. Koelbl, F.H. Grus, Surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry to detect breast cancer markers in tears and serum, Cancer Genomics Proteomics 6 (2009) 75–84 doi:6/2/75 [pii].
[52] A. Lebrecht, D. Boehm, M. Schmidt, H. Koelbl, R.L. Schwirz, F.H. Grus, Diagnosis of breast cancer by tear proteomic pattern., Cancer Genomics Proteomics. 6 177–82.
[53] S. Li, R. Sack, T. Vijmasi, S. Sathe, A. Beaton, D. Quigley, et al., Antibody protein array analysis of the tear film cytokines, Optom. Vis. Sci. 85 (2008) 653–660, http://dx.doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181824e20.
[54] Y. Wei, N. Gadaria-Rathod, S. Epstein, P. Asbell, Tear cytokine profile as a noninvasive biomarker of inflammation for ocular surface diseases: standard operating procedures, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54 (2013) 8327–8336, http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-12132.
[55] X. Le Guezennec, J. Quah, L. Tong, N. Kim, Human tear analysis with miniaturized multiplex cytokine assay on " wall-less " 96-well plate, Mol. Vis. 21 (2015) 1151–1161.
[56] T.T. Wong, L. Zhou, J. Li, L. Tong, S.Z. Zhao, X.R. Li, et al., Proteomic profiling of inflammatory signaling molecules in the tears of patients on chronic glaucoma medication, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 52 (2011) 7385–7391, http://dx.doi.org/10.1167/iovs.10-6532.
[57] T.H. Wakamatsu, M. Dogru, K. Tsubota, Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases, Arq. Bras. Oftalmol. 71 (2008) 72–79, http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27492008000700015.
[58] S.S. Çomoğlu, H. Güven, M. Acar, G. Öztürk, B. Koçer, Tear levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with Parkinson's disease, Neurosci. Lett. 553 (2013) 63–67, http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.08.019.
[59] D. Devos, G. Forzy, J. de Seze, S. Caillez, P. Louchart, P. Gallois, et al., Silver stained isoelectrophoresis of tears and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis, J. Neurol. 248 (2001) 672–675, http://dx.doi.org/10.1007/PL00007833.
[60] S.P. Humphrey, R.T. Williamson, A review of saliva: normal composition, flow, and function, J. Prosthet. Dent. 85 (2001) 162–169, http://dx.doi.org/10.1067/mpr.2001.113778.
[61] P.D.V. de Almeida, A.M.T. Grégio, M.A.N. Machado, A.A.S. de Lima, L.R. Azevedo, Saliva composition and functions: a comprehensive review, J. Contemp. Dent. Pract. 9 (2008) 72–80.
[62] B.L. Schulz, J. Cooper-White, C.K. Punyadeera, Saliva proteome research: current status and future outlook, Crit. Rev. Biotechnol. 33 (2013) 246–259, http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2012.687361.
[63] N. Ramasubbu, V. Paloth, Y. Luo, G.D. Brayer, M.J. Levine, Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 A resolution: implications for its role in the oral cavity., Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr. 52 (1996) 435–46. doi:http://dx.doi.org/10.1107/S0907444995014119.
[64] S. Hu, Y. Xie, P. Ramachandran, R.R. Ogorzalek Loo, Y. Li, J.A. Loo, et al., Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry, Proteomics 5 (2005) 1714–1728, http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401037.
[65] P. Denny, F.K. Hagen, M. Hardt, L. Liao, W. Yan, M. Arellanno, et al., The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions, J. Proteome Res. 7 (2008) 1994–2006, http://dx.doi.org/10.1021/pr700764j.
[66] T. Guo, P.A. Rudnick, W. Wang, C.S. Lee, D.L. Devoe, B.M. Balgley, Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS, J. Proteome Res. 5 (2006) 1469–1478, http://dx.doi.org/10.1021/pr060065m.
[67] L.Y. Lin, C.C. Chang, Determination of protein concentration in human saliva, Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi = The Kaohsiung Journal of Medical Sciences 5 (1989) 389–397.
[68] M. Shaila, G.P. Pai, P. Shetty, Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: a comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis, Journal of Indian Society of Periodontology 17 (2013) 42–46, http://dx.doi.org/10.4103/0972-124X.107473.
[69] Y.M. Henskens, U. van der Velden, E.C. Veerman, A.V.N. Amerongen, Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis or periodontitis, J. Periodontal Res. 28 (1993) 43–48.

[70] A.G. Ngounou Wetie, K.L. Wormwood, L. Charette, J.P. Ryan, A.G. Woods, C.C. Darie, Comparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the salivary proteome of children with autism spectrum disorder, J. Cell. Mol. Med. 19 (2015) 2664–2678, http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12658.
[71] C.F. Streckfus, O. Mayorga-Wark, D. Arreola, C. Edwards, L. Bigler, W.P. Dubinsky, Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in situ of the breast, Cancer Invest. 26 (2008) 159–167, http://dx.doi.org/10.1080/07357900701783883.
[72] C.F. Streckfus, K.A. Storthz, L. Bigler, W.P. Dubinsky, A comparison of the proteomic expression in pooled saliva specimens from individuals diagnosed with ductal carcinoma of the breast with and without lymph node involvement, Journal of Oncology 2009 (2009) 737619, http://dx.doi.org/10.1155/2009/737619.
[73] E.P. de Jong, H. Xie, G. Onsongo, M.D. Stone, X.-B. Chen, J.A. Kooren, et al., Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions, PLoS One 5 (2010), e11148 http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011148.
[74] F.V. Winck, A.C.P. Ribeiro, R.R. Domingues, L.Y. Ling, D.M. Riaño-Pachón, C. Rivera, et al., Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivary extracellular vesicles, Sci. Rep. 5 (2015) 16305, http://dx.doi.org/10.1038/srep16305.
[75] C.-C. Wu, H.-W. Chu, C.-W. Hsu, K.-P. Chang, H.-P. Liu, Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma, Proteomics 15 (2015) 3394–3404, http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201500157.
[76] I. Devic, M. Shi, M.M. Schubert, M. Lloid, K.T. Izutsu, C. Pan, et al., Proteomic analysis of saliva from patients with oral chronic graft-versus-host disease, Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation 20 (2014) 1048–1055, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.03.031.
[77] C.W. Bassim, K.S. Ambatipudi, J.W. Mays, D.A. Edwards, S. Swatkoski, H. Fassil, et al., Quantitative salivary proteomic differences in oral chronic graft-versus-host disease, J. Clin. Immunol. 32 (2012) 1390–1399, http://dx.doi.org/10.1007/s10875-012-9738-4.
[78] K.S. Ambatipudi, S. Swatkoski, J.J. Moresco, P.G. Tu, A. Coca, J.H. Anolik, et al., Quantitative proteomics of parotid saliva in primary Sjögren's syndrome, Proteomics 12 (2012) 3113–3120, http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200208.
[79] V. Thumbigere-Math, B.S. Michalowicz, E.P. de Jong, T.J. Griffin, D.L. Basi, P.J. Hughes, et al., Salivary proteomics in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, Oral Dis. 21 (2015) 46–56, http://dx.doi.org/10.1111/odi.12204.
[80] S.A. Flowers, L. Ali, C.S. Lane, M. Olin, N.G. Karlsson, Selected reaction monitoring to differentiate and relatively quantitate isomers of sulfated and unsulfated core 1 O-glycans from salivary MUC7 protein in rheumatoid arthritis, Mol. Cell. Proteomics 12 (2013) 921–931, http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M113.028878.
[81] C. Giacomelli, L. Bazzichi, L. Giusti, F. Ciregia, C. Baldini, Y. Da Valle, et al., MALDI-TOF and SELDI-TOF analysis: "tandem" techniques to identify potential biomarker in fibromyalgia, Reumatismo 63 (2011) 165–170, http://dx.doi.org/10.4081/reumatismo.2011.165.
[82] S. Shintani, H. Hamakawa, Y. Ueyama, M. Hatori, T. Toyoshima, Identification of a truncated cystatin SA-I as a saliva biomarker for oral squamous cell carcinoma using the SELDI ProteinChip platform, Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 39 (2010) 68–74, http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2009.10.001.
[83] C. Gallo, D. Ciavarella, A. Santarelli, E. Ranieri, G. Colella, L. Lo Muzio, et al., Potential salivary proteomic markers of oral squamous cell carcinoma, Cancer Genomics Proteomics 13 (2016) 55–62.
[84] O.H. Ryu, J.C. Atkinson, G.T. Hoehn, G.G. Illei, T.C. Hart, Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis, Rheumatology 45 (2006) 1077–1086, http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kei212.
[85] L. Bigler, C.F. Streckfus, L.R. Bigler, M. Zwick, The use of surface-enhanced laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry to detect putative breast cancer markers in saliva : a feasibility study, J. Oral Pathol. Med. 125 (2006) 292–300, http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2006.00427.x.
[86] F. Ardito, M. Giuliani, D. Perrone, G. Giannatempo, O. Di Fede, G. Favia, et al., Expression of salivary biomarkers in patients with Oral Mucositis: evaluation by SELDI-TOF/MS, Oral Dis. (2015) http://dx.doi.org/10.1111/odi.12405 (n/a–n/a).
[87] J.K. Chen, E. Eisenberg, D.J. Krutchkoff, R. V Katz, Changing trends in oral cancer in the United States, 1935 to 1985: a Connecticut study., J. Oral Maxillofac. Surg. 49 (1991) 1152–8.
[88] F. Levi, C. La Vecchia, L. Randimbison, V.C. Te, Cancer incidence and mortality in young adults in Vaud, Switzerland, 1974–1992, Int. J. Cancer 61 (1995) 606–610.
[89] M.-H. Metz-Boutigue, P. Shooshtarizadeh, G. Prevost, Y. Haikel, J.-F. Chich, Antimicrobial peptides present in mammalian skin and gut are multifunctional defence molecules, Curr. Pharm. Des. 16 (2010) 1024–1039.
[90] J. Wiesner, A. Vilcinskas, Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system, Virulence 1 (2010) 440–464, http://dx.doi.org/10.4161/viru.1.5.12983.
[91] É. Csősz, G. Emri, G. Kalló, G. Tsaprailis, J. Tőzsér, Highly abundant defense proteins in human sweat as revealed by targeted proteomics and label-free quantification mass spectrometry, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 29 (2015) 2024–2031, http://dx.doi.org/10.1111/jdv.13221.
[92] M.I. Hassan, A. Waheed, S. Yadav, T.P. Singh, F. Ahmad, Prolactin inducible protein in cancer, fertility and immunoregulation: structure, function and its clinical implications, Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 447–459, http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8463-x.
[93] F. Rizzi, S. Bettuzzi, The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis, Endocr. Relat. Cancer 17 (2010) R1–17, http://dx.doi.org/10.1677/ERC-09-0140.
[94] M.D. Ganfornina, S. Do Carmo, J.M. Lora, S. Torres-Schumann, M. Vogel, M. Allhorn, et al., Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress, Aging Cell 7 (2008) 506–515, http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00395.x.
[95] E.T. Gum, R.A. Swanson, C. Alano, J. Liu, S. Hong, P.R. Weinstein, et al., Human serum albumin and its N-terminal tetrapeptide (DAHK) block oxidant-induced neuronal death, Stroke 35 (2004) 590–595, http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.0000110790.05859.DA.
[96] M. Burian, A. Velic, K. Matic, S. Günther, B. Kraft, L. Gonser, et al., Quantitative proteomics of the human skin secretome reveal a reduction in immune defense mediators in ectodermal dysplasia patients, J. Investig. Dermatol. 135 (2015) 759–767, http://dx.doi.org/10.1038/jid.2014.462.
[97] M.M. Raiszadeh, M.M. Ross, P.S. Russo, M.A. Schaepper, W. Zhou, J. Deng, et al., Proteomic analysis of eccrine sweat: implications for the discovery of schizophrenia biomarker proteins, J. Proteome Res. 11 (2012) 2127–2139, http://dx.doi.org/10.1021/pr2007957.
[98] N.S. Penneys, J. Haft, R. Rubin, Electrophoretic patterns of proteins in cystic fibrosis sweat, J. Investig. Dermatol. 83 (1984) 238–239.
[99] S. Rieg, H. Steffen, S. Seeber, A. Humeny, H. Kalbacher, K. Dietz, et al., Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo, J. Immunol. 174 (2005) 8003–8010, http://dx.doi.org/10.1016/S0093-3619(08)70018-2.
[100] D. Alexiou, A. Anagnostopoulos, C. Papadatos, Total free amino acids, ammonia, and protein in the sweat of children, Am. J. Clin. Nutr. 32 (1979) 750–752.
[101] M.J. Patterson, S.D. Galloway, M.A. Nimmo, Variations in regional sweat composition in normal human males, Exp. Physiol. 85 (2000) 869–875.
[102] N.A. Taylor, C.A. Machado-Moreira, Regional variations in transepidermal water loss, eccrine sweat gland density, sweat secretion rates and electrolyte composition in resting and exercising humans, Extreme Physiology & Medicine 2 (2013) 4, http://dx.doi.org/10.1186/2046-7648-2-4.
[103] K. Sueno, N. Nakaima, K. Shingaki, M. Ura, Y. Noda, T. Kosugi, et al., Total protein concentration in selectively collected secretions from the middle and inferior meatus of the nose, Auris Nasus Larynx 13 (Suppl 1) (1986) S85–S88.
[104] L. Ruocco, B. Fattori, A. Romanelli, M. Martelloni, A. Casani, M. Samolewska, et al., A new collection method for the evaluation of nasal mucus proteins, Clin. Exp. Allergy 28 (1998) 881–888.
[105] A.M. Cole, P. Dewan, T. Ganz, Innate antimicrobial activity of nasal secretions, Infect. Immun. 67 (1999) 3267–3275.
[106] S.D. Meredith, G.D. Raphael, J.N. Baraniuk, S.M. Banks, M.A. Kaliner, The pathophysiology of rhinitis. III. The control of IgG secretion, J. Allergy Clin. Immunol. 84 (1989) 920–930.
[107] A. Saieg, K.J. Brown, M.T. Pena, M.C. Rose, D. Preciado, Proteomic analysis of pediatric sinonasal secretions shows increased MUC5B mucin in CRS, Pediatr. Res. 77 (2015) 356–362, http://dx.doi.org/10.1038/pr.2014.187.
[108] B. Casado, L.K. Pannell, S. Viglio, P. Iadarola, J.N. Baraniuk, Analysis of the sinusitis nasal lavage fluid proteome using capillary liquid chromatography interfaced to electrospray ionization-quadrupole time of flight- tandem mass spectrometry, Electrophoresis 25 (2004) 1386–1393, http://dx.doi.org/10.1002/elps.200305862.
[109] H. Wang, S. Chavali, R. Mobini, A. Muraro, F. Barbon, D. Boldrin, et al., A pathway-based approach to find novel markers of local glucocorticoid treatment in intermittent allergic rhinitis, Allergy 66 (2011) 132–140, http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02444.x.
[110] H.B. Schiöth, S. Craft, S.J. Brooks, W.H. Frey, C. Benedict, Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions, Mol. Neurobiol. 46 (2012) 4–10, http://dx.doi.org/10.1007/s12035-011-8229-6.
[111] Z. Liu, M. Jiang, T. Kang, D. Miao, G. Gu, Q. Song, et al., Lactoferrin-modified PEG-co-PCL nanoparticles for enhanced brain delivery of NAP peptide following intranasal administration, Biomaterials 34 (2013) 3870–3881, http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.003.
[112] J. Hitti, J.A. Lapidus, X. Lu, A.P. Reddy, T. Jacob, S. Dasari, et al., Noninvasive diagnosis of intraamniotic infection: proteomic biomarkers in vaginal fluid, Am. J. Obstet. Gynecol. 203 (2010) http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2010.03.037 (32.e1–8).
[113] G.G. Donders, E. Bosmans, A. Dekeersmaecker, A. Vereecken, B. Van Bulck, B. Spitz, Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora, Am. J. Obstet. Gynecol. 182 (2000) 872–878.
[114] H.L. Martin, B.A. Richardson, P.M. Nyange, L. Lavreys, S.L. Hillier, B. Chohan, et al., Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition, J. Infect. Dis. 180 (1999) 1863–1868, http://dx.doi.org/10.1086/315127.
[115] S.S. Witkin, I.M. Linhares, P. Giraldo, Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation, Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 21 (2007) 347–354, http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2006.12.004.
[116] G. Zegels, G.A. Van Raemdonck, W.A. Tjalma, X.W. Van Ostade, Use of cervicovaginal fluid for the identification of biomarkers for pathologies of the female genital tract, Proteome Sci. 8 (2010) 63, http://dx.doi.org/10.1186/1477-5956-8-63.
[117] J.L.V. Shaw, C.R. Smith, E.P. Diamandis, Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid, J. Proteome Res. 6 (2007) 2859–2865, http://dx.doi.org/10.1021/pr0701658.
[118] M.G. Gravett, A. Thomas, K.A. Schneider, A.P. Reddy, S. Dasari, T. Jacob, et al., Proteomic analysis of cervical-vaginal fluid: identification of novel biomarkers for detection of intra-amniotic infection, J. Proteome Res. 6 (2007) 89–96, http://dx.doi.org/10.1021/pr060149v.
[119] T. Orfanelli, A. Jayaram, G. Doulaveris, L.J. Forney, W.J. Ledger, S.S. Witkin, Human epididymis protein 4 and secretory leukocyte protease inhibitor in vaginal fluid: relation to vaginal components and bacterial composition, Reproductive Sciences

(Thousand Oaks, Calif.) 21 (2014) 538–542, http://dx.doi.org/10.1177/1933719113503416.
[120] U. Rüetschi, A. Rosén, G. Karlsson, H. Zetterberg, L. Rymo, H. Hagberg, et al., Proteomic analysis using protein chips to detect biomarkers in cervical and amniotic fluid in women with intra-amniotic inflammation., J. Proteome Res.. 4 2236–42. doi:http://dx.doi.org/10.1021/pr050139e.
[121] L. Pereira, A.P. Reddy, T. Jacob, A. Thomas, K.A. Schneider, S. Dasari, et al., Identification of novel protein biomarkers of preterm birth in human cervical-vaginal fluid, J. Proteome Res. 6 (2007) 1269–1276, http://dx.doi.org/10.1021/pr0605421.
[122] M.K.W. Di Quinzio, H.M. Georgiou, S.J. Holdsworth-Carson, M. Ayhan, Y.J. Heng, S.P. Walker, et al., Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid displays differential protein expression in association with labor onset at term, J. Proteome Res. 7 (2008) 1916–1921, http://dx.doi.org/10.1021/pr7006413.
[123] Y.J. Heng, M.K.W. Di Quinzio, M. Permezel, M. Ayhan, G.E. Rice, H.M. Georgiou, Temporal proteomic analysis of human cervicovaginal fluid with impending term labor, J. Proteome Res. 9 (2010) 1344–1350, http://dx.doi.org/10.1021/pr900892f.
[124] S. Liong, M.K.W. Di Quinzio, G. Fleming, M. Permezel, G.E. Rice, H.M. Georgiou, Prediction of spontaneous preterm labour in at-risk pregnant women, Reproduction (Cambridge, England) 146 (2013) 335–345, http://dx.doi.org/10.1530/REP-13-0175.
[125] S.J. Shah, K.H. Yu, V. Sangar, S.I. Parry, I.A. Blair, Identification and quantification of preterm birth biomarkers in human cervicovaginal fluid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, J. Proteome Res. 8 (2009) 2407–2417, http://dx.doi.org/10.1021/pr8010342.
[126] G.A.A. Van Raemdonck, W.A.A. Tjalma, E.P. Coen, C.E. Depuydt, X.W.M. Van Ostade, Identification of protein biomarkers for cervical cancer using human cervicovaginal fluid, PLoS One 9 (2014), e106488 http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106488.
[127] G. Van Raemdonck, G. Zegels, E. Coen, B. Vuylsteke, W. Jennes, X. Van Ostade, Increased Serpin A5 levels in the cervicovaginal fluid of HIV-1 exposed seronegatives suggest that a subtle balance between serine proteases and their inhibitors may determine susceptibility to HIV-1 infection, Virology 458–459 (2014) 11–21, http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.015.
[128] E.I. Christensen, J. Gburek, Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology, Pediatric Nephrology (Berlin, Germany) 19 (2004) 714–721, http://dx.doi.org/10.1007/s00467-004-1494-0.
[129] B. Haraldsson, J. Sörensson, Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier, News Physiol. Sci. 19 (2004) 7–10.
[130] W.S. McDougal, A.J. Wein, L.R. Kavoussi, A.C. Novick, A.W. Partin, C.A. Peters, et al., Campbell-Walsh Urology 10th Edition Review, 2011.
[131] S.H. Clarke, Investigation into methods of collection of urine for culture from men and women, Br. Med. J. 2 (1960) 1491–1493 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2097631&tool=pmcentrez&rendertype=abstract (accessed February 15, 2016).
[132] N.A. Brunzel, Fundamentals of Urine and Body Fluid Analysis, 3rd ed Elsevier/Saunders, St. Louis, Mo, 2013.
[133] S.M. Bradbury, Collection of urine specimens in general practice: to clean or not to clean? J. R. Coll. Gen. Pract. 38 (1988) 363–365.
[134] S. Cui, P.J. Verroust, S.K. Moestrup, E.I. Christensen, Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule, Am. J. Physiol. 271 (1996) F900–F907 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898021 (accessed January 24, 2016).
[135] T. Pisitkun, R.-F. Shen, M.A. Knepper, Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine, Proc. Natl. Acad. Sci. 101 (2004) 13368–13373, http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0403453101.
[136] A. Castagna, D. Cecconi, L. Sennels, J. Rappsilber, L. Guerrier, F. Fortis, et al., Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads, J. Proteome Res. 4 (2006) 1917–1930, http://dx.doi.org/10.1021/pr050153r.
[137] R. Pieper, C.L. Gatlin, A.M. McGrath, A.J. Makusky, M. Mondal, M. Seonarain, et al., Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots, Proteomics 4 (2004) 1159–1174, http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200300661.
[138] L. Wang, F. Li, W. Sun, S. Wu, X. Wang, L. Zhang, et al., Concanavalin A-captured glycoproteins in healthy human urine, Mol. Cell. Proteomics 5 (2006) 560–562, http://dx.doi.org/10.1074/mcp.D500013-MCP200.
[139] W. Sun, F. Li, S. Wu, X. Wang, D. Zheng, J. Wang, et al., Human urine proteome analysis by three separation approaches, Proteomics 5 (2005) 4994–5001, http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401334.
[140] F. Locatelli, B. Canaud, K.U. Eckardt, P. Stenvinkel, C. Wanner, C. Zoccali, The importance of diabetic nephropathy in current nephrological practice, J. Control. Release 18 (2003) 1716–1725, http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfg288.
[141] H.H. Otu, H. Can, D. Spentzos, R.G. Nelson, R.L. Hanson, H.C. Looker, et al., Prediction of diabetic nephropathy using urine proteomic profiling 10 years prior to development of nephropathy, Diabetes Care 30 (2007) 638–643, http://dx.doi.org/10.2337/dc06-1656.
[142] J.J. Coon, P. Zürbig, M. Dakna, A.F. Dominiczak, S. Decramer, D. Fliser, et al., CE-MS analysis of the human urinary proteome for biomarker discovery and disease diagnostics, Proteomics Clin. Appl. 2 (2008) 964, http://dx.doi.org/10.1002/prca.200800024.
[143] I. Rehman, A.R. Azzouzi, J.W.F. Catto, S. Allen, S.S. Cross, K. Feeley, et al., Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study, Urology 64 (2004) 1238–1243, http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2004.06.063.
[144] M. Bakun, M. Niemczyk, D. Domanski, R. Jazwiec, A. Perzanowska, S. Niemczyk, et al., Urine proteome of autosomal dominant polycystic kidney disease patients, Clinical Proteomics 9 (2012) 13, http://dx.doi.org/10.1186/1559-0275-9-13.
[145] L.F. Quintana, J.M. Campistol, M.P. Alcolea, E. Bañon-Maneus, A. Sol-González, P.R. Cutillas, Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction, Mol. Cell. Proteomics 8 (2009) 1658–1673, http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M900059-MCP200.
[146] O. Johnston, H. Cassidy, S. O'Connell, A. O'Riordan, W. Gallagher, P.B. Maguire, et al., Identification of β2-microglobulin as a urinary biomarker for chronic allograft nephropathy using proteomic methods, Proteomics Clin. Appl. 5 (2011) 422–431, http://dx.doi.org/10.1002/prca.201000160.
[147] C. Lacroix, C. Caubet, A. Gonzalez-de-Peredo, B. Breuil, D. Bouyssié, A. Stella, et al., Label-free quantitative urinary proteomics identifies the arginase pathway as a new player in congenital obstructive nephropathy, Mol. Cell. Proteomics 13 (2014) 3421–3434, http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M114.040121.
[148] J.C. Oates, S. Varghese, A.M. Bland, T.P. Taylor, S.E. Self, R. Stanislaus, et al., Prediction of urinary protein markers in lupus nephritis, Kidney Int. 68 (2005) 2588–2592, http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00730.x.
[149] P.A. Cadieux, D.T. Beiko, J.D. Watterson, J.P. Burton, J.C. Howard, B.E. Knudsen, et al., Surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (SELDI-TOF-MS): a new proteomic urinary test for patients with urolithiasis, J. Clin. Lab. Anal. 18 (2004) 170–175, http://dx.doi.org/10.1002/jcla.20018.
[150] M. Saito, M. Kimoto, T. Araki, Y. Shimada, R. Fujii, K. Oofusa, et al., Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers, Eur. Urol. 48 (2005) 865–871, http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2005.04.028.
[151] M. Ostergaard, H.H. Rasmussen, H.V. Nielsen, H. Vorum, T.F. Orntoft, H. Wolf, et al., Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation, Cancer Res. 57 (1997) 4111–4117 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9307301 (accessed January 27, 2016).
[152] S. Kageyama, T. Isono, H. Iwaki, Y. Wakabayashi, Y. Okada, K. Kontani, et al., Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine, Clin. Chem. 50 (2004) 857–866, http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2003.027425.
[153] C.-L. Chen, T.-S. Lin, C.-H. Tsai, C.-C. Wu, T. Chung, K.-Y. Chien, et al., Identification of potential bladder cancer markers in urine by abundant-protein depletion coupled with quantitative proteomics, J. Proteomics 85 (2013) 28–43, http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.024.
[154] Y.-T. Chen, C.-L. Chen, H.-W. Chen, T. Chung, C.-C. Wu, C.-D. Chen, et al., Discovery of novel bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics using iTRAQ technology, J. Proteome Res. 9 (2010) 5803–5815, http://dx.doi.org/10.1021/pr100576x.
[155] J. Wu, Y. Chen, W. Gu, Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases, J. Zhejiang Univ. Sci. B 11 (2010) 227–237, http://dx.doi.org/10.1631/jzus.B0900327.
[156] N. Yang, S. Feng, K. Shedden, X. Xie, Y. Liu, C.J. Rosser, et al., Urinary glycoprotein biomarker discovery for bladder cancer detection using LC/MS-MS and label-free quantification, Clin. Cancer Res. 17 (2011) 3349–3359, http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3121.
[157] Y.-T. Chen, H.-W. Chen, D. Domanski, D.S. Smith, K.-H. Liang, C.-C. Wu, et al., Multiplexed quantification of 63 proteins in human urine by multiple reaction monitoring-based mass spectrometry for discovery of potential bladder cancer biomarkers, J. Proteomics 75 (2012) 3529–3545, http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.031.
[158] G. Alves, D.A. Pereira, V. Sandim, A.A. Ornellas, N. Escher, C. Melle, et al., Urine screening by Seldi-Tof, followed by biomarker identification, in a Brazilian cohort of patients with renal cell carcinoma (RCC)., Int. Braz J Urol. 39 228–39.
[159] D.-L. Wu, W.-H. Zhang, W.-J. Wang, S.-B. Jing, Y.-M. Xu, Proteomic evaluation of urine from renal cell carcinoma using SELDI-TOF-MS and tree analysis pattern, Technol. Cancer Res. Treat. 7 (2008) 155–160.
[160] J. Mueller, F. Von Eggeling, D. Driesch, J. Schubert, C. Melle, K. Junker, ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients, Eur. Urol. 47 (2005) 885–894, http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2005.02.016.
[161] A. Vlahou, P.F. Schellhammer, S. Mendrinos, K. Patel, F.I. Kondylis, L. Gong, et al., Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine, Am. J. Pathol. 158 (2001) 1491–1502, http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64100-4.
[162] M.A. McAteer, A.M. Akhtar, C. von Zur Muhlen, R.P. Choudhury, An approach to molecular imaging of atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation using microparticles of iron oxide, Atherosclerosis 209 (2010) 18–27, http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.009.
[163] C. von Zur Muhlen, E. Schiffer, P. Zuerbig, M. Kellmann, M. Brasse, N. Meert, et al., Evaluation of urine proteome pattern analysis for its potential to reflect coronary artery atherosclerosis in symptomatic patients, J. Proteome Res. 8 (2009) 335–345, http://dx.doi.org/10.1021/pr800615t.
[164] D. Gozal, S. Jortani, A.B. Snow, L. Kheirandish-Gozal, R. Bhattacharjee, J. Kim, et al., Two-dimensional differential in-gel electrophoresis proteomic approaches reveal urine candidate biomarkers in pediatric obstructive sleep apnea, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180 (2009) 1253–1261, http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200905-0765OC.
[165] B. Ye, S. Skates, S.C. Mok, N.K. Horick, H.F. Rosenberg, A. Vitonis, et al., Proteomic-based discovery and characterization of glycosylated eosinophil-derived neurotoxin and COOH-terminal osteopontin fragments for ovarian cancer in urine, Clin. Cancer Res. 12 (2006) 432–441, http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0461.
[166] J. Beretov, V.C. Wasinger, E.K.A. Millar, P. Schwartz, P.H. Graham, Y. Li, Proteomic analysis of urine to identify breast cancer biomarker candidates using a label-free LC-MS/MS approach, PLoS One 10 (2015), e0141876 http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141876.

[167] L. Su, L. Cao, R. Zhou, Z. Jiang, K. Xiao, W. Kong, et al., Identification of novel biomarkers for sepsis prognosis via urinary proteomic analysis using iTRAQ labeling and 2D-LC-MS/MS, PLoS One 8 (2013), e54237 http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054237.
[168] L. Su, R. Zhou, C. Liu, B. Wen, K. Xiao, W. Kong, et al., Urinary proteomics analysis for sepsis biomarkers with iTRAQ labeling and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Trauma Acute Care Surg. 74 (2013) 940–945, http://dx.doi.org/10.1097/TA.0b013e31828272c5.
[169] P. Vestergaard, R. Leverett, Constancy of urinary creatinine excretion, J. Lab. Clin. Med. 51 (1958) 211–218.
[170] D. Theodorescu, D. Fliser, S. Wittke, H. Mischak, R. Krebs, M. Walden, et al., Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine, Electrophoresis 26 (2005) 2797–2808, http://dx.doi.org/10.1002/elps.200400208.
[171] M. Shi, W.M. Caudle, J. Zhang, Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach, Neurobiol. Dis. 35 (2009) 157–164, http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.09.004.
[172] T.K. Sigdel, C.D. Nicora, S.-C. Hsieh, H. Dai, W.-J. Qian, D.G. Camp, et al., Optimization for peptide sample preparation for urine peptidomics, Clinical Proteomics 11 (2014) 7, http://dx.doi.org/10.1186/1559-0275-11-7.
[173] P. Olszowy, B. Buszewski, Urine sample preparation for proteomic analysis, J. Sep. Sci. 37 (2014) 2920–2928, http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201400331.
[174] S. Thomas, L. Hao, W.A. Ricke, L. Li, Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics, Proteomics Clin. Appl. 10 (4) (2016) 358–370, http://dx.doi.org/10.1002/prca.201500102.
[175] S. Kalantari, A. Jafari, R. Moradpoor, E. Ghasemi, E. Khalkhal, Human urine proteomics: analytical techniques and clinical applications in renal diseases, International Journal of Proteomics 2015 (2015) 782798, http://dx.doi.org/10.1155/2015/782798.
[176] M.J. Kim, A.H. Frankel, F.W.K. Tam, Urine proteomics and biomarkers in renal disease, Nephron Exp. Nephrol. 119 (2011) e1–e7, http://dx.doi.org/10.1159/000324223.
[177] T. Ganz, The role of antimicrobial peptides in innate immunity, Integr. Comp. Biol. 43 (2003) 300–304, http://dx.doi.org/10.1093/icb/43.2.300.
[178] N.N. Schommer, R.L. Gallo, Structure and function of the human skin microbiome, Trends Microbiol. 21 (2013) 660–668, http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.10.001.
[179] G. Kalló, A. Chatterjee, M. Tóth, É. Rajnavölgyi, A. Csutak, J. Tőzsér, et al., Relative quantification of human β-defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring, Rapid Commun. Mass Spectrom. 29 (2015) 1623–1631, http://dx.doi.org/10.1002/rcm.7259.
[180] M. Zasloff, Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract, J. Am. Soc. Nephrol. 18 (2007) 2810–2816, http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2007050611.
[181] G. Marquis, S. Garzon, H. Strykowski, P. Auger, Cell walls of normal and lysozyme-damaged blastoconidia of *Candida albicans*: localization of surface factor 4 antigen and vicinal-glycol staining, Infect. Immun. 59 (1991) 1312–1318.
[182] S. Lee-Huang, P.L. Huang, Y. Sun, H.F. Kung, D.L. Blithe, H.C. Chen, Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (1999) 2678–2681.
[183] T.H. Flo, K.D. Smith, S. Sato, D.J. Rodriguez, M.A. Holmes, R.K. Strong, et al., Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron, Nature 432 (2004) 917–921, http://dx.doi.org/10.1038/nature03104.
[184] J. Yang, D. Goetz, J.Y. Li, W. Wang, K. Mori, D. Setlik, et al., An iron delivery pathway mediated by a lipocalin, Mol. Cell 10 (2002) 1045–1056.
[185] R.L. McKown, N. Wang, R.W. Raab, R. Karnati, Y. Zhang, P.B. Williams, et al., Lacritin and other new proteins of the lacrimal functional unit, Exp. Eye Res. 88 (2009) 848–858, http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2008.09.002.
[186] J. Wang, N. Wang, J. Xie, S.C. Walton, R.L. McKown, R.W. Raab, et al., Restricted epithelial proliferation by lacritin via PKCalpha-dependent NFAT and mTOR pathways, J. Cell Biol. 174 (2006) 689–700, http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200605140.
[187] W. Wang, J. Despanie, P. Shi, M.C. Edman-Woolcott, Y.-A. Lin, H. Cui, et al., Lacritin-mediated regeneration of the corneal epithelia by protein polymer nanoparticles, Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine 2 (2014) 8131–8141, http://dx.doi.org/10.1039/C4TB00979G.
[188] R.L. McKown, E.V. Coleman Frazier, K.K. Zadrozny, A.M. Deleault, R.W. Raab, D.S. Ryan, et al., A cleavage-potentiated fragment of tear lacritin is bactericidal, J. Biol. Chem. 289 (2014) 22172–22182, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.570143.
[189] R.A. Kowluru, M. Mishra, Contribution of epigenetics in diabetic retinopathy, Sci. China Life Sci. 58 (2015) 556–563, http://dx.doi.org/10.1007/s11427-015-4853-0.
[190] N. Cheung, P. Mitchell, T.Y. Wong, Diabetic retinopathy, Lancet 376 (2010) 124–136, http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
[191] G.A. Lutty, Effects of diabetes on the eye, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54 (2013) 81–87, http://dx.doi.org/10.1167/iovs.13-12979.
[192] Y.K. Dastur, The rationale of argon green laser photocoagulation for diabetic maculopathy, J. Postgrad. Med. 40 (1994) 13–17.
[193] C. Gutiérrez-vázquez, C. Villarroya-beltri, M. Mittelbrunn, Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions, Immunol. Rev. 251 (2013) 125–142, http://dx.doi.org/10.1111/imr.12013.Transfer.
[194] Y.J. Yoon, O.Y. Kim, Y.S. Gho, Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes, BMB Rep. 47 (2014) 531–539, http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.10.164.
[195] G. Turturici, R. Tinnirello, G. Sconzo, F. Geraci, Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 306 (2014) C621–C633, http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00228.2013.
[196] S.J. Gould, G. Raposo, As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles, Journal of Extracellular Vesicles 2 (2013) 3–5, http://dx.doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389.
[197] M.-P. Caby, D. Lankar, V.-S. Claude, G. Raposo, C. Bonnerot, Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma, Int. Immunol. 17 (2005) 879–887, http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxh267.
[198] J. Nilsson, J. Skog, A. Nordstrand, V. Baranov, L. Mincheva-Nilsson, X.O. Breakefield, et al., Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer, Br. J. Cancer 100 (2009) 1603–1607, http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605058.
[199] S. Keller, J. Ridinger, A.-K. Rupp, J.W.G. Janssen, P. Altevogt, Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics, J. Transl. Med. 9 (2011) 86, http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-9-86.
[200] Y. Ogawa, Y. Miura, A. Harazono, M. Kanai-Azuma, Y. Akimoto, H. Kawakami, et al., Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva, Biol. Pharm. Bull. 34 (2011) 13–23, http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.13.
[201] K.R. Qazi, P. Torregrosa Paredes, B. Dahlberg, J. Grunewald, A. Eklund, S. Gabrielsson, Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis, Thorax 65 (2010) 1016–1024, http://dx.doi.org/10.1136/thx.2009.132027.
[202] C. Admyre, S.M. Johansson, K.R. Qazi, J.-J. Filén, R. Lahesmaa, M. Norman, et al., Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk, J. Immunol. 179 (2007) 1969–1978, http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969.
[203] K.M. Little, D.M. Smalley, N.L. Harthun, K. Ley, The plasma microparticle proteome, Semin. Thromb. Hemost. 36 (2010) 845–856, http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1267038.
[204] M. Harel, P. Oren-Giladi, O. Kaidar-Person, Y. Shaked, T. Geiger, Proteomics of microparticles with SILAC quantification (PROMIS-Quan): a novel proteomic method for plasma biomarker quantification, Molecular & Cellular Proteomics : MCP. 14 (2015) 1127–1136, http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M114.043364.
[205] N.S. Barteneva, E. Fasler-Kan, M. Bernimoulin, J.N.H. Stern, E.D. Ponomarev, L. Duckett, et al., Circulating microparticles: square the circle, BMC Cell Biol. 14 (2013) 23, http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-14-23.
[206] M. Yáñez-Mó, P.R.-M. Siljander, Z. Andreu, A.B. Zavec, F.E. Borràs, E.I. Buzas, et al., Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, Journal of Extracellular Vesicles 4 (2015) 27066, http://dx.doi.org/10.3402/jev.v4.27066.
[207] J. De Toro, L. Herschlik, C. Waldner, C. Mongini, Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications, Front. Immunol. 6 (2015) 203, http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00203.
[208] D. Duijvesz, K.E. Burnum-Johnson, M.A. Gritsenko, A.M. Hoogland, M.S. Vredenbregt-van Den Berg, R. Willemsen, et al., Proteomic profiling of exosomes leads to the identification of novel biomarkers for prostate cancer, PLoS One 8 (2013) http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082589.
[209] I.M. Rood, J.K.J. Deegens, M.L. Merchant, W.P.M. Tamboer, D.W. Wilkey, J.F.M. Wetzels, et al., Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome, Kidney Int. 78 (2010) 810–816, http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.262.
[210] P.G. Moon, J.E. Lee, S. You, T.K. Kim, J.H. Cho, I.S. Kim, et al., Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy, Proteomics 11 (2011) 2459–2475, http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201000443.
[211] D.M. Smalley, N.E. Sheman, K. Nelson, D. Theodorescu, Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer, J. Proteome Res. 7 (2008) 2088–2096, http://dx.doi.org/10.1021/pr700775x.
[212] C.L. Chen, Y.F. Lai, P. Tang, K.Y. Chien, J.S. Yu, C.H. Tsai, et al., Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients, J. Proteome Res. 11 (2012) 5611–5629, http://dx.doi.org/10.1021/pr3008732.
[213] E. Ramacciotti, A.E. Hawley, S.K. Wrobleski, D.D. Myers, J.R. Strahler, P.C. Andrews, et al., Proteomics profiling of plasma microparticles following deep-vein thrombosis, Expert Rev. Proteomics 125 (2010) 327–330, http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2010.01.019.
[214] E. Ramacciotti, A.E. Hawley, S.K. Wrobleski, D.D. Myers, J.R. Strahler, P.C. Andrews, et al., Proteomics of microparticles after deep venous thrombosis, Thromb. Res. 125 (2010) http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2010.01.019.
[215] M.W. Graner, O. Alzate, A.M. Dechkovskaia, J.D. Keene, J.H. Sampson, D.A. Mitchell, et al., Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes, FASEB J. 23 (2008) 1541–1557, http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-122184.

dp 1779 20
Research Article

Rapid Communications in Mass Spectrometry

Received: 27 January 2015 Revised: 16 June 2015 Accepted: 21 June 2015 Published online in Wiley Online Library

Rapid Commun. Mass Spectrom. **2015**, *29*, 1623–1631
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.7259

Relative quantification of human β-defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring

Gergő Kalló[1], Arunima Chatterjee[2], Márta Tóth[2], Éva Rajnavölgyi[2], Adrienne Csutak[3], József Tőzsér[1] and Éva Csősz[1]*

[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Proteomics Core Facility, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter. 1, 4010 Debrecen, Hungary
[2]Department of Immunology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter. 1, 4010 Debrecen, Hungary
[3]Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter. 1, 4010 Debrecen, Hungary

RATIONALE: A targeted proteomics method based on selected reaction monitoring (SRM) is a relevant approach for the analysis of multiple analytes in biological samples. Defensins are phylogenetically conserved small antimicrobial peptides contributing to innate host defense and exhibiting low immunogenicity, resistance to proteolysis and a broad range of antimicrobial activities. The goal of the present study was to develop and optimize SRM-based targeted proteomics methods for the detection of human β-defensins 1–4 in various biological fluids.
METHODS: An SRM-based targeted proteomics method was developed and validated for the detection of human β-defensins 1–4. The supernatants of resting and IL-1β-stimulated Caco2, HT-29 and SW-1116 colonic epithelial cells (CEC), cell lysates of CECs and tear samples of human healthy individuals were analyzed and the feasibility of the developed method was validated by ELISA and dot-blot analysis complemented by RT-qPCR.
RESULTS: Our results demonstrate that the developed SRM method offers an alternative approach for the cost-effective and rapid analysis of human β-defensins in samples with biological relevance.
CONCLUSIONS: A semi-quantitative targeted mass spectrometry method was developed and validated for the relative quantification of β-defensins 1–4 in cell culture supernatants and body fluid analyses. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

AUC, area under the curve; AMP, antimicrobial peptide; CD, Crohn's disease; CEC, colonic epithelial cells; hBD, human β-defensin; IBD, irritable bowel disease; MRM, Multiple Reaction Monitoring; PTP, proteotypic peptide; SELDI, Surface Enhanced Laser Desorption Ionization; SIL, stable isotope labelled peptide; SRM, Selected Reaction Monitoring; UC, ulcerative colitis

Defensins represent a phylogenetically ancient and structurally conserved group of antimicrobial peptides (AMP) consisting of 16–50 amino acids. They exhibit multiple functional activities and act in a coordinated manner to provide a first line of defense against various pathogens.[1] The α and β families of human defensins differ in their precursor structures, peptide length and the site of secretion. In humans, four β-defensin types are expressed referred to as β-defensin 1–4 (hBD1–4).[1–4] Based on the UniProt database, β-defensins 5 and 6 also exist but no protein data have been published so far. The β sheets of these molecules create a compact tertiary structure referred to as the β-defensin fold.[5]

* *Correspondence to:* É. Csősz, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Proteomics Core Facility, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter. 1, 4010 Debrecen, Hungary.
E-mail: cseva@med.unideb.hu

Due to this unique organization human defensins are resistant to proteolysis and can exert their effects even under harsh environmental conditions.[6] In epithelial cells β-defensins have been considered as potential AMPs providing a protective barrier against Gram-negative bacteria and Candida species.[7] Another important function of β-defensins is their chemotactic activity resulting in the recruitment of various immune cells towards the site of infection or inflammation.[8] Elevated levels of human β-defensin-2 (hBD2) was observed in patients with irritable bowel disease (IBD) and in ulcerative colitis (UC) indicating an activated immune system in these diseases. Increased levels of hBD2 was also detected in stool samples of the inflamed digestive tract,[9] whereas increased hBD3 levels were described in the colonic mucosa of patients with UC.[10] hBD4 functions as a synergistic partner of lysozyme-C and together with hBD3 exerts additive effects[11] suggesting its protective role against different types of pathogens. Human β-defensin molecules are present in various body fluids such as saliva,[12] sweat[13] and tears,[14] while hBD1 was also detected in the urogenital tract.[15]

The large mucosal surface of the intestinal epithelium acts as an important physical and chemical barrier and confers a first line of defense against pathogenic bacteria, viruses and other microorganisms.[16,17] In the small intestine hBD1 was described as a constitutively expressed AMP, the expression

Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

of which is not regulated by proinflammatory cytokines.[46] However, the level of hBD4 is upregulated as a result of bacterial infection but not by classical proinflammatory signals such as IL-1β.[11] On the contrary, hBD2 and hBD3 were described as inducible AMPs, which respond to stimulation by elevated proinflammatory cytokine secretion.[16–18] Inflammatory bowel diseases such as UC and CD are associated with increased levels of inducible β-defensins[19] leading to epithelial cell proliferation, immune cell migration and enhanced production of proinflammatory cytokines.[20] In addition to their antimicrobial and immune modulatory effects, some defensins have been identified as cancer-associated molecules with anti-tumor effects.[21]

Basal tear fluid contains proteins, lipids, metabolites, salts and organic molecules.[22] Studies aimed at characterizing the tear proteome have been performed and more than 1500 tear proteins have been identified.[23,24] Literature data suggest that changes in tear proteome composition can be of diagnostic value in some diseases such as diabetic retinopathy,[25,26] keratoconus,[27] blepharitis,[28] dry-eye[29] and Sjögren's syndrome.[30] Changes in tear hBD levels have also been reported after ocular surgery[31] and in patients with pterygium.[32]

Targeted proteomics preferentially relies on the SRM/MRM scan mode of triple quadrupole-containing mass spectrometers. In the course of sample analysis the first quadrupole transmits ions with a specified *m/z*, which is fragmented in the second quadrupole functioning as a collision cell, while the third quadrupole transmits a single specified fragment resulting in a signal when the precursor ion and its selected fragment are present at the same time.[33,34] SRM-based methods ensure high specificity on one hand and quantitative data on the other hand, since the AUC of the specific signal corresponds to the amount of the compound entering the mass spectrometer. When functioning in a semi-quantitative setup, the targeted approach allows the relative quantification of specified analytes,[35] but absolute quantification may also be possible.[36] The usual requirement for absolute quantification includes at least three protein-specific sequences (proteotyptic peptides, PTPs) with five transitions for each PTP,[37] while in case of relative quantification one peptide with two transitions could be satisfactory.

Identification of β-defensins can be performed by gene expression profiling,[38] ELISA, Western blot[39–41] or SELDI.[42,43] To our best knowledge the targeted proteomics approach has not been used so far for the detection of human β-defensins. Although the classical antibody-based methods are widely used for the quantitative or semi-quantitative analyses of proteins and peptides, the dynamic range in the quantitative settings can be a potential limiting factor and the determination of more than one analyte as well as lack of suitable antigens may restrict the utilization of this method. The SRM-based methods also offer multiplexing, but are more cost-effective than the classical antibody-based techniques. Another advantage of the targeted methods is their high flexibility, the possibility to design and validate SRM transitions together with the simultaneous analysis of multiple proteins.[44,45] However, the limitation of the SRM-based approach could be the restricted availability of PTPs and the possible co-elution of interfering compounds.[37,46]

In order to establish a cost-effective and flexible multiplex method for the analysis of the most common β-defensins, we have developed an SRM-based method that could be applied for the determination of hBD1–4 levels in different biological samples.

EXPERIMENTAL

Cell culture

In this study, we have used the human HT-29, SW-1116 and Caco2 colonic epithelial cell lines (CECs) derived from various types of human colorectal adenocarcinomas. The tested cell lines are adherent and resemble the features of the human colon. The HT-29 and SW-1116 cells were grown in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine at 5% CO_2 and 37 °C. Caco2 cells were grown in 20% FCS containing RPMI medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine and 1% non-essential amino acids at 5% CO_2 and 37 °C. Resting CECs (5×10^5/mL) were stimulated with 10 ng/mL IL-1β for 1 h followed by the removal of the supernatant that was replaced by fresh medium and the cells were incubated for 5 h before harvesting. The cell culture supernatants were collected without disturbing the cellular monolayer and trypsin-EDTA was added to collect the cells. The detached cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) in order to avoid contamination by the cell culture supernatant, and lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1 mM EDTA, 17 mM β-mercaptoethanol, 0.5% Triton X) was added to collect the cell lysates.

ELISA

Determination of hBD2 protein levels in 100 µL cell lysate or in cell culture supernatants was performed by sandwich ELISA in three biological replicates using the EK-072-37 kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc.) according to the suggested protocol. Determination of hBD2 levels in tear samples was performed in a volume corresponding to 5 µg total tear protein.

Development of the SRM-based targeted proteomics method

Amino acid sequences of hBD1–4 were retrieved from the UniProt database[47] (Accession numbers: P60022, O15263, P81534, Q8WTQ1) and were subjected to analysis by the PeptideCutter software.[48] Tryptic fragments with ≥95% cleavage probability were selected for BLASTp analysis[49] and the NCBI non-redundant protein sequence database was searched to determine the protein-specific, unique tryptic peptide sequences. Design of the SRM transitions was performed by the Skyline software.[50] Stable-isotope-labeled synthetic (SIL) crude peptides were obtained from JPT Peptide Technologies GmbH, Germany, while purified hBD2 SIL was obtained from PepscanPresto, The Netherlands. The quality of the synthetic peptides was assessed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) conducted in our laboratory (data not shown) and the SRM spectra of singly charged y ions were recorded.

 Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Sample preparation for mass spectrometry

Protein concentration of the tested samples was determined with the Bradford method.[51] The proteins were denatured with 6 M urea and were reduced with 10 mM dithiothreitol. The reduced samples were alkylated with 20 mM iodoacetamide and diluted with 25 mM ammonium bicarbonate to decrease the urea concentration to 1 M. Trypsin digestion was performed at 37 °C overnight by adding MS-grade modified trypsin (ABSciex) in 1:25 enzyme-to-protein ratio. The digested peptides were lyophilized and dissolved in 1% formic acid. The samples were desalted with C18 ZipTip (Millipore), lyophilized and re-dissolved in 1% formic acid. Cell lysates and supernatants from each cell line were processed together on the same day, while in the case of the tears, samples belonging to each set were digested and analyzed in parallel on the same day.

Mass spectrometry analysis

SRM-based analysis of biological fluids was carried out on a 4000 QTRAP (ABSciex) mass spectrometer using a NanoSpray II MicroIon source and was controlled by the Analyst 1.4.2 software (ABSciex). The spray voltage was 2800 V, the ion source gas was 50 psi, the curtain gas was 10 psi and the source temperature was 110 °C. The cycle time was 1.15 s, which provides near 30 data points/peak. Chromatographic separation was performed with an EasynLC II system (Bruker). Desalting was performed on a Zorbax 300SB-C18 column (5 × 0.3 mm, 5 µm pore size; Agilent) followed by separation on a Zorbax 300SB-C18 analytical column (150 mm × 75 µm 3.5 µm pore size; Agilent). Solvent A was 0.1% formic acid in LC water, solvent B was acetonitrile containing 0.1% formic acid. The flow rate was 300 nL/min, and a 30 min water/acetonitrile gradient combined with a continuous increase of solvent B from 0% to 100% was applied. Sample blocking was carried out by a randomly selected control and a randomly selected IL1β-treated sample that were paired and digested together and analyzed one after the other using the same conditions. In case of the cell culture supernatants a randomly selected control-IL1β-treated sample pair followed by two other randomly selected control-IL1β-treated pairs were analyzed (three replicates). The same procedure was applied for cell lysates and tear samples.

The CaCo2 cells and tears were analyzed in two experimental settings. In the first set of experiments purified non-labeled synthetic peptides were utilized for hBD1, 3 and 4 and a purified SIL peptide was utilized for hBD2. In the second set of the experiments crude SIL peptides for hBD1–4 were spiked into the CaCo2 cell lysate and the supernatant samples.

Data analysis

The SRM data were analyzed by using the Skyline software.[50] The endogenous/SIL peptide ratios were calculated by the software. The Skyline data are publicly available through the Panorama web site.[52]

Table 1. SRM transition parameters of representative proteotypic peptides for hBD1, hBD2, hBD3 and hBD4

Protein	Proteotypic peptide	Q1 (*m*/*z*)	Q3 (*m*/*z*)	Ion	Dwell time (ms)	DP	CE
hBD1	IQGT*C*YR	420.705	727.319	y6	20	61.8	19.7
		420.705	599.261	y5	20	61.8	19.7
		420.705	542.239	y4	20	61.8	19.7
		420.705	441.191	y3	20	61.8	19.7
		420.705	338.182	y2	20	61.8	19.7
hBD2	GIGDPVT*C*LK	522.773	945.507	y9	20	69.2	25.5
		522.773	832.423	y8	20	69.2	25.5
		522.773	775.401	y7	20	69.2	25.5
		522.773	660.374	y6	20	69.2	25.5
		522.773	563.322	y5	20	69.2	25.5
		522.773	464.253	y4	20	69.2	25.5
		522.773	363.206	y3	20	69.2	25.5
		522.773	260.196	y2	20	69.2	25.5
hBD3	GIINTLQK	464.776	829.514	y7	20	65.0	22.2
		464.776	716.430	y6	20	65.0	22.2
		464.776	603.346	y5	20	65.0	22.2
		464.776	489.303	y4	20	65.0	22.2
		464.776	388.255	y3	20	65.0	22.2
		464.776	275.171	y2	20	65.0	22.2
hBD4	I*C*GYGTAR	449.216	784.341	y7	20	63.9	21.3
		449.216	624.310	y6	20	63.9	21.3
		449.216	567.288	y5	20	63.9	21.3
		449.216	404.225	y4	20	63.9	21.3
		449.216	347.203	y3	20	63.9	21.3
		449.216	246.156	y2	20	63.9	21.3

Amino acids in *italics* represent carbamidomethylated cysteines.
DP: de-clustering potential, CE: collision energy

 Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 2. Linear dynamic range of the hBD SIL peptides in cell culture supernatant and tear matrix. The values represent the dilution factors

Protein	Peptide	Linear dynamic range in cell culture supernatant	Linear dynamic range in tears
hBD1	IQGTCYR	250x–5x	500x–25x
hBD2	GIGDPVTCLK	250x–10x	500x–10x
hBD3	GIINTLQK	250x–5x	250x–25x
hBD4	ICGYGTAR	250x–5x	500x–25x

For the calculation of the linear dynamic range the log AUC values were plotted against the log concentration values and logistic regression was applied for curve calculation. The linear dynamic range was defined based on these curves.

Statistical analysis was performed with the SigmaPlot 12.0 software (Systat Software Inc.) using Student's t-test. Correlation coefficients were determined by the linear regression method;[53] the level of significance was set to $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to better understand the role of β-defensins in innate defense mechanisms we sought to develop an SRM-based targeted proteomics approach for the determination of the relative levels of hBD1–4. The amino acid sequence of these proteins was retrieved from the UniProt database, subjected to the PeptideCutter software, and the tryptic fragments with ≥95% cleavage probability were selected for BLASTp analysis. The results demonstrated the presence of one peptide specific for each hBD including hBD1, -2 and -3, respectively. Thus hBD1 could be identified by the IQGTCYR sequence, hBD2 by GIGDPVTCLK and hBD3 by the GIINTLQK peptide underscoring the conserved structure of these small molecules (Table 1).

As an exception, four specific peptide sequences could be identified for hBD4 (LVLLLAISLLLYQDLPVR, ICGYGTAR, CPNTYACCLR, WDESLLNR). In order to select from the four available peptides a prediction using the CONSeQuence software[54] was applied. Based on our previous experiments and literature data,[55] from the peptides ICGYGTAR and WDESLLNR offered by the software the ICGYGTAR sequence was selected for the SRM design.

Optimization of SRM parameters and determination of the linear dynamic range for hBD peptides

SRM transitions for the selected β-defensin peptides were designed by using Skyline[50] and were tested with SIL peptides. Signals for all transitions of y ions were recorded and examined manually. All transitions showing co-elution in case of each individual peptide were selected and used for further analyses (Table 1). To determine the linear dynamic range increasing amounts of stable-isotope-labeled (SIL) synthetic hBD peptides in the dilution range of 1000- to 5-fold were spiked either into the cell culture supernatant or to the tear fluid. Using the developed SRM method 1000-fold dilution (approximately 75 fmol) of the tested hBD peptides could be detected, but the linear dynamic range of the peptides was different in the studied matrices (Table 2). In the case of the SIL hBD1 peptide, the linear range in the cell culture supernatant matrix was at 250- to 5-fold dilution (approximately 300 fmol to 15 pmol), while in tears it was in the range of 500- to 25-fold dilution (approximately 150 fmol to 3 pmol). The linear range of the SIL hBD2 peptide in the cell culture supernatant and tears was between 250- to 10-fold dilution (approximately 300 fmol to 7.5 pmol) and 500- to 10-fold dilution (approximately 150 fmol to 7.5 pmol), respectively. The SRM analyses of the SIL hBD3 peptide showed that the linear range in the cell culture supernatant matrix was at the 250- to 5-fold dilution range (approximately 300 fmol to 15 pmol) and in tears between 250- to 25-fold dilution (approximately 300 fmol to 3 pmol). The linear range of the selected SIL hBD4 peptide was observed between 250- to 5-fold dilution (approximately 300 fmol to 15 pmol) both in the cell culture supernatants and the tear matrix. Based on these results, the designed SRM method exhibited a broad dynamic range and it allowed the analysis within a wide range of changes often observed in biological systems.

Determination of hBD1, hBD3 and hBD4 levels in human colonic epithelial cells

Considering that β-defensins are produced in the cytosol but exert their biological activities outside the cell, where their secreted forms can exhibit various biological activities, we measured the levels of hBD1, hBD3 and hBD4 both in cell lysates and cell culture supernatants of three different CEC lines. SIL peptides were spiked either into the epithelial cell lysates or the supernatants right before the analysis (Supplementary Fig. S1, see Supporting Information). Upon IL-1β stimulation the level of hBD1 did not change significantly in SW-1116 and HT-29 cells; however, significant decrease was detected only in the Caco2 cell lysates (Fig. 1(a)). Considering the secreted hBD1 levels the decrease was significant in stimulated HT-29 cells but not in SW-1116 CECs (Fig. 1(d)).[56,57]

Changes in the endogenous:SIL peptide ratio showed significantly higher hBD3 levels in all stimulated cells as compared to the cell lysates of their unstimulated counterparts (Fig. 1(c)), and these changes could also be detected at the level of secreted hBD3 (Fig. 1(e)). As a result of stimulation the level of intracellular hBD4 did not change significantly and a similar tendency has been observed as shown for hBD1 (Fig. 1(c)). The secreted form of hBD4 changed significantly only in the HT-29 cell culture supernatants, while in SW-1116 and Caco2 cells hBD4 levels followed the pattern of hBD1 (Fig. 1(f)). García *et al*. have shown that hBD4 collaborates with hBD3,[11] but this functional interplay likely does not require elevated hBD4 expression. It seems that hBD1 and hBD4 exhibited similar

 Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

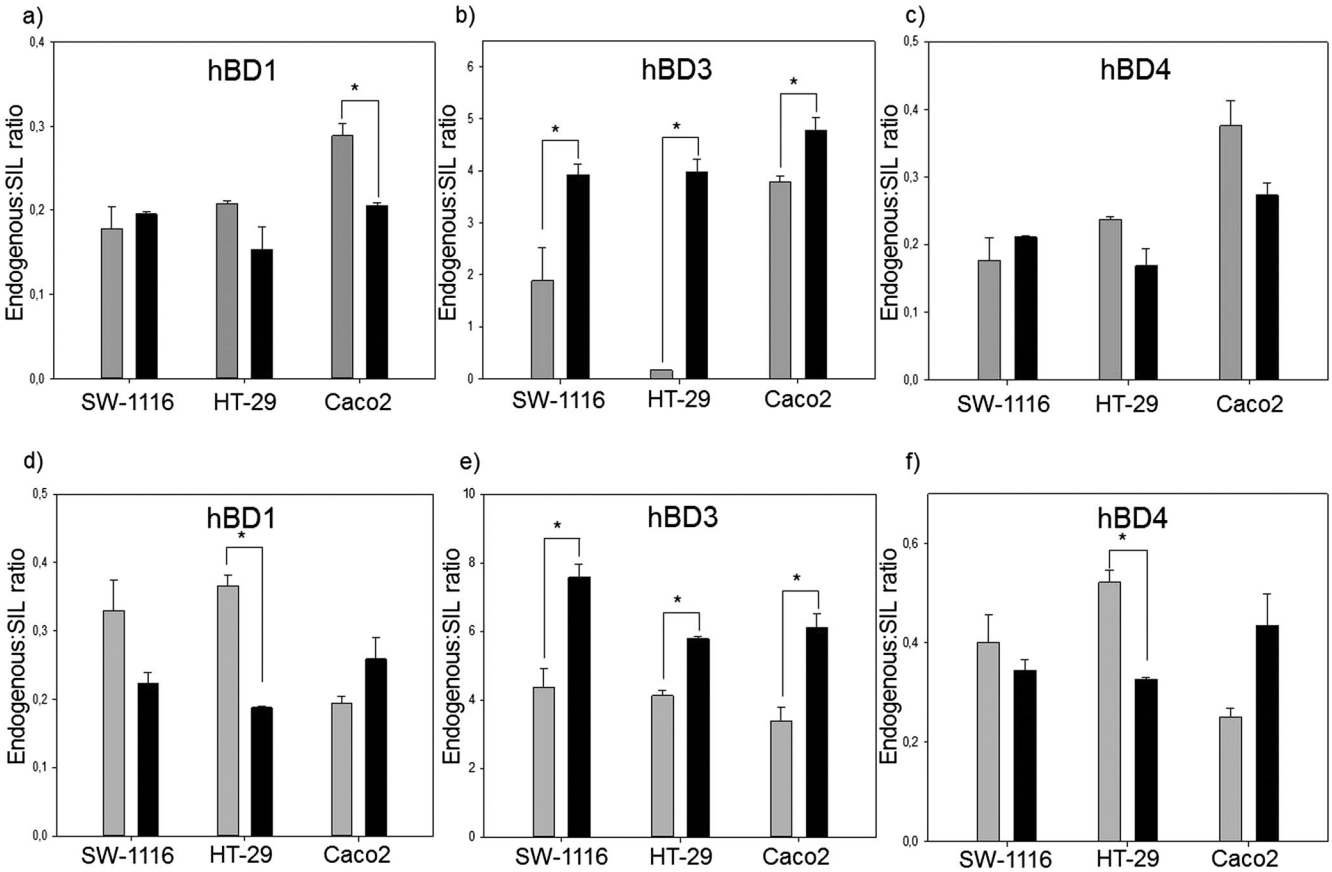


Figure 1. Determination of hBD1, hBD3 and hBD4 levels in colonic epithelial cells. (a) Determination of β-defensin 1 IQGTCYR levels in cell lysates. (b) Determination of β-defensin 3 GIINTLQK levels in cell lysates. (c) Determination of β-defensin 4 ICGYGTAR levels in cell lysates. (d) Determination of secreted β-defensin 1 IQGTCYR levels in cell culture supernatants. (e) Determination of secreted β-defensin 3 GIINTLQK levels in cell culture supernatants. (f) Determination of secreted β-defensin 4 ICGYGTAR levels in cell culture supernatants. The bars represent the mean values of three independent experiments with the standard error of the means, the grey bars show the values for the control group and the black bars correspond to the IL-1β-treated group; * indicates $p < 0.05$.

kinetics when challenged by inflammatory stimuli such as IL-1β. As a conclusion, our data demonstrate the feasibility of the SRM-based method in the comparative analysis of hBD levels and provide further evidence for the inducible feature of hBD3 in an inflammatory environment.[17,56]

Validation of SRM data measured for hBD2 with ELISA and RT-qPCR

To further validate the results obtained for hBD2 by the SRM approach, the mRNA and protein levels of IL-1β-stimulated and control CaCo2 cells was determined by the SRM, RT-qPCR and ELISA methods (Fig. 2 and Supplementary Fig. S2, see Supporting Information). The CaCo2 cells responded to the IL-1β stimulation with increased hBD2 levels both in the cytosol and in the cell culture supernatant as indicated by the SRM-based method (Figs. 2(a) and 2(b)). The RT-qPCR data indicated higher hBD2 mRNA levels in IL-1β-stimulated cells than in controls (Fig. 2(c)). In line with previous results the concentration of intracellular and secreted hBD2, determined by ELISA, also showed significantly higher hBD2 levels when the cells were stimulated by IL-1β (Figs. 2(d) and 2(e)). Similar results were obtained with dot-blot analysis showing robust upregulation of secreted hBD2 in the supernatants of IL-1β-activated CaCo2 cells (Supplementary Fig. S2, see Supporting Information) demonstrating the activation-induced secretion of hBD2 under inflammatory conditions.[58–61] It is important to note that despite the similar tendency of the changes determined with ELISA and SRM, the ELISA method resulted in higher changes as compared to those determined by using SRM. This may be due to the amplification steps making that technique more sensitive than the SRM approach. Comparison of the magnitude of changes obtained with SRM, RT-qPCR and ELISA revealed the ELISA method as the most sensitive method, while the RT-qPCR- and SRM-based assays provided changes with similar magnitudes. In a next step we also compared the efficacy of the ELISA and the newly developed SRM method for the analysis of hBD2 levels derived from the same samples (Fig. 2(f)). The correlation coefficient of the data obtained by the SRM and ELISA techniques (0.937) indicated that these methods provide comparable results. Based on these results the developed SRM approach can be evaluated as an alternative quantification method that is cheaper than the antibody-based techniques. It could be especially useful in those cases when the determination of more than one hBD is needed and the sample volume does not permit the administration of consecutive ELISA measurements.

 Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

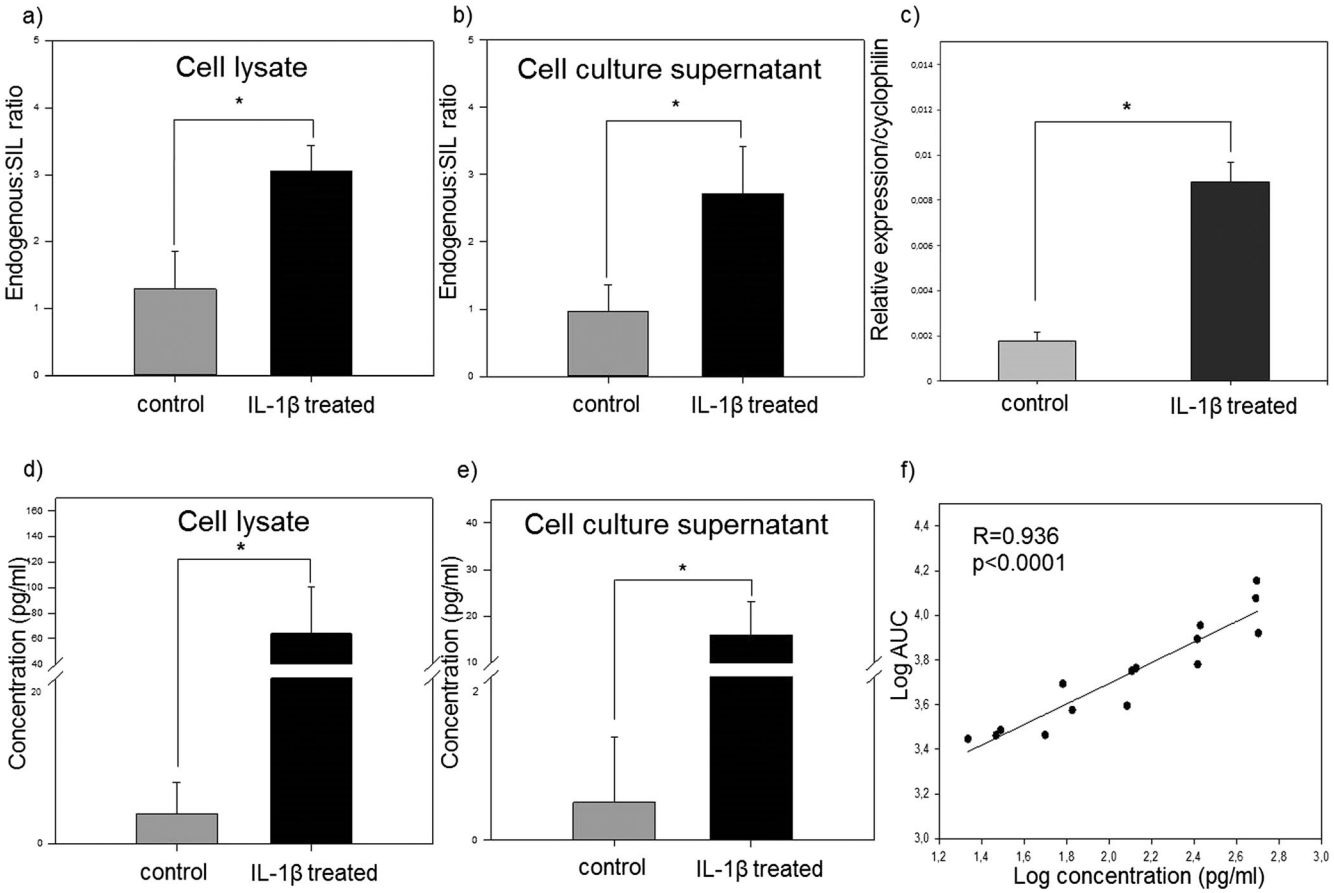


Figure 2. Analysis of hBD2 levels in Caco2 cell culture. (a) Determination of β-defensin 2 GIGDPVTCLK levels in Caco2 cell lysates. (b) Determination of secreted β-defensin 2 GIGDPVTCLK levels in Caco2 cell culture supernatants. (c) qPCR data for β-defensin 2 mRNA levels normalized to cyclophylin. (d) Determination of β-defensin 2 protein concentrations (pg/mL) in cell lysate using ELISA. (e) Determination of secreted β-defensin 2 protein concentrations (pg/mL) in cell culture supernatant with ELISA. The bars represent the mean values of three independent experiments with the standard error of the means; the grey bars show the values for the control group and the black bars correspond to the IL-1β-treated group; * indicates $p < 0.05$. (f) Correlation analysis of the ELISA and SRM methods. The x axis contains the log concentration (pg/mL) of hBD2-containing samples determined using ELISA and the y axis contains the log area under the curve (AUC) values determined for the same samples using the SRM method. The correlation coefficient (R) and p value are indicated.

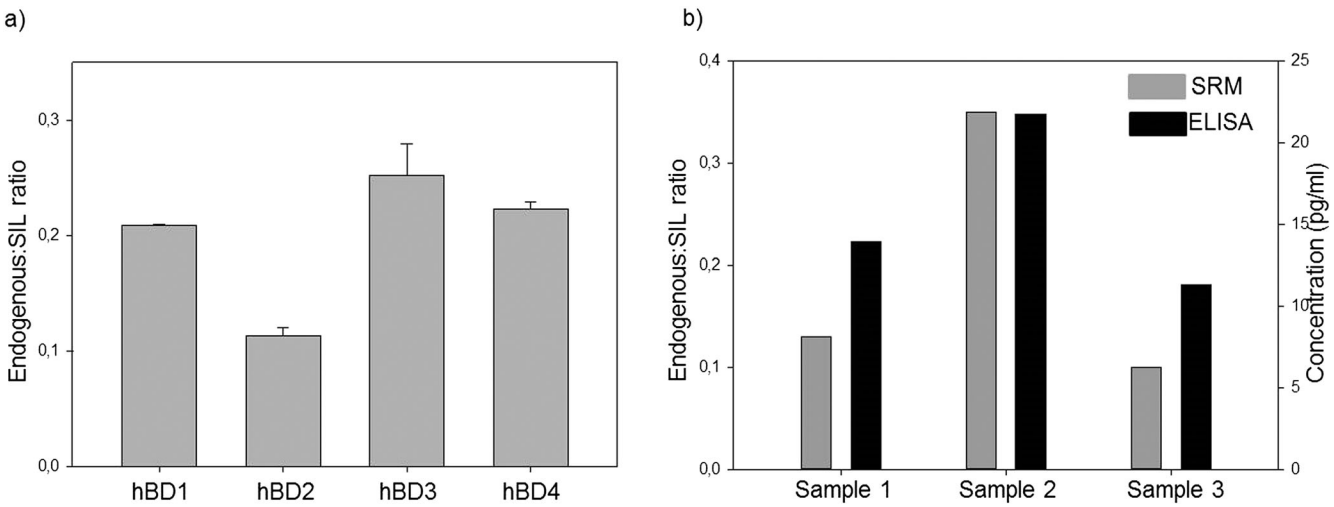


Figure 3. Analysis of β-defensin levels in tears. (a) Examination of β-defensin 1–4 levels in tears. The bars represent the mean values of three independent experiments with the standard error of means. (b) Comparison of tear β-defensin 2 amounts determined by ELISA (black bars) and SRM (grey bars).

 Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Analysis of β-defensin levels in tears

Most of the body fluids contain a wide array of antimicrobial peptides as a part of the innate immune defense mechanisms. In this context the major function of β-defensins is to rapidly kill and/or inactivate microorganisms.[62] AMPs also differ in the spatial area of secretion and this type of distribution depends on the actual environmental challenges, which could have an impact on the efficacy of combating against a large variety of microorganisms. In order to assess whether the newly developed SRM method could also be utilized for the analysis of biological fluids, such as human tears, we collected tear samples from healthy volunteers and analyzed them. The quantification of hBD1, hBD2, hBD3 and hBD4 peptides was performed by the SRM method (Fig. 3(a)) and the SRM analyses of hBD2 were confirmed by ELISA (Fig. 3(b) and Supplementary Fig. S3, see Supporting Information). The level of hBD2 was the lowest and the level of hBD3 was the highest, while the levels of hBD1 and hBD4 were almost the same, highlighting the non-inducible feature of hBD1 and hBD4.[11,46] The β-defensin levels in tear samples were found to be lower than those detected in the supernatants of CECs indicating differences in the tissue-specific expression of β-defensins.[63] The data indicate that the developed SRM method is suitable for the relative quantification of β-defensins also in body fluids typically of low sample volume such as tears, although the antibody-based method seems to be more sensitive than the developed MS-based method.

Analysis of accuracy

For the determination of accuracy of the developed SRM method the coefficients of variance (CVs) were calculated. Based on literature data no consensus CV value is available for validating the accuracy of datasets. The most widely used recommendations involve CV <20%[64,65] or CV <25%.[66,67] This type of analysis showed that the CV between the biological replicates of all SRM experiments was below 20%. Considering that CVs for SRM analyses were acceptable, we concluded that the developed and validated SRM method provides an accurate approach for the relative quantification of hBDs in different biological samples.

CONCLUSIONS

In this study we present a semi-quantitative targeted proteomics method appropriate for the relative quantification of hBD1–4 levels in biological samples as an alternative approach to the classical antibody-based detection and quantification systems. The ultimate advantage of the newly developed SRM method compared to ELISA or Western blot relies on its multiplex feature that allows a cost-effective simultaneous analysis of multiple analytes derived from the same sample, having relevance for cell biology and medical applications, where the amount of the sample to be studied is limited. The inducible feature of hBD2 and hBD3 confirmed at the mRNA and protein levels in the case of hBD2 together with the utility of the developed SRM-based targeted proteomics method for semi-quantitative analysis of hBD1–4 in cell lysates, culture supernatants and tear samples is highlighted.

Acknowledgements

This research was supported by TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 and the Marie-Curie Cross-Talk program FP7-215553 (2007–2013). The help of Dr. Miklós Emri is greatly acknowledged.

REFERENCES

[1] J. Wiesner, A. Vilcinskas. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* **2010**, *1*, 440.
[2] H. Chen, Z. Xu, L. Peng, X. Fang, X. Yin, N. Xu, P. Cen. Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides* **2006**, *27*, 931.
[3] T. Ganz. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 710.
[4] J. Jarczak, E. M. Kościuczuk, P. Lisowski, N. Strzałkowska, A. Jóźwik, J. Horbańczuk, J. Krzyżewski, L. Zwierzchowski, E. Bagnicka. Defensins: Natural component of human innate immunity. *Hum. Immunol.* **2013**, *74*, 1069.
[5] A. M. Torres, P. W. Kuchel. The beta-defensin-fold family of polypeptides. *Toxicon* **2004**, *44*, 581.
[6] *Proteases: Structure and Function*, (Eds: K. Brix, W. Stöcker). Springer, **2013**.
[7] J. Winter, M. Wenghoefer. Human defensins: Potential tools for clinical applications. *Polymers* **2012**, *4*, 691.
[8] D. Yang, O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schröder, J. M. Wang, O. M. Howard, J. J. Oppenheim. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **1999**, *286*, 525.
[9] J. Langhorst, A. Junge, A. Rueffer, J. Wehkamp, D. Foell, A. Michalsen, F. Musial, G. J. Dobos. Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* **2009**, *104*, 404.
[10] A. Rahman, A. Fahlgren, B. Sitohy, V. Baranov, A. Zirakzadeh, S. Hammarström, A. Danielsson, M. L. Hammarström. Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2007**, *13*, 847.
[11] J. R. García, A. Krause, S. Schulz, F. J. Rodríguez-Jiménez, E. Klüver, K. Adermann, U. Forssmann, A. Frimpong-Boateng, R. Bals, W. G. Forssmann. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1819.
[12] Y. Abiko, M. Nishimura, T. Kaku. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med. Electron Microsc.* **2003**, *36*, 247.
[13] M. H. Metz-Boutigue, P. Shooshtarizadeh, G. Prevost, Y. Haikel, J. F. Chich. Antimicrobial peptides present in mammalian skin and gut are multifunctional defence molecules. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 1024.
[14] F. Garreis, T. Schlorf, D. Worlitzsch, P. Steven, L. Bräuer, K. Jäger, F. P. Paulsen. Roles of human beta-defensins in innate immune defense at the ocular surface: arming and alarming corneal and conjunctival epithelial cells. *Histochem. Cell. Biol.* **2010**, *134*, 59.
[15] E. V. Valore, C. H. Park, A. J. Quayle, K. R. Wiles, P. B. McCray Jr, T. Ganz. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 1633.
[16] D. A. O'Neil, E. M. Porter, D. Elewaut, G. M. Anderson, L. Eckmann, T. Ganz, M. F. Kagnoff. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 6718.

 Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

[17] P. Vora, A. Youdim, L. S. Thomas, M. Fukata, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, A. Wada, T. Hirayama, M. Arditi, M. T. Abreu. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 5398.
[18] J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J. M. Schroder. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5707.
[19] M. Ramasundara, S. T. Leach, D. A. Lemberg, A. S. Day. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24*, 202.
[20] F. Niyonsaba, H. Ushio, N. Nakano, W. Ng, K. Sayama, K. Hashimoto, I. Nagaoka, K. Okumura, H. Ogawa. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 594.
[21] N. Droin, J. B. Hendra, P. Ducoroy, E. Solary. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. *J. Proteomics* **2009**, *72*, 918.
[22] J. J. Harding. *Biochemistry of the Eye*. Chapman & Hall, London, **1997**.
[23] L. Zhou, S. Z. Zhao, S. K. Koh, L. Chen, C. Vaz, V. Tanavde, X. R. Li, R. W. Beuerman. In-depth analysis of the human tear proteome. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 3877.
[24] G. A. de Souza, L. M. Godoy, M. Mann. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol.* **2006**, *7*, R72.
[25] É. Csősz, P. Boross, A. Csutak, A. Berta, F. Tóth, S. Póliska, Z. Török, J. Tőzsér. Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 2196.
[26] H. J. Kim, P. K. Kim, H. S. Yoo, C. W. Kim. Comparison of tear proteins between healthy and early diabetic retinopathy patients. *Clin. Biochem.* **2012**, *45*, 60.
[27] A. Acera, E. Vecino, I. Rodríguez-Agirretxe, K. Aloria, J. M. Arizmendi, C. Morales, J. A. Durán. Changes in tear protein profile in keratoconus disease. *Eye (Lond.)* **2011**, *25*, 1225.
[28] B. S. Koo, D. Y. Lee, H. S. Ha, J. C. Kim, C. W. Kim. Comparative analysis of the tear protein expression in blepharitis patients using two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 719.
[29] L. Zhou, R. W. Beuerman, C. M. Chan, S. Z. Zhao, X. R. Li, H. Yang, L. Tong, S. Liu, M. E. Stern, D. Tan. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4889.
[30] N. Tomosugi, K. Kitagawa, N. Takahashi, S. Sugai, I. Ishikawa. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjögren's syndrome. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 820.
[31] L. Zhou, L. Q. Huang, R. W. Beuerman, M. E. Grigg, S. F. Li, F. T. Chew, L. Ang, M. E. Stern, D. Tan. Proteomic analysis of human tears: defensin expression after ocular surface surgery. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 410.
[32] L. Zhou, R. W. Beuerman, L. P. Ang, C. M. Chan, S. F. Li, F. T. Chew, D. T. Tan. Elevation of human alpha-defensins and S100 calcium-binding proteins A8 and A9 in tear fluid of patients with pterygium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2009**, *50*, 2077.
[33] V. Lange, P. Picotti, B. Domon, R. Aebersold. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 222.
[34] A. James, C. Jorgensen. Basic design of MRM assay for peptide quantification. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *658*, 167.
[35] S. W. Holman, P. F. Sims, C. E. Eyers. The use of selected reaction monitoring in quantitative proteomics. *Bioanalysis* **2012**, *4*, 1763.
[36] A. J. Percy, A. G. Chambers, J. Yang, A. M. Jackson, D. Domanski, J. Burkhart, A. Sickmann, C. H. Borchers. Method and platform standardization in MRM-based quantitative plasmaproteomics. *J. Proteomics* **2013**, *95*, 66.
[37] S. A. Carr, S. E. Abbatiello, B. L. Ackermann, C. Borchers, B. Domon, E. W. Deutsch, R. P. Grant, A. N. Hoofnagle, R. Hüttenhain, J. M. Koomen, D. C. Liebler, T. Liu, B. MacLean, D. R. Mani, E. Mansfield, H. Neubert, A. G. Paulovich, L. Reiter, O. Vitek, R. Aebersold, L. Anderson, R. Bethem, J. Blonder, E. Boja, J. Botelho, M. Boyne, R. A. Bradshaw, A. L. Burlingame, D. Chan, H. Keshishian, E. Kuhn, C. Kinsinger, J. S. Lee, S. W. Lee, R. Moritz, J. Oses-Prieto, N. Rifai, J. Ritchie, H. Rodriguez, P. R. Srinivas, R. R. Townsend, J. Van Eyk, G. Whiteley, A. Wiita, S. Weintraub. Targeted peptide measurements in biology and medicine: best practices for mass spectrometry-based assay development using a fit-for-purpose approach. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 907.
[38] T. D. Starner, B. Agerberth, G. H. Gudmundsson, P. B. McCray Jr.. Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 1608.
[39] A. V. Panyutich, N. N. Voitenok, R. I. Lehrer, T. Ganz. An enzyme immunoassay for human defensins. *J. Immunol. Methods* **1991**, *141*, 149.
[40] S. K. Ghosh, T. A. Gerken, K. M. Schneider, Z. Feng, T. S. McCormick, A. Weinberg. Quantification of human beta-defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 757.
[41] A. Y. Liu, D. Destoumieux, A. V. Wong, C. H. Park, E. V. Valore, L. Liu, T. Ganz. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *118*, 275.
[42] C. M. Hegedus, C. F. Skibola, M. Warner, D. R. Skibola, D. Alexander, S. Lim, N. L. Dangleben, L. Zhang, M. Clark, R. M. Pfeiffer, S. Steinmaus, A. H. Smith, M. T. Smith, L. E. Moore. Decreased urinary beta-defensin-1 expression as a biomarker of response to arsenic. *Toxicol. Sci.* **2008**, *106*, 74.
[43] D. L. Diamond, J. R. Kimball, S. Krisanaprakornkit, T. Ganz, B. A. Dale. Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. *J. Immunol. Methods* **2001**, *256*, 65.
[44] P. Picotti, O. Rinner, R. Stallmach, F. Dautel, T. Farrah, B. Domon, H. Wenschuh, R. Aebersold. High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 43.
[45] R. Hüttenhain, S. Surinova, R. Ossola, Z. Sun, D. Campbell, F. Cerciello, R. Schiess, D. Bausch-Fluck, G. Rosenberger, J. Chen, O. Rinner, U. Kusebauch, M. Hajdúch, R. L. Moritz, B. Wollscheid, R. Aebersold. N-glycoprotein SRMAtlas: a resource of mass spectrometric assays for N-glycosites enabling consistent and multiplexed protein quantification for clinical applications. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 1005.
[46] B. Kuster, M. Schirle, P. Mallick, R. Aebersold. Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 577.
[47] www.uniprot.org.
[48] http://web.expasy.org/peptide_cutter.
[49] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov.
[50] www.brendanx-uw1.gs.washington.edu.
[51] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
[52] https://panoramaweb.org/labkey/project/University%20of%20Debrecen/Defensin/begin.view?

 Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

[53] W. W. Daniel. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*, (5th edn.). John Wiley, New York, **1991**.
[54] C. E. Eyers, C. Lawless, D. C. Wedge, K. W. Lau, S. J. Gaskell, S. J. Hubbard. CONSeQuence: prediction of reference peptides for absolute quantitative proteomics using consensus machine learning approaches. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, M110.003384.
[55] S. Banerjee, S. Mazumdar. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, 282574.
[56] N. Kapel, N. Benahmed, A. Morali, J. Svahn, D. Canioni, O. Goulet, F. M. Ruemmele. Fecal beta-defensin-2 in children with inflammatory bowel diseases. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2009**, *48*, 117.
[57] J. Wehkamp, K. Fellermann, K. R. Herrlinger, S. Baxmann, K. Schmidt, B. Schwind, M. Duchrow, C. Wohlschläger, A. C. Feller, E. F. Stange. Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2002**, *14*, 745.
[58] S. Jäger, E. F. Stange, J. Wehkamp. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch. Surg.* **2013**, *398*, 1.
[59] O. E. Sørensen, D. R. Thapa, A. Rosenthal, L. Liu, A. A. Roberts, T. Ganz. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 4870.
[60] V. Zaga-Clavellina, M. Ruiz, P. Flores-Espinosa, R. Vega- Sanchez, A. Flores-Pliego, G. Estrada-Gutierrez, I. Sosa-Gonzalez, I. Morales-Méndez, M. Osorio-Caballero. Tissue-specific human beta-defensins (HBD)-1, HBD-2 and HBD-3 secretion profile from human amniochorionic membranes stimulated with *Candida albicans* in a two-compartment tissue culture system. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2012**, *10*, 70.
[61] V. Zaga-Clavellina, G. Garcia-Lopez, P. Flores-Espinosa. Evidence of in vitro differential secretion of human beta-defensins-1, -2, and -3 after selective exposure to *Streptococcus agalactiae* in human fetal membranes. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2012**, *25*, 358.
[62] Y. Lai, R. L. Gallo. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 131.
[63] H. Chen, Z. Xu, L. Peng, X. Fang, X. Yin, N. Xu, P. Cen. Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides* **2006**, *27*, 931.
[64] R. M. Schoenherr, J. R. Whiteaker, L. Zhao, R. G. Ivey, M. Trute, J. Kennedy, U. J. Voytovich, P. Yan, C. Lin, A. G. Paulovich. Multiplexed quantification of estrogen receptor and HER2/Neu in tissue and cell lysates by peptide immunoaffinity enrichment mass spectrometry. *Proteomics* **2012**, *12*, 1253.
[65] S. Sano, S. Tagami, Y. Hashimoto, K. Yoshizawa-Kumagaye, M. Tsunemi, M. Okochi, T. Tomonaga. Absolute quantitation of low abundance plasma APL1β peptides at sub-fmol/mL level by SRM/MRM without immunoaffinity enrichment. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 1012.
[66] S. A. Carr, L. Anderson. Protein quantitation through targeted mass spectrometry: the way out of biomarker purgatory? *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 1749.
[67] J. R. Whiteaker, C. Lin, J. Kennedy, L. Hou, M. Trute, I. Sokal, P. Yan, R. M. Schoenherr, L. Zhao, U. J. Voytovich, K. S. Kelly-Spratt, A. Krasnoselsky, P. R. Gafken, J. M. Hogan, L. A. Jones, P. Wang, L. Amon, L. A. Chodosh, P. S. Nelson, M. W. McIntosh, C. J. Kemp, A. G. Paulovich. A targeted proteomics-based pipeline for verification of biomarkers in plasma. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 625.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

 Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers

Gergő Kalló[1], Miklós Emri[2], Zsófia Varga[3], Bernadett Ujhelyi[4], József Tőzsér[1], Adrienne Csutak[4☯], Éva Csősz[1☯*]

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1., 4032 Debrecen, Hungary, **2** Department of Nuclear Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1., 4032 Debrecen, Hungary, **3** Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1., 4032 Debrecen, Hungary, **4** Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1., 4032 Debrecen, Hungary

☯ These authors contributed equally to this work.
* cseva@med.unideb.hu

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Kalló G, Emri M, Varga Z, Ujhelyi B, Tőzsér J, Csutak A, et al. (2016) Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers. PLoS ONE 11(6): e0158000. doi:10.1371/journal.pone.0158000

Editor: Jon M. Jacobs, Pacific Northwest National Laboratory, UNITED STATES

Received: February 17, 2016

Accepted: June 8, 2016

Published: June 21, 2016

Copyright: © 2016 Kalló et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The SRM data are publicly available at the Panorama website: (https://panoramaweb.org/labkey/project/__r1225/begin.view?)

Funding: This work was supported by the New Széchenyi Plan TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 to GK, New Széchenyi Plan TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 to: GK AC ÉC, New Széchenyi Plan TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 to: JT ÉC GK, New Széchenyi Plan TÁMOP-4.2.2.B-15/1/KONV-2015-0001 to GK, National Brain Research Program KTIA_13_NAP-A-II/3 to ME, Astellas

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative diseases, with increasing prevalence affecting millions of people worldwide. Currently, only autopsy is able to confirm the diagnosis with a 100% certainty, therefore, biomarkers from body fluids obtained by non-invasive means provide an attractive alternative for the diagnosis of Alzheimer`s disease. Global changes of the protein profile were examined by quantitative proteomics; firstly, electrophoresis and LC-MS/MS were used, thereafter, SRM-based targeted proteomics method was developed and applied to examine quantitative changes of tear proteins. Alterations in the tear flow rate, total tear protein concentration and composition of the chemical barrier specific to AD were demonstrated, and the combination of lipocalin-1, dermcidin, lysozyme-C and lacritin was shown to be a potential biomarker, with an 81% sensitivity and 77% specificity.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common forms of age-related dementia, affecting more than 25 million people worldwide, with the number of new cases being continuously on the rise, particularly in the developed and developing countries [1]. The etiology of AD is still unknown. The disease can be characterized by massive cognitive decline, occurring in either sporadic or familial forms. Evidence suggests that abnormal production and accumulation of misfolded, toxic proteins like β-amyloid (Aβ) peptides, the microtubule-associated protein tau [2], and the presynaptic protein α-synuclein are involved in the pathogenesis of AD [3]. The pathological hallmarks of AD are the appearance of senile plaques and neurofibrillary tangles in the brain tissue, in addition to the development of cerebral amyloid angiopathy, with depositions of Aβ peptides in the vessel walls [4].

Pharma Ltd. Fellowship to GK, Janos Bolyai and Lajos Szodoray Postdoctoral Fellowships to AC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have the following interests: This study was funded in part by an Astellas Pharma Ltd. Fellowship to GK. At the University of Debrecen there is an Astellas Pharma award for Ph.D. students presenting the best research proposal. The awardee is selected by the Scientific Comettee of the University of Debrecen and the award is given by Astellas Pharma Ltd. in form of 500000 HUF (approx. 1600 EUR) credit to cover the costs of consumables and chemicals used during the research. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Based on reported data, AD affects the entire visual system; AD-related changes have been observed in the eye, the visual pathway, as well as the visual cortex. Aβ depositions in the lens and retina were also detected, along with changes such as the reduction of the numbers of retinal ganglion cells, thinning of the nerve cell layer, optic atrophy and decline in the numbers of axons affecting mainly the large diameter axons in the optic nerve [5,6]. These changes result in the impairment of visual acuity and color vision, defects in fixation, delay in saccadic eye movement and changes in contrast sensitivity [7].

Multiple studies highlighted the role of Aβ and hyperphosphorylated tau [8] in the pathophysiology of the disease, however, new evidences suggest the involvement of inflammatory processes [9] and the increased oxidation of brain proteins [10], besides the amyloid depositions and neurofibrillary tangle formation. The oxidation of brain proteins is probably the consequence of higher reactive oxygen species (ROS) production that can be caused by inflammatory processes, or by mitochondrial dysfunction, which is often associated with the appearance of AD [11].

Several biomarkers for AD were identified, yet an ideal biomarker that is able to improve differential diagnosis, track disease progression and measure treatment efficacy has not been discovered. Despite advances in neuroimaging techniques [12,13], and the opportunities provided by the "omics" and systems biology studies [14], autopsy remains the only mean to provide diagnosis with a 100% certainty. Genetic markers; such as mutations in the gene of amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) and tau, were identified for early onset AD, while apolipoprotein E (APOE) and clusterin gene (CLU) mutations were identified for the late onset form [15,16]. Disease-specific mutations indicating the alteration of fatty acid and amino acid metabolism, innate immune response, apoptosis, cell communication, and cell adhesion pathways in the brain of AD patients were also highlighted [17]. For biomarker analyses, brain tissue, cerebrospinal fluid (CSF), blood plasma and serum were used, and several candidate protein biomarkers were identified using advanced proteomics techniques, such as two dimensional gel electrophoresis, oxyblotting, mass spectrometry, and multiplex assays [14,18].

Selected reaction monitoring (SRM)-based targeted proteomics analysis is a versatile tool for biomarker studies. SRM is a special scan mode of the triple quadrupole-containing mass spectrometers, which allows for highly specific identification; and with the help of stable isotope-labeled (SIL) synthetic peptides, it enables the relative or absolute quantification of the analytes of interest [19,20]. Another advantage of SRM is the multiplex feature, multiple molecules can be analyzed simultaneously from the same sample, which allows for a more cost-effective analysis compared to the classical antibody-based quantification techniques [21].

With increasing AD prevalence, there is a high demand for novel diagnostic methods utilizing body fluids collected by non-invasive means, such biomarkers are of valuable importance. Tear fluid; therefore, provides a viable source, and with its relatively high protein content [22], it is a widely used candidate for biomarker studies [23–25]. Tear samples are easy to collect, thus, they provide excellent sample source for developing bedside diagnostic tests for pathological conditions affecting the ocular system, or the body as a whole [26,27]. The tear fluid creates a chemical barrier at the surface of the eye as part of the innate immune system, which provides protection against pathogens by secreting antibacterial and immunomodulatory proteins (AMPs) that inhibit bacterial growth [28]. The major tear proteins; such as lipocalin-1, lactotransferrin and lysozyme-C are involved in the immune and inflammatory processes and defense against pathogens [22]. The relatively high abundance of these proteins makes them the major AMPs of tears. Besides the major AMPs, tear fluid contains several prototypic AMPs, such as defensins, LL-37 cathelicidin in addition to dermcidin [22].

Tear fluid was used as a potential biomarker source in a study of neuroinflammation in Parkinson's disease; a neurodegenerative condition associated with inflammation, and increased TNF-α levels were found in tears of PD patients [29].

Considering the extensive influence of AD on the visual system, in this pilot study, we wanted to examine the changes of tear production, and tear protein composition in patients with AD and in their age-matched controls. A two-step procedure was applied; firsty, gel-based LC-MS/MS was used for protein identification on a small sample size, thereafter, an SRM-based targeted proteomics method was developed for the identified proteins, in order to examine the AD-dependent alterations on a larger sample size, in order to identify possible tear biomarkers for AD.

Methods

Sample collection

In total, 23 donors were recruited in this study; 14 patients with AD and 9 age-matched controls. Sample collection complied with the guidelines of the Helsinki Declaration and ethical approval was obtained from the University of Debrecen Ethics Committee (2980–2009), while the subjects gave informed written consent. In the case of AD patients, the consent was acquired in the presence of a caregiver, although none of them were placed under guardianship. All of the donors were patients of the University of Debrecen, Faculty of Medicine, and the assessment of AD was done by a psychiatrist. Diagnosis of Alzheimer's disease was based on the NINCDS-ADRDA [30] and the DSM-IV-TR [31] criteria. Besides psychiatric and neurological assessment, patients underwent general medical examination, basic laboratory testing (blood chemistry analysis, complete blood cell count, hepatic and renal function test, vitamin B_{12} and folate level determination, thyroid function test) and CT or MR imaging of the brain to rule out other causes of dementia. Patients with a history of sudden onset, early extrapyramidal signs, early behavioral changes or focal neurological features were excluded. The clinical evaluation of the age-matched control subjects consisted of a structured interview, demographic information, medical history, current medication, history of alcohol consumption and a subjective assessment of memory problems using the Mini-Mental State Examination [32]. Only controls without any signs of cognitive impairment were included in the study. Patients with autoimmune disorders, systemic inflammation or ophthalmological disorders were excluded. In case of AD group, the women to men ratio was approximately 1:2 and the mean age was 77 years, whereas in the control group, the women to men ratio was approximately 1:1 and the mean age was 72 years. After assessment of the anterior ocular status of each patient, tear was collected from the inferior meniscus of one or both eyes. The non-traumatic tear collection was carried out without topical anesthesia using standard capillary collection technique [33], thereafter, collected samples were frozen and stored at -70°C until analysis.

SDS-PAGE

The protein concentration of each tear sample was measured using the Bradford method [34]. 20μg tear protein from three randomly selected AD patients and two controls were subjected to SDS-PAGE analysis on a 10% SDS polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out in a Bio-Rad mini tetra cell (Bio-Rad) on 100 A constant current for one hour. The protein bands were stained using Coomassie PageBlue (Fermentas) solution and scanned with a Pharos FX Plus laser scanner (Bio-Rad). Image analysis was done using the QuantityOne software (Bio-Rad). Band intensities in each case were determined and statistically analyzed by Mann–Whitney U test using SigmaPlot 12.0 software (Systat Software Inc.).

LC-MS/MS analysis

Bands with significantly different intensities between AD and control samples were excised, followed by in-gel digestion with trypsin. Initially, reduction was performed using 20mM dithiothreitol for one hour at 56°C, followed by alkylation with 55mM iodoacetamide for 45 minutes. Overnight trypsin digestion was carried out using stabilized MS grade TPCK-treated bovine trypsin (ABSciex) at 37°C, thereafter; the digested peptides were extracted and lyophilized. The peptides were re-dissolved in 10μl 1% formic acid before LC-MS/MS analysis.

Prior to mass spectrometric analysis, peptides were separated using a 90 minute water/acetonitrile gradient, with an increase in acetonitrile concentration from 0 to 100% in a 60 minute time interval, using an EasynLCII (Bruker) nano HPLC. The peptide mixture was desalted on a Zorbax 300SB-C18 in-line trap column (5 x 0.3 mm, 5 μm pore size, Agilent), followed by separation on a Zorbax 300SB-C18 analytical column (150 mm x 75 μm 3.5 μm pore size, Agilent). Solvent A was 0.1% formic acid in LC water, solvent B was LC acetonitrile containing 0.1% formic acid, while the flow rate was 300nl/min.

Positive mode LC-MS/MS scans were performed on a 4000 QTRAP (ABSciex) mass spectrometer using a NanoSpray II MicroIon source, controlled by the Analyst 1.4.2 software (ABSciex). The spray voltage was 2800V, the ion source gas was 50 psi, the curtain gas was 20 psi and the source temperature was 70°C. Information Dependent Acquisition method was utilized; after the first mass scan (mass range 400–1700 amu), an enhanced resolution experiment was carried out to establish the charge state of the precursor ions. The MS/MS spectra of the two most intensive ions were recorded (mass range 100–1900 amu) in Enhanced Product Ion mode at a scan rate of 4000 amu/s, and rolling collision energy was applied with the maximum of 90eV.

The acquired LC-MS/MS data were used for protein identification with the help of ProteinPilot 4.0 (ABSciex) search engine searching the SwissProt database (release: 2015.07, 548872 sequence entries), and using the biological modification table included in the ProteinPilot 4.0 software. A minimum of two peptide sequences with $\geq$95% confidence were used for protein identification.

Development of SRM-based targeted proteomics experiment

The amino acid sequences of lipocalin-1, lactotransferrin, extracellular glycoprotein lacritin, lysozyme-C, lipophilin A, Ig λ-chain C region, prolactin inducible protein, Zn-α2 glycoprotein, galectin 3 binding protein and dermcidin were retrieved from the UniProt database (P31025, P02788, Q9GZZ8, P61626, P60201, P0CG04, P12273, P25311, Q08380, P81605, respectively), *in silico* trypsin digestions were then carried out. In order to determine the unique tryptic sequences, BLASTp analyses were performed (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov), searching the NCBI non-redundant protein sequence database for unique, protein-specific sequences. The protein specific sequences were subjected to SRM transition design using the Skyline software (www.brendanx-uw1.gs.washington.edu). Stable isotope-labeled (SIL) synthetic crude peptides were obtained from JPT Peptide Technologies GmbH, Germany, and the SRM spectra of all singly charged "y" ions were registered in case of all peptides. The best two transitions for each peptide were selected for further analyses.

SRM-based targeted mass spectrometry analysis

37 tear samples originating from 14 AD patients and 9 age-matched controls were denatured using 6 M urea for 30 mins at room temperature, followed by a digestion procedure similar to that used for LC-MS/MS sample preparation described above. In the denatured, reduced, and alkylated samples, the urea concentration was diluted with 25mM ammonium bicarbonate to

1M immediately before trypsin digestion. Samples were desalted with C18 PierceTips (Thermo Scientific), lyophilized and re-dissolved in 1% formic acid.

SRM-based analyses of digested tear samples were carried out in triplicates on the 4000 QTRAP mass spectrometer using the same voltage, gas, and temperature, as described above in section LC-MS/MS analysis. The declustering potential (DP) and collision energy (CE) values were optimized, and the cycle time was set to 2.5 sec. Chromatographic separation was done on the EasynLC II, using a 30 min acetonitrile/water gradient with an increase in acetonitrile concentration from 0 to 100% during a 15 minute time interval.

Sample blocking was carried out before analyzes; a randomly selected AD sample was paired with a randomly selected control sample and analyzed one after the other using the same conditions. SIL peptides were added to the samples immediately before the analyses. Data were evaluated using the Skyline software, spectra were examined manually and the AUC values were calculated by the software. The SRM data were uploaded to the Panorama website: (https://panoramaweb.org/labkey/project/__r1225/begin.view?) and are publicly available.

The primary AUC data were transformed to MSstats R-package format [35] by an in-house developed software. After the normalization based on the SIL standard peptides, and log2 transformation of data, group differences were examined by a mixed-effect variance analysis [36]. Groups were modeled as fixed effect, while the subject level variances were modeled as random effects. After analysis, the raw p-values were adjusted by the Benjamini and Hochberg type false discovery rate method for multiple testing purposes [37]. Besides the adjusted p-values, the log2 fold change, the standard error and the t-values were also examined. Receiver-operating characteristic (ROC) analyses [38] were carried out by the pROC software [39] and Confidence Interval (CI) values were calculated.

Results

Tear protein profile changes in AD

The amount of proteins in biological fluids; especially in tear, can provide information of diagnostic relevance. The typical protein concentration in tear fluid is 5–7 μg/μl [40], and the tear production rate is approximately 2 μl/min. Monitoring the tear production rate and tear protein concentration during sample collection (Table 1), significant differences were observed in case of AD patients compared to controls. The flow rate of 6 ± 2 μl/min observed in controls was significantly increased in AD patients (12±2 μl/min), along with a significant increase in tear protein concentration from 4.4 ± 1.4 μg/μl in controls to 8.8 ± 2.9 μg/μl in AD patients (Fig 1).

Due to the limited amount of tear fluid; initially, tear profile changes were studied from a few randomly selected samples, thereafter, validation of the observed differences was carried out on a larger sample size. In order to monitor global tear protein changes characteristic to AD, equal amounts of tear proteins from three randomly selected AD patients and two controls were analyzed by electrophoresis. After visualization of protein bands and carrying out densitometric evaluation, 13 bands were observed in each case (Fig 2a), out of which 11 bands showed a significant decrease in band intensity in AD samples (Fig 2b). The bands were excised and digested using trypsin, followed by LC-MS/MS based protein identification (Fig 2c, S1 Table). Only those proteins; of which at least two peptides with $\geq$95% confidence could be detected, were accepted as present (S1 Table). Examining the differentially expressed proteins, we have identified them as being involved in the host defense, and are components of the chemical barrier of the eye. These data suggest that AD can alter the composition of the chemical barrier, this is in accordance with previous experiments showing alterations of the chemical barrier by different stimuli and pathological conditions [41–43].

Table 1. Patient data and tear collection parameters.

Patient Nr.	Age (years)	Gender	Tear flow rate (μl/min)	Tear protein concentration (μg/μl)
AD 1	67	M	OD: 10.0	OD:7.1
AD 2	77	M	OD: 12.4 OS: 16.7	OD:3.6 OS:8.3
AD 3	80	F	OD: 14.5 OS: 16.7	OD:4.1 OS:3.9
AD 4	80	M	OD: 5.0	OD:6.9
AD 5	80	M	OS: 5.0	OS:11.5
AD 6	72	F	OD: 15.9 OS: 7.7	OD:12.1 OS:14.4
AD 7	90	F	OD: 5.6 OS: 13.0	OD:4.8 OS:5.0
AD 8	76	F	OD: 11.8	OD:12.1
AD 9	82	M	OD: 10.7 OS: 12.7	OD:17.0 OS:15.9
AD 10	81	M	OS: 9.6	OS: 9.6
AD 11	65	F	OD: 18.1 OS: 18.7	OD:9.4 OS:9.6
AD 12	66	M	OD: 10.0 OS: 17.0	OD: 4.7 OS:9.4
AD 13	76	M	OD: 14.1 OS: 17.7	OD:9.1 OS:7.5
AD 14	86	M	OD: 10.0	OD:8.8
Control 1	73	M	OD: 5.0 OS: 0.8	OD:3.5 OS:3.2
Control 2	62	M	OD: 10.4 OS: 2.6	OD:4.7 OS:4.7
Control 3	71	M	OD: 7.0 OS: 1.2	OD:7.4 OS:7.0
Control 4	71	F	OS: 4.6	OS: 3.6
Control 5	81	M	OD: 1.2 OS: 8.4	OD:4.4 OS:4.4
Control 6	89	F	OD: 3.5 OS: 3.0	OD:2.9 OS:2.3
Control 7	68	F	OD: 17.7 OS: 4.6	OD:7.4 OS:6.3
Control 8	66	F	OD: 3.2	OD:1.6
Control 9	65	F	OD: 6.6	OD:1.4

The eye from which the tear was collected is indicated. OD: Oculus dexter (right eye), OS: Oculus sinister (left eye).

doi:10.1371/journal.pone.0158000.t001

SRM-based quantitative proteomic method development for tear proteins

In order to validate changes of the chemical barrier in the tears of AD patients on a larger sample size, an SRM-based targeted proteomics approach was developed. The SRM scan mode provides a highly selective and sensitive method to monitor the level of multiple molecules in a single analysis; however, this method requires the proteins under examination to be defined priorly. For SRM assay design, lipocalin-1, lactotransferrin, lysozyme-C, extracellular glycoprotein lacritin, Ig λ, Zn α2 glycoprotein, prolactin inducible protein and lipophilin A proteins identified in bands showing significantly different intensity in AD samples as compared to controls were chosen. It is well known that the major proteins of sweat and tears play a role in host

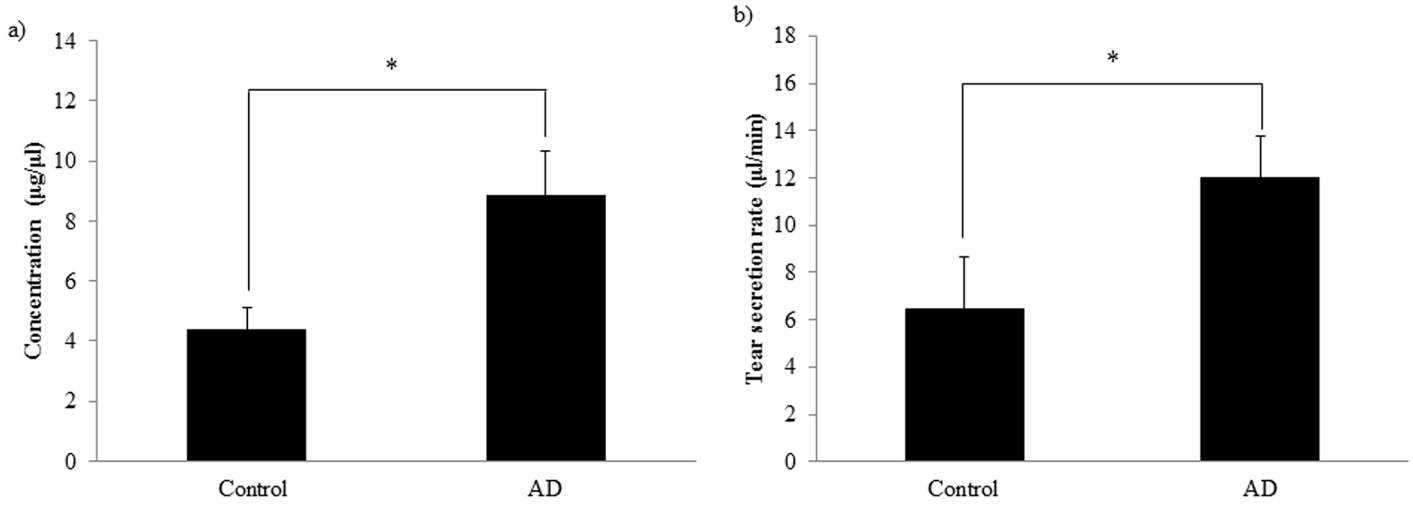


Fig 1. Protein concentration and flow rate of collected tear. The bars represent mean values with the standard error of mean of a) total protein concentration measured by Bradford method b) tear secretion rate. * indicates p <0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0158000.g001

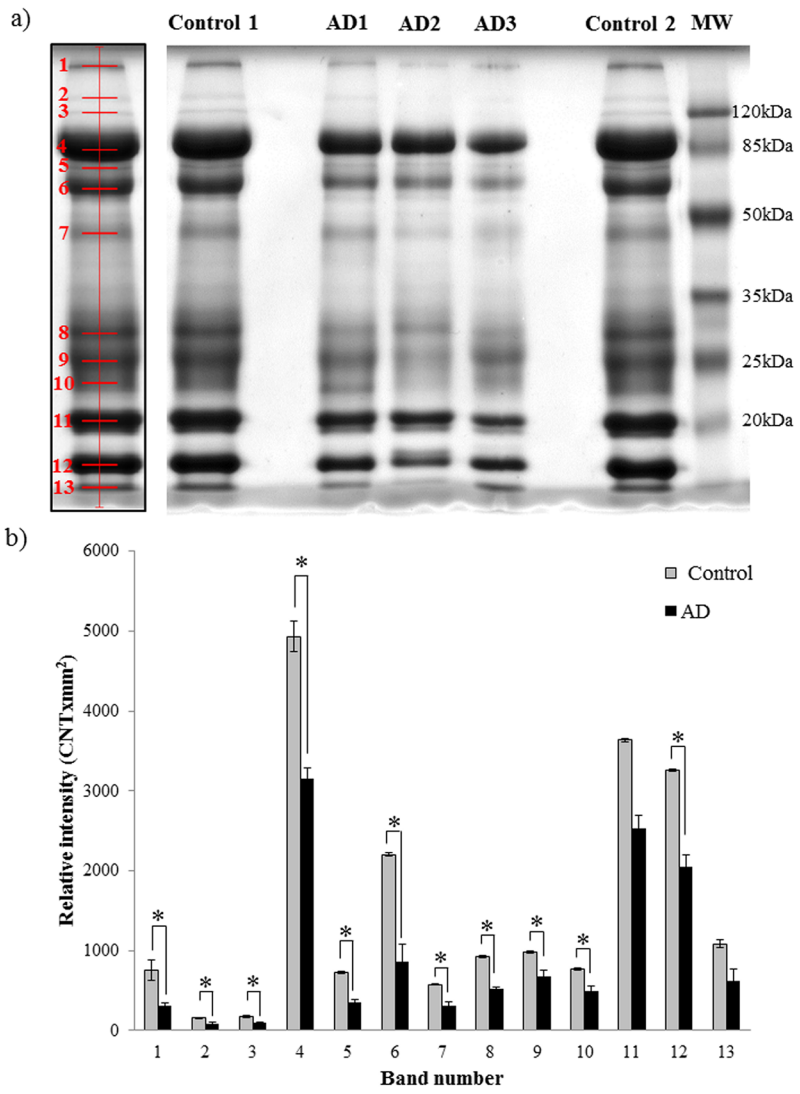
defense against potential pathogens [22,44], thus, based on previous experiments, galectin-3 binding protein and dermcidin; considered as proteins with an important role in host defense and immunomodulation [45,46], were also included into the panel of analyzed tear proteins.

SRM-based quantitative proteomic experiments were designed and optimized for the ten selected proteins (S2 Table). In order to enhance the specificity of the method, stable isotope-labeled (SIL) synthetic counterparts of the studied peptides were purchased and used in the analyses as an internal standard (S1 Fig). The sensitivity of the method was assessed by analyzing increasing amounts of SIL peptides added to the tear in a range of 10000 fold– 5 fold dilution. Most of the peptides were detectable in 10000 fold dilution (approximately 7.5 fmol), and the SRM signal intensity was proportional to the amount of peptides introduced in a broad range of dilutions (S3 Table). Based on our results, it appears that the developed SRM method is sensitive enough, and has a broad dynamic range enabling it to be a useful tool to monitor alterations of tear protein amounts.

Changes in the tear chemical barrier`s composition in AD

The composition of the chemical barrier constantly changes upon different stimuli, as a response to mechanical and microbial challenges, in order to protect the human organism efficiently from potentially invading pathogens [47]. Moreover, systemic conditions can also affect the production and secretion of antimicrobial peptides, leading to changes in the composition of this antimicrobial peptide cocktail [47]. Tear fluid contains a variety of antimicrobial and immunomodulatory proteins as part of the first line defense of the innate immune system [22].

In order to study changes in the tear`s chemical barrier in AD, level of the ten selected proteins was analyzed using the developed SRM method in 37 tear samples from 14 patients with AD, and 9 controls in triplicates (S4 table). In line with results obtained from electrophoresis, the levels of lipocalin-1, lactotransferrin, extracellular glycoprotein lacritin, lysozyme-C, and prolactin inducible protein were significantly decreased, while the level of dermcidin was significantly elevated in AD tears, as compared to those of the controls (Fig 3,Table 2). The down-regulated proteins are expressed by the lacrimal glands, indicating lacrimal gland dysfunction in AD.



c)

Band nr.	Identified proteins (symbol)	UniProt ID
1	-	-
2	LTF	P02788
3	LTF	P02788
4	LTF	P02788
5	LTF	P02788
	ALB	P02768
	IGHA1	P01876
6	LTF	P02788
	IGHA1	P01876
7	AZGP1	P25311
	KRT1	P04264
	LACRT	Q9GZZ8
8	KRT1	P04264
	KRT10	P13645
9	IGLC*	P0CG05/P0CG06
10	IGLC*	P0CG05/P0CG06
	IGKC	P01834
	ZG16B	Q96DA0
	PRR4	Q16378
11	LCN1	P31025
	PIP	P12273
12	LYZ	P61626
	LPNC	O75556
	PIP	P12273
	LPNA	O95968
	CST4	P01036
13	LYZ	P61626

Fig 2. Changes in the tear proteome in AD. a) Gel image of tear proteins from three AD and two control subjects. The left panel shows the representative band distribution detected with QuantityOne. b) Densitometric analysis of gel bands. The bars show mean values with the standard error of mean, grey bars indicate control group while the black bars indicate the AD group. * indicates p <0.05. c) List of identified proteins with the corresponding UniProt reference numbers. * indicates the presence of Ig λ, though the Ig λ-2 chain C region and Ig λ-3 chain C region of the identified peptides were undistinguishable. LTF: lactotransferrin, ALB: serum albumin, IGHA1: Ig α-1 chain C region, AZGP1: Zn-α2 glycoprotein, KRT1: keratin, type II cytoskeletal 1, LACRT: extracellular glycoprotein lacritin, KRT10: Keratin, type I cytoskeletal 10, IGLC: Ig λ chain C region, IGKC: Ig κ chain C region, ZG16B: zymogen granule protein 16 homolog B, PRR4: proline-rich protein 4, LCN1: lipocalin-1, PIP: prolactin-inducible protein, LYZ: lysozyme-C, LPNC: lipophilin C, LPNA: lipophilin A, CST4: cystatin S.

doi:10.1371/journal.pone.0158000.g002

Identification of potential AD-specific tear biomarkers

Proteins differentially expressed in the tears of AD patients were subjected to further analyses, in order to examine their potential use as future predictive biomarkers for AD. A receiver operator characteristic (ROC) analysis was carried out for each significantly expressed protein, and multivariate ROC curves were constructed to test the different combinations of potential biomarkers. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and the area under the ROC curve (AUC) were calculated in each setting (Table 3). An AUC value close to 1.0

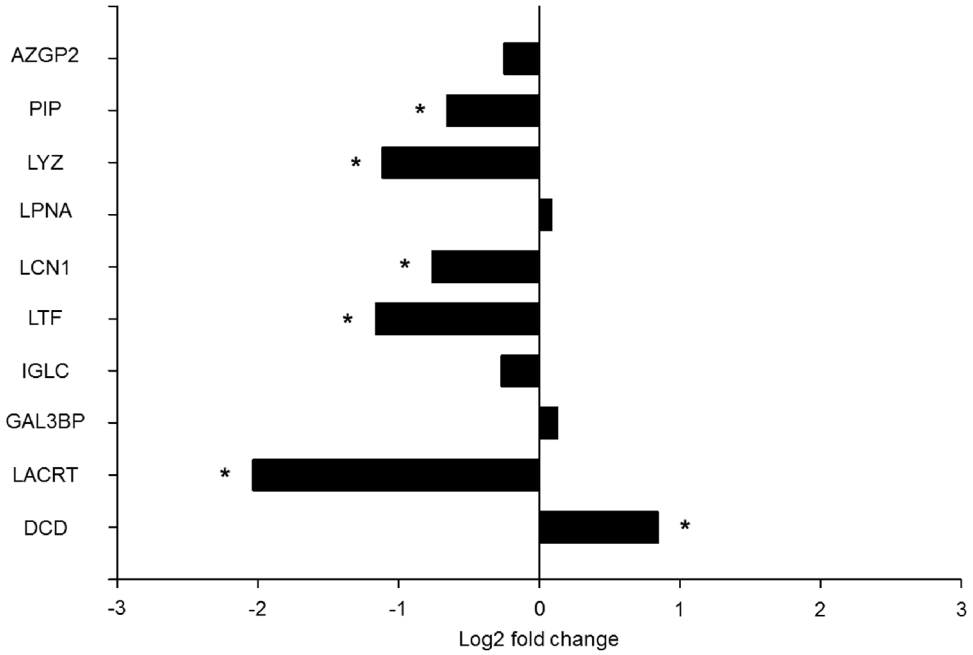


Fig 3. Quantitative analysis of tear proteins by SRM. The log2 fold change of the studied proteins in tears of patients with AD compared to controls. * indicate $p \leq 0.05$. AZGP1: Zn-α2 glycoprotein, PIP: prolactin-inducible protein, LYZ: lysozyme-C, LTF: lactotransferrin, LPNA: lipophilin A, LCN1: lipocalin-1, LACRT: extracellular glycoprotein lacritin, IGLC: Ig λ chain C region, GAL3BP: galectin 3-binding protein, DCD: dermcidin.

doi:10.1371/journal.pone.0158000.g003

indicates a well-performing biomarker; whereas values close to 0.5 suggest a biomarker performing no better than random.

In all cases, the AUC value was above 0.6, and when different combinations of two or more proteins were analyzed, AUC value was above 0.7, indicating an additive effect of the different proteins in improving the performance of the test. The highest sensitivity was obtained by combination of lysozyme-C and extracellular glycoprotein lacritin; yielding 91% sensitivity. The most balanced performance was achieved when lipocalin-1, dermcidin, lysozyme-C and extracellular glycoprotein lacritin were combined. In this case, the AUC was 0.80, the

Table 2. Result of the mixed effect variance analysis.

Protein	Log2FC	SE	Tvalue	Adjusted p value
Zn-α2 glycoprotein	-0.25	0.17	-1.43	0.26
Prolactin-inducible protein	-0.66	0.14	-4.75	<0.0001
Lysozyme-C	-1.11	0.15	-7.29	<0.0001
Lipophilin A	0.09	0.23	0.39	0.76
Lipocalin-1	-0.76	0.13	-5.79	<0.0001
Lactotransferrin	-1.16	0.17	-6.66	<0.0001
Ig λ chain C region	-0.27	0.23	-1.19	0.35
Galectin 3-binding protein	0.13	0.19	0.68	0.59
Extracellular glycoprotein lacritin	-2.04	0.18	-11.53	<0.0001
Dermcidin	0.85	0.23	3.64	0.0006

The log2 fold change (log2FC) standard error (SE), T values (Tvalue) and the FDR corrected p-values are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0158000.t002

Table 3. ROC analysis of possible tear biomarkers for AD.

Proteins	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PV+ (%)	PV- (%)	AUC	Accuracy	95% CI
LCN1	53.1	79.7	22.7	43.3	0.68	0.72	0.56–0.80
LTF	78.1	51.6	17.5	55.4	0.67	0.73	0.55–0.78
LYZ	90.6	50	8.6	52.5	0.68	0.67	0.57–0.79
PIP	71.9	56.2	20	54.9	0.6	0.67	0.48–0.72
LACRT	90.6	57.8	7.5	48.2	0.71	0.65	0.59–0.82
DCD	62.5	76.6	19.7	42.9	0.7	0.70	0.59–0.82
LCN1+DCD	53.1	89.1	20.8	29.2	0.74	0.76	0.63–0.85
LYZ+LACRT	90.6	59.4	7.3	47.3	0.72	0.64	0.61–0.83
LCN1+DCD+ LACRT	90.6	65.6	6.7	43.1	0.8	0.69	0.71–0.89
LCN1+DCD+LTF	53.1	89.1	20.8	29.2	0.74	0.76	0.62–0.84
LCN1+DCD+LYZ	59.4	82.8	19.7	36.7	0.75	0.76	0.64–0.86
LCN1+LTF+LYZ	87.5	50	11.1	53.3	0.72	0.71	0.61–0.83
LYZ+LACRT+ DCD	90.6	65.6	6.7	43.1	0.79	0.71	0.69–0.89
LYZ+LACRT+ LCN1	87.5	59.4	9.5	48.1	0.72	0.67	0.62–0.83
PIP+LACRT+DCD	93.8	60.9	4.9	45.5	0.79	0.68	0.69–0.97
DCD+LCN1+LTF+PIP	62.5	76.6	19.7	42.9	0.74	0.72	0.64–0.84
LCN1+DCD+LYZ+LACRT	81.2	76.6	10.9	36.6	0.8	0.72	0.71–0.89

doi:10.1371/journal.pone.0158000.t003

sensitivity was 81% and the specificity was 77%. Considering these values, it seems that a test combining these four potential biomarkers may therefore be used as a first screen in the diagnosis of AD.

Discussion

Tear fluid is an excellent candidate for biomarker studies, given the facts that samples may be collected non-invasively, in addition to providing information not only on local ocular conditions; such as dry-eye disease and diabetic retinopathy, but also on systemic pathophysiological processes [22,25,29]. The presence of amyloid plaques was demonstrated in the retina and lens of patients with Alzheimer's disease, and animal model studies indicated correlation in amyloid depositions between the retina and the brain [5,6]. Changes in the retinal vasculature and retinal morphology were detected in the eyes of patients with AD, resulting in the reduced visual performance observed in AD patients [13]. We have hypothesized that changes in retinal morphology and blood flow related to AD may alter the microenvironment of the eye, and this alteration may therefore be reflected at the level of tear proteins.

In our study, a significant increase in the flow rate and protein concentration, along with a significant difference in the amount of the studied tear proteins was observed in samples obtained from AD patients. This is in good agreement with previously published data suggesting extensive ocular alterations related to AD [5–7]. The protein level changes observed with electrophoretic analysis of five samples were validated by targeted proteomics analyses on 37 samples. The only increase in tear proteins characteristic to AD has been observed in case of dermcidin, which is produced by epithelial cells, [47] and is the main sweat antimicrobial peptide with a broad range antimicrobial activity [44]. The proteins with reduced amount were involved in first line defense of the eye, produced by the lacrimal gland.

The altered composition of the chemical barrier, along with the reduced level of studied defense proteins might imply an increased risk of ocular infections, yet there has been no reported increase of ocular infections in patients with AD according to the scientific literature.

However, reduced corneal sensitivity and abnormal tear functions were reported in AD patients as compared to controls, in addition to other neurodegenerative diseases [48]. Dermcidin; with its broad antimicrobial spectrum, appears to be a plausible factor responsible for limiting bacterial over-growth and; therefore, possible infections.

Given the easy, non-invasive collection possibility of tears, the prospect of a bedside test development is worth exploring. Patients with an increased tear flow rate (above 5 μl/min according to our data), along with increased tear protein concentration, and who also show altered level of extracellular glycoprotein lacritin, lipocalin-1, lysozyme-C and dermcidin, may be subjected to further imaging, neuropsychological testing (CT, MRI, PET) and cerebrospinal fluid analyses ($A\beta_{42}$, total tau and p-tau levels). Considering the small sample size analyzed in this pilot study, more studies carried out on a large population scale are required, in order to evaluate the applicability of the proposed biomarkers. After validation, tear analysis, as an easily executable test, can be used in population screening by general practitioners, and patients with a positive test may be further evaluated by clinical centers for the establishment of the diagnosis. If early diagnosis and treatment are promptly provided, the quality of life can be improved for AD patients and their caregivers, which will undoubtedly aid in decreasing the socio-economic burden of the disease.

Supporting Information

S1 Fig. Representative SRM spectra for each analyzed peptide. The y axis shows the intensity while the x axis shows the retention time. The blue line refers for the synthetic, stabile isotope labeled peptide, while the red line for the endogenous counterparts.
(PPTX)

S1 Table. List of the identified proteins in tears. The name and accession numbers of the identified proteins in each band are presented along with the protein identification data. The sequence coverage (%Cov), the identified peptide sequences, the confidence of sequence identification (Conf), post-translational modifications (Modifications), cleavages, theoretical molecular weights and m/z values, the recorded precursor mass and m/z values, the delta mass (dMass) values are indicated along with the ID of spectrum used for sequence identification and retention time.
(XLSX)

S2 Table. SRM transition parameters of examined tear proteins. Bold amino acids represent carbamidomethylated cysteines while * indicates the stable isotope-labeled amino acids. DP: de-clustering potential, CE: collision energy.
(DOCX)

S3 Table. Linear dynamic range of the SIL peptides in tear matrix. The values represent the dilution range where the amount of peptide introduced into the mass spectrometer is proportional with the signal intensity.
(DOCX)

S4 Table. AUC data determined by SRM analyzes from tears of AD patients and controls. The values of three independent replicates are indicated.
(XLS)

Acknowledgments

This research was supported by TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016, TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, TÁMOP-4.2.2.B-15/1/KONV-2015-0001, TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-

2012-0045 and National Brain Research Program KTIA_13_NAP-A-II/3. Adrienne Csutak is receiver of Janos Bolyai and Lajos Szodoray Postdoctoral Fellowships. We thank Dr. Mohamed Mahdi for the English proofreading.

Gergő Kalló was supported by Astellas Pharma Ltd. in form of support for chemicals and consumables which does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ÉC AC. Performed the experiments: GK. Analyzed the data: GK ME. Contributed reagents/materials/analysis tools: ZV BU. Wrote the paper: JT ÉC AC GK.

References

1. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. Dialogues Clin Neurosci. 2009; 11: 111–28. PMID: 19585947
2. Bali J, Ben Halima S, Felmy B, Goodger Z, Zurbriggen S, Rajendran L. Cellular basis of Alzheimer's disease. Ann Indian Acad Neurol. 2010; 13: S89–93. doi: 10.4103/0972-2327.74251 PMID: 21369424
3. Crews L, Tsigelny I, Hashimoto M, Masliah E. Role of synucleins in Alzheimer's disease. Neurotox Res. 2009; 16: 306–317. doi: 10.1007/s12640-009-9073-6 PMID: 19551456
4. Love S. Contribution of cerebral amyloid angiopathy to Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004; 75: 1–4. Available: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1757461&tool=pmcentrez&rendertype=abstract PMID: 14707293
5. Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov A V., Miller C a., Ko MK, Black KL, et al. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. Neuroimage. Elsevier Inc.; 2011; 54: S204–S217. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.06.020
6. Goldstein LE, Muffat JA, Cherny RA, Moir RD, Ericsson MH, Huang X, et al. Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. Lancet (London, England). 2003; 361: 1258–65. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12981-9
7. Armstrong RA. Alzheimer's Disease and the Eye. J Optom. Elsevier; 2009; 2: 103–111. doi: 10.3921/joptom.2009.103
8. Prvulovic D, Hampel H. Amyloid β (Aβ) and phospho-tau (p-tau) as diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease. Clin Chem Lab Med. 2011; 49: 367–374. doi: 10.1515/CCLM.2011.087 PMID: 21342022
9. Wyss-coray T, Rogers J. Inflammation in Alzheimer Disease—A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012; 1–24.
10. Korolainen M a, Goldsteins G, Nyman T a, Alafuzoff I, Koistinaho J, Pirttilä T. Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. Neurobiol Aging. 2006; 27: 42–53. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.11.010 PMID: 16298240
11. Takuma K, Yan SS, Stern DM, Yamada K. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease. J Pharmacol Sci. 2005; 97: 312–316. doi: 10.1254/jphs.CPJ04006X PMID: 15750290
12. Mueller SG, Weiner MW, Thal LJ, Petersen RC, Jack CR, Jagust W, et al. Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). Alzheimers Dement. 2005; 1: 55–66. doi: 10.1016/j.jalz.2005.06.003 PMID: 17476317
13. Laske C, Sohrabi HR, Frost SM, López-de-Ipiña K, Garrard P, Buscema M, et al. Innovative diagnostic tools for early detection of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2015; 11: 561–78. doi: 10.1016/j.jalz.2014.06.004 PMID: 25443858
14. Korolainen M a., Nyman T a., Aittokallio T, Pirttilä T. An update on clinical proteomics in Alzheimer's research. J Neurochem. 2010; 112: 1386–1414. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06558.x PMID: 20050976
15. Kim DH, Yeo SH, Park J-M, Choi JY, Lee T-H, Park SY, et al. Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. Gene. Elsevier B.V.; 2014; 545: 185–193. doi: 10.1016/j.gene.2014.05.031

16. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. Nat Genet. 2009; 41: 1088–1093. doi: 10.1038/ng.440 PMID: 19734902

17. Podtelezhnikov AA, Tanis KQ, Nebozhyn M, Ray WJ, Stone DJ, Loboda AP. Molecular insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease and its relationship to normal aging. PLoS One. 2011; 6: e29610. doi: 10.1371/journal.pone.0029610 PMID: 22216330

18. Korolainen M a, Nyman T a, Nyyssönen P, Hartikainen ES, Pirttilä T. Multiplexed proteomic analysis of oxidation and concentrations of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer disease. Clin Chem. 2007; 53: 657–65. doi: 10.1373/clinchem.2006.078014 PMID: 17289803

19. Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. Nat Methods. 2012; 9: 555–66. doi: 10.1038/nmeth.2015 PMID: 22669653

20. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. Mol Syst Biol. 2008; 4: 222. doi: 10.1038/msb.2008.61 PMID: 18854821

21. Kalló G, Chatterjee A, Tóth M, Rajnavölgyi É, Csutak A, Tőzsér J, et al. Relative quantification of human β-defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring. Rapid Commun Mass Spectrom. 2015; 29: 1623–1631. doi: 10.1002/rcm.7259 PMID: 26467114

22. Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, Chen L, Vaz C, Tanavde V, et al. In-depth analysis of the human tear proteome. J Proteomics. Elsevier B.V.; 2012; 75: 3877–3885. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.053

23. Zhou L, Beuerman RW, Chan CM, Zhao SZ, Li XR, Yang H, et al. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. J Proteome Res. 2009; 8: 4889–905. doi: 10.1021/pr900686s PMID: 19705875

24. Herber S, Grus FH, Sabuncuo P, Augustin AJ. Two-dimensional analysis of tear protein patterns of diabetic patients. Electrophoresis. 2001; 22: 1838–44. PMID: 11425240

25. Csősz É, Boross P, Csutak A, Berta A, Tóth F, Póliska S, et al. Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy. J Proteomics. 2012; 75: 2196–2204. doi: 10.1016/j.jprot.2012.01.019 PMID: 22300579

26. An HJ, Ninonuevo M, Aguilan J, Liu H, Lebrilla CB, Alvarenga LS, et al. Glycomics analyses of tear fluid for the diagnostic detection of ocular rosacea. J Proteome Res. 4: 1981–7. doi: 10.1021/pr0501620 PMID: 16335942

27. Haeckel R, Hänecke P. The application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes. Ann Biol Clin (Paris). 1993; 51: 903–10. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8210068

28. Sperandio B, Fischer N, Sansonetti PJ. Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. Semin Immunol. Elsevier Ltd; 2015; 27: 111–118. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.011

29. Çomoğlu SS, Güven H, Acar M, Öztürk G, Koçer B. Tear levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2013; 553: 63–67. doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.019 PMID: 23973333

30. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology. 1984; 34: 939–44. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6610841 PMID: 6610841

31. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Source Information [Internet]. U.S. National Library of Medicine; Available: https://www.nlm.nih.gov/research/umls/sourcereleasedocs/current/DSM4/

32. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res. 1975; 12: 189–198. 0022-3956(75)90026-6 [pii] PMID: 1202204

33. Berta A. Collection of tear samples with or without stimulation. Am J Ophthalmol. 1983; 96: 115–6. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6869470 PMID: 6869470

34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248–54. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051 PMID: 942051

35. Choi M, Chang C-Y, Clough T, Broudy D, Killeen T, MacLean B, et al. MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. Bioinformatics. 2014; 30: 2524–6. doi: 10.1093/bioinformatics/btu305 PMID: 24794931

36. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. J Stat Softw. 2015; 67. doi: 10.18637/jss.v067.i01

37. Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing When researchers tend to select pursuing multiple the (statistically) and support of conclusions. An unguarded use in a greatly results of single-inference inc. 2015; 57: 289–300.

38. Shultz EK. Multivariate receiver-operating characteristic curve analysis: prostate cancer screening as an example. Clin Chem. 1995; 41: 1248–55. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628115 PMID: 7628115

39. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. BMC Bioinformatics. 2011; 12: 77. doi: 10.1186/1471-2105-12-77 PMID: 21414208

40. Fullard RJ, Snyder C. Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1990; 31: 1119–1126. PMID: 2354914

41. Sugi K, Saitoh O, Hirata I, Katsu K. Fecal lactoferrin as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. Am J Gastroenterol. 1996; 91: 927–34. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8633583 PMID: 8633583

42. Rieg S, Steffen H, Seeber S, Humeny A, Kalbacher H, Dietz K, et al. Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. J Immunol. 2005; 174: 8003–8010. doi: 10.1016/S0093-3619(08)70018-2 PMID: 15944307

43. Mumcu G, Cimilli H, Karacayli U, Inanc N, Ture-Ozdemir F, Eksioglu-Demiralp E, et al. Salivary levels of antimicrobial peptides Hnp 1–3, LI-37 and S100 in Behcet's disease. Arch Oral Biol. Elsevier Ltd; 2012; 57: 642–6.

44. Csősz É, Emri G, Kalló G, Tsaprailis G, Tőzsér J. Highly abundant defense proteins in human sweat asrevealed by targeted proteomics and label-free quantification mass spectrometry. J Eur Acad Dermatology Venereol. 2015; 29: 2024–2031. doi: 10.1111/jdv.13221

45. Ullrich A, Sures I, D'Egidio M, Jallal B, Powell TJ, Herbst R, et al. The secreted tumor-associated antigen 90K is a potent immune stimulator. J Biol Chem. 1994; 269: 18401–18407. PMID: 8034587

46. Schittek B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. J Innate Immun. 2012; 4: 349–360.

47. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. Virulence. 2010; 1: 440–464. doi: 10.4161/viru.1.5.12983 PMID: 21178486

48. Örnek N, Dağ E, Örnek K. Corneal Sensitivity and Tear Function in Neurodegenerative Diseases. Curr Eye Res. 2015; 40: 423–428. doi: 10.3109/02713683.2014.930154 PMID: 24955505

dc_1779_20

FEBS openbio

FEBS PRESS science publishing by scientists

Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications

Éva Csősz[1,2], Eszter Deák[1,3], Noémi Tóth[1,3], Carlo Enrico Traverso[4], Adrienne Csutak[3] and József Tőzsér[1,2]

1 Biomarker Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary
2 Proteomics Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary
3 Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary
4 Clinica Oculistica, DiNOGMI, University of Genoa and IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italy

Keywords
aqueous humour; biomarker; cytokine profile; glaucoma; tear; trabeculectomy

Correspondence
É. Csősz, Biomarker Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary
Tel: +36 52 416432
E-mail: cseva@med.unideb.hu

Adrienne Csutak and József Tőzsér contributed equally to this work

(Received 11 February 2019, revised 11 March 2019, accepted 5 April 2019)

doi:10.1002/2211-5463.12637

Glaucoma is a multifactorial neurodegenerative disease that causes impaired vision and, in advanced cases, blindness. The increasing prevalence of glaucoma due to an ageing population has necessitated the identification of suitable biomarkers for the early detection of the disease. Aqueous humour (AH) has been proposed as a source of biomarkers, but it can only be collected using a minor, yet invasive surgical intervention. Tears, however, are constantly available and can be collected any time via noninvasive methods. In order to examine the utility of tear as a surrogate for aqueous humour in biomarker development, we compared the levels of 27 cytokines and chemokines in paired samples of tear and aqueous humour using a Luminex multiplex immunobead-based technique. Significantly higher levels of cytokines in tear compared to aqueous humour were detected suggesting that tear and aqueous humour are not identical in terms of inflammation response. Furthermore, the levels of IFN-γ, GM-CSF and IL-5 in tear were significantly lower in patients who developed complications after one year, but no statistically significant changes in cytokine levels were observed in aqueous humour. These three molecules may have potential as predictive biomarkers for the appearance of late flap-related complications of trabeculectomy.

Glaucoma is a multifactorial neurodegenerative disease affecting the optic nerve, leading to impaired vision and, in advanced cases, blindness [1]. There are different types of glaucoma, primarily categorized by the iridocorneal angle. Both the open-angle glaucoma and the angle-closure glaucoma can be divided into primary and secondary forms, and can also be classified as acute or chronic [2]. In glaucoma, neuropathy of the optic nerve and the loss of retinal ganglion cells can be observed, resulting in atrophy of the optic nerve and impairment of visual functions, leading to blindness [3,4]. Taking into consideration the increasing prevalence of

Abbreviations
AH, aqueous humour; bFGF, fibroblast growth factor; CV, coefficient of variation; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; IOP, intraocular pressure; IP-10, interferon gamma-induced protein 10; LC-MS, liquid chromatography coupled mass spectrometry; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MIP, macrophage inflammatory proteins; MMC, mitomycin C; PACG, primary angle-closure glaucoma; PDGF, platelet-derived growth factor; POAG, primary open-angle glaucoma; RANTES, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; TNF, tumour necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

FEBS Open Bio 9 (2019) 1020–1028 © 2019 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

glaucoma due to an ageing demographics of modern society, it is crucial to find suitable biomarkers for the early detection of the disease [5]. Several studies were carried out to investigate proteins related to the pathophysiological changes observed in glaucoma, most of them focusing on the analysis of the retina, optic nerve, trabecular meshwork and aqueous humour (AH). There were also studies conducted on blood samples, while only few used tear fluid [6–10].

Using various proteomic methods such as LC-MS-based analyses and immunological methods, hundreds of proteins characteristic of glaucoma were identified. Most of these specimens were obtained from the retina and the trabecular meshwork by highly invasive techniques [9–14]. Biological fluids are often used instead of tissue samples for biomarker studies [15]. As such, AH is frequently analysed in the examination of glaucoma as a surrogate for ocular biological fluids [9]. AH is the product of the ciliary body and is drained from the eye through the trabecular meshwork and the uveoscleral pathway. Proteomic analyses of AH samples from patients with glaucoma revealed important proteins involved in metabolism, inflammatory response and antioxidant defence [9,16]. Extensive studies analysing the amount of inflammatory cytokines revealed higher levels of pro-inflammatory cytokines in the AH originating from patients with glaucoma, as compared to controls [17–21].

Despite the usefulness of AH as a source of biomarkers of trabecular meshwork and retinal ganglion cell damage, the invasive collection of this biological fluid prevents its application for the purpose of screening or follow-ups. On the other hand, tear fluid provides a better alternative, given its availability and ease of collection along with a composition of glaucoma-related proteins traced directly to the AH. Tears are a valuable biological fluid, widely studied in eye diseases for the purpose of identifying potential biomarkers for eye-related and systemic diseases [15]. In glaucoma, only few studies used tear fluid as a biological source [22], and with proteomic analyses, 27 proteins were identified as potential glaucoma biomarkers, mainly for primary open-angle glaucoma (POAG) [12]. The pro- and anti-inflammatory cytokines were also studied in tear fluid, showing a shifted balance towards the pro-inflammatory state in glaucoma upon topical medication [23].

Multiplex immunobead-based assays are often used to examine the level of multiple cytokine and chemokine molecules in a single sample. This is very beneficial when analysing certain bodily fluids that can be collected only in small amounts, as in the case of tear and AH, respectively [24,25]. In this pilot study, we compared the concentrations of 27 cytokine and chemokine molecules in the tear and AH samples originating from the same patient with glaucoma, using a commercially available multiplex immunobead kit. Our aim was to determine whether the readily available tear fluid can replace the use of AH in studying patients with glaucoma following trabeculectomy.

Results and Discussion

Multiplex immunobead assays provide a versatile tool for the analysis of bodily fluids with low volume. The application of antibodies provides high specificity, while the Luminex beads offer the possibility of multiplexing, allowing for the analysis of multiple analytes in one sample [26]. This technique was used in the form of a validated, commercially available kit for the measurement of the concentration of 27 cytokine and chemokine molecules in tear and AH samples originating from patients with glaucoma, who underwent trabeculectomy in order to lower their intraocular pressure. All the 27 analytes were detected in both sample types; however, in cases where the amount of the studied molecule was under the limit of detection (Table S1), the number 0 was assigned for the concentration of the analyte. The most dilute standards from the calibration curve (S8) had high CV% in case of most of the analytes, indicating that the kit cannot reliably measure the concentration of the individual proteins in very dilute samples (Table S1).

The analysis of tear

All of the examined cytokines, except for IL2 and IL10, were present in at least 90% of the tear samples. IL2 could be detected only in 45% of the samples, while IL10 was present in 85% of the samples (Table S2). Considering that we did not include healthy control because our aim was to compare the two types of samples originating from the same patient, first we compared our results to data available in the literature.

Comparing our results to those obtained by Martinez-de-la-Casa *et al.* [27] regarding the concentration of the same 27 cytokines and chemokines on control and glaucoma subjects using the same sample collection procedure, we can conclude that the levels of eotaxin, G-CSF, IL-12, IL-13, IL-15, IL-1β, IL-4, IL-7 and MIP1α were in the same range and were very similar in the two studies. A similar trend in the levels of bFGF, GM-CSF, IFN-γ, IL-10, IL-17, IL-5, MCP1, PDGF-BB, TNFα and VEGF was observed as compared to controls in the two studies; however, in our

case, the levels of these cytokines were even higher. The levels of IL-1Ra, IL-2, IL-6, IL-8, IP-10, MIP1β and RANTES were lower in our study as compared to the control tears from healthy subjects published by Martinez-de-la-Casa *et al*. (Table S3) [27]. However, when we compared the cytokine levels measured in our samples to the results reported by Mrugacz et.al. examining physiological tear with ELISA method [28], the levels of IL-6, TNFα and IL-17 were much higher in our samples. A similar phenomenon was observed when we compared our data to those obtained by Gupta et al. [29] examining eye-drop naive patients with newly diagnosed POAG compared to controls using a different sample collection procedure and a different method than ours.

It should be noted that it is indeed difficult to compare results obtained by different studies, as the application of different analytical strategies hinders the proper comparison of results between studies. For tear analysis, Gupta et al. and Mrugacz et.al. have used ELISA methods to examine the cytokine levels. Their results are comparable to each other but display magnitude lower values compared to our results and the results obtained by Martinez de la Casa *et al*. [27–29]. The higher level of some cytokines observed in our study compared to the values from the literature might indicate a more pronounced pro-inflammatory condition, which might be due to the fact that the patients recruited into our study had a more advanced phase of glaucoma, finally succumbing to trabeculectomy.

Another factor that can influence tear composition is the method of collection. Depending on the procedure, significantly higher levels of pro-inflammatory cytokines were observed in basal tears as compared to reflex tears [30]. In our study, basal tear was collected by the same person throughout the study, and the presence of ocular surface disease or autoimmune disease was regarded as exclusion criteria. It is important to note that neither the tear collection nor the analysis method applied by Gupta et al. was the same as the ones used in this study and by Martinez-de-la-Casa et. al., and the patients with glaucoma recruited in these two later studies were eye-drop users [27,29]. According to the currently used treatment protocols, eye-drops are widely used in the therapy of glaucoma. Evidence from the literature shows that the administration of eye-drops can distort the level of cytokines in tears, leading to higher pro-inflammatory cytokine concentrations, in agreement with the findings from our study [23,31].

Gender and the type of glaucoma were not associated with a statistically significant difference on the cytokine levels, tear production rate and tear protein concentration in any of the studied groups. The group of patients using three or more different eye-drops was compared to the group using less than three eye-drops, but we could not find any statistically significant difference (Table S4). Based on these data, we think that the administration of different drugs does not modulate the level of the analysed cytokines, tear protein concentration or tear production rate, at least in case of patients examined in this study.

The IOP of the patients and the presence of complications following trabeculectomy were monitored, including infection, blebitis, endophthalmitis, reduced visual acuity, flap-related complications, choroidal ablation, and bleb failure leading to blocked AH filtration to the subconjunctival space.

We collected ophthalmological data for 19 out of 20 recruited patients, and we examined the effect of the presence of complications on the level of tear cytokines, tear total protein concentration and tear production rate. In case of three proteins, statistically significant differences could be observed. The concentration of IFN-γ was higher in the group of patients without complication, and the same tendency was observed in case of GM-CSF and IL-5, as well (Fig. 1).

IFN-γ is secreted by T helper cells, cytotoxic T cells and natural killer cells and has antiviral, immunoregulatory and antitumour properties [32]. The increase of IFN-γ may inhibit collagen synthesis and lead to delayed epidermal wound healing [33,34]. According to another study, the application of mesenchymal stem cells following chemical injury of the cornea reduced IFN-γ levels and thus reduces the corneal inflammation and neovascularization resulting in wound healing with less epithelial defects [35].

IL-5 is mainly produced by Th2-type helper T cells and was shown to have an important role in the activation, proliferation and survival of eosinophils and the differentiation of B cells [36]. It was observed in mice overexpressing IL-5 that the wound healing is delayed and re-epithelization is impaired [37].

GM-CSF is a pleiotropic molecule activating granulocyte and macrophage cell lineages, with an important role in wound healing through the induction of keratinocyte proliferation and promoting migration of epithelial cells [38]. Recombinant GM-CSF can be applied to help the wound healing process [38]. It was shown that GM-CSF plays an important role in the early, so-called acute inflammatory phase of ocular wound healing [39]. With the administration of recombinant human GM-CSF, it was demonstrated that GM-CSF has no effect on cell proliferation but on cell migration [40].

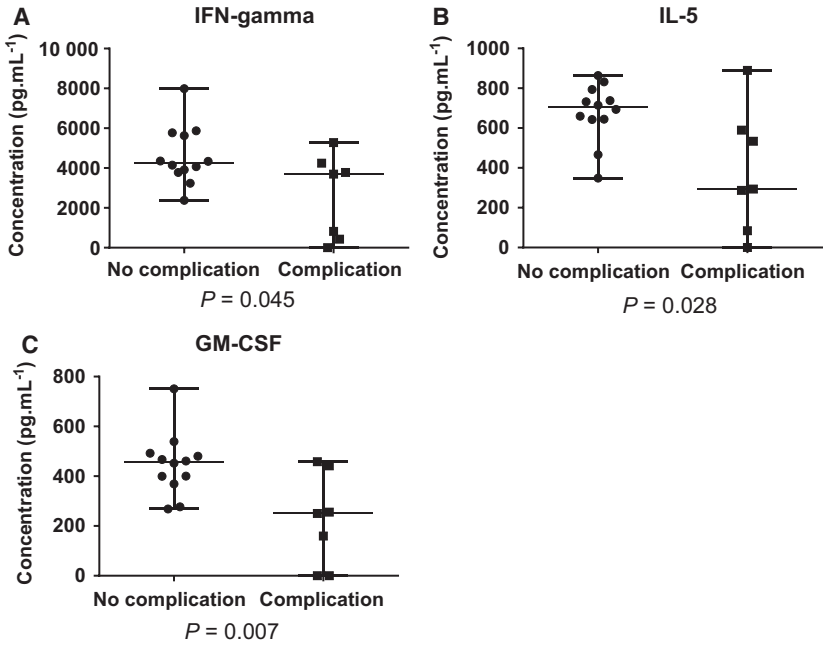


Fig. 1. Concentrations of cytokines with statistically significant differences between the groups with complications and no complication. The concentration (pg·mL^{-1}) of IFN-gamma (A), IL-5 (B) and GM-CSF (C) in the two groups is plotted. Below each plot, the *P* values obtained by the utilization of nonparametric Mann–Whitney *U*-test are indicated.

According to our data, ocular complications are associated with reduced levels of each observed cytokine. However, according to the scientific literature, faster wound healing, which might be one reason for bleb failure, would require increased levels of these factors. It should be noted that none of the studies involving IL-5, IFN-γ and GM-CSF were carried out on tear samples. The phenomena leading to bleb failure are not known in detail, and most probably, multiple, more complex mechanisms take part in the regulation of the process.

Despite the fact that our results observed in human tear contradict the results observed by others in skin or in rodent ocular wound healing models, IL-5, IFN-γ and GM-CSF can serve as a good starting point for further biomarker studies and verifications.

The analysis of aqueous humour

Aqueous humour was next analysed in the same manner as tear. More than half of cytokines detected were present in more than 90% of the samples. However, IL-1b, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, G-CSF and IFN-γ were present in less than 50% of the samples. IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, bFGF and MIP1α were present in 70–85% of the samples.

Next, we compared our data to data acquired from the analysis of human AH removed during cataract surgery by Sharma *et al*., POAG and cataract samples by Duvesh *et al.* and control and PEX samples by Garweg *et al*. (Table S3) [24,41,42]. We found that the level of bFGF, G-CSF, IL-1Ra, IL-6 and RANTES was higher in our samples; the level of IL8, MIP1α, MIP1β and eotaxin was higher in the study carried out by Sharma et. al.; and the MCP1 levels were in the same range in both studies [24]. Based on other studies, where similar examination methods were used to those applied by our group, the levels of eotaxin, GM-CSF, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IP-10, MCP1, MIP1α and VEGF were in the same range, and the level of IL-12, IL-4 and MIP1β was lower in our study. At the same time, the levels of bFGF, G-CSF, IL-1ra, IL-2, IL-5, IL-7, IL-13, IL-15, IL-17 and TNFα were higher in our study compared to the studies carried out by Duvesh *et al.* and Garweg *et al.* (Table S3) [41,42].

The effect of complication, gender and type of glaucoma on the cytokine levels was examined but no statistically significant difference could be found between any of the studied groups (data not shown).

Comparative analysis

Tear, as a noninvasively collectable bodily fluid, is constantly available and an important resource for follow-up studies. Different studies have examined the composition of tears and of aqueous humour in glaucoma and other eye diseases, but no previous comparative study examining the cytokine levels in tears and aqueous humour was carried out. After critical examination of the data obtained for tear and AH, we have compared the level of cytokines between these two

sample types. All studied cytokines and chemokine molecules, except IL-2, showed statistically significantly higher levels in tears compared to AH (Fig. 2, Table 1).

Based on our data, we can conclude that tear and aqueous humour are not identical from the inflammatory point of view and tear cannot substitute for aqueous humour for diagnostic purposes. Most probably, the levels of cytokines in the two sample types are controlled by different mechanisms. The higher cytokine levels in tear compared to aqueous humour might reflect not only the glaucoma-related, but also the eyedrop- or other factors-induced pro-inflammatory conditions, as well. A limitation of the study is the relatively low number of the participants recruited. Larger studies are needed to validate our findings and also to be able to do a proper patient stratification based on the drugs used.

Materials and methods

Subjects and sample collection

All participants recruited into this study were patients of the Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Debrecen. The participants provided written informed consent for tear and aqueous humour collection in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethical Committee of the University of Debrecen (approval number: 4234-2014). All patients underwent trabeculectomy surgery to reduce intraocular pressure. Exclusion criteria were the presence of autoimmune and/or ocular surface diseases and previous history of ocular surgery within 6 months. For the comparison of the tear and aqueous humour, 20 patients (11 male and 9 female; mean age: 58.8 ± 14.8) with glaucoma [eight patients with primary angle-closure glaucoma (PACG) and 12 patients with POAG] were recruited and the tears and aqueous humour were collected. Basal tear was collected only once for 2 min from patients except G002 and G093 right before the trabeculectomy. In case of patients G002 and G093, sample collection was not possible on the day of trabeculectomy; in their case, a previously collected tear sample was used. These cases are marked with * in Table S2. The nontraumatic tear collection was carried out before the trabeculectomy, using sterile glass capillary tubes (VWR Ltd, Hungary) from the lateral inferior meniscus without local anaesthesia or stimulation [43]. Tear samples were collected for 2 min, and then promptly transferred to 0.2-mL PCR tubes and centrifuged on 4 °C (264 ***g***) for 10 min, and the supernatants were then deep-frozen and stored at −70 °C until analysis. The AH samples were collected during trabeculectomy surgery through a limbal paracentesis by the same operator using sterile glass capillary. Care was taken to prevent blood and intraocular tissue contamination. The

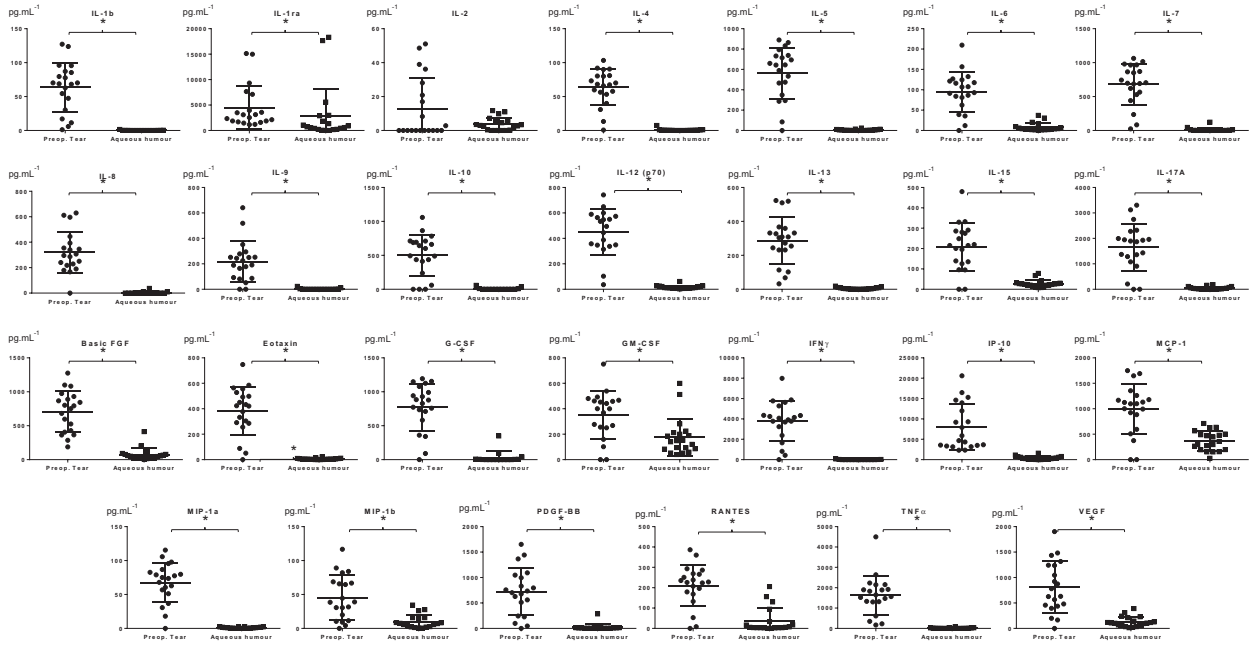


Fig. 2. Concentrations of 27 cytokines and chemokines in preoperative tear and aqueous humour samples from patients with glaucoma. The '*x*' axis shows the sample type, while '*y*' axis shows the concentration of the analyte in pg·mL^{-1}. For statistical analysis, paired nonparametric Wilcoxon test was used, and * indicates statistically significant ($P < 0.05$) difference.

Table 1. Concentrations of cytokines and chemokines in preoperative tear and aqueous humour samples by multiplex bead immunoassay. Data are expressed as mean ($pg{\cdot}mL^{-1}$) ± SEM. The concentrations were calculated based on the recorded 8 point calibration curves and applied dilutions shown in Table S1. Statistical significance between groups was determined using paired nonparametric Wilcoxon test. The *P* values in bold indicate statistically significant ($P < 0.05$) values. SEM, standard error of the means.

Cytokine	Preoperative tear	Aqueous humour	*P* value
bFGF	725.48 ± 114.51	75.86 ± 26.13	**0.0001**
Eotaxin	388.04 ± 71.72[a]	5.95 ± 1.99[a]	**0.0001**
G-CSF	774.46 ± 131.24[a]	25.58 ± 20.46	**0.0001**
GM-CSF	358.06 ± 73.92	174.49 ± 49.2[a]	**0.0008**
IFN-g	3762.96 ± 680.68	6.75 ± 4.84	**0.0001**
IL-10	497.45 ± 116.38	5.96 ± 4.7[a]	**0.0004**
IL-12	450.22 ± 72.97[a]	16.98 ± 4.63	**0.0003**
IL-13	293.49 ± 52.67	4.90 ± 1.93	**0.0001**
IL-15	211.71 ± 43.68[a]	26.80 ± 5.69	**0.0001**
IL-17	1670.93 ± 352.26	47.26 ± 20.82	**0.0001**
IL-1b	64.18 ± 13.65[a]	0.23 ± 0.15[a]	**0.0001**
IL-1ra	3236.83 ± 824.22	1113.62 ± 504.18	**0.0031**
IL-2	12.77 ± 7.47	6.58 ± 3.18	0.4380
IL-4	63.94 ± 9.91[a]	0.72 ± 0.36	**0.0001**
IL-5	553.52 ± 102.4	4.82 ± 2.36	**0.0001**
IL-6	94.64 ± 17.75	43.77 ± 31.11[a]	**0.0038**
IL-7	686.74 ± 109.95[a]	9.85 ± 7.47	**0.0001**
IL-8	315.37 ± 55.32[a]	2.74 ± 2.33[a]	**0.0002**
IL-9	210.35 ± 57.31[a]	2.13 ± 1.67[a]	**0.0004**
IP-10	7816.74 ± 2268.70	383.96 ± 157.47[a]	**0.0001**
MCP-1	1004.36 ± 179.03	365.66 ± 82.18[a]	**0.0004**
MIP-1a	67.12 ± 11.05[a]	1.05 ± 0.39[a]	**0.0001**
MIP-1b	45.41 ± 13.08	9.98 ± 3.95	**0.0007**
PDGF-BB	707.12 ± 173.6	22.71 ± 14.34	**0.0001**
RANTES	210.20 ± 35.7	34.91 ± 22.33	**0.0001**
TNF-a	1466.11 ± 265.38	13.49 ± 6.78	**0.0001**
VEGF	805.66 ± 200.44	130.83 ± 37.16[a]	**0.0001**

[a]Indicate values which are in the same range with data obtained by other studies.

samples were expelled from the capillaries to 0.2-mL PCR tubes and processed in an identical way as tears. Protein concentration of tear and aqueous humour samples was determined using the Bradford method [44].

Multiplex analysis of cytokines in tear and aqueous humour samples

The concentration of the interleukins IL-1β, IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxin, basic fibroblast growth factor (bFGF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)-γ, interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), macrophage inflammatory proteins MIP1α and MIP1β, platelet-derived growth factor (PDGF-BB), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), tumour necrosis factor α (TNFα) and vascular endothelial growth factor (VEGF) was analysed using a multiplex immunobead system based on xMAP technology (Luminex, Austin, TX, USA). The 27-plex Bio-Plex kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was utilized strictly adhering to the manufacturer's instructions. The tear and aqueous humour samples were diluted. Based on previous experiments, 1 : 25 dilution was applied for tears and 1 : 2 dilution for AH samples, where the amount of the AH was sufficient. In cases where the amount of the AH collected was not enough, the dilutions indicated in Table S1 were used. Two technical replicates were used in each case; however, in case of G041 and G107 the tear sample amount was enough only for one replicate (samples marked with # in Table S2).

Fluorescence intensity data were recorded and analysed using the BIO-PLEX MANAGER software (version 4.1.1.; Bio-Rad Laboratories). Concentrations of the 27 cytokines and chemokines were calculated based on the recorded calibration curve and the dilution factor used. For curve fitting, logistic regression was applied.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 25.0 (IBM, Armonk, NY, USA) for Windows. Nonparametric Mann–Whitney U-test was used to compare the protein concentrations among groups. For the comparison of tear and aqueous humour samples originating from the same patient, paired nonparametric Wilcoxon test was used. All data with $p<0.05$ are defined as significantly different.

Conclusion

In our study, we compared the levels of 27 cytokines in tear and AH originating from patients with glaucoma who underwent trabeculectomy. Our findings are largely in agreement with the data in the scientific literature; however, in the case of some cytokines differences were detected. According to our data, tear and AH are not identical from the inflammatory point of view; significantly higher levels of cytokines were found in tear compared to AH.

The concentrations of three tear proteins, IFN-γ, GM-CSF and IL-5, were associated with the presence of complications. However, more patients have to be recruited to be able to identify/verify these proteins as potential risk factors for the occurrence of flap-related complications following trabeculectomy.

Our data highlight the promising potential of this continuously available, easy-to-collect body fluid for

dynamic testing, making it worth exploring as an alternative to samples collectable by invasive methods.

Acknowledgements

This research was funded by János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences, ÚNKP-18-4-DE-436, and by PD116817 and PD121075 National Research, Development and Innovation Office (NKFI) grants. The technical help of Kamilla Sólyom is greatly acknowledged. We thank Dr. Mohamed Mahdi and Dr. Iván Uray for the English proofreading.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

ÉC and AC conceptualized the study. ÉC and NT curated the data. ÉC and JT acquired funding. ÉC, ED and NT contributed to methodology. ÉC, JT and AC provided resources. ÉC visualized the data. ÉC wrote the original draft of the manuscript. CET, JT and AC reviewed and edited the manuscript.

References

1 Kingman S (2004) Glaucoma is second leading cause of blindness globally. *Bull World Health Organ* **82**, 887–888.
2 Andersson Geimer S (2013) Glaucoma diagnostics. *Acta Ophthalmol* **91**, 390–391.
3 Križaj D, Ryskamp DA, Tian N, Tezel G, Mitchell CH, Slepak VZ *et al*. (2014) From mechanosensitivity to inflammatory responses: new players in the pathology of glaucoma. *Curr Eye Res* **39**, 105–119.
4 Chang EE & Goldberg JL (2012) Glaucoma 2.0: Neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement. *Ophthalmology* **119**, 979–986.
5 Tham Y-C, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T and Cheng C-Y (2014) Global Prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* **121**, 2081–2090.
6 Bollinger KE, Crabb JS, Yuan X, Putliwala T, Clark AF and Crabb JW (2011) Quantitative proteomics: $TGF\beta_2$ signaling in trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 8287–8294.
7 Crabb JW, Yuan X, Dvoriantchikova G, Ivanov D, Crabb JS and Shestopalov VI (2010) Preliminary quantitative proteomic characterization of glaucomatous rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* **91**, 107–110.
8 Bollinger KE, Crabb JS, Yuan X, Putliwala T, Clark AF and Crabb JW (2012) Proteomic similarities in steroid responsiveness in normal and glaucomatous trabecular meshwork cells. *Mol Vis* **18**, 2001–2011.
9 Funke S, Perumal N, Bell K, Pfeiffer N and Grus FH (2017) The potential impact of recent insights into proteomic changes associated with glaucoma. *Expert Rev Proteomics* **14**, 311–334.
10 Tezel G (2013) A proteomics view of the molecular mechanisms and biomarkers of glaucomatous neurodegeneration. *Prog Retin Eye Res* **35**, 18–43.
11 Hagan S, Martin E, Enríquez-de-Salamanca A, Aass C, Norheim I, Eriksen E *et al*. (2016) Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J* **7**, 15.
12 Pieragostino D, Agnifili L, Fasanella V, D'Aguanno S, Mastropasqua R, Di Ilio C *et al*. (2013) Shotgun proteomics reveals specific modulated protein patterns in tears of patients with primary open angle glaucoma naïve to therapy. *Mol BioSyst* **9**, 1108–1116.
13 Yang X, Hondur G, Li M, Cai J, Klein JB, Kuehn MH *et al*. (2015) Proteomics analysis of molecular risk factors in the ocular hypertensive human retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci* **56**, 5816–5830.
14 Höhn R, Mirshahi A, Nickels S, Schulz A, Wild PS, Blettner M *et al*. (2017) Cardiovascular medication and intraocular pressure: results from the Gutenberg Health Study. *Br J Ophthalmol* **101**, 1633–1637.
15 Csosz É, Kalló G, Jakob BM, Deák E, Csutak A and Tozsér J (2016) Quantitative body fluid proteomics in medicine – a focus on minimal invasiveness. *J Proteomics* **153**, 30–43.
16 Kaeslin MA, Killer HE, Fuhrer CA, Zeleny N, Huber AR and Neutzner A (2016) Changes to the aqueous humor proteome during glaucoma. *PLoS One* **11**, 1–15.
17 Takai Y, Tanito M and Ohira A (2012) Multiplex cytokine analysis of aqueous humor in eyes with primary open-angle glaucoma, exfoliation glaucoma, and cataract. *Investig Ophthalmol Vis Sci* **53**, 241–247.
18 Khalef N, Labib H, Helmy H, Abd M, Hamid E, Moemen L *et al*. (2017) Levels of cytokine in the aqueous humor of eyes with primary open angle glaucoma, pseudoexfoliation glaucoma and cataract. *Elect Phys* **9**, 3833–3837.
19 Ohira S, Inoue T, Iwao K, Takahashi E and Tanihara H (2016) Factors influencing aqueous proinflammatory cytokines and growth factors in uveitic glaucoma. *PLoS One* **11**, 1–13.
20 Shaolin D *et al*. (2016) Multiplex cytokine levels of aqueous humor in acute primary angle-closure patients: fellow eye comparison. *BMC Ophthalmol* **16**, 1–8.
21 Gu R, Zhou M, Jiang C, Yu J and Xu G (2016) Elevated concentration of cytokines in aqueous in post-vitrectomy eyes. *Clin Exp Ophthalmol* **44**, 128–134.

22 Pieragostino D, D'Alessandro M, di Ioia M, Di Ilio C, Sacchetta P and Del Boccio P (2015) Unraveling the molecular repertoire of tears as a source of biomarkers: beyond ocular diseases. *Proteomics - Clin Appl*. **9**, 169–186.
23 Malvitte L, Montange T, Vejux A, Baudouin C, Bron AM, Creuzot-Garcher C *et al*. (2007) Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *Br J Ophthalmol* **91**, 29–32.
24 Sharma RK, Rogojina AT and Chalam KV (2009) Multiplex immunoassay analysis of biomarkers in clinically accessible quantities of human aqueous humor. *Mol Vis* **15**, 60–69.
25 Borkenstein A, Faschinger C, Maier R, Weger M, Theisl A, Demel U *et al*. (2013) Measurement of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, Fas ligand, interleukin-1α, and interleukin-1β in the aqueous humor of patients with open angle glaucoma using multiplex bead analysis. *Mol Vis* **19**, 2306–2311.
26 De Jager W, Velthuis H, Prakken BJ, Rijkers GT and Kuis W (2003) Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 133–139.
27 Martinez-de-la-Casa JM, Perez-Bartolome F, Urcelay E, Santiago JL, Moreno-Montañes J, Arriola-Villalobos P *et al*. (2017) Tear cytokine profile of glaucoma patients treated with preservative-free or preserved latanoprost. *Ocul Surf* **15**, 723–729.
28 Mrugacz M, Ostrowska L, Bryl A, Szulc A, Zelazowska-Rutkowska B and Mrugacz G (2017) Pro-inflammatory cytokines associated with clinical severity of dry eye disease of patients with depression. *Adv Med Sci* **62**, 338–344.
29 Gupta D, Wen JC, Huebner JL, Stinnett S, Kraus VB, Tseng HC *et al*. (2017) Cytokine biomarkers in tear film for primary open-angle glaucoma. *Clin Ophthalmol* **11**, 411–416.
30 Zakaria N, Van Grasdorff S, Wouters K, Rozema J, Koppen C, Lion E *et al*. (2012) Human tears reveal insights into corneal neovascularization. *PLoS One* **7**, 1–18.
31 Funke S, Beck S, Lorenz K, Kotterer M, Wolters D, Perumal N *et al*. (2016) Analysis of the effects of preservative-free tafluprost on the tear proteome. *Am J Transl Res* **8**, 4025–4039.
32 Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T and Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**, 163–189.
33 Granstein RD, Flotte TJ and Amento EP (1990) Interferons and collagen production. *J Invest Dermatol* **95**, 75S–80S.
34 Laato M, Heino J, Gerdin B, Kahari VM & Niinikoski J (2001) Interferon-gamma-induced inhibition of wound healing in vivo and in vitro. *Ann Chir Gynaecol* **90** (Suppl. 215), 19–23.
35 Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR *et al*. (2008) The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* **26**, 1047–1055.
36 Lee S, Lee E, Kim S, Jeong P, Cho Y, Yun SJ *et al*. (2012) Identification of pro-inflammatory cytokines associated with muscle invasive bladder cancer ; The Roles of IL-5, IL-20, and IL-28A. *PLoS One* **7**, 1–18.
37 Leitch VD, Strudwick XL, Matthaei KI, Dent LA and Cowin AJ (2009) IL-5-overexpressing mice exhibit eosinophilia and altered wound healing through mechanisms involving prolonged inflammation. *Immunol Cell Biol* **87**, 131–140.
38 Groves RW and Schmidt-Lucke JA (2000) Recombinant human GM-CSF in the treatment of poorly healing wounds. *Adv Skin Wound Care* **13**, 107–112.
39 Seet L-F, Finger SN, Chu SWL, Toh LZ and Wong TT (2013) Novel insight into the inflammatory and cellular responses following experimental glaucoma surgery: a roadmap for inhibiting fibrosis. *Curr Mol Med* **13**, 911–928.
40 Rho CR, Park M and Kang S (2015) Effects of granulocyte-macrophage colony- stimulating (GM-CSF) factor on corneal epithelial cells in corneal wound healing model. *PLoS One* **10**, 1–11.
41 Duvesh R, Puthuran G, Srinivasan K, Rengaraj V, Krishnadas SR, Rajendrababu S *et al*. (2017) Multiplex cytokine analysis of aqueous humor from the patients with chronic primary angle closure glaucoma. *Curr Eye Res* **42**, 1608–1613.
42 Garweg JG, Zandi S, Pfister IB, Skowronska M and Gerhardt C (2017) Comparison of cytokine profiles in the aqueous humor of eyes with pseudoexfoliation syndrome and glaucoma. *PLoS One* **12**, 1–13.
43 Berta A (1983) Collection of tear samples with or without stimulation. *Am J Ophthalmol* **96**, 115–116.
44 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1. Raw data obtained by the multiplex analysis of cytokines and chemokines in preoperative tear and aqueous humour samples from patients with glaucoma.

Table S2. Clinical features and sample characteristics of patients with glaucoma. In case of each patient recruited the type of glaucoma, age, gender, number of preoperatively used drugs, the tear flow rate, collected tear volume and tear protein concentration, the collected AH volume and AH protein concentration and the presence of postoperative complications are presented along with the concentrations of the 27 cytokines and chemokines.

Table S3. Comparison of the concentrations of cytokines and chemokines measured in tears and aqueous humour to data published in the scientific literature.

Table S4. The effect of gender, type of glaucoma and the number of eye drops administrated on the concentration of cytokines and chemokines. The number of cases in each group, the mean rank, the sum of ranks and the p values given by the nonparametric Manny-Whitney U-test are shown in case of each analyte.

dc_1779_20

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Wound-Healing Markers Revealed by Proximity Extension Assay in Tears of Patients following Glaucoma Surgery

Éva Csősz [1,2,*], Noémi Tóth [3], Eszter Deák [1,3], Adrienne Csutak [3,†] and József Tőzsér [1,2,†]

1 Biomarker Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1., 4032 Debrecen, Hungary; deak.eszter@med.unideb.hu (E.D.); tozser@med.unideb.hu (J.T.)
2 Proteomics Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1., 4032 Debrecen, Hungary
3 Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei krt. 98., 4032 Debrecen, Hungary; tothnoemi111@gmail.com (N.T.); acsutak@med.unideb.hu (A.C.)
* Correspondence: cseva@med.unideb.hu; Tel.: +36-52-416-432
† These authors contributed equally to this work.

Received: 15 October 2018; Accepted: 11 December 2018; Published: 18 December 2018

Abstract: Tears are a constantly available and highly valuable body fluid collectable by non-invasive techniques. Although it can give information on ocular status and be used for follow-ups, tear analysis is challenging due to the low amount of sample that is available. Proximity extension assay (PEA) allows for a sensitive and scalable analysis of multiple proteins in a single run from a one-µL sample, so we applied this technique and examined the amount of 184 proteins in tears collected at different time points after trabeculectomy. The success rate of this surgical intervention highly depends on proper wound healing; therefore, information on the process is indispensable. We observed significantly higher levels of IL-6 and MMP1 at the early time points (day one, two, and four) following trabeculectomy, and the protein amounts went back to the level observed before the surgery three months after the intervention. Patients with or without complications were tested, and proteins that have roles in the immune response and wound healing could be observed with altered frequency and amounts in the cases of patients with complications. Our results highlight the importance of inflammation in wound-healing complications, and at the same time, indicate the utility of PEA in tear analysis.

Keywords: proximity extension assay; tear; glaucoma; wound healing; inflammation

1. Introduction

Glaucoma is a multifactorial neurodegenerative eye disease that affects millions of people and is a leading cause of blindness worldwide [1]. In glaucoma, the neuropathy of the optic nerve and the progressive and irreversible loss of retinal ganglion cells can be observed, resulting in the atrophy of the optic nerve and the loss of visual functions, leading to blindness [2,3]. The most important form of treatment is the reduction of the increased intraocular pressure (IOP), which can delay the glaucoma progression and prevent visual field loss. Most of the patients are initially treated and well controlled with topical medication (eye drops), but surgery becomes necessary when the desired IOP cannot be reached. Some minimal invasive microsurgery procedures are available, but the most widely used gold standard surgical intervention in open angle glaucoma is still filtration surgery. The latter involves trabeculectomy, which is an invasive procedure associated with a relatively high complication and failure rate [4,5]. During trabeculectomy, a part of the trabecular meshwork is removed, and a channel

dc_1779_20

is created between the anterior chamber and the subconjunctival space, leading to controlled leaking of the aqueous humor, and thus the lowering of the IOP. One of the key features of the success of trabeculectomy is the wound healing, which might be impaired, making the postoperative IOP control impossible [4].

Wound healing is a well-organized cascade of closely linked processes starting with a coagulative and inflammatory phase, followed by the proliferative and repair phase, and ending with the remodeling phase [6]. Ocular wound healing differs from that observed in case of skin [7]; right after the injury in the first few hours in the epithelial cell layer, the phases of latency, migration, and proliferation occur with the proliferation phase peaking around 24 hours after the injury [8,9]. The ATP released from the injured cells and the damage-associated molecular patterns made available by the injury increase the apoptosis and toll-like receptor signaling, which leads to the production of pro-inflammatory cytokines such as interleukins IL-1α and β, IL-6, and tumor necrosis factor α (TNFα) [10,11]. The release of matrix metalloproteinases (MMPs) triggers the extracellular matrix rearrangements, making possible fibronectin polymerization, the remodeling of cellular junctions, the formation of focal contacts at wound margins, and the migration of cells to cover the wound [8,12]. These steps are followed by cell proliferation, the formation of a basement membrane, and the restoration of barrier functions orchestrated by keratinocyte growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factors (PDGF), neural growth factor (NGF), transforming growth factors (TGF), and cytokines (mainly IL-1, IL-6, and IL-8, as reviewed by [8,11,13]). At the same time, keratocyte apoptosis in the stroma is followed by the recruitment of immune cells and keratocyte transformation to fibroblasts and myofibroblasts [14–16]. The transformed and the newly formed cells migrate to the site of injury to fill up and close the wound. Less information is available regarding the endothelial cells in which the migration of the endothelial cells to fill up the gap, and the secretion of basement membrane was observed to happen in an approximately six hours to time interval of several days [8,12].

The phases of ocular wound healing are regulated by the tightly controlled appearance of cytokines and chemokines released during injury. These molecules in turn lead to the appearance of other cytokines and growth factors, making possible the coordination of molecular events that is characteristic to the latency, migration, and proliferation phases both in the epithelial and stromal layers. Epithelial cells express interleukins (IL), tumor necrosis factor (TNF) α, and growth factors under normal conditions, and they are activated/released during the injury [11]. Growth factors and cytokines from tears that are released upon the injury, which in turn increase the production of other cytokines and growth factors [9,17]. EGF and PDGF are released during the injury, and the amounts of KGF and HGF also are increased [13,17]. Meanwhile, the controlled activation of MMPs makes the large extracellular matrix rearrangements that are required for cell migration and wound closure possible. The wound-healing process ends with a slow and long remodeling phase that lasts for up to a year and ends up, under normal conditions, with the scarless healing that is necessary for proper vision [8,12,18].

Each step of the process can be affected, leading to complications and ineffective surgical intervention. Reepithelization typically occurs mainly three to five days after surgery [12], but complications appear later (weeks or months) after surgery [19,20], highlighting the importance of the early events of wound healing.

In order to get more information on the ocular wound-healing process following trabeculectomy, we decided to use tears, the accessible body fluid that can be collected in tiny amounts by non-invasive techniques. To examine multiple proteins in the same sample, methods permitting multiplexing are required. Such methods can be based on mass spectrometry, immunological detection, or a combination of different methods. Immunological detection in most of the settings is more sensitive compared to mass spectrometry, but the dynamic range of the mass spectrometry usually overcomes that which is achievable by the immunological methods [21], and moreover, it is the only unbiased method. At the same time, it is difficult to work reliably in many cases with many different biological materials by

dc_1779_20

mass spectrometry. A novel approach with exceptional specificity and scalability is the combination of antibody-based detection with the well-defined methods that are used during quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The proximity extension assay (PEA) uses two polyclonal antibodies raised against the protein of interest and linked to complementary oligonucleotides. When the two antibodies bind the protein of interest, oligonucleotides hybridize. After hybridization, DNA polymerase is added, and qPCR is carried out, permitting the quantification of the protein-specific oligonucleotide sequences. The results are given as normalized expression units (NPX) and can provide the relative quantification of proteins [22]. This method, by combining two, individually powerful analysis techniques, makes relative quantification of multiple proteins possible in very low sample amounts, providing an effective tool for the analysis of body fluids available in low volumes [23–26].

During this work, our aim was to apply the PEA method on tear analysis to get more information on the amounts of proteins that have roles in the different phases of the ocular wound-healing process, with highlights on complications following trabeculectomy.

2. Results and Discussion

The tightly regulated process of ocular wound healing makes the scarless healing of tissue injuries possible, and involves a multitude of molecules playing role in the regulation of the biochemical events of the wound-healing steps. In order to examine the relative amount of multiple tear molecules, giving information on a novel method for ocular wound healing, PEA was applied for the analysis of tear proteins. This method permits the analysis of up to 92 proteins per panel using only one μL of body fluid, which can be extremely beneficial in the case of body fluids that are collectable in low volume such as tears, where the typical amount collected is 5–10 μL [27].

2.1. Tear Sample Analysis by PEA

Tear samples were analyzed by PEA at Olink Proteomics (Uppsala, Sweden) using the cardiovascular (CVD) II and the inflammation panels. Each panel included 92 proteins and four internal controls, providing information about 184 proteins altogether (Table S1). Due to technical issues identified with the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) assay, the BDNF protein could not be analyzed. According to our data, 11 out of the analyzed 184 proteins do not appear in tears. These proteins are fibroblast growth factor 5, interferon gamma, interleukins IL2, IL20, and IL24, interleukin receptors IL2RB, IL15RA, and IL22RA1, signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) family member 1, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), and tumor necrosis factor. Internal controls were added to each sample to monitor the quality of assay performance and the quality of individual samples. Quality control (QC) was performed in two steps: i) each sample plate was evaluated based on the standard deviation (SD) of the internal controls, and only data from the sample plate that pass quality control (SD < 0.2 NPX) were reported, and ii) the quality of each sample was assessed by evaluating the deviation from the median value of the controls for each individual sample. Samples that deviate less than 0.3 NPX from the median pass the quality control. In the CVD II and inflammation panels, 55 out of 60 and 57 out of 60 samples passed the QC, respectively (Table S2). Most proteins of the could be measured with <5% coefficient of variation (CV) with a typical intraassay CV of 4% (Figure 1).

In the case of the CVD II panel, 60% of the proteins (55 out of 92) could be detected in more than 75% of the samples, while in case of the inflammation panel, this value was 45% (41 proteins out of 92) (Table S2). Compared to the more than 90% detectability for proteins included in the CVD II panel and >75% for proteins included in the inflammation panel observed in plasma, the values obtained for tear analysis are lower, but it should be mentioned that the protein composition of tears was substantially different from that of plasma [28]. At the same time, NPX values may differ depending on the sample preparation methods, sample matrices, or the pathological conditions that are present. However, based on our data, both the CVD II and inflammation panels that are used primarily for plasma protein analysis work well in case of tears, and they provide easy-to-use tools for the multiplex

dc_1779_20

analysis of proteins from small amounts of samples. This is of extremely high importance, because the amount of basal tear that is available is usually low, in some cases hindering the administration of replicates in very sensitive mass spectrometry analyses. Reflex tear can be collected in higher amounts, but its quality is significantly different compared to basal tear [29]. Considering the qualitative and quantitative differences between the basal and reflex tear, arguments against pooling for tear analysis, and that the method does not require technical replicates due to the application of proper controls, PEA can be considered a method of choice for the analysis of individual, basal tear samples.

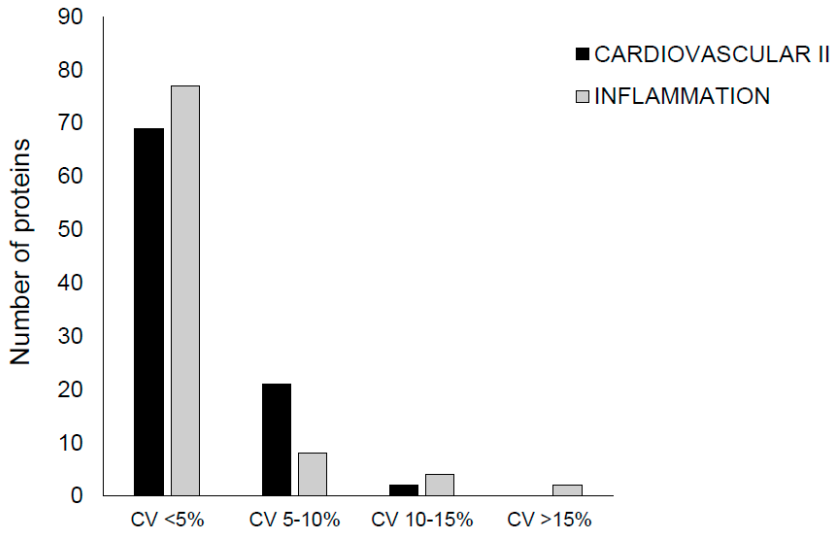


Figure 1. Intraassay %CV distribution. The number of proteins with %CV within defined intervals is indicated in case of Cardiovascular II and Inflammation panels.

2.2. Examination of Protein-Level Changes after Trabeculectomy

To interrogate the role that selected tear proteins have in wound healing, the amount of 184 proteins was analyzed in a follow-up study in tear samples originating from patients who underwent trabeculectomy. The starting point of the study was day zero, when the samples were collected before the surgical intervention. By examining changes in the level of interleukins, growth factors, extracellular matrix components, and other proteins with possible roles in wound healing in early and later time points (postoperative day one, day two, day four, and three months), our aim was to understand the subtle events related to the different phases of wound healing. After reviewing patient records, we could not find bleb leak, hypotony, hyphema, choroidal effusion, choroidal hemorrhage, blebitis, or endophthalmitis. In the case of three patients, the surgical intervention could not lower the high IOP properly, and the administration of IOP-lowering eye drops was required as indicated in Table S3. This latter group was designated as the "group with complications".

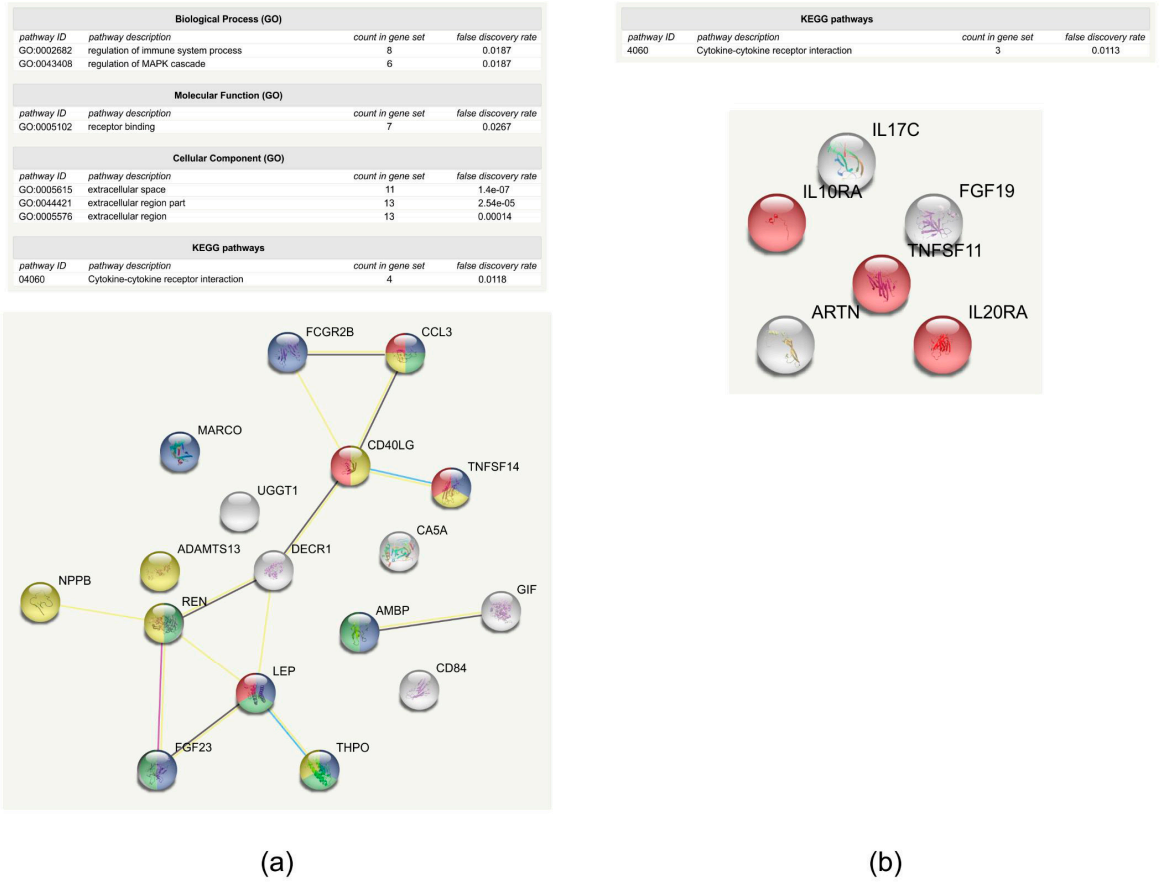
The amount and the frequency of the 184 tested proteins were examined in the groups with and without complications using a step-by-step procedure. First, a qualitative analysis was carried out, followed by quantitative analysis, heat map analysis, hierarchical clustering, and statistical analysis. The proteins with altered frequency or the amount between the groups with and without complications were subjected to functional analysis. First, the network of proteins was created with the help of String (https://string-db.org/) and analyzed, followed by Gene Ontology (GO) enrichment analysis. The String database provides an easy-to-use tool for analyzing protein–protein interaction networks, and gives information on the structure and function of proteins as retrieved from curated databases such as UniProt, PDB, Ensembl, etc. The analysis of the enriched GO functions can also be done; the enriched functions, the false discovery rate, and the number of proteins participating in the specified functions can be listed [30,31].

dc_1779_20

Proteins where there was at least a 20% difference in their frequency between the groups with or without complication (Table 1, Table S4) were introduced into String network analysis (Figure 2). The network of proteins that appear less likely in the samples of patients belonging to group with complications contains 17 proteins. The A disintegrin and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 13 (ADAMTS13), alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (AMBP), chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3), CD40 ligand, CD84 molecule, carbonic anhydrase (CA5A), 2,4-dienoyl CoA reductase 1 (DECR1), IgG Fc fragment low affinity receptor (FCGR2B), fibroblast growth factor 23 (FGF23), gastric intrinsic factor (GIF), leptin (LEP), macrophage receptor with collagenous structure (MARCO), atrial natriuretic factor (BNP/NPPB), renin (REN), thrombopoietin (THPO), tumor necrosis factor superfamily member 14 (TNFSF14), and uridine diphosphate-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1 (UGGT1) appear less likely in the samples originating from patients with complications. The enriched GO functions are related to receptor binding, the regulation of MAPK cascade, and immune regulation (Figure 2a). CD84 has a role in modulating the activation and differentiation of immune cells, the mitochondrial DECR1 and CA5A participate in metabolism, and the gastric intrinsic factor has a role in cyanocobalamin absorption. According to functional analysis, UGGT1 has a role in the quality control of protein folding. It recognizes glycoproteins with minor folding defects, reglucosylates them, and facilitates their recycling to the endoplasmic reticulum [32]. Eleven of these proteins were already found to be related to wound healing (Table 1). It was shown that leptin and NPPB promote wound healing in the skin [33–35], and FGFs facilitate cell migration and regeneration during wound healing [36]. In case of renin, data are not clear; the renin-angiotensin system is implicated in wound healing but, depending on the conditions, it drives the system either to pro-inflammatory, pro-proliferative, and pro-fibrotic, or anti-inflammatory, anti-proliferative, and anti-fibrotic directions [37]. In the case of the CD40 ligand, TNFSF14, CCL3, and ADAMTS13, it was shown that their lack or decreased level leads to impaired wound healing. The lack of CD40L is related to increased collagen deposition, while the lack of ADAMTS13 increases the extravasation of neutrophils in the early phase of wound healing [38,39]. Platelet hyperactivity, impaired wound healing, and the accumulation of immune cells along with high cytokine levels were observed upon the lack of TNFSF14 [40,41], and reduced levels of CCL3 were observed in impaired wound healing [42]. THPO has a role in platelet synthesis, but it was observed that treatment with the THPO receptor agonist slightly delayed the healing rate in wounded mice [43]. Bikunin or inter-alpha trypsin inhibitor is related to impaired wound healing; more pathological-appearing cells were observed after naphthalene injury in inter-alpha trypsin inhibitor-deficient mice significantly [44]. There are no data regarding the CA5A, but it was shown that the carbonic anhydrase is expressed in skin during wound healing, and its reduced levels were observed in keloid scars [45]. At this point, we cannot properly address why the reduced occurrence of leptin, NPPB, and FGF23 was observed in the samples originating from the group with complications, but the reduced frequency of the other eight proteins already related to wound healing can be explained; their reduced level was linked to wound-healing problems, as it is the case in the group with complications. It also should be noted that data regarding the link between the examined proteins and wound healing are mainly from studies on skin or airways, and conditions in the eye may differ from those observed in other parts of the body. IL17C, IL10RA, IL20RA, FGF19, artemin (ARTN), and TNFSF11 were found to appear more frequently in the samples of patients with complications (Table 1). String analysis shows that these proteins do not interact with each other, and the only enriched pathway was cytokine-binding (Figure 2b). It was already observed by different groups that IL17C plays an important role in the innate immunity of the epithelium by stimulating the production of antibacterial and immunomodulatory peptides through the NF-kappa-B and MAPK pathways [46], and the overexpression of IL17C is associated with psoriasiform skin [47]. IL20 and its receptor IL20RA promote the epithelial wound healing in mouse cornea [48], IL10RA promotes the survival of myeloid cells [49], and TNFSF11, as a ligand for NF-kappa-B, promotes cell proliferation [50]. Artemin was shown to enhance the migrating capability in wound healing, and many members of the FGF family are applied as drugs helping the wound healing [51,52]. The increased frequency of proteins having

dc_1779_20

roles in cell migration, cell proliferation, and enhancing wound healing in patients with complications might give an explanation of the presence of complication being possibly related to the early closure of the channel generated during trabeculectomy.



Biological Process (GO)

pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0002682	regulation of immune system process	8	0.0187
GO:0043408	regulation of MAPK cascade	6	0.0187

Molecular Function (GO)

pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005102	receptor binding	7	0.0267

Cellular Component (GO)

pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005615	extracellular space	11	1.4e-07
GO:0044421	extracellular region part	13	2.54e-05
GO:0005576	extracellular region	13	0.00014

KEGG pathways

pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	4	0.0118

KEGG pathways

pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
4060	Cytokine-cytokine receptor interaction	3	0.0113

(a) (b)

Figure 2. Proteins present with different frequency in the groups. (**a**) Proteins that are less likely to be present in samples belonging to a group with complications; (**b**) proteins that are more likely to be present in samples belonging to a group with complications. In both cases, the upper part of the figure shows the enrichment table generated by String. In the enrichment table, the name and GO code of the enriched pathway, the number of proteins belonging to the pathway, and the false discovery rate are indicated. The lower part of the figures show the network generated by String, with each ball representing a protein, and lines representing protein–protein interactions. Proteins colored with red participate in cytokine–cytokine receptor interaction, the blue color represents the proteins that are responsible for the regulation of immune system processes, and proteins colored with green participate in the regulation of the MAPK cascade, while the ones colored with yellow are responsible for receptor binding. Proteins are represented by their gene name.

dc_1779_20

Table 1. List of proteins with altered abundance in the group with complications. The percent of samples expressing the indicated protein in the group with and without complications is listed in the case of each protein where the difference was more than 20% between the two groups. The direction of change in the group with complication is indicated along with biological function and the role in wound healing in the case of each protein. * indicates the enriched Gene Ontology (GO) function calculated by String, and # indicates function as listed in String. ADAMST13: A disintegrin and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 13, AMBP: alpha-1-microglobulin/bikunin precursor, CD40L: CD40 ligand, DECR1: 2,4-dienoyl CoA reductase 1, FCGR2B: IgG Fc fragment low affinity receptor, GIF: gastric intrinsic factor, LEP: leptin, MARCO: macrophage receptor with collagenous structure, NPPB: atrial natriuretic factor, REN: renin, THPO: thrombopoietin, TNSF14: tumor necrosis factor superfamily member 14.

Protein Code According to String	Protein Code According to Olink	% of Samples in Group with No Complications	% of Samples in Group with Complications	Change of Protein Abundance	Biological Function	Role in Wound Healing
CD40LG	CD40-L	74	45	decrease	cytokine–cytokine receptor interaction, receptor binding *	lack of CD40L leads to excessive collagen deposition
ADAMTS13	ADAM-TS13	68	45	decrease	receptor binding *	lack of ADAMTS13 increases the extravasation of neutrophils
GIF	GIF	68	45	decrease	cyanocobalamin absorption #	not identified yet
FGF23	FGF-23	89	55	decrease	regulation of immune system process, regulation of MAPK cascade *	not FGF23 but other FGFs facilitate wound healing
CD84	CD84	74	27	decrease	modulation of the activation and differentiation of immune cells, regulation and interconnection of innate and adaptive immune response #	not identified yet
REN	REN	84	55	decrease	regulation of MAPK cascade, receptor binding *	depending on the conditions activates or inhibits wound healing
DECR1	DECR1	95	73	decrease	Metabolism #	not identified yet
AMBP	AMBP	84	64	decrease	regulation of immune system process, regulation of MAPK cascade *	AMBP deficiency is related to significantly more pathological-appearing cells in airway injury
FCGR2B	IgG Fc receptor II-b	47	18	decrease	regulation of immune system process *	not identified yet
THPO	THPO	42	0	decrease	regulation of immune system process, regulation of MAPK cascade, receptor binding *	THPO receptor agonist causes slight delay in wound healing
MARCO	MARCO	42	9	decrease	regulation of immune system process *	not identified yet
UGGT1	GT	26	0	decrease	protein folding quality control #	not identified yet

Table 1. *Cont.*

Protein Code According to String	Protein Code According to Olink	% of Samples in Group with No Complications	% of Samples in Group with Complications	Change of Protein Abundance	Biological Function	Role in Wound Healing
NPPB	BNP	47	18	decrease	receptor binding *	promotes wound healing
LEP	LEP	79	36	decrease	regulation of immune system process, regulation of MAPK cascade, cytokine–cytokine receptor interaction *	promotes wound healing
CA5A	CA5A	32	0	decrease	Metabolism #	lower levels of carbonic anhydrase were detected in keloid scars
TNFSF14	TNFSF14	100	73	decrease	regulation of immune system process, cytokine–cytokine receptor interaction, receptor binding *	lack of TNFSF14 helps the accumulation of immune cells, increases cytokine levels, impairs wound healing
CCL3	CCL3	89	64	decrease	regulation of immune system process, regulation of mitogen-activated protein kinase cascade, cytokine–cytokine receptor interaction, receptor binding *	helps macrophage recruitment; decreased CCL3 levels were observed in impaired wound healing
IL17C	IL-17C	37	64	increase	cytokine–cytokine receptor interaction #	overexpression is observed in psoriasis
IL20RA	IL-20RA	53	82	increase	cytokine–cytokine receptor interaction *	promotes corneal epithelial healing
IL10RA	IL-10RA	5	36	increase	cytokine–cytokine receptor interaction *	promotes survival of myeloid cells
TNFSF11	TRANCE	16	36	increase	cytokine–cytokine receptor interaction*, cell proliferation #	not identified yet
ARTN	ARTN	47	91	increase	neurotrophic factor, ligand for the RET receptor #	facilitates wound healing
FGF19	FGF-19	37	64	increase	regulation of bile acid synthesis #	not FGF19 but other FGFs facilitate wound healing

dc_1779_20

In order to have a more in-depth analysis, the qualitative examination was followed by quantitative analysis. The 184 proteins were examined, and 46 of the proteins could be detected in less than 30% of the samples (Table S2), so these proteins were excluded from further statistical analyses. The changes in the relative amount of the proteins were visualized on a heat map (Figure 3a). Hierarchical clustering of the data revealed that, based on these protein signatures, the group with complications cannot be unanimously differentiated from the group without complications. However, higher protein amounts could be observed in case of 14 proteins in the samples belonging to the group with complications (Figure 3b). Functional analysis of these proteins shows an enrichment of proteins belonging to immune response GO (GO:0006955) function. Caspase 8 has a role in apoptosis, protein S100A12, TNF superfamily member 14, monocyte chemotactic protein 3 (MCP-3/CCL7), chemokine (C-C motif) ligand 23 (CCL23), and NF-kappa-B essential modulator (NEMO/IKKBG) have pro-inflammatory functions, while the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8 (CEACAM8) and spondin 2 have a role in cell adhesion. The osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor (OSCAR) participates in osteoclast differentiation, but also functions in neutrophil degranulation, and can activate TNF-α release from inflammatory monocytes [53]. Superoxide dismutase (SOD2) and glyoxalase 1 (GLO1) may have protective roles preventing the accumulation of free radicals and advanced glycation end products (AGEs), and their reduced activity or expression was found to be associated with delayed wound healing [54–57]. In a corneal wound healing model, the expression of poly-ADP ribose polymerase-1 (PARP-1) was shown to be upregulated by fibronectin, while PARP-1 activation in skin was associated with delayed wound healing [58,59]. The increased amount of PARP-1, osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor, SOD2, and GLO1 may indicate the presence of additional stress factors in the group where complications are present. The signal transducing adapter molecule (STAM)-binding protein initiates cell growth and cell proliferation, while the eukaryotic initiation factor EIF4EBP1 has a role in the regulation of translation; both are needed for the increased cell proliferation that is required for wound closure [60]. The increased amounts of molecules whose decrease was associated with the delayed wound healing (SOD2, GLO1, PARP-1) and of those molecules that have a role in proliferation (STAM-binding protein, EIF4EBP1) might reflect premature wound healing, leading to the ineffective trabeculectomy that is characteristic in the group with complications.

Proteins are represented by their abbreviations as follows: 4E-BP1 = EIF4EBP1: eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, CASP8: caspase 8, CCL3: chemokine (C-C motif) ligand 3, CCL23: chemokine (C-C motif) ligand 23, CEACAM8: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, EN-RAGE = S100A12: S100 calcium binding protein A12, IL8: interleukin 8, IL18: interleukin 18, GLO1: glyoxalase 1, MCP-1 = CCL2: chemokine (C-C motif) ligand 2, MCP-3 = CCL7: chemokine (C-C motif) ligand 7, MMP12: macrophage metalloelastase, NEMO = IKBKG- NF-kappa-B essential modulator, OSCAR: osteoclast associated, immunoglobulin-like receptor, PARP1: poly (ADP-ribose) polymerase 1, PIGR: polymeric immunoglobulin receptor, PRELP: proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein, SOD2: superoxide dismutase 2, SPON2: spondin 2, STAMBP: STAM binding protein, TNFSF14: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14, TNFRSF10A: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a, TNSFRSF11A: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a. Note that the presence of different abbreviations for the same protein on panel b and c (4E-BP1—EIF4EBP1, EN-RAGE—S100A12, NEMO—IKBKG, MCP-3—CCL7, MCP-1—CCL2) are due to the utilization of different protein databases by the different software tools.

According to a non-parametric Mann–Whitney U-test, nine proteins showed statistically significant differences between the two groups (Table S4). All of the proteins except for the polymeric immunoglobulin receptor (PIGR) showed an increase in the amount in samples belonging to the group with complications. The network analysis revealed a network with few connections, and the enriched pathways were related to immune response (Figure 3c). MMP12 could not be visualized in the network, because the String database did not contain this protein at the time of analysis. IL8, IL18, MCP-1, CCL3, and the TNF receptor superfamily members 10A and 11A participate in cytokine–cytokine

dc_1779_20

receptor interaction, while PIGR has a role in IgA and IgM binding, and the proline/arginine-rich and leucine-rich repeat protein has a role in extracellular matrix assembly [61]. MMP12 was found to be responsible for ocular wound healing, promoting the early repair process of the corneal epithelium by enhancing epithelial cell migration and neutrophil infiltration [62]. As it was expected, the results of both the qualitative and quantitative analyses show that proteins that have a role in the immune response and wound healing were changed in case of patients with complications. In order to get more information on the events regulating the wound healing and be able to monitor the effect of the time and/or complication on the relative protein levels, a rigorous in-depth statistical analysis using a linear mixed model was performed.

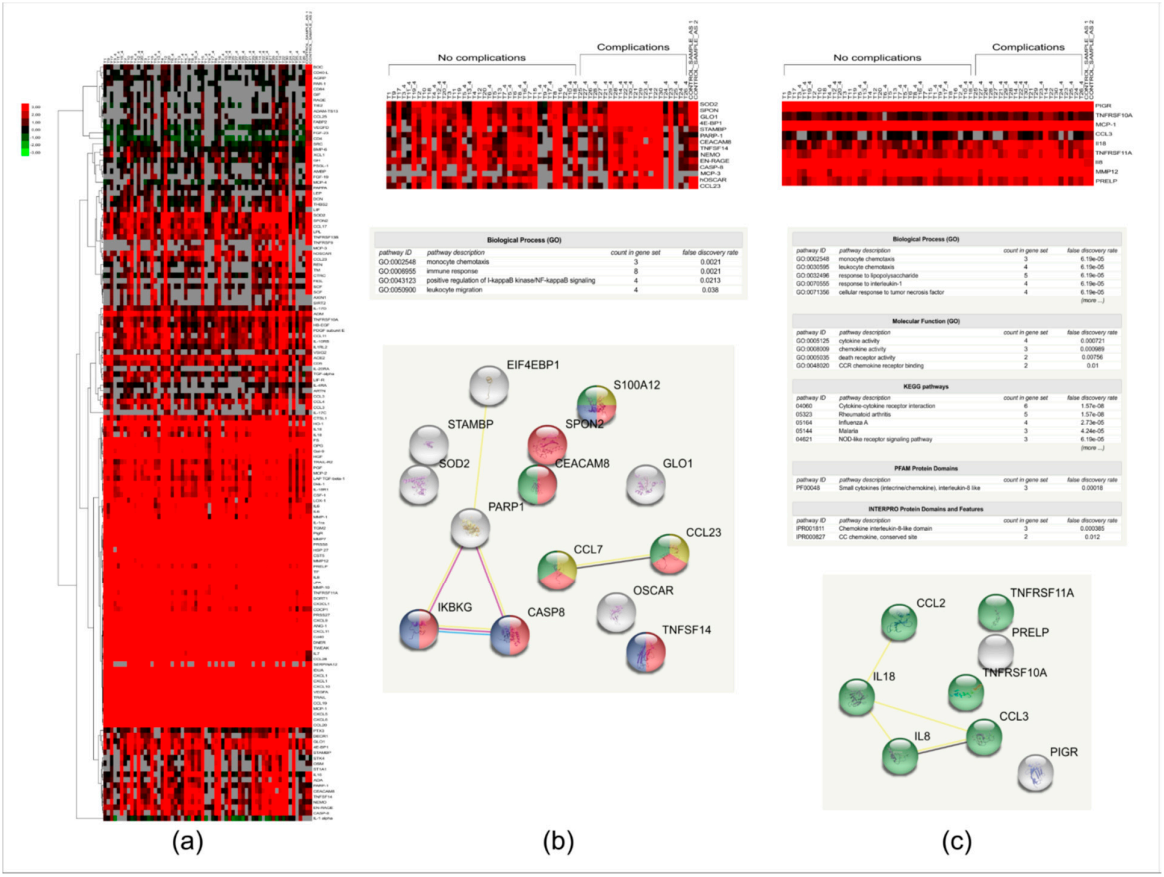


Figure 3. Cluster analysis and heat map of proteins analyzed in tears of patients with glaucoma who underwent trabeculectomy. (**a**) Relative protein amount (NPX) in case of proteins with higher than 30% detectability characteristic for each sample; (**b**) a magnified image of the heat map for proteins showing a higher expression level in the samples belonging to the group with complications is shown, along with the network and the enriched GO terms and pathways. In the enrichment table, the name and GO code of the enriched pathway, the number of proteins belonging to the pathway, and the false discovery rate are indicated. In the network, each ball represents a protein. Proteins colored with yellow participate in monocyte chemotaxis, while those colored with red have a role in the immune response, proteins with the blue color participate in the regulation of NF-kappa B signaling, and those colored with green have a role in leukocyte migration; (**c**) a magnified image of the heat map for proteins showing significantly altered expression levels in samples belonging to group with complications is shown, along with the network and the enriched GO terms and pathways. In the enrichment table, the name and GO code of the enriched pathway, the number of proteins belonging to the pathway, and the false discovery rate are indicated. Proteins colored with green participate in cytokine–cytokine receptor interaction.

dc_1779_20

Regarding the effect of time, the level of IL6 and MMP-1 changed in a statistically significant way, according to our data. The level of both IL6 and MMP-1 increased in a statistically significant manner on postoperative day one, remained high on days two and four, and went back to the original level three months after the surgical intervention (Figure 4). The changes between day zero and day one, day two, and day four, respectively, were statistically significant, as were the changes between day one, day two, and day four, respectively, and at three months (day 90) as well. The changes between the group with complications and group without complications were not statistically significant.

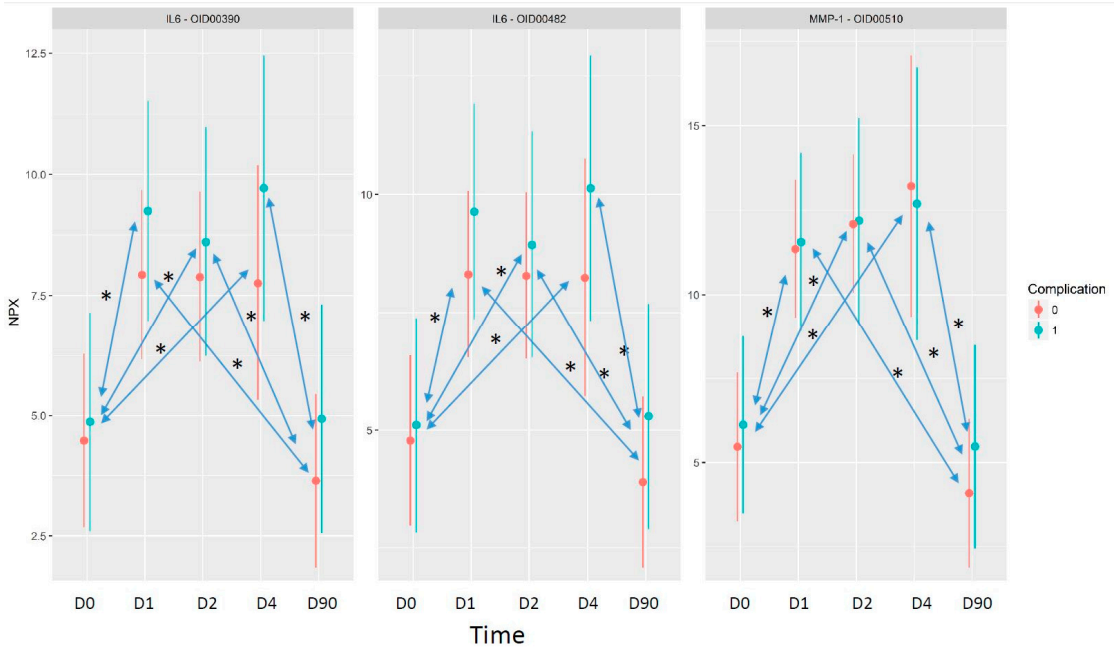


Figure 4. NPX values over the time in the case of proteins with statistically significant differences. The "*x*" axis shows the time points, and the "*y*" axis shows the mean NPX values in the cases of patients with complications (blue color) and without complications (red color) following trabeculectomy. All of the time points were compared to each other; arrows and * indicates statistical significance $p < 0.05$.

IL6 was present in both panels; in this way, it was measured twice, and the very similar behavior of this protein in the two assays provides further evidence for the good replicability of the assays. IL6 has a role in the inflammatory part of wound healing, and is released right after ocular injury [8]. It is known that upregulating the integrin-type fibronectin receptor IL-6 facilitates epithelial cell migration, stimulates the attachment of corneal epithelial cells to collagen type IV and laminin matrices, and may influence the production of fibrotic material by activated keratocytes [63]. The increased level of IL6 observed in tears at postoperative days one, two, and four most probably reflects the higher levels of this cytokine, which is characteristic for the migration and proliferation phases of ocular wound healing (Figure 5). At the same time, the higher level of IL6 that was observed in the tears of patients with complications at all of the postoperative time points supports our previous observation that an increase in the relative amount of proteins participating in immune reaction is detectable in samples originating from patients with complications.

dc_1779_20

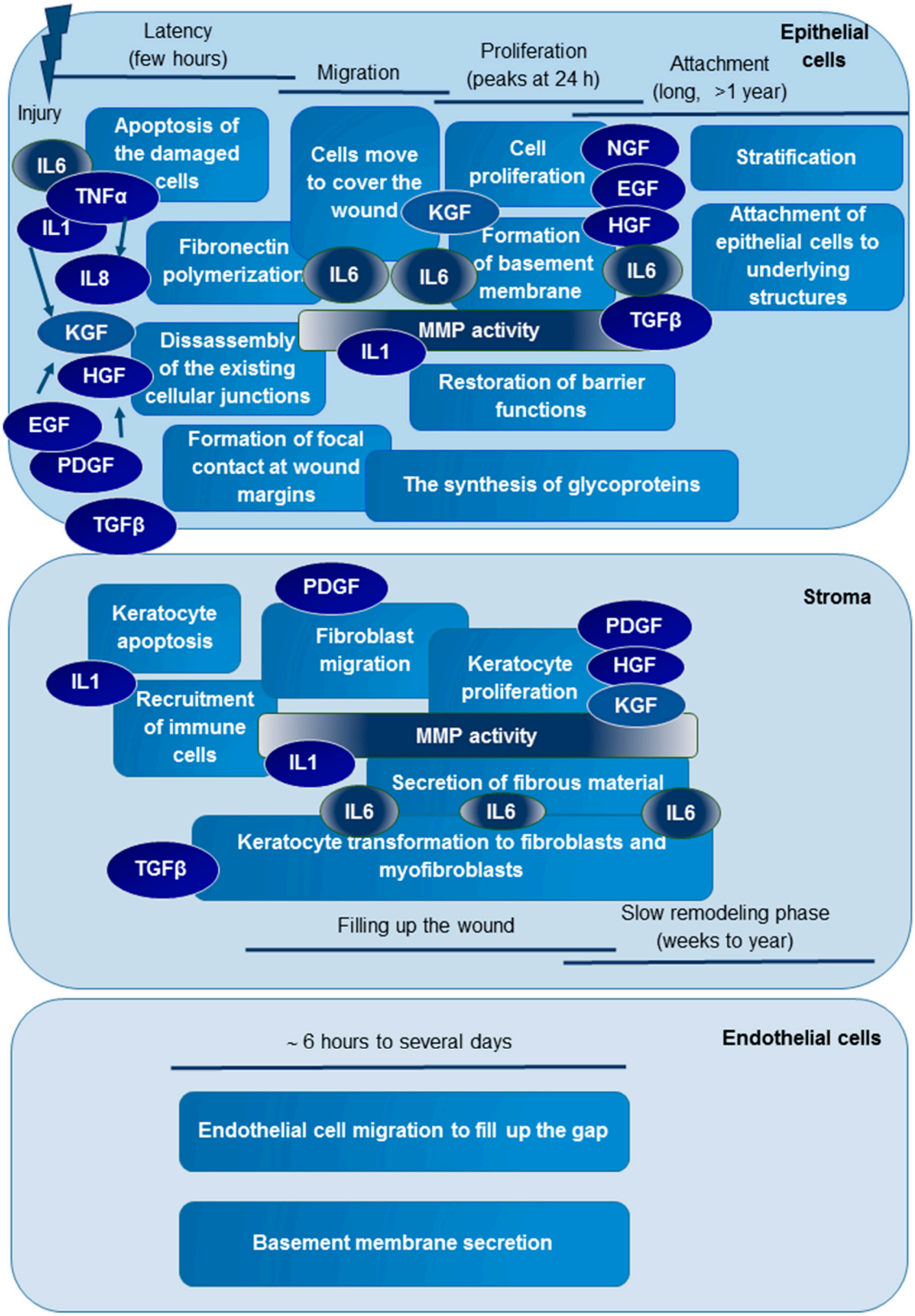


Figure 5. Phases of ocular wound healing. The events that are characteristic for the different phases of ocular wound healing and the regulator molecules are marked with rectangles with ovals, respectively. The dark blue cytokines and growth factors were examined in this study, and those with the black color were found to show statistically significant changes.

dc_1779_20

Following injury in the first few hours in the lag or latency phase, the released cytokines (mainly IL-1, IL-6, TNF-α, and IL-8) orchestrate the early events of epithelial wound healing. The damaged cells are dying mainly by apoptosis, and the recruited immune cells help the debridement and the clearance of apoptotic cells. MMPs are activated by IL-1 and other factors, and an extensive extracellular matrix rearrangement starts. The epidermal (EGF), hepatocyte (HGF), keratocyte (KGF), platelet-derived (PDGF), and nerve (NGF) growth factors that are released upon injury or by the action of cytokines help the wound-healing process. During this phase, some of the existing cellular junctions are removed; there is a fibronectin polymerization to help the cell migration, and focal contacts are formed at the wound margin, preparing the conditions for cell migration. In the migration phase, cells migrate to the site of the wound to cover the wound bed. The migration starts approximately five hours after the injury, and is directed by IL-6, KGF, HGF, and PDGF, which is followed by cell proliferation stimulated by the strong mitogenic effect of growth factors. At the same time, extensive synthetic processes are taking place, and the formation of the basement membrane and restoration of the barrier functions happen.

In the stroma, injury is followed by the keratocyte apoptosis and recruitment of the immune cells. IL-1 and TGFβ released in the epithelial cell layer diffuse to the stroma due to the defects of the basement membrane, and regulate the early events of stromal wound healing. The immune cells and keratocytes transform to fibroblasts and myofibroblasts mainly upon the action of TGFβ, and migrate to the site of the injury to fill up the wound. Meanwhile, the keratocytes and fibroblasts secrete growth factors that help the cell proliferation both in the stroma and the epithelial cell layer. The stromal and the epithelial wound healing ends with a slow and long remodeling phase. During this phase in the epithelial cell layer, the stratification of the cells happens, and the firm adherence of the cells to the underlying structures is reestablished. In the stroma, there is an extensive collagen remodeling, and the myofibroblasts disappear. Regarding the endothelial injury, cell migration is the most important process; the endothelial cells migrate to the site of injury, fill up the gap, and secrete a new basement membrane to restore the barrier functions, if necessary.

MMPs have a role in extensive extracellular matrix (ECM) remodeling, which is required for proper wound healing. They have a prominent role in the migration phase, helping cell migration, the recruitment of immune cells, and the production of new fibrotic material (Figure 5). We could observe the increase of MMP-1 in the early postoperative time points, when the matrix metalloproteinase activity promotes the rearrangement of the extracellular matrix, the disintegration of the cell–ECM junctions, the initiation of cell migration, and a decline in the MMP-1 amount at a later time point.

According to our data, both IL6 and MMP-1 have a role not only in the latency and migration phases of ocular wound healing, but also in the proliferation phase and possibly at the early events of the attachment and slow remodeling phases (Figure 5).

Pathway analysis showed that the relevant pathway involving both IL6 and MMP-1 was the "photodynamic therapy-induced" pathway (Figure 6). According to this pathway, NF-kappa B signaling is activated, which in turn activates among the others the expression of interleukins such as IL6 and of matrix metalloproteinases such as MMP-1. When this pathway is activated in tumor cells, it leads to an inflammation followed by leukocyte migration into the tumor tissue, leading to the apoptosis of the tumor cells [64]. During ocular wound healing, the damaged cells die by apoptosis and necrosis, and the immune cells are recruited to help the tissue regeneration and the clearance of dead cells [8]. The higher activity of this pathway in the first few days (days one, two, and four) after surgery might be responsible for the inflammatory part of the wound-healing process.

Data of the qualitative and quantitative analyses are in line with each other and in accordance with the literature data that indicate a different wound-healing balance in the two groups. In the group with complications, the lower frequency of proteins having a role in the regulation of wound healing and of CA, whose low levels were found in keloid scar formation, was observed. At the same time, higher levels of proteins having a role in immune response, cell proliferation, ECM rearrangements, wound healing, and proteins whose low levels were associated with delayed wound healing (ex. SOD2,

dc_1779_20

GLO1), indicate a more pronounced wound healing compared to the group without complications. Although our data show that the presence and the amount of proteins that have roles in the immune reaction and wound healing are altered in the case of patients with complications, these data have to be considered carefully, since the number of patients recruited into the study was relatively low. New studies with larger number of patients are needed to confirm the increased level of these proteins as possibly responsible for the appearance of complications. Considering that the inflammation is relatively manageable from a therapeutic point of view, these data, if validated on a larger sample size, might help improve the later outcomes of trabeculectomy.

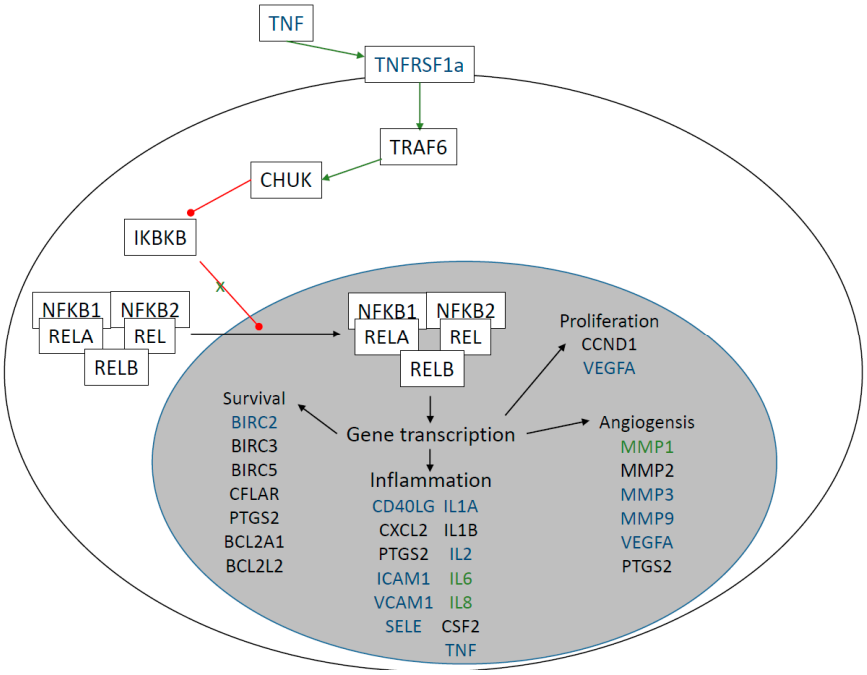


Figure 6. Photodynamic therapy-induced pathway. The proteins highlighted with blue are the proteins that are present in the analyzed panels, while the proteins marked with green indicate those that show statistically significant changes. Green arrows indicate activation, while red arrows indicate inhibition. The pathway was drawn based on Wikipathway WP3617 (www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP3617).

3. Materials and Methods

3.1. Subjects and Tear Sample Collection

The sample collection was done in accordance with the Declaration of Helsinki, and was approved by the Ethical Committee of the University of Debrecen (approval number: 4234-2014, 11/11/2014). Recruited subjects (six females, two males) were patients of the Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, and gave written informed consent for sample collection. All of the patients underwent trabeculectomy surgery to reduce intraocular pressure at the Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of Debrecen. A follow-up study including eight patients was carried out, and tear samples were collected before trabeculectomy (day 0), at day one, day four, and three months after the surgery. One of the patients did not present on the three-month control; as a result, the sample could be collected only at the 10-month time point after the surgery. Exclusion criteria were the presence of autoimmune disease and/or any ocular surface disease other than glaucoma. The non-invasive tear collection was carried out before the trabeculectomy using sterile glass capillary tubes (VWR Ltd., Radnor, PA, USA) for two minutes from the lateral inferior meniscus without local anesthesia or stimulation [65]. Tear samples were centrifuged at 4 °C at 2.4× *g* for 10 min in a benchtop Eppendorf centrifuge; then, the supernatants were aliquoted to five-µL aliquots and

dc_1779_20

deep frozen and stored at −70 °C until analysis. Protein concentration of tear samples was determined using the Bradford method [66]. At the time of tear collection, an ophthalmological examination was also carried out.

3.2. Relative Quantification of 186 Proteins in Tear by Proximity Extension Assay

Proteins of interest were selected based on previous experiments, and the scientific literature was analyzed by the analysis service of Olink Proteomics (Uppsala, Sweden). Four µL of tears in the case of each sample was shipped on dry ice to Olink Proteomics, and one µL of undiluted and 4x diluted tears, respectively, was used for the analyses. The relative protein quantification was performed using PEA-based panels. The proteins of interest could be found in the inflammation panel and CVD panel II, so these two panels were analyzed. Each panel was able to simultaneously analyze 92 selected proteins, as listed in Supplementary Table S1. Using proper internal and external controls, the raw values were normalized for variation between and within runs, and were converted into normalized protein expression units (NPX), which are arbitrary units on log2 scale, allowing for the relative quantification of proteins this way.

3.3. Functional Analysis

The hierarchical clustering of proteins detected in more than 30% of the samples was performed using Gene Cluster 3.0 (http://cluster2.software.informer.com/), and the heat map was created with Java TreeView version 1.1.6r4 [67]. Before clustering, no filtering or adjustment of the data was performed, the distance/similarity measures were based on the Pearson correlation, and the clustering was done by complete linkage analysis. The network of selected proteins was drawn with String 10.5 [30,31] using default settings and medium stringency, and the proteins belonging to the enriched GO functions were highlighted.

Pathway analysis was performed on proteins with statistically significant changes using the Wikipathways (https://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways) search function. The pathways were manually evaluated for their relevance.

3.4. Statistical Analysis

A non-parametric Mann–Whitney U-test was applied to compare the mean NPX values that were characteristic for the two groups. The statistical analysis was performed using SPSS 25.0 (IBM Inc., Armonk, NY, USA). For the examination of the effect of surgery and/or time on the relative protein amounts, a linear mixed model and ANOVA was applied using ImerTest function in R [68]. Sixty samples from eight different patients at four different time points were included in the analyses. Samples that did not pass quality control (QC) as defined by Olink were included in the analysis, since their distribution did not appear to differ from the other samples. Proteins with lower than 30% detectability were removed from the analysis, resulting in 138 out of 184 proteins.

Time point and complications were included as fixed effects, and were considered variables of interest. The subject ID was included as a random effect, estimating and controlling for the base protein expression level in each subject. Due to the low number of patients recruited, the effect of gender was not examined. *p*-Values for the fixed effect were estimated using Satterthwaite's approximation of degrees of freedom, and were corrected for multiple testing using the Benjamini–Hochberg approach [69]. For each significant assay, a post hoc test was performed to estimate the population mean and pairwise differences between groups. Post hoc p-values were calculated using the Tukey method [70].

4. Conclusions

We could observe that proteins having a role in immune response and wound healing appear with altered frequency and/or amounts in the samples originating from patients with complications following glaucoma surgery compared to samples from patients with no complications.

Further verification and the extension of the study with a higher number of recruited patients are required in order to validate our data and possibly identify new diagnostic and therapeutic target proteins. Based on our data, PEA is a method that is suitable for the analysis of tear samples, and can be a method of choice in the examination of basal tear permitting the relative quantification of hundreds of proteins in individual tear samples.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at http://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/4096/s1.

Author Contributions: Conceptualization, E.C. and A.C.; methodology, E.C., and E.D; resources, E.C., A.C. and J.T.; data curation, N.T.; writing—original draft preparation, E.C.; writing—review and editing, A.C. and J.T.; visualization, E.C.; funding acquisition, E.C., J.T.

Funding: This research was funded by János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences and by National Research, Development and Innovation Office (NKFI) PD116817 and PD121075 grants.

Acknowledgments: The technical help of Kamilla Sólyom and Vince Kovács is greatly acknowledged, along with special thanks to the Olink group for their contribution.

Conflicts of Interest: The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Tham, Y.-C.; Li, X.; Wong, T.Y.; Quigley, H.A.; Aung, T.; Cheng, C.-Y. Global Prevalence of Glaucoma and Projections of Glaucoma Burden through 2040: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 2081–2090. [CrossRef] [PubMed]
2. Chang, E.E.; Goldberg, J.L. Glaucoma 2.0: Neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 979–986. [CrossRef] [PubMed]
3. Križaj, D.; Ryskamp, D.A.; Tian, N.; Tezel, G.; Mitchell, C.H.; Slepak, V.Z.; Shestopalov, V.I. From mechanosensitivity to inflammatory responses: New players in the pathology of glaucoma. *Curr. Eye Res.* **2014**, *39*, 105–119. [CrossRef] [PubMed]
4. Van Bergen, T.; Van de Velde, S.; Vandewalle, E.; Moons, L.; Stalmans, I. Improving patient outcomes following glaucoma surgery: State of the art and future perspectives. *Clin. Ophthalmol.* **2014**, *8*, 857–867. [CrossRef] [PubMed]
5. Bar-David, L.; Blumenthal, E.Z. Evolution of Glaucoma Surgery in the Last 25 Years. *Rambam Maimonides Med. J.* **2018**, *9*. [CrossRef] [PubMed]
6. Barrientos, S.; Stojadinovic, O.; Golinko, M.S.; Brem, H.; Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 585–601. [CrossRef] [PubMed]
7. Bukowiecki, A.; Hos, D.; Cursiefen, C.; Eming, S.A. Wound-healing studies in cornea and skin: Parallels, differences and opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1257. [CrossRef] [PubMed]
8. Ashby, B.D.; Garrett, Q.; Willcox, M.D. Corneal Injuries and Wound Healing – Review of Processes and Therapies. *Austin J. Clin. Ophthalmol.* **2014**, *1*, 1–25. [CrossRef]
9. Agrawal, V.B.; Tsai, R.J.F. Importance of Corneal Epithelial. *Indian J. Ophthalmol.* **2003**, *51*, 5–15. [PubMed]
10. Eslani, M.; Movahedan, A.; Afsharkhamseh, N.; Sroussi, H.; Djalilian, A.R. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Corneal Epithelial Wound Healing. *Investig. Opthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 6108. [CrossRef] [PubMed]
11. Ljubimov, A.; Saghizadeh, M. Progress in corneal wound healing. *Prog. Retin. Eye Res.* **2016**, *49*, 17–45. [CrossRef] [PubMed]
12. Maycock, N.J.R.; Marshall, J. Genomics of corneal wound healing: A review of the literature. *Acta Ophthalmol.* **2014**, *92*, E170–E184. [CrossRef] [PubMed]
13. Yu, F.S.X.; Yin, J.; Xu, K.; Huang, J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res. Bull.* **2010**, *81*, 229–235. [CrossRef] [PubMed]
14. West-Mays, J.A.; Dwivedi, D.J. The keratocyte: Corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 1625–1631. [CrossRef] [PubMed]
15. Barbosa, F.L.; Chaurasia, S.S.; Cutler, A.; Asosingh, K.; Kaur, H.; de Medeiros, F.W.; Agrawal, V.; Wilson, S.E. Corneal myofibroblast generation from bone marrow-derived cells. *Exp. Eye Res.* **2010**, *91*, 92–96. [CrossRef] [PubMed]

dc_1779_20

16. Wilson, S.E.; Liu, J.J.; Mohan, R.R. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* **1999**, *18*, 293–309. [CrossRef]
17. Wilson, S.E.; Mohan, R.R.; Mohan, R.R.; Ambrósio, R.; Hong, J.; Lee, J. The Corneal Wound Healing Response: Cytokine-mediated Interaction of the Epithelium, Stroma, and Inflammatory Cells. *Prog. Retin. Eye Res.* **2001**, *20*, 625–637. [CrossRef]
18. Spadea, L.; Giammaria, D.; Trabucco, P. Corneal wound healing after laser vision correction. *Br. J. Ophthalmol.* **2016**, *100*, 28–33. [CrossRef] [PubMed]
19. Olayanju, J.A.; Hassan, M.B.; Hodge, D.O.; Khanna, C.L. Trabeculectomy-Related Complications in Olmsted County, Minnesota, 1985 Through 2010. *JAMA Ophthalmol.* **2015**, *133*, 574–580. [CrossRef] [PubMed]
20. Csutak, A.; Tőzsér, J.; Békési, L.; Hassan, Z.; Berta, A.; Silver, D.M. Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 3743–3747.
21. Kallo, G.; Chatterjee, A.; Toth, M.; Rajnavölgyi, É.; Csutak, A.; Tozser, J.; Csősz, É. Relative quantification of human β-defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 1623–1631. [CrossRef] [PubMed]
22. Abrahamsson, A.; Rzepecka, A.; Dabrosin, C. Equal pro-inflammatory profiles of CCLs, CXCLs, and matrix metalloproteinases in the extracellular microenvironment in vivo in human dense breast tissue and breast cancer. *Front. Immunol.* **2018**, *8*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
23. Larsson, A.; Carlsson, L.; Lind, A.-L.; Gordh, T.; Bodolea, C.; Kamali-Moghaddam, M.; Thulin, M. The body mass index (BMI) is significantly correlated with levels of cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid. *Cytokine* **2015**, *76*, 514–518. [CrossRef] [PubMed]
24. Björkesten, J.; Enroth, S.; Shen, Q.; Wik, L.; Hougaard, D.M.; Cohen, A.S.; Sörensen, L.; Giedraitis, V.; Ingelsson, M.; Larsson, A.; et al. Stability of Proteins in Dried Blood Spot Biobanks. *Mol. Cell. Proteomic* **2017**, *16*, 1286–1296. [CrossRef] [PubMed]
25. Hillered, L.; Dahlin, A.P.; Clausen, F.; Chu, J.; Bergquist, J.; Hjort, K.; Enblad, P.; Lewén, A. Cerebral microdialysis for protein biomarker monitoring in the neurointensive care setting—A technical approach. *Front. Neurol.* **2014**, *5*, 245. [CrossRef] [PubMed]
26. Bhargava, M.; Viken, K.; Wang, Q.; Jagtap, P.; Bitterman, P.; Ingbar, D.; Wendt, C. Bronchoalveolar Lavage Fluid Protein Expression in Acute Respiratory Distress Syndrome Provides Insights into Pathways Activated in Subjects with Different Outcomes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7464. [CrossRef] [PubMed]
27. Csosz, É.; Kalló, G.; Jakob, B.M.; Deák, E.; Csutak, A.; Tozsér, J. Quantitative body fluid proteomics in medicine—A focus on minimal invasiveness. *J. Proteom.* **2016**, *153*, 30–43. [CrossRef] [PubMed]
28. Zhou, L.; Beuerman, R.W. The power of tears: How tear proteomics research could revolutionize the clinic. *Expert Rev. Proteom.* **2017**, *14*, 189–191. [CrossRef] [PubMed]
29. Zakaria, N.; Van Grasdorff, S.; Wouters, K.; Rozema, J.; Koppen, C.; Lion, E.; Cools, N.; Berneman, Z.; Tassignon, M.J. Human tears reveal insights into corneal neovascularization. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36451. [CrossRef] [PubMed]
30. Szklarczyk, D.; Franceschini, A.; Wyder, S.; Forslund, K.; Heller, D.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Roth, A.; Santos, A.; Tsafou, K.P.; et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D447–D452. [CrossRef] [PubMed]
31. Szklarczyk, D.; Morris, J.H.; Cook, H.; Kuhn, M.; Wyder, S.; Simonovic, M.; Santos, A.; Doncheva, N.T.; Roth, A.; Bork, P.; et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D362–D368. [CrossRef] [PubMed]
32. Roversi, P.; Marti, L.; Caputo, A.T.; Alonzi, D.S.; Hill, J.C.; Dent, K.C.; Kumar, A.; Levasseur, M.D.; Lia, A.; Waksman, T.; et al. Interdomain conformational flexibility underpins the activity of UGGT, the eukaryotic glycoprotein secretion checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 8544–8549. [CrossRef] [PubMed]
33. Tadokoro, S.; Ide, S.; Tokuyama, R.; Umeki, H.; Tatehara, S.; Kataoka, S.; Satomura, K. Leptin promotes wound healing in the skin. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121242. [CrossRef] [PubMed]
34. Kook, H.; Itoh, H.; Choi, B.S.; Sawada, N.; Doi, K.; Hwang, T.J.; Kim, K.K.; Arai, H.; Baik, Y.H.; Nakao, K.; et al. Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, *284*, H1388–H1397. [CrossRef] [PubMed]
35. Lee, T.W.; Kwon, Y.W.; Park, G.T.; Do, E.K.; Yoon, J.W.; Kim, S.-C.; Ko, H.C.; Kim, M.B.; Kim, J.H. Atrial natriuretic peptide accelerates human endothelial progenitor cell-stimulated cutaneous wound healing and angiogenesis. *Wound Repair Regen.* **2018**, *26*, 116–126. [CrossRef] [PubMed]

dc_1779_20

36. Powers, C.J.; McLeskey, S.W.; Wellstein, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* **2000**, *7*, 165–197. [CrossRef] [PubMed]
37. Bernasconi, R.; Nystrom, A. Balance and circumstance: The renin angiotensin system in wound healing and fibrosis. *Cell Signal.* **2018**, *51*, 34–46. [CrossRef] [PubMed]
38. Lutgens, E.; Cleutjens, K.B.J.M.; Heeneman, S.; Koteliansky, V.E.; Burkly, L.C.; Daemen, M.J.A.P. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7464–7469. [CrossRef] [PubMed]
39. Chauhan, A.K.; Kisucka, J.; Brill, A.; Walsh, M.T.; Scheiflinger, F.; Wagner, D.D. ADAMTS13: A new link between thrombosis and inflammation. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 2065–2074. [CrossRef] [PubMed]
40. Dhall, S.; Karim, Z.A.; Khasawneh, F.T.; Martins-Green, M. Platelet Hyperactivity in *TNFSF14/LIGHT* Knockout Mouse Model of Impaired Healing. *Adv Wound Care* **2016**, *5*, 421–431. [CrossRef] [PubMed]
41. Krause, P.; Zahner, S.P.; Kim, G.; Shaikh, R.B.; Steinberg, M.W. The Tumor Necrosis Factor Family Member TNFSF14 (LIGHT) is Required for Resolution of Intestinal Inflammation in Mice. *Gastroenterology* **2015**, *146*, 1752–1762. [CrossRef] [PubMed]
42. Lin, Q.; Fang, D.; Fang, J.; Ren, X.; Yang, X.; Wen, F.; Su, S.B. Impaired Wound Healing with Defective Expression of Chemokines and Recruitment of Myeloid Cells in TLR3-Deficient Mice. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 3710–3717. [CrossRef] [PubMed]
43. Kiang, J.G.; Zhai, M.; Liao, P.J.; Ho, C.; Gorbunov, N.V.; Elliott, T.B. Thrombopoietin Receptor Agonist Mitigates Hematopoietic Radiation Syndrome and Improves Survival after Whole-Body Ionizing Irradiation Followed by Wound Trauma. *Mediat. Inflamm.* **2017**, *2017*. [CrossRef] [PubMed]
44. Adair, J.E.; Stober, V.; Sobhany, M.; Zhuo, L.; Roberts, J.D.; Negishi, M.; Kimata, K.; Garantziotis, S. Inter-α-trypsin inhibitor promotes bronchial epithelial repair after injury through vitronectin binding. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16922–16930. [CrossRef] [PubMed]
45. Barker, H.; Aaltonen, M.; Pan, P.; Vahatupa, M.; Kaipiainen, P.; May, U.; Prince, S.; Uusitalo-Järvinen, H.; Waheed, A.; Pastoreková, S. Role of carbonic anhydrases in skin wound healing. *Exp. Mol. Med.* **2017**, *49*, E334. [CrossRef] [PubMed]
46. Ramirez-Carrozzi, V.; Sambandam, A.; Luis, E.; Lin, Z.; Jeet, S.; Lesch, J.; Hackney, J.; Kim, J.; Zhou, M.; Lai, J.; et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 1159–1166. [CrossRef] [PubMed]
47. Johnston, A.; Fritz, Y.; Dawes, S.M.; Diaconu, D.; Al-Attar, P.M.; Guzman, A.M.; Chen, C.S.; Fu, W.; Gudjonsson, J.E.; McCormick, T.S.; et al. McCormick and NLW. Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 2252–2262. [CrossRef] [PubMed]
48. Zhang, W.; Magadi, S.; Li, Z.; Smith, C.W.; Burns, A.R. IL-20 promotes epithelial healing of the injured mouse cornea. *Exp. Eye Res.* **2017**, *154*, 22–29. [CrossRef] [PubMed]
49. Sziksz, E.; Pap, D.; Lippai, R.; Béres, N.J.; Fekete, A.; Szabó, A.J.; Vannay, Á. Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*. [CrossRef] [PubMed]
50. Papanastasiou, A.D.; Sirinian, C.; Kalofonos, H.P. Identification of novel human receptor activator of nuclear factor-kB isoforms generated through alternative splicing: Implications in breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Res.* **2012**, *14*, R112. [CrossRef] [PubMed]
51. Hui, Q.; Jin, Z.; Li, X.; Liu, C.; Wang, X. FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1875. [CrossRef] [PubMed]
52. Song, Z.; Yang, F.; Du, H.; Li, X.; Liu, J.; Dong, M.; Xu, X. Role of artemin in non-small cell lung cancer. *Thorac. Cancer* **2018**, *9*, 555–562. [CrossRef] [PubMed]
53. Barrow, A.D.; Palarasah, Y.; Bugatti, M.; Holehouse, A.S.; Byers, D.E.; Holtzman, M.J.; Vermi, W.; Skjødt, K.; Crouch, E.; Colonna, M. OSCAR is a receptor for surfactant protein D that activates TNF-α release from human CCR2+ inflammatory monocytes. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 3317–3326. [CrossRef] [PubMed]
54. Fujiwara, T.; Dohi, T.; Maan, Z.N.; Rustad, K.C.; Kwon, S.H.; Padmanabhan, J.; Whittam, A.J.; Suga, H.; Duscher, D.; Rodrigues, M.; et al. Age-associated intracellular superoxide dismutase deficiency potentiates dermal fibroblast dysfunction during wound healing. *Exp. Dermatol.* **2017**. [CrossRef] [PubMed]
55. Fleming, T.H.; Theilen, T.-M.; Masania, J.; Wunderle, M.; Karimi, J.; Vittas, S.; Bernauer, R.; Bierhaus, A.; Rabbani, N.; Thornalley, P.J.; et al. Aging-dependent reduction in glyoxalase 1 delays wound healing. *Gerontology* **2013**, *59*, 427–437. [CrossRef] [PubMed]

dc_1779_20

56. Fleming, T.; Nawroth, P.P. Reactive metabolites as a cause of late diabetic complications. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 439–442. [CrossRef] [PubMed]
57. Treiber, N.; Maity, P.; Singh, K.; Ferchiu, F.; Wlaschek, M.; Scharffetter-Kochanek, K. The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. *Dermatoendocrinol* **2012**, *4*, 232–235. [CrossRef] [PubMed]
58. Zaniolo, K.; Gingras, M.-E.; Audette, M.; Guerin, S.L. Expression of the gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase-1 is modulated by fibronectin during corneal wound healing. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*, 4199–4210. [CrossRef] [PubMed]
59. El-Hamoly, T.; Hegedus, C.; Lakatos, P.; Kovacs, K.; Bai, P.; El-Ghazaly, M.A.; El-Denshary, E.S.; Szabó, É.; Virág, L. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 delays wound healing by regulating keratinocyte migration and production of inflammatory mediators. *Mol. Med.* **2014**, *20*, 363–371. [CrossRef] [PubMed]
60. Rodrigues, M.; Gurtner, G. Black, White, and Gray: Macrophages in Skin Repair and Disease. *Curr. Pathobiol. Rep.* **2017**, *5*, 333–342. [CrossRef] [PubMed]
61. Li, H.; Cui, Y.; Luan, J.; Zhang, X.; Li, C.; Zhou, X.; Shi, L.; Wang, H.; Han, J. PRELP (proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein) promotes osteoblastic differentiation of preosteoblastic MC3T3-E1 cells by regulating the β-catenin pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *470*, 558–562. [CrossRef] [PubMed]
62. Wolf, M.; Maltseva, I.; Clay, S.M.; Pan, P.; Gajjala, A.; Chan, M.F. Effects of MMP12 on cell motility and inflammation during corneal epithelial repair. *Exp. Eye Res.* **2017**, *160*, 11–20. [CrossRef] [PubMed]
63. Nishida, T.; Nakamura, M.; Mishima, H.; Otori, T. Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *J. Cell Physiol.* **1992**, *153*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
64. Gollnick, S.O.; Evans, S.S.; Baumann, H.; Owczarczak, B.; Maier, P.; Vaughan, L.; Wang, W.C.; Unger, E.; Henderson, B.W. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 1772–1779. [CrossRef] [PubMed]
65. Berta, A. Collection of tear samples with or without stimulation. *Am. J. Ophthalmol.* **1983**, *96*, 115–116. [CrossRef]
66. Bradford, M.M. A rapid and sensitive methode for the quantitation of microgram quantites of proiteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [CrossRef]
67. Saldanha, A.J. Java Treeview-extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 3246–3248. [CrossRef] [PubMed]
68. Kuznetsova, A.; Brockhoff, P.B.; Christensen, R.H.B. lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J. Stat. Softw.* **2017**, *82*. [CrossRef]
69. Benjamini, Y.; Hochberg, Y.; Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* **1995**, *57*, 289–300. [CrossRef]
70. Tukey, J.W. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* **1949**, *5*, 99–114. [CrossRef] [PubMed]

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

dc_1779_20

FEBS openbio

FEBS PRESS science publishing by scientists

Salivary proteome profiling of oral squamous cell carcinoma in a Hungarian population

Éva Csősz[1,2,*], Bernadett Márkus[1,2,*], Zsuzsanna Darula[3], Katalin F. Medzihradszky[3], Judit Nemes[4], Emese Szabó[1,2], József Tőzsér[1,2], Csongor Kiss[5] and Ildikó Márton[6]

1 Proteomics Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary
2 Biomarker Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary
3 Laboratory of Proteomics Research, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary
4 Department of Pedodontics, Faculty of Dentistry, University of Debrecen, Hungary
5 Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Hungary
6 Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, University of Debrecen, Hungary

Keywords
biomarker; ELISA; oral squamous cell carcinoma; proteomics analysis

Correspondence
É. Csősz, Proteomics Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 4010 Debrecen, Egyetem tér. 1., Hungary
Fax: +36-52-314989
Tel: +36-52-416432
E-mail: cseva@med.unideb.hu

*Equally contributing first authors.

(Received 17 October 2017, revised 23 December 2017, accepted 15 January 2018)

doi:10.1002/2211-5463.12391

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the seventh most common malignancy and the ninth most frequent cause of cancer death in Europe. Within Europe, Hungary has one of the highest rates of OSCC incidence and mortality. Thus, there is an urgent need to improve early detection. Saliva, as a readily available body fluid, became an increasingly important substance for the detection of biomarkers for many diseases. Different research groups have identified salivary biomarkers specific for OSCC for different countries. In this study, saliva samples of Hungarian patients with OSCC were studied to discover disease-specific and perhaps region-specific biomarkers. LC-mass spectrometry (MS)/MS analysis on a linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer was used for qualitative and quantitative salivary protein profiling. More than 500 proteins were identified from saliva by shotgun proteomics. The up- and downregulated proteins in the saliva of patients with OSCC highlighted the importance of protein–protein interaction networks involving the immune system and proteolysis in disease development. Two potential biomarkers from our shotgun analysis and a third candidate reported earlier by a Taiwanese group were further examined by ELISA on a larger reference set of samples. Resistin, a biomarker reported in Taiwan but not validated in our study, highlights the necessity of application of standardized analysis methods in different ethnic or geographical populations to identify biomarkers with sufficient specificity and sensitivity.

The oral cavity is the most frequent site of head and neck cancers, developing predominantly as oral cavity squamous cell carcinomas (OSCCs) in the upper aerodigestive epithelium [1,2]. The three major recognized risk factors of OSCC are tobacco consumption, alcohol consumption, and poor oral hygiene [3–5]. OSCC mortality rates reflect the different consumption patterns of alcohol and tobacco in European countries [6]. Annually, more than 300 000 new patients are diagnosed with OSCC worldwide. The disease is associated with poor prognosis and high mortality mainly due to late diagnosis because of the lack of reliable early diagnostic markers [7]. Mortality rate from OSCC is about 10-fold higher for men than for women. However, female OSCC incidence increased dramatically in the last decade. In addition, a rising

Abbreviations
MS, mass spectrometry; OSCC, oral squamous cell carcinoma; UPLC, ultraperformance liquid chromatography.

FEBS Open Bio **8** (2018) 556–569 © 2018 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

tendency was observed in younger patient cohorts [8]. In contrast to other European countries where the mortality rates of OSCC started to decline, unfavorable incidence and mortality figures remained exceedingly high in Hungary since the 1970s representing a major public health challenge [9].

Development of cancer diagnostic tools with sufficiently high sensitivity and specificity is required to enable early detection of OSCC [10]. Recent treatment strategies of patients with OSCC are based on traditional stage-predicting indices and histological grading [11]. Unfortunately, these predictors are relatively subjective and unreliable because tumors with the same staging and grading may respond to therapy differently. Thus, improving the diagnostic methods is required. A potential way of improving our diagnostic tools is to perform in-depth salivary analyses to discover and to assess biochemical and immunological markers in the saliva for early oral cancer diagnosis [12,13]. Biomarkers identified in the last decades in biological fluids can be linked to carcinogenesis and may serve as prognostic factors and saliva is a new clinical biomarker source that can be easily collected by noninvasive means [14–18]. As there is direct contact between saliva and the oral lesion(s), disease-related concentration changes of saliva ingredients may provide as good or better clues than serum samples [19]. More than 3700 salivary proteins have been identified by several research groups [20,21]. Many proteins were declared potential salivary biomarkers of OSCC in different countries [22–24]. In this study, we present a two-stage approach for the discovery of candidate OSCC-specific salivary biomarkers in the Hungarian population. LC-mass spectrometry (MS)/MS analysis using ultraperformance liquid chromatography (UPLC) coupled to a linear ion trap-Orbitrap hybrid tandem mass spectrometer was applied for qualitative and quantitative salivary protein profiling. Selected proteins, based on the shotgun analysis of a few randomly selected samples, were further investigated by ELISA on a reference set of samples.

Materials and methods

Patients and saliva collection

Donor enrollment, sample collection, and processing conformed to the principles of the Helsinki Declaration. Ethical approval was obtained from the University of Debrecen Ethics Committee (No. 3385-2011), and all subjects provided written informed consent. Clinical examinations were performed by dental surgeons from the Faculty of Dentistry, University of Debrecen. Adult patients (> 18 years) with histology-proven OSCC were recruited into the study. Saliva samples were collected before starting any antitumor therapy. Age-matched controls (MCTL) were consecutive patients and young controls (YCTL) were medical students admitted to the Faculty of Dentistry for regular dental checkup. Exclusion criteria included children (≤ 18 years), pregnancy and breast-feeding, diabetes mellitus, human papillomavirus infection, human immunodeficiency virus infection, autoimmune and immunodeficiency disorders, and cancer other than OSCC.

Unstimulated saliva samples were collected from 43 donors between 9 a.m. and 11 a.m. at the Faculty of Dentistry, University of Debrecen (collection between May 9, 2013, and February 29, 2016). The test set contained three randomly selected samples from patients with OSCC and controls for proteomics analysis, whereas the reference set contained samples from 20 patients with OSCC (mean age: 57 years), six YCTL (mean age: 24.5 years), and 11 MCTL (mean age: 59 years) for biomarker verification. Saliva samples were kept on ice during collection and were filtered using Millipore SLSV025LS 5-μm-pore-size syringe filters (Merck, Billerica, MA, USA). The filtered saliva was aliquoted and immediately placed at −70 °C until further use.

Sample preparation for mass spectrometry

Filtered saliva was dried in SpeedVac and redissolved in 25 mM pH 8.5 ammonium bicarbonate buffer. Total protein concentration of salivary samples was measured using the Bradford method [25]. Following denaturation with 8 M urea, all samples were reduced with 10 mM dithiothreitol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in ammonium bicarbonate buffer. Then, samples were alkylated with 20 mM iodoacetamide (Bio-Rad) in ammonium bicarbonate buffer and diluted with 25 mM ammonium bicarbonate (Sigma, St. Louis, MO, USA) to reduce the urea concentration to 1 M. Each sample was digested by MS-grade modified trypsin (AB Sciex, Framingham, MA, USA) in 1 : 25 enzyme-to-protein ratio (w/w) at 37 °C overnight. The digested samples were dried in SpeedVac and redissolved in 0.1% formic acid. The digests were desalted on Pierce C18 Tips (Thermo Scientific, West Palm Beach, FL, USA), and the eluates were dried and stored at −70 °C until MS analysis.

Mass spectrometry analysis

Tryptic digests representing 2 μg total protein were analyzed by LC-MS/MS using a Waters nanoACQUITY UPLC Online coupled to a linear ion trap-Orbitrap hybrid tandem mass spectrometer (Orbitrap Elite; Thermo Scientific) operating in positive ion mode. After trapping at 3% B (Waters Symmetry C18 180 μm × 20 mm column, 5 μm particle size, 100 Å pore size; flow rate: 10 $\mu L \cdot min^{-1}$), peptides were fractionated using a linear gradient of 3–40% B in 100 min (Waters BEH C18 75 μm × 250 mm column,

1.7 μm particle size, 300 Å pore size; solvent A: 0.1% formic acid/water; solvent B: 0.1% formic acid/5% dimethyl sulfoxide/acetonitrile; flow rate: 400 nL·min^{-1}). Data acquisition was carried out in a data-dependent fashion, and the 10 most abundant, multiply charged ions were selected from each MS survey (m/z: 380–1600; resolution: 60 000, acquired in profile mode) for MS/MS analyses. CID analyses were performed in the linear ion trap (normalized collision energy: 35). Dynamic exclusion was enabled (exclusion time: 30 s).

Protein identification

Peak lists generated from the MS/MS data by the 'PAVA' software [26] were searched against the human subset of the UniProt database (downloaded on June 10, 2014; 136 245 target sequences concatenated with a randomized sequence for each entry) using the PROTEINPROSPECTOR search engine (v.5.10.9.). Search parameters: enzyme: trypsin with maximum 1 missed cleavage site; fixed modification: carbamidomethyl (Cys); variable modifications: acetylation (protein N terminus), oxidation (Met), and pyroglutamic acid formation (N-terminal Gln) allowing up to two variable modifications per peptide; and mass accuracy: 5 p.p.m. and 0.6 Da for precursor and fragment ions (both monoisotopic), respectively. The following acceptance criteria were applied: score > 22 and 15, and E-value < 0.01 and 0.05 for protein and peptide identifications, respectively. The false-positive rates of the identified proteins and peptides were < 1%. Relative abundance of individual proteins was estimated by spectral counting: The number of identifications per protein (PSMs) was normalized to the total number of identifications, and then, these relative spectral counts were compared across the different samples.

Functional analyses were performed in the case of proteins with at least three unique peptide identifications. For the calculation of the OSCC/control ratio, the proteins which were identified with at least three unique peptides in at least two of three samples in either the control or the OSCC group were considered.

Validation of the candidate biomarkers using ELISA

All saliva samples from patients with OSCC and controls were analyzed in duplicate with quantitative ELISA. The ELISA kit for heparin cofactor 2 (Cat. number: LS-F13221) was purchased from LifeSpan Biosciences (Seattle, WA, USA), for resistin (Cat. number: KHP0051) from Thermo Fisher Scientific (West Palm Beach, FL, USA), and for complement C5 (Cat. number: ab125963) from Abcam (Branford, CT, USA). The concentration of the studied proteins in saliva was measured by the sandwich ELISA method according to the instruction provided by the vendor of each kit. Absorbance was measured at 450 nm, and concentrations were calculated based on the recorded 7-point calibration curves.

First, the variation coefficient of the parallel measurements was calculated and those data having more than 25 CV % value were excluded from statistical analysis.

Bioinformatics

The cluster analysis was carried out with Cluster 3.0 (http://cluster2.software.informer.com/) using the C CLUSTERING LIBRARY version 1.52, and the heat map was created with JAVA TREEVIEW version 1.1.6r4 [27].

The protein–protein interaction network of salivary proteins was generated using STRING version 10.5 [28,29] applying default settings and medium stringency. After the generation of networks, the enriched gene ontology (GO) terms provided by the software were also examined.

The statistical analysis of ELISA data was performed using the Mann–Whitney U-test and the two-sample t-test to compare the protein concentrations between groups. The data were considered significantly different where the P value was < 0.05.

Results and Discussion

Demographic and clinical characteristics of patients with OSCC

Among the included 17 patients, 13 were males and 4 females between the age of 44 and 73 years. The tumor developed in the tongue (T) in six cases and in the floor of the mouth (F) in four cases, and in three cases, it was detected in the gingival (G) region. In four cases, the tumor development showed multiple localization, and in two patients, the tumor developed in the T and either in the F or in the G region, while in another two patients, the tumor development was detected in the T, in the F, and also in the G region. Eight patients were discovered in early tumor development stage (stage I: 5; and stage II: 3), and nine patients were diagnosed with advanced tumors (stage III: 4; and stage IV: 5). There were six well-differentiated (W), seven moderately differentiated (M), and four poorly differentiated (P) OSCC samples (Table 1).

Shotgun proteomics analysis of saliva samples

Three randomly selected samples from patients with OSCC and matched controls, respectively, were subjected to shotgun proteomics analysis. More than 500 proteins were identified from salivary samples. For

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients with OSCC. In the case of each patient, the gender, age, tumor localization, TNM classification, tumor stage, and stage of differentiation are given. M is for male and F for female. Regarding tumor localization, T is for tongue, G is for gingiva, and F is for floor of the mouth. The W is for well-differentiated, M is for moderately differentiated, and P is for poorly differentiated tumors.

Patient code	Gender	Age (year)	Tumor localization	TNM classification	Tumor stage	Stage of differentiation
1	M	73	T	T2N1M0	III	W
2	F	69	G	T4N0M0	IV	W
3	F	67	F	T4N2M0	IV	W
4	M	52	T; G; F	T4N1M0	IV	M
5	M	57	T	T3N0M0	III	W
6	F	59	T	T1N0M0	I	W
7	M	67	F	T1N0M0	I	W
8	F	50	T	T2N0M0	II	M
9	M	52	T; G	T2N2M0	IV	M
10	M	48	T	T1N0M0	I	M
11	M	64	T	T2N0M0	II	P
12	M	44	G	T4N1M0	IV	M
13	M	44	T; F	T3N0M0	III	M
14	M	60	F	T2N0M0	II	M
15	M	49	T; G; F	T3N1M0	III	P
16	M	47	G	T1N0M0	I	P
17	M	64	F	T1N0M0	I	P

protein quantification, spectral counting was used and the ratios of OSCC : CTL protein quantities have been determined. Detailed information of the identified proteins is presented in Table S1.

The proteins with at least three unique sequences and with at least twofold change value (OSCC/CTL ratio < 0.5 or > 2) were subjected to further examination. A cluster analysis was carried out, and a heat map was generated to visualize the changes in protein amount in CTL and OSCC samples (Fig. 1). Based on cluster analysis, the protein levels can discriminate the OSCC group from the CTL group. Proteins were classified as salivary proteins or proteins being present in saliva under normal conditions and as acute-phase proteins (Table 2). For protein classification, the UniProt and Sys-Body-Fluid databases were used; the latter contains more than 10 000 proteins of different body fluid proteomes [30]. In addition, some proteins were classified as salivary proteins based on the literature data [21,31–35].

Two proteins, cytochrome *c* and mucin-7, were only present in the CTL samples, and six proteins, complement factor H (CFH) and C5 (C5), corticosteroid-binding globulin (SERPINA6), heparin cofactor 2 (SERPIND1), apolipoprotein E (APOE), and serum paraoxonase/arylesterase 1 (PON1), were only present in the OSCC samples (Table 3).

Functional analysis of salivary proteins

It was observed that the level of some proteins such as apolipoproteins, components of the complement system, proteinases, proteinase inhibitors, components of the coagulation cascade is upregulated. This might indicate a change in proteolysis most probably associated with the interrelated coagulation cascade-complement activation processes. At the same time, the level of proteins having role in metabolism and host defense was downregulated showing extensive cancer-related changes (Table 2). For a more detailed functional analysis of the differentially expressed proteins, GO analysis was performed; the Biological Process, Molecular Function, and Cellular Localization according to GO (http://www.geneontology.org/) were examined. First, the network of differentially expressed proteins was generated using STRING version 10.5 [28,29], followed by GO enrichment analysis provided by String. The network of downregulated proteins contained 35 proteins (nodes) and 27 possible protein–protein interactions analyzed at medium stringency (Fig. 2A). No biological function was enriched in the downregulated proteins in this loosely connected network (Fig. 2B); however, seven of 35 downregulated proteins are metabolic enzymes participating mainly in carbohydrate metabolism and 10 of 35 proteins have a role in defense. The upregulated 45 proteins show a highly interconnected protein–protein interaction network with 400 interactions analyzed at medium stringency (Fig. 2C). The enriched functions indicate active regulatory mechanisms implicating the immune system, lipid metabolism, plasminogen activation, antioxidant activity, and inhibition of enzymatic activities (Fig. 2D). Regarding localization of up- or downregulated proteins, all are mainly extracellular

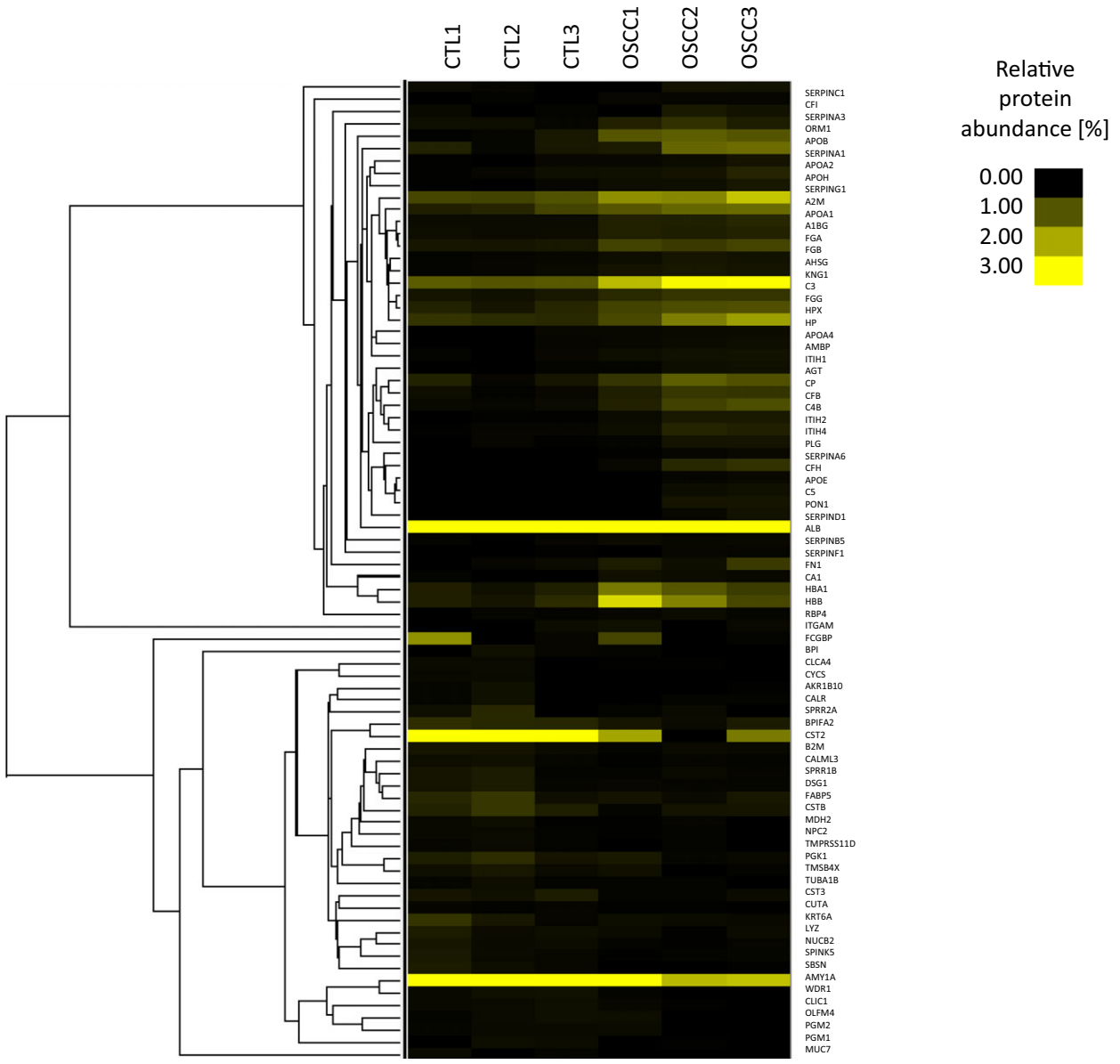


Fig. 1. Cluster analysis and heat map of proteins identified in the CTL and OSCC groups. The relative peptide count (%), characteristic of each sample, is shown.

proteins according to GO (Fig. 2B,D), but a part of the upregulated proteins originate from lipid particles or platelet alpha-granules indicating the presence of a possibly cancer-induced complex process involving systemic mechanisms.

To obtain more insights into the changes associated with OSCC, a literature search was performed to see which proteins have been associated with oncogenesis. Most of the proteins were already associated with OSCC, and 32 proteins were identified to be present in saliva in this pathological condition.

Complement C4B (C4B), complement factor B (CFB), complement C3, and alpha-1-antitrypsin were shown to be associated with the risk of developing OSCC according to a targeted proteomics study [36]. The levels of apolipoproteins A and E; PON1; inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, H2, and H4; kininogen 1; protein AMBP; nucleobindin-2; SERPIND1; and SERPINA6 were found to be upregulated in OSCC in shotgun proteomics experiments carried out on saliva samples [23]. The presence of APOE was related to the increased invasion potential of OSCC [37].

Table 2. List of proteins with at least twofold change between OSCC and CTL groups. The UniProt protein ID, the protein name, and function are presented. The representative identification and quantification data, the number (#) of unique peptides, the sequence coverage (%Cov), and the OSCC/CTL ratio are given in each case. Classification indicating salivary (S) or acute-phase (A) proteins is presented. The type of sample from patients with OSCC where the protein was identified is also listed. NI denotes proteins not identified in OSCC yet.

Protein ID	Protein name	# Unique peptide	%Cov	OSCC/ CTL ratio	Classification	Function	Type of OSCC sample
O60218	Aldo-keto reductase family 1 member B10	5	17	0.10	S	Metabolic enzyme	Saliva[a] [23]
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	8	37	3.14	AS	Immune response, transport	Saliva [16]
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	12	31	3.29	AS	Protease inhibitor	NI
P01009	Alpha-1-antitrypsin	25	62	3.70	S	Protease inhibitor	Saliva [36]
P04217	Alpha-1B-glycoprotein	12	39	3.25	S	Immune response	Saliva [16]
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	7	26	2.70	AS	Protease inhibitor, immune response, transport	NI
P01023	Alpha-2-macroglobulin	54	51	2.16	S	Protease inhibitor	NI
P04745	Alpha-amylase 1	42	83	0.21	S	Metabolic enzyme	Saliva [14]
P01019	Angiotensinogen	7	18	8.50	AS	Renin–angiotensin system	NI
P01008	Antithrombin III	7	22	2.08	AS	Protease inhibitor, blood coagulation	NI
P02647	Apolipoprotein A-I	24	69	2.14	S	Lipid metabolism	Saliva [23]
P02652	Apolipoprotein A-II	7	67	3.85	S	Lipid metabolism	Saliva [23]
P06727	Apolipoprotein A-IV	5	16	3.55	S	Lipid metabolism	Saliva [23]
P04114	Apolipoprotein B-100	42	13	8.12	S	Lipid metabolism	NI
P02649	APOE	4	18	Only in OSCC	S	Lipid metabolism	Saliva [23]
P17213	Bactericidal permeability-increasing protein	4	12	0.24	S	Immune response	NI
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	12	44	3.02	S	Lipid metabolism, blood coagulation	Saliva [22]
P61769	Beta-2-microglobulin	5	57	0.46	S	Immune response	NI
Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2	11	41	0.49	S	Immune response, defense	NI
Q14CN2	Calcium-activated chloride channel regulator 4	5	8	0.23	S	Transport	NI
P27482	Calmodulin-like protein 3	6	64	0.37	S	Metal binding, chaperone	NI
P27797	Calreticulin	4	19	0.37	S	Chaperone	NI
P00915	Carbonic anhydrase 1	6	34	8.55	S	Metabolic enzyme, acid–base balance	Saliva [22]
P00450	Ceruloplasmin	27	37	3.65	AS	Metal binding	Blood [39]
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	7	34	0.31	S	Transport, cell cycle regulation	NI
P01024	Complement C3	84	61	2.77	AS	Immune response	Saliva [36]
P0C0L5	Complement C4-B	32	25	6.69	AS	Immune response	Saliva [36]
P01031	Complement C5	7	5	Only in OSCC	AS	Immune response	NI
B4E1Z4	CFB	22	22	5.44	AS	Immune response	Saliva [36]
P08603	CFH	21	22	Only in OSCC	AS	Immune response	NI
P05156	Complement factor I	3	7	6.42	AS	Immune response	NI
P22528	Cornifin-B	6	79	0.45	S	Cornification	NI
P08185	Corticosteroid-binding globulin	4	15	Only in OSCC	AS	Protease inhibitor	Saliva [23]
P04080	Cystatin-B	6	86	0.39	S	Protease inhibitor	NI
P01034	Cystatin-C	7	43	0.33	S	Protease inhibitor	NI
P09228	Cystatin-SA	13	69	0.35	S	Protease inhibitor	Saliva [14]
P99999	Cytochrome *c*	4	32	0.00	A	Electron transport chain, apoptosis	Tissue [53]
Q02413	Desmoglein-1	8	12	0.40	S	Desmosome component	NI

Table 2. (Continued).

Protein ID	Protein name	# Unique peptide	%Cov	OSCC/ CTL ratio	Classification	Function	Type of OSCC sample
P61916	Epididymal secretory protein E1	4	33	0.30	S	Lipid metabolism, cholesterol transport	NI
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	12	79	0.49	S	Lipid metabolism	Saliva[a] [23]
P02671	Fibrinogen alpha chain	11	13	2.67	AS	Blood coagulation	Blood [40]
P02675	Fibrinogen beta chain	20	49	2.91	AS	Blood coagulation	Blood [40]
P02679	Fibrinogen gamma chain	18	48	2.43	AS	Blood coagulation	Blood [40]
B7ZLE5	FN1 protein	24	17	5.73	S	Cell adhesion	Tissue [42]
P00738	Haptoglobin	29	67	2.61	AS	Heme binding	Blood [38]
P69905	Hemoglobin subunit alpha	11	92	3.37	S	Oxygen transport	Saliva[a] [23]
P68871	Hemoglobin subunit beta	17	94	4.41	S	Oxygen transport	Saliva[a] [23]
P02790	Hemopexin	20	52	2.41	AS	Heme binding	Saliva [16, 22]
P05546	Heparin cofactor 2	8	17	Only in OSCC	A	Blood coagulation	Saliva [23]
Q9Y6R7	IgGFc-binding protein	52	17	0.49	S	Immune response	NI
P11215	Integrin alpha-M	6	9	2.01	S	Immune response	Tissue [41]
P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	8	14	3.76	S	Protease inhibitor	Saliva [23]
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	10	18	11.23	S	Protease inhibitor	Saliva [23]
Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	13	22	5.33	S	Protease inhibitor	Saliva [23]
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	21	39	0.44	S	Cytoskeleton	NI
P01042	Kininogen-1	11	18	2.89	S	Protease inhibitor, blood coagulation	Saliva [23]
P61626	Lysozyme C	7	54	0.47	S	Host defense	NI
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	4	17	0.37	S	Metabolic enzyme	NI
Q8TAX7	Mucin-7	4	12	0.00	S	Host defense	NI
P80303	Nucleobindin-2	8	26	0.32	S	Metal binding	Saliva [23]
Q6UX06	Olfactomedin-4	7	20	0.47	S	Cell adhesion	NI
P36871	Phosphoglucomutase-1	6	13	0.08	S	Metabolic enzyme	NI
Q96G03	Phosphoglucomutase-2	5	11	0.40	S	Metabolic enzyme	NI
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	10	33	0.44	S	Metabolic enzyme	Saliva [22]
P36955	Pigment epithelium-derived factor	4	12	7.17	S	Tumor development, angiogenesis	NI
P05155	Plasma protease C1 inhibitor	8	21	5.95	S	Protease inhibitor, blood coagulation	NI
P00747	Plasminogen	9	17	5.11	AS	Blood coagulation	NI
P02760	Protein AMBP	6	23	5.41	S	Protease inhibitor, host defense	Saliva [23]
O60888	Protein CutA	3	33	0.43	S	Metal binding, enzyme binding	NI
P02753	Retinol-binding protein 4	5	24	2.54	S	Protease inhibitor, host defense	Blood [38]
Q9NQ38	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	11	13	0.32	S	Lipid metabolism	NI
P36952	Serpin B5	4	14	2.63	S	Tumor suppressor	Blood [12]
P02768	Serum albumin	71	84	2.53	S	Transport	Saliva [22]
P27169	Serum paraoxonase/ arylesterase 1	9	37	Only in OSCC	A	Detoxification	Saliva [23]

Table 2. (Continued).

Protein ID	Protein name	# Unique peptide	%Cov	OSCC/ CTL ratio	Classification	Function	Type of OSCC sample
P35326	Small proline-rich protein 2A	6	79	0.29	S	Cornification	Saliva[a] [23]
Q6UWP8	Suprabasin	12	33	0.05	S	Cell proliferation	NI
P62328	Thymosin beta-4	5	64	0.42	S	Actin binding, cell proliferation	NI
O60235	Transmembrane protease serine 11D	3	10	0.20	S	Protease, host defense	NI
P68363	Tubulin alpha-1B chain	4	12	0.40	S	Microtubule component	Saliva[a] [23]
O75083	WD repeat-containing protein 1	7	19	0.13	S	Cell migration	NI

[a]Indicates that not the protein itself, but another close family member of it was already found in OSCC.

Table 3. Proteins identified only in the OSCC or CTL group.

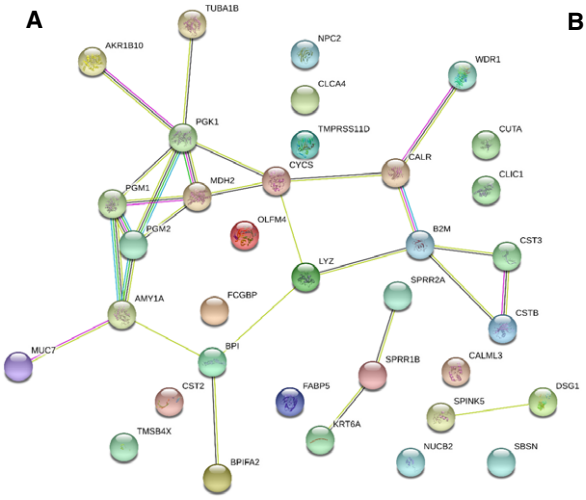
Protein ID[a]	Protein name	Gene name	Function	Presence	Reference to previous studies
P02649	APOE	APOE	Lipid metabolism	Only OSCC	Identified in saliva of patients with OSCC [23]
P01031	Complement C5	C5	Innate immune response, complement component	Only OSCC	Not identified in cancer yet
P08603	CFH	CFH	Innate immune response, complement component	Only OSCC	Identified in other forms of cancer but not in OSCC [49,50]
P08185	Corticosteroid-binding globulin	SERPINA6	Protease inhibitor	Only OSCC	Identified in saliva of patients with OSCC [23]
P05546	Heparin cofactor 2	SERPIND1	Blood coagulation	Only OSCC	Identified in saliva of patients with OSCC [23]
P27169	Serum paraoxonase /arylesterase 1	PON1	Detoxification	Only OSCC	Identified in saliva of patients with OSCC [23]
P99999	Cytochrome *c*	CYCS	Electron transport chain, its release from mitochondria initiates apoptosis	Only Ctrl	Its release was inhibited in OSCC [53]
Q8TAX7	Mucin-7	MUC7	Antibacterial activity, host defense	Only Ctrl	Not identified in cancer yet

[a]Based on http://www.uniprot.org/.

The alpha-1-acid glycoprotein, alpha-1B glycoprotein, alpha-amylase, beta-2-glycoprotein, carbonic anhydrase 1, cystatin-SA, hemopexin, phosphoglycerate kinase, and serum albumin were identified as potential salivary markers of OSCC [14,16,22].

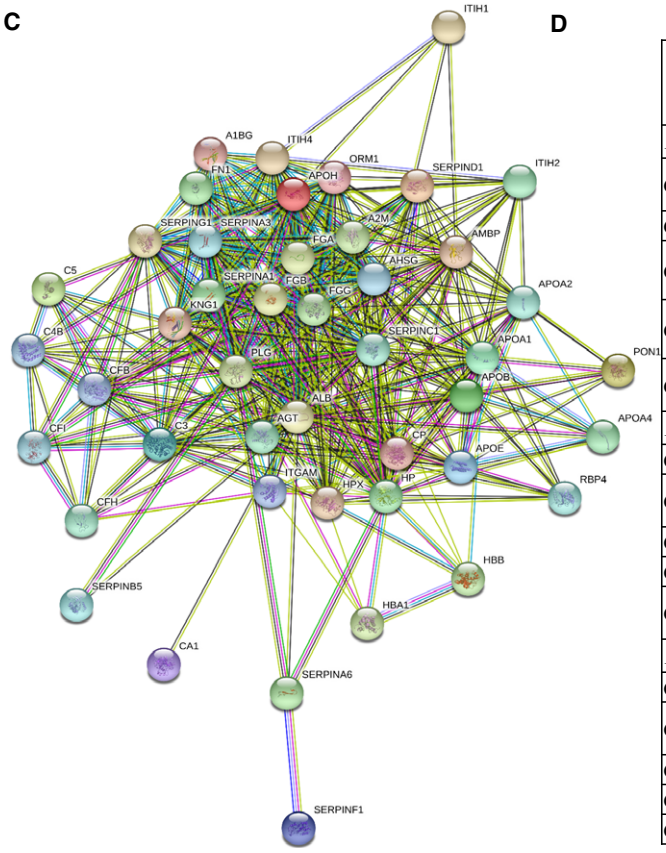
Some of the proteins found to be differentially expressed in our study, such as fibrinogen alpha, beta, and gamma chains, haptoglobin, SERPINB5, retinol-binding protein 4, and ceruloplasmin, were shown to be plasma markers of OSCC, while the presence of integrin alpha-M and fibronectin FN1 was demonstrated in the OSCC tissue [12,38–42].

In the case of 36 proteins, no association with OSCC was found so far (Table 2). Angiotensinogen and plasminogen themselves were not found to be associated with OSCC, but the plasminogen activator system was shown to be a predictive marker for early OSCC, and by bioinformatics analysis, the angiotensin-converting enzymes were associated with malignant epithelial neoplasia characteristic of OSCC [43,44]. In the case of six proteins, not the protein from our list, but another protein from the same family was already demonstrated to be differentially expressed in OSCC (Table 2). In the case of SERPINB5, there are contradictory data; in our study, the level of SERPINB5 was found to be elevated in OSCC; however, the SERPINB5 and different forms of SERPINS from clade B were found by other groups to be downregulated in OSCC on mRNA level and higher SERPINB5 levels were found to



B

Pathway ID	Pathway description	Observed gene count	False discovery rate
I. Localization			
GO.0070062	Extracellular region part	24	3.56e–09
GO.0005576	Extracellular region	26	1.69e–09
GO.0031988	Extracellular exosome	25	1.11e–12
GO.0044421	Membrane-bounded vesicle	25	1.09e–10



D

Pathway ID	Pathway description	Observed gene count	False discovery rate
I. Biological process			
GO.0002697	Regulation of immune effector process	10	9.91e–07
GO.0031639	Plasminogen activation	4	9.91e–07
GO.0034370	Triglyceride-rich lipoprotein particle remodeling	4	9.91e–07
GO.0034374	Low-density lipoprotein particle remodeling	4	9.91e–07
GO.0019216	Regulation of lipid metabolic process	8	9.53e–06
II. Molecular Function			
GO.0005319	Lipid transporter activity	6	9.06e–06
GO.0017127	Cholesterol transporter activity	5	7.23e–08
GO.0016209	Antioxidant activity	5	6.64e–05
GO.0004857	Enzyme inhibitor activity	19	4.76e–20
GO.0004867	Serine-type endopeptidase inhibitor activity	14	4.76e–20
III. Localization			
GO.0070062	Extracellular exosome	43	9.48e–34
GO.0034364	High-density lipoprotein particle	6	8.65e–10
GO.0005577	Fibrinogen complex	4	8.3e–08
GO.0005576	Extracellular region	43	7.68e–26
GO.0031091	Platelet alpha-granule	10	6.88e–15

Fig. 2. The protein–protein interaction network and functional classification of up- and downregulated proteins in OSCC. The network of downregulated (A) and upregulated (C) proteins in OSCC displayed by String 10.4 using default settings and medium stringency. Each node represents a protein and the edges represent protein–protein interactions based on different levels of evidence collected by String. The enrichment table of GO terms calculated by String in the case of downregulated (B) and upregulated (D) proteins is shown indicating the number of the proteins belonging to each term and the false discovery rate calculated by String.

correlate with better prognosis of patients with oral cancer [45,46].

Plasma protease C1 inhibitor (SERPING1), antithrombin III, and fibronectin were found to play a role in carcinogenesis, but their implication in oral cancer, especially in OSCC, has not been demonstrated yet [47,48]. The CFH was previously identified in lung adenocarcinoma and cutaneous squamous cell

carcinoma, but not in OSCC [49,50], and apoB100 was found in serum of patients with head and neck squamous cell carcinoma [51]. No data were found on the presence of complement C5 and mucin-7 in cancer; however, other components of the complement system and other forms of mucins were all identified in different forms of cancer and in OSCC as well [36,52].

As for the involvement of cytochrome *c*, it was shown that the HIF-1α-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in OSCC happens through the inhibition of cytochrome *c* release [53].

Examination of the level of selected proteins by ELISA

Many of the studies published in the scientific literature are based on shotgun proteomics experiments. Only few of the proteins listed in Table 2 were verified or validated either using SRM-based targeted or antibody-based methods. Considering the proteins present only in OSCC based on our shotgun experiments, the data presented in the literature, and the availability of antibodies, SERPIND1 and C5 were selected for further studies. To test the utility of potential biomarkers identified in Asia for a European population, resistin reported to be a potential biomarker for OSCC in Taiwan [23] was also selected.

The concentrations of C5, SERPIND1, and resistin were examined in the saliva of patients with OSCC, MCTL, and YCTL using quantitative sandwich ELISA kits (Fig. 3). In the case of C5, the difference was significant but only when YCTL and patients with OSCC or YCTL and MCTL were compared, indicating that the level of C5 was age-dependent or it was influenced by other factors. One such factor can be the inflammatory status related to poor oral hygiene often

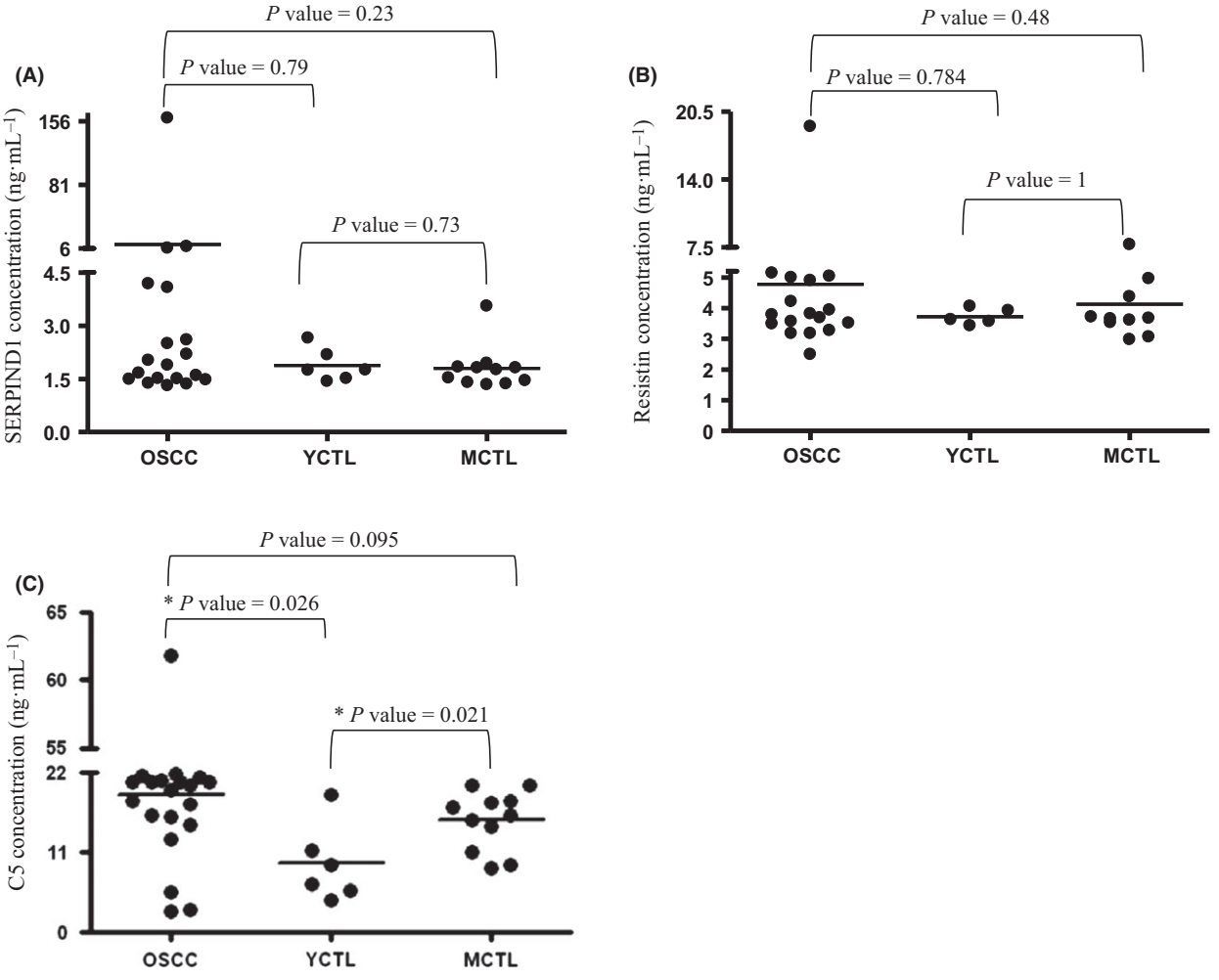


Fig. 3. Examination of potential salivary biomarkers using ELISA. The concentration of SERPIND1 (A), resistin (B), and complement C5 (C) proteins in the saliva samples collected from patients with OSCC, YCTL, and MCTL. The *P* value is indicated; * refers to $P < 0.05$.

observed in the middle-aged and elderly population in Hungary [54]. This means that despite the differential expression of C5 in the OSCC group, the level of C5 does not discriminate between the target MCTL and the diseased group, and hence, it cannot be used as a biomarker for OSCC.

In the case of resistin and SERPIND1, no significant differences were found between the groups. Resistin was not up- or downregulated according to our shotgun experiments and did not show significant differences in the ELISA experiments either. In the case of SERPIND1, one possible explanation of the disagreement between the shotgun proteomics and ELISA data can be that the low number of samples (three for each group) tested by shotgun proteomics and the high individual variation of the saliva samples collected from the patients may lead to false-positive results. This outcome highlights the importance of validation of the shotgun proteomics data on larger patient cohorts to decrease the false positivity of biomarker identifications. In a two-stage experimental approach, starting with a shotgun proteomics experiment, the level of resistin was found to be significantly higher in the saliva samples of patients with OSCC compared to controls. However, following ELISAs showed that the median values in the OSCC group were only slightly elevated compared to the control group [23]. In the same study, SERPIND1 was not validated but was shown to be upregulated in the saliva samples of patients with OSCC. In our study, a similar experimental setup was applied; in the shotgun experiment, the level of SERPIND1 was higher but the level of resistin did not change markedly in the OSCC group, and the validation of SERPIND1 and resistin shows that none of them turned to be useful potential biomarkers. The fact that resistin was identified as a biomarker for OSCC in Taiwan but not in Hungary gives further evidence for the importance of regional studies highlighted in our previous work [55].

Conclusions

Global analysis of salivary samples from patients with OSCC and controls contributes to the better understanding of the disease, including the interaction of tumor cells with their environment and the influence of cancer lesion on salivary protein ecology. Salivary proteins, characterizing patients with OSCC in this study, highlighted the importance of networks involving the immune system and proteolysis in this disease. Six proteins were only detected in OSCC samples by proteomics analyses and two of them were further examined using ELISA, but none of the proteins turned to be a potential biomarker in OSCC in our study group. The fact that resistin was shown to be a possible biomarker in Taiwan but not in our study highlights the importance of regional or population-tailored studies.

Acknowledgements

This work was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences, Hungarian Scientific Research Fund OTKA K105034; TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 project implemented through the New Széchenyi Plan cofinanced by the European Social Fund; and the National Research, Development and Innovation Office [GINOP-2.3.2-15-2016-00020 and GINOP-2.3.2-15-2016-00001]. The work of Kamilla Sólyom and Jánosné Tóth is greatly acknowledged.

Author contributions

IM, EC, and CK designed the experiments; IM and JN performed stomatologic examination of patients; BM and ZD carried out the experiments; BM, ZD, and EC evaluated the data and wrote the manuscript; BM, ES, and EC prepared the figures and tables; and JT, KM, CK, and IM reviewed the manuscript.

References

1 Massano J, Regateiro FS, Januário G and Ferreira A (2006) Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**, 67–76.
2 Argiris A, Karamouzis MV, Raben D and Ferris RL (2008) Head and neck cancer. *Lancet* **371**, 1695–1709.
3 Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P and Boyle P (2008) Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* **122**, 155–164.
4 Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C and Corrao G (2001) A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* **85**, 1700–1705.
5 Rosenquist K (2005) Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl*, **179**, 1–66.
6 Suba Z, Mihályi S, Takács D and Gyulai-Gaál S (2009) Oral cancer: morbus Hungaricus in the 21st century. *Fogorv Sz* **102**, 63–68.
7 Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **65**, 87–108.

8 Myers JN, Elkins T, Roberts D and Byers RM (2000) Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* **122**, 44–51.
9 Garavello W, Bertuccio P, Levi F, Lucchini F, Bosetti C, Malvezzi M, Negri E and La Vecchia C (2010) The oral cancer epidemic in central and eastern Europe. *Int J Cancer* **127**, 160–171.
10 Santosh ABR, Jones T and Harvey J (2016) A review on oral cancer biomarkers: understanding the past and learning from the present. *J Cancer Res Ther* **12**, 486–492.
11 Sparano A, Weinstein G, Chalian A, Yodul M and Weber R (2004) Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* **131**, 472–476.
12 Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, Feinmesser R, Savulescu D, Borovoi I, Gavish M and Nagler RM (2009) Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *Br J Cancer* **101**, 1194–1198.
13 Shpitzer T, Bahar G, Feinmesser R and Nagler RM (2007) A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. *J Cancer Res Clin Oncol* **133**, 613–617.
14 Sannam Khan R, Khurshid Z, Akhbar S and Faraz Moin S (2016) Advances of salivary proteomics in oral squamous cell carcinoma (OSCC) detection: an update. *Proteomes* **4**, 41.
15 Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN and Patel PS (2011) A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian J Clin Biochem* **26**, 326–334.
16 Winck FV, Prado Ribeiro AC, Ramos Domingues R, Ling LY, Riaño-Pachón DM, Rivera C, Brandão TB, Gouvea AF, Santos-Silva AR, Coletta RD *et al.* (2015) Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivary extracellular vesicles. *Sci Rep* **5**, 16305.
17 Csősz É, Kalló G, Márkus B, Deák E, Csutak A and Tőzsér J (2017) Quantitative body fluid proteomics in medicine — A focus on minimal invasiveness. *J Proteomics* **153**, 30–43.
18 Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ and Wong DTW (2013) Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev* **26**, 781–791.
19 Nagler R, Bahar G, Shpitzer T and Feinmesser R (2006) Concomitant analysis of salivary tumor markers–a new diagnostic tool for oral cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 3979–3984.
20 Schulz BL, Cooper-White J and Punyadeera CK (2013) Saliva proteome research: current status and future outlook. *Crit Rev Biotechnol* **33**, 246–259.
21 Grassl N, Kulak NA, Pichler G, Geyer PE, Jung J, Schubert S, Sinitcyn P, Cox J and Mann M (2016) Ultra-deep and quantitative saliva proteome reveals dynamics of the oral microbiome. *Genome Med* **8**, 44.
22 Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, Elashoff D, Wei R, Loo JA and Wong DT (2008) Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res* **14**, 6246–6252.
23 Wu C-C, Chu H-W, Hsu C-W, Chang K-P and Liu H-P (2015) Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma. *Proteomics* **15**, 3394–3404.
24 Yu J-S, Chen Y-T, Chiang W-F, Hsiao Y-C, Chu LJ, See L-C, Wu C-S, Tu H-T, Chen H-W, Chen C-C *et al.* (2016) Saliva protein biomarkers to detect oral squamous cell carcinoma in a high-risk population in Taiwan. *Proc Natl Acad Sci* **113**, 11549–11554.
25 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
26 Guan S, Price JC, Prusiner SB, Ghaemmaghami S and Burlingame AL (2011) A data processing pipeline for mammalian proteome dynamics studies using stable isotope metabolic labeling. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111.010728.
27 Saldanha Alok J (2004) Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**, 3246–3248.
28 Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P *et al.* (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* **45**, D362–D368.
29 Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP *et al.* (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* **43**, D447–D452.
30 Li S-J, Peng M, Li H, Liu B-S, Wang C, Wu J-R, Li Y-X and Zeng R (2009) Sys-BodyFluid: a systematical database for human body fluid proteome research. *Nucleic Acids Res* **37**, D907–D912.
31 Swaak AJ, Visch LL and Zonneveld A (1988) Diagnostic significance of salivary levels of beta 2-microglobulin in Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol* **7**, 28–34.
32 Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, DeVoe DL and Balgley BM (2006) Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS. *J Proteome Res* **5**, 1469–1478.
33 Rossetti DV, Martelli C, Longhi R, Iavarone F, Castagnola M and Desiderio C (2013) Quantitative analysis of thymosin β_4 in whole saliva by capillary electrophoresis-mass spectrometry using multiple ions

monitoring (CE-MIM-MS). *Electrophoresis* **34**, 2674–2682.
34 Morzel M, Chabanet C, Schwartz C, Lucchi G, Ducoroy P and Nicklaus S (2014) Salivary protein profiles are linked to bitter taste acceptance in infants. *Eur J Pediatr* **173**, 575–582.
35 Alves DBM, Bingle L, Bingle CD, Lourenco SV, Silva AA, Pereira DL and Vargas PA (2017) BPI-fold (BPIF) containing/plunc protein expression in human fetal major and minor salivary glands. *Braz Oral Res* **31**, e6.
36 Kawahara R, Bollinger JG, Rivera C, Ribeiro ACP, Brandão TB, Leme AFP and MacCoss MJ (2016) A targeted proteomic strategy for the measurement of oral cancer candidate biomarkers in human saliva. *Proteomics* **16**, 159–173.
37 Jayakar SK, Loudig O, Brandwein-Gensler M, Kim RS, Ow TJ, Ustun B, Harris TM, Prystowsky MB, Childs G, Segall JE *et al*. (2017) Apolipoprotein E promotes invasion in oral squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* **187**, 2259–2272.
38 Chen Y, Azman SN, Kerishnan JP, Zain RB, Chen YN and Wong YL (2014) Identification of host-immune response protein candidates in the sera of human oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS ONE* **9**, e109012.
39 Jayadeep A, Raveendran Pillai K, Kannan S, Nalinakumari KR, Mathew B, Krishnan Nair M and Menon VP (1997) Serum levels of copper, zinc, iron and ceruplasmin in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* **16**, 295–300.
40 Pro Tung CL, Lin ST, Chou HC, Chen YW, Lin HC, Tung CL, Huang KJ, Chen YJ, Lee YR and Chan HL (2013) Proteomics-based identification of plasma biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *J Pharm Biomed Anal* **75**, 7–17.
41 Ohara T, Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Kitahara H, Okamune A, Kato K, Hase T, Nakaya H and Yoshizawa K (2009) Integrin expression levels correlate with invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* **36**, 429–436.
42 Yen CY, Huang CY, Hou MF, Yang YH, Chang CH, Huang HW, Chen CH and Chang HW (2013) Evaluating the performance of fibronectin 1 (FN1), integrin α4β1 (ITGA4), syndecan-2 (SDC2), and glycoprotein CD44 as the potential biomarkers of oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Biomarkers* **18**, 63–72.
43 Magnussen S, Rikardsen OG, Hadler-Olsen E, Uhlin-Hansen L, Steigen SE and Svineng G (2014) Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) are potential predictive biomarkers in early stage oral squamous cell carcinomas (OSCC). *PLoS ONE* **9**, e101895.
44 de Carvalho Fraga CA, Farias LC, Jones KM, Batista de Paula AM and Guimaraes ALS (2017) Angiotensin-converting enzymes (ACE and ACE2) as potential targets for malignant epithelial neoplasia: review and bioinformatics analyses focused in oral squamous cell carcinoma. *Protein Pept Lett* **24**, 784–792.
45 Shiiba M, Nomura H, Shinozuka K, Saito K, Kouzu Y, Kasamatsu A, Sakamoto Y, Murano A, Ono K, Ogawara K *et al*. (2010) Down-regulated expression of SERPIN genes located on chromosome 18q21 in oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep* **24**, 241–249.
46 Xia W, Lau YK, Hu MC, Li L, Johnston DA, Sheng S, El-Naggar A and Hung MC (2000) High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* **19**, 2398–2403.
47 Kocsis J, Mészáros T and Madaras B (2011) High levels of acute phase proteins and soluble 70 kDa heat shock proteins are independent and additive risk factors for mortality in colorectal cancer. *Cell Stress Chaperones* **16**, 49–55.
48 Daly M, O'Meara A and Hallinan FM (1987) Identification and characterization of a new antithrombin III familial variant (AT Dublin) with possible increased frequency in children with cancer. *Br J Haematol* **65**, 457–462.
49 Cui T, Chen Y, Knosel T, Yang L, Zoller K, Galler K, Berndt A, Mihlan M, Zipfel PF and Petersen I (2011) Human complement factor H is a novel diagnostic marker for lung adenocarcinoma. *Int J Oncol* **39**, 161–168.
50 Riihilä PM, Nissinen LM, Ala-aho R, Kallajoki M, Grénman R, Meri S, Peltonen S, Peltonen J and Kähäri V (2014) Complement factor H: a biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* **134**, 498–506.
51 Li G, Da M, Zhang W, Wu H, Ye J, Chen J, Ma L, Gu N, Wu Y and Song X (2016) Alteration of serum lipid profile and its prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **45**, 167–172.
52 Li P, Xiao LY and Tan H (2015) Muc-1 promotes migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via PI3K-Akt signaling. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 10365–10374.
53 Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T and Osaki T (2005) Mechanism of HIF-1α-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* **96**, 394–402.
54 Bánóczy J and Rigó O (1991) Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. *Community Dent Oral Epidemiol* **19**, 265–267.

55 Csősz É, Lábiscsák P, Kalló G, Márkus B, Emri M, Szabó A, Tar I, Tőzsér J, Kiss C and Márton I (2017) Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers. *PLoS ONE* **12**, e0177282.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. List of identified proteins.

doi:1779.20

RESEARCH ARTICLE

Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers

Éva Csősz[1☯‡], Péter Lábiscsák[1☯‡], Gergő Kalló[1], Bernadett Márkus[1], Miklós Emri[2], Adrienn Szabó[3], Ildikó Tar[4], József Tőzsér[1], Csongor Kiss[5], Ildikó Márton[4]*

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 1. Egyetem ter, Debrecen, Hungary, **2** Department of Medical Imaging, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 1. Egyetem ter, Debrecen, Hungary, **3** Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, University of Debrecen, 1. Egyetem ter, Debrecen, Hungary, **4** Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, University of Debrecen, 1. Egyetem ter, Debrecen, Hungary, **5** Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Debrecen, 1. Egyetem ter, Debrecen, Hungary

☯ These authors contributed equally to this work.
‡ These authors are co-first authors on this work.
* marton.ildiko@dental.unideb.hu

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Csősz É, Lábiscsák P, Kalló G, Márkus B, Emri M, Szabó A, et al. (2017) Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers. PLoS ONE 12(5): e0177282. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282

Editor: John Matthew Koomen, H Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, UNITED STATES

Received: September 12, 2016

Accepted: April 1, 2017

Published: May 18, 2017

Copyright: © 2017 Csősz et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data are publicly available through the Panorama website (https://panoramaweb.org/labkey/project/University%20of%20Debrecen/OSCC%20saliva/begin.view?).

Funding: This work was supported in part by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences, TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 project implemented through the New Széchenyi Plan co-financed by the

Abstract

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) accounting for about 90% of malignant oral lesions is the 6th most common malignancy worldwide. Diagnostic delay may contribute to dismal survival rate therefore, there is a need for developing specific and sensitive biomarkers to improve early detection. Hungarian population occupies the top places of statistics regarding OSCC incidence and mortality figures therefore, we aimed at finding potential salivary protein biomarkers suitable for the Hungarian population. In this study we investigated 14 proteins which were previously reported as significantly elevated in saliva of patients with OSCC. In case of IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α and VEGF a Luminex-based multiplex kit was utilized and the salivary concentrations were determined. In case of catalase, profilin-1, S100A9, CD59, galectin-3-bindig protein, CD44, thioredoxin and keratin-19, SRM-based targeted proteomic method was developed and the relative amount of the proteins was determined in the saliva of patients with OSCC and controls. After several rounds of optimization and using stable isotope-containing peptides, we developed an SRM-based method for rapid salivary protein detection. The validation of the selected potential biomarkers by ELISA revealed salivary protein S100A9 and IL-6 as useful protein biomarkers for OSCC detection improving the diagnostic accuracy for OSCC in the Hungarian population.A noninvasive diagnostic method to detect biomarkers useful for the early diagnosis of OSCC was developed. This can be an attractive strategy in screening saliva samples collected in a nation-wide multi-centric study in order to decrease morbidity, mortality, to enhance survival rate and to improve quality of life. The heterogeneity of protein biomarkers found in different ethnic groups presented in the literature highlights the importance of identification of population-tailored protein biomarkers.

European Social Fund, and Hungarian Scientific Research Fund OTKA K105034. Gergő Kalló is receiver of Astellas Pharma Ltd. Fellowship in form of support for chemicals and consumables, which does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: This study was funded in part by an Astellas Pharma Ltd. Fellowship to GK. At the University of Debrecen there is an Astellas Pharma award for Ph.D. students presenting the best research proposal. The awardee is selected by the Scientific Committee of the University of Debrecen and the award is given by Astellas Pharma Ltd. in form of 500000 HUF (approx. 1600 EUR) credit to cover the costs of consumables and chemicals used during the research. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

With 350,000–400,000 new cases annually, oral cavity squamous cell carcinomas (OSCC) represent a major health-care problem worldwide. The increasing incidence of OSCC among women and young and middle-aged males is particularly challenging [1–4]. Despite advances in surgical and radiation treatments and chemotherapy, the average 5-year overall survival rate of advanced OSCC is not much higher than 50% [5]. Hungarian women and men occupy the top places of statistics regarding global OSCC incidence and mortality figures with an embarrassing fourfold elevation of overall OSCC mortality rate in Hungary by the new millennium since the 1970-ies [6]. In contrast to other European countries where mortality rates from OSCC started to decline after 2000, the untoward trend of rising OSCC mortality figures in Hungary did not stop [7].

Standard diagnostic methods, i.e. expert clinical examination and histological evaluation of suspicious areas fail to detect the majority of patients with early stage OSCC so improvement of the diagnostic methods is required [5,8]. Salivary protein biomarkers may represent a promising tool for improving clinical outcome of patients with OSCC.

Saliva is a very dilute body fluid which contains electrolytes, nitrogenous products and proteins. The protein content of saliva has been analyzed by several workgroups, and more than 2000 salivary proteins have been identified [9]. The most abundant proteins in saliva are α-amylase, cystatins, proline rich peptides, serum albumin and mucins [9]. Besides the highly abundant proteins, the low-abundance proteins of saliva have diagnostic values in oral diseases like bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw [10] and also in systemic diseases such as breast cancer [11]. In the past decade, several studies identified a series of proteins, mostly NF-κB-dependent cytokines, with elevated concentration in the saliva of patients with OSCC using antibody-based techniques, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as the gold standard for protein biomarker detection [12,13]. Unfortunately, this methodology does not allow the identification of protein biomarkers in great numbers, it is time consuming and expensive.

Selected reaction monitoring (SRM)-based targeted proteomics allows the identification and quantification of multiple proteins with high specificity and great detection dynamics [14]. It can be applied practically for any kind of samples but it has high importance for the study of different body fluids such as of patients with cancer [15].

Application of SRM-based targeted proteomics platform was already used for salivary protein biomarker detection [16] and our aim was to test if some of the potential salivary protein biomarkers already described in scientific literature can be used in the Hungarian population for OSCC detections.

In this prospective study we report on the detection of salivary biomarkers in accordance to the Clinical Proteomic Technologies for Cancer (CPTC) initiative guidelines established by the National Cancer Institute [17]. The guidelines suggest the application of SRM-based targeted proteomics for verification of potential biomarkers identified in the discovery phase, and after verification, the biomarkers can be subjected to the validation step. For validation, only few proteins should be chosen and tested using ELISA or other antibody-based method [17]. Candidate biomarkers reported in the literature were selected and SRM-based targeted proteomics platform along with Luminex-based multiplex assay was used to monitor the level of these biomarkers on a test set of samples followed by the verification of the potential biomarkers whose level was significantly altered in the OSCC group compared to the controls by ELISA. ELISA tests specific for the potential biomarkers were carried out on a reference set of samples and the IL-6 and S100A9 was shown to be specific for OSCC in the studied Hungarian patient cohort.

Materials and methods

All the reagents used in this work were of analytical or LC-MS grade and were purchased from Sigma-Aldrich unless stated otherwise.

Patients, sample collection

Unstimulated saliva samples were collected from 108 donors between 9 a.m. and 11 a.m. at the Faculty of Dentistry, University of Debrecen. Patient enrollment, sample collection and processing were carried out respecting the Declaration of Helsinki. Ethical approval was obtained from the University of Debrecen Ethics Committee (No. 3385–2011) and the subjects gave written informed consent. In parallel to sample collection a questionnaire containing questions on smoking habits, alcohol consumption was filled out by the patients. Patients were asked to avoid eating, drinking, smoking, or using oral hygiene products for at least 1 hour before sample collection.

A two-step sample collection was applied: 1) the test set (collection between 2011.06.30.-2012.04.13.) contained 29 OSCC, 25 age-matched and 8 young controls for method development and biomarker identifications and 2) a reference set (collection between 2013.05.09–2016.02.29) containing 26 OSCC, 12 age-matched and 7 young controls for biomarker verification. Saliva samples were kept on ice throughout the collection and processing—no more than 60 minutes elapsed from sample collection to freezing. Samples of the test set were centrifuged at 4100 x g for 15 min at 4˚C at the Genomic Medicine and Bioinformatics Core Facility (University of Debrecen). The supernatants were transferred to fresh tubes and the aliquots were stored at -70˚C until further processing. The samples of the reference set were filtered using a PVDF membrane-containing filter unit (5 μm pore size, Millipore SLSV025LS) and the filtered saliva was aliquoted and stored at -70˚C until further processing. All donors were patients of the University of Debrecen, Faculty of Dentistry. Consecutive patients with diagnosed OSCC were recruited into the study. Age-matched controls were consecutive patients admitted to the Faculty of Dentistry for regular dental checkup. The young controls were students of the University of Debrecen admitted to the Faculty of Dentistry for regular dental checkup. OSCC was diagnosed by histopathological evaluation. Treatment was started based on positive histology result and was not influenced by saliva sample collection and evaluation. Periodontal condition was evaluated by a periodontist from Department of Periodontology; none of the patients and healthy volunteers had diabetes mellitus, human papilloma virus infection or any autoimmune diseases. The study population was a consecutive series of patients and volunteers according to the above presented criteria.

Study design

In this prospective study we did not compare two laboratory methods rather we wanted to apply the methodology of proteomics to determine proteins with high sensitivity and specificity in saliva samples from patients with OSCC. Data collection was planned before sampling and performing the examinations. Three types of examinations were applied according to the Fig 1. During study design the CPTAC guidelines were followed: first; SRM-based biomarker verification was carried out followed by the ELISA analysis of the three selected potential biomarkers on larger patient cohort.

The samples for the Luminex assay and SRM-based assay were randomly selected from the test set of samples, and the samples for validation by ELISA were also randomly selected from the reference set of samples (S1 Table).

All the clinical evaluations of patients and controls were done by expert health care professionals (IT and AS). The laboratory examinations were done by well-trained, graduated

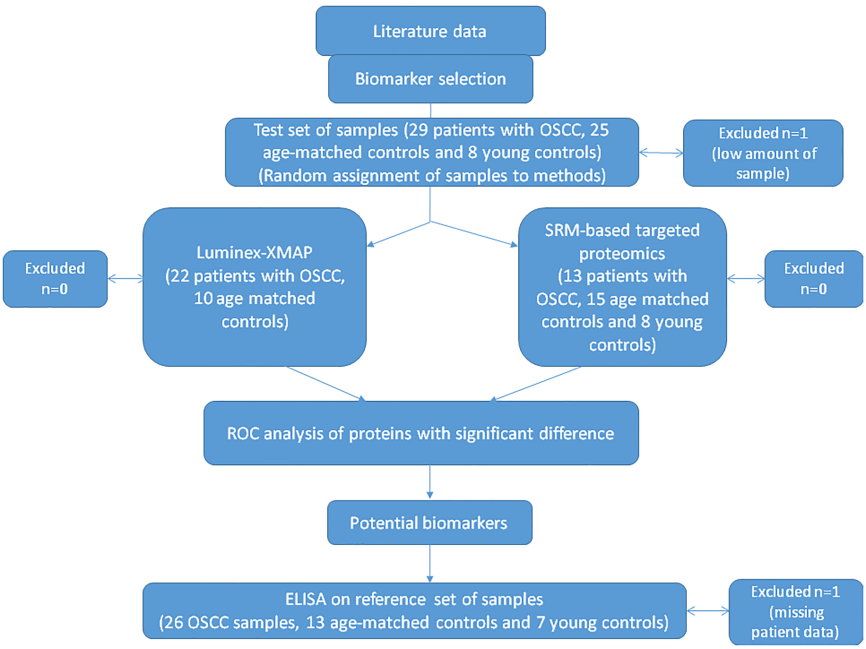


Fig 1. Study design.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282.g001

molecular biologists (GK, PL, BM, and EC). This was a non-interventional study and the results of the performed methods did not influence in any means the treatment of patients. The sampling procedure was non-invasive and completely harmless to the study subjects. Therefore, no adverse events were related to performing the laboratory examinations.

Cytokine assay

The multiplex immunobead Luminex x-MAP-based cytokine assay was carried out on a Custom 6plex Milliplex kit (Merck-Millipore) containing antibodies against IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α and VEGF. 25 μl of the saliva samples of patients with OSCC and age-matched controls were analyzed in duplicates. The assay was carried out based on the protocol provided by the manufacturer and the data acquisition was done on BioPlex 2.0 Workstation (Bio-Rad) operated by the Bioplex Manager 4.0 software. The level of IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α and VEGF was calculated by the Bioplex Manager software based on the recorded 7-point calibration curve. For curve fitting a logistic regression model was used.

Design of SRM-based targeted proteomics method

The amino acid sequences of the examined proteins were utilized from the UniProt database (www.uniprot.org) and were subjected to *in silico* trypsin digestion. In order to determine the unique protein-specific tryptic sequences BLASTp analysis (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) was carried out searching the NCBI non-redundant protein sequence database. SRM transition design was performed by the Skyline software [18] (www.brendanx-uw1.gs.washington.edu) on the protein-specific tryptic peptide sequences. All possible transitions of singly charged "y" ions were tested on digested saliva samples from patients suffering from OSCC. Peptides which gave reproducible SRM spectra with good peak shape were chosen for further analyses and their stable isotope-labeled synthetic forms were obtained from the JPT Peptide Technologies GmbH, Germany. The quality of the synthetic peptides was assessed in our laboratory by

mass spectrometry analyzes. The SRM spectra of all fragment ions were recorded and the two best transitions were selected for further analyzes.

Sample preparation for mass spectrometry

200 μl filtered saliva was dried in speedvac and redissolved in 50 mM ammonium bicarbonate buffer. Protein concentration of the samples was determined using the Bradford method [19]. Sample blocking was carried out before trypsin digestion; one randomly selected OSCC sample was grouped with one randomly selected age-matched and one young control sample and the groups were processed together on the same day. The proteins were denatured with 6 M urea and then reduced with 10 mM dithiothreitol. The samples were alkylated with 20 mM iodo-acetamide and diluted with 25 mM ammonium bicarbonate in order to decrease the urea concentration to 1 M. Trypsin digestion was performed at 37°C overnight using MS grade modified trypsin (ABSciex) in 1:25 enzyme to protein ratio. The digested samples were dried in speedvac and redissolved in 1% formic acid. The samples were desalted using Pierce C18 Tips (Thermo Scientific) and the eluates were dried and dissolved in 1% formic acid.

Mass spectrometry analysis

SRM-based analysis of saliva samples were carried out on a 4000 QTRAP (ABSciex) mass spectrometer using a NanoSpray II MicroIon Source and controlled by the Analyst 1.4.2 software (ABSciex). The spray voltage was 2800V, the ion source gas was 50 psi, the curtain gas was 20 psi and the source temperature was 70°C. The dwell time was 20 msec and the cycle time was 1.7 sec allowing the collection of approximately 15 data points/chromatographic peak. The chromatographic separation was done on an EasynLC II system (Bruker) and the peptide mixture was first loaded and desalted onto an in-line trap column (5 x 0.3mm, 5μm particle size, 300 Å pore size Zorbax 300SB-C18,) followed by separation on a Zorbax 300SB-C18 analytical column (150 mm x 75μm 3.5μm particle size, 300 Å pore size) using a 90 min acetonitrile/water gradient with a slow increase in acetonitrile concentration from 0% to 100% during 60 min. Solvent A was 0.1% formic acid in LC water, solvent B was LC acetonitrile containing 0.1% formic acid.

For SRM analysis 20 μg digested protein spiked with the stable isotope-labeled reference peptides was introduced to the mass spectrometer. All SRM analyses were carried out in duplicates.

ELISA

Each saliva sample from patients with OSCC, matched control and young control subjects were analyzed in duplicate by ELISA using Human ELISA Kit. The concentration of IL-6 and thioredoxin (EK0410 and EK1254, respectively, Boster Biological Technology Co., Pleasanton, USA) and S100A9 (E-EL-H1290, Elabscience Biotechnology Co., Wuhan, China) in saliva were determined by sandwich enzyme-linked immune-sorbent assay technique according to manufacturer's protocol. Absorbance was measured at 450 nm and concentrations were calculated based on the recorded 6-point (thioredoxin and S100A9) and 7-point (IL-6) calibration curves, respectively.

Data analysis

The SRM data were analyzed using the Skyline software [18]. All data where the AUC value was less than 10 were excluded from further analyses. The Skyline data are publicly available through the Panorama [20] web site:

(https://panoramaweb.org/labkey/project/University%20of%20Debrecen/OSCC%20saliva/begin.view?)

The primary data were transformed into appropriate format of MSstats R-package [21–23] by an in-house developed software. Before the statistical analysis peptides with insufficient amount of data across the set of samples were removed and for further analyses only those samples were used where both technical replicates were recorded. After normalization based on heavy standards and log2 transformation of measured abundances the group differences were investigated by mixed-effect variance analysis [22,24] for all proteins. The groups were used as the fixed effect and the subject level variance were modeled as random effects. The raw p-values of group differences were adjusted by the Benjamini and Hochberg type false discovery rate (FDR) method for multiple testing issues [25]. Besides the adjusted p-values the log2 fold changes, standard error and T values were examined. For evaluation of test performances multivariate receiver operating characteristic (ROC) curve analyses [26] were constructed by the Epi R-package [27], the accuracy and the 95% confidence intervals were calculated.

Results and discussion

Detection of salivary biomarkers which can help in the early diagnosis of OSCC is of high importance in improving survival rates of patients with OSCC. More than 35 proteins were identified by different groups as potential salivary biomarkers but a high variability in the results was observed [28]. Protein biomarkers identified in one population may not necessarily be suitable in another population. For example, IL-8 was identified as a biomarker in the USA [12,29–32], India [13] and Serbia [33] but not in Japan and Iran [34,35]. Similarly, S100A9 proved to be a suitable OSCC biomarker in the USA but not in China [36,37]. In USA catalase was shown to be biomarker by Hu et. al. [36] but not by de Jong et. al. [38]. The difference of the useful biomarkers studied in different populations (Table 1) raises the question if biomarkers validated in one population have predictive value in another population [12,29–37,39–50,38,51–60]. The prevalence of OSCC in Hungary is the highest in Europe so our aim was to examine if some of the previously described OSCC biomarkers can be used in the Hungarian population.

Based on literature data, 14 proteins were chosen and their levels were examined in the saliva of patients with OSCC and controls originating from the North-Eastern part of Hungary. Oral hygiene of age-matched controls was quite poor, characterized by the presence of various oral inflammatory conditions, independently from the presence of OSCC, as expected from earlier stomatoepidemiologic studies investigating this population [61,62]. Therefore, recruitment of healthy young controls with good oral hygiene, absent from oral inflammatory lesions was considered important.

Multiplex analyses were carried out; the level of IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α and VEGF was examined using a custom Luminex assay taking the benefit of high sensitivity of the antibody-based methods. We have chosen these cytokines as far as their levels were observed to be elevated in saliva from patients with OSCC compared to the levels observed in controls [12,29–31,33–35,40,46]. However, in some other studies no significant changes could be observed in the levels of IL-6 and IL-8 [29,34,35]. In order to examine the level of catalase, profilin-1, S100A9, CD59, galectin-3-bindig protein, CD44 and keratin-19 identified as biomarkers by different groups [36,50,54,63], targeted proteomics method was developed and optimized.

After careful examination of the recorded metadata originating from each patient, a considerable difference regarding the alcohol consumptions and smoking habits between the groups was observed. Smoking was more abundant in patients with OSCC; they consumed more

Table 1. List of examined salivary protein biomarkers for OSCC in different countries. The proteins included in the studies carried out in different countries are indicated. The proteins in bold were found to be potential biomarkers for OSCC. The abbreviations of protein names are used according to gene name.

Country	Examined proteins	Reference
Brazil	**C1R, C3, C4B, CFB, FAM49B, LCN2, LRG1, SERPINA1, SLPI, TAGLN2**	[16]
China	**CEACAM5, S100A7, S100A8**, S100A9	[37,59]
Croatia	**FGF2, IL6**	[51]
Hungary	CAT, CD44, CD59, IL1A, IL1B, **IL6,** IL8, KRT19, **LGALS3BP**, PROF1, **S100A9**, TNF, TXN, VEGF	present study
India	**LDH**, MUC16, IL-8**	[13,58,64]
Iran	IL1A, **IL6**, IL8, TNF	[35]
Israel	**ALB, CEACAM5**, **CCNDBP1, KRT19,** EGFR, **IGG, IGF1, LDH, MKI67**, **MMP2, MMP9, MUC16, OGG1, SRC, SERPINB5**, **sIgA**, SERPINB3**, **TPA****	[54–56]
Italy	**STATH, BIRC5**	[52,53]
Japan	**DEFA1, IL1B**, **IL6,** IL8, SPP1	[34,39,40]
Serbia	**IL1B, IL8, M2BP**	[33]
Taiwan	**ALB, AMY**, ANXA2, APOA1, APOA2, APOA4, C4BPA, C6, C9, CCNDBP1, CD109, CHIT1**, **EGFR, EPHX1, FSCN1, FABP, GSTM1, HEP2, HEXA, HIST1H2AA, HPRT, HSD17B4, ICAM3, IGHA2, IGHV1-2, IGKV1D-12, IGKV4-1, IGLV1-47, ITIH2, ITIH4, NKIRAS1, KNG1, PRCP, RETN, RPL7, S100A8, SERPINA6, SLC4A1, TF, TMEM132A, TUBA1C, VTN, ZN497, ZN501**	[42–45]
United Kingdom	**P53ab**	[41]
USA	**ACT**, FGF2**, **CAT*, CD44, CD59, EDN1,** H1F0, **IL1A, IL1B, IL6, IL8**, INL, KRT19, **LGALS3BP**, MSN, **MYL**, PROF1**, RAB7A, S100A12, S100A7, **S100A9,** S100P, **TNF, VEGFA**	[29–32,36,46–50,38,65]

*In case of catalase protein there are controversial data; in the study carried out by Hu et. al. [36] it was reported as potential biomarker but the study carried out by de Jong et. al. [38] could not confirm this finding.

** Specific isoforms are undistinguishable.

*** Mixture of fragments of cytokeratins 8, 18 and 19.

ACT: actin, ALB: serum albumin, AMY: α-amylase, ANXA2: annexin A2, APOA1: apolipoprotein A1, APOA2: apolipoprotein A2, APOA4: apolipoprotein A–IV, BIRC5: Baculoviral IAP repeat-containing protein 5, C1R: complement C1r subcomponent, C4B: complement C4-B, C4BPA: C4b-binding protein α chain, C3: complement C3, C6: complement C6, C9: complement C9, CAT: catalase, CCNDBP1: cyclin D1-binding protein 1, CD44: CD44 antigen, CD59: CD59 antigen, CD109: CD109 antigen, CEACAM5: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5, CFB: complement factor B, CHIT1: chitotriosidase-1, DEFA1: human neutrophil defensin 1, EGFR: epidermal growth factor receptor, EDN1: endothelin-1, EPHX1: epoxide hydrolase 1, FABP4: fatty acid-binding protein adipocyte, FAM49: protein FAM49B, FGF2: basic fibroblast growth factor 2, FSCN1: fascin, GSTM1: glutathione S-transferase Mu1, H1F0: histone H1.0, HEP2: heparin cofactor 2, HEXA: β-hexosaminidase subunit α, HIST1H2AA: histone H2A type 1-A, HPRT: haptoglobin-related protein, HSD17B4: peroxisomal multifunctional enzyme type 2, ICAM3: intercellular adhesion molecule 3, IGF1: insulin-like growth factor I, IGG: immunoglobulin G, IGHA2: immunoglobulin alpha-2 chain C region, IGHV1-2: immunoglobulin heavy variable 1–2, IGKV1D-12: immunoglobulin kappa variable 1D-12, IGKV4-1: immunoglobulin kappa variable 4–1, IGLV1-47: immunoglobulin lambda variable 1–47, IL1A: interleukin-1α, IL1B: interleukin-1β, IL6: interleukin-6, IL8: interleukin-8, INL: involucrin, ITIH2: inter-α-trypsin inhibitor heavy chain H2, ITIH4: inter-α-trypsin inhibitor heavy chain H4, KNG1: kininogen-1, KRT19: cytokeratin-19, LCN2: neutrophil gelatinase-associated lipocalin, LDH: lactate dehydrogenase, LGALS3BP: galectin-3-binding protein, LRG1: leucine-rich alpha-2-glycoprotein, MKI67: proliferation marker protein Ki-67, MMP2: matrix metalloproteinase 2, MMP9: matrix metalloproteinase 9, MSN: moesin, MUC16: cancer antigen 125, MYL: myosin regulatory light polypeptide, NKIRAS1: NF-kappa-B inhibitor-interacting Ras-like protein 1, OGG1: N-glycosylase/DNA lyase, SPP1: osteopontin, SRC: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, P53ab: p53 autoantibody, PRCP: lysosomal Pro-X carboxypeptidase, PROF1: profiling 1, RAB7A: Ras-related protein Rab-7a, RETN: resistin, RPL7: 60S ribosomal protein L7, S100A7: protein S100-A7, S100A8: protein S100-A8, S100A9: protein S100-A9, S100P: protein S100-P, SERPINA1: alpha-1-antitrypsin, SERPINA6: corticosteroid binding globulin, SERPINB3: serpin B3, SERPINB5: serpin B5, sIgA: secreted immunoglobulin A, SLC4A1: band 3 anion transporter, SLPI: antileukoproteinase, STATH: statherin, TAGLN2: transgelin-2, TF: serotransferrin, TMEM132A: transmembrane protein 132A, TNF: tumor necrosis factor, TUBA1C: tubulin-α-1C chain, TPA: tissue polypeptide antigen, TXN: thioredoxin, VEGFA: vascular endothelial growth factor A, VTN: vitronectin, ZN497: zinc finger protein 497, ZN501: zinc finger protein 501.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282.t001

alcohol and more of them consumed alcohol on a daily base. Accordingly, the cariological and periodontal status of patients was poor; the DMFT, DMFS, gingival index and plaque index values were higher in the OSCC group compared to controls (Table 2).

Antibody-based analysis of potential OSCC salivary biomarkers

Investigating salivary appearance of proinflammatory cytokines in OSCC patients is relevant and clinically meaningful. Cancer and chronic inflammation are interrelated with a link represented by cytokines and chemokines [66]. Both tumor cells and tumor-infiltrating immune cells produce these regulatory compounds offering thereby multiple therapeutic targets for immunomodulatory treatment of patients with oral and head and neck squamous cell carcinoma [67–69]. However, the source of the investigated cytokines in the saliva of patients with chronic oral inflammation, independent from OSCC, can be from immune cells and stimulated gingival and oral mucosal tissue [70].

The saliva samples of randomly selected 26 patients and 9 age-matched controls were analyzed in duplicates and the levels of IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α and VEGF was determined (Fig 2). In our study the levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α were significantly elevated in the OSCC group compared to the age-matched controls being in accordance with the previous results reported by different groups [28,33]. Examining the distribution of data points, it was observed that the results for IL-1β in the lower concentration range overlapped between the OSCC and control groups and despite the significant difference they could not discriminate between the two groups. Based on our results, it seems that among the studied cytokines only IL-6 and TNF-α can be used as potential biomarkers in the Hungarian population.

IL-6 is expressed by OSCC tumor cells and stromal cells and it has been shown to play a crucial role in OSCC carcinogenesis, progression and recurrence involving the IL-6, IL-6R, STAT3 pathway [71–73]. Using a different signal transduction pathway resulting in NF-κB activation, TNF-α has also been related to oral carcinogenesis [74]. Factors, known to be associated with poor oral hygiene and oral inflammation, such as advanced age and smoking have been shown to correlate with elevated salivary IL-6 levels [75]. Therefore, not every cytokine may serve as a suitable diagnostic salivary biomarker of OSCC in different populations.

The age-matched controls did not show any signs of precancerous lesions in their oral cavity but as a result of oral inflammatory conditions we could not see any significant differences in the levels of other cytokines between the OSCC and control groups. These results might be explained by the fact that oral hygiene in the age matched group was compromised resulting in inflammation without any signs or symptoms of OSCC. Cheng and coworkers have demonstrated that the levels of IL-6 and IL-8 were significantly higher in the saliva of patients with OSCC compared to those who have chronic periodontitis [46]. Our results confirmed these findings. IL-6 level proved to be significantly higher in patients with OSCC than in controls exhibiting a compromised oral health condition and the same trend was true in case of IL-8 (Fig 2). OSCC patients formed two subgroups with respect to salivary IL-8 concentration, 7 patients had above-average and 19 patients had below average IL-8 levels. Similar to IL-1β, IL-8 level in the lower concentration range overlapped between the OSCC and control groups. Although salivary levels of IL-8 tended to be higher in OSCC patients than in age-matched controls, the difference in this cohort was not significant. A similar dual distribution of serum IL-8 concentration and IL-8 expression by the tumor cells in patients with OSCC was observed recently by Fujita et al. High serum IL-8 concentrations, and intensive IL-8 expression by tumor cells were significantly correlated with poor disease outcome measures [76].

Table 2. Patient data.

	Test set					Reference set		
	OSCC patients (BioPlex)	Age-matched control patients (Bioplex)	OSCC patients (mass spectrometry)	Age-matched control patients (MC—mass spectrometry)	Young healthy control patients (HC—mass spectrometry)	OSCC patients (ELISA)	Age-matched control patients (MC-ELISA)	Young healthy control patients (YC-ELISA)
Total number	22	10	13	15	8	26	12	7
Age	61.9±7.8 (49–77)	63.5±6.7 (53–73)	60.8±7.5 (52–77)	64.9±10.4 (52–87)	24.3±1.9 (22–28)	58.2±9.7 (44–77)	59.3± 5.6 (50–68)	24.4± 1.3 (22–26)
Sex M/F	18/4	9/1	11/2	11/4	3/5	20/6	3/9	4/3
Socioeconomical status								
· **low/middle/ high**	6/14/0	2/6/2	4/7/0	0/10/5	0/0/8	7/17/1	2/8/0	0/0/5
Smoking habit								
· **Never smoker**	5%	40%	7.7%	79%	62.5%	4%	41%	43%
· **Ex-smoker**	22%	10%	23%	21%	12.5%	23%	25%	14%
· **Current smoker**	68%	50%	61.6%	-	12.5%	69%	17%	14%
· **No response**	5%	-	7.7%	-	12.5%	4%	17%	29%
Alcohol consumption								
· **Never/rarely**	2/3	2/1	1/0	4/3	0/3	4/6	4/2	0/3
· **Monthly/ weekly**	4/4	4/3	4/1	3/3	3/1	3/8	0/4	2/0
· **Daily**	8	-	6	0	0	4	0	0
· **Intake (mL/day)**	beer 285 mL/day/ person	beer 171 mL/day/person	beer 426 mL/day/person	beer 30 mL/day/person	beer 33 mL/day/person	beer 162 mL/day/ person	beer 171 mL/day/person	beer 0 mL/day/person
	wine / champagne 94 mL/day/ person	wine / champagne 34 mL/day/person	wine / champagne 130 mL/day/person	wine / champagne 11 mL/day/person	wine / champagne 11 mL/day/person	wine / champagne 84 mL/day/ person	wine / champagne 31 mL/day/person	wine / champagne 23 mL/day/person
	spirits 25 mL/day/ person	spirits 0 mL/day/person	spirits 28 mL/day/person	spirits 9 mL/day/person	spirits 10 mL/day/person	spirits 24 mL/day/ person	spirits 0 mL/day/person	spirits 0 mL/day/person
Periodontal assessment								
· **Gingival index**	0.7	0.3	0.9	0.5	0.5	0.7	0.2	0.3
· **Plaque index**	1.4	0.4	1.6	0.3	0.2	1.3	0.6	0.3
Cariological assessment								
· **DMFT**	23.1	19.7	23	18.9	7.5	26.9	26	8.3
· **DMFS**	99.8	81.6	67.5	79.9	17.5	121.6	117.8	18.0
Comorbidities								
·**Hypertonia +Cardiovascular disease**	1	2	1	1	-	6	2	-
· **Hypertonia**	4	2	4	4	-	8	3	-
· **Cardiovascular disease**	6	0	4	0	-	2		-

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282.t002

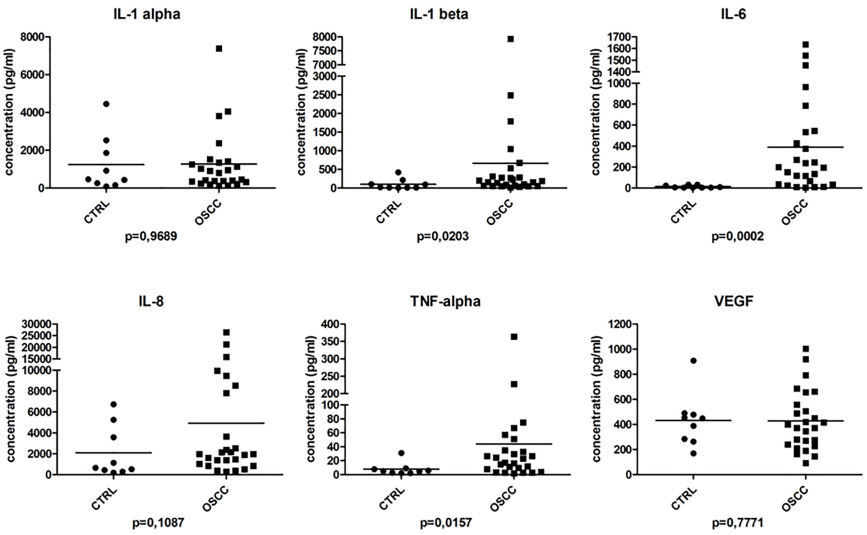


Fig 2. Salivary cytokine levels determined with Luminex-based multiplex assay. The concentration (pg/ml) of the studied cytokines is indicated in case of control (CTRL) and OSCC group. Below each graph the p value is indicated.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282.g002

Design of targeted proteomics method

An SRM-based targeted mass spectrometry method was designed for the examination of catalase, profilin-1, thioredoxin, protein S100A9, CD59 glycoprotein, CD44 antigen, galectin-3-bindig protein and keratin-19. The sequences were retrieved from the Uniprot database (P04040, P07737, Q99757, P06702, P13987, P16070, Q08380, and P08727, respectively) and *in silico* digested with trypsin. The tryptic peptides were searched against the NCBInr database using the Blastp software in order to identify the peptides which are specific for the studied proteins. Using the protein-specific sequences SRM transitions have been designed with the help of the Skyline software. The stabile isotope-labeled (SIL) synthetic counterparts of the specific peptides were ordered and spiked into the samples in known amounts. For collision energy (CE) and declustering potential (DP) optimization the synthetic peptides were used. All the possible transitions of singly charged "y" ions were optimized with the help of the Skyline software and the best two transitions per peptide were selected. The optimized parameters (Table 3) were used for the SRM method development and further used for the examination of saliva samples.

In order to gain information regarding the concentration range where the peptide amount introduced into the mass spectrometer is linear with the intensity of the signal recorded, a dilution series of approximately 60 fmol-1 pmol of SIL peptides spiked into saliva samples were analyzed. For keratin-19 and CD44 antigen peptides no linearity could be observed. For galectin 3 binding protein LASAYGAR, protein S100A9 LTWASHEK, thioredoxin VGEFSGANK and profilin-1 TLVLLMGK peptides the curve was linear between approximately 120 fmol-0.5 pmol range, while in case of catalase LNVITVGPR, CD59 glycoprotein AGLWVYNK peptides the linear range was slightly broader; between approximately 120 fmol-1 pmol. The thioredoxin TAFQEALDAAGDK peptide shows linearity between approximately 60 fmol-0.5 pmol concentrations, while the whole studied range was covered only by protein S100A9 DLQNFLK peptide (approximately 60 fmol-1 pmol concentrations). The broad concentration range observed permits the study of high-amplitude changes often present in biological systems.

Table 3. Optimized SRM parameters used for the mass spectrometric examination of salivary proteins. The Q1 and Q3 m/z values, the type of "y" ion used, the dwell time, declustering potential (DP) and collision energy (CE) is indicated in case of each studied peptide.

Protein	Peptide	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Ion	Dwell time (msec)	DP	CE
Catalase	LNVITVGPR	484.798	642.393	y6	20	63.0	23.4
		484.798	529.309	y5	20	63.0	23.4
		484.798	428.261	y4	20	63.0	23.4
	LNVITVGPR*	489.802	652.401	y6	20	63.0	23.4
		489.802	539.317	y5	20	84.8	23.4
		489.802	438.269	y4	20	84.8	23.4
CD44 antigen	NDVTGGR	359.677	489.277	y5	20	84.8	16.2
		359.677	390.209	y4	20	84.8	16.2
	NDVTGGR*	364.681	499.286	y5	20	84.8	16.2
		364.681	400.217	y4	20	84.8	16.2
	TEAADLCK	425.702	620.307	y6	20	63.1	20.0
		425.702	549.270	y5	20	63.1	20.0
		425.702	478.232	y4	20	63.1	20.0
	TEAADLCK*	429.709	628.321	y6	20	63.1	20.0
		429.709	557.284	y5	20	66.6	20.0
		429.709	486.247	y4	20	66.6	20.0
CD59 glycoprotein	AGLQVYNK	446.747	651.346	y5	20	66.6	21.2
		446.747	523.287	y4	20	66.6	21.2
	AGLQVYNK*	450.755	659.360	y5	20	66.6	21.2
		450.755	531.301	y4	20	66.6	21.2
Keratin-19	APSIHGGSGGR	498.254	627.295	y7	20	79.9	24.1
		498.254	490.236	y6	20	79.9	24.1
		498.254	433.215	y5	20	79.9	24.1
		498.254	376.193	y4	20	79.9	24.1
	APSIHGGSGGR*	503.258	637.304	y7	20	64.3	24.1
		503.258	500.245	y6	20	64.3	24.1
		503.258	443.223	y5	20	64.3	24.1
		503.258	386.202	y4	20	64.3	24.1
Profilin-1	TLVLLMGK	437.775	660.411	y6	20	60.6	20.7
		437.775	561.342	y5	20	60.6	20.7
		437.775	448.258	y4	20	60.6	20.7
	TLVLLMGK*	441.782	668.425	y6	20	60.6	20.7
		441.782	569.357	y5	20	63.0	20.7
		441.782	456.273	y4	20	63.0	20.7
	SSFYVNGLTLGGQK	735.882	887.494	y9	20	63.0	37.7
		735.882	773.451	y8	20	63.0	37.7
		735.882	603.346	y6	20	84.8	37.7
	SSFYVNGLTLGGQK*	739.890	895.508	y9	20	84.8	37.7
		739.890	781.465	y8	20	84.8	37.7
		739.890	611.360	y6	20	84.8	37.7

(*Continued*)

Table 3. (*Continued*)

Protein	Peptide	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Ion	Dwell time (msec)	DP	CE
Protein S100A9	DLQNFLK	439.242	649.366	y5	20	84.8	20.8
		439.242	521.308	y4	20	84.8	20.8
	DLQNFLK*	443.249	657.380	y5	20	63.1	20.8
		443.249	529.322	y4	20	63.1	20.8
	LTWASHEK	486.250	757.362	y6	20	63.1	23.5
		486.250	571.283	y5	20	63.1	23.5
		486.250	500.246	y4	20	66.6	23.5
	LTWASHEK*	490.257	765.376	y6	20	66.6	23.5
		490.257	579.297	y5	20	66.6	23.5
		490.257	508.260	y4	20	66.6	23.5
Thioredoxin	TAFQEALDAAGDK	668.822	760.383	y8	20	66.6	33.9
		668.822	689.346	y7	20	66.6	33.9
	TAFQEALDAAGDK*	672.829	768.397	y8	20	79.9	33.9
		672.829	697.360	y7	20	79.9	33.9
	VGEFSGANK	454.727	623.314	y6	20	79.9	21.7
		454.727	476.246	y5	20	79.9	21.7
	VGEFSGANK*	458.734	631.328	y6	20	64.3	21.7
		458.734	484.260	y5	20	64.3	21.7
Galectin-3-binding protein	LASAYGAR	404.719	624.310	y6	20	64.3	18.8
		404.719	466.240	y4	20	64.3	18.8
	LASAYGAR*	409.723	634.318	y6	20	60.6	18.8
		409.723	476.249	y4	20	60.6	18.8

* indicates the stable isotope-labeled, heavy amino acid.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282.t003

Targeted proteomic analysis of the selected potential OSCC biomarkers

The SRM transitions for endogenous peptides and SIL counterparts were recorded and using the amount of the SIL peptide as a reference the relative levels of endogenous peptides were calculated. In order to assess which peptides and which transitions can be successfully utilized in an eventual screening, saliva samples of randomly selected 15 patients with OSCC, 15 age-matched controls (MC) and 10 healthy young controls (HC) were analyzed using the developed targeted mass spectrometry method. In all cases where the area under the curve values for the transitions were less than 10, the results were omitted and not used for further calculations.

Some of the transitions did not give consistent results in the analyzed samples so they were omitted from the calculations. This means that for CD44 antigen, CD59 glycoprotein, galectin-3-bindig protein and keratin-19 the best transitions used during the optimization did not provide good quality data in most of the analyzed saliva samples so they were not used for the statistical analysis. The catalase LNVITVGPR peptide, the SSFYVNGLTLGGYK and TLVLLMGK peptides of profilin-1, the DLYNFLK peptide from protein S100A9 and TAFQEALDAAGDK peptide from thioredoxin gave data of acceptable quality in most of the samples and were further used for statistical analysis.

The statistical analyses indicated no significant differences between age-matched (MC) and healthy young (HC) controls (Fig 3A) while significant differences were observed in case of S100A9 and thioredoxin between patients with OSCC and controls (Fig 3B–3D, Table 4). These data suggest that these changes were specific for OSCC and were not age-dependent. In

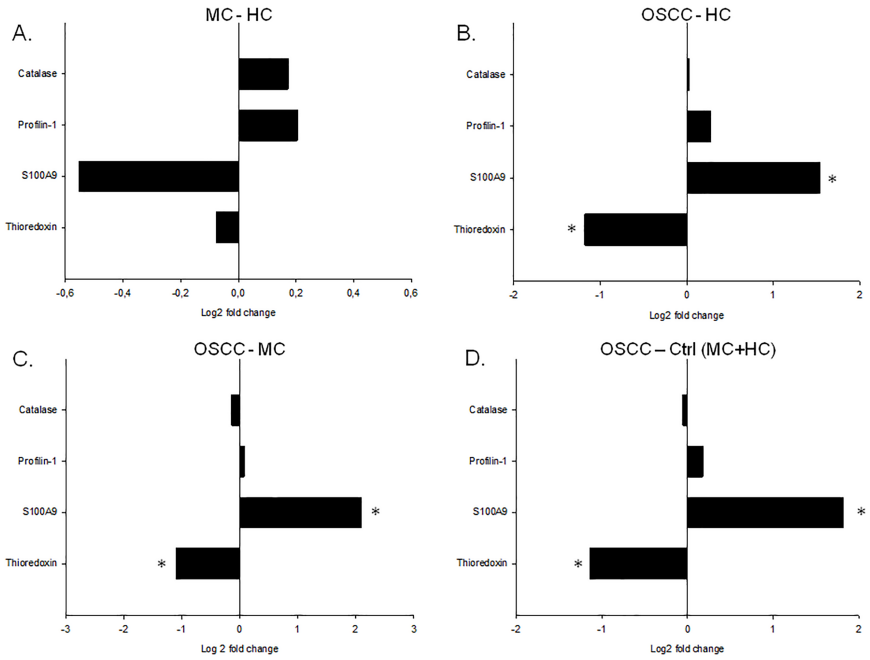


Fig 3. Quantitative analysis of salivary proteins by SRM. The log2 fold change in case of thioredoxin, S100A9, profilin and catalase is shown. The comparison between the (A) age matched controls (MC) and healthy controls (HC), (B) OSCC group and healthy control (HC) group, (C) OSCC group and age matched (MC) group and (D) OSCC group and both healthy and matched control groups is indicated. * indicates significant change, $p<0.05$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282.g003

the saliva of patients with OSCC the level of S100A9 was significantly elevated while the level of thioredoxin was significantly reduced compared to both healthy young and age matched controls. S100A9 is a general marker of cancerous lesions, it was identified in different tumors including tumors of tongue, prostate, breast, lung, in colorectal cancer, gastric cancer, squamous cervical cancer, etc. and it is considered as a primary target for drug development [77–84]. Thioredoxin is part of the antioxidant system and it was shown to have increased expression in tumor samples [85–87]. We do not have information regarding the thioredoxin levels in the salivary gland or tumor tissue itself, but it cannot be excluded that the reduction of thioredoxin levels in saliva may arise from the fact that this protein accumulates in the tissues resulting in a reduced secretion.

ROC analysis

The results of either the mass spectrometry-based or Luminex-based experiments provided information about the changes of the studied proteins in patients with OSCC compared to those in

Table 4. Results of mixed-effect variance analysis of OSCC and MC group differences. The log2 fold change (logFC) standard error (SE), T values (Tvalue) and the FDR corrected p-values are shown.

Protein	Log2FC	SE	Tvalue	Adjusted p-value
Catalase	-0.14	0.25	-0.56	0.66
Profilin-1	0.07	0.17	0.44	0.66
S100A9	2.09	0.41	5.14	<0.0001
Thioredoxin	-1.10	0.39	-2.79	0.01

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282.t004

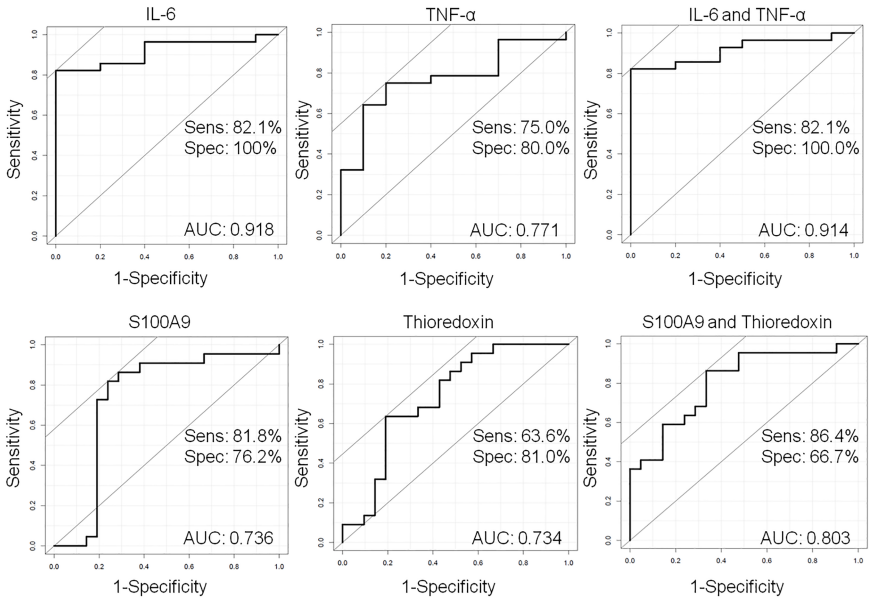


Fig 4. Estimation of predictive power of possible biomarkers using ROC curve analysis. The sensitivity (y axis) was plotted versus 1−specificity (x axis) in case of each potential biomarker alone or in combinations. The area under the curve is indicated on each pane. The sensitivity and specificity was calculated for each biomarkers and biomarker combination.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282.g004

the controls. To test which proteins with a significant difference between the studied groups can be used as possible biomarkers, a ROC curve analysis was performed and the area under the curve (AUC) was calculated. Values of AUC close to 1.0 suggest a perfectly performing biomarker; while values close to 0.5 indicate that the biomarker performs not better than random.

In our experiments the AUC value for S100A9 was 0.74 (accuracy 0.75, 95% confidence interval: 0.55–0.96) and for thioredoxin 0.73 (accuracy 0.79, 95% confidence interval: 0.61–0.96) suggesting equally performing potential biomarkers (Fig 4). In order to examine the sensitivity and specificity of the combination of S100A9 and thioredoxin multivariate ROC analysis was carried out. The S100A9 and thioredoxin together performed better than alone, the AUC value was 0.80 (accuracy 0.88, 95% confidence interval: 0.77–1.0) suggesting an additive effect of the two potential biomarkers on the discrimination of OSCC samples from the controls (Fig 4).

In the next step we wanted to examine the sensitivity and specificity of the IL-6 and TNF-α alone or in combination. The AUC for IL-6 was 0.92 (accuracy 0.92, 95% confidence interval: 0.83–1.0) and for TNF-α was 0.77 (accuracy 0.77, 95% confidence interval: 0.6–0.93), while the AUC for the combination of IL-6 and TNF-α was 0.91 (accuracy 0.91, 95% confidence interval: 0.83–1.0) (Fig 4). These results indicate that the IL-6 alone seems to be the best potential biomarker able to distinguish between the OSCC samples and controls as it was shown in most of the studies presented in the literature (Table 1).

Verification of the potential biomarkers using ELISA

The level of IL-6, S100A9 and thioredoxin was examined using quantitative ELISA according to the protocol provided by the manufacturers in the saliva samples of patients with OSCC, age-matched controls and young controls. The 46 samples of the reference set were analyzed in duplicates (Fig 5) but for the statistical analysis data for only 45 samples were used (one age-matched control sample was excluded because of missing patient data).

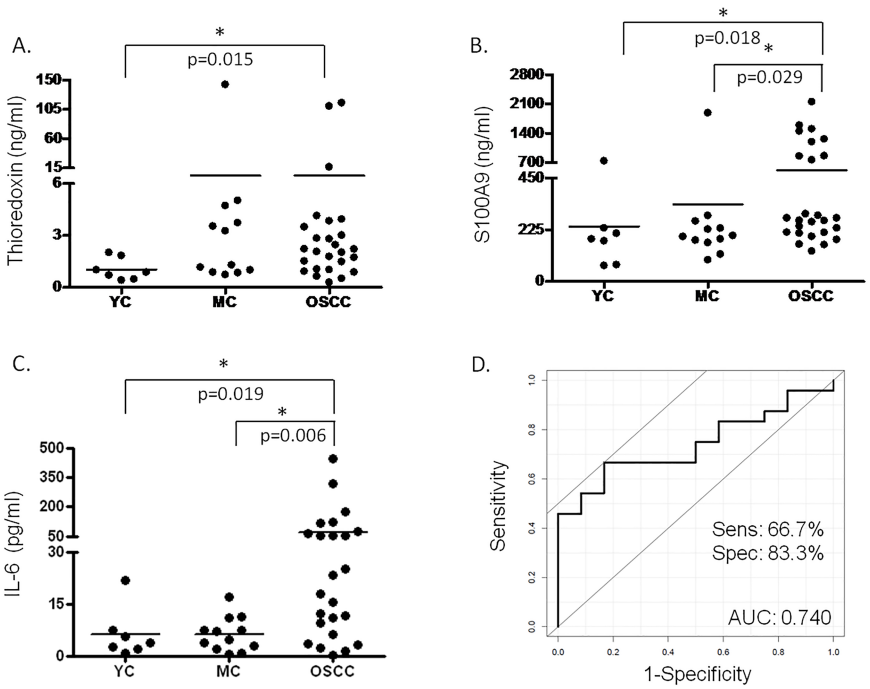


Fig 5. Salivary protein levels determined with ELISA. The salivary concentration of (A) thioredoxin, (B) S100A9 protein and (C) IL-6 is indicated in case of young healthy controls (YC), age matched controls (MC) and OSCC group. In cases where significant difference was observed the p value is indicated. (D) ROC analysis of the combined effect of IL-6 and S100A9 protein.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177282.g005

According to the validation experiments in case of IL-6 and S100A9 there was significant difference observed between the OSCC and young controls and OSCC and age-matched controls, while in case of thioredoxin the difference was significant only between OSCC and young controls. ROC analysis was performed for proteins having significantly different levels between the OSCC and age-matched control groups. The AUC for IL-6 was 0.708 with 50% sensitivity and 100% specificity and for S100A9 the AUC was 0.463, the sensitivity was 96% and specificity was 16%. This means that despite the previous good sensitivity and specificity results obtained on the test set, the analyses carried out on the reference set, on a larger sample cohort indicate that either IL-6 or S100A9 alone are not well-enough performing biomarkers. However, their combination with AUC of 0.74, 67% sensitivity and 83% specificity show a well performing biomarker combination. In order to improve the sensitivity and specificity of OSCC detection further research should be done and extension of the analyses on larger populations would be beneficial.

Conclusion

In this study we developed and optimized an SRM-based targeted proteomic approach for monitoring the level of salivary biomarker candidate proteins and we could identify and verify potential salivary protein biomarkers suitable for the Hungarian population.

Four out of 14 potential salivary protein biomarkers included in our study were shown to have significant differences between the control and OSCC groups and three of them proved worth using as potential biomarkers for the Hungarian population. The validation of IL-6, S100A9 and thioredoxin revealed the potential utility of combination of IL-6 and S100A9.

Our results provide further evidence to literature data demonstrating that general protein biomarkers for OSCC which can be applied world-wide are very hard to find. It should be

noted that on protein level there are discrepancies between the different studied groups which highlights the importance of population-tailored proteomics studies to find OSCC-specific protein biomarkers applicable for cost-effective screening purposes. In our opinion our findings are of remarkable importance since the incidence of OSCC is high and shows an increasing tendency not only in the old but in the young generation as well.

Supporting information

S1 Table. List of saliva samples used in the study. Samples in bold were used for both Bioplex and ELISA experiments.
(XLSX)

Acknowledgments

This work was supported in part by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences, TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0016 project implemented through the New Széchenyi Plan co-financed by the European Social Fund, and Hungarian Scientific Research Fund OTKA K105034. Gergő Kalló is receiver of Astellas Pharma Ltd. Fellowship in form of support for chemicals and consumables which does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The work of Dr. Mária Fera for sample collection is greatly acknowledged.

Author Contributions

Conceptualization: IM CK.

Data curation: ME EC.

Formal analysis: ME.

Funding acquisition: IM JT EC GK.

Investigation: IT PL EC BM GK.

Methodology: EC PL GK.

Project administration: EC IM.

Resources: AS IM EC IT PL ME.

Software: ME.

Supervision: IM EC JT.

Validation: BM.

Visualization: GK BM.

Writing – original draft: EC.

Writing – review & editing: IM CK JT.

References

1. SEER Cancer Statistics Review 1975–2007—Previous Version—SEER Cancer Statistics [Internet]. Available: http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2007/
2. Oral Cancer Facts—The Oral Cancer Foundation [Internet]. Available: http://www.oralcancer.org/facts/

3. La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Levi F. Trends in oral cancer mortality in Europe. Oral Oncol. 2004; 40: 433–439. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2003.09.013 PMID: 14969823
4. Garavello W, Bertuccio P, Levi F, Lucchini F, Bosetti C, Malvezzi M, et al. The oral cancer epidemic in central and eastern Europe. Int J Cancer. 2010; 127: 160–71. https://doi.org/10.1002/ijc.25019 PMID: 19882710
5. Zhang H, Dziegielewski PT, Biron VL, Szudek J, Al-Qahatani KH, O'Connell DA, et al. Survival outcomes of patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma treated with multimodal therapy: a multi-institutional analysis. J Otolaryngol Head Neck Surg. 2013; 42: 30. https://doi.org/10.1186/1916-0216-42-30 PMID: 23672952
6. Suba Z, Mihályi S, Takács D, Gyulai-Gaál S. [Oral cancer: morbus Hungaricus in the 21st century]. Fogorv Sz. 2009; 102: 63–8. PMID: 19514245
7. Bonifazi M, Malvezzi M, Bertuccio P, Edefonti V, Garavello W, Levi F, et al. Age-period-cohort analysis of oral cancer mortality in Europe: the end of an epidemic? Oral Oncol. 2011; 47: 400–7. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.06.010 PMID: 21402489
8. Walsh T, Liu JLY, Brocklehurst P, Glenny A-M, Lingen M, Kerr AR, et al. Cochrane Database of Systematic Reviews. The Cochrane database of systematic reviews. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1996.
9. Csősz É, Kalló G, Márkus B, Deák E, Csutak A, Tőzsér J. Quantitative body fluid proteomics in medicine—A focus on minimal invasiveness. J Proteomics. 2016; 1874–3919: 30364–5.
10. Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, de Jong EP, Griffin TJ, Basi DL, Hughes PJ, et al. Salivary proteomics in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Oral Dis. 2015; 21: 46–56. https://doi.org/10.1111/odi.12204 PMID: 24286378
11. Streckfus CF, Mayorga-Wark O, Arreola D, Edwards C, Bigler L, Dubinsky WP. Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer Invest. 2008; 26: 159–67. https://doi.org/10.1080/07357900701783883 PMID: 18259946
12. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Miller L, Ho V, Ondrey F. The feasibility of monitoring NF-κB associated cytokines: TNF-α, IL-1α, IL-6, and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus. Mol Carcinog. 2005; 44: 77–82. https://doi.org/10.1002/mc.20113 PMID: 16075467
13. Punyani SR, Sathawane RS. Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. Clin Oral Investig. 2012; 17: 517–524. https://doi.org/10.1007/s00784-012-0723-3 PMID: 22526890
14. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. Mol Syst Biol. 2008; 4: 222. https://doi.org/10.1038/msb.2008.61 PMID: 18854821
15. Pan S, Chen R, Brand RE, Hawley S, Tamura Y, Gafken PR, et al. Multiplex Targeted Proteomic Assay for Biomarker Detection in Plasma: A Pancreatic Cancer Biomarker Case Study. J Proteome Res. 2012; 11: 1937–1948. https://doi.org/10.1021/pr201117w PMID: 22316387
16. Kawahara R, Bollinger JG, Rivera C, Ribeiro ACP, Brandão TB, Leme AFP, et al. A targeted proteomic strategy for the measurement of oral cancer candidate biomarkers in human saliva. Proteomics. 2016; 16: 159–173. https://doi.org/10.1002/pmic.201500224 PMID: 26552850
17. Rodriguez H, Rivers R, Kinsinger C, Mesri M, Hiltke T, Rahbar A, et al. Reconstructing the pipeline by introducing multiplexed multiple reaction monitoring mass spectrometry for cancer biomarker verification: an NCI-CPTC initiative perspective. Proteomics Clin Appl. 2010; 4: 904–14. https://doi.org/10.1002/prca.201000057 PMID: 21137031
18. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. Bioinformatics. 2010; 26: 966–968. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054 PMID: 20147306
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248–54. PMID: 942051
20. Sharma V, Eckels J, Taylor GK, Shulman NJ, Stergachis AB, Joyner SA, et al. Panorama: a targeted proteomics knowledge base. J Proteome Res. 2014; 13: 4205–10. https://doi.org/10.1021/pr5006636 PMID: 25102069
21. Chang C-Y, Picotti P, Huttenhain R, Heinzelmann-Schwarz V, Jovanovic M, Aebersold R, et al. Protein Significance Analysis in Selected Reaction Monitoring (SRM) Measurements. Mol Cell Proteomics. 2011; 11: M111.014662–M111.014662.
22. Clough T, Thaminy S, Ragg S, Aebersold R, Vitek O. Statistical protein quantification and significance analysis in label-free LC-MS experiments with complex designs. BMC Bioinformatics. 2012; 13 Suppl 1: S6.

23. Choi M, Chang C-Y, Clough T, Broudy D, Killeen T, MacLean B, et al. MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. Bioinformatics. 2014; 30: 2524–6. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu305 PMID: 24794931

24. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. J Stat Softw. 2015; 67.

25. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing on JSTOR [Internet]. Available: http://www.jstor.org/stable/2346101?seq=1#page_scan_tab_contents

26. Shultz EK. Multivariate receiver-operating characteristic curve analysis: prostate cancer screening as an example. Clin Chem. 1995; 41: 1248–55. PMID: 7628115

27. Carstensen B, Plummer M. A Package for Statistical Analysis in Epidemiology. 2015; Available: https://cran.r-project.org/web/packages/Epi/index.html

28. Cheng Y-SL, Rees T, Wright J. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. Clin Transl Med. 2014; 3: 3. https://doi.org/10.1186/2001-1326-3-3 PMID: 24564868

29. St John MAR, Li Y, Zhou X, Denny P, Ho C-M, Montemagno C, et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2004; 130: 929–35. https://doi.org/10.1001/archotol.130.8.929 PMID: 15313862

30. Arellano-Garcia M, Hu S, Wang J, Henson B, Zhou H, Chia D, et al. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. Oral Dis. 2008; 14: 705–712. https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01488.x PMID: 19193200

31. Elashoff D, Zhou H, Reiss J, Wang J, Xiao H, Henson B, et al. Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2012; 21: 664–72. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-1093 PMID: 22301830

32. Korostoff A, Reder L, Masood R, Sinha UK. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. Oral Oncol. 2011; 47: 282–287. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.02.006 PMID: 21397550

33. Brinkmann O, Kastratovic DA, Dimitrijevic M V, Konstantinovic VS, Jelovac DB, Antic J, et al. Oral squamous cell carcinoma detection by salivary biomarkers in a Serbian population. Oral Oncol. 2011; 47: 51–5. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.10.009 PMID: 21109482

34. Katakura A, Kamiyama I, Takano N, Shibahara T, Muramatsu T, Ishihara K, et al. Comparison of salivary cytokine levels in oral cancer patients and healthy subjects. Bull Tokyo Dent Coll. 2007; 48: 199–203. PMID: 18360107

35. SahebJamee M, Eslami M, AtarbashiMoghadam F, Sarafnejad A. Salivary concentration of TNFalpha, IL1 alpha, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. Med oral, Patol oral y cirugía bucal. 2008; 13: E292–5.

36. Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. Clin Cancer Res. 2008; 14: 6246–52. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5037 PMID: 18829504

37. Jou Y-J, Hua C-H, Lin C-D, Lai C-H, Huang S-H, Tsai M-H, et al. S100A8 as potential salivary biomarker of oral squamous cell carcinoma using nanoLC–MS/MS. Clin Chim Acta. 2014; 436: 121–129. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.05.009 PMID: 24863804

38. de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen X-B, Kooren JA, et al. Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. PLoS One. 2010; 5: e11148. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011148 PMID: 20567502

39. Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J, Ueno T, Mishima K, Takagi S, et al. Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. Anticancer Res. 18: 4645–9. PMID: 9891534

40. Sato J, Goto J, Murata T, Kitamori S, Yamazaki Y, Satoh A, et al. Changes in saliva interleukin-6 levels in patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 110: 330–6. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.03.040 PMID: 20598594

41. Warnakulasuriya S, Soussi T, Maher R, Johnson N, Tavassoli M. Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. J Pathol. 2000; 192: 52–57. https://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH669>3.0.CO;2-C PMID: 10951400

42. Chen Y-C, Li T-Y, Tsai M-F. Analysis of the saliva from patients with oral cancer by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2002; 16: 364–9. https://doi.org/10.1002/rcm.588 PMID: 11857719

43. Jou Y-J, Lin C-D, Lai C-H, Chen C-H, Kao J-Y, Chen S-Y, et al. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. Anal Chim Acta. 2010; 681: 41–8. https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.030 PMID: 21035601

44. Jou Y-J, Lin C-D, Lai C-H, Tang C-H, Huang S-H, Tsai M-H, et al. Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages. Clin Chim Acta. 2011; 412: 1357–65. https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.004 PMID: 21497587

45. Wu C-C, Chu H-W, Hsu C-W, Chang K-P, Liu H-P. Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma. Proteomics. 2015; 15: 3394–404. https://doi.org/10.1002/pmic.201500157 PMID: 26205615

46. Lisa Cheng Y-S, Jordan L, Gorugantula LM, Schneiderman E, Chen H-S, Rees T. Salivary interleukin-6 and -8 in patients with oral cancer and patients with chronic oral inflammatory diseases. J Periodontol. 2014; 85: 956–65. https://doi.org/10.1902/jop.2013.130320 PMID: 24147842

47. Gorugantula LM, Rees T, Plemons J, Chen H-S, Cheng Y-SL. Salivary basic fibroblast growth factor in patients with oral squamous cell carcinoma or oral lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012; 114: 215–22. https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.03.013 PMID: 22769407

48. Pickering V, Jordan RCK, Schmidt BL. Elevated salivary endothelin levels in oral cancer patients—a pilot study. Oral Oncol. 2007; 43: 37–41. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.12.027 PMID: 16757207

49. Cheng Y-SL, Rees T, Jordan L, Oxford L, O'Brien J, Chen H-S, et al. Salivary endothelin-1 potential for detecting oral cancer in patients with oral lichen planus or oral cancer in remission. Oral Oncol. 2011; 47: 1122–6. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.07.032 PMID: 21868280

50. Franzmann EJ, Reategui EP, Pedroso F, Pernas FG, Karakullukcu BM, Carraway KL, et al. Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007; 16: 1348–55. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0011 PMID: 17627000

51. Vucicević Boras V, Cikes N, Lukać J, Virag M, Cekić-Arambasin A. Salivary and serum interleukin 6 and basic fibroblast growth factor levels in patients with oral squamous cell carcinoma. Minerva Stomatol. 2005; 54: 569–73. PMID: 16224376

52. Contucci A, Inzitari R, Agostino S, Vitali A, Fiorita A, Cabras T, et al. Statherin levels in saliva of patients with precancerous and cancerous lesions of the oral cavity: a preliminary report. Oral Dis. 2005; 11: 95–99. https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01057.x PMID: 15752082

53. Mascitti M SA. Detection Level of Salivary Survivin in Patients with OSCC. J Carcinog Mutagen. OMICS International; 2013; 2013.

54. Nagler R, Bahar G, Shpitzer T, Feinmesser R. Concomitant analysis of salivary tumor markers—a new diagnostic tool for oral cancer. Clin Cancer Res. 2006; 12: 3979–84. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2412 PMID: 16818695

55. Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, Feinmesser R, Savulescu D, Borovoi I, et al. Salivary analysis of oral cancer biomarkers. Br J Cancer. 2009; 101: 1194–1198. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605290 PMID: 19789535

56. Shpitzer T, Bahar G, Feinmesser R, Nagler RM. A comprehensive salivary analysis for oral cancer diagnosis. J Cancer Res Clin Oncol. 2007; 133: 613–617. https://doi.org/10.1007/s00432-007-0207-z PMID: 17479291

57. Balan JJ, Rao RS, Premalatha BR, Patil S. Analysis of tumor marker CA 125 in saliva of normal and oral squamous cell carcinoma patients: a comparative study. J Contemp Dent Pract. 13: 671–5. PMID: 23250173

58. Shetty SR, Chadha R, Babu S, Kumari S, Bhat S, Achalli S. Salivary lactate dehydrogenase levels in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: a biochemical and clinicopathological study. J Cancer Res Ther. 2012; 8 Suppl 1: S123–5.

59. He H, Chen G, Zhou L, Liu Y. A joint detection of CEA and CA-50 levels in saliva and serum of patients with tumors in oral region and salivary gland. J Cancer Res Clin Oncol. 2009; 135: 1315–21. https://doi.org/10.1007/s00432-009-0572-x PMID: 19322585

60. Jessie K, Jayapalan JJ, Ong K-C, Abdul Rahim ZH, Zain RM, Wong K-T, et al. Aberrant proteins in the saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. Electrophoresis. 2013; 34: 2495–502. https://doi.org/10.1002/elps.201300107 PMID: 23784731

61. Hermann P, Gera I, Borbély J, Fejérdy P, Madléna M. Periodontal health of an adult population in Hungary: findings of a national survey. J Clin Periodontol. 2009; 36: 449–57. https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01395.x PMID: 19508245

62. Madléna M, Hermann P, Jáhn M, Fejérdy P. Caries prevalence and tooth loss in Hungarian adult population: results of a national survey. BMC Public Health. 2008; 8: 364. https://doi.org/10.1186/1471-2458-8-364 PMID: 18939981

63. Thiel UJE, Feltens R, Adryan B, Gieringer R, Brochhausen C, Schuon R, et al. Analysis of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma by MALDI-TOF MS. J Oral Pathol Med. 2011; 40: 369–79. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00982.x PMID: 21166718

64. Van Raemdonck G, Zegels G, Coen E, Vuylsteke B, Jennes W, Van Ostade X. Increased Serpin A5 levels in the cervicovaginal fluid of HIV-1 exposed seronegatives suggest that a subtle balance between serine proteases and their inhibitors may determine susceptibility to HIV-1 infection. Virology. 2014; 458–459: 11–21. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.015 PMID: 24928035

65. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF-κB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. Cancer Detect Prev. 2005; 29: 42–45. https://doi.org/10.1016/j.cdp.2004.10.003 PMID: 15734216

66. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Nature. 2008; 454: 436–444. https://doi.org/10.1038/nature07205 PMID: 18650914

67. Eiró N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. World J Gastrointest Surg. Baishideng Publishing Group Inc; 2012; 4: 62–72. https://doi.org/10.4240/wjgs.v4.i3.62 PMID: 22530080

68. Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev. 2016; 99: 180–185. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.009 PMID: 26621196

69. Bell RB, Leidner R, Feng Z, Crittenden MR, Gough MJ, Fox BA. Developing an Immunotherapy Strategy for the Effective Treatment of Oral, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. J Oral Maxillofac Surg. 2015; 73: S107–S115. https://doi.org/10.1016/j.joms.2015.05.026 PMID: 26608138

70. Márton IJ, Kiss C. Overlapping Protective and Destructive Regulatory Pathways in Apical Periodontitis. J Endod. 2014; 40: 155–163. https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.036 PMID: 24461396

71. Jinno T, Kawano S, Maruse Y, Matsubara R, Goto Y, Sakamoto T, et al. Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2015; 33: 2161–8. https://doi.org/10.3892/or.2015.3838 PMID: 25761055

72. Huang J-S, Yao C-J, Chuang S-E, Yeh C-T, Lee L-M, Chen R-M, et al. Honokiol inhibits sphere formation and xenograft growth of oral cancer side population cells accompanied with JAK/STAT signaling pathway suppression and apoptosis induction. BMC Cancer. 2016; 16: 245. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2265-6 PMID: 27012679

73. Skrinjar I, Brailo V, Vidovic-Juras D, Vucicevic-Boras V, Milenovic A. Evaluation of pretreatment serum interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha as a potential biomarker for recurrence in patients with oral squamous cell carcinoma. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2015; 20: e402–7. https://doi.org/10.4317/medoral.20373 PMID: 25858079

74. Piva MR, DE Souza LB, Martins-Filho PRS, Nonaka CFW, DE Santana Santos T, DE Souza Andrade ES, et al. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF-α, TGF-β and NF-κB expression. Oncol Lett. Spandidos Publications; 2013; 5: 1909–1914. https://doi.org/10.3892/ol.2013.1302 PMID: 23833665

75. Arduino PG, Menegatti E, Cappello N, Martina E, Gardino N, Tanteri C, et al. Possible role for interleukins as biomarkers for mortality and recurrence in oral cancer. Int J Biol Markers. 2015; 30: 262–6.

76. Fujita Y, Okamoto M, Goda H, Tano T, Nakashiro K, Sugita A, et al. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. PLoS One. Public Library of Science; 2014; 9: e110378. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110378 PMID: 25461761

77. He Q-Y, Chen J, Kung H-F, Yuen AP-W, Chiu J-F. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. Proteomics. 2004; 4: 271–8. https://doi.org/10.1002/pmic.200300550 PMID: 14730689

78. Leanderson T, Ivars F. S100A9 and tumor growth. Oncoimmunology. 2012; 1: 1404–1405. https://doi.org/10.4161/onci.21027 PMID: 23243608

79. Cross SS, Hamdy FC, Deloulme JC, Rehman I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. Histopathology. 2005; 46: 256–69. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02097.x PMID: 15720411

80. Kawai H, Minamiya Y, Takahashi N. Prognostic impact of S100A9 overexpression in non-small cell lung cancer. Tumour Biol. 2011; 32: 641–6. https://doi.org/10.1007/s13277-011-0163-8 PMID: 21369941

81. Duan L, Wu R, Ye L, Wang H, Yang X, Zhang Y, et al. S100A8 and S100A9 are associated with colorectal carcinoma progression and contribute to colorectal carcinoma cell survival and migration via Wnt/β-catenin pathway. PLoS One. 2013; 8: e62092. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062092 PMID: 23637971

82. Wu W, Juan WC, Liang CRMY, Yeoh KG, So J, Chung MCM. S100A9, GIF and AAT as potential combinatorial biomarkers in gastric cancer diagnosis and prognosis. Proteomics Clin Appl. 2012; 6: 152–62. https://doi.org/10.1002/prca.201100050 PMID: 22532451

83. Chao A, Wang T-H, Lee Y-S, Hsueh S, Chao A-S, Chang T-C, et al. Molecular characterization of adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix using microarray analysis of gene expression. Int J Cancer. 2006; 119: 91–8. https://doi.org/10.1002/ijc.21813 PMID: 16450401

84. Markowitz J, Carson WE. Review of S100A9 biology and its role in cancer. Biochim Biophys Acta. 2013; 1835: 100–9. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.10.003 PMID: 23123827

85. Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, et al. Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. J Lab Clin Med. 2003; 142: 46–51. https://doi.org/10.1016/S0022-2143(03)00068-4 PMID: 12878985

86. Noike T, Miwa S, Soeda J, Kobayashi A, Miyagawa S. Increased expression of thioredoxin-1, vascular endothelial growth factor, and redox factor-1 is associated with poor prognosis in patients with liver metastasis from colorectal cancer. Hum Pathol. 2008; 39: 201–8. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.04.024 PMID: 17949784

87. Grogan TM, Fenoglio-Prieser C, Zeheb R, Bellamy W, Frutiger Y, Vela E, et al. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. Hum Pathol. 2000; 31: 475–81. https://doi.org/10.1053/hp.2000.6546 PMID: 10821495

dc_1779_20
DOI: 10.1111/jdv.13221 JEADV

ORIGINAL ARTICLE

Highly abundant defense proteins in human sweat as revealed by targeted proteomics and label-free quantification mass spectrometry

É. Csősz,[1] G. Emri,[2] G. Kalló,[1] G. Tsaprailis,[3] J. Tőzsér[1,*]

[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Proteomics Core Facility, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary
[2]Department of Dermatology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary
[3]Center for Toxicology, University of Arizona, Tucson, AZ, USA
*Correspondence: J. Tőzsér. E-mail: tozser@med.unideb.hu

Abstract

Background The healthy human skin with its effective antimicrobial defense system forms an efficient barrier against invading pathogens. There is evidence suggesting that the composition of this chemical barrier varies between diseases, making the easily collected sweat an ideal candidate for biomarker discoveries.

Objective Our aim was to provide information about the normal composition of the sweat, and to study the chemical barrier found at the surface of skin.

Methods Sweat samples from healthy individuals were collected during sauna bathing, and the global protein panel was analysed by label-free mass spectrometry. SRM-based targeted proteomic methods were designed and stable isotope labelled reference peptides were used for method validation.

Results Ninety-five sweat proteins were identified, 20 of them were novel proteins. It was shown that dermcidin is the most abundant sweat protein, and along with apolipoprotein D, clusterin, prolactin-inducible protein and serum albumin, they make up 91% of secreted sweat proteins. The roles of these highly abundant proteins were reviewed; all of which have protective functions, highlighting the importance of sweat glands in composing the first line of innate immune defense system, and maintaining the epidermal barrier integrity.

Conclusion Our findings with regard to the proteins forming the chemical barrier of the skin as determined by label-free quantification and targeted proteomics methods are in accordance with previous studies, and can be further used as a starting point for non-invasive sweat biomarker research.

Received: 24 April 2015; Accepted: 12 May 2015

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Funding source

None declared.

Introduction

The healthy human skin possesses an effective antimicrobial defense system, formed by a complex physical and chemical epidermal barrier that is in cooperation with other cellular components of the innate immune system and normal microbial flora of the skin.[1,2] As a constituent of the chemical barrier, expression of antimicrobial peptides by keratinocytes, mast cells, neutrophils, sebocytes and eccrine epithelial cells have been reported.[3] Some of the antimicrobial peptides were shown to be expressed constitutively (e.g. dermcidin, RNase7, psoriasin) while others were found to be inducible upon pathogenic stimuli (e.g. LL-37, hBD2, hBD3).[3–5] It has been reported that antimicrobial peptides such as dermcidin, lysozyme, lactoferrin, psoriasin, cathelicidin and β-defensins are present in human sweat[4,6–9] and dermcidin-derived peptides were identified as the principal antimicrobial components.[7] Reduced presence of dermcidin-derived peptides was detected in the sweat of atopic dermatitis patients in association with an impaired cutaneous antimicrobial defense,[7] while its increased expression has been demonstrated in different cancer cells.[10,11] Beside their antibiotic properties, some components of the skin's chemical barrier are also able to recruit inflammatory cells and induce cytokine release.[12]

Little is known about the causes and consequences of qualitative and quantitative alterations of the human sweat proteins,

© 2015 European Academy of Dermatology and Venereology

moreover, the composition of the sweat itself has not been fully explored. Currently, intense research efforts are being carried out to discover new diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in samples which are easily obtainable from patients using non-invasive methods. Recent advances in analytical techniques now allow thorough analysis of human sweat proteins, hence, facilitating sweat biomarker studies.[13,14]

Label-free quantification of proteins with mass spectrometry is a powerful and sensitive method for protein identification and relative quantification. The protein digests are introduced into high precision mass spectrometers where MS/MS spectra are recorded. Based on the spectra, the proteins/peptides are identified, and taking into account either the number of MS/MS events (spectral counting) or the intensity of the precursor ions, the relative quantification of peptides is performed.[15,16] Silva and coworkers have also used LCMS^E to absolutely quantify proteins. In their method, the average MS signal response for the three most intense tryptic peptides per mole of protein is constant within a coefficient of variation of less than ±10%. Moreover, given an internal standard, this relationship can be used to calculate a universal response factor.[17] Targeted proteomics is a challenging part of proteomics, and it is mainly based on the Selected Reaction Monitoring (SRM) scan mode of triple quadrupole-containing mass spectrometers being able to provide specific identification and quantification of the proteins in question.[18,19] During the scan, the first quadrupole transmits ions only with specified, compound-specific *m*/*z*; these ions are fragmented in the second quadrupole functioning as a collision cell, and the third quadrupole selectively transmits only one fragment with a specified *m*/*z*. This means that a signal can be detected only in case if two criteria characteristic for a compound are fulfilled in the same time. These SRM transitions provide high specificity in one hand and quantitative data on the other, as the area under the curve (AUC) of the specific signal is proportional to the amount of the compound entering the mass spectrometer.[19]

In this study our aim was to examine the qualitative and quantitative protein profile of the sweat collected from healthy volunteers, in order to gain more insight into the protein composition of healthy human sweat. The presented data contribute to our knowledge concerning the normal physiological function of human sweat, and provide data for further biomarker research.

Materials and methods

All reagents used in this study were of analytical or LC-MS grade and were purchased from Sigma-Aldrich unless stated otherwise.

Sample collection

Ten male and 10 female healthy young adults (between 22–35 years of age) were recruited into the study. Heat-induced sweat was collected in an 80 °C electric Finnish-type sauna in the morning. Volunteers were asked not to use any cosmetics that day, and before entering the sauna, they were required to take a shower using only water, and to dry their skin. Volunteers were instructed to stay in the sauna for 20 min, thereafter, take a shower, dry their skin and rest for 10 min, followed by another 20 min sauna time. All sample collection complied with the guidelines of the Helsinki Declaration, approved by the Regional Ethical Committee (DEOEC RKEB/IKEB 4078/2013 and 2885/2008) and the subjects signed an informed consent. The collected samples were transported to the laboratory on ice and in less than 30 min from sample collection, samples were centrifuged in order to get rid of the shed skin cells and cellular debris. The clear sweat was concentrated by lyophilization, redissolved in ammonium bicarbonate and pooled. The protein concentration of the pooled sweat was determined by Bradford method,[20] and the concentrated sample was stored at −70 °C until further processing. Following protein extraction in 0.1 mol/L ammonium bicarbonate, pH 7.8, the pooled sample was precipitated twice, using six volumes of ice-cold acetone. The final pellet was solubilized in 0.1 mol/L ammonium bicarbonate, pH 7.8, and a micro bicinchoninic acid protein assay[21] was performed according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL, USA) to determine the total protein content.

Label-free quantification by LCMS^E and protein identification by LC-MS/MS

Pooled sweat protein samples (4.2 μg total) were first reduced and alkylated, followed by tryptic digestion overnight at 37 °C. For LCMS^E,[17] tryptic digests (600 ng in an injection volume of 4 μL containing 50 ng of a T33V Rhodobacter cytochrome c digest as an internal standard), were injected onto a Waters QTOF Premier equipped with a nanoESI source and a NanoAcquity UPLC (Waters Corp., Millford, MA, USA). LC separation of peptides was performed in triplicate using a Symmetry C18 5 μm, 20-mm × 180-μm pre-column and a BEH130 C18 1.7 μm, 100-mm × 100-μm analytical reversed phase column (Waters Corp.). Solvent A was water with 0.1% formic acid and solvent B was 0.1% formic acid in acetonitrile in case of all LC separations. The peptides were separated with a gradient of 2–35% solvent B over 150 min followed by a rise to 95% of solvent B over 2 min and a 5-min rinse with 95% of solvent B, after which the system returned to 2% solvent B in 2 min. The flow rate was 750 nL/min and the column temperature was 35 °C. The lock mass was delivered from the auxiliary pump of the NanoAcquity pump with a constant flow rate of 500 nL/min at a concentration of 100 fmol of [Glu^1]fibrinopeptide B/μL to the reference sprayer of the NanoLockSpray source of the mass spectrometer. The mass spectrometer was operated in the V-mode of analysis with a typical resolving power of at least 10 000 full-width half-maximum. All analyses were performed using positive nanoelectrospray ion mode. The reference sprayer was sampled with a frequency of 60 s. Accurate mass LC-MS data were collected in an alternating low energy and elevated energy mode of acquisition.[22,23] The spectral acquisition time in each

© 2015 European Academy of Dermatology and Venereology

mode was 1.5 s with a 0.1 s interscan delay. In low energy MS mode, data were collected at constant collision energy of 4 eV. In elevated energy MS mode, the collision energy was ramped from 15 to 35 eV during each 1.5 s data collection cycle with one complete cycle of low and elevated energy data acquired every 3.2 s. The radiofrequency applied to the quadrupole was adjusted such that ions from *m/z* 50 to 2000 were efficiently transmitted. High energy MS ions were collected between 100 to 1500 *m/z*. The digested sweat protein sample was also analysed by LC-MS/MS using an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with an Advion nanomate ESI source (Advion, Ithaca, NY, USA), following ZipTip (Millipore, Billerica, MA, USA) C18 sample clean-up according to the manufacturer's instructions. Peptides (240 ng) were eluted from a C18 pre-column (100-μm id × 2 cm; Thermo Fisher Scientific) onto an analytical column (75-μm ID × 10 cm, C18; Thermo Fisher Scientific) using a 5% hold of solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) over 5 min, followed by a 5–10% gradient of solvent B over 5 min, 10–35% gradient of solvent B over 35 min, 35–50% gradient of solvent B over 20 min, 50–95% gradient of solvent B over 5 min, and finally by a 95% solvent B hold for another 4.6 min. All flow rates were at 400 nL/min. Data-dependent scanning was performed by the Xcalibur v 2.1.0 software[24] (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) using a survey mass scan at 60 000 resolution in the Orbitrap analyser scanning *m/z* 400–1600, followed by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry of the fourteen most intense ions in the linear ion trap analyser. Precursor ions were selected by the monoisotopic precursor selection setting with selection or rejection of ions held to a ±10 ppm window. Dynamic exclusion was set to place any selected *m/z* on an exclusion list for 45 s after a single MS/MS.

Database searching and protein identification

LC-MS/MS spectra were searched against human proteins downloaded from Uniprot on August 06, 2013 (http://www.uniprot.org) using Thermo Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) considering tryptic peptides with up to two missed cleavages. Iodoacetamide derivatives of cysteines, and oxidation of methionines were specified as variable modifications. At the time of the search, this reference proteome set contained 88 323 protein entries. Proteins were identified at 99% confidence with XCorr score cut-offs[25] as determined by a reversed database search. The protein and peptide identification results from the LC-MS/MS experiment were also interrogated and visualized with Scaffold v 4.0.5 (Proteome Software Inc., Portland, OR, USA), a program that relies on various search engine results and uses Bayesian statistics to reliably identify more spectra.[26,27] Those proteins were accepted that passed the criteria of a minimum of two peptides identified at 0.1% FDR at peptide level and 1% FDR at the protein level.

All LCMS^{E} data were processed and searched using ProteinLynx GlobalServer version 2.4 (Waters Corp.). Protein identifications were obtained with the embedded ion accounting algorithm of the software (Identity^{E}) and searching a human database downloaded from Uniprot to which the primary sequence of the T33V cytochrome c from Rhodobacter was appended. The combined protein database was randomized once before use. Trypsin was specified as the digestion enzyme allowing for 1 missed cleavage. Iodoacetamide derivatives of cysteines, and oxidation of methionines were specified as fixed and variable modifications respectively. A minimum of three fragment ions matched were required per peptide, and a minimum of one peptide was required per protein for identification. The ion detection, clustering, and normalization were performed using ProteinLynx GlobalServer. The principles of the applied data clustering and normalization have been explained in great detail elsewhere.[28–30] Identity^{E} results of all three replicates were imported into Scaffold v 3.2.0 (Proteome Software Inc.). Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 90% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm.[26] Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 90% probability and contained at least two identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm.[27] Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

Design of targeted proteomic method

In silico trypsin digestion of human dermcidin and prolactin-inducible protein (PIP) sequences derived from Uniprot database were performed and the tryptic peptides were subjected to Blastp search against the NCBInr database in order to exclude the non-specific sequences. The SRM transitions characteristic for dermcidin and PIP-specific peptide sequences were designed with Skyline software (www.brendanx-uw1.gs.washington.edu). Stable isotope labelled synthetic standard peptides were obtained from JPT Peptide Technologies, Germany and used for collision energy and declustering potential optimization.

The sweat samples were trypsin digested and, following ZipTip (Millipore) C18 sample clean-up according to the manufacturer's instructions, 5 μg of tryptic digest was injected to the HPLC. Peptides were eluted from a Zorbax C18 precolumn (Agilent, Santa Clara, CA, USA) onto a Zorbax C18 (150 mm × 75 μm, 3.5 μm pore size) analytical column (Agilent) performing a 0–100% gradient of solvent B over 15 min, a 100% solvent B hold for 5 min and a rapid 0% solvent B change in 2 min followed by a 0% solvent B hold for 8 min. The flow rate was 300 nL/min. SRM data were recorded on a 4000 QTRAP (ABSciex, Farmingham, MA, USA) mass spectrometer equipped with NanoSpray II (ABSciex) operating in positive ion mode (spray voltage 2800 V, nebulizig gas 50 psi, curtain gas 20 psi, source temperature 70 °C) controlled by Analyst 1.4.2.

© 2015 European Academy of Dermatology and Venereology

(ABSciex, Farmingham, MA, USA) software and coupled to Easy nLC nano HPLC (Bruker, Bremen, Germany). Data evaluation and the calculation of the AUC values were done using Skyline.

All the recorded data are available upon request by sending an email to the corresponding author.

Results and discussion

The feasibility of sweat protein analysis; made possible by the abundance of sweat and the simple non-invasive means of sweat collection, makes it an excellent target for biomarker research. Chemical analysis of the sweat may demonstrate the presence of macromolecules other than those derived from the plasma, making the sweat ideal for the detection of disease-specific biomarkers.[31] Sweat analysis was used for the identification of biomarkers characteristic of schizophrenia, and 17 proteins were identified whose abundance had changed in the sweat of schizophrenic patients as compared to controls.[13] There is also accumulating evidence that the protein profile of skin surface is altered in pathological conditions like atopic dermatitis.[32] In order to identify disease-specific changes, we ought to first understand the role and composition of the protein panel expressed in the surface of the skin under physiological conditions.

Sweat protein identification and quantification

In this work we have used a sweat pool collected during sauna bathing from healthy adult volunteers and examined it in order to gain more insight into the skin surface proteins. Using

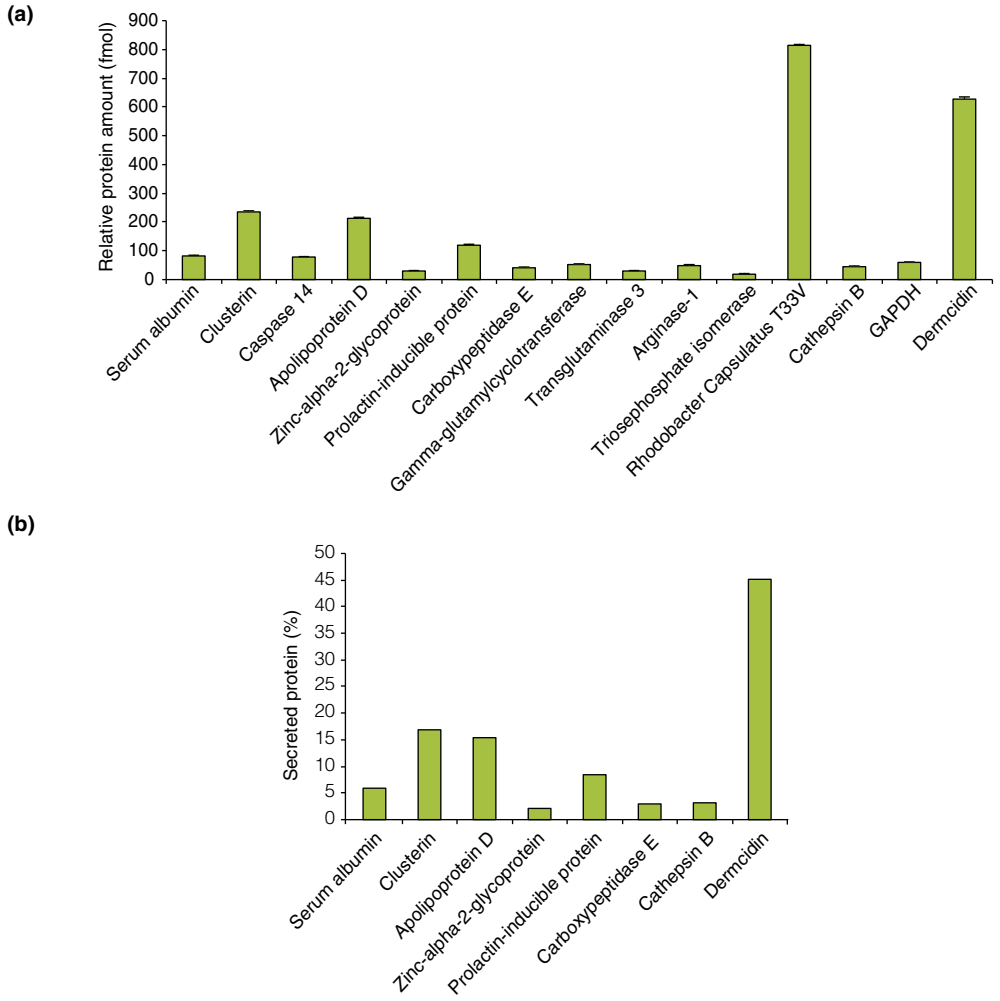


Figure 1 Sweat protein amounts determined by label-free quantification. The bars show the amount of sweat proteins representing the mean values of three parallel label-free mass spectrometry analyses on QTOF instrument. Error bars indicate standard error of means. Panel (a) Proteins identified in the sweat. The spiked Rhodobacter cytochrome C is also indicated. Panel (b) Percentage of the eight most abundant secreted sweat proteins.

© 2015 European Academy of Dermatology and Venereology

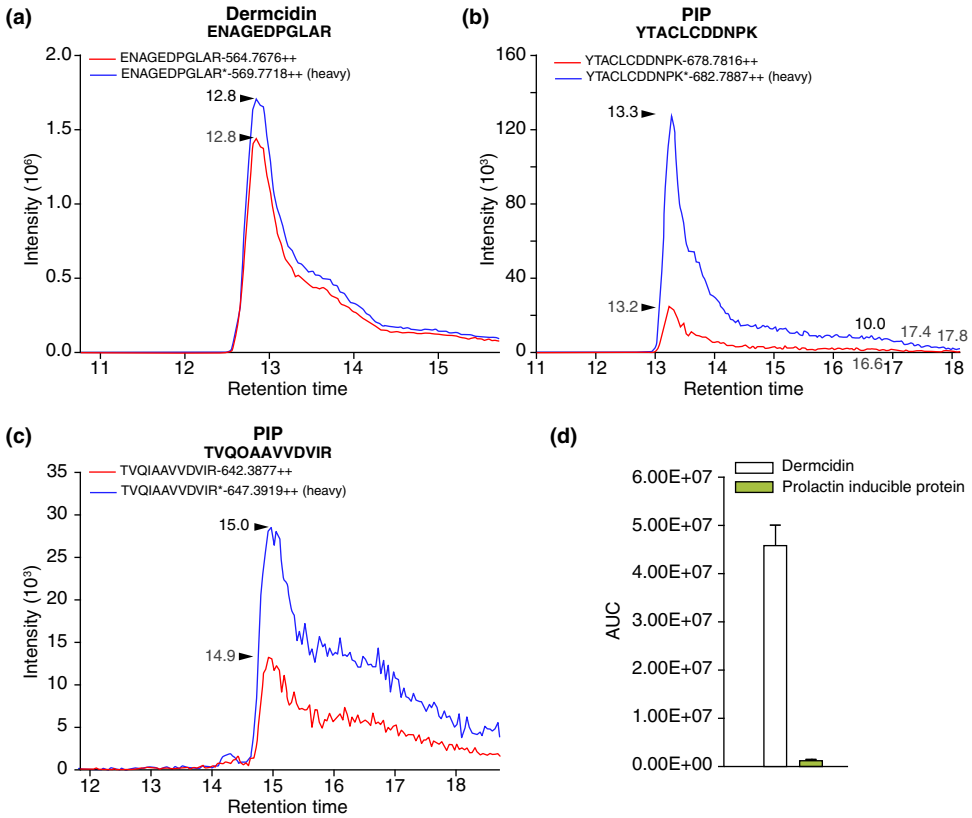


Figure 2 Relative amount of dermcidin and PIP determined by SRM-based targeted proteomic approach. Panel (a–d) Representative SRM spectra for dermcidin and PIP-specific sequences (red spectra) and their synthetic, stable isotope labeled counterparts (blue spectra). The following optimized parameters were used: ENAGEDPGLAR peptide: 564.7/628.3, 564.7/513.3, CE 27.9 eV, DP 72.3 eV; ENAGEDPGLAR* peptide: 569.7/638.3, 569.7/523.3, CE 27.9 eV, DP 72.3 eV; YTACLCDDNPK peptide: 678.7/1092.4, 678.7/748.3, CE 34.4 eV, DP 80.6 eV; YTACLCDDNPK* peptide: 682.7/1100.4, 682.7/756.3, CE 34.4 eV, DP 80.6 eV; TVQIAAVVDVIR peptide: 642.4/842.5, 642.4/771.5, CE 32.4 eV, DP 77.9 eV; TVQIAAVVDVIR* peptide: 647.4/852.5, 647.4/781.5 CE 32.4 eV, DP 77.9 eV. (*) Represents the stable isotope containing amino acid. Panel (d) Relative amount of dermcidin and PIP. The bars represent the mean AUC values per μg of total protein in case of two parallel experiments. Error bars indicate standard error of means.

consecutive mass spectrometry scans, 95 proteins were identified by high resolution LC-MS/MS based on a minimum of two peptides, 20 of them being novel proteins that were not reported in sweat previously (Table S1, Supporting Information).

The relative levels of individual proteins identified from human sweat were determined based on a spiked internal digest of T33V Rhodobacter cytochrome c (Fig. 1a). Dermcidin was the most abundant protein in the sweat, with a concentration of 1.14 pmol/μg, a finding that was reported by other experiments as well.[33] Besides dermcidin, levels of apolipoprotein D and clusterin were also shown to be considerably high. Dermicidin, clusterin, apolipoprotein D and PIP accounted for 46%, 17%, 15% and 8% of the secreted sweat proteins, respectively, while the serum albumin accounted only for 6% (Fig. 1b). To the best of our knowledge, this is the first study to present a broad overview of the sweat protein profile, providing comparative analysis of individual protein levels. Based on our quantification, the five most abundant sweat proteins; dermcidin, clusterin, apolipoprotein D, PIP and serum albumin constituted 91% of secreted sweat proteins.

In order to validate our results obtained by label-free quantification, we have designed SRM-based targeted proteomic experiments to analyse dermcidin and PIP levels in human sweat. After the determination of tryptic sequences specific for dermcidin and PIP respectively, the sequences ENAGEDPGLAR for dermcidin and YTACLCDDNPK and TVQIAAVVDVIR for PIP were used to design the SRM transitions. Stable isotope-labeled reference peptides (marked with *) were administrated, and the relative amount of dermcidin and PIP in the sweat pool was determined (Fig. 2). Both the SRM-based targeted proteomics experiment and the label-free quantification support the evidence regarding dermcidin being the most characteristic sweat protein.

© 2015 European Academy of Dermatology and Venereology

Table 1 The function of highly abundant sweat proteins

Protein name	Accession number	Function
Dermcidin	P81605	Defense response to bacteria and fungi* Antimicrobial peptide with broad antimicrobial spectrum[4]
Prolactin-inducible protein	P12273	Binding to different species of bacteria showing highest affinity to streptococci[34,36] Binding to IgG, IgG-Fc, CD4-T cell receptor suggesting a wide range of immunological functions[35]
Clusterin	P10909	Chaperone, modulator of MMP9 activity[37,38]
Apolipoprotein D	P05090	Tissue regeneration* lipid binding* Prevents lipid damage caused by free radicals[43]
Serum albumin	P02768	Response to stress* Transport, binding, antioxidant role*[40]

*GO functions.

Role of highly abundant proteins in the skin barrier function and non-immune mediated defense

Based on the GeneOnthology (GO) annotation, the number of identified sweat proteins involved in immune system processes and defense against bacteria and fungi is quite high (Fig. 3, Table S2, Supporting Information). To better understand the function of highly abundant sweat proteins, the scientific literature was reviewed. The meticulous analysis of these highly abundant sweat proteins revealed their possible implication in protecting the skin from invading pathogens (Table 1), as part of a chemical barrier whose alterations may lead to an increased rate of skin infections.[7,32–39] Dermcidin and its peptide derivatives with broad spectrum antibiotic activity were shown to be the main sweat protein/peptides secreted.[33] Their activity is not altered by low pH and high salt concentrations – conditions typically observed in sweat – making them the principal skin antimicrobial peptides.[4] In this study, using label-free quantitative MS analysis, we confirmed that the most abundant component of sweat derived from healthy human volunteers is dermcidin (Fig. 1). The function of PIP is not clear, it can bind different bacteria, and was identified in human sweat, saliva and tears, practically in all body fluids which are exposed to microbes.[34–37] It was detected in mice at an early embryonic stage, before the development of the immune system, and in human amniotic fluid, most probably providing some protection against bacteria before the development and maturation of the immune system.[35] Secreted form of clusterin belongs to the extracellular chaperones, and it is present in almost all physiological fluids, maintaining fluid-epithelial interface homoeostasis and preventing the onset of inflammatory conditions.[38,39] Recent data suggest that clusterin interacts with MMPs inhibiting their enzymatic activity, and it is highly possible that it is able to reduce keratinocyte damage and inflammation of the skin.[38] The presence of albumin in sweat was demonstrated by other studies as well,[31] but its origin is not clear. It may originate from the blood as seen in the case of tears where the albumin content can be used as the measure of transudation.[40] It was shown previously that the DAHK peptide; derived from the N-terminal part of albumin, has a potent antioxidant activity.[41] Considering the presence of different proteases in the sweat,[42] (Table S1, Supporting Information) and the GO function of albumin, (Table S2, Supporting Information) one can speculate about the possible antioxidant function of this protein in human sweat. The lipocalin family member apolipoprotein D is a

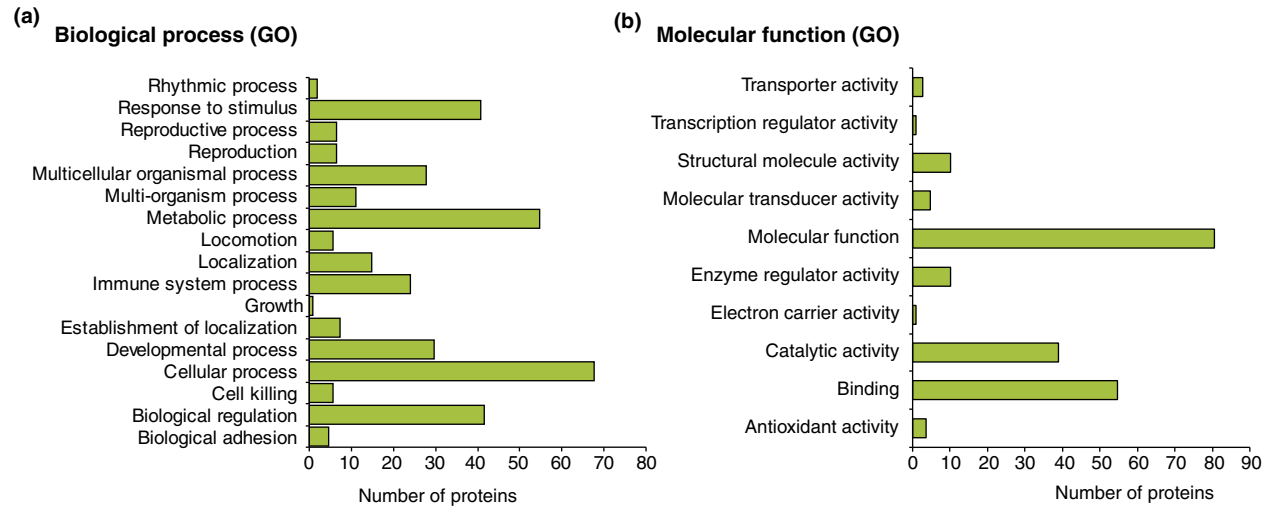


Figure 3 GO functions of identified sweat proteins. Number of sweat proteins having a role in different GO Biological Processes (Panel a) and GO Molecular Functions (Panel b).

© 2015 European Academy of Dermatology and Venereology

multi-ligand-binding protein able to transport hydrophobic molecules. It was proven to have a role in preventing lipid peroxidation, especially in the central nervous system, protecting the cells from oxidative stress.[43] Its presence in the sweat may indicate its protective roles as a component of the first line of defense, preventing the skin lipids from damage caused by peroxidation.

Taking into account our findings and the information available in the scientific literature, concerning the function of highly abundant proteins in human sweat, it seems evident that these highly abundant proteins are essential to the formation of the chemical barrier. Dermcidin and PIP most probably play a pivotal role in antibacterial defense, while clusterin functions as a chaperone and MMP inhibitor. It seems obvious that the primary role of apolipoprotein D in the sweat is to inhibit lipid peroxidation, while the presence of albumin might hint to either a scavenger function; by binding different molecules preventing their enrichment on the skin surface, or an antioxidant effect through its N-terminal tetrapeptide.

Concluding remarks

Utilizing label-free quantification and SRM-based validation, we were able to identify and quantify dermcidin, clusterin, apolipoprotein D, PIP and serum albumin as highly abundant sweat proteins. Based on data from the literature, it appears that they are all implicated in the formation of the chemical barrier of the skin. Moreover, dermcidin and PIP probably play a vital role; as part of the innate immune response, in defense against potential pathogens. We hope that our findings may shed some light on the protein composition of the sweat, thereby providing insight into the constituents of the skin's chemical barrier. This in turn will serve as valuable asset to the ever-growing, rapidly advancing field of biomarker studies.

Acknowledgements

We are grateful for the funding of TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, TÁMOP-4.2.4.-A/2-11-1-2012-0001 and Training Grant Number – ES007091. Label-free mass spectrometry data were acquired by the Arizona Proteomics Consortium supported by NIEHS grant ES06694 to the SWEHSC, NIH/NCI grant CA023074 to the AZCC and by the BIO5 Institute of the University of Arizona. The Thermo Fisher LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer was provided by grant 1S10 RR028868-01 from NIH/NCRR. The help of Andrea Kulcsár and Dr. Mohamed Mahdi is greatly acknowledged. Presented data are MIAPE-compliant.

References

1 Borkowski AW, Gallo RL. The coordinated response of the physical and antimicrobial peptide barriers of the skin. *J Invest Dermatol* 2011; **131**: 285–287.
2 Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides, old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol* 2012; **132**: 887–895.
3 Metz-Boutigue MH, Shooshtarizadeh P, Prevost G *et al.* Antimicrobial peptides present in mammalian skin and gut are multifunctional defence molecules. *Curr Pharm Des* 2010; **16**: 1024–1039.
4 Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides, the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 2010; **1**: 440–464.
5 Harder J, Schröder JM, Gläser R. The skin surface as antimicrobial barrier, present concepts and future outlooks. *Exp Dermatol* 2013; **22**: 1–5.
6 Park JH, Park GT, Cho IH *et al.* An antimicrobial protein, lactoferrin exists in the sweat, proteomic analysis of sweat. *Exp Dermatol* 2011; **20**: 369–371.
7 Rieg S, Steffen H, Seeber S *et al.* Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. *J Immunol* 2005; **174**: 8003–8010.
8 Rieg S, Seeber S, Steffen H *et al.* Generation of multiple stable dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites. *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 354–365.
9 Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA *et al.* Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol* 2002; **119**: 1090–1095.
10 Chang WC, Huang MS, Yang CJ *et al.* Dermcidin identification from exhaled air for lung cancer diagnosis. *Eur Respir J* 2010; **35**: 1182–1185.
11 Stewart GD, Skipworth RJ, Pennington CJ *et al.* Variation in dermcidin expression in a range of primary human tumours and in hypoxic/oxidatively stressed human cell lines. *Br J Cancer* 2008; **99**: 126–132.
12 Hata TR, Gallo RL. Antimicrobial peptides, skin infections, and atopic dermatitis. *Semin Cutan Med Surg* 2008; **27**: 144–150.
13 Raiszadeh MM, Ross MM, Russo PS *et al.* Proteomic analysis of eccrine sweat, implications for the discovery of schizophrenia biomarker proteins. *J Proteome Res* 2012; **11**: 2127–2139.
14 Burian M, Velic A, Matic K *et al.* Quantitative proteomics of the human skin secretome reveal a reduction in immune defense mediators in ectodermal dysplasia patients. *J Invest Dermatol* 2015; **135**: 759–767.
15 Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G *et al.* Quantitative mass spectrometry in proteomics, a critical review. *Anal Bioanal Chem* 2007; **389**: 1017–1031.
16 Ishihama Y, Oda Y, Tabata T *et al.* Exponentially modified protein abundance index emPAI, for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 2005; **4**: 1265–1272.
17 Silva JC, Gorenstein MV, Li G-Z *et al.* Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics* 2006; **5**: 144–156.
18 James A, Jorgensen C. Basic design of MRM assays for peptide quantification. *Methods Mol Biol* 2010; **658**: 167–185.
19 Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2008; **4**: 222.
20 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–254.
21 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Chem* 1985; **150**: 76–85.
22 Bateman RH, Langridge JI, McKenna T *et al.* Methods and apparatus for mass spectrometry. *U. S. Patent 2.* 2006; **385**: 918A.
23 Bateman RH, Carruthers R, Hoyes JB *et al.* A novel precursor ion discovery method on a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer for studying protein phosphorylation. *J Am Soc Mass Spectrom* 2002; **13**: 792–803.
24 Andon NL, Hollingworth S, Koller A *et al.* Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spetrometry. *Proteomics* 2002; **2**: 1156–1168.
25 Qian WJ, Liu T, Monroe ME *et al.* Probability-based evaluation of peptide and protein identifications from tandem mass spectrometry and SEQUEST analysis: the human proteome. *J Proteome Res* 2005; **4**: 53–62.
26 Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E *et al.* Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 2002; **74**: 5383–5392.

© 2015 European Academy of Dermatology and Venereology

27 Silva JC, Denny R, Dorschel CA *et al.* Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem* 2005; **77**: 2187–2200.
28 Hughes MA, Silva JC, Geromanos SJ *et al.* Quantitative proteomic analysis of drug-induced changes in mycobacteria. *J Proteome Res* 2006; **5**: 54–63.
29 Vissers JPC, Langridge JI, Aerts JMF. Serum markers and protein signatures for Gaucher disease. *Mol Cell Proteomics* 2007; **6**: 755–766.
30 Nakayashiki N. Sweat protein components tested by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting. *Tohoku J Exp Med* 1990; **161**: 25–31.
31 Leung DYM. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int* 2013; **62**: 151–161.
32 Sagawa K, Kimura A, Saito Y *et al.* Production and characterization of a monoclonal antibody for sweat-specific protein and its application for sweat identification. *Int J Legal Med* 2003; **117**: 90–95.
33 Nistor A, Bowden G, Blanchard A *et al.* Influence of mouse prolactin-inducible protein in saliva on the aggregation of oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2009; **24**: 510–513.
34 Lee B, Bowden GH, Myal Y. Identification of mouse submaxillary gland protein in mouse saliva and its binding to mouse oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2002; **47**: 327–332.
35 Hassan MI, Waheed A, Yadav S *et al.* Prolactin inducible protein in cancer, fertility and immunoregulation: structure, function and its clinical implications. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 447–459.
36 Schenkels LC, Walgreen-Weterings E, Oomen LC *et al.* In vivo binding of the salivary glycoprotein EP-GP identical to GCDFP-15, to oral and non-oral bacteria detection and identification of EP-GP binding species. *Biol Chem* 1997; **378**: 83–88.
37 Jeong S, Ledee DR, Gordon GM *et al.* Interaction of clusterin and matrix metalloproteinase-9 and its implication for epithelial homeostasis and inflammation. *Am J Pathol* 2012; **180**: 2028–2039.
38 Rizzi F, Bettuzzi S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer* 2010; **17**: R1–R17.
39 Tözsér J, Berta A. Lactate dehydrogenase activity in pathological human tears obtained with glass capillaries correlates with the albumin content. *Int Ophthalmol* 1998; **22**: 289–292.
40 Gum ET, Swanson RA, Alano C *et al.* Human serum albumin and its N-terminal tetrapeptide (DAHK) block oxidant-induced neuronal death. *Stroke* 2004; **35**: 590–595.
41 Baechle D, Flad T, Cansier A *et al.* Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *J Biol Chem* 2006; **281**: 5406–5415.
42 Bajo-Grañeras R, Sanchez D, Gutierrez G *et al.* Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum. *J Neurochem* 2011; **117**: 949–960.
43 Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM *et al.* Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* 2008; **7**: 506–515.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. List of identified human sweat proteins.
Table S2. The GO function of identified sweat proteins.

© 2015 European Academy of Dermatology and Venereology

BMC Bioinformatics

RESEARCH ARTICLE Open Access

Analysis of networks of host proteins in the early time points following HIV transduction

Éva Csősz[1*], Ferenc Tóth[2], Mohamed Mahdi[2], George Tsaprailis[3,4], Miklós Emri[5†] and József Tőzsér[1,2*†]

Abstract

Background: Utilization of quantitative proteomics data on the network level is still a challenge in proteomics data analysis. Currently existing models use sophisticated, sometimes hard to implement analysis techniques. Our aim was to generate a relatively simple strategy for quantitative proteomics data analysis in order to utilize as much of the data generated in a proteomics experiment as possible.

Results: In this study, we applied label-free proteomics, and generated a network model utilizing both qualitative, and quantitative data, in order to examine the early host response to Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1). A weighted network model was generated based on the amount of proteins measured by mass spectrometry, and analysis of weighted networks and functional sub-networks revealed upregulation of proteins involved in translation, transcription, and DNA condensation in the early phase of the viral life-cycle.

Conclusion: A relatively simple strategy for network analysis was created and applied to examine the effect of HIV-1 on host cellular proteome. We believe that our model may prove beneficial in creating algorithms, allowing for both quantitative and qualitative studies of proteome change in various biological and pathological processes by quantitative mass spectrometry.

Keywords: Weighted network, Quantitative proteomics, Host response, HIV-1

Background

Utilization of state-of the art proteomics methods can generate thousands of data points, and extensive information on proteins present in the sample can be obtained. High-resolution shotgun proteomics can provide both qualitative and quantitative information about proteins, and can be applied in an unbiased way to study the complete proteome [1, 2]. Despite the high amount of data available, it is sometimes difficult to acquire relevant biological information, in which case sophisticated analytical methods and capable software are needed [3].

Network analysis is widely used in biological data analysis for examination of transcriptomic, proteomic or metabolomic datasets [4–6], and for analyzing interactions between various molecules [7, 8]. In the cellular environment, most of the proteins exert their biological function as part of a complex, or in the form of interactions with other proteins, therefore, application of protein-protein interaction (PPI) analysis methods is advantageous [9]. PPI networks can provide a new layer of information, allowing for the utilization of currently available data, in addition to possibly unravelling hidden biological phenomena [10, 11].

New concepts on network analysis are emerging helping the understanding of biological complexity [12], however, in most cases, only the presence or absence of the protein is considered, the available quantitative data can hardly be incorporated into the network analyses.

The replication cycle of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) is a complex, multi-step, and highly regulated process. The cycle typically begins with viral attachment to cell surface receptors, and ending with the production of infectious virions. Due to the multiple processes involved, the replication cycle has been

* Correspondence: cseva@med.unideb.hu; tozser@med.unideb.hu
†Miklós Emri and József Tőzsér contributed equally to this work.
[1]Proteomics Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1., Debrecen 4032, Hungary
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

classically divided into two distinct phases; the early and late phase. The early phase encompasses cell binding, fusion, internalization, uncoating, reverse transcription, as well as integration of the viral cDNA into the host genome. On the other hand, transcription of viral genome, export of viral RNA, assembly of virions at the plasma membrane, as well as budding and maturation of the released virions are parts of the late phase of the replication cycle [13, 14]. While late phase events are relatively well characterized, the precise mechanism and regulation of early phase steps remain poorly understood.

Genomics and proteomics studies were carried out to investigate how HIV-1 hijacks the host cellular machinery, avoiding being sensed by host immune responses. siRNA screens were implemented to study the cellular genes and proteins required for HIV-1 infection [9, 15, 16], HIV-1 protein – host protein protein-protein interaction networks were generated, and the data were deposited in HIV-1 Human Interaction Database [17].

In case of HIV infection, the network-based examinations have identified perturbed host cellular systems; such as the proteasome and transcriptional regulation, and have revealed that HIV-1 preferably interacts with highly connected and central cellular proteins [18–20].

In this study, we have generated the protein expression profiles of cells during early HIV-1 infection using protein mass spectrometry, and integrated the acquired data with knowledge-based protein-protein interaction network to understand how cellular network is perturbed by HIV.

Results

Our aim was to analyze the proteomic landscape of the early stage of HIV-1 based lentiviral vector transduction. 293 T cells were infected with VSV-G pseudotyped HIV-1 vector, and 0, 4 and 12 h post-infection, cell lysates were harvested. Label-free proteomics was applied to examine protein-level changes. Duplicate samples for three time points were collected (0, 4, and 12 h post-transduction) in case of virus transduced samples and in case of control, mock transduced samples. The collected 6 virus treated and 6 control samples were analyzed in duplicates, allowing for the measurement of two technical and two biological replicates for each time point.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited into the ProteomeXchange Consortium [21] via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD010436 and https://doi.org/10.6019/PXD010436.

Identified proteins (Additional file 1) were manually curated, and in the case of non-human or non-viral identifications, the sequences were verified. In many instances, they were mistakenly designated as non-human proteins, in which case it was corrected. In few instances, the non-human proteins could not be matched to any of the human or viral proteins, and consequently, these sequences were omitted from further analyses. The data for Rhodobacter capsulatus cytochrome c, bovine pancreatic trypsin inhibitor, bovine serum albumin and pig trypsin were kept to serve as reference for quantitative analyses, but were not used for further computations. The relative amount of proteins was computed based on spectral counting and in case of each protein the mean of the results of the four analyses corresponding to each condition was calculated (Additional file 2).

Statistical analysis

Firstly, a qualitative analysis was carried out to detect newly expressed or down-regulated proteins in the first 4 or 12 h after HIV-1 pseudovirion transduction. Only those proteins were considered for statistical analysis which could be quantified in at least 2 out of 4 replicates, and were not quantified in other conditions. HIST1H1E, HNRNPL, PRRC2A and TRIM28 were quantified only at H04, and there were no proteins quantified solely in H12 time point (Additional files 1, 2). HIST1H1E interacts with linker DNA between nucleosomes, and functions in DNA condensation, HNRNPL and TRIM28 play a role in translation and transcription, while PRRC2A plays a role in inflammatory processes.

Some of the proteins were quantified in all time points except H12. These include ALYREF, CCDC86, CSDA, COX5A, HN1, MYL6, PPIF, SEPT2, SRSF6, TCOF1, and TPM3 (Additional file 1). These proteins participate in RNA binding (ALYREF, CCDC86, SRSF6, TCOF1), DNA binding (CSDA), protein folding (PPIF), energy generation (COX5A), signalization (HN1) and cytoskeleton assembly (MYL6, SEPT2, TPM3).

In order to examine changes in the amount of proteins, statistical analysis was carried out (Additional file 3). The amount of CSDA, EEF1A1, EEF1D, HN1, NPM1, PGAM1 and SRSF6 increased significantly, while that of HIST1H1D and HSPA5 significantly decreased in H04 (Fig. 1). It is interesting to note that after peaking in H04, CSDA, HN1 and SRSF6 were not quantified in H12. In H12, compared to C12, the amount of COX6B1 and PDIA3 increased, while that of EEF2 and GAPDH decreased significantly (Fig. 1). When the function of proteins showing statistically significant changes was examined, we observed an increase in the amount of proteins implicated in RNA binding in H04, and an overall decrease in their amount in H12.

Network analysis

To broaden our insight, and to better understand the possible functional associations of protein changes upon HIV-1 pseudovirion transduction, we have searched for the available protein-protein interactions of the quantified proteins in our datasets. For evaluation of the

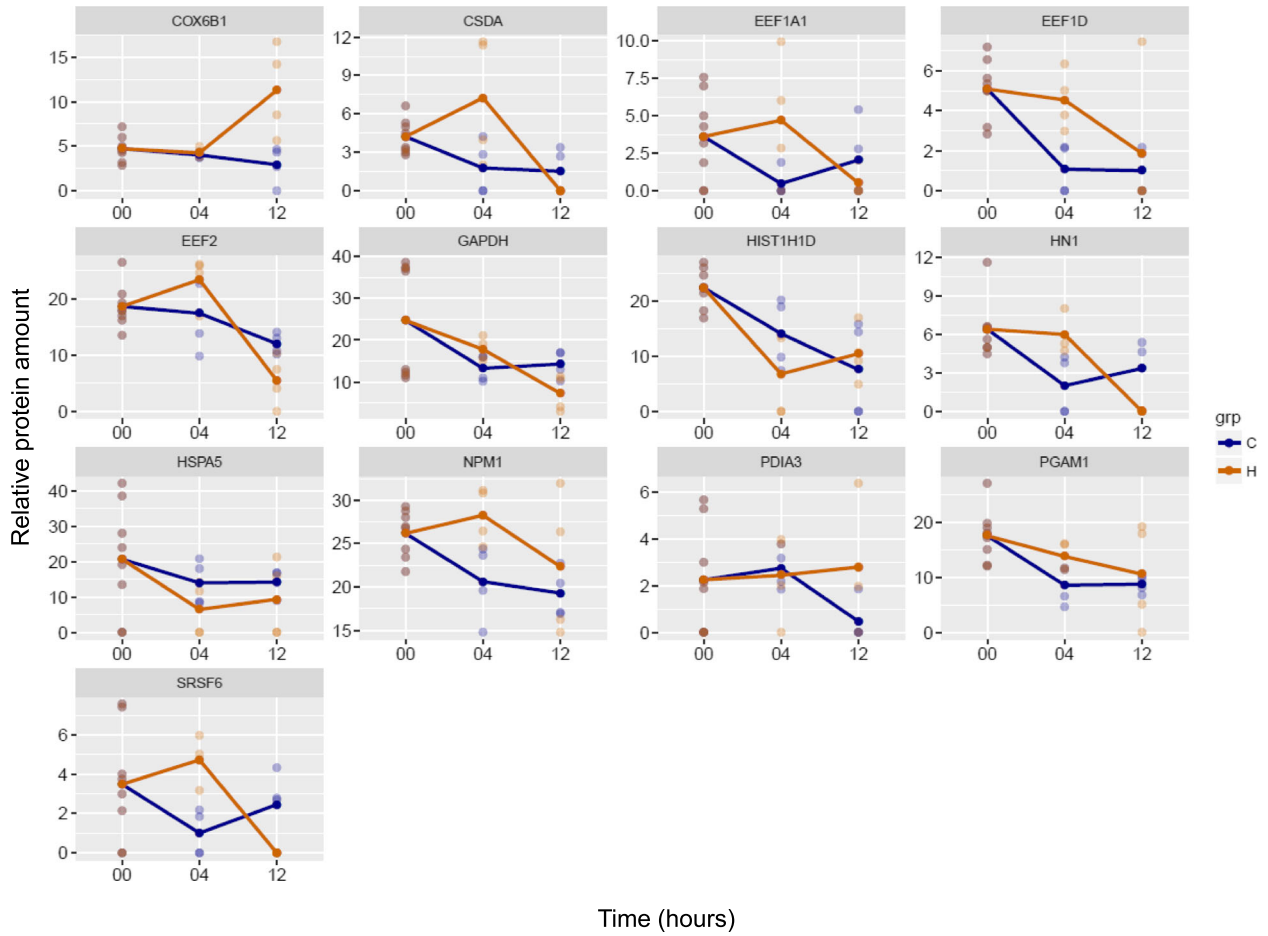


Fig. 1 Relative protein amounts showing statistically significant changes in HIV-1 treated samples compared to controls. The x axis shows the time-points of sample collection in hours, and the y axis shows the relative protein amounts. Blue color refers to control (C), and yellow color to the HIV-1 treated sample (H)

interactions, the STRING database was used, which contains information on known and predicted, direct physical, and indirect functional protein-protein interactions [22]. Only interactions which were of high confidence (interaction score in STRING database > 0.95) were used. Initially, five binary interaction networks were generated: NW0 combined proteins from mock- and virion-treated cell lysates collected at 0 time-point, C04 and C12 networks contained proteins from the mock-treated cells collected 4 h and 12 h post-infection, respectively, and the H04 and H12 networks contained proteins from the HIV-1 transduced cells collected at 4 and 12 h time-points, respectively (Fig. 2). The number of nodes and the number of edges of the networks show a decreasing trend over time, with a marked shrinkage in H12.

These binary networks provide information solely on the possibility of interaction between two proteins (Fig. 2, Fig. 3a, b), hence, in order to gain more realistic information, protein amounts measured by spectral counting were implemented into the network using a simple statistical model. In this way, binary edges were transformed into estimated protein pair's interaction intensities in the sample, which is proportional to the amounts of proteins participating in the interaction, and inversely proportional to the number of interactions (Fig. 3c). The weighted networks were examined, and the number of nodes (N), edges (E), network strength (S), edge density (D) and functional and non-functional edge ratio (R) were calculated (Fig. 4).

The number of nodes decreased significantly in H12, indicating network shrinkage in H12, observed in the binary network (Fig. 4a). The number of edges and network strength did not change in a statistically significant manner (Fig. 4b, c), however, edge density decreased significantly in H04 while increasing significantly in H12 (Fig. 4d). These changes indicate the presence of a less interactive network in H04, and a smaller; yet more active, PPI network in H12 (Fig. 4a, d).

Next, we were eager to analyze the functionality of the networks, and hence, we generated functional sub-networks of proteins belonging to GO terms. All the

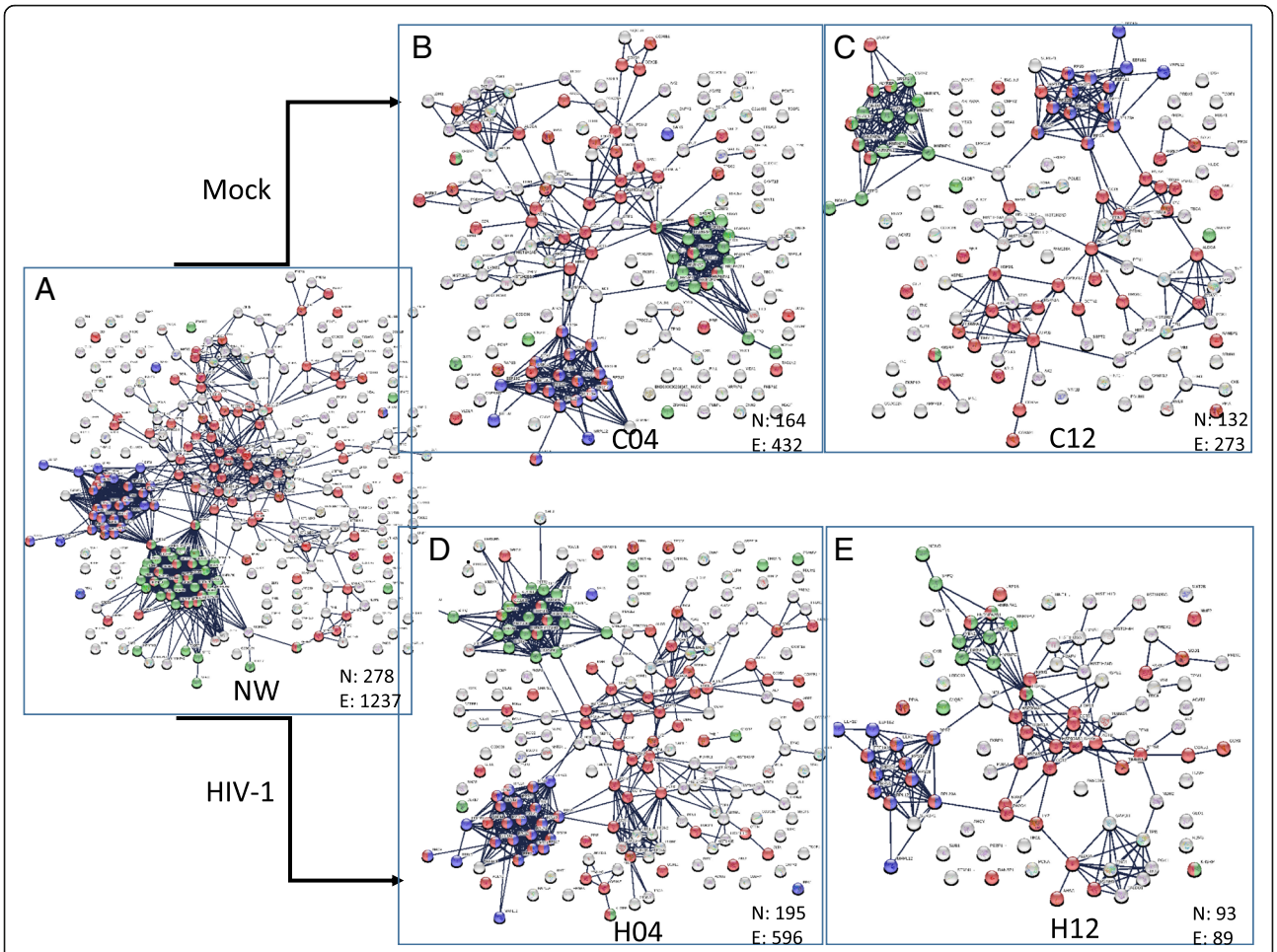


Fig. 2 Protein-protein interaction network of the proteins quantified in each condition. The PPI networks were generated by STRING (confidence 0.95) using the list of quantified proteins presented in Additional file 2 in case of each condition. The number of nodes (N) and the number of edges (E) according to STRING in case of each network is indicated. **a**. PPI network of proteins in the 0 h time point (NW), **b**. PPI network of proteins in the 4 h time point in control, mock-transduced cells (C04). **c** PPI network of proteins in the 12 h time point in control, mock-transduced cells (C12). **d**. PPI network of proteins in the 4 h time point in HIV vector-transduced cells (H04). **e**. PPI network of proteins in the 12 h time point in HIV vector- transduced cells (H12). Red dots represent proteins belonging to transport GO term, blue dots indicate proteins having a role in translation, while green dots indicate proteins with a role in RNA splicing according to the functional enrichment analysis provided by STRING

Molecular Function, Biological Process and Cellular Component GO terms listed as enriched by STRING in C04, H04, C12 and H12; where at least 10 protein per GO function in any of the networks were present, were considered. To visualize network changes, the GO.0044765 term was chosen randomly (Fig. 3d), and the change of this sub-network was visualized in all time points (Fig. 5). Proteins present in a given GO term listed as enriched by STRING were considered as being part of the functional sub-network (f), whereas proteins not being part of the specific GO term, were considered as non-functional (n) proteins. Three types of interactions were analyzed: i) interactions between proteins belonging to functional sub-networks (f), ii) interactions between proteins not belonging to functional sub-network (n), and iii) interactions between functional and non-functional proteins (c – cross) (Fig. 3d). In order to better understand the changes, a statistical approach was applied, and the following network parameters were calculated: in case of each functional (f) network of proteins belonging to a specific GO term, the Nf, Ef, Sf, Df, and Rf, while for non-functional (n) proteins the Nn, En, Sn, Dn, and Rn network parameters were calculated. In case of interactions between the functional and non-functional proteins (c) the Ec, Sc, Dc, and Rc network parameters were calculated (Additional file 4).

According to our hypothesis, those GO functions or functional sub-networks might be responsible for the changes induced by HIV-1, where the parameters in the functional network change significantly, whereas in the non-functional network, no statistically significant changes

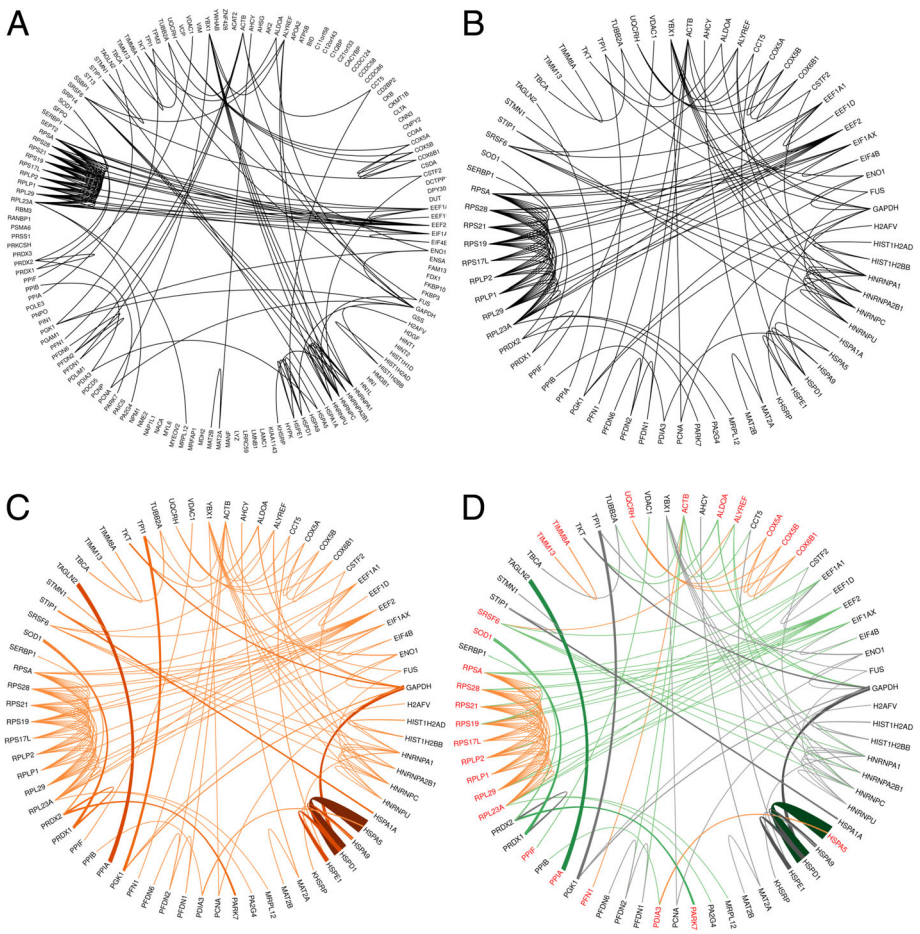


Fig. 3 Network generation pipeline. Representative network drawn by circlize, showing data for sample1 and interactions generated by STRING. **a**. Binary network containing all the identified proteins arranged in alphabetical order on the external ring of the circular plot. Thin black curves show the possible interactions generated by STRING. **b**. Binary network containing only the proteins with interactions. The isolated proteins (i.e. without any connection) were eliminated. Thin black curves show the possible interactions generated by STRING. **c**. Weighted network containing the interacting proteins. Orange lines represent interactions, the higher the intensity of the color and thickness of the line the higher the interaction strength. **d**. Weighted network with functional feature. A randomly selected GO function (GO:0044765) is used to illustrate the functional network. Red proteins are part of the functional sub-network, while black proteins are not, being considered as non-functional proteins. The weighted interactions are color-coded according to the protein-pair classification: functional – functional interactions are orange, non-functional – non-functional interactions are gray, and functional – non-functional interactions are green. The interaction strength is represented by the intensity of the color and thickness of the line: the higher the intensity of the color and the thickness of the line, the higher the interaction strength

are shown. At the same time, those GO functions where the parameters in the functional network do not change in a statistically significant manner, yet do so in the non-functional sub-networks, are thought to not explain the changes related to HIV-1 transduction.

After statistical analysis and FDR correction of the results (Additional file 5), in case of some GO terms, statistically significant differences were observed. No significant difference in edge and strength values were observed in any of the functional sub-networks (Ef and Sf), and the number of nodes was significantly reduced in H12 only in the case of 5 functional sub-networks (Additional file 6). Considering edge density (D) and ratio (R), only those GO terms were further considered where (i) the significant difference was present only in the functional sub-network (Df and Rf, respectively) and (ii) where the significant difference was present both in the functional sub-network (Df and Rf) and in the cross network (Dc and Rc) (Additional file 6). According to our hypothesis, proteins belonging to the GO terms listed in Table 1 and Table 2, are responsible for the changes of cellular proteome observed in the H04 and H12 networks in response to HIV-1 transduction. In H04 sample, an increase in the node number (proteins present in the network) was observed, however, this increase was not significant. In the same time, a global

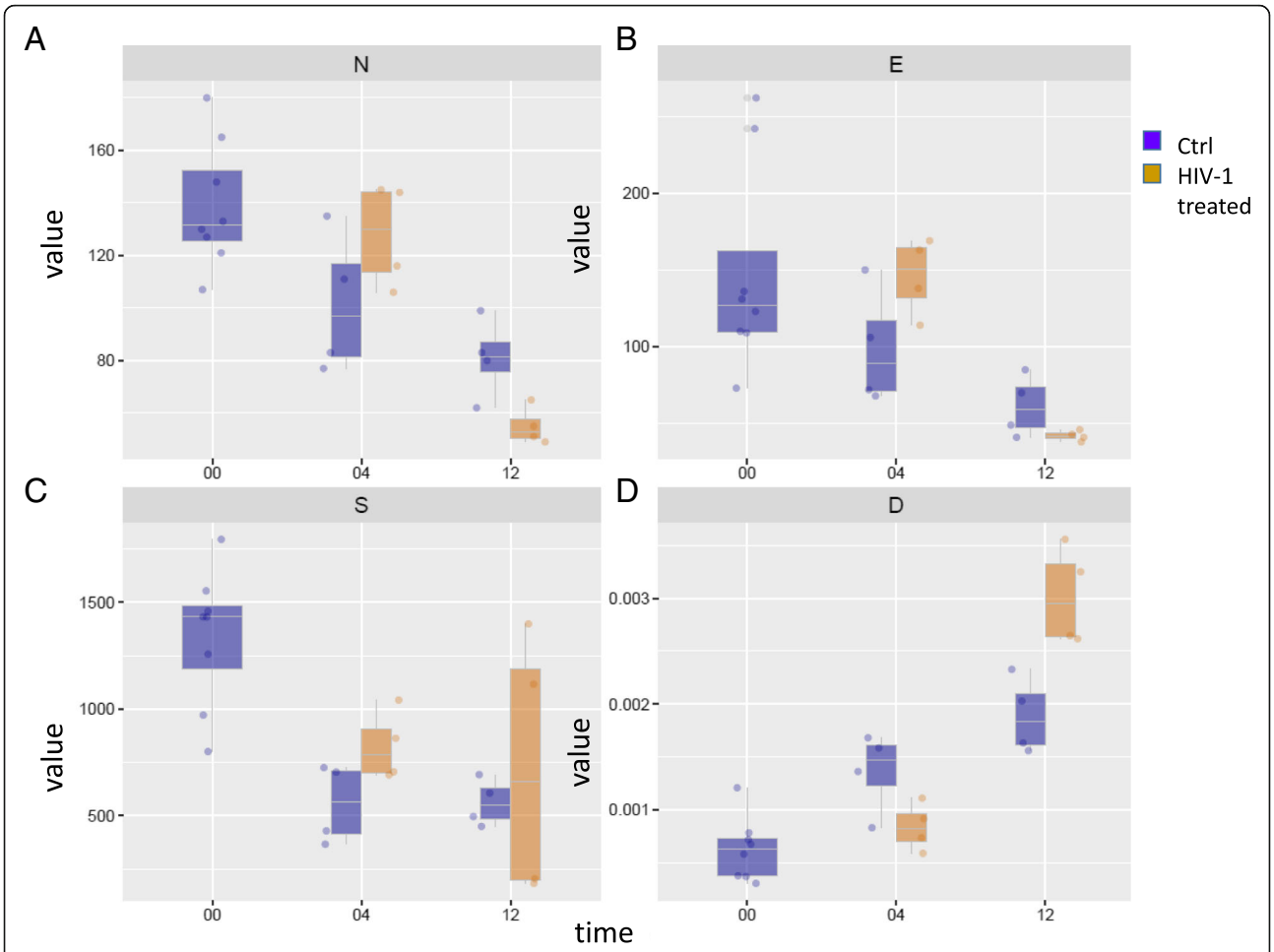


Fig. 4 Network parameters. **a**. Number of nodes (N), **b**. number of edges (E), **c**. network strength (S), **d**. strength or edge density (D) in case of networks observed in the examined conditions. The y axis show the mean value characteristic for each parameter, and the x axis indicates the time points. Blue color refers to control, while the yellow color to the HIV-1 treated conditions

decrease in interactivity; represented by the number of edges, was noticed. Proteins which might be responsible for this reduced interactivity belong to the RNA processing-related functions (splicing, RNA synthesis, RNA catabolism, translation, transcription), regulation of cell death, regulation of cellular response to stress, viral life cycle (viral gene expression, viral transcription, viral life cycle) and protein localization, and some very general GO terms; such as protein binding, cellular macromolecular biosynthetic process, purine nucleotide binding, organic substance transport, etc. (Table 1). In spite of the reduced global interactivity, some functional sub-networks; such as viral process, protein kinase binding, multi-organism process, de novo protein folding and protein complex subunit organization, show significantly increased interactivity (Table 1).

In H12, a statistically significant reduction of the node numbers and shrinkage of the network; along with a significant increase in interactivity, was observed (Fig. 4). The proteins responsible for the increased interactivity (increased Df and Rf values) belong to RNA binding, RNA catabolic process, viral life cycle, viral process, negative regulation of cell death, de novo posttranslational protein folding, protein complex subunit organization, and cellular metabolic process, etc. (Table 2). The cell junction and the myelin sheet GO terms also appear in H12, however, when proteins belonging to these GO terms were examined, it was found that they are part of more general GO terms from the list; such as intracellular non-membrane-bounded organelle or nucleus, extracellular space, etc. In case of biosynthetic process functional sub-network (GO.0009058), a decrease in the Rf was observed.

Discussion

Genome-wide RNA interference-based screens were carried out to evaluate more than 20,000 human gene products to determine their alteration in HIV infection [23, 24]. A previous study showed an overall downregulation of cellular genes encoding for nuclear proteins, and genes involved in DNA replication and

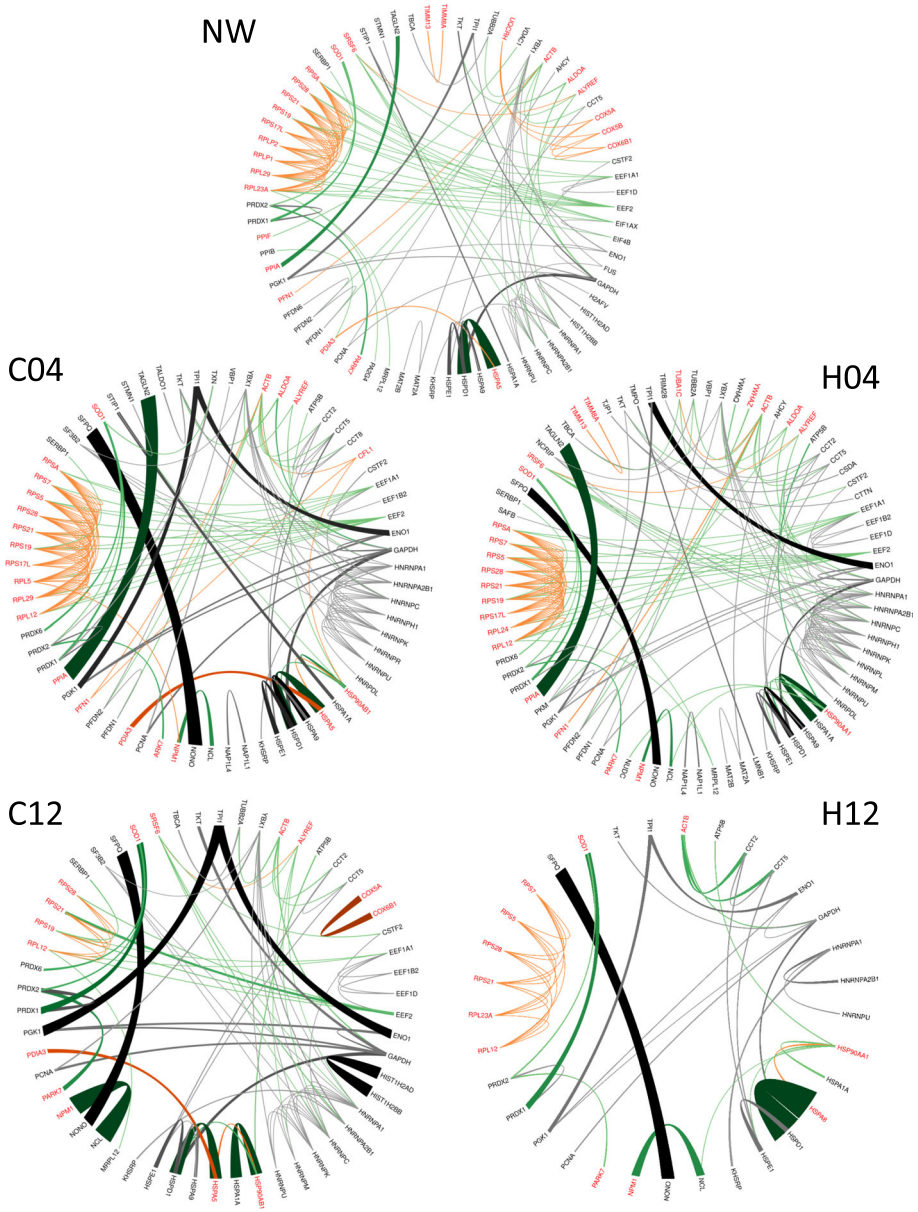


Fig. 5 Network changes visualized in case of a representative functional sub-network. The representative figure shows the changes in weighted networks in case of proteins belonging to randomly selected GO:0044765 GO term. NW represents the weighted PPI network of interacting proteins in the 0 h time point, C04 and C12 correspond to PPI networks of interacting proteins in the 4 h and 12 h time point, respectively, in control, mock-transduced cells. H04 and H12 represent the weighted PPI network of interacting proteins in the 4 h and 12 h time point, respectively, in HIV vector-transduced cells. Red proteins are part of the functional sub-network, while black proteins are non-functional proteins. The weighted interactions are color-coded according to the protein-pair classification: functional – functional interactions are orange, non-functional – non-functional interactions are gray, and functional – non-functional interactions are green. The interaction strength is represented by the intensity of the color and thickness of the line: the higher the intensity of the color and the thickness of the line, the higher the interaction strength

protein synthesis in the early stages of the early phase of viral infection [25], in a pattern that was confirmed by our analysis (Table 1). Upregulation of cellular genes was only found to occur at a later time point, peaking at 22 h post-infection, additionally, analysis on T cells showed that the most profound changes in cellular proteome appear 24 h after infection, at time points related to the late phase of infection [26].

It was found that up to 300 host cellular genes were involved in the life cycle of HIV-1, and while the identity of the genes was divergent among different studies, they were found more or less to belong to similar pathways

Table 1 List of GO terms with significantly different changes in the functional sub-network in H04

GO code	GO term	Significantly changed parameter	Direction of change in H04
GO.0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	Df	decrease
GO.0000228	nuclear chromosome	Df	decrease
GO.0000375	RNA splicing, via transesterification reactions	Df	decrease
GO.0000398	mRNA splicing, via spliceosome	Df	decrease
GO.0000956	nuclear-transcribed mRNA catabolic process	Df	decrease
GO.0003735	structural constituent of ribosome	Df	decrease
GO.0005198	structural molecule activity	Df	decrease
GO.0005515	protein binding	Df	decrease
GO.0005524	ATP binding	Df, Dc	decrease
GO.0005622	intracellular	Df	decrease
GO.0005737	cytoplasm	Df	decrease
GO.0005739	mitochondrion	Df	decrease
GO.0005840	ribosome	Df	decrease
GO.0006351	transcription, DNA-templated	Df, Dc	decrease
GO.0006366	transcription from RNA polymerase II promoter	Df, Dc	decrease
GO.0006367	transcription initiation from RNA polymerase II promoter	Df	decrease
GO.0006396	termination of RNA polymerase II transcription	Df	decrease
GO.0006397	mRNA processing	Df	decrease
GO.0006401	RNA catabolic process	Df	decrease
GO.0006402	mRNA catabolic process	Df	decrease
GO.0006412	translation	Df	decrease
GO.0006413	translational initiation	Df, Dc	decrease
GO.0006414	translational elongation	Df, Dc	decrease
GO.0006415	translational termination	Df	decrease
GO.0006417	regulation of translation	Df, Dc	decrease
GO.0006518	peptide metabolic process	Df	decrease
GO.0006605	protein targeting	Df	decrease
GO.0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	Df	decrease
GO.0006732	coenzyme metabolic process	Df, Dc	decrease
GO.0006886	intracellular protein transport	Df	decrease
GO.0008104	protein localization	Rf	decrease
GO.0008152	metabolic process	Df	decrease
GO.0008380	RNA splicing	Df	decrease
GO.0009056	catabolic process	Df	decrease
GO.0009892	negative regulation of metabolic process	Df	decrease
GO.0009987	cellular process	Df	decrease
GO.0010468	regulation of gene expression	Df	decrease
GO.0010556	regulation of macromolecule biosynthetic process	Df	decrease
GO.0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	Df, Dc	decrease
GO.0010941	regulation of cell death	Df	decrease
GO.0015031	protein transport	Df	decrease
GO.0016032	viral process	Df	increase
GO.0016043	cellular component organization	Df	decrease
GO.0016070	RNA metabolic process	Df, Dc	decrease

Table 1 List of GO terms with significantly different changes in the functional sub-network in H04 *(Continued)*

GO code	GO term	Significantly changed parameter	Direction of change in H04
GO.0016071	mRNA metabolic process	Df	decrease
GO.0016482	cytoplasmic transport	Df	decrease
GO.0016604	nuclear body	Df, Dc	decrease
GO.0017076	purine nucleotide binding	Df, Dc	decrease
GO.0018130	heterocycle biosynthetic process	Df, Dc	decrease
GO.0019058	viral life cycle	Df	decrease
GO.0019080	viral gene expression	Df	decrease
GO.0019083	viral transcription	Df	decrease
GO.0019222	regulation of metabolic process	Df	decrease
GO.0019438	aromatic compound biosynthetic process	Df, Dc	decrease
GO.0019538	aromatic compound biosynthetic process	Df	decrease
GO.0019899	enzyme binding	Df	decrease
GO.0019900	kinase binding	Df, Dc	increase
GO.0019901	protein kinase binding	Df	increase
GO.0022607	cellular component assembly	Df	decrease
GO.0022626	cytosolic ribosome	Df	decrease
GO.0030554	adenyl nucleotide binding	Df, Dc	decrease
GO.0031625	ubiquitin protein ligase binding	Df, Dc	decrease
GO.0031974	membrane-enclosed lumen	Df	decrease
GO.0032550	purine ribonucleoside binding	Df, Dc	decrease
GO.0032553	ribonucleotide binding	Df, Dc	decrease
GO.0032555	purine ribonucleotide binding	Df, Dc	decrease
GO.0032774	RNA biosynthetic process	Df, Dc	decrease
GO.0034248	regulation of cellular amide metabolic process	Df	decrease
GO.0034613	cellular protein localization	Rf	decrease
GO.0034622	cellular macromolecular complex assembly	Df	decrease
GO.0034645	cellular macromolecule biosynthetic process	Df	decrease
GO.0034654	nucleobase-containing compound biosynthetic process	Df, Dc	decrease
GO.0034655	nucleobase-containing compound catabolic process	Df	decrease
GO.0035639	purine ribonucleoside triphosphate binding	Df, Dc	decrease
GO.0036094	small molecule binding	Df, Dc	decrease
GO.0042981	regulation of apoptotic process	Df	decrease
GO.0043065	positive regulation of apoptotic process	Df	decrease
GO.0043066	negative regulation of apoptotic process	Df, Dc	decrease
GO.0043226	organelle	Df	decrease
GO.0043227	membrane-bounded organelle	Df, Dc	decrease
GO.0043229	intracellular organelle	Df	decrease
GO.0043231	intracellular membrane-bounded organelle	Df	decrease
GO.0043233	organelle lumen	Df	decrease
GO.0044085	cellular component biogenesis	Df	decrease
GO.0044237	cellular metabolic process	Df	decrease
GO.0044238	primary metabolic process	Df	decrease
GO.0044248	cellular catabolic process	Df	decrease
GO.0044249	cellular biosynthetic process	Df	decrease

Table 1 List of GO terms with significantly different changes in the functional sub-network in H04 *(Continued)*

GO code	GO term	Significantly changed parameter	Direction of change in H04
GO.0044260	cellular macromolecule metabolic process	Df	decrease
GO.0044265	cellular macromolecule catabolic process	Df	decrease
GO.0044267	cellular protein metabolic process	Df	decrease
GO.0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	Df, Dc	decrease
GO.0044391	ribosomal subunit	Df	decrease
GO.0044422	organelle part	Df	decrease
GO.0044424	intracellular part	Df	decrease
GO.0044444	cytoplasmic part	Df	decrease
GO.0044446	intracellular organelle part	Df	decrease
GO.0044451	nucleoplasm part	Df, Dc	decrease
GO.0044454	nuclear chromosome part	Df	decrease
GO.0044802	single-organism membrane organization	Df, Dc	decrease
GO.0045184	establishment of protein localization	Df	decrease
GO.0046907	intracellular transport	Df, Dc	decrease
GO.0051084	de novo posttranslational protein folding	Df	increase
GO.0051704	multi-organism process	Df, Dc	increase
GO.0060255	regulation of macromolecule metabolic process	Df	decrease
GO.0060548	negative regulation of cell death	Df, Dc	decrease
GO.0065003	macromolecular complex assembly	Df	decrease
GO.0070013	intracellular organelle lumen	Df	decrease
GO.0070972	protein localization to endoplasmic reticulum	Rf	decrease
GO.0071013	catalytic step 2 spliceosome	Df	decrease
GO.0071702	organic substance transport	Df, Dc	decrease
GO.0071704	organic substance metabolic process	Df	decrease
GO.0071705	nitrogen compound transport	Df, Dc	decrease
GO.0071822	protein complex subunit organization	Df	increase
GO.0071840	cellular component organization or biogenesis	Df	decrease
GO.0072594	establishment of protein localization to organelle	Df	decrease
GO.0080090	regulation of primary metabolic process	Df	decrease
GO.0080135	regulation of cellular response to stress	Df, Dc	decrease
GO.0090304	nucleic acid metabolic process	Df, Dc	decrease
GO.0097367	carbohydrate derivative binding	Df, Dc	decrease
GO.1901362	organic cyclic compound biosynthetic process	Df, Dc	decrease
GO.1901566	organonitrogen compound biosynthetic process	Df	decrease
GO.1901575	organic substance catabolic process	Df	decrease
GO.1901576	organic substance biosynthetic process	Df	decrease
GO.1902580	single-organism cellular localization	Df	decrease

In case of each GO term where statistically significant changes were observed in network parameters in HIV-1 treated cells at 4 h time-point the GO identifier, the changed parameter and the direction of change is indicated

[27, 28]. Network analysis is widely used in the examination of protein-protein interactions, providing information regarding protein changes on a different level, giving a more ample view of the alterations and perturbations of the biological systems as a result of a particular treatment. During analysis of PPIs, the presence or absence of a protein is evaluated, and the interactions, in light of existing evidence (ex. experimental data, literature search, computational methods), are displayed [29, 30]. STRING is a widely used, constantly updated, and expanding database of PPIs [22], used for the examination of verified, or potential interactions among

Table 2 List of GO terms with significantly different changes in the functional sub-networks in H12

GO code	GO term	Significantly changed parameter	Direction of change in H12
GO.0005759	mitochondrial matrix	Nf	decrease
GO.0003674	molecular function	Df, Dc	increase
GO.0003723	RNA binding	Rf, Rc	increase
GO.0005488	binding	Df, Dc	increase
GO.0005615	extracellular space	Rf, Rc	increase
GO.0005634	nucleus	Df, Dc	increase
GO.0005654	nucleoplasm	Df, Dc	increase
GO.0005739	mitochondrion	Df	increase
GO.0005743	mitochondrial inner membrane	Df, Dc	increase
GO.0005759	mitochondrial matrix	Df	increase
GO.0005856	cytoskeleton	Df, Dc	increase
GO.0006401	RNA catabolic process	Df, Dc	increase
GO.0006402	mRNA catabolic process	Df, Dc	increase
GO.0009058	biosynthetic process	Rf, Rc	decrease
GO.0009987	cellular process	Df, Dc	increase
GO.0010467	gene expression	Rf, Rc	increase
GO.0016032	viral process	Rf	increase
GO.0016604	nuclear body	Nf	decrease
GO.0017076	purine nucleotide binding	Df, Dc	increase
GO.0019058	viral life cycle	Df, Dc	increase
GO.0022607	cellular component assembly	Df	increase
GO.0030054	cell junction	Df	increase
GO.0031966	mitochondrial membrane	Df, Dc	increase
GO.0031981	nuclear lumen	Df, Dc	increase
GO.0043066	negative regulation of apoptotic process	Df	increase
GO.0043209	myelin sheath	Df	increase
GO.0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	Df	increase
GO.0043933	macromolecular complex subunit organization	Rf, Rc	increase
GO.0044237	cellular metabolic process	Df	increase
GO.0044265	mitochondrial nucleoid	Df, Dc	increase
GO.0044428	nuclear part	Df, Dc	increase
GO.0044430	cytoskeletal part	Df, Dc	increase
GO.0044451	nucleoplasm part	Nf	decrease
GO.0044712	single-organism catabolic process	Nf	decrease
GO.0044765	single-organism transport	Df, Dc	increase
GO.0044822	poly(A) RNA binding	Rf	increase
GO.0051084	de novo posttranslational protein folding	Rf, Rc	increase
GO.0051704	multi-organism process	Rf, Rc	increase
GO.0060548	negative regulation of cell death	Df	increase
GO.0071013	catalytic step 2 spliceosome	Df	increase
GO.0071705	nitrogen compound transport	Nf	decrease
GO.0071822	protein complex subunit organization	Rf	increase
GO.1901575	organic substance catabolic process	Df	increase

In case of each GO term where statistically significant changes were observed in network parameters in HIV-1 treated cells at 12 h time-point the GO identifier, the changed parameter and the direction of change is indicated

proteins of interests. These networks are rich in information on protein clusters and functions based on Gene Ontology (GO), however, enrichment of GO terms does not handle protein amounts, therefore, reflecting theoretical, rather than actual parameters. Meanwhile, the use of highly accurate mass spectrometry techniques provide analytical data that is wealthy in quantity as well as quality. There were few attempts made to introduce the quantitative data into the network analysis [31, 32]. In order to implement quantitative data into the PPI networks, instead of the widely used binary networks, a weighted network often utilized in information science [33] was used in this study. Taking into account the protein amount reflected by the normalized total spectra, instead of the probabilistic assumption [32], we choose a simple statistical model. In our model, the protein pair's interaction is proportional to their amount in the sample, and inversely proportional to the number of possible interactions listed in the PPI network generated by STRING for proteins present in the sample. After including the interaction density values as network edge weights; calculated by our method, we could determine a sort of weighed network parameters for the statistical investigation of network alterations.

In our study, we aimed at characterizing the cellular proteome changes in the early stage of HIV-1 infection, within the 0–12 h time interval. Generation of weighted networks, and analysis of functional sub-networks revealed that the dynamics of protein level changes in sub-networks is different in HIV-1 transduced samples 12 h post-infection. Expectedly, in the very early stages of infection, proteins involved in translation, transcription and DNA condensation were upregulated, notably HIST1H1E, HNRNPL, PRRC2A and TRIM28. Some other proteins; such as ALYREF, CCDC86, CSDA, COX5A, HN1, MYL6, PPIF, SEPT2, SRSF6, TCOF1, and TPM3, prominently associated with RNA binding, cytoskeleton assembly, and signaling were quantified in all time points except H12.

Examining the binary networks, two protein clusters could be observed. One comprising proteins having a role in translation and ribosome biogenesis, and the other containing proteins from the hnRNP family with a role in RNA splicing (Fig. 2). The functional sub-network containing the ribosome component proteins did not show a statistically significant change, and with this, we can demonstrate on protein level the same findings observed by Kleinman et.al. at gene level, who could not observe statistically significant difference in case of genes having a role in ribosome biogenesis at 12 h time point [34]. Regarding the other cluster containing mainly hnRNP proteins, we could not observe a statistically significant change in network parameters among the different time points. However, literature data show that host RNA splicing is altered upon HIV-1 infection, and the level of class A/B and H of hnRNP proteins changes; initially decreased 6–12 days post infection, thereafter increased [35]. At the same time, it was shown that some proteins of this cluster; such as HNRNPH1, HNRNPU and SRSF6, are so called HIV-1 dependency factors [36] and are required by HIV-1. These data are derived from later time-points, as most of the experiments do not examine such early events at 4 h or 12 h post infection.

Considering the results of the analyses, based on the weighted networks, we could identify increased cellular metabolic processes comprising increased RNA binding and catabolism, cellular component assembly, along with increased viral process and inhibition of apoptosis (increased negative regulation of apoptotic process). RNA binding was shown to be increased upon RNA virus infection; Garcia-Moreno et al. observed an increased activity of RNA-binding proteins upon sindbis virus (SINV) infection at 18 h time point [37]. At the same time, they observed an increased binding of RNA binding proteins to viral RNAs. This implies a massive downregulation of the host mRNAs 18 h post infection, involving mainly the housekeeping genes [37]. In case of HIV-1 infection, global siRNA studies indicate that a statistically significant portion of the host factors participate in mRNA transport [18].

Cells infected with HIV-1 usually die by apoptosis, hence prevention of apoptosis might help maintain the viral reservoir in the host [18, 38]. It was shown that a fraction of infected immune cells survive, highlighting the importance of escaping from apoptosis in the development of viral reservoirs [38]. A mixed pattern of upregulation and downregulation of genes involved in antiviral defense and cell death signaling were observed by Mohammadi et al. at early time points [24]. Inhibition of apoptosis increases the virus production in HIV-1 infected cells [39], and modulation of this system might be a good possibility for a therapeutic intervention [40].

Based on our data on the weighted networks, HSPA8 shows an increased interactivity in H12 datasets (Fig. 5a). HSPA8 and other members of the Hsp70 family play a key role during viral infection either as receptors for the virus, as chaperons aiding the protein folding, or as transporters between organelles [18, 41, 42].

Hijacking of the host system by HIV-1 is a complex phenomenon with early and late events. In the early phases of the viral infection, the virus utilizes cellular RNA and protein production machinery for its replication. It was observed that by 15 h post infection, all viral transcripts were produced by the cells, and 18 h after infection, the virus budding commences [24]. Chang et al.;. using next generation sequencing, observed a considerable viral mRNA level in infected cells 12 h post-infection [43]. In this sense, examining the host response 48 h [15, 44] or

6 days post-infection [45] cannot provide us with information on the very early events. Observations made by Kleinmann et al. analyzing the dataset generated by Chang et al., show that at 12 h post infection, the gene expression profiles are similar to the mock samples, and clear distinctions could only be made after 24 h, highlighting the necessity of more sensitive methods for the examination of early events of HIV-1 infection.

It is challenging to properly compare our results to those presented in the scientific literature, since the commonly used starting time point examined is 48 h post infection, in case of HIV-1. However, considering the findings presented by different groups; either on HIV-1 or other RNA virus infections, our findings are in good agreement with previous studies analyzing transcriptomic and proteomic changes upon virus infection in these very early time points. The use of non-primary HIV-1 cell targets; such as HEK, and pseudotyped virions, and the application of data-dependent sampling [46], may indeed limit interpretation of the results. The utilization of other cell types and data acquisition methods with higher reproducibility; such as parallel reaction monitoring [2] or data independent acquisition [47], might give more accurate input data. In spite of the above limitations, we believe that this model of proteomic data evaluation serves as a good starting point for further development of algorithms implementing not only qualitative, but also quantitative data generated in a given proteomic experiment, and that such a combination will undoubtedly aid in the understanding and deciphering of complex biological phenomena.

Conclusion

A weighted network model facilitating the use of both qualitative and quantitative data, acquired in a label-free proteomics experiment was generated and applied to examine the early host response to HIV-1. Upregulation of proteins involved in translation, transcription and DNA condensation in the early phase of the viral life-cycle could be observed, highlighting the utility of our weighted PPI network data analysis approach. More studies are required to further demonstrate the utility of this new data-driven weighted network based analysis, and it should be noted that the current model has a serious limitation. The strength of different protein-protein interactions in the edge weight calculation; due to the lack of information, is not yet included. However, the applied weight-model can easily be extended to use this type of information as soon as any public database becomes available. We hope that this approach can open new ways for creating algorithms, allowing for both quantitative and qualitative studies of proteome change in various biological and pathological processes by quantitative mass spectrometry.

Methods

Production of viral particles

Viral particles were produced with some modifications of a previously utilized protocol [48]. Briefly, recombinant viruses were produced by transient transfection of 293 T cells (ATCC® CRL3216™) using pWOX-CMV-GFP (transfer vector plasmid), pMDLg/pRRE (packaging plasmid), pRSV.rev (Rev-coding plasmid), and pMD. G (VSV-G envelope protein-coding plasmid). Vectors were a kind gift from D. Trono (University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland) [49], and were subsequently modified by our research group [48]. Salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich) was also added. Media containing virus particles was concentrated by Ultracel-100 K Amicon Ultra Centrifugal Filter (Millipore), and stored in − 70 °C. Quantity of pseudovirions produced was assessed by measurement of reverse transcriptase (RT) activity using a colorimetric kit (Sigma-Aldrich, Roche).

Transduction and sample collection

293 T cells in T-25 cell culture flasks were either mock-treated or transduced at 50% confluency with 5 ng RT equivalent of the HIV-based pseudovirions, in the presence of 4 μg/ml polybrene (Sigma-Aldrich), in 1 ml total volume, and incubated at 37 C°. After 0, 4, and 12 h, cells were trypsinized for 10 min, then washed tree times with ice-cold PBS to remove non-fused pseudovirion particles. The final pellet was suspended in 4 ml lysis buffer (150 mM sodium chloride, 1.0% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 50 mM Tris) pH 8.0, supplemented with cOmplete protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), incubated for 30 min at room temperature, centrifuged, and the supernatant was mixed with 24 ml cold (− 20 C°) acetone and stored at − 20 C° overnight.

Mass spectrometry analysis

The cleared cell lysates were acetone-precipitated with six volumes of cold acetone overnight. The precipitates were re-dissolved in 25 mM ammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich) and digested in-solution with trypsin [50]. The tryptic fragments were used for replicate LC-MS/MS analyses at University of Arizona in Tucson, AZ, USA.

500 ng per 5 μL injected protein lysate spiked with 300 fmol of Rhodobacter capsulatus cytochrome c T33 V mutant, was analyzed using a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with an Advion nanomate ESI source (Advion), after Omix (Agilent Technologies) C18 sample clean-up according

to the manufacturer's instructions. Peptides were eluted from a C18 precolumn (100-μm × 2 cm, Thermo Fisher Scientific) onto an analytical column (75-μm × 10 cm, C18, Thermo Fisher Scientific) using a 165 min gradient of solvent A (water, 0.1% formic acid) and solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid). The flow rate was 500 nl/minute. Data-dependent analysis (DDA) was performed by the Xcalibur v 2.1.0 software [51] using a survey mass scan at 60,000 resolution in the Orbitrap analyzer scanning mass/charge 350–1600, followed by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry (MS/MS) at 35 normalized collision energy of the 14 most intense ions in the linear ion trap analyzer. Precursor ions were selected by the monoisotopic precursor selection setting with selection or rejection of ions held to a +/− 10 ppm window. Singly charged ions were excluded from MS/MS. Dynamic exclusion was set to place any selected m/z on an exclusion list for 45 s after a single MS/MS. Tandem mass spectra were searched against the UniprotKB/Swiss-Prot release available on December 12, 2014 without species restriction. At the time of the search, this database contained 459,734 entries. All MS/MS spectra were searched using Thermo Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) considering fully tryptic peptides with up to 2 missed cleavage sites. Variable modifications considered during the search included methionine oxidation (15.995 Da), and cysteine carbamidomethylation (57.021 Da). The parent ion mass tolerance was 10 ppm, while the fragment tolerance was 0.8 Da. Proteins were identified at 99% confidence with XCorr score cut-offs [52] as determined by a reversed database search. The protein and peptide identification results were validated with Scaffold v4.4.6. (Proteome Software Inc.) [1]. Peptide identifications were accepted if they had greater than 89% probability to achieve an FDR less than 0.1% by the Scaffold Local FDR algorithm. Protein identifications were accepted if they had greater than 99% probability and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the ProteinProphet algorithm [53]. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Proteins sharing significant peptide evidence were grouped into clusters.

Protein quantification was done based on spectral counting; the quantitative values were generated by the Scaffold program based on the normalized total spectra. In case of protein clusters, each peptide was used only once for quantification for the first human protein in the cluster, as listed by Scaffold. All quantitative data were used for statistical analyses; none of the data points were removed.

Statistical analysis of proteomics data

For both statistical and network analysis, we used in-house developed R-software based on STRING [54–57], circlize (https://jokergoo.github.io/circlize_book/book/), MASS [55], lsmeans [56], matrixStats [57], reshape2 [58] and ggplot2 [59] packages. Assuming that data from technical repetitions are often characterized by Poisson distribution [60], and the large variances of biological replicas can be modelled by negative binomial distribution [61], we used modified general linear models to describe group-level differences in measured protein data in the 4 and 12 h time points. For each protein; after fitting negative binomial generalized linear model [55], we performed a post-hoc analysis [62] to characterize time-dependent mean differences by z score, and corrected p values for multiple comparisons.

Network analysis

Gene names of the identified human proteins were subjected to STRING database [22] and five PPI networks were generated. The NW0 combined proteins from mock- and HIV-1 plasmid-treated cell lysates collected at 0 time-point, the C04 and C12 networks contained proteins from the mock cells collected 4 and 12 h post-infection, respectively, while the H04 and H12 networks contained proteins from the HIV-1 treated cells collected at 4 and 12 h time-points, respectively. Very high confidence interactions (interaction score > 0.95) in between the query proteins were used for the generation of each binary network. In these networks, the nodes were the proteins and the edges indicated the interactions between proteins as they were present in STRING. For network generation, the SRING R-package and the STRING database was applied, and the 0.95 combined score value to generate the binary networks $B_{t,s}$ (B_0, $B_{4h,C}$, $B_{4h,H}$, $B_{12h,C}$, $B_{12h,H}$) corresponding to the protein sets. In these networks, the binary edges indicated only the possibility of the interactions, taking no notice of the quantity.

To estimate the real interaction density, binary networks ($B_{t,s}$) generated by STRING were further modified, and the amount of proteins measured by spectral counting was used to add w_{ij} weights to the edges. In this way, the existence of edges provides information on the existence of interaction, and the strength of protein pair's interactions were estimated by this edge-weight model:

$$w_{ij} = \frac{n_i}{k_i}\frac{n_j}{k_j} \quad (1)$$

where w_{ij} represents the interaction density between protein P_i and P_j; n_i, n_j means the quantity while k_i, k_j denote the degree (the number of edges) of P_i and P_j in the given $B_{t,s}$ binary network.

In this calculation, we used the measured data (n_i, n_j), which enabled us to alter the theoretical binary PPI

network into a realistic, sample related interaction network, in which the weights of the edges are in direct proportion to the quantities and in inverse proportion to all interaction possibilities of the connected proteins in the given sample.

Because we can consider the n_i as the number of molecules of the protein P_i, the n_i/k_i ratio represents the number of P_i molecules involved in one interaction of P_i, and thus, the interaction density between P_i and P_j can be described by the product of n_i/k_i and n_j/k_j. It should be mentioned that the used edge-weight model in the absence of a strong interactor protein may overestimate the effect of other weak interactor proteins, also, interaction strength data cannot be achieved in a classical quantitative proteomics experiment, and currently are unavailable in publicly accessible databases.

Functional subnetwork construction

In order to investigate the PPI networks of the proteins belonging to GO (geneontology.org/) terms, we marked in each $W_{t,s}$ the nodes by a function flag, which indicated whether or not the protein belongs to a given f-function; in our case, to a GO term. The so-called functional enrichment according to GO terms was done by STRING, using default settings and the Molecular Function, Biological Process and Cellular Component GO terms listed as enriched by STRING in C04, H04, C12 and H12, where at least 10 protein per GO function in any of the networks was present, were considered. This procedure defined a sort of $W^f_{t,s}$ functional networks, and divided them into two disjunctive sub-networks ($F^f_{t,s}$ functional, belonging to the GO term and $NF^f_{t,s}$ non-functional not being part of the respective GO term), containing the functional and the non-functional nodes, respectively. Because of this separation, the edges (i.e. the interactions) were also classified into three classes: functional edges between the functional nodes, non-functional edges between non-functional nodes and cross-edges in between functional and non-functional nodes, depending on the f-markers of the connected proteins.

Examination of the global characteristics of the evaluated PPI networks

Any undirected weighted PPI network W(N,E) consists of two sets: N nodes and E edges. Each of the links (interactions) is defined by a couple of nodes (proteins) P_i and P_j, and its value is w_{ij}. Since the direction of interaction cannot be ordered, the connectivity matrix became symmetric: $w_{ij} = w_{ji}$.

Number of nodes (N) and edges (E)

N, Nf and Nn denotes the number of nodes (i.e. proteins) in the whole network and the functional and non-functional sub-networks, respectively, with the following relation:

$$N = Nf + Nn \tag{2}$$

E denotes the number of edges (i.e. interactions) in the whole network. Ef and En are the number of edges within the functional and the non-functional sub-networks, respectively. The number of cross-edges (Ec) shows the connected proteins between the functional and the non-functional sub-networks. The edge numbers follow the next relation:

$$E = Ef + En + Ec \tag{3}$$

Network strength and averaged node strength (S)

We defined the network strength S as the total sum of the weights of edges:

$$S = \frac{1}{2}\sum_{i,j=1}^{N} w_{i,j} \tag{4}$$

In the functional networks we can calculate strength of whole network (S), and the functional (Sf) and non-functional sub-networks (Sn), as well. The sum of cross connection edges can be calculate as follows:

$$Sc = S\text{-}Sf\text{-}Sn \tag{5}$$

Edge-weight density or strength density (D)

the edge-weight density measures how the weighted network is saturated by strong edges:

$$D = \frac{S}{w_{max}\dfrac{N(N-1)}{2}} \tag{6}$$

In the functional networks we can measure the edge-weight density of the whole network (D) and the functional (Df) and non-functional sub-networks (Dn), as well.

Edge-weight ratio (R): using the network strength we can define the edge-weight ratio parameter for the two sub-networks:

$$Rf = \frac{Sf}{S} \tag{7}$$

and the non-functional relative edge-weight density:

$$Rn = \frac{Sn}{S} \tag{8}$$

Since the distribution of network parameters was not Gaussian or negative binomial, we used Wilcoxson tests [63] to characterize the group-related differences at the 4 and 12 h time points. The evaluated p-values were corrected for multiple comparisons by false discovery rate methods [64].

Additional files

Additional file 1: List of identified proteins. (XLSX 1147 kb)

Additional file 2: List of quantified proteins. The gene name according to UniProt in case of quantified proteins is given, and for each protein, the mean amount of four replicates is presented for each time point except NW, where the mean amount of 8 replicates is given. (XLSX 23 kb)

Additional file 3: Statistical analysis of protein quantities. The gene name according to UniProt, the *p* value and z score for the 4 h and 12 h time points are listed in case of each protein. The lists are presented in ascending order of the *p* values. (XLSX 24 kb)

Additional file 4: Network parameters calculated for functional sub-networks. The y axis show the mean value characteristic for each parameter, and the x axis indicates the time points. Blue color refers to the control, while the yellow color to the HIV-1 treated conditions. N refers to the number of nodes, E to the number of edges, S show network strength, D represents the edge density and R the edge ratio. The f refers to the functional sub-network, the n to the non-functional subnetwork containing the proteins not present in the functional sub-network, while the c refers to the interactions between the functional and the non-functional sub-networks. (PDF 9676 kb)

Additional file 5: Statistical analysis of network parameters. The FDR-corrected p value and z score for the 4 h and 12 h time points, respectively, in case of each network parameter calculated (N, Nf, Nn, E, Ef, En, Ec, S, Sf, Sn, Sc, D, Df, Dn, Dc, Rf, Rn, Rc) for each GO function presented in Additional file 4. (XLSX 287 kb)

Additional file 6: List of GO terms with network parameters that were significantly changed in the functional sub-networks. (XLSX 16 kb)

Abbreviations

cDNA: Complementary DNA; D: Saturation of the PPI interaction density in the sample; Dc: Saturation of the PPI interaction density between the functional and non-functional proteins in the sample; Df: Saturation of the PPI interaction density of the functional proteins in the sample; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; Dn: Saturation of the PPI interaction density of the nonfunctional proteins in the sample; DNA: Deoxyribonucleic acid; E: Number of interactions in the network generated from STRING with combined score of 0.95; Ec: Number of interactions between the functional and non-functional proteins; Ef: Number of interactions between the functional proteins; En: Number of interactions between the non-functional proteins; FBS: Fetal bovine serum; GO: Gene Ontology; HEK: Human embryonic kidney cells; HIV: Human immunodeficiency virus; MIPS: Monoisotopic precursor selection; N: Number of proteins in the network; Nf: Number of proteins in the functional sub-network; Nn: Number of proteins in the non-functional sub-network; PBS: Phosphate buffered saline; PPI: Protein-protein interaction; ppm: Parts per million; R: Relative PPI density, edge-weight ratio; Rc: Relative cross-functional PPI density, edge-weight ratio between the functional and non-functional PPI networks; Rf: Relative functional PPI density, edge-weight ratio between in the functional PPI network; Rn: Relative non-functional PPI density, edge-weight ratio in the non-functional PPI network; RNA: Ribonucleic acid; RT: Reverse transcriptase; S: PPI density of the sample; Sc: PPI density of the cross-functional proteins in the sample; Sf: PPI density of the functional proteins in the sample; siRNA: Small interfering RNA; Sn: PPI density of the non-functional proteins in the sample; VSV: Vesicular stomatitis virus

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

JT conceptualized the study, designed the HIV-1 transduction experiments, reviewed the manuscript and provided the resources for the study. FT produced the viruses, carried out the cell transductions, prepared the samples for mass spectrometry and curated the mass spectrometry data. EC designed the data analysis strategy, analyzed the mass spectrometry, statistical and network analysis data, prepared the tables and wrote the manuscript. GT performed the mass spectrometry experiment and helped with the manuscript preparation. ME designed and performed the statistical analysis and network analysis, assisted in manuscript writing and prepared the Figs. MM participated in manuscript preparation, critically reviewed the manuscript, performed the English editing and helped with the evaluation of HIV-1 transduction results. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Hungarian Scientific Research Fund (NKFI-6, 125238) to JT, by the Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry of Human Capacities in Hungary, within the framework of the Biotechnology thematic programme of the University of Debrecen, GINOP-2.3.3-15-2016-00020, and partially by Janos Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. Mass spectrometry data were acquired by the Arizona Proteomics Consortium supported by NIEHS grant ES06694 to the SWEHSC, NIH/NCI grant CA023074 to the UA Cancer Center and by the BIO5 Institute of the University of Arizona. The Thermo Fisher LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer was provided by grant 1S10 RR028868–01 from NIH/NCRR. Funding bodies did not play any roles in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and materials

The mass spectrometry datasets generated during the current study were deposited to the ProteomeXchange database and are available via the PRIDE repository with the dataset identifier PXD010436 and https://doi.org/10.6019/PXD010436. All data analyzed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

Ethics approval and consent to participate

Non applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

[1]Proteomics Core Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1., Debrecen 4032, Hungary. [2]Laboratory of Retroviral Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Egyetem ter 1., Debrecen 4032, Hungary. [3]Arizona Research Labs, University of Arizona, PO Box 210066, Administration Building, Room 601, Tucson, AZ 85721-0066, USA. [4]The Scripps Research Institute, 132 Scripps Way, Jupiter, FL 33458, USA. [5]Department of Medical Imaging, Division of Nuclear Medicine and Translational Imaging, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei krt. 98., Debrecen 4032, Hungary.

Received: 7 May 2019 Accepted: 10 July 2019
Published online: 17 July 2019

References

1. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. Anal Chem. 2002;74(20):5383–92.
2. Domon B, Aebersold R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. Nat Biotechnol. 2010;28(7):710–21.
3. Codrea MC, Nahnsen S. Platforms and pipelines for proteomics data analysis and management. Modern Proteomics - Sample Preparation, Analysis and Practical Applications. 2016;919:203–15.
4. Kentaro Kawata AH, Yugi K, Kubota H, Sano T, Fujii M, Tomizawa Y, Kokaji T, Tanaka KY, Uda S, Yutaka S, Matsumoto M, Nakayama KI, Saitoh K, Kato K, Ueno A, Ohishi M, Hirayama A, Kuroda S. Trans-omic Analysis Reveals Selective Responses to Induced and Basal Insulin across Signaling, Transcriptional, and Metabolic Networks. *iScience*. 2018;7:1–18.
5. Koberlin MS, Snijder B, Heinz LX, Baumann CL, Fauster A, Vladimer GI, Gavin AC, Superti-Furga G. A conserved circular network of Coregulated lipids modulates innate immune responses. Cell. 2015;162(1):170–83.

6. Oldham MC, Konopka G, Iwamoto K, Langfelder P, Kato T, Horvath S, Geschwind DH. Functional organization of the transcriptome in human brain. Nat Neurosci. 2008;11(11):1271–82.
7. Li D, Li YP, Li YX, Zhu XH, Du XG, Zhou M, Li WB, Deng HY. Effect of regulatory network of exosomes and microRNAs on neurodegenerative diseases. Chin Med J. 2018;131(18):2216–25.
8. Szilagyi A, Nussinov R, Csermely P. Allo-network drugs: extension of the allosteric drug concept to protein- protein interaction and signaling networks. Curr Top Med Chem. 2013;13(1):64–77.
9. Jager S, Cimermancic P, Gulbahce N, Johnson JR, McGovern KE, Clarke SC, Shales M, Mercenne G, Pache L, Li K, et al. Global landscape of HIV-human protein complexes. Nature. 2011;481(7381):365–70.
10. Csermely P, Sandhu KS, Hazai E, Hoksza Z, Kiss HJ, Miozzo F, Veres DV, Piazza F, Nussinov R. Disordered proteins and network disorder in network descriptions of protein structure, dynamics and function: hypotheses and a comprehensive review. Curr Protein Pept Sci. 2012;13(1):19–33.
11. Dai LY, Zhao TY, Bisteau X, Sun WD, Prabhu N, Lim YT, Sobota RM, Kaldis P, Nordlund P. Modulation of Protein-Interaction States through the Cell Cycle. *Cell*. 2018;173(6):1481.
12. Weiss RA. The discovery of endogenous retroviruses. Retrovirology. 2006;3:67.
13. Kirchhoff F: HIV Life Cycle: Overview. In: *Encyclopedia of AIDS*. Edited by Hope TJ, Stevenson M, Richman D. New York, NY: Springer New York; 2013: 1–9.
14. Lehmann-Che J, Saib A. Early stages of HIV replication: how to hijack cellular functions for a successful infection. AIDS Rev. 2004;6(4):199–207.
15. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. Science. 2008;319(5865):921–6.
16. Konig R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE, et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. Cell. 2008;135(1):49–60.
17. Fu W, Sanders-Beer BE, Katz KS, Maglott DR, Pruitt KD, Ptak RG. Human immunodeficiency virus type 1, human protein interaction database at NCBI. Nucleic Acids Res. 2009;37:D417–22.
18. MacPherson JI, Dickerson JE, Pinney JW, Robertson DL. Patterns of HIV-1 protein interaction identify perturbed host-cellular subsystems. PLoS Comput Biol. 2010;6(7):e1000863.
19. Dickerson JE, Pinney JW, Robertson DL. The biological context of HIV-1 host interactions reveals subtle insights into a system hijack. BMC Syst Biol. 2010; 4:80.
20. Pinney JW, Dickerson JE, Fu W, Sanders-Beer BE, Ptak RG, Robertson DL. HIV-host interactions: a map of viral perturbation of the host system. Aids. 2009;23(5):549–54.
21. Vizcaino JA, Deutsch EW, Wang R, Csordas A, Reisinger F, Rios D, Dianes JA, Sun Z, Farrah T, Bandeira N, et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. Nat Biotechnol. 2014;32(3):223–6.
22. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. Nucleic Acids Res. 2017;45(D1):D362–8.
23. Zhou HL, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XHD, Castle JC, Stec E, Ferrer M, Strulovici B, Hazuda DJ, et al. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. Cell Host Microbe. 2008;4(5):495–504.
24. Arhel N, Kirchhoff F. Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets. Bba-Mol Basis Dis. 2010;1802(3):313–21.
25. Mohammadi P, Desfarges S, Bartha I, Joos B, Zangger N, Munoz M, Gunthard HF, Beerenwinkel N, Telenti A, Ciuffi A. 24 hours in the life of HIV-1 in a T cell line. PLoS Pathog. 2013;9(1):e1003161.
26. Nemeth J, Vongrad V, Metzner KJ, Strouvelle VP, Weber R, Pedrioli P, Aebersold R, Gunthard HF, Collins B. In vivo and in vitro proteome analysis of human immunodeficiency virus (HIV)-1-infected, human CD4(+) T cells. Mol Cell Proteomics. 2017;16(4):S108–23.
27. Goff SP. Knockdown screens to knockout HIV-1. Cell. 2008;135(3):417–20.
28. Yeung ML, Houzet L, Yedavalli VSRK, Jeang KT. A genome-wide short hairpin RNA screening of Jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. J Biol Chem. 2009;284(29):19463–73.
29. de Lichtenberg U, Jensen LJ, Brunak S, Bork P. Dynamic complex formation during the yeast cell cycle. Science. 2005;307(5710):724–7.
30. Greene CS, Krishnan A, Wong AK, Ricciotti E, Zelaya RA, Himmelstein DS, Zhang R, Hartmann BM, Zaslavsky E, Sealfon SC, et al. Understanding multicellular function and disease with human tissue-specific networks. Nat Genet. 2015;47(6):569–76.
31. Celaj A, Schlecht U, Smith JD, Xu W, Suresh S, Miranda M, Aparicio AM, Proctor M, Davis RW, Roth FP, et al. Quantitative analysis of protein interaction network dynamics in yeast. Mol Syst Biol. 2017;13(7):934.
32. Sardiu ME, Cai Y, Jin J, Swanson SK, Conaway RC, Conaway JW, Florens L, Washburn MP. Probabilistic assembly of human protein interaction networks from label-free quantitative proteomics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(5):1454–9.
33. Boccaletti S, Latora V, Moreno Y, Chavez M, Hwang DU. Complex networks: structure and dynamics. Phys Rep. 2006;424(4–5):175–308.
34. Kleinman CL, Doria M, Orecchini E, Giuliani E, Galardi S, De Jay N, Michienzi A. HIV-1 infection causes a down-regulation of genes involved in ribosome biogenesis. PloS one. 2014;9(12):e113908.
35. Dowling D, Nasr-Esfahani S, Tan CH, O'Brien K, Howard JL, Jans DA, Purcell DF, Stoltzfus CM, Sonza S. HIV-1 infection induces changes in expression of cellular splicing factors that regulate alternative viral splicing and virus production in macrophages. Retrovirology. 2008;5:18.
36. Sertznig H, Hillebrand F, Erkelenz S, Schaal H, Widera M. Behind the scenes of HIV-1 replication: Alternative splicing as the dependency factor on the quiet. Virology. 2018;516:176–188.
37. Garcia-Moreno M, Noerenberg M, Ni S, Jarvelin AI, Gonzalez-Almela E, Lenz CE, Bach-Pages M, Cox V, Avolio R, Davis T, et al. System-wide Profiling of RNA-Binding Proteins Uncovers Key Regulators of Virus Infection. Molecular cell. 2019;74(1):196–211, e111.
38. Lum JJ, Badley AD: Resistance to apoptosis: mechanism for the development of HIV reservoirs. Current HIV research. 2003;1(3):261–274.
39. Antoni BA, Sabbatini P, Rabson AB, White E. Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection. J Virol. 1995;69(4):2384–392.
40. Badley AD, Sainski A, Wightman F, Lewin SR. Altering cell death pathways as an approach to cure HIV infection. Cell death & disease. 2013;4:e718.
41. Stricher F, Macri C, Ruff M, Muller S. HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. Autophagy. 2013;9(12):1937–54.
42. Sherman MP, Greene WC. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2002;4(1):67–73.
43. Chang ST, Sova P, Peng X, Weiss J, Law GL, Palermo RE, Katze MG. Next-generation sequencing reveals HIV-1-mediated suppression of T cell activation and RNA processing and regulation of noncoding RNA expression in a CD4+ T cell line. mBio. 2011;2(5).
44. Rato S, Rausell A, Munoz M, Telenti A, Ciuffi A. Single-cell analysis identifies cellular markers of the HIV permissive cell. Plos Pathog. 2017;13(10):e1006678.
45. Rao S, Amorim R, Niu M, Breton Y, Tremblay MJ, Mouland AJ. Host mRNA decay proteins influence HIV-1 replication and viral gene expression in primary monocyte-derived macrophages. Retrovirology. 2019;16(1):3.
46. Tabb DL, Vega-Montoto L, Rudnick PA, Variyath AM, Ham AJ, Bunk DM, Kilpatrick LE, Billheimer DD, Blackman RK, Cardasis HL, et al. Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of proteome research. 2010;9(2):761–76.
47. Heaven MR, Funk AJ, Cobbs AL, Haffey WD, Norris JL, McCullumsmith RE, Greis KD. Systematic evaluation of data-independent acquisition for sensitive and reproducible proteomics-a prototype design for a single injection assay. J Mass Spectrom : JMS. 2016;51(1):1–11.
48. Miklossy G, Tozser J, Kadas J, Ishima R, Louis JM, Bagossi P. Novel macromolecular inhibitors of human immunodeficiency virus-1 protease. Protein engineering, design & selection : PEDS. 2008;21(7):453–61.
49. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J Virol. 1998;72(11):8463–71.
50. Csosz E, Markus B, Darula Z, Medzihradszky KF, Nemes J, Szabo E, Tozser J, Kiss C, Marton I. Salivary proteome profiling of oral squamous cell carcinoma in a Hungarian population. FEBS open bio. 2018;8(4):556–69.
51. Andon NL, Hollingworth S, Koller A, Greenland AJ, Yates JR 3rd, Haynes PA. Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectrometry. Proteomics. 2002;2(9):1156–68.
52. Qian WJ, Liu T, Monroe ME, Strittmatter EF, Jacobs JM, Kangas LJ, Petritis K, Camp DG 2nd, Smith RD. Probability-based evaluation of peptide and protein identifications from tandem mass spectrometry and SEQUEST analysis: the human proteome. J Proteome Res. 2005;4(1):53–62.
53. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Analytical chemistry. 2003;75(17):4646–58.
54. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Lin J, Minguez P, Bork P, von Mering C, et al. STRING v9.1: protein-protein

interaction networks, with increased coverage and integration. Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):D808–15.
55. W.N. Venables BDR. Modern applied statistics with S. New York: Springer-Verlag; 2002.
56. Lenth RV. Least-squares means: the R package lsmeans. J Stat Softw. 2016;69(1):1–33.
57. matrixStats: Functions that Apply to Rows and Columns of Matrices (and to Vectors). R package version 0.52.2 [https://github.com/HenrikBengtsson/matrixStats].
58. Wickham H. Reshaping data with the reshape package. J Stat Softw. 2007;21(12):1–20.
59. Ginestet C. ggplot2: elegant graphics for data analysis. J R Stat Soc a Stat. 2011;174:245.
60. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. Genome Res. 2008;18(9):1509–17.
61. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. Genome Biol. 2010;11:3.
62. Searle SR, Speed FM, Milliken GA. Population marginal means in the linear-model - an alternative to least-squares means. Am Stat. 1980;34(4):216–21.
63. MHaDA W. Nonparametric statistical methods. New York: John Wiley & Sons; 1999.
64. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. J Roy Stat Soc B Met. 1995;57(1):289–300.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions