Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Doktorský studijní program:
Biochemie a patobiochemie

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MDDr. Iva Michalus

Vývoj a implementace nových přístupů umožňujících proteomickou charakterizaci kostních tkání ve stomatochirurgii

Development and implementation of new approaches enabling proteomic characterization of bone tissues in oral surgery

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. Dr. Ing. Radovan Hynek

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31.10.2023

Iva Michalus

Identifikační záznam:

MICHALUS, Iva. *Vývoj a implementace nových přístupů umožňujících proteomickou charakterizaci kostních tkání ve stomatochirurgii. [Development and implementation of new approaches enabling proteomic characterization of bone tissues in oral surgery].* Praha, 2023. 110 stran, 5 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie. Vedoucí závěrečné práce: prof. Dr. Ing. Radovan Hynek

Identification record:

MICHALUS, Iva. *Development and implementation of new approaches enabling proteomic characterization of bone tissues in oral surgery.* Praha, 2023. 110 pages, 5 appendices. Ph.D. thesis. Charles University, First Faculty of Medicine, University of Chemistry and Technology, Prague, Department of Biochemistry and Microbiology. Supervisor: prof. Dr. Ing. Radovan Hynek

Motto:

V jednoduchosti je síla i krása!

Proto pamatuj na zásadu

KISS: Keep it simple and straightforward!

Poděkování

Poděkování patří především mému skvělému školiteli prof. Dr. Ing. Radovanu Hynkovi za jeho neutuchající „keep it simple proteomicko – medicínský drive“, který nás rozhodně nikdy nenechal zahálet a nikdy nedovolil přidat k metodě ani jeden „zbytečný“ krok navíc. Za jeho nekončící podporu a empatii v časech mé pracovní zaneprázdněnosti, v dobách covidových, stěhovacích či státnicových. Bez jeho nehynoucího (a neuvěřitelně nakažlivého) entuziasmu, který dokáže hory (a doktorandy) přenášet a jeho neustálé důvěry a naprostého nadšení pro náš výzkum, by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, Ph.D. za provedení precizních analýz pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie, RNDr. Mgr. Pavlu Cejnarovi, Ph.D. za složité matematické analýzy získaných dat, RNDr. Václavu Kašičkovi, CSc. a RNDr. Petře Sázelové, CSc. za provedení analýz pomocí kapilární elektroforézy, doc. Viktorové a Dr. Tran Van Nguyenovi za přípravu modelových kostních kultur *in vitro*.

V neposlední řadě děkuji mé drahé sestřičce Žanetě Krausové, která byla vždy mou pravou rukou v ordinaci, mému partnerovi, rodině a přátelům, kteří bez výraznějších komentářů, i nadále podporují mé sobecké tendence k potenciálním dalším studijním aktivitám a tiše tolerují kolísající nálady vědecko-medicínského pracovníka.

Souhrn

Proteomika je bouřlivě se rozvíjející obor, který nachází uplatnění v mnoha oblastech medicíny, včetně stomatologie. Přesto proteomická charakterizace kostních tkání ve stomatochirurgii není stále běžně využívána. Hlavní příčinou je značná komplikovanost používaných analytických přístupů, která vyplývá z nerozpustného charakteru kostních tkání. Cílem této práce bylo vyvinout a aplikovat přímočarou metodiku, která by mohla vést k rutinnímu využití proteomiky i v této oblasti.

Nejprve byla s využitím prasečích čelistních kostí jako modelových vzorků vyvinuta technika umožňující identifikovat až stovky proteinů díky jejich štěpení trypsinem přímo v kostních tkáních („in-bone digestion“) následovaného analýzou pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS). Tato technika byla následně aplikována na analýzu odoperovaných tkání lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání. Jak ve vzorcích maxilárních, tak mandibulárních kostí, bylo možné technikou přímého štěpení identifikovat značné množství proteinů. Navíc matematická analýza získaných dat umožnila též rozlišit mezi tkáněmi postiženými zánětem a zdravými tkáněmi. Přístup založený na přímém štěpení byl následně úspěšně rozšířen též na analýzu *in vitro* modelů lidských kostních tkání. Přímé štěpení následované analýzou uvolněných peptidových fragmentů pomocí LC-MS/MS a následná matematická analýza získaných dat umožnila nejen rozlišit vzorky modelů s indukovanými patologickými stavy od kontrolních, ale bylo možné i vzájemné rozlišení dvou různých patologických stavů. V rámci řešení disertační práce byla také otestována možnost využít po technice založené na přímém štěpení v kostních tkáních („in-bone digestion“) i jinou koncovku než LC-MS/MS, konkrétně kapilární elektroforézu s detekcí v ultrafialové oblasti (CE-UV). Po vyhodnocení získaných CE-UV profilů matematickou analýzou bylo možné odlišit vzorky kostní tkáně postižené zánětem od tkáně zdravé.

Využití výše zmíněných netradičních a velmi přímočarých metodických přístupů umožňuje vnést do oblasti stomatochirurgie rutinní vhled na molekulární úrovni. Tak by například mělo být možné sledovat, jaké jsou proteomické reflexe určitých patologických stavů, což by mělo napomoci porozumět mechanismu jejich vzniku i volbě vhodné léčby. Proteomické analýzy odoperovaných čelistních kostí by rovněž mohly sloužit jako vhodný doplněk, případně i alternativa k jejich tradičnímu histologickému hodnocení.

Klíčová slova: stomatochirurgie, maxilární kosti, mandibulární kosti, proteomická analýza, přímé specifické štěpení proteinů, tandemová hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií

Summary

Proteomics is a booming field with application in many areas of medicine, including dentistry. Nevertheless, proteomic characterization of bone tissues in oral surgery is not still commonly used. The main reason is involvement of demanding analytical approaches due to insoluble chatacter of bone tissues. The goal of this work was to develop and apply straightforward methodology that could lead to the routine use of proteomics in this area as well.

Using porcine jawbones as a model samples, a technique was developed allowing identifying about hundreds of proteins thanks to their trypsin digestion directly in bone tissues ("in-bone digestion") followed by analysis using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This technique was subsequently applied to the analysis of human maxillary and mandibular bone tissues obtained during surgical procedures. In both maxillary and mandibular bone samples, it was possible to identify a considerable amount of proteins using the “in-bone digestion” technique. Additionaly, the mathematical analysis of the obtained data was able to distinguish between the inflammatory and healthy tissues. The approach based on direct cleavage was subsequently successfully extended to the analysis of *in vitro* models of human bone tissues. Direct cleavage followed by analysis of the released peptide fragments using LC-MS/MS and subsequent mathematical analysis of the obtained data was able not only to distinguish the samples of models with induced pathological conditions from the control ones, but also allowed distinguishing between two different pathological conditions. The possibility of using a technique of "in-bone digestion" followed by different analysis than LC-MS/MS was verified. Namely capillary electrophoresis with ultraviolet detection (CE-UV) was tested. After evaluating of the obtained CE-UV profiles by mathematical analysis, it was possible to distinguish between inflammatory and healthy bone tissue samples.

The use of the above-mentioned non-traditional and very straightforward methodological approaches makes it possible to introduce routine insight at the molecular level into the field of oral surgery. For example, it should be possible to monitor the proteomic reflections of certain pathological conditions, which should help to understand the mechanism of their occurrence and the choice of appropriate treatment. Proteomic analyzes of jaw bones after surgical procedures could also serve as a suitable supplement, or even an alternative, to their traditional histological evaluation.

Key words: oral surgery, maxillary bones, mandibular bones, proteomic analysis, direct specific cleavage of proteins, tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography

Obsah

Poděkování 1

Souhrn 2

Summary 4

Zaměření a forma disertační práce 9

1. Literární úvod a přehled problematiky 10

1.1 Pokroky ve stomatochirurgii: Současné léčebné modality 10

1.2 Nahlédnutí do proteomiky 13

1.2.1 Co je proteomika a k čemu slouží 13

1.2.2 Hlavní techniky využívané v současné proteomice 14

1.2.3 Příklady využití proteomiky ve stomatologii 17

1.2.3.1 Proteomické analýzy tekutých vzorků 17

1.2.3.2 Proteomické analýzy měkkých tkání 18

1.2.3.3 Proteomické analýzy tvrdých tkání 18

1.2.4 Cesta k rutinní analýze proteinů obsažených v nerozpustných materiálech 20

1.2.5 Biologický a klinický význam vybraných kostních proteinů zejména z pohledu stomatochirurgie 22

2. Cíle dizertační práce 26

3. Formulace hypotéz 27

4. Použité metody a role autorky 28

5. Výsledky 29

5.1 Ověření specifického štěpení proteinů přímo kostní tkáni 29

5.2 Charakterizace odoperovaných lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání ve stomatochirurgii pomocí techniky přímého štěpení (“in-bone” digestion) následovaného tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií 32

5.3 Rychlé rozlišení a charakterizace indukovaných patologických stavů v modelech lidských kostních tkání metodou založenou na přímém specifickém enzymovém štěpení (in-sample digestion) s aplikací ve stomatochirurgii 35

5.4 Přímé štěpení vzorků kostních tkání (in-bone digestion) s koncovkou kapilární elektroforézy s UV detektorem 39

6. Diskuse metodických postupů a výsledků 44

6.1 Vývoj techniky s využitím modelových vzorků prasečích čelistních kostních tkání 44

6.2 Využití techniky přímého štěpení v kostních tkáních (in-bone digestion) pro charakterizaci vzorků lidských maxilárních a mandibulárních kostí 45

6.3 Charakterizace indukovaných patologických stavů v in-vitro modelech lidských kostních tkání 47

6.4 Přímé štěpení vzorků kostních tkání (in-bone digestion) s koncovkou kapilární elektroforézy s UV detektorem 49

7. Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce 50

8. Seznam použité literatury 52

9. Seznam publikací 63

9.1 Publikace, které jsou podkladem disertační práce 63

9.2 Publikace bez vztahu k tématu disertační práce 64

10. Seznam obrázků a tabulek 65

11. Přílohy – publikace, které jsou podkladem disertační práce a ocenění 66

11.1 Příloha 1 67

11.2 Příloha 2 75

11.3 Příloha 3 86

11.4 Příloha 4 95

11.5 Příloha 5 – ocenění publikace uvedené v příloze 2 106

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
BMP	kostní morfogenetický protein
CBCT	cone beam computed tomography
CE-UV	kapilární elektroforéza s detekcí v ultrafialové oblasti
C18	oktadecylový řetězec využívaný pro modifikaci silikagelu v chromatografii na reverzní fázi
DHB	kyselina dihydroxybenzoová
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GFC	gingivální crevikulární tekutina
LC-MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií
MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace; čas letu („matrix assisted laser desorption/ionization, time-of-flight“)
PCA	matematická analýza hlavních komponent (principal component analysis)
PMF	peptidové mapování s využitím hmotnostní spektrometrie („peptide mass fingerprinting“)
PMM	peptidové mapování s využitím hmotnostní spektrometrie („peptide mass mapping“)
PLS-DA	matematická analýza – partial least square discrimination analysis
PRF	platelet rich fibrin
PRP	platelet rich plasma

RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (reversed phase – high performance liquid chromatography)
SDS-PAGE	elektroforéza s dodecyl síranem sodným v polyakrylamidovém gelu
ÚOCHB AV ČR	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky
ZipTip	jednoduchá chromatografická technika prováděná ve špičce pipety s reverzní fází

Zaměření a forma disertační práce

Disertační práce má interdisciplinární charakter a je metodicky zaměřená. Zabývá se totiž procesem, který začíná chirurgickým zákrokem a pokračuje proteomickou charakterizací odoperovaných kostních tkání.

Práce je předkládána ve stručné kombinované formě založené na čtyřech původních vědeckých publikacích v impaktovaných časopisech, které jsou její součástí.

1.Literární úvod a přehled problematiky

1.1 Pokroky ve stomatochirurgii: Současné léčebné modality

Stomatochirurgie je součástí specializovaného oboru ústní, čelistní a obličejové chirurgie zahrnující širokou škálu diagnostických a terapeutických intervencí u stavů postihujících dutinu ústní, čelisti, hlavu a krk. Pojímá nejen rekonstrukční chirurgii obličeje po úrazech nebo po onkologických resekčních výkonech, ale také estetickou chirurgii. Stomatochirurgie je stejně jako všechny medicínské obory dynamický obor, který se neustále vyvíjí, aby splnil požadavky moderní zdravotní péče. Nedávné pokroky v diagnostických nástrojích, minimálně invazivních postupech, implantologii, parodontologii, léčbě poruch temporomandibulárního kloubu a onkologických intervencích, rozšířily možnosti dostupné léčby. Integrace technologií a mezioborové spolupráce je předpokladem pro další zkvalitňování péče o pacienty.

Stomatochirurgické zákroky mohou být vykonávány jak v lokální, tak celkové anestezii. Mezi nejběžnější ambulantní výkony patří extrakce zubů, především pak zubů moudrosti, resekce kořenových hrotů, implantace, augmentace čelistních kostí, excize lézí měkkých tkání obličeje a dutiny ústní a exstirpace lézí čelistí. Ve většině případů se jedná o cysty (odontogenního i neodontogenního původu) nebo tumory, které mohou být benigní či maligní. Stejně jako v dalších chirurgických oborech odesílá stomatochirurg odebraný materiál k histologickému vyšetření.

Kost je především kalciem mineralizovaná pojivová tkáň, proto je její zpracování a histologické vyšetření náročnější. Konvenční histologické vyšetření kostí vyžaduje důkladnou dekalcifikaci kosti (Mawhinney et al., 1984). Vzorek kostní tkáně je pacientovi odebrán během chirurgického zákroku nebo biopsie. Dále se vzorek musí dobře fixovat, obvykle formalínem. Fixace zachovává tkáň a zabraňuje rozkladu vzorku při následné dekalcifikaci kyselinami nebo chemickými činidly. Kost je tvrdá tkáň, proto existuje limitované množství metod, jak z ní vyrobit kvalitní řezy. Jedna z variant je výbrus kostní tkáně do tenkých destiček. Ty se brousí pomocí abrazivních povrchů, aby se vytvořily tenké broušené profily. Dále můžeme připravit vzorky kostí prosycením akrylovými nebo epoxidovými pryskyřicemi a vytvořit řezy pomocí mikrotomu (Bancroft & Stevens, 1996). Další možností zpracování mineralizované spongiózní

kosti jsou zmrazené řezy (Bancroft & Stevens, 1996; Carson & Hladik, 2009; Woods & Ellis, 1994).

Tyto metody jsou velmi užitečné pro studium anorganických složek kostí nebo zubů, ale odvápnění, tedy odstranění anorganického vápníku z organické kolagenové struktury, je předpokladem pro studium organických složek (Junqueira et al., 1997).

Častěji tedy dochází k časově náročnějšímu procesu odvápnění kostní tkáně s následným jejich zpracováním standardní metodou pro výrobu parafínových řezů. Dekalcifikace je standardně užívaná technika ve většině histopatologických laboratořích pro mikroskopické hodnocení mineralizovaných tkání. Urychlení odvápnění lze provádět různými metodami, jako je použití tepla, vakua, elektrického proudu, míchání i koncentrací chemických prostředků (Khangura et al., 2021). Chemická činidla jsou nejčastěji používaná pro rutinní analýzu. Lze použít tři typy chemických činidel, jsou to nejrychleji působící silné anorganické kyseliny, například kyselina dusičná a kyselina chlorovodíková (v koncentraci do 10%); nejčastěji užívané zejména pro svoji šetrnost ke studovaným tkáním jsou pak slabé organické kyseliny, například kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina pikrová a chelatační činidla, například EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), ta ale působí velmi pomalu (až několik týdnů) (Gupta et al., 2014). Použití těchto chemikálií ale může vést k určitým změnám v architektuře tkáně, včetně změn charakteristik barvení (Verdenius & Alma, 1958).

Vědci provedli mnoho studií za účelem stanovení ideálního chemického činidla tak, aby co nejúčinněji a nejrychleji došlo k úplnému odstranění vápníku bez poškození tkáňové architektury a poskytnutí adekvátní barevné charakteristiky (Choube et al., 2018; Khangura et al., 2021; Prasad & Donoghue, 2013; Sanjai et al., 2012; Srinivasyaiah et al., 2016). Dle studie vyžaduje dekalcifikace zubů nejrychlejší metodou za užití 10% kyseliny dusičné 3-5 dní. Nejdelší dekalcifikace byla za užití EDTA, kde činidlo potřebuje dokonce až 28-30 dní (Gupta et al., 2014).

Dále jsou vzorky dehydratovány pomocí řady alkoholových roztoků a jsou zality do bloku parafínového vosku, který je ideální pro následné řezání (Sadeghipour & Babaheidarian, 2019). Tyto bloky se poté nařežou na tenké parafínové řezy (obvykle 4-5 mikrometrů silné) pomocí mikrotomu. Dále se přemisťují na sklíčka a dochází k barvení hematoxylinem a eosinem, aby se zvýraznily specifické buněčné a strukturální složky (Chan, 2014). Massonův trichróm lze použít ke zvýraznění kolagenových struktur (Foot, 1933). Řezy jsou dále analyzovány mikroskopickým vyšetřením.

Společně s dalšími medicínskými obory dosáhla i stomatochirurgie v posledních letech pozoruhodných pokroků díky moderním technologiím, chirurgickým technikám a mezioborové spolupráci. Mezi základní pilíře moderní stomatochirurgie dnes již neodmyslitelně patří minimálně invazivní techniky redukující pacientovu morbiditu, operační čas, zlepšující estetické výsledky a urychlující pacientovu rekonvalescenci.

Mezi tyto techniky zařazujeme užití piezzosurgery (vysokofrekvenční ultrazvukové kostní vrtačky), která odstraňuje kost při zachování okolních měkkých a tvrdých tkání, nebo laseru, který se ve stomatologické oblasti nevyužívá pouze k chirurgii, ale také v konzervačním a estetickém zubním lékařství, parodontologii a endodoncii (Nogueira et al., 2023). Napomáhá také při hojení aftů, oparů a při hojení ran s minimálními otoky a jizvením. Ve většině případů jeho užití vede k relativně bezkrevnému chirurgickému a pooperačnímu průběhu, menším nebo žádným pooperačním bolestem a redukci otoku. Výrazně snižuje riziko poškození okolních tkání nebo zubů (Bilder et al., 2023; Pick & Colvard, 1993). Obě techniky snižují pooperační komplikace, otok a bolest (Kirpalani & Dym, 2020).

Revoluci v diagnostice a minimálně invazivního plánování způsobilo užívání precizní radiologické metody trojrozměrného zobrazování pomocí CBCT (cone beam computed tomography) (Kaasalainen et al., 2021). Díky plánování založeném na vysoce kvalitních snímcích získaných z CBCT za užití specifických plánovacích programů a operačních chirurgických šablon roste popularita metody počítačově navigované chirurgie a implantologie. To nám umožňuje přesnější a detailnější analýzu stávající situace, přesnou lokalizaci anatomických struktur a možnost chirurgického ošetření s ohledem na optimální protetický i estetický výsledek za celkového snížení doby operačního výkonu (Jacobs et al., 2018).

Nejen ve stomatochirurgii, ale také v ortopedii, plastické chirurgii, dermatologii, stejně tak jako při hojení diabetických ran, prokázala svá pozitiva vznikající oblast regenerativní medicíny zahrnující technologii kmenových buněk, tkáňového inženýrství a užití plazmy nebo fibrinu bohatého na krevní destičky (platelet rich plasma – PRP, platelet rich fibrin – PRF). PRP nebo PRF působí jako biomateriál, který dodává růstové faktory a cytokiny z granulí krevních destiček do cílové oblasti, čímž podporuje regeneraci v různých tvrdých i měkkých tkáních (šlachy, chrupavky, kosti, játra, zubní pulpa) a urychluje také proces hojení (J. Xu et al., 2020). PRP byla dostupná pouze v nemocničním prostředí, ale technologie (centrifuga) nyní umožňuje i orálním chirurgům provádět tento postup přímo v ordinaci během ambulantních zákroků. Zatímco dříve bylo nutné velké množství krve, nyní mohou lékaři extrahovat PRP či PRF již z 10-100 ccm pacientovy odebrané krve. Díky jejich osteoindukčním vlastnostem hrají PRP/PRF

důležitou roli v moderních implantologických, augmentačních postupech a při metodách řízené tkáňové regenerace (Fan et al., 2020). Růstové faktory v PRF také napomáhají snížit pooperační komplikace, jako je bolest, trismus, edém, přítomnost hematomů po extrakci zubů moudrosti v dolní čelisti (Starzyńska et al., 2021).

A v neposlední řadě také kmenové buňky. Jejichž rychlý pokrok v souvislosti s regenerací dřeňové pulpy a periodoncia prostřednictvím tkáňového inženýrství, které kombinuje kmenové buňky, biomateriály a růstové faktory, způsobily převratnou revoluci a nový pohled v regenerativní endodoncii a také regenerativní parodontologii (Tomokiyo et al., 2019; Xie et al., 2021).

Užití kostního morfogenetického proteinu (BMP) ve stomatochirurgii se jeví jako potenciální léčebná možnost kostních defektů. Hlavním předmětem studií zůstává jejich potenciál dosáhnout naprosté regenerace kosti bez nutnosti užití autologních nebo alogenních kostních štěpů (Sasikumar et al., 2012). Díky svým osteoindukčním vlastnostem jsou BMP schopny stimulovat diferenciaci pluripotentních mezenchymálních buněk na osteoprogenitorové buňky (osteoblasty, chondroblasty) a navozují regeneraci a remodelaci kostních lézí (King & Cochran, 2002). Jsou hojně využívány v implantologii, kde zvyšují kostní reakci okolo cizorodých materiálů (Díaz-Sánchez et al., 2015).

1.2 Nahlédnutí do proteomiky

1.2.1 Co je proteomika a k čemu slouží

Za jednoho z významných zakladatelů proteomiky může být pokládán Marc R. Wilkins, který použil termín proteom ještě jako doktorand na Maquarie University v australském Sydney (Wasinger et al., 1995). Jedná se o sousloví skládající se ze slov protein a genom. V roce 1995 pak byla založena první specializovaná proteomická laboratoř (Swinbanks, 1995). Pojem proteomika pak pravděpodobně jako první použil v roce 1997 Peter James jako analogii k tehdy již používanému termínu genomika (James, 1997). Na tomto místě je užitečné zmínit, že ačkoliv je proteom podmíněn genomem, je na rozdíl od statického genomu velmi variabilní. Genom je totiž stejný v buňkách různých tkání daného jedince, zatímco proteom je v různých

tkáních odlišný (Wilkins, 2009). Nadto lze očekávat, že se bude významně lišit v závislosti na tom, zda je tkáň ve fyziologickém nebo patologickém stavu anebo reaguje na stres.

Pokud se pokusíme proteomiku vymezit, tak můžeme říci, že se jedná o obor, který se zabývá studiem proteinů ve velkém měřítku (Anderson & Anderson, 1998; Blackstock & Weir, 1999). Naopak proteomikou nelze nazvat například detailní studium jediného proteinu. Proteomika je využívána zejména k identifikaci a relativní kvantifikaci proteinů, ale nalézá uplatnění též při studiu posttranslačních modifikací (například glykosylace, fosforylace etc.), výzkumu vzájemných interakcí proteinů nebo jejich interakcí s biologickými membránami či charakterizaci proteinových komplexů.

1.2.2 Hlavní techniky využívané v současné proteomice

Současná proteomika využívá celou řadu nejrůznějších analytických technik, nicméně za její hlavní pilíře lze považovat specifické enzymové štěpení studovaných proteinů a hmotnostní spektrometrii, ať už na principu MALDI-TOF nebo LC-MS/MS.

Specifické enzymové štěpení je založeno na skutečnosti, že některé proteolytické enzymy štěpí polypeptidové řetězce studovaných proteinů s vysokou specifitou za určitými aminokyselinovými zbytky. Daný protein je tak rozštěpen na specifické peptidové fragmenty. Počet, relativní molekulová hmotnost i aminokyselinová sekvence vzniklých peptidů je pro daný protein charakteristická. Ačkoliv je ke štěpení proteinů možné využít různé proteolytické enzymy je za enzym první volby v proteomice považován trypsin, který polypeptidový řetězec proteinu štěpí za zbytky argininu a lysinu (pokud nenásleduje prolin). Trypsin je oblíben pro vysokou specificitu, odolnost a též proto, že fragmenty s argininem a lysinem na C-konci představují výhodu při analýzách pomocí hmotnostní spektrometrie (Dongré et al., 1996; Huang et al., 2005). Vzniklé směsi charakteristických peptidových fragmentů jsou obvykle před další analýzou, zejména jedná-li se o hmotnostní spektrometrii, purifikovány pomocí takzvaných „pipetovacích špiček“ označovaných jako ZipTip. Jedná se v podstatě o chromatografii na reverzní fázi ve velmi zjednodušeném provedení, kde ve špičce pipety je obsažena stacionární fáze obvykle se silikagelem modifikovaným oktadecylovým uhlíkovým řetězcem (C18) (Molnár & Horváth, 1976; Žuvela et al., 2019). Peptidové fragmenty jsou navázány v polárním (vodném) prostředí, promyty a pak eluovány roztokem acetonitrilu (více o chromatografii na reverzní fázi viz níže). Analýza směsí specifických peptidových fragmentů

může být prováděna s využitím různých analytických technik. V současné proteomice jsou k jejich analýzám patrně nejčastěji využívány hmotnostně spektrometrické techniky.

Nejvíce využívaná pro analýzu ať už intaktních proteinů nebo peptidových fragmentů vzniklých specifickým enzymovým štěpením je hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF a LC-MS/MS. Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF (matricí podporovaná laserová desorpce/ionizace; čas letu), (matrix assisted laser desorption/ionization; time-of-flight) využívá skutečnosti, že biopolymery, mezi něž patří též proteiny a peptidy, po smíšení s matricí, vysušení a ozáření vhodnou intenzitou laseru ve vakuu, jsou schopny vytvořit ionty, aniž by docházelo k jejich fragmentaci (Hillenkamp et al., 1991). Jako zmíněné matrice jsou využívány obvykle jednoduché organické molekuly, například DHB (kyselina dihydroxybenzoová). Ionty vzniklé po ozáření směsi matrice a analyzovaného vzorku laserem jsou pak urychleny ve stejnosměrném elektrickém poli, takže všem, které mají stejný náboj, je bez ohledu na hmotnost udělena stejná kinetická energie. Při stejné kinetické energii pak rychlost jejich letu proti detektoru závisí na jejich hmotnosti. Čím menší mají hmotnost, tím rychleji letí k detektoru a dopadnou na něj dříve. Naopak ionty s větší hmotností doletí k detektoru za delší dobu. Čas letu k detektoru (time-of-flight) lze změřit s vysokou přesností. Ze změřených časů letu jsou pak vypočteny molekulové hmotnosti například analyzovaných peptidových fragmentů, a tak vzniká hmotnostní spektrum charakteristické pro daný protein, který byl specificky rozštěpen. Díky skutečnosti, že například trypsin štěpí polypeptidový řetězec vždy za argininem a lysinem (pokud nenásleduje v sekvenci prolin), je tak daný protein rozštěpen na specifickou směs peptidových fragmentů, která po analýze pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF poskytne pro daný protein charakteristické spektrum. Protože dané hmotnostní spektrum je pro daný protein typické podobně jako pro daného jedince otisk prstu, hovoří se někdy o PMF (peptide mass fingerprinting). Někdy je používáno též označení PMM (peptide mass mapping). Do češtiny se oba výrazy obvykle překládají zkráceně jako peptidové mapování. Porovnáním získaných hmotností specifických peptidových fragmentů s databází odvozenou ze sekvence DNA daného organismu pak může být protein identifikován. Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF nemusí samozřejmě sloužit jen k identifikaci proteinů, ale může být využita ke studiu v podstatě jakýchkoliv změn, které se projeví změnou molekulové hmotnosti.

Další hmotnostně spektrometrickou technikou velmi oblíbenou v proteomice je LC-MS/MS. Základem této techniky je tandemový hmotnostní spektrometr (IUPAC-Compendium of Chemical Terminology, 1997) s předřazenou kapalinovou chromatografií (IUPAC, 1997).

Kapalinová chromatografie je schopná separovat i velmi komplexní směsi peptidů, takže peptidové fragmenty se dostávají do hmotnostního spektrometru postupně. Obvykle se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC). Principem této chromatografie jsou hydrofobní interakce separovaných molekul s fází stacionární, která je obvykle tvořena silikagelem modifikovaným oktadecylovými zbytky (C18) (Molnár & Horváth, 1976; Žuvela et al., 2019). Hydrofobní interakce oktadecylových řetězců s hydrofobními postranními řetězci aminokyselinových zbytků peptidových fragmentů jsou nejsilnější v polárním (vodném) prostředí, ale se snižující se polaritou mobilní fáze slábnou. K eluci obvykle používá gradient acetonitrilu (ACN), jehož rostoucí koncentrace v čase snižuje polaritu mobilní fáze a způsobuje postupné uvolňování peptidů z chromatografické kolony, na kterou navazuje hmotnostní spektrometr. Tandemový hmotnostní spektrometr poté kromě hmotnosti jednotlivých peptidových fragmentů dovoluje získat též informace o sekvenci jejich aminokyselinových zbytků. Porovnání získaných dat s databázemi odvozenými od sekvence DNA daného organismu pak umožňuje identifikovat značné množství proteinů obsažených i ve velmi komplexních směsích.

Přestože využití hmotnostní spektrometrie je v moderní proteomice velmi rozšířené, není hmotnostně spektrometrická koncovka jedinou využívanou možností. Zejména tandemovou hmotnostní spektrometrii s předřazenou kapalinovou chromatografií stále není možné považovat za běžně dostupnou techniku. Alternativou k hmotnostně spektrometrické koncovce může představovat například kapilární elektroforéza vybavená UV detektorem (CE-UV). K separaci, například peptidových fragmentů, při ní dochází na základě jejich rozdílných nábojových vlastností. Separované peptidové fragmenty jsou pak při průtoku přes UV detektor detekovány díky absorbanci peptidové vazby v ultrafialové oblasti. Výhodou CE-UV jsou nižší pořizovací náklady i konstrukční jednoduchost. Kromě toho má CE vyšší potenciál rozlišovat mezi vzorky obsahujícími složky, které se mohou vyskytovat ve formách, které se liší stavem náboje (např. fosforylované a nefosforylované formy), ve srovnání s technikami MS, kde je analýza fosforylovaných forem komplikovaná kvůli problémům s jejich ionizací, které je třeba řešit, např. obohacením in situ (Hynek et al., 1997; Krásný et al., 2015). Kapilární elektroforéza představuje separační techniku se širokou použitelností pro analýzu proteinů i peptidů, včetně jejich komplexních směsí (Dawod et al., 2017; Kašička, 2018, 2020; Latosinska et al., 2019; Shen et al., 2019; Štěpánová & Kašička, 2016, 2019; Z. Zhang et al., 2017). Určitou nevýhodou je na druhé straně ovšem skutečnost, že pokud je spojena CE pouze s UV detektorem a není vybavena hmotnostně spektrometrickou detekcí, lze pak porovnávat pouze profily získaných elektroferogramů bez možnosti identifikace jednotlivých proteinů.

1.2.3 Příklady využití proteomiky ve stomatologii

Tak jako v jiných oblastech medicíny, nacházejí proteomické analýzy uplatnění též ve stomatologii. Současné možnosti jejich rutinního využití však závisí na charakteru analyzovaných vzorků. Relativně nejméně technicky komplikované jsou analýzy kapalných vzorků. Není proto překvapivé, že již nalezneme řadu příkladů analýz ústních tekutin. Náročnější už jsou proteomické analýzy měkkých tkání a nejobtížnější jsou proteomické analýzy tvrdých tkání.

1.2.3.1 Proteomické analýzy tekutých vzorků

Díky neinvazivní technice odběru i relativně snadné analýze byla publikována již řada studií charakterizujících proteom ústních tekutin.

Byla publikována proteomická analýza slin, jejichž složení může odrážet různé patologické stavy a je možné je studovat běžně dostupnými laboratorními technikami (Bassim et al., 2012; Campisi et al., 2006; Levine, 2011; Rezaei Chianeh & Prabhu, 2014; L. Zhang et al., 2010).

Analyzována byla též gingivální crevikulární tekutina (GFC), jejíž složení je odrazem stavu parodontu, a proto by její proteomické analýzy mohly mimo jiné napomoci při identifikaci markerů periodontologických onemocnění (Baliban et al., 2012; Ngo et al., 2013; Tsuchida et al., 2012, 2014). Publikována byla i kvantitativní proteomická analýza zaměřené na složení gingivální crevikulární tekutiny (GFC) při různých stavech paradontu (Silva-Boghossian et al., 2013). I další publikovaná studie nasvědčuje tomu, že výskyt proteinových markerů v GFC závisí na progresi onemocnění parodontu (Kinney et al., 2014). Byla publikována i studie naznačující souvislost mezi výskytem proteinů bohatých na prolin ve slinách a náchylnosti k zubnímu kazu (Levine, 2011). I řada dalších studií využívajících běžně používané techniky včetně hmotnostní spektrometrie ukazují, že proteomické analýzy GFC lze již téměř považovat za rutinní (Carneiro et al., 2012, 2014; Rody et al., 2014).

1.2.3.2 Proteomické analýzy měkkých tkání

Publikovány byly též studie charakterizující měkké tkáně, konkrétně zubní dřeň nebo periodontální ligamenta.

S využitím dvoudimenzionální gelové elektroforézy byly analyzovány zdravé tkáně zubní dřeně i tkáně postižené kazem (Pääkkönen et al., 2005). Mezi zmíněnými tkáněmi však byly zjištěny jen relativně malé rozdíly. Podstatnější rozdíly v proteomických profilech zdravých a zubním kazem postižených tkání zubní dřeně byly publikovány v jiné studii (McLachlan et al., 2005). V další studii zubní dřeně využívající dvoudimenzionální gelovou elektroforézu následovanou hmotnostní spektrometrií byly identifikovány proteiny jako anexin, kolagen typu VI nebo matrilin-2 (Wei et al., 2008). Později byla provedena detailnější proteomická studie pokoušející se identifikovat též „chybějící" proteiny zubní dřeně do té doby zjištěné pouze pomocí transkriptomických analýz (Eckhard et al., 2015).

Předmětem několika proteomických studií se již stala i periodontální ligamenta. Ta představují vláknitou tkáň, v níž se mimo jiné hojně vyskytuje i kolagen typu I. Buňky periodontálního ligamenta hrají roli při reakci na onemocnění, mechanická traumata i během regenerace, což je zajímavé mimo jiné z hlediska prováděných stomatochirurgických zákroků. Jedna z prvních publikovaných proteomických studií periodontálních ligament byla zaměřena na proteom fibroblastů ve snaze po hlubším porozumění regulačním procesům (Reichenberg et al., 2005). Další studie byla zaměřena na proteiny související s osteogenní diferenciací buněk lidských periodontálních ligament (Wu et al., 2009a). Podařilo se identifikovat celkem 29 rozdílně exprimovaných proteinů v diferencujících se buňkách (Wu et al., 2009b).

1.2.3.3 Proteomické analýzy tvrdých tkání

Analyticky mnohem náročnější než charakterizace tekutých vzorků nebo vzorků měkkých tkání jsou proteomické analýzy tvrdých tkání, jako jsou alveolární kosti nebo tvrdé tkáně zubů. Hlavním příčinou je skutečnost, že proteiny, které je třeba analyzovat, jsou obsaženy v nerozpustné matrici. Část z nich může být extrahována do roztoku a následně již poměrně snadno analyzována běžnými postupy používanými v současné proteomice, jako je specifické štěpení trypsinem následované analýzou peptidových fragmentů pomocí LC-MS/MS (Salmon et al., 2013). V uvedené studii byly proteiny extrahovány jak z alveolárních kostí, tak ze vzorků zubního cementu. Tímto způsobem bylo identifikováno ve vzorcích alveolárních kostí a

vzorcích zubního cementu celkem 318 proteinů, z toho 105 proteinů bylo přítomno výlučně v alveolárních kostech a 83 výlučně ve vzorcích zubního cementu (Salmon et al., 2013). Jedná se sice o relativně jednoduchý postup, nicméně jeho nevýhodou je skutečnost, že významná část proteinů zůstane pevně „uvězněna“ ve struktuře nerozpustné matrice. Proto tyto proteiny nemohou být extrahovány do roztoku, a tudíž zůstanou bez možnosti poskytnout proteomická data.

Řešením může být již delší dobu známá demineralizace tvrdých zubních tkání využitelná také pro dentoalveolární tkáně (Hubbard & Kon, 2002; Salmon et al., 2017; Termine et al., 1980a, 1980b). Nevýhodou tohoto přístupu je časová náročnost a skutečnost, že obsahuje příliš mnoho kroků. Dalším problémem je špatná rozpustnost mnoha matricových proteinů obsažených v tvrdých tkáních; což při využití výše uvedených přístupů představuje další překážku (Termine et al., 1980a, 1980b). Již zmíněná relativně nedávno publikovaná studie dentoalveolárních tkání u myší vedla k úspěšné identifikaci řady proteinů, včetně těch, které jsou charakteristické pro extracelulární matrix, jak v zubním cementu, tak i dentinu a alveolárních kostech. S využitím specifického štěpení trypsinem a analýze uvolněných specifických peptidových fragmentů pomocí LC-MS/MS bylo identifikováno 193 proteinů v zubním cementu, 135 v dentinu a 147 v alveolárních kostech. Použitý postup ovšem zahrnoval demineralizaci vzorků uvedených tkání v roztoku obsahujícím EDTA, která trvala 20 dní (Salmon et al., 2017). Celý proces je tak extrémně zdlouhavý, a tudíž nevhodný pro rychlou a efektivní proteomickou charakterizaci odoperovaných tkání. Nedávno byla publikována proteomická studie, která vedla mimo jiné též k identifikaci proteinů v lidských alveolárních kostech s využitím specifického štěpení trypsinem následovaného LC-MS/MS (Fretwurst et al., 2022). I v této studii však štěpení trypsinem předcházelo komplikované a časově náročné zpracování tvrdých tkání. Publikace uvádí, že 40 mg tkáně, což je poměrně značné množství, bylo nejprve rozemleto na prášek, ten byl následně podroben zdlouhavému extrakčnímu procesu, kde teprve čtvrtý den bylo možné s proteiny dále pracovat. Využití EDTA může naznačovat, že proces kromě extrakce využívá též dekalcifikaci tkáně, která by mohla napomoci uvolnění proteinů (Fretwurst et al., 2022). Ani tento postup se pro svou náročnost, jak časovou, tak na množství analyzované tkáně, příliš nehodí pro rutinní proteomickou charakterizaci kostních vzorků.

Lze konstatovat, že kvůli značné komplikovanosti i časové náročnosti se výše zmíněné postupy nejeví vhodné pro implementaci do běžné stomatochirurgické praxe. Proto hlavním cílem předkládané disertační práce bylo navržení a ověření podstatně přímočařejší techniky, která by s využitím minimálního množství kroků vedla k rychlé proteomické charakterizaci tkání

lidských maxilárních i mandibulárních kostních tkání odoperovaných při stomatochirurgických zákrocích (viz cíle práce).

1.2.4 Cesta k rutinní analýze proteinů obsažených v nerozpustných materiálech

V předchozí kapitole (1.2.3.3) byla zmíněna úskalí provázející analýzy proteinů obsažených v kostních a zubních tkáních stejně jako komplikovanost a časová náročnost tradičně volených přístupů. Lze konstatovat, že podobná úskalí doprovází analýzy proteinů obsažených v nerozpustných vzorcích obecně. Může to být způsobeno jistou „myšlenkovou pastí“, která snadno vede k úvaze, že nejprve je třeba z nerozpustného materiálu izolovat intaktní proteiny a pak je teprve možné podrobit je specifickému štěpení například trypsinem. Alespoň v případě některých nerozpustných materiálů se však ukázalo, že tomu tak není.

Pravděpodobně první zmínka o analýze proteinů obsažených v nerozpustné matrici bez nutnosti jejich předchozí izolace pochází z roku 1989, kdy Eckerskorn a Lottspeich popsali specifické štěpení proteinů přímo v polyakrylamidovém gelu po elektroforéze (SDS-PAGE), s následnou separací a izolací uvolněných peptidových fragmentů pomocí RP-HPLC a stanovením jejich aminokyselinových sekvencí. Eckerskorn a Lottspeich tedy použili postup, který je založený na jednoduché myšlence, že intaktní proteiny nemusí být zdlouhavě izolovány z gelu před specifickým štěpením trypsinem. Místo toho se kousek gelu obsahující protein vyřízne a po odmytí barviva sloužícího k vizualizaci proteinu je ponořen do roztoku trypsinu. Relativně malé molekuly trypsinu pronikají přes porézní gelovou strukturu a specificky štěpí proteiny zachycené v gelu. Uvolněné peptidové fragmenty jsou ve srovnání s intakním proteinem velmi malé, a proto mohou snadno difundovat do roztoku. Poté lze provést jejich analýzu vybranou technikou. Nejednalo se ještě o přímé štěpení proteinů v původním vzorku („in-sample digestion“), protože vzorky byly nejprve separovány pomocí SDS-PAGE (Eckerskorn & Lottspeich, 1989). Zmíněná strategie byla následně rozvíjena, takže se s ní lze setkat v různých variantách včetně těch, které jsou kompatibilní s rychle se rozvíjejícími proteomickými koncovkami, jako je například hmotnostní spektrometrie, a tak jí lze zařadit mezi přístupy o kterých lze bez nadsázky prohlásit, že významně přispěly k bouřlivému rozvoji proteomiky (Borchers et al., 2000; Granvogl et al., 2007; Hellman et al., 1995; Jenö et al., 1995; Rosenfeld et al., 1992; Shevchenko et al., 1996, 2006). Pro techniku přímého štěpení proteinů v gelu se vžilo výstižné označení „in-gel digestion“. Není bez zajímavosti, že článek z roku 1989 je

poněkud opomíjen a mnohem méně citován, než některé pozdější články využívající jiné varianty založené na „in-gel digestion“, například (Eckerskorn & Lottspeich, 1989; Shevchenko et al., 2006). Patrně je to dáno tím, že uvedená strategie byla plně doceněna, až když v proteomice začaly být hojně využívány hmotnostně spektrometrické techniky, které právě na techniku „in-gel digestion“ v současnosti často navazují.

Analogický postup, jako je výše popsaná technika „in-gel digestion“, byl použit pro analýzu proteinů přímo ve vzorku historické malby (Hynek et al., 2004). V tomto případě se již ovšem jednalo o techniku, kterou lze nazvat specifickým štěpením přímo v původním vzorku („in-sample digestion“), protože ze vzorku nebyly nejprve žádnou technikou izolovány intaktní proteiny. Specifické štěpení trypsinem probíhalo přímo v nerozpustné matrici vzorku a teprve do roztoku uvolněné peptidové fragmenty byly, po jednoduchém přečištění s využitím ZipTip, analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF (Hynek et al., 2004). Technika přímého specifického štěpení proteinů byla následně využita k proteomickým analýzám dalších nerozpustných materiálů, jako jsou historické malty nebo osifikované tkáně srdečních chlopní (Křížková et al., 2014; Zeman et al., 2013). Zmíněný postup byl ještě efektivnější, když na přímé specifické enzymové štěpení ve vzorku s hmotnostně spektrometrickou koncovkou navázala ještě vhodná matematická analýza získaných dat jako je PCA (Hrdlickova Kuckova et al., 2015). Nedávno byla technika přímého specifického štěpení ve vzorku úspěšně využita k analýze zvířecích chlupů (Kučková et al, 2023) a nejnověji též pro charakterizaci tkáně oční rohovky i jejích *in vitro* modelů (Kuckova et al., 2023; Tran et al., 2023).

Protože též kostní tkáně jsou nerozpustné vzorky s porézní sktrukturou, skrz níž by mohl například trypsin difundovat, vycházela předložená disertační práce mimo jiné z hypotézy, že by vhodný jednoduchý postup založený na přímém specifickém štěpení mohl vést k identifikaci značného množství proteinů (až stovek) také v tkáních lidských maxilárních (horní čelist) i mandibulárních (dolní čelist) kostí odoperovaných při chirurgických zákrocích a umožnit tak jejich proteomickou charakterizaci. Ačkoliv jsme předpokládali, že navržený postup by mohl fungovat, nebylo například zdaleka jasné, zda bude bez modifikací použitelný pro analýzu jak maxilárních, tak i mandibulárních kostních tkání, protože jejich charakter je dost odlišný, což se týká i jejich minerální denzity (Devlin et al., 1998).

Dalšími materiály s porézní strukturou, pro které by přicházelo v úvahu využití přímého štěpení ve vzorku („in-sample digestion“), jsou *in-vitro* modely lidských kostních buněk. Z hlediska stomatochirurgie jsou zajímavé, protože některé patologické stavy, jako například kostní

nádory, nemají tak častou prevalenci výskytu, a tudíž je pro jejich studium obtížné získat dostatečné množství vzorků. Rutinní proteomická analýza kostních modelů *in-vitro* s různými indukovanými patologickými stavy by tak mohla přispět k hlubšímu pochopení mechanismu jejich vzniku a případně i k volbě vhodné terapie. Modely *in-vitro* lidských kostních buněk by patrně bylo užitečné využívat ve větší míře v preklinickém výzkumu, protože mohou simulovat interakce a mechanismy, které obvykle představují zjednodušené situace *in vivo* (Sieberath et al., 2020). Bylo již vytvořeno několik modelů založených na buňkách tvořících kost (osteoblasty) a buňkách resorbujících kost (osteoklasty) simulujících proces remodelace kosti i souvisejících onemocnění (Borciani et al., 2020; Jeon et al., 2016; Lambertini et al., 2021; Mandatori et al., 2021). Pomocí těchto *in-vitro* modelů založených na systémech kokultivace osteoblastů a osteoklastů byl zjištěn účinek kvercetinu, glukosaminu, klodronátu, alendronátu, miR-2, melatoninu, stroncia, vitaminu D3 a vitaminu K2 u poruch kostí (Dolci et al., 2019; Forte et al., 2016; Hayden et al., 2014; Lambertini et al., 2021; Mandatori et al., 2021; Smieszek et al., 2020). Výše zmíněné studie prokázaly užitečnost *in vitro* modelů lidských kostních buněk pro studium kostních patologických stavů a případně i screening léčiv. Kromě toho byl vytvořen kokultivační systém buněk rakoviny prsu a osteoklastů ke studiu indukce osteoklastogeneze a metastatického mikroprostředí (Mercatali et al., 2017). Modelové kostní kultury byly již rovněž využity pro studium stimulace osteoblastogeneze prostřednictvím extracelulárních vezikul ve vztahu ke karcinomu prostaty (Lanning et al., 2021). Pro vhled na molekulární úrovni by bylo žádoucí mít možnost kostní kultury lidských buněk *in-vitro* rychle a efektivně charakterizovat proteomickými technikami. Nedávno publikované výsledky naznačují, že technika přímého štěpení („in-sample digestion“) by mohla být pro charakterizaci *in vitro* kostních modelů využitelná (Michalus et al., 2022). Podrobněji je tato tématika pojednána v kapitolách 5.3 a 6.3 této disertační práce.

1.2.5 Biologický a klinický význam vybraných kostních proteinů zejména z pohledu stomatochirurgie

V této kapitole jsou stručně popsány role významných proteinů kostních tkání, které se navíc podařilo identifikovat v lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání v rámci řešení předložené disertační práce (viz Tabulka 2 v příloze 2). Jsou prezentovány formou seznamu, ve kterém jsou seřazeny sestupně, podle počtu unikátních peptidových fragmentů identifikovaných pomocí LC-MS/MS (Hynek et al., 2021).

1. Kolagen je nejhojnějším proteinem extracelulární matrix nacházejícím se v různých izoformách v pojivových tkáních obratlovců, kosti nevyjímaje, jehož změny aminokyselinové sekvence mohou indikovat různá onemocnění (Di Lullo et al., 2002), který se běžně používá v dentální implantologii (Patino et al., 2002).

2. Tenascin je glykoprotein extracelulární matrix hojně zastoupený v kostech, kde ovlivňuje adhezi a diferenciaci osteoblastů a je často přítomen v okolí hojících se ran (Morgan et al., 2011).

3. Fibronektin je relativně velký (440 kDa) glykoprotein, který se váže na další proteiny extracelulární matrix, jako je kolagen, a také na membránové receptorové proteiny zvané integriny a účastní se řady procesů, jako je adheze buněk nebo hojení ran (Pankov & Yamada, 2002). Bylo též prokázáno, že fibronektin ovlivňuje funkci osteoblastů (Bentmann et al., 2010).

4. Periostin je známý jako protein extracelulární matrix, který se jeví mít klíčovou roli při regeneraci periodontálního vaziva a maxilárních i mandibulárních kostí po chirurgických zákrocích (Du & Li, 2017). Bylo rovněž zjištěno, že zvýšená hladina exprese periostinu souvisí s kostními metastázami karcinomu prsu (Contié et al., 2011).

5. Annexin patří mezi proteiny hojně se vyskytující v amorfní složce mezibuněčné hmoty kosti, kde by pravděpodobně mohl hrát roli při tvorbě hydroxyapatitu (Genge et al., 1990).

6. Serpin (inhibitor serinových proteáz) reprezentuje skupinou proteinů, u kterých bylo poprvé zjištěno, že působí na serinové proteázy (Silverman et al., 2010; Whisstock et al., 2010). Bylo popsáno, že mutace Serpinu H1 souvisí s dědičným onemocněním pojivové tkáně osteogenesis imperfecta (Lindert et al., 2015).

7. Trombospondin je glykoprotein, který je součástí mineralizované extracelulární matrix, která je odvozená od osteoblastů (Robey et al., 1989). Hladina trombospondinu může být patrně ovlivněna reakcí na přítomnost cizího tělesa (FBR-foreign body response), což by mohlo být zajímavé z hlediska implantologie (Morris & Kyriakides, 2014).

8. Plastin 3 ovlivňuje kostní remodelaci prostřednictvím regulace aktivity osteoklastů (Neugebauer et al., 2018).

9. Chondroadherin je protein mezibuněčné hmoty, o kterém se předpokládá, že hraje roli při udržování kostních buněk na kolagenových matricích kosti (Mizuno et al., 1996).

10. Biglycan je proteoglykan, který hraje roli při mineralizaci kostí a ovlivňuje rychlost růstu kostní hmoty (T. Xu et al., 1998). Je významný i z hlediska kostní patologie, protože hraje roli při regulaci růstu buněk osteosarkomu (Aggelidakis et al., 2018).

11. Lumican je významnou proteoglykanovou složkou kostní matrix, kterou vylučují diferencující se i zralé osteoblasty (Raouf et al., 2002).

12. Dekorin je jedním z hlavních proteoglykanů v kostech, kde moduluje sestavení kolagenové matrice a mineralizaci (Mochida et al., 2009).

13. Osteopontin hraje roli ve vývoji alveolárních kostí i zubního cementu, včetně jejich mineralizace (Foster et al., 2018). Kromě toho, že ovlivňuje kostní metabolismus a homeostázu se zdá, že úzce souvisí s výskytem a rozvojem mnoha onemocnění souvisejících s kostmi, jako je osteoporóza, revmatoidní artritida a osteosarkom (Si et al., 2020).

14. Clusterin je glykoprotein zapojený do regulace buněčné proliferace. Předpokládá se, že by mohl inhibovat diferenciaci osteoblastů mezenchymálních kmenových buněk kostní dřeně (Abdallah et al., 2018).

15. Osteoglycin (též známý jako mimekan) byl nedávno prokázán jako koordinátor kostní a glukózové homeostázy (Lee et al., 2018).

16. Asporin je protein, jehož změna hladiny by mohla souviset s onemocněními kostí a kloubů, jako je onemocnění bederní ploténky nebo osteoartróza (Ikegawa, 2008).

17. Osteomodulin, nazývaný také osteoadherin, patří do rodiny malých proteinů bohatých na leucin (SLRP) vyskytujících se v extracelulární matrix (Sommarin et al., 1998). Exprese osteomodulinu v osteoblastech je indukována osteoklastickou aktivitou, což indikuje jeho zapojení do kostní homeostázy (Ninomiya et al., 2007).

18. Tetranektin je protein složený ze čtyř identických, nekovalentně vázaných polypeptidů, které zřejmě hrají roli v mineralizaci kostí během osteogeneze (Wewer et al., 1994).

19. Alfa-2-HS-glykoprotein, také známý jako fetuin-A, se může podílet společně s dalšími proteiny na tvorbě kostní tkáně (Szweras et al., 2002).

20. Fibromodulin je proteoglykan z rodiny SLRP, o kterém se předpokládá, že hraje roli při tvorbě zubní tkáně a alveolární kosti (Goldberg et al., 2009).

21. Kalretikulin známý jako chaperon vážící vápník, inhibuje zánětem indukovanou osteoklastogenezi a kostní resorpci (Fischer et al., 2017).

22. Osteokalcin je vylučován výhradně osteoblasty a mohl by sloužit jako marker tvorby kosti k posouzení kvality kosti čelisti před zavedením implantátu (Moser & van der Eerden, 2018; Yasuda et al., 2020).

23. Retikulokalbin je protein vázající vápník umístěný v lumen endoplazmatického retikula, který byl mimo jiné nalezen v sekretomu osteoblastů.

24. Kalumenin je další protein vázající vápník, který je přítomen v sekretomu osteoblastů (Sanchez et al., 2018).

25. Sialoprotein je součástí mineralizovaných tkání, jako je kost, dentin, cement a mineralizovaná chrupavka. Bylo popsáno, že hraje funkční roli při tvorbě kosti a osteoklastogenezi (Malaval et al., 2008).

26. Transmembránový protein 119, známý také jako osteoblastový indukční faktor, hraje klíčovou roli při tvorbě a biomineralizaci kostí a byla též popsána jeho zvýšená hladina u osteosarkomu (Jiang et al., 2017).

2. Cíle disertační práce

1. S využitím modelových vzorků (prasečí kostní tkáně) vyvinout rychlou a přímočarou metodu založenou na proteomické analýze, která by umožnovala co nejjednodušším způsobem charakterizovat významné množství proteinů v tkáních čelistních kostí. V ideálním případě s využitím specifického enzymového štěpení proteinů v přímo v kostních tkáních. Nejpoužívanější analytickou koncovkou by měla být LC-MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií).

2. Ověřit potenciál metody pro rutinní proteomické analýzy lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání odoperovaných při stomatochirurgických zákrocích.

3. Adaptovat techniku i na alternativní a běžněji dostupnou analytickou koncovku, jakou představuje například CE-UV (kapilární elektroforéza s detekcí v UV oblasti).

4. Otestovat využitelnost metody též pro rozlišení *in-vitro* modelových kostních kultur s indukovanými různými patologickými stavy.

3. Formulace hypotéz

1. Relativně malé molekuly trypsinu by z roztoku, ve kterém je ponořen vzorek kosti, měly pronikat porézní kostní tkání až k jednotlivým proteinům, které budou specificky štěpit. Odštěpené specifické peptidové fragmenty by pak měly difundovat do roztoku. Po jejich přečištění by mělo být možné charakterizovat proteiny obsažené v kostní tkáni vhodnou analytickou technikou, jakou je například LC-MS/MS, aniž by bylo předem nutné proteiny z kostních tkání izolovat.

2. Matematická analýza hmotnostně spektrometrických dat by mohla napomoci například k rozlišení patologických a nepatologických stavů kostních tkání.

3. Výše uvedené přímé štěpení proteinů v kostních tkáních (in-bone digestion) by mohlo být zakončeno i jinou, dostupnější analytickou koncovkou, jakou je například CE-UV, která separuje jednotlivé peptidové fragmenty na základě jejich nábojových vlastností v roztoku. Porovnáním profilů získaných elektroferogramů pomocí matematické analýzy by pak mohlo umožnit rozlišit patologickou kostní tkáň od tkáně zdravé.

4. Pokud je možné použít postup využívající přímého štěpení ve vzorcích s koncovkou LC-MS/MS ke studiu proteinů obsažených v kostních tkáních, měl by být využitelný i pro *in vitro* vzorky modelů kostních kultur s různými indukovanými patologickými stavy, protože jsou podobně jako kostní tkáně porézního charakteru.

4. Použité metody a role autorky

Použité metody jsou podrobně popsány v jednotlivých publikacích (viz přílohy 1-4). Tím, že se jedná o interdisciplinární práci, je spektrum použitých metod velmi široké. V podstatě lze říci, že sahá od chirurgických zákroků, přes specifické enzymové štěpení, následované tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií, nebo též kapilární elektroforézou s UV detekcí, až po vyhodnocování dat matematickou analýzou. Jako koncovka následující specifické enzymové štěpení byla též využita kapilární elektroforéza s UV detekcí. Z důvodu pestré škály použitých metod je níže specifikován podíl autorky.

Autorka předložené disertační práce prováděla chirurgické zákroky, které vedly k získání všech analyzovaných vzorků lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání. Dále prováděla zpracování všech vzorků (podrobněji viz přiložené publikace), následované specifickým enzymovým štěpením, přečištěním získaných směsí peptidových fragmentů pomocí ZipTip s následným odpařením roztoku. Dále byly vzorky předány školiteli, který je předal k analýze pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, Ph.D. Vzorky analyzované s využitím koncovky kapilární elektroforézy byly předány školiteli, který je předal RNDr.Václavu Kašičkovi, CSc. Hmotnostně spektrometrická profilová spektra, i data získaná využitím kapilární elektroforézy, byla hodnocena pomocí matematických analýz, které prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D. Autorka disertace následně získané výsledky vyhodnocovala, interpretovala a navrhovala další postupy. Měla zásadní podíl na přípravě publikačních výstupů, včetně napsání draftů manuskriptů. Autorský podíl na jednotlivých publikacích, které jsou podkladem disertace, je blíže specifikován na počátku kapitol 5.1–5.4.

5.Výsledky

Řešení mé disertační práce vedlo ke vzniku čtyř publikací v impaktovaných časopisech, které prošly recenzním řízením. Na dvou publikacích jsem první autorkou (příloha 1 a 3) a na dalších dvou je mé prvoautorství sdílené. Mé role jsou uvedeny v předchozí kapitole. V této části, jsou uvedeny pouze vybrané nejpodstatnější výsledky ze čtyř publikací, které jsou k dispozici v přílohách 1-4.

5.1 Ověření specifického štěpení proteinů přímo kostní tkáni

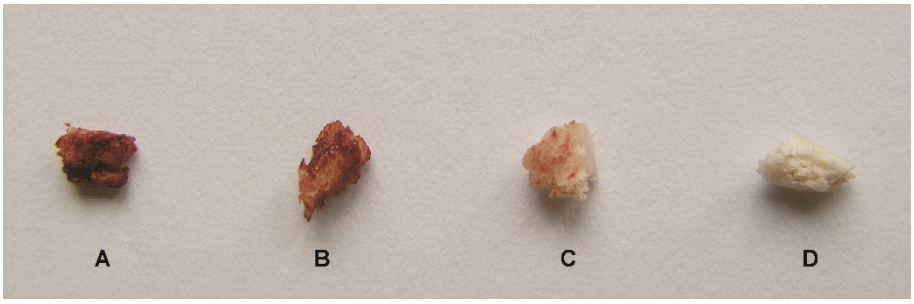
Michalusova I., Trubacova D., Cejnar P., Kuckova S., Santrucek J., Hynek R.: Direct tryptic cleavage in bone tissue followed by LC-MS/MS as a first step towards routine characterization of proteins embedded in alveolar bones. *International Journal of Mass Spectrometry* 455, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375. IF_{2020} 1,98

Můj autorský podíl

Po konzultaci se svým školitelem jsem navrhla experimentální postupy a provedla preparaci modelových vzorků z prasečích čelistních kostí. Na získané modelové vzorky jsem aplikovala popsané metodické postupy (viz Příloha 1) zahrnující mimo jiné preinkubační krok, specifické enzymové štěpení trypsinem, přečištění získaných peptidových fragmentů pomocí ZipTip a odpaření rozpouštědla. Následně jsem vzorky předala svému školiteli, který je předal k analýze pomocí LC-MS/MS (prováděl Ing. Jiří Šantrůček, Ph.D.). Hmotnostně spektrometrická data byla analyzována pomocí programu MaxQuant a matematické analýzy (prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D.). Takto získané výstupy jsem zpracovala, interpretovala a na jejich základě sepsala původní verzi manuskriptu.

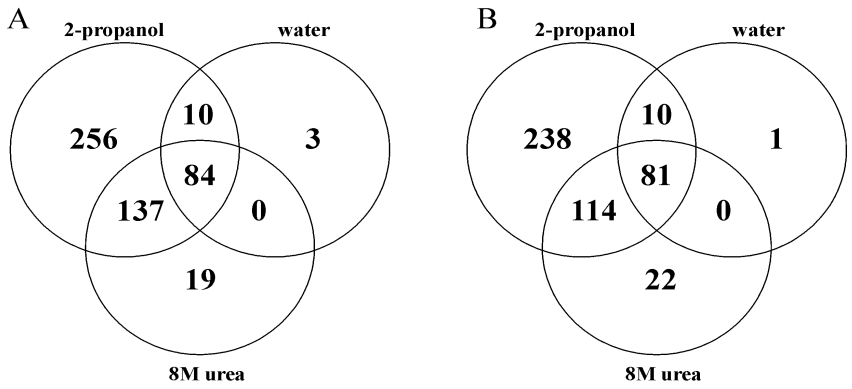
Nejprve bylo nutné ověřit, zda by rychlá a jednoduchá technika založená na specifickém štěpení proteinů trypsinem přímo ve vzorku („in-sample digestion“) mohla být využitelná též pro vzorky kostních tkání v tom smyslu, že by při minimálním počtu kroků vedla k identifikaci významného počtu proteinů, z nichž nezanedbatelné množství souvisí s funkcí kostních tkání. V případě úspěšného ověření pak nalézt vhodné podmínky, které by při zachování

jednoduchosti techniky vedly k vyššímu počtu identifikovaných proteinů. Jako model byly zvoleny prasečí čelistní kosti, protože mají podobné vlastnosti jako lidské, a navíc se mohou používat jako náhradní kostní materiál při řízené kostní regeneraci ve stomatochirurgii a v maxilofaciální chirurgii (Calvo Guirado et al., 2013; Iezzi et al., 2017; Pagliani et al., 2012). Protože studie byla zaměřena na proteiny pevně vázané v kostní tkáni, byla snaha v preinkubačním kroku alespoň redukovat množství jiných (například krevních proteinů). K preinkubaci byla použita deionizovaná voda, 8 M močovina a propan-2-ol. Dokonce i vizuálně bylo možné pozorovat rozdíly při využití výše zmíněných rozpouštědel v preinkubačním kroku (viz Obrázek 1).



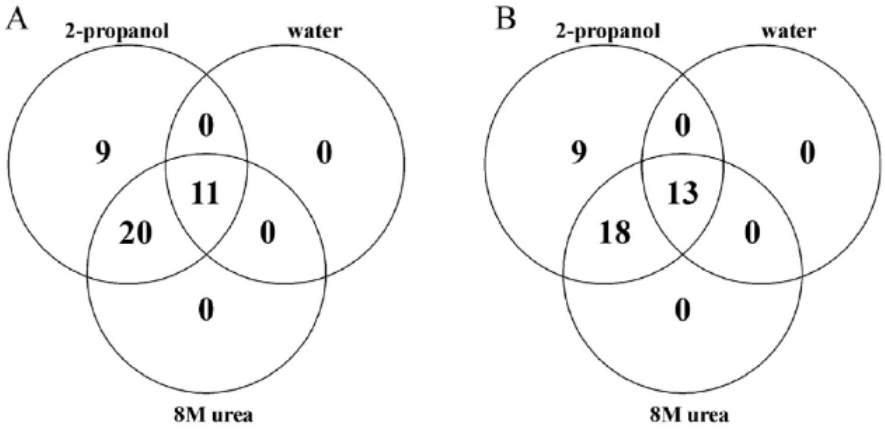
Obrázek 1 Vizuální změny vzorků prasečích čelistních kostí po aplikaci různých preinkubačních kroků. Bez preinkubace A); po 30 minutách preinkubace deionizovanou vodou B), 8 M močovinou C) a propan-2-olem D). Převzato z (Michalusová et al., 2020b).

Po aplikaci přímého specifického štěpení trypsinem na vzorky čelistních kostí, podrobené výše zmíněným preinkubačním krokům, bylo následně pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií identifikováno nejvíce proteinů ve vzorcích po preinkubaci propan-2-olem. Při využití tohoto rozpouštědla bylo identifikováno 487 proteinů ve vzorcích horních čelistních kostí a 443 proteinů ve vzorcích dolních čelistních kostí. Vennovy diagramy znázorňující počty proteinů při využití uvedených rozpouštědel jsou znázorněny na obrázku (viz Obrázek 2).



Obrázek 2 Vennovy diagramy identifikovaných proteinů po 30 minutách preinkubace deionizovanou vodou, 8 M močovinou a propan-2-olem v A) horní čelist a B) dolní čelist. Převzato z (Michalusová et al., 2020b).

V obrázku 3 jsou znázorněny Vennovy diagramy identifikovaných proteinů, které jsou typické pro kostní tkáně (viz Obrázek 3).



Obrázek 3 Vennovy diagramy identifikovaných proteinů, které mají souvislost s funkcí kostních tkání po 30 minutách preinkubace deionizovanou vodou, 8 M močovinou a propan-2-olem v A) horní čelist a B) dolní čelist. Převzato z (Michalusová et al., 2020b).

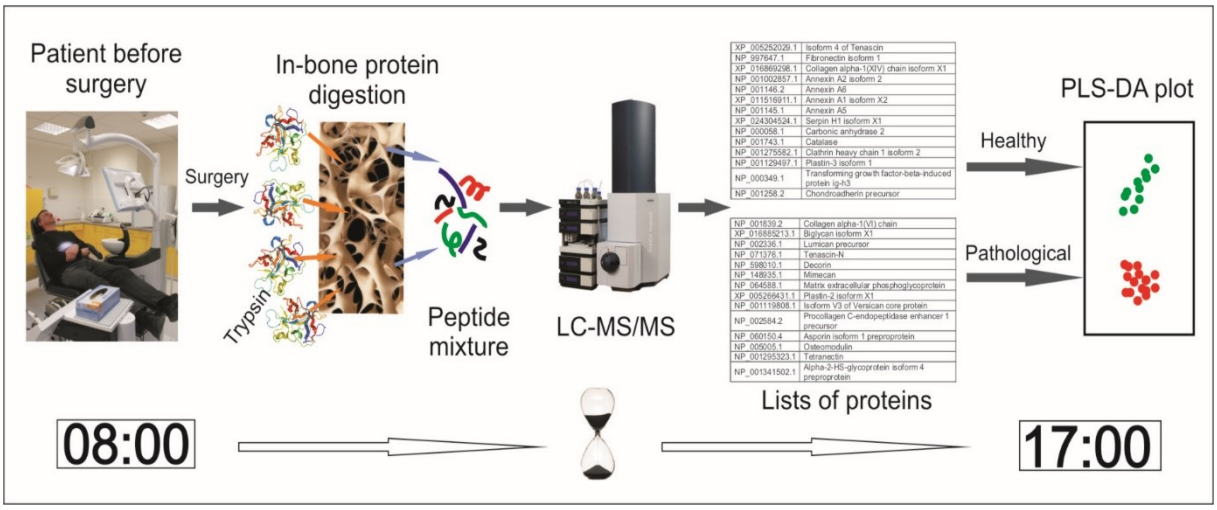
5.2 Charakterizace odoperovaných lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání ve stomatochirurgii pomocí techniky přímého štěpení ("in-bone" digestion) následovaného tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií

Hynek R.*, Michalus I.*, Cejnar P., Santrucek J., Seidlova S., Kuckova S., Sazelova P., Kasicka V.: In-bone protein digestion followed by LC-MS/MS peptide analysis as a new way towards the routine proteomic characterization of human maxillary and mandibular bone tissue in oral surgery. *Electrophoresis* 42, 2552-2562, 2021. DOI: https://doi.org/10.1002/elps.202100211. IF_{2021} 3,59 *Sdílené prvoautorství.

Můj autorský podíl

Prováděla jsem všechny chirurgické zákroky, které vedly k získání vzorků kostních tkání použitých v této práci. Vzorky jsem následně zpracovala a aplikovala na ně popsané metodické postupy (viz Příloha 2) zahrnující mimo jiné specifické enzymové štěpení trypsinem, přečištění získaných peptidových fragmentů pomocí ZipTip a odpaření rozpouštědla. Následně jsem vzorky předala svému školiteli, který je předal k analýze pomocí LC-MS/MS (prováděl Ing. Jiří Šantrůček, Ph.D.). Hmotnostně spektrometrická data byla analyzována pomocí programu MaxQuant a matematické analýzy (prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D.). Získané výstupy jsem zpracovala, interpretovala a na jejich základě jsem ve spolupráci se svým školitelem sepsala původní verzi manuskriptu.

Metoda založená na přímém specifickém štěpení proteinů trypsinem v kostních tkáních („in-bone digestion") byla využita pro analýzu vzorků odoperovaných lidských maxilárních a mandibulárních kostí. Zjednodušené schéma celého procesu začínajícího chirurgickým zákrokem je znázorněno na obrázku (viz Obrázek 4).



Obrázek 4 Schéma pracovního postupu. Převzato z (Hynek et al., 2021).

Protože byla snaha mít k dispozici metodu s nejmenším počtem kroků, byla testována také varianta bez preinkubačního kroku. Výsledky byly porovnávány s experimenty, při kterých byl, na základě předchozích zkušeností s hledáním vhodných podmínek na vzorcích prasečích čelistních kostí, použit pro preinkubační krok propan-2-ol. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce (viz Tabulka 1).

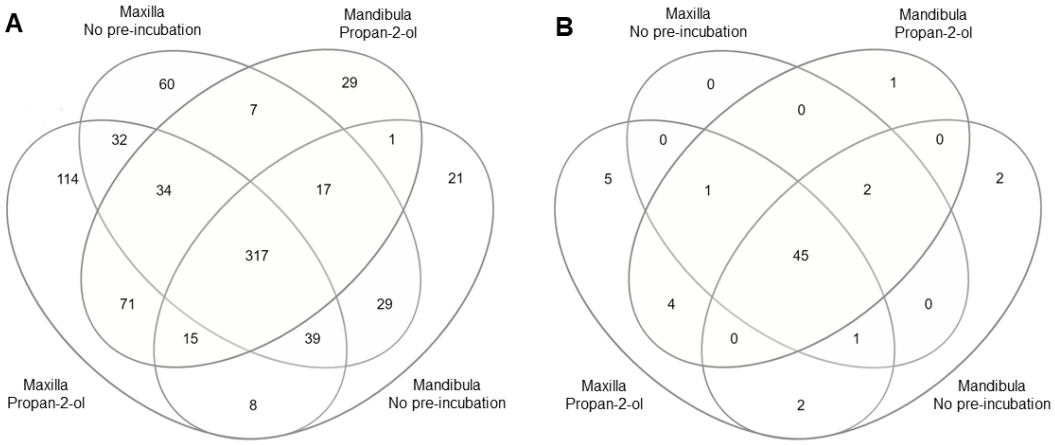
Tabulka 1 Počty identifikovaných proteinů při využití různých variant techniky.

Typ identifikovaných proteinů	**Počet identifikovaných proteinů***	
	Bez preinkubace	30 min preinkubace v propan-2-olu
Všechny proteiny v maxilárních tkáních	999 / 535/ 518	1120 / 630 / 655
Všechny proteiny v mandibulárních tkáních	1008 / 447 / 501	1151 / 491/ 489
Typické kostní proteiny v maxilárních tkáních	51 / 49 / 46	62 / 58 / 52
Typické kostní proteiny v mandibulárních tkáních	53 / 52 / 49	56 / 53 / 50

*Celkový počet identifikovaných proteinů alespoň v 1 vzorku / celkový počet identifikovaných proteinů alespoň ve 4 vzorcích / průměrný počet identifikovaných proteinů na vzorek

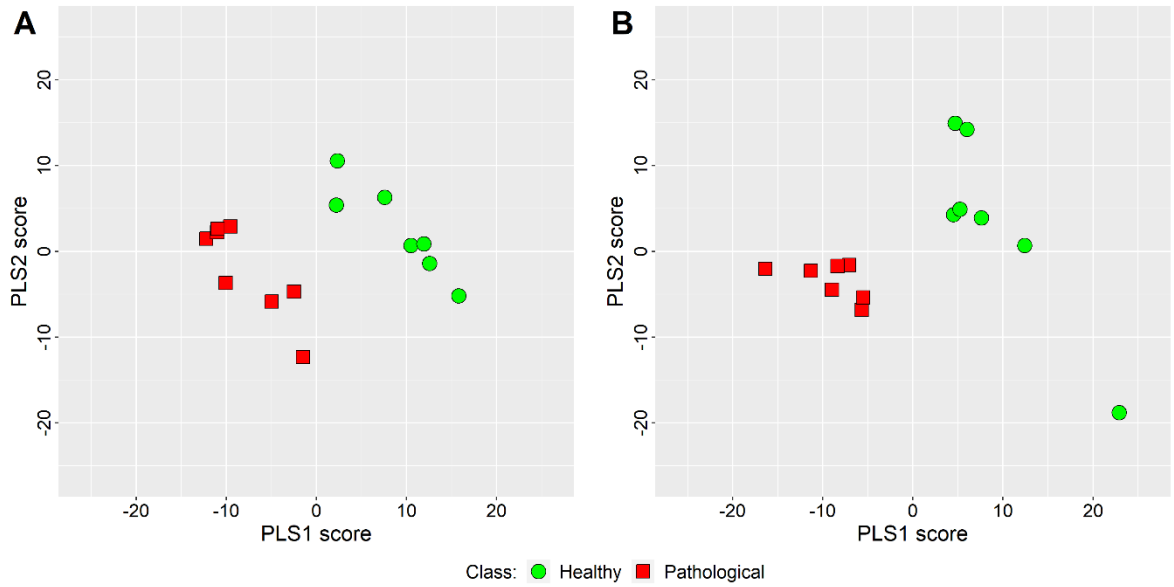
Celkově se podařilo identifikovat 1120 proteinů v odoperovaných vzorcích lidských maxilárních a 1151 proteinů lidských mandibulárních kostí. Použití propan-2-olu v preinkubačním kroku vedlo ke zvýšení počtu identifikovaných proteinů jak v případě vzorků maxilárních, tak mandibulárních kostí. Řada identifikovaných proteinů je v kostních tkáních významná z biologického a klinického hlediska, což je diskutováno v následující kapitole (kap. 6).

Vennovy diagramy ukazující překryvy mezi výše uvedenými skupinami proteinů identifikované v alespoň čtyřech vzorcích jsou znázorněny na obrázku (viz Obrázek 5). Podobné počty proteinů byly identifikovány jak v maxilárních, tak i mandibulárních kostních tkáních.



Obrázek 5 Vennovy diagramy všech proteinů (A) a proteinů charakteristických pro kostní tkáně (B) identifikovaných ve vzorcích maxilárních a mandibulárních kostí bez předinkubačního kroku a s předinkubací v propan-2-olu (čísla odpovídají počtu identifikovaných proteinů alespoň ve čtyřech vzorcích maxilárních nebo mandibulárních kostí) (převzato z (Hynek et al., 2021)*).*

Grafické znázornění výsledků matematické analýzy PLS-DA (partial least square-discriminant analysis) použité k rozlišení vzorků nepatologických a patologických (zánět) kostních tkání je uvedeno na obrázku (viz Obrázek 6).



Obrázek 6 Rozlišení mezi zdravými a patologickými stavy kostních tkání bez preinkubace (A) a s 30minutovou preinkubací vzorku v propan-2-olu před tryptickým štěpením (B) ((převzato z (Hynek et al., 2021)*).*

Rozlišení mezi vzorky zdravých a zánětlivých kostí dosáhl 73 %, když nebyl použit preinkubační krok. Při zařazení preinkubačního kroku s propan-2-olem se přesnost vzájemného rozlišení obou skupin (zdravé tkáně x zánětlivé tkáně) zvýšila na 100 %.

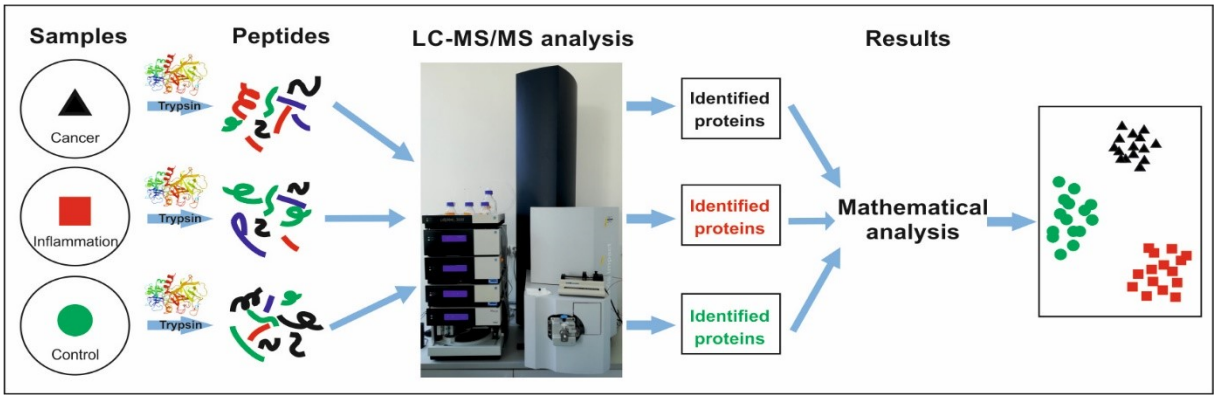
5.3 Rychlé rozlišení a charakterizace indukovaných patologických stavů v modelech lidských kostních tkání metodou založenou na přímém specifickém enzymovém štěpení (in-sample digestion) s aplikací ve stomatochirurgii

Michalus I., Van Nguyen T., Viktorová J., Cejnar P., Šantrůček J., Kučková, Š., Sázelová P., Kašička V., Hynek R.: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of peptides separated from the insoluble matrix by in-sample tryptic protein digestion for rapid discrimination of various induced pathological states of human bone models in oral surgery. Journal of Separation Science, 2022; 45:4388–4396. DOI: https://doi.org/10.1002/jssc.202200694. IF_{2022} 3,1

Můj autorský podíl

Prováděla jsem zpracování vzorků lidských *in vitro* kostních kultur s různými indukovanými patologickými stavy (tyto kostní kultury byly připraveny doc. Ing. Jitkou Viktorovou, Ph.D. a Ing. Tran Van Nguyenem, Ph.D.). Vzorky jsem následně zpracovala a aplikovala na ně popsané metodické postupy (viz Příloha 3) zahrnující mimo jiné specifické enzymové štěpení trypsinem, přečištění získaných peptidových fragmentů pomocí ZipTip a odpaření rozpouštědla. Následně jsem vzorky předala svému školiteli, který je předal k analýze pomocí LC-MS/MS (prováděl Ing. Jiří Šantrůček, Ph.D.). Hmotnostně spektrometrická data byla analyzována pomocí programu MaxQuant a matematické analýzy (prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D.). Získané výstupy jsem zpracovala, interpretovala a na jejich základě sepsala původní verzi manuskriptu.

Byl ověřen potenciál techniky využívající přímé enzymové štěpení (in-sample digestion) následované tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií pro charakterizaci proteinů obsažených ve vzorcích *in vitro* lidských kostních tkání s indukovanými patologickými stavy. Schéma pracovního postupu je znázorněné na obrázku (viz Obrázek 7).



Obrázek 7 Schéma postupu založeného na přímém štěpení následovaného LC-MS/MS (převzato z (Michalus et al., 2022)*).*

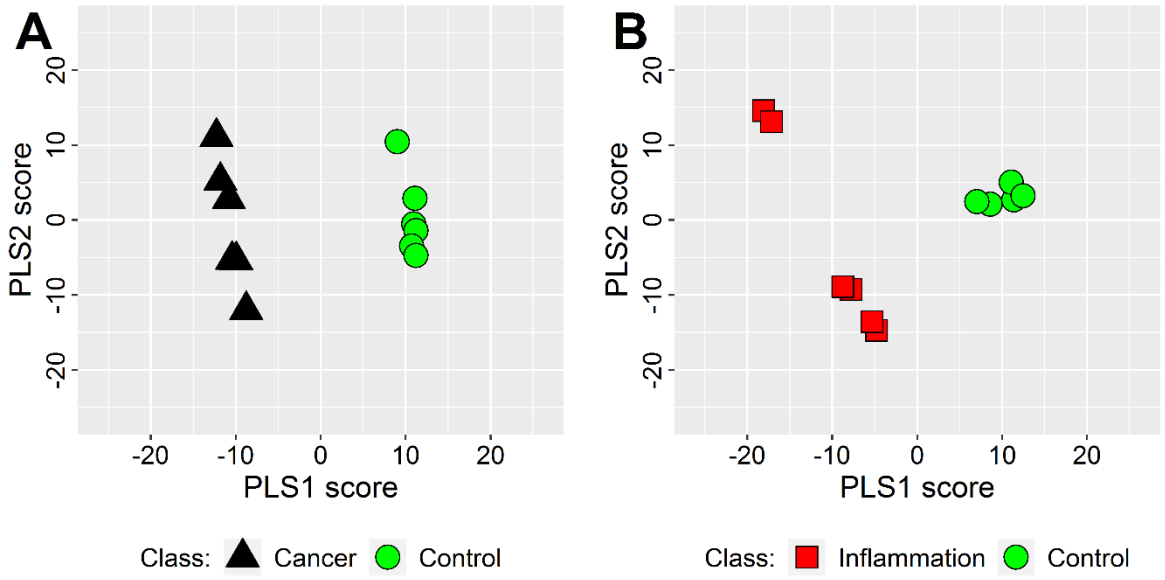
Tabulka 2 Počty proteinů identifikovaných v in vitro kostních kulturách a maxilárních kostech

Původ vzorku	**Počet identifikovaných proteinů***		
	1	2	3
Kultura s indukovanou rakovinou	532	466	446
Kultura s identifikovaným zánětem	546	460	440
Kontrolní kultura	533	478	451
Vzorky maxilárních kostí	623	530	491

*Celkový počet proteinů identifikovaných alespoň v jednom vzorku (sloupec č. 1), alespoň v 50 % vzorků (sloupec č. 2) a průměrný počet identifikovaných proteinů na vzorek (sloupec č. 3).

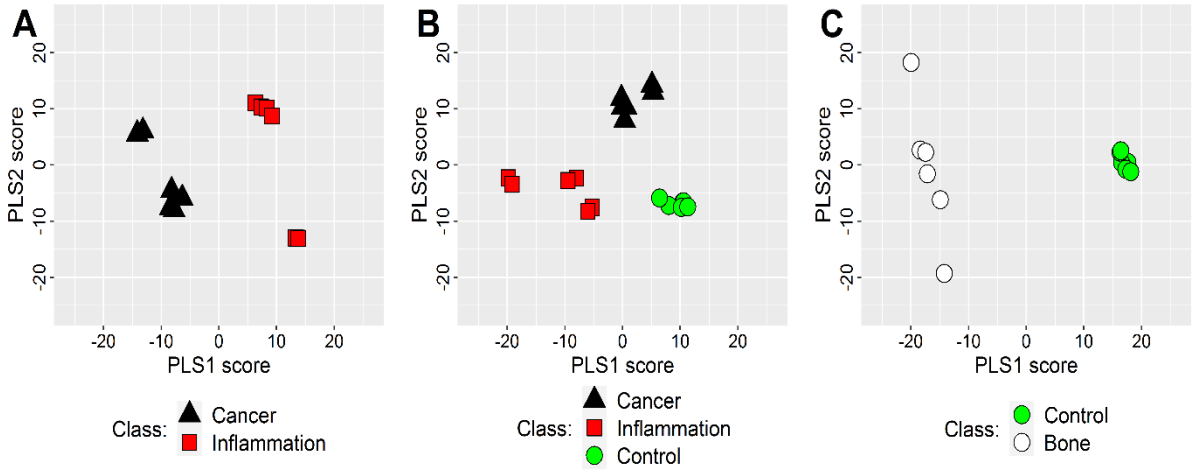
Počty identifikovaných proteinů jsou shrnuty v Tabulce (viz Tabulka 2). Průměrné počty identifikovaných proteinů na vzorek v buněčných kulturách různých kostních modelů *in vitro* a také ve vzorcích z lidských maxilárních kostí z vestibulární lamely byly zhruba podobné, konkrétně 446 proteinů v kultuře kostních buněk s indukovanou rakovinou, 440 v kultuře s indukovaným zánětem, 451 proteinů v kultuře kontrolních buněk a 491 proteinů v lidských maxilárních kostech (z vestibulární lamely).

Aby se zjistilo, zda použitá technika přímého štěpení proteinů ve vzorku má potenciál rozlišovat mezi různými skupinami vzorků kultur kostních buněk *in vitro,* byla použita matematická analýza PLS-DA (partial least square – discriminant analysis). Rozlišení mezi kulturami kostních buněk s indukovanou rakovinou a kontrolní kulturou je graficky znázorněno na obrázku 8A a rozlišení mezi kulturou kostních buněk s indukovaným zánětem a kontrolní kulturou je znázorněno na obrázku 8B (viz Obrázek 8). Přesnost rozlišení mezi rakovinou a kontrolou byla 94 % a přesnost mezi zánětem a kontrolou byla 83 %.



Obrázek 8 Rozlišení mezi kulturami buněk modelů kostních tkání in vitro s indukovanou rakovinou a kontrolními kulturami kostních buněk (A) a mezi kulturami kostních buněk s indukovaným zánětem a kontrolními kulturami kostních buněk (B). Převzato z (Michalus et al., 2022).

Obrázek 9A ukazuje, že je také možné rozlišit mezi dvěma různými patologickými stavy, jmenovitě mezi rakovinou a zánětem, s dosaženou přesností 94 %. Rozlišení mezi všemi třemi kostními kulturami *in vitro* je znázorněno na obrázku 9B s dosaženou přesností 77 % (viz Obrázek 9). Pro srovnání bylo provedeno i rozlišení mezi vzorky vestibulární lamely lidských maxilárních kostí a kontrolní lidskou *in vitro* buněčnou kulturou (Obrázek 9C). V tomto případě bylo dosaženo rozlišení s přesností 100 %.



Obrázek 9 Rozlišení mezi kulturami buněk modelů kostních tkání in vitro s indukovanou rakovinou a buněčnou kulturou s indukovaným zánětem (A), mezi všemi třemi kulturami kostních buněk s indukovanou rakovinou, zánětem a kontrolními kulturami kostních buněk (B) a mezi kontrolními kulturami kostních buněk a vzorky lidských maxilárních kostí (C). Převzato z (Michalus et al., 2022).

V *in vitro* modelech lidských kostních tkání byly též charakterizovány proteiny. Pomocí matematické analýzy (PLS-DA) byl jako nejvýznamnější protein pro rozlišení mezi modelem rakovinných kostních buněk a kontrolní kulturou určen Galectin-1. Hladina Galectinu-1 byla přibližně 16krát vyšší v *in vitro* modelových vzorcích kostních tkání s indukovanou rakovinou než v kontrolních vzorcích.

5.4 Přímé štěpení vzorků kostních tkání (in-bone digestion) s koncovkou kapilární elektroforézy s UV detektorem

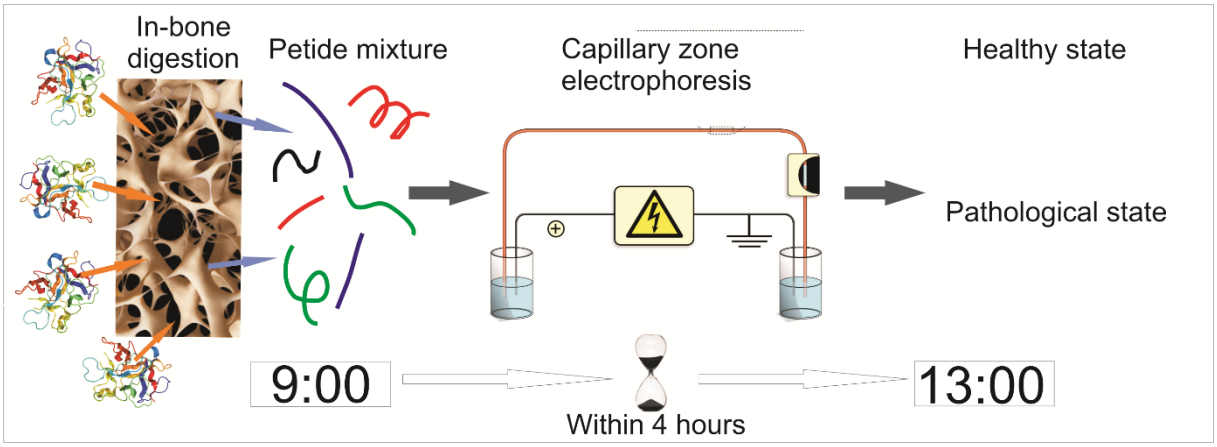
Michalusova I.*, Sazelova P.*, Cejnar P., Kuckova S., Hynek R., Kasicka V.: Capillary electrophoretic profiling of in-bone tryptic digests of proteins as a potential tool for the detection of inflammatory states in oral surgery. *Journal of Separation Science* 43(20), 2020. DOI: https://doi.org/10.1002/jssc.202000718. IF_{2020} 3,64 **Sdílené prvoautorství.*

Můj autorský podíl

Po konzultaci se svým školitelem jsem navrhla alternativní koncovku (kapilární elektroforézu) pro separaci specifických peptidových fragmentů. Provedla jsem preparaci modelových vzorků z prasečích kostí. V této publikaci, byly využity též vzorky tkání lidských čelistních kostí, které byly získány při mnou provedených operačních zákrocích. Na všechny analyzované vzorky jsem aplikovala popsané metodické postupy (viz Příloha 4) zahrnující mimo jiné, specifické enzymové štěpení. Následně jsem vzorky předala svému školiteli, který je předal k analýze pomocí kapilární elektroforézy na ÚOCHB AV ČR (prováděli RNDr. Václav Kašička, CSc. a RNDr. Petra Sázelová). Data získaná z elektroforézy byla zpracována pomocí matematické analýzy (prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D.). Takto získané výstupy jsem zpracovala, interpretovala a na jejich základě sepsala větší část původní verze manuskritu (část týkající se speciálnějších záležitostí kapilární elektroforézy byla dodána výše zmíněnými spoluautory z ÚOCHB AV ČR).

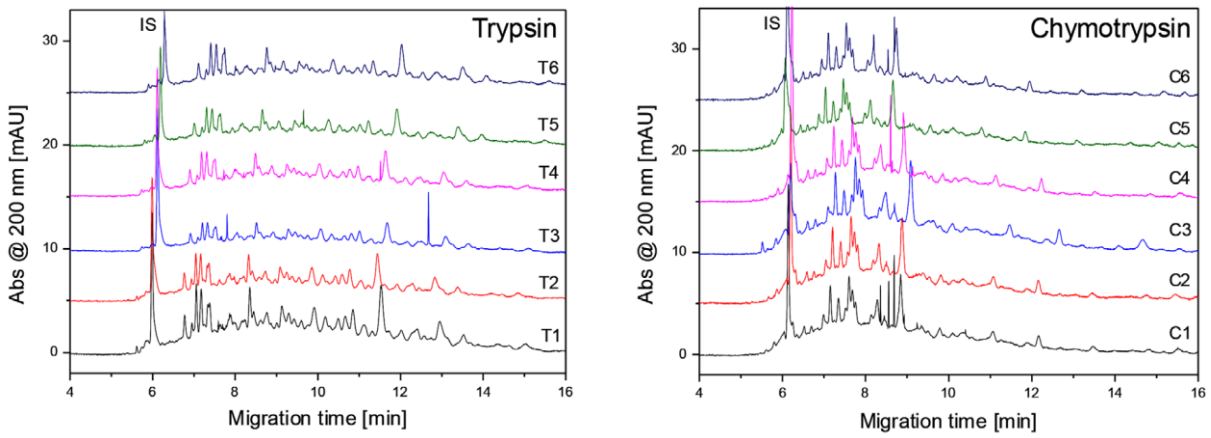
Protože kapilární elektroforéza (CZE) vybavená UV detektorem patří mezi dostupnější techniky než tandemová hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií,

bylo ověřeno, zda by ji bylo možné využít jako koncovku po přímém specifickém štěpení proteinů ve vzorcích kostních tkání. Zjednodušené schéma pracovního postupu je znázorněno na obrázku (viz Obrázek 10).



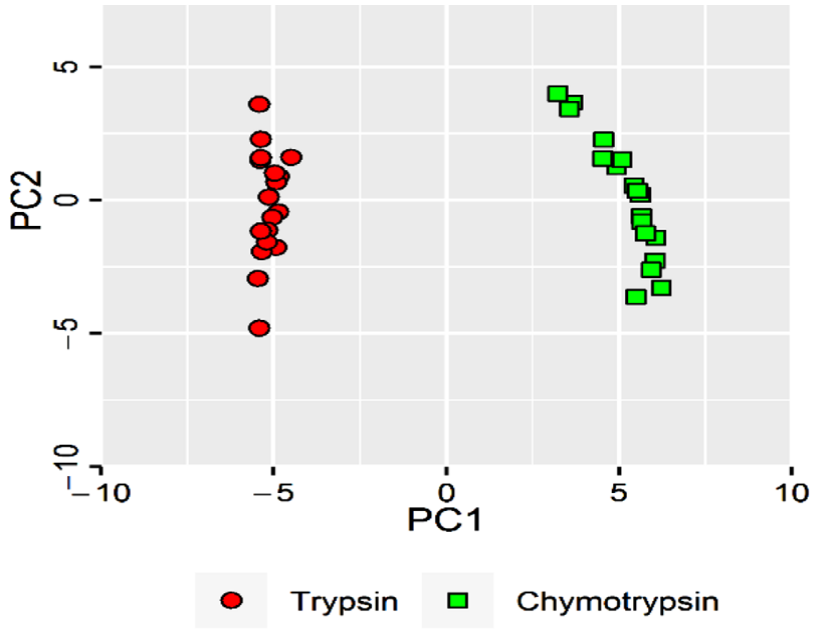
Obrázek 10 Schéma pracovního postupu s koncovkou CZE (převzato z (Michalusová et al., 2020a)*)*

Nejprve byla otestována možnost rozlišit pomocí této techniky peptidové fragmenty vzniklé přímým specifickým štěpením trypsinem a chymotrypsinem. Byly získány elektroferogramy s odlišnými profily (viz Obrázek 11).



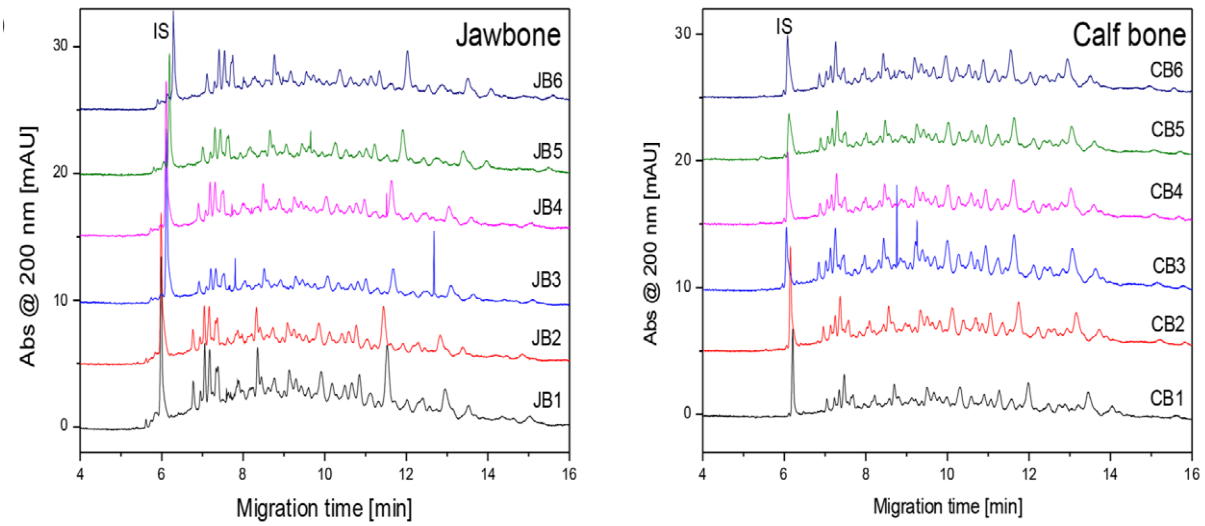
Obrázek 11 CE–UV profily vzorků prasečí čelistní kosti štěpené trypsinem a chymotrypsinem (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)*).*

Následující matematická analýza dat PCA (Principal component analysis) byla schopná obě skupiny spolehlivě rozlišit (viz Obrázek 12)



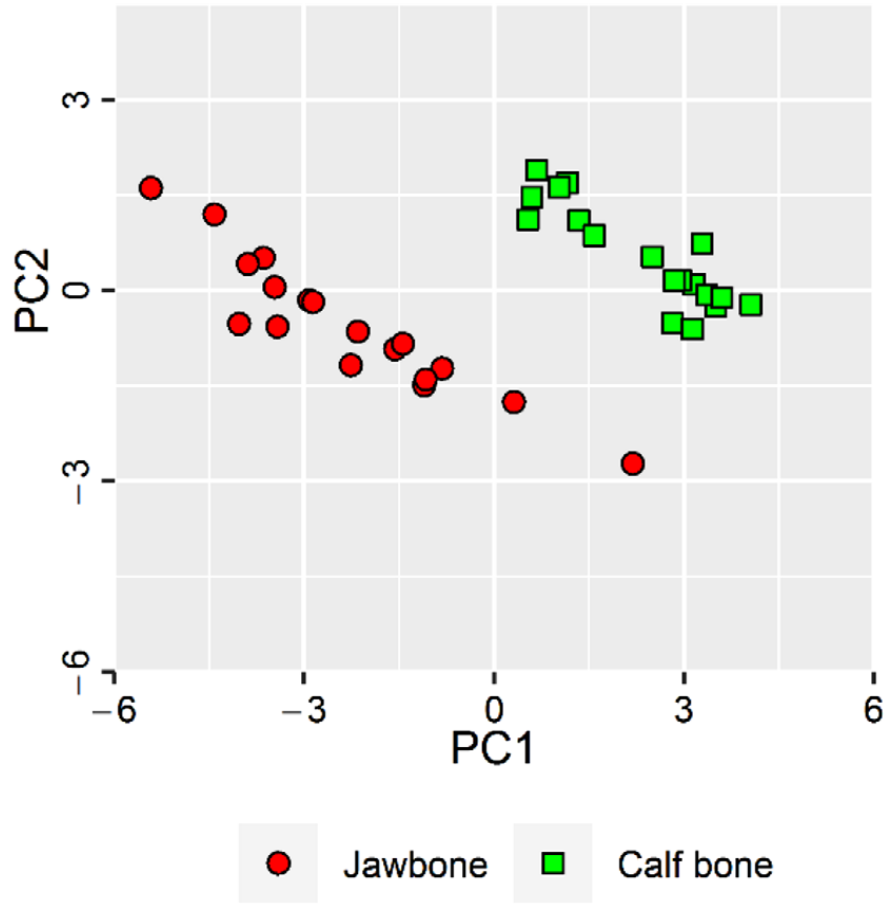
Obrázek 12 Rozlišení vzorků kostních tkání štěpených trypsinem a chymotrypsinem s využitím matematické analýzy PCA pro hodnocení získaných CE-UV profilů (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)*).*

Dále bylo testováno specifické štěpení pouze trypsinem. Určité rozdíly elektroferogramů po specifickém štěpení lze nalézt mezi vzorky prasečích čelistních a lýtkových kostí (viz Obrázek 13).



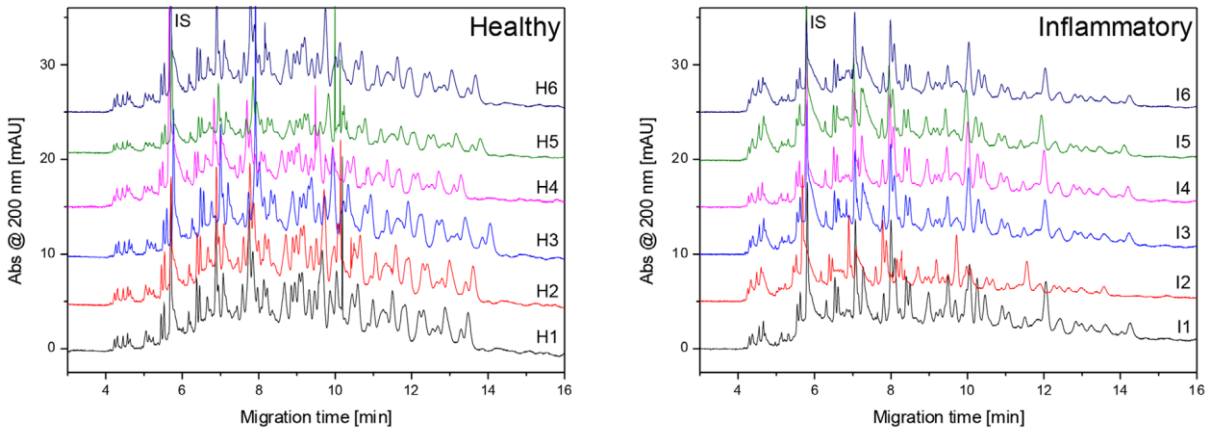
Obrázek 13 CE–UV profily vzorků prasečí čelistní a lýtkové kosti štěpené trypsinem. (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)*).*

Obě skupiny vzorků bylo též možné rozlišit pomocí matematické analýzy PCA získaných dat z CE-UV (viz Obrázek 14).



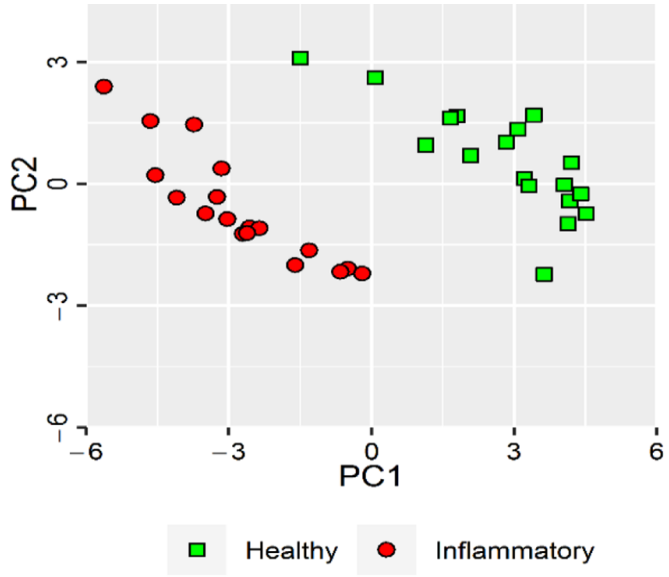
Obrázek 14 Rozlišení vzorků prasečích čelistních a lýtkových s využitím matematické analýzy PCA pro hodnocení získaných CE-UV profilů (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)*).*

Takto ověřená technika byla následně aplikována na vzorky lidských čelistních kostí. Jisté rozdíly v CE-UV profilech byly zjištěny mezi skupinami kostních tkání postižených zánětem a mezi vzorky zdravých kostních tkání (viz Obrázek 15).



Obrázek 15 CE–UV profily vzorků zdravých lidských čelistních kostí (vlevo) a kostních tkání postižených zánětem. (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)*).*

Díky matematické analýze PCA získaných dat bylo možné vzorky zdravých lidských čelistních tkání spolehlivě rozlišit od tkání postižených zánětem (viz Obrázek 16).



Obrázek 16 Rozlišení vzorků zdravých lidských kostních tkání a zánětlivých lidských kostních tkání s využitím matematické analýzy PCA pro hodnocení získaných CE-UV profilů (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)*).*

6. Diskuse metodických postupů a výsledků

6.1 Vývoj techniky s využitím modelových vzorků prasečích čelistních kostních tkání

Nejprve jsem se soustředila na navržení a vývoj velmi jednoduché a rychlé techniky, která by umožnila identifikovat významný počet proteinů obsažených v tkáních čelistních kostí. Tradiční techniky využívající demineralizace jsou totiž časově velmi náročné, a tudíž nevhodné k rutinnímu využití. Proto byl zvolen přístup přímého specifického enzymového štěpení ve zkoumaném vzorku, který sice není obvyklý, ale byl již úspěšně použit pro analýzu proteinů zachycených v barevných vrstvách historických obrazů a později i proteinů obsažených v dalších nerozpustných materiálech, jakými jsou například historické malty nebo osifikované tkáně srdečních chlopní (Hynek et al., 2004; Křížková et al., 2014; Zeman et al., 2013).

Vycházeli jsme z předpokladu, že analogický postup by mohl být použitelný i pro analýzu vzorků tkání čelistních kostí. Kostní tkáně jsou totiž dosti porézní a vycházeli jsme z hypotézy, že relativně malé molekuly trypsinu jimi mohou pronikat až k proteinům, které jsou v nich zachyceny a specificky je štěpit. Uvolněné specifické peptidové fragmenty by pak měly snadno difundovat do roztoku a po purifikaci by mohly být analyzovány například pomocí hmotnostní spektrometrie. Uvedenou hypotézu jsme se rozhodli nejprve ověřit s využitím modelových vzorků, které představovaly prasečí čelistní kosti. Byly použity vzorky jak z dolní, tak horní čelisti, protože jejich vlastnosti, jako je například minerální denzita, jsou rozdílné (Devlin et al., 1998). Bylo tedy třeba mimo jiné otestovat, zda navržený postup bude v obou případech poskytovat srovnatelné výsledky. Rozhodli jsme se zcela rezignovat na zdlouhavé snahy o izolaci intaktních proteinů z kostních tkání a postupovat zcela jinou cestou – tedy cestou přímého štěpení vzorků v kostních tkáních. Protože jsme se zaměřili na proteiny „uvězněné“ v kostních tkáních, rozpustné proteiny jsme považovali za kontaminaci. Proto byl do postupu zařazen preinkubační (promývací) krok, který měl jejich množství výrazně redukovat. Byla otestována preinkubace s využitím celkem tří různých roztoků, u nichž byl pozorován i různý vizuální efekt (viz obr. 1), který spočíval ve snížení intenzity červené barvy. Nejslabší byl po promytí deionizovanou vodou, středně silný při promytí roztokem 8 M močoviny a

nejvýraznější, když byl k preinkubaci použit propan-2-ol. Pokles intenzity červeného zbarvení by mohl souviset s redukcí obsahu hemoglobinu a mohl by tedy naznačovat též redukci kontaminace krevními proteiny. Celkový počet proteinů identifikovaných ve vzorcích prasečích kostních tkání byl nejnižší při promytí deionizovanou vodou, středně vysoký při promytí roztokem 8M močoviny a výrazně nejvyšší po promytí propan-2-olem (viz obrázek 2). Protože nás zajímalo, zda technika přímého enzymového štěpení je schopna identifikovat též proteiny charakteristické pro funkci kostních tkání, byly sledovány i počty těchto proteinů. I v tomto případě bylo nejlepších výsledků dosaženo, pokud byl k preinkubaci použit propan-2-ol. Počet identifikovaných proteinů charakteristických pro kostní tkáně byl přibližně čtyřikrát vyšší než počet identifikovaný po předběžném promytí vodou. Překryvy zobrazené po různých krocích předmytí jsou znázorněny na Vennových diagramech níže (viz obrázek 3), které jednoznačně ukazují výrazný efekt propan-2-olu.

Jedním z možných vysvětlení účinku propan-2-olu by mohl být pozitivní vliv na proteolytické štěpení, které již u některých organických rozpouštědel bylo popsáno. Například byl popsán vliv acetonitrilu a acetonu na štěpení vybraných modelových proteinů (cytochrom c, myoglobin) trypsinem ve volném roztoku (Russell et al., 2001). Na druhou stranu je třeba vzít v úvahu skutečnost, že tato studie uvádí štěpení trypsinem přímo v přítomnosti různých organických rozpouštědel; v naší studii byl v kroku preinkubace použit pouze propan-2-ol s následným specifickým štěpením přímo v kostní tkáni umístěné v roztoku 50 mM NH_4HCO_3 (hydrogenuhličitanu amonného). Dalo by se navrhnout alternativní vysvětlení, že použití propan-2-olu vede ke změnám, které následně usnadní přístup trypsinu k proteinům obsaženým v kostní matrici.

Na základě experimentů s prasečími čelistními kostmi jsme dospěli k závěru, že netradiční přístup přímého štěpení proteinů v kostní tkáni představuje techniku využitelnou pro rychlou a efektivní charakterizaci proteinů ve stomatochirurgii.

6.2 Využití techniky přímého štěpení v kostních tkáních (in-bone digestion) pro charakterizaci vzorků lidských maxilárních a mandibulárních kostí

Technika využívající specifické štěpení trypsinem přímo v kostní tkáni (in-bone digestion) k identifikaci proteinů byla aplikována na vzorky lidských maxilárních i mandibulárních kostí (Michalusová et al., 2020b). Schéma pracovního postupu je znázorněno na obrázku 4 (podrobný popis v publikaci v příloze 2). Celý postup začíná chirurgickým zákrokem, při němž jsou

odoperovány kostní tkáně, které jsou následně podrobeny proteomické analýze. Testovali jsme dvě varianty přípravy vzorku pro štěpení tryptického proteinu v kostech. Protože naším záměrem bylo zachovat postup identifikace přiměřeného množství proteinů v kostní tkáni co nejjednodušší a přímočarý, vyzkoušeli jsme nejprve postup s přímou in-kostní digescí proteinu trypsinem po jednoduchém promytí kosti hydrogenuhličitanem amonným. V této variantě bylo 15 vzorků lidských alveolárních kostí (8 maxilárních, 7 mandibulárních) pouze krátce propláchnuto roztokem hydrogenuhličitanu amonného (viz příloha 2) před jejich specifickým štěpením trypsinem. V druhé variantě jsme zařadili relativně krátkou (30 min.) preinkubaci kostních vzorků v propan-2-olu při 50 °C, jehož použití se osvědčilo při analýzách vzorků prasečích čelistních kostí (Michalusová et al., 2020b). Tento preinkubační krok byl aplikován na 14 vzorků lidských alveolárních kostí (7 maxilárních, 7 mandibulárních). Celkem bylo charakterizováno 29 vzorků alveolární kosti (podrobnosti viz příloha 2). Zařazení preinkubace s propan-2-olem vedlo k identifikaci vyššího množství proteinů (viz Tabulka 1). Velmi pozitivním zjištěním bylo, že se podařilo dosáhnout ještě vyššího množství identifikovaných proteinů než v případě modelových prasečích kostí (Michalusová et al., 2020b). Dalším pozitivem byla identifikace přibližně stejného množství proteinů ve vzorcích maxilárních i mandibulárních kostních tkání, což by vzhledem k různému charakteru těchto kostních tkání, včetně jejich minerální denzity, nemuselo být zdaleka samozřejmé (Devlin et al., 1998). Výše uvedená zjištění navíc ilustrují Vennovy diagramy znázorňující překryvy proteinů identifikovaných v jednotlivých skupinách (viz Obrázek 5).

Dále byla aplikována matematická analýza PLS-D na data získaná pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií pro rozlišení vzorků zdravých čelistních tkání (získaných po chirurgických extrakcích) a rozlišení vzorků patologických tkání (viz Obrázek 6). Bez zařazení preikubačního kroku dosahovalo rozlišení mezi vzorky zdravých a patologickcých tkání 73 %. Při zařazení preinkubačního kroku s propan-2-olem se přesnost se vzájemného rozlišení obou skupin (zdravé tkáně x zanětlivé tkáně) zvýšila na 100 %. Z výše uvedeného se tedy zdá odůvodněné zařazovat preinkubační krok s propan-2-olem, protože vede k úspěšnější charakterizaci vzorků, aniž by představoval významnější komplikaci metody.

Doposud publikované srovnatelné analýzy tvrdých tkání využívaly komplikované a zdlouhavé postupy (Fretwurst et al., 2022; Salmon et al., 2017). Jak vyplývá ze schématu pracovního postupu (viz Obrázek 4) a vyhodnocení získaných dat, je možné velmi rychlou a přímočarou technikou charakterizovat na molekulární úrovni vzorky čelistních kostních tkání

odoperovaných při stomatochirurgických zákrocích. Je to dáno zejména skutečností, že pracovní postup vyvinutý pro analýzy maxilárních a mandibulárních kostních tkání v rámci řešení této disertační práce nevyžaduje izolaci intaktních proteinů.

V analyzovaných vzorcích se navíc podařilo identifikovat celou řadu proteinů hrajících významné biologické a klinické role v kostních tkáních. Větší počty těchto proteinů byly identifikovány ve vzorcích, které byly před specifickým štěpením pre-inkubovány 30 minut v propan-2-olu (viz tabulka 2 v příloze 2). Jejich role jsou popsány v kapitole 1.2.5.

Skupiny proteinů charakteristických pro kostní tkáně ve vzorcích maxilárních a mandibulárních kostí jsou velmi podobné. To není samozřejmé zjištění vzhledem k rozdílnému charakteru maxilárních a mandibulárních kostí, které se vyznačují například rozdílnou minerální denzitou (Devlin et al., 1998). Pro využitelnost metody přímého štěpení (in-bone digestion) ve stomatochirurgii je to ovšem velmi významné a pozitivní zjištění. Pouze několik proteinů souvisejících s kostními tkáněmi, zejména jejich izoforem, bylo nalezeno výhradně buď v maxilární nebo v mandibulární kosti (viz tabulka 2 v příloze 2). Několik typů kolagenů bylo identifikováno s vysokým počtem unikátních peptidových fragmentů. To není překvapivé, protože kolageny jsou hojně zastoupeny v pojivových tkáních.

Z výše uvedeného vyplývá, že technika přímého štěpení proteinů v kostní tkáni („in-bone digestion“) následovaná tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií má potenciál nejen rozlišit mezi patologickou a zdravou tkání, ale může též přinést do stomatochirurgie vhled na molekulární úrovni.

6.3 Charakterizace indukovaných patologických stavů v *in-vitro* modelech lidských kostních tkání

Některé patologické stavy, jako například kostní nádory, nepatří ve stomatochirurgii mezi nejčastěji se vyskytující diagnózy, a tudíž pro jejich studium není k dispozici dostatek vzorků. Kostní modely *in-vitro* umožňují použití lidských buněk k získání relevantnějších výsledků preklinického výzkumu, protože tyto modely mohou simulovat interakce a mechanismy, které obvykle představují zjednodušenou situaci *in vivo* (Sieberath et al., 2020). Již byly vytvořeny různé modely založené na buňkách tvořících kost (osteoblasty) a buňkách resorbujících kost (osteoklasty), aby bylo možné simulovat proces remodelace kosti i související onemocnění (Borciani et al., 2020; Jeon et al., 2016; Lambertini et al., 2021; Mandatori et al., 2021). Protože

in-vitro modely kostních tkání mají podobný charakter jako samotné kostní tkáně, v tom smyslu, že v nich obsažené proteiny jsou "uvězněny" v porézní nerozpustné matrici, předpokládali jsme, že by k jejich charakterizaci mohla být využita technika přímého specifického štěpení trypsinem, která byla vyvinuta na vzorcích prasečích kostí a poté úspěšně využita k charakterizaci vzorků lidských maxilárních i mandibulárních kostních tkání (Hynek et al., 2021; Michalusová et al., 2020b). Schéma použitého pracovního postupu je znázorněno na obrázku 7 (viz Obrázek 7). V *in-vitro* modelových kostních kulturách s indukovanou rakovinou, zánětem i kontrolní kulturou se podařilo identifikovat řádově stovky proteinů, jejichž počty jsou shrnuty v tabulce 2 (viz Tabulka 2), která pro srovnání uvádí i proteiny identifikované ve vzorcích lidských čelistních kostí.

Jak vzorky s indukovanou rakovinou, tak vzorky s indukovaným zánětem, bylo možné pomocí matematické analýzy PLS-DA rozlišit od kontroly (viz Obrázek 8). Navíc bylo možné rozlišit oba indukované patologické stavy (rakovina a zánět) a dokonce všechny tři skupiny studovaných modelových kostních kultur (rakovina, zánět, kontrola), což je znázorněno v obrázku (viz Obrázek 9).

Matematická analýza PLS-DA rovněž identifikovala jako nejdůležitější protein pro rozlišení mezi modelem rakovinných kostních buněk a kontrolním modelem kostních buněk Galektin-1. Hladina galektinu-1 byla v *in vitro* modelových vzorcích rakovinné kosti v průměru přibližně 16krát zvýšena ve srovnání s kontrolními vzorky *in vitro* modelové kultury. Zvýšení exprese galektinu-1 přispívá růstu nádoru, protože může modulovat buněčnou adhezi, migraci, přežití a signalizaci (Elola et al., 2007). Bylo publikováno, že hladina galektinu-1 se výrazně zvýšila u pacientů s duktálním adenokarcinomem pankreatu, karcinomem ovaria a karcinomem plic (Carlini et al., 2014; L. Chen et al., 2015; Martinez-Bosch et al., 2018). Galektin-1 hraje důležitou roli v progresi rakoviny různými mechanismy, jako je schopnost podporovat růst nádoru prostřednictvím regulace hypoxií indukovatelného faktoru-1α a vlivem na migraci nádoru zprostředkováním signální dráhy Akt/mTOR (White et al., 2014; Zhao et al., 2010).

Kromě toho byly v kultuře kostních buněk s indukovanou rakovinou identifikovány níže diskutované proteiny, které naopak nebyly nalezeny v kultuře kontrolní. Jedná se o proliferující buněčný nukleární antigen (PCNA), nekonvenční izoformu myosinu-Id X2 a proteolipidový protein 2 (více viz příloha 3). Jaderný antigen proliferujících buněk (PCNA) je známý jako marker u různých nádorů (Lv et al., 2016). Je využíván v diagnostice a prognóze karcinomu prsu a vyšší úroveň exprese tohoto proteinu také koreluje s kratším obdobím bez onemocnění (Chi et al., 2019; Juríková et al., 2016; Malkas et al., 2006). Exprese PCNA naopak nebyla

detekována ve zdravých ani zánětlivých tkáních, ale významné zvýšení exprese bylo pozorováno u cervikální intraepiteliální neoplazie a invazivního cervikálního spinocelulárního karcinomu (Wang et al., 2004). Dále bylo prokázáno, že vysoce exprimovaná lncRNA 1 působí jako onkogen u karcinomu děložního čípku, který přímo váže PCNA mRNA, aby zesílil její expresi (Yang et al., 2015). Myosin-X (Myo10), nekonvenční myosin, má zásadní funkce v mnoha buněčných procesech, včetně hojení ran, tvorby filopodií, angiogeneze, regulace tvorby a otáčení růstových vrcholů a tvorby invadopodií (Courson & Cheney, 2015). Nedávné studie uvádějí, že Myo10 je up regulován prostřednictvím EGR1-dependentní dráhy u mutantních p53 nádorů prsu v agresivitě a metastázách u pacientek s karcinomem prsu (Arjonen et al., 2014; Cao et al., 2014). Kromě toho proteázou aktivovaný receptor 2 zvýšil expresi MYO10 u kolorektálního karcinomu, aby indukoval migraci buněk, což přispívá k invazi rakovinných buněk na okraji nádoru (X. Zhang et al., 2019). Proteolipidový protein 2 (PLP2) je integrální membránový protein iontového kanálu endoplazmatického retikula (Feng et al., 2020). Další identifikovaný protein PLP2 (proteolipid protein 2) byl pozorován jako onkogen u některých rakovin, jako je například mnohočetný myelom, gliomy, maligní melanom, renální buněčný karcinom a karcinom prsu (Bai et al., 2020; Y.-H. Chen et al., 2018; Ding et al., 2015; Xiao et al., 2020; Zou et al., 2018). Vysoké hladiny PLP2 jsou přítomny u pacientů s progresí onemocnění a špatnou prognózou (Bai et al., 2020; Xiao et al., 2020).

6.4 Přímé štěpení vzorků kostních tkání (in-bone digestion) s koncovkou kapilární elektroforézy s UV detektorem

Výhodou přímého štěpení vzorků v kostních tkáních (in-bone digestion) s koncovkou LC-MS/MS je možnost rychlé identifikace značného množství proteinů. Na druhé straně ještě tandemová hmotnostní spektrometrie nepatří k zcela běžnému vybavení. Proto byla studována i možnost využití jiné koncovky, konkrétně CE-UV (kapilární elektroforézy s UV detektorem). CE-UV je efektivní separační technika využívaná pro analýzu celé řady různých molekul, včetně proteinů a peptidů (Dawod et al., 2017; Kašička, 2018, 2020; Štěpánová & Kašička, 2016). Je využitelná též k separaci jejich komplexních směsí (Latosinska et al., 2019; Shen et al., 2019; Štěpánová & Kašička, 2019; Z. Zhang et al., 2017).

Pracovní postup (viz Obrázek 10) mohl být prováděn dokonce v ještě jednodušším uspořádání, protože místo purifikace vzorků pomocí ZipTip, který byl využíván v případě koncovky LC-

MS/MS, byl zařazen pouze krátký centrifugační krok k odstranění mechanických nečistot (detaily viz příloha 4) (Hynek et al., 2021; Michalusová et al., 2020b). Nejprve bylo otestováno, zda metoda po přímém specifickém štěpení vzorků prasečích kostních tkání trypsinem a chymotrypsinem poskytne různé profily. Podle předpokladu bylo dosaženo výrazně různých profilů CE-UV elektroferogramů (viz Obrázek 11) a následující matematická analýza PCA (viz Obrázek 12) byla schopna obě skupiny spolehlivě rozlišit. Různé CE–UV profily (viz Obrázek 13) byly získány i v případě porovnání vzorků prasečí čelistní a lýtkové kosti štěpené trypsinem. Nelišily se samozřejmě tak výrazně, protože v obou případech se již jednalo pouze o tryptické štěpy kostních tkání, nicméně matematická analýza PCA byla schopna obě skupiny vzorků vzájemně odlišit (viz Obrázek 14). Jen nepatrné rozdíly v elektroferogramech jsou viditelné mezi vzorky zdravých lidských čelistních kostí a kostních tkání postižených zánětem (viz Obrázek 15). Díky matematické analýze PCA získaných dat však bylo možné i tyto skupiny vzájemně odlišit (viz Obrázek 16). Získané výsledky naznačují, že CE-UV by mohla být alespoň v některých případech využívána jako alternativní koncovka následující přímé enzymové štěpení v kostní tkáni („in-bone digestion“). Výhodou této techniky je větší dostupnost a nižší náklady na analýzy, než je tomu v případě hmotnostní spektrometrie. Na druhou stranu, pokud je dostupná jako koncovka LC-MS/MS, je lepší ji upřednostnit, protože tím, že identifikuje jednotlivé proteiny, nabízí více dat k objasnění příčin rozdílného charakteru studovaných vzorků.

7.Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce

Řešení předložené disertační práce vedlo k vyvinutí inovativní techniky umožňující rychlou a efektivní proteomickou charakterizaci kostních tkání odoperovaných při stomatochirurgických zákrocích. Vycházeli jsme z hypotézy, že relativně malé molekuly trypsinu mohou difundovat porézní kostní tkání k proteinům „uvězněným“ v nerozpustné kostní matrici a specificky je štěpit; uvolněné specifické peptidové fragmenty pak difundují do roztoku. Aplikace vhodné koncovky, jakou může být například LC-MS/MS by pak měla vést k identifikaci značného množství proteinů. Technika by tak nevyžadovala komplikovanou a časově náročnou izolaci intaktních proteinů z kostních tkání.

S využitím tkání prasečích čelistních kostí se podařilo výše zmíněnou hypotézu ověřit a nalézt vhodné podmínky, které vedly k identifikaci významného množství proteinů pomocí LC-

MS/MS. Velmi se osvědčilo použití propan-2-olu v preinkubačním kroku (detaily viz příloha 1). Zmíněný přístup využívající přímé štěpení („in-bone digestion“) byl následně využit k proteomické charakterizaci odoperovaných lidských maxilárních i mandibulárních kostních tkání. Umožnil identifikaci značného množství proteinů, včetně těch, které mají značný biologický i klinický význam v kostních tkáních (viz 6.2). Matematická analýza dat získaných pomocí LC-MS/MS pak umožnila rozlišit mezi vzorky zdravých a patologických tkání.

Přístup využívající přímé štěpení byl též úspěšně využit pro charakterizaci *in vitro* modelů lidských kostních tkání s různými indukovanými patologickými stavy. I v tomto případě bylo s využitím koncovky LC-MS/MS identifikováno značné množství proteinů. Matematická analýza získaných dat následně umožnila rozlišit mezi *in vitro* modely kostních tkání s indukovanou rakovinou a kontrolou, s indukovaným zánětem a kontrolou. Rozlišit bylo možné též vzájemně oba zmíněné patologické stavy.

Byla též ověřena možnost využití alternativní koncovky – CE-UV pro separaci specifických peptidových fragmentů uvolněných přímým štěpením vzorků kostních tkání („in-bone digestion“). Pomocí matematické analýzy získaných elektroferogramů bylo možné rozlišit mimo jiné též vzorky zánětlivých a zdravých tkání lidských kostí.

Závěrem lze konstatovat, že nové přístupy k proteomické charakterizaci kostních tkání ve stomatochirurgii založené na přímém štěpení mají potenciál přinést do této oblasti vhled na molekulární úrovni v měřítku podstatně větším, než bylo doposud běžné. Mohly by tak představovat příspěvek k hlubšímu porozumění fyziologickým i patologickým procesům v čelistních kostech. Navíc lze uvažovat o tom, že takto jednoduchá a rychlá analýza kostních tkání by mohla představovat doplněk nebo dokonce alternativu k jejich tradičnímu histologickému hodnocení. Snadný a rutinně zvládnutelný postup zakončený poloautomatickými postupy jako například LC-MS/MS s následnou matematickou analýzou získaných dat nevyžadují zkušeného histologa a značně omezují možnost subjektivní interpretace.

8. Seznam použité literatury

Abdallah, B. M., Alzahrani, A. M., & Kassem, M. (2018). Secreted Clusterin protein inhibits osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by suppressing ERK1/2 signaling pathway. *Bone*, *110*, 221–229. https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.018

Aggelidakis, J., Berdiaki, A., Nikitovic, D., Papoutsidakis, A., Papachristou, D. J., Tsatsakis, A. M., & Tzanakakis, G. N. (2018). Biglycan Regulates MG63 Osteosarcoma Cell Growth Through a LPR6/β-Catenin/IGFR-IR Signaling Axis. *Frontiers in Oncology*, *8*, 470. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00470

Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, *19*(11), 1853–1861. https://doi.org/10.1002/elps.1150191103

Arjonen, A., Kaukonen, R., Mattila, E., Rouhi, P., Högnäs, G., Sihto, H., Miller, B. W., Morton, J. P., Bucher, E., Taimen, P., Virtakoivu, R., Cao, Y., Sansom, O. J., Joensuu, H., & Ivaska, J. (2014). Mutant p53–associated myosin-X upregulation promotes breast cancer invasion and metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(3), 1069–1082. https://doi.org/10.1172/JCI67280

Bai, H., Zhu, Y., Xu, P., & Chen, B. (2020). PLP2 Expression as a Prognostic and Therapeutic Indicator in High-Risk Multiple Myeloma. *BioMed Research International*, *2020*, 4286101. https://doi.org/10.1155/2020/4286101

Baliban, R. C., Sakellari, D., Li, Z., DiMaggio, P. A., Garcia, B. A., & Floudas, C. A. (2012). Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. *Journal of Clinical Periodontology*, *39*(3), 203–212. https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01805.x

Bancroft, J., & Stevens, A. (1996). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone.

Bassim, C. W., Ambatipudi, K. S., Mays, J. W., Edwards, D. A., Swatkoski, S., Fassil, H., Baird, K., Gucek, M., Melvin, J. E., & Pavletic, S. Z. (2012). Quantitative salivary proteomic differences in oral chronic graft-versus-host disease. *Journal of Clinical Immunology*, *32*(6), 1390–1399. https://doi.org/10.1007/s10875-012-9738-4

Bentmann, A., Kawelke, N., Moss, D., Zentgraf, H., Bala, Y., Berger, I., Gasser, J. A., & Nakchbandi, I. A. (2010). Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *25*(4), 706–715. https://doi.org/10.1359/jbmr.091011

Bilder, A., Rachmiel, A., Ginini, J. G., Capucha, T., Ohayon, C., Weitman, E., & Emodi, O. (2023). A Comparative Study of Mucosal Wound Healing after Excision with a Scalpel, Diode Laser, or CO(2) Laser. *Plastic and Reconstructive Surgery. Global Open*, *11*(8), e5150. https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000005150

Blackstock, W. P., & Weir, M. P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*, *17*(3), 121–127. https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01245-1

Borchers, C., Peter, J. F., Hall, M. C., Kunkel, T. A., & Tomer, K. B. (2000). Identification of in-gel digested proteins by complementary peptide mass fingerprinting and tandem mass spectrometry data obtained on an electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, *72*(6), 1163–1168. https://doi.org/10.1021/ac990937m

Borciani, G., Montalbano, G., Baldini, N., Cerqueni, G., Vitale-Brovarone, C., & Ciapetti, G. (2020). Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches. *Acta Biomaterialia*, *108*, 22–45. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.043

Calvo Guirado, J. L., Ramírez Fernández, M. P., Negri, B., Delgado Ruiz, R. A., Maté Sánchez de-Val, J. E., & Gómez-Moreno, G. (2013). Experimental model of bone response to collagenized xenografts of porcine origin (OsteoBiol® mp3): a radiological and histomorphometric study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, *15*(1), 143–151.

https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2011.00337.x

Campisi, G., Di Fede, O., Roccia, P., Di Nicola, F., Falaschini, S., & Muzio, L. Lo. (2006). Saliva: Its Value as a Biological Matrix and Current Methods of Sampling. *European Journal of Inflammation*, *4*(1), 11–19. https://doi.org/10.1177/1721727X0600400102

Cao, R., Chen, J., Zhang, X., Zhai, Y., Qing, X., Xing, W., Zhang, L., Malik, Y. S., Yu, H., & Zhu, X. (2014). Elevated expression of myosin X in tumours contributes to breast cancer aggressiveness and metastasis. *British Journal of Cancer*, *111*(3), 539–550. https://doi.org/10.1038/bjc.2014.298

Carlini, M. J., Roitman, P., Nuñez, M., Pallotta, M. G., Boggio, G., Smith, D., Salatino, M., Joffé, E. D. B. de K., Rabinovich, G. A., & Puricelli, L. I. (2014). Clinical relevance of galectin-1 expression in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *84*(1), 73–78. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.01.016

Carneiro, L. G., Nouh, H., & Salih, E. (2014). Quantitative gingival crevicular fluid proteome in health and periodontal disease using stable isotope chemistries and mass spectrometry. *Journal of Clinical Periodontology*, *41*(8), 733–747. https://doi.org/10.1111/jcpe.12262

Carneiro, L. G., Venuleo, C., Oppenheim, F. G., & Salih, E. (2012). Proteome data set of human gingival crevicular fluid from healthy periodontium sites by multidimensional protein separation and mass spectrometry. *Journal of Periodontal Research*, *47*(2), 248–262. https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01429.x

Carson, F. L., & Hladik, C. (2009). *Histotechnology: A Self-instructional Text*. American Society for Clinical Pathology Press. https://books.google.lu/books?id=68RPPgAACAAJ

Chan, J. K. C. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International Journal of Surgical Pathology*, *22*(1), 12–32. https://doi.org/10.1177/1066896913517939

Chen, L., Yao, Y., Sun, L., Zhou, J., Liu, J., Wang, J., Li, J., & Tang, J. (2015). Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *Journal of Ovarian Research*, *8*, 78. https://doi.org/10.1186/s13048-015-0206-7

Chen, Y.-H., Hueng, D.-Y., & Tsai, W.-C. (2018). Proteolipid Protein 2 Overexpression Indicates Aggressive Tumor Behavior and Adverse Prognosis in Human Gliomas. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11). https://doi.org/10.3390/ijms19113353

Chi, J.-R., Yu, Z.-H., Liu, B.-W., Zhang, D., Ge, J., Yu, Y., & Cao, X.-C. (2019). SNHG5 Promotes Breast Cancer Proliferation by Sponging the miR-154-5p/PCNA Axis. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *17*, 138–149. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.05.013

Choube, A., Astekar, M., Choube, A., Sapra, G., Agarwal, A., & Rana, A. (2018). Comparison of decalcifying agents and techniques for human dental tissues. *Biotechnic & Histochemistry : Official Publication of the Biological Stain Commission*, *93*(2), 99–108. https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1396095

Contié, S., Voorzanger-Rousselot, N., Litvin, J., Clézardin, P., & Garnero, P. (2011). Increased expression and serum levels of the stromal cell-secreted protein periostin in breast cancer bone metastases. *International Journal of Cancer*, *128*(2), 352–360. https://doi.org/10.1002/ijc.25591

Courson, D. S., & Cheney, R. E. (2015). Myosin-X and disease. *Experimental Cell Research*, *334*(1), 10–15. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.03.014

Dawod, M., Arvin, N. E., & Kennedy, R. T. (2017). Recent advances in protein analysis by capillary and microchip electrophoresis. *The Analyst*, *142*(11), 1847–1866. https://doi.org/10.1039/c7an00198c

Devlin, H., Horner, K., & Ledgerton, D. (1998). A comparison of maxillary and mandibular bone mineral densities. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *79*(3), 323–327. https://doi.org/10.1016/s0022-3913(98)70245-8

Di Lullo, G. A., Sweeney, S. M., Korkko, J., Ala-Kokko, L., & San Antonio, J. D. (2002). Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(6), 4223–4231. https://doi.org/10.1074/jbc.M110709200

Díaz-Sánchez, R.-M., Yáñez-Vico, R.-M., Fernández-Olavarría, A., Mosquera-Pérez, R., Iglesias-Linares, A., & Torres-

Lagares, D. (2015). Current Approaches of Bone Morphogenetic Proteins in Dentistry. *The Journal of Oral Implantology*, *41*(3), 337–342. https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-13-00012

Ding, Z., Jian, S., Peng, X., Liu, Y., Wang, J., Zheng, L., Ou, C., Wang, Y., Zeng, W., & Zhou, M. (2015). Loss of MiR-664 Expression Enhances Cutaneous Malignant Melanoma Proliferation by Upregulating PLP2. *Medicine*, *94*(33), e1327. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001327

Dolci, L. S., Panzavolta, S., Torricelli, P., Albertini, B., Sicuro, L., Fini, M., Bigi, A., & Passerini, N. (2019). Modulation of Alendronate release from a calcium phosphate bone cement: An in vitro osteoblast-osteoclast co-culture study. *International Journal of Pharmaceutics*, *554*, 245–255. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.023

Dongré, A. R., Jones, J. L., Somogyi, Á., & Wysocki, V. H. (1996). Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model. *Journal of the American Chemical Society*, *118*(35), 8365–8374. https://doi.org/10.1021/ja9542193

Du, J., & Li, M. (2017). Functions of Periostin in dental tissues and its role in periodontal tissues' regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *74*(23), 4279–4286. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2645-3

Eckerskorn, C., & Lottspeich, F. (1989). Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. *Chromatographia*, *28*, 92–94. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:56078167

Eckhard, U., Marino, G., Abbey, S. R., Tharmarajah, G., Matthew, I., & Overall, C. M. (2015). The Human Dental Pulp Proteome and N-Terminome: Levering the Unexplored Potential of Semitryptic Peptides Enriched by TAILS to Identify Missing Proteins in the Human Proteome Project in Underexplored Tissues. *Journal of Proteome Research*, *14*(9), 3568–3582. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00579

Elola, M. T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M. F., Vasta, G. R., & Rabinovich, G. A. (2007). Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *64*(13), 1679–1700. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7044-8

Fan, Y., Perez, K., & Dym, H. (2020). Clinical Uses of Platelet-Rich Fibrin in Oral and Maxillofacial Surgery. *Dental Clinics of North America*, *64*(2), 291–303. https://doi.org/10.1016/j.cden.2019.12.012

Feng, Z., Zhou, W., Wang, J., Qi, Q., Han, M., Kong, Y., Hu, Y., Zhang, Y., Chen, A., Huang, B., Chen, A., Zhang, D., Li, W., Zhang, Q., Bjerkvig, R., Wang, J., Thorsen, F., & Li, X. (2020). Reduced expression of proteolipid protein 2 increases ER stress-induced apoptosis and autophagy in glioblastoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *24*(5), 2847–2856. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcmm.14840

Fischer, C. R., Mikami, M., Minematsu, H., Nizami, S., Goo Lee, H., Stamer, D., Patel, N., Yu Soung, D., Back, J.-H., Song, L., Drissi, H., & Lee, F. Y. (2017). Calreticulin inhibits inflammation-induced osteoclastogenesis and bone resorption. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, *35*(12), 2658–2666. https://doi.org/10.1002/jor.23587

Foot, N. C. (1933). The Masson Trichrome Staining Methods in Routine Laboratory Use. *Stain Technology*, *8*(3), 101–110. https://doi.org/10.3109/10520293309116112

Forte, L., Torricelli, P., Boanini, E., Gazzano, M., Rubini, K., Fini, M., & Bigi, A. (2016). Antioxidant and bone repair properties of quercetin-functionalized hydroxyapatite: An in vitro osteoblast-osteoclast-endothelial cell co-culture study. *Acta Biomaterialia*, *32*, 298–308. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.013

Foster, B. L., Ao, M., Salmon, C. R., Chavez, M. B., Kolli, T. N., Tran, A. B., Chu, E. Y., Kantovitz, K. R., Yadav, M., Narisawa, S., Millán, J. L., Nociti, F. H. J., & Somerman, M. J. (2018). Osteopontin regulates dentin and alveolar bone development and mineralization. *Bone*, *107*, 196–207. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.12.004

Fretwurst, T., Tritschler, I., Rothweiler, R., Nahles, S., Altmann, B., Schilling, O., & Nelson, K. (2022). Proteomic profiling of human bone from different anatomical sites - A pilot study. *Proteomics. Clinical Applications*, *16*(5), e2100049. https://doi.org/10.1002/prca.202100049

Genge, B. R., Wu, L. N., & Wuthier, R. E. (1990). Differential fractionation of matrix vesicle proteins. Further characterization

of the acidic phospholipid-dependent Ca2(+)-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(8), 4703–4710. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39619-X

Goldberg, M., Ono, M., Septier, D., Bonnefoix, M., Kilts, T. M., Bi, Y., Embree, M., Ameye, L., & Young, M. F. (2009). Fibromodulin-deficient mice reveal dual functions for fibromodulin in regulating dental tissue and alveolar bone formation. *Cells, Tissues, Organs*, *189*(1–4), 198–202. https://doi.org/10.1159/000151370

Granvogl, B., Gruber, P., & Eichacker, L. A. (2007). Standardisation of rapid in-gel digestion by mass spectrometry. *Proteomics*, *7*(5), 642–654. https://doi.org/10.1002/pmic.200600607

Gupta, S., Jawanda, M. K., Sm, M., & Bharti, A. (2014). Qualitative histological evaluation of hard and soft tissue components of human permanent teeth using various decalcifying agents - a comparative study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, *8*(9), ZC69-72. https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/10195.4874

Hayden, R. S., Vollrath, M., & Kaplan, D. L. (2014). Effects of clodronate and alendronate on osteoclast and osteoblast co-cultures on silk-hydroxyapatite films. *Acta Biomaterialia*, *10*(1), 486–493. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.028

Hellman, U., Wernstedt, C., Góñez, J., & Heldin, C. H. (1995). Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Analytical Biochemistry*, *224*(1), 451–455. https://doi.org/10.1006/abio.1995.1070

Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C., & Chait, B. T. (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry*, *63*(24), 1193A-1203A. https://doi.org/10.1021/ac00024a002

Hrdlickova Kuckova, S., Rambouskova, G., Hynek, R., Cejnar, P., Oltrogge, D., & Fuchs, R. (2015). Evaluation of mass spectrometric data using principal component analysis for determination of the effects of organic lakes on protein binder identification. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, *50*(11), 1270–1278. https://doi.org/10.1002/jms.3699

Huang, Y., Triscari, J. M., Tseng, G. C., Pasa-Tolic, L., Lipton, M. S., Smith, R. D., & Wysocki, V. H. (2005). Statistical characterization of the charge state and residue dependence of low-energy CID peptide dissociation patterns. *Analytical Chemistry*, *77*(18), 5800–5813. https://doi.org/10.1021/ac0480949

Hubbard, M. J., & Kon, J. C. (2002). Proteomic analysis of dental tissues. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *771*(1–2), 211–220. https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00042-9

Hynek, R., Kasicka, V., Kucerová, Z., & Kás, J. (1997). Fast detection of phosphorylation of human pepsinogen A, human pepsinogen C and swine pepsinogen using a combination of reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for peptide mapping. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, *688*(2), 213–220.

Hynek, R., Kuckova, S., Hradilova, J., & Kodicek, M. (2004). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a tool for fast identification of protein binders in color layers of paintings. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, *18*(17), 1896–1900. https://doi.org/10.1002/rcm.1570

Hynek, R., Michalus, I., Cejnar, P., Šantrůček, J., Seidlová, S., Kučková, Š., Sázelová, P., & Kašička, V. (2021). In-bone protein digestion followed by LC-MS/MS peptide analysis as a new way towards the routine proteomic characterization of human maxillary and mandibular bone tissue in oral surgery. *Electrophoresis*, *42*(23), 2552–2562. https://doi.org/10.1002/elps.202100211

Iezzi, G., Piattelli, A., Giuliani, A., Mangano, C., Barone, A., Manzon, L., Degidi, M., Scarano, A., Filippone, A., & Perrotti, V. (2017). Molecular, Cellular and Pharmaceutical Aspects of Bone Grafting Materials and Membranes During Maxillary Sinus-lift Procedures. Part 2: Detailed Characteristics of the Materials. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *18*(1), 33–44. https://doi.org/10.2174/1389201017666161202104002

Ikegawa, S. (2008). Expression, regulation and function of asporin, a susceptibility gene in common bone and joint diseases. *Current Medicinal Chemistry*, *15*(7), 724–728. https://doi.org/10.2174/092986708783885237

IUPAC. (1997). Compendium of Chemical Terminology. In *Blackwell Scientific Publications* (2nd ed. (t). https://doi.org/https://doi.org/10.1351/goldbook

Jacobs, R., Salmon, B., Codari, M., Hassan, B., & Bornstein, M. M. (2018). Cone beam computed tomography in implant dentistry: recommendations for clinical use. *BMC Oral Health*, *18*(1), 88. https://doi.org/10.1186/s12903-018-0523-5

James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *30*(4), 279–331. https://doi.org/10.1017/s0033583597003399

Jenö, P., Mini, T., Moes, S., Hintermann, E., & Horst, M. (1995). Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, *224*(1), 75–82. https://doi.org/10.1006/abio.1995.1010

Jeon, O. H., Panicker, L. M., Lu, Q., Chae, J. J., Feldman, R. A., & Elisseeff, J. H. (2016). Human iPSC-derived osteoblasts and osteoclasts together promote bone regeneration in 3D biomaterials. *Scientific Reports*, *6*, 26761. https://doi.org/10.1038/srep26761

Jiang, Z.-H., Peng, J., Yang, H.-L., Fu, X.-L., Wang, J.-Z., Liu, L., Jiang, J.-N., Tan, Y.-F., & Ge, Z.-J. (2017). Upregulation and biological function of transmembrane protein 119 in osteosarcoma. *Experimental & Molecular Medicine*, *49*(5), e329. https://doi.org/10.1038/emm.2017.41

Junqueira, L. C., Kelley, R. O., Carneiro, J., & Jel\'\inek, R. (1997). *Základy histologie*. H+H. https://books.google.lu/books?id=hLISAAAACAAJ

Juríková, M., Danihel, Ľ., Polák, Š., & Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochemica*, *118*(5), 544–552. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002

Kaasalainen, T., Ekholm, M., Siiskonen, T., & Kortesniemi, M. (2021). Dental cone beam CT: An updated review. *Physica Medica : PM : An International Journal Devoted to the Applications of Physics to Medicine and Biology : Official Journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*, *88*, 193–217. https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2021.07.007

Kašička, V. (2018). Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2015-mid 2017). *Electrophoresis*, *39*(1), 209–234. https://doi.org/10.1002/elps.201700295

Kašička, V. (2020). Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2017-mid 2019). *Electrophoresis*, *41*(1–2), 10–35. https://doi.org/10.1002/elps.201900269

Khangura, A. K., Gupta, S., Gulati, A., & Singh, S. (2021). Tooth decalcification using different decalcifying agents - A comparative study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, *25*(3), 463–469. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_203_21

King, G. N., & Cochran, D. L. (2002). Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *Journal of Periodontology*, *73*(8), 925–936. https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.8.925

Kinney, J. S., Morelli, T., Oh, M., Braun, T. M., Ramseier, C. A., Sugai, J. V, & Giannobile, W. V. (2014). Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *Journal of Clinical Periodontology*, *41*(2), 113–120. https://doi.org/10.1111/jcpe.12194

Kirpalani, T., & Dym, H. (2020). Role of Piezo Surgery and Lasers in the Oral Surgery Office. *Dental Clinics of North America*, *64*(2), 351–363. https://doi.org/10.1016/j.cden.2019.12.007

Krásný, L., Pompach, P., Strnadová, M., Hynek, R., Vališ, K., Havlíček, V., Novák, P., & Volný, M. (2015). High-throughput workflow for identification of phosphorylated peptides by LC-MALDI-TOF/TOF-MS coupled to in situ enrichment on MALDI plates functionalized by ion landing. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, *50*(6), 802–811. https://doi.org/10.1002/jms.3586

Křížková, M., Kuckova, S., Santrucek, J., & Hynek, R. (2014). Peptide mass mapping as an effective tool for historical mortar analysis. *Construction and Building Materials*, *50*, 219–225. https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2013.09.059

Kuckova, S., Smirnova, T. A., Straka, D., Meledina, A., Santrucek, J., Humpolakova, K., Hoskova, M., Cejnar, P., & Hynek, R. (2023). Proteotypic peptides of hairs for the identification of common European domestic and wild animal species revealed by in-sample protein digestion and mass spectrometry analysis. *Journal of Separation Science*, *46*(13), e2300064. https://doi.org/10.1002/jssc.202300064

Lambertini, E., Penolazzi, L., Pandolfi, A., Mandatori, D., Sollazzo, V., & Piva, R. (2021). Human osteoclasts/osteoblasts 3D

dynamic co-culture system to study the beneficial effects of glucosamine on bone microenvironment. *International Journal of Molecular Medicine*, *47*(4). https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4890

Lanning, B., Webber, J., Uysal-Onganer, P., Jiang, W. G., Clayton, A., & Dart, D. A. (2021). Prostate Cancer Cell Extracellular Vesicles Increase Mineralisation of Bone Osteoblast Precursor Cells in an In Vitro Model. *Biology*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/biology10040318

Latosinska, A., Siwy, J., Mischak, H., & Frantzi, M. (2019). Peptidomics and proteomics based on CE-MS as a robust tool in clinical application: The past, the present, and the future. *Electrophoresis*, *40*(18–19), 2294–2308. https://doi.org/10.1002/elps.201900091

Lee, N. J., Ali, N., Zhang, L., Qi, Y., Clarke, I., Enriquez, R. F., Brzozowska, M., Lee, I. C., Rogers, M. J., Laybutt, D. R., Center, J. R., Baldock, P. A., & Herzog, H. (2018). Osteoglycin, a novel coordinator of bone and glucose homeostasis. *Molecular Metabolism*, *13*, 30–44. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.004

Levine, M. (2011). Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. *International Journal of Dentistry*, *2011*, 953412. https://doi.org/10.1155/2011/953412

Lindert, U., Weis, M. A., Rai, J., Seeliger, F., Hausser, I., Leeb, T., Eyre, D., Rohrbach, M., & Giunta, C. (2015). Molecular Consequences of the SERPINH1/HSP47 Mutation in the Dachshund Natural Model of Osteogenesis Imperfecta. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(29), 17679–17689. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661025

Lv, Q., Zhang, J., Yi, Y., Huang, Y., Wang, Y., Wang, Y., & Zhang, W. (2016). Proliferating Cell Nuclear Antigen Has an Association with Prognosis and Risks Factors of Cancer Patients: a Systematic Review. *Molecular Neurobiology*, *53*(9), 6209–6217. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9525-3

Malaval, L., Wade-Guéye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J.-P., Burt-Pichat, B., Duboeuf, F., Boivin, G., Jurdic, P., Lafage-Proust, M.-H., Amédée, J., Vico, L., Rossant, J., & Aubin, J. E. (2008). Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(5), 1145–1153. https://doi.org/10.1084/jem.20071294

Malkas, L. H., Herbert, B. S., Abdel-Aziz, W., Dobrolecki, L. E., Liu, Y., Agarwal, B., Hoelz, D., Badve, S., Schnaper, L., Arnold, R. J., Mechref, Y., Novotny, M. V, Loehrer, P., Goulet, R. J., & Hickey, R. J. (2006). A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(51), 19472–19477. https://doi.org/10.1073/pnas.0604614103

Mandatori, D., Penolazzi, L., Pelusi, L., Lambertini, E., Michelucci, F., Porreca, A., Cerritelli, P., Pipino, C., Di Iorio, A., Bruni, D., Di Nicola, M., Buda, R., Piva, R., & Pandolfi, A. (2021). Three-Dimensional Co-Culture System of Human Osteoblasts and Osteoclast Precursors from Osteoporotic Patients as an Innovative Model to Study the Role of Nutrients: Focus on Vitamin K2. *Nutrients*, *13*(8). https://doi.org/10.3390/nu13082823

Martinez-Bosch, N., Barranco, L. E., Orozco, C. A., Moreno, M., Visa, L., Iglesias, M., Oldfield, L., Neoptolemos, J. P., Greenhalf, W., Earl, J., Carrato, A., Costello, E., & Navarro, P. (2018). Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: potential use as biomarker. *Oncotarget*, *9*(68), 32984–32996. https://doi.org/10.18632/oncotarget.26034

Mawhinney, W. H., Richardson, E., & Malcolm, A. J. (1984). Control of rapid nitric acid decalcification. *Journal of Clinical Pathology*, *37*(12), 1409–1413. https://doi.org/10.1136/jcp.37.12.1409

McLachlan, J. L., Smith, A. J., Bujalska, I. J., & Cooper, P. R. (2005). Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1741*(3), 271–281. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.03.007

Mercatali, L., Spadazzi, C., Miserocchi, G., Liverani, C., De Vita, A., Bongiovanni, A., Recine, F., Amadori, D., & Ibrahim, T. (2017). Development of a Human Preclinical Model of Osteoclastogenesis from Peripheral Blood Monocytes Co-cultured with Breast Cancer Cell Lines. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *127*. https://doi.org/10.3791/56311

Michalus, I., Van Nguyen, T., Viktorová, J., Cejnar, P., Šantrůček, J., Kučková, Š., Sázelová, P., Kašička, V., & Hynek, R. (2022). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of peptides separated from the insoluble matrix by

in-sample tryptic protein digestion for rapid discrimination of various induced pathological states of human bone models in oral surgery. *Journal of Separation Science*, *45*(24), 4388–4396. https://doi.org/10.1002/jssc.202200694

Michalusová, I., Sázelová, P., Cejnar, P., Kučková, Š., Hynek, R., & Kašička, V. (2020a). Capillary electrophoretic profiling of in-bone tryptic digests of proteins as a potential tool for the detection of inflammatory states in oral surgery. *Journal of Separation Science*, *43*(20), 3949–3959. https://doi.org/10.1002/jssc.202000718

Michalusová, I., Trubacova, D., Cejnar, P., Kuckova, S., Santrucek, J., & Hynek, R. (2020b). Direct tryptic cleavage in bone tissue followed by LC-MS/MS as a first step towards routine characterization of proteins embedded in alveolar bones. *International Journal of Mass Spectrometry*, *455*, 116375. https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375

Mizuno, M., Fujisawa, R., & Kuboki, Y. (1996). Bone chondroadherin promotes attachment of osteoblastic cells to solid-state substrates and shows affinity to collagen. *Calcified Tissue International*, *59*(3), 163–167. https://doi.org/10.1007/s002239900103

Mochida, Y., Parisuthiman, D., Pornprasertsuk-Damrongsri, S., Atsawasuwan, P., Sricholpech, M., Boskey, A. L., & Yamauchi, M. (2009). Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, *28*(1), 44–52. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.11.003

Molnár, I., & Horváth, C. (1976). Reverse-phase chromatography of polar biological substances: separation of catechol compounds by high-performance liquid chromatography. *Clinical Chemistry*, *22*(9), 1497–1502. https://doi.org/10.1093/clinchem/22.9.1497

Morgan, J. M., Wong, A., Yellowley, C. E., & Genetos, D. C. (2011). Regulation of tenascin expression in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(11), 3354–3363. https://doi.org/10.1002/jcb.23265

Morris, A. H., & Kyriakides, T. R. (2014). Matricellular proteins and biomaterials. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, *37*, 183–191. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.03.002

Moser, S. C., & van der Eerden, B. C. J. (2018). Osteocalcin-A Versatile Bone-Derived Hormone. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 794. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00794

Neugebauer, J., Heilig, J., Hosseinibarkooie, S., Ross, B. C., Mendoza-Ferreira, N., Nolte, F., Peters, M., Hölker, I., Hupperich, K., Tschanz, T., Grysko, V., Zaucke, F., Niehoff, A., & Wirth, B. (2018). Plastin 3 influences bone homeostasis through regulation of osteoclast activity. *Human Molecular Genetics*, *27*(24), 4249–4262. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy318

Ngo, L. H., Darby, I. B., Veith, P. D., Locke, A. G., & Reynolds, E. C. (2013). Mass spectrometric analysis of gingival crevicular fluid biomarkers can predict periodontal disease progression. *Journal of Periodontal Research*, *48*(3), 331–341. https://doi.org/10.1111/jre.12012

Ninomiya, K., Miyamoto, T., Imai, J., Fujita, N., Suzuki, T., Iwasaki, R., Yagi, M., Watanabe, S., Toyama, Y., & Suda, T. (2007). Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *362*(2), 460–466. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.193

Nogueira, D. G. de M., Leão, J. C., Sales, P. H. da H., Silva, P. G. de B., & Gomes, A. C. A. (2023). Piezoelectric Surgery Is Effective in Reducing Pain, Swelling, and Trismus After Removal of Impacted Lower Third Molars: A Meta-Analysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery : Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, *81*(4), 483–498. https://doi.org/10.1016/j.joms.2022.10.020

Pääkkönen, V., Ohlmeier, S., Bergmann, U., Larmas, M., Salo, T., & Tjäderhane, L. (2005). Analysis of gene and protein expression in healthy and carious tooth pulp with cDNA microarray and two-dimensional gel electrophoresis. *European Journal of Oral Sciences*, *113*(5), 369–379. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2005.00237.x

Pagliani, L., Andersson, P., Lanza, M., Nappo, A., Verrocchi, D., Volpe, S., & Sennerby, L. (2012). A collagenated porcine bone substitute for augmentation at Neoss implant sites: a prospective 1-year multicenter case series study with histology. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, *14*(5), 746–758. https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2010.00314.x

Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 20), 3861–3863. https://doi.org/10.1242/jcs.00059

Patino, M. G., Neiders, M. E., Andreana, S., Noble, B., & Cohen, R. E. (2002). Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. *The Journal of Oral Implantology*, *28*(5), 220–225. https://doi.org/10.1563/1548-1336(2002)028<0220:CAAIMI>2.3.CO;2

Pick, R. M., & Colvard, M. D. (1993). Current status of lasers in soft tissue dental surgery. *Journal of Periodontology*, *64*(7), 589–602. https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.7.589

Prasad, P., & Donoghue, M. (2013). A comparative study of various decalcification techniques. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, *24*(3), 302–308. https://doi.org/10.4103/0970-9290.117991

Raouf, A., Ganss, B., McMahon, C., Vary, C., Roughley, P. J., & Seth, A. (2002). Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology*, *21*(4), 361–367. https://doi.org/10.1016/s0945-053x(02)00027-6

Reichenberg, E., Redlich, M., Cancemi, P., Zaks, B., Pitaru, S., Fontana, S., Pucci-Minafra, I., & Palmon, A. (2005). Proteomic analysis of protein components in periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontology*, *76*(10), 1645–1653. https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.10.1645

Rezaei Chianeh, Y., & Prabhu, K. (2014). Biochemical markers in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4*, S33–S40. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60412-6

Robey, P. G., Young, M. F., Fisher, L. W., & McClain, T. D. (1989). Thrombospondin is an osteoblast-derived component of mineralized extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, *108*(2), 719–727. https://doi.org/10.1083/jcb.108.2.719

Rody, W. J. J., Holliday, L. S., McHugh, K. P., Wallet, S. M., Spicer, V., & Krokhin, O. (2014). Mass spectrometry analysis of gingival crevicular fluid in the presence of external root resorption. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics : Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, *145*(6), 787–798. https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2014.03.013

Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., & Ferrara, P. (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, *203*(1), 173–179. https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90061-b

Russell, W. K., Park, Z. Y., & Russell, D. H. (2001). Proteolysis in mixed organic-aqueous solvent systems: applications for peptide mass mapping using mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *73*(11), 2682–2685. https://doi.org/10.1021/ac001332p

Sadeghipour, A., & Babaheidarian, P. (2019). Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1897*, 253–268. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_22

Salmon, C. R., Giorgetti, A. P. O., Paes Leme, A. F., Domingues, R. R., Kolli, T. N., Foster, B. L., & Nociti, F. H. J. (2017). Microproteome of dentoalveolar tissues. *Bone*, *101*, 219–229. https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.05.014

Salmon, C. R., Tomazela, D. M., Ruiz, K. G. S., Foster, B. L., Paes Leme, A. F., Sallum, E. A., Somerman, M. J., & Nociti, F. H. J. (2013). Proteomic analysis of human dental cementum and alveolar bone. *Journal of Proteomics*, *91*, 544–555. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.016

Sanchez, C., Mazzucchelli, G., Lambert, C., Comblain, F., DePauw, E., & Henrotin, Y. (2018). Comparison of secretome from osteoblasts derived from sclerotic versus non-sclerotic subchondral bone in OA: A pilot study. *PLOS ONE*, *13*(3), e0194591. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194591

Sanjai, K., Kumarswamy, J., Patil, A., Papaiah, L., Jayaram, S., & Krishnan, L. (2012). Evaluation and comparison of decalcification agents on the human teeth. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, *16*(2), 222–227. https://doi.org/10.4103/0973-029X.99070

Sasikumar, K. P., Elavarasu, S., & Gadagi, J. S. (2012). The application of bone morphogenetic proteins to periodontal and peri-implant tissue regeneration: A literature review. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *4*(Suppl 2), S427-30. https://doi.org/10.4103/0975-7406.100320

Shen, X., Yang, Z., McCool, E., Lubeckyj, R., Chen, D., & Sun, L. (2019). Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry

for top-down proteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *120*, 115644. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115644

Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V, & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, *1*(6), 2856–2860. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, *68*(5), 850–858. https://doi.org/10.1021/ac950914h

Si, J., Wang, C., Zhang, D., Wang, B., & Zhou, Y. (2020). Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *26*, e919159. https://doi.org/10.12659/MSM.919159

Sieberath, A., Della Bella, E., Ferreira, A. M., Gentile, P., Eglin, D., & Dalgarno, K. (2020). A Comparison of Osteoblast and Osteoclast In Vitro Co-Culture Models and Their Translation for Preclinical Drug Testing Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3). https://doi.org/10.3390/ijms21030912

Silva-Boghossian, C. M., Colombo, A. P. V, Tanaka, M., Rayo, C., Xiao, Y., & Siqueira, W. L. (2013). Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. *PloS One*, *8*(10), e75898. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075898

Silverman, G. A., Whisstock, J. C., Bottomley, S. P., Huntington, J. A., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pak, S. C., Reichhart, J.-M., & Bird, P. I. (2010). Serpins flex their muscle: I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(32), 24299–24305. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.112771

Smieszek, A., Marcinkowska, K., Pielok, A., Sikora, M., Valihrach, L., & Marycz, K. (2020). The Role of miR-21 in Osteoblasts-Osteoclasts Coupling In Vitro. *Cells*, *9*(2). https://doi.org/10.3390/cells9020479

Sommarin, Y., Wendel, M., Shen, Z., Hellman, U., & Heinegârd, D. (1998). Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(27), 16723–16729. https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16723

Srinivasyaiah, A., Nitin, P., & Hegde, U. (2016). Comparison of Microwave Versus Conventional Decalcification of Teeth Using Three Different Decalcifying Solutions. *Journal of Laboratory Physicians*, *8*(2), 106–111. https://doi.org/10.4103/0974-2727.180791

Starzyńska, A., Kaczoruk-Wieremczuk, M., Lopez, M. A., Passarelli, P. C., & Adamska, P. (2021). The Growth Factors in Advanced Platelet-Rich Fibrin (A-PRF) Reduce Postoperative Complications after Mandibular Third Molar Odontectomy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(24). https://doi.org/10.3390/ijerph182413343

Štěpánová, S., & Kašička, V. (2016). Recent applications of capillary electromigration methods to separation and analysis of proteins. *Analytica Chimica Acta*, *933*, 23–42. https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.006

Štěpánová, S., & Kašička, V. (2019). Recent developments and applications of capillary and microchip electrophoresis in proteomics and peptidomics (2015-mid 2018). *Journal of Separation Science*, *42*(1), 398–414. https://doi.org/10.1002/jssc.201801090

Swinbanks, D. (1995). Australia backs innovation, shuns telescope. *Nature*, *378*(6558), 653. https://doi.org/10.1038/378653a0

Szweras, M., Liu, D., Partridge, E. A., Pawling, J., Sukhu, B., Clokie, C., Jahnen-Dechent, W., Tenenbaum, H. C., Swallow, C. J., Grynpas, M. D., & Dennis, J. W. (2002). alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(22), 19991–19997. https://doi.org/10.1074/jbc.M112234200

Termine, J. D., Belcourt, A. B., Christner, P. J., Conn, K. M., & Nylen, M. U. (1980a). Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *The Journal of Biological Chemistry*, *255*(20), 9760–9768.

Termine, J. D., Belcourt, A. B., Miyamoto, M. S., & Conn, K. M. (1980b). Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. II. Separation and purification of fetal bovine dentin phosphoprotein. *The Journal of Biological*

Chemistry, *255*(20), 9769–9772.

Tomokiyo, A., Wada, N., & Maeda, H. (2019). Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium. *Stem Cells and Development*, *28*(15), 974–985. https://doi.org/10.1089/scd.2019.0031

Tran, V. N., Strnad, O., Šuman, J., Veverková, T., Sukupová, A., Cejnar, P., Hynek, R., Kronusová, O., Šach, J., Kaštánek, P., Ruml, T., & Viktorová, J. (2023). Cannabidiol nanoemulsion for eye treatment - Anti-inflammatory, wound healing activity and its bioavailability using in vitro human corneal substitute. *International Journal of Pharmaceutics*, *643*, 123202. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123202

Tsuchida, S., Satoh, M., Sogawa, K., Kawashima, Y., Kado, S., Ishige, T., Beppu, M., Sawai, S., Nishimura, M., Kodera, Y., Matsushita, K., & Nomura, F. (2014). Application of proteomic technologies to discover and identify biomarkers for periodontal diseases in gingival crevicular fluid: A review. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, *8*(3–4), 232–240. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/prca.201300122

Tsuchida, S., Satoh, M., Umemura, H., Sogawa, K., Kawashima, Y., Kado, S., Sawai, S., Nishimura, M., Kodera, Y., Matsushita, K., & Nomura, F. (2012). Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. *Proteomics*, *12*(13), 2190–2202. https://doi.org/10.1002/pmic.201100655

Verdenius, H. H., & Alma, L. (1958). A quantitative study of decalcification methods in histology. *Journal of Clinical Pathology*, *11*(3), 229–236. https://doi.org/10.1136/jcp.11.3.229

Wang, J.-L., Zheng, B.-Y., Li, X.-D., Angström, T., Lindström, M. S., & Wallin, K.-L. (2004). Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *10*(7), 2407–2414. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0242

Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R., Williams, K. L., & Humphery-Smith, I. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis*, *16*(7), 1090–1094. https://doi.org/10.1002/elps.11501601185

Wei, X., Wu, L., Ling, J., Liu, L., Liu, S., Liu, W., Li, M., & Xiao, Y. (2008). Differentially expressed protein profile of human dental pulp cells in the early process of odontoblast-like differentiation in vitro. *Journal of Endodontics*, *34*(9), 1077–1084. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.06.014

Wewer, U. M., Ibaraki, K., Schjørring, P., Durkin, M. E., Young, M. F., & Albrechtsen, R. (1994). A potential role for tetranectin in mineralization during osteogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *127*(6 Pt 1), 1767–1775. https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1767

Whisstock, J. C., Silverman, G. A., Bird, P. I., Bottomley, S. P., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pak, S. C., Reichhart, J.-M., & Huntington, J. A. (2010). Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(32), 24307–24312. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.141408

White, N. M. A., Masui, O., Newsted, D., Scorilas, A., Romaschin, A. D., Bjarnason, G. A., Siu, K. W. M., & Yousef, G. M. (2014). Galectin-1 has potential prognostic significance and is implicated in clear cell renal cell carcinoma progression through the HIF/mTOR signaling axis. *British Journal of Cancer*, *110*(5), 1250–1259. https://doi.org/10.1038/bjc.2013.828

Wilkins, M. (2009). Proteomics data mining. In *Expert review of proteomics* (Vol. 6, Issue 6, pp. 599–603). https://doi.org/10.1586/epr.09.81

Woods, A. E., & Ellis, R. C. (1994). *Laboratory Histopathology: A Complete Reference* (Issue v. 1-2). Churchill Livingstone. https://books.google.com/books?id=Tm9XxgEACAAJ

Wu, L., Wei, X., Ling, J., & Liu, L. (2009a). [A differential expression proteomic study of human periodontal ligament cell during osteogenic differentiation]. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology*, *44*(4), 212–216.

Wu, L., Wei, X., Ling, J., Liu, L., Liu, S., Li, M., & Xiao, Y. (2009b). Early osteogenic differential protein profile detected by

proteomic analysis in human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research*, *44*(5), 645–656. https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01174.x

Xiao, W., Wang, C., Chen, K., Wang, T., Xing, J., Zhang, X., & Wang, X. (2020). MiR-765 functions as a tumour suppressor and eliminates lipids in clear cell renal cell carcinoma by downregulating PLP2. *EBioMedicine*, *51*, 102622. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.102622

Xie, Z., Shen, Z., Zhan, P., Yang, J., Huang, Q., Huang, S., Chen, L., & Lin, Z. (2021). Functional Dental Pulp Regeneration: Basic Research and Clinical Translation. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16). https://doi.org/10.3390/ijms22168991

Xu, J., Gou, L., Zhang, P., Li, H., & Qiu, S. (2020). Platelet-rich plasma and regenerative dentistry. *Australian Dental Journal*, *65*(2), 131–142. https://doi.org/10.1111/adj.12754

Xu, T., Bianco, P., Fisher, L. W., Longenecker, G., Smith, E., Goldstein, S., Bonadio, J., Boskey, A., Heegaard, A. M., Sommer, B., Satomura, K., Dominguez, P., Zhao, C., Kulkarni, A. B., Robey, P. G., & Young, M. F. (1998). Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nature Genetics*, *20*(1), 78–82. https://doi.org/10.1038/1746

Yang, M., Zhai, X., Xia, B., Wang, Y., & Lou, G. (2015). Long noncoding RNA CCHE1 promotes cervical cancer cell proliferation via upregulating PCNA. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *36*(10), 7615–7622. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3465-4

Yasuda, K., Okada, S., Okazaki, Y., Hiasa, K., Tsuga, K., & Abe, Y. (2020). Bone turnover markers to assess jawbone quality prior to dental implant treatment: a case-control study. *International Journal of Implant Dentistry*, *6*(1), 67. https://doi.org/10.1186/s40729-020-00264-0

Zeman, A., Šmíd, M., Havelcová, M., Coufalova, L., Kuckova, S., Velčovská, M., & Hynek, R. (2013). The structure and material composition of ossified aortic valves identified using a set of scientific methods. *Journal of Asian Earth Sciences*, *77*, 311–317. https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2013.07.001

Zhang, L., Xiao, H., Karlan, S., Zhou, H., Gross, J., Elashoff, D., Akin, D., Yan, X., Chia, D., Karlan, B., & Wong, D. T. (2010). Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer. *PloS One*, *5*(12), e15573. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015573

Zhang, X., Fang, Q., Ma, Y., Zou, S., Liu, Q., & Wang, H. (2019). Protease activated receptor 2 mediates tryptase-induced cell migration through MYO10 in colorectal cancer. *American Journal of Cancer Research*, *9*(9), 1995–2006.

Zhang, Z., Zhu, G., Peuchen, E., & Dovichi, N. (2017). Preparation of linear polyacrylamide coating and strong cationic exchange hybrid monolith in a single capillary, and its application as an automated platform for bottom-up proteomics by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Microchimica Acta*, *184*. https://doi.org/10.1007/s00604-017-2084-8

Zhao, X.-Y., Chen, T.-T., Xia, L., Guo, M., Xu, Y., Yue, F., Jiang, Y., Chen, G.-Q., & Zhao, K.-W. (2010). Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, *31*(8), 1367–1375. https://doi.org/10.1093/carcin/bgq116

Zou, Y., Chen, Y., Yao, S., Deng, G., Liu, D., Yuan, X., Liu, S., Rao, J., Xiong, H., Yuan, X., Yu, S., Zhu, F., Wang, Y., & Xiong, H. (2018). MiR-422a weakened breast cancer stem cells properties by targeting PLP2. *Cancer Biology & Therapy*, *19*(5), 436–444. https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1433497

Žuvela, P., Skoczylas, M., Liu, J. J., Bączek, T., Kaliszan, R., Wong, M. W., Buszewski, B., & Héberger, K. (2019). Addition: Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*, *119*(7), 4818. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00167

9.Seznam publikací

9.1 Publikace, které jsou podkladem disertační práce

V časopisech s impaktovým faktorem

1. **Michalusova I.**, Trubacova D., Cejnar P., Kuckova S., Santrucek J., Hynek R.: Direct tryptic cleavage in bone tissue followed by LC-MS/MS as a first step towards routine characterization of proteins embedded in alveolar bones. *International Journal of Mass Spectrometry* 455, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375. IF_{2020} 1,98
2. Hynek R.*, **Michalus I.***, Cejnar P., Santrucek J., Seidlova S., Kuckova S., Sazelova P., Kasicka V.: In-bone protein digestion followed by LC-MS/MS peptide analysis as a new way towards the routine proteomic characterization of human maxillary and mandibular bone tissue in oral surgery. *Electrophoresis* 42, 2552-2562, 2021. DOI: https://doi.org/10.1002/elps.202100211. IF_{2021} 3,59 *Sdílené prvoautorství.
3. **Michalus I.**, Van Nguyen T., Viktorová J., Cejnar P., Šantrůček J., Kučková, Š., Sázelová P., Kašička V., Hynek R.: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of peptides separated from the insoluble matrix by in-sample tryptic protein digestion for rapid discrimination of various induced pathological states of human bone models in oral surgery. Journal of Separation Science, 2022; 45:4388–4396. DOI: https://doi.org/10.1002/jssc.202200694. IF_{2022} 3,1
4. **Michalusova I.***, Sazelova P.*, Cejnar P., Kuckova S., Hynek R., Kasicka V.: Capillary electrophoretic profiling of in-bone tryptic digests of proteins as a potential tool for the detection of inflammatory states in oral surgery. *Journal of Separation Science* 43(20), 2020. DOI: https://doi.org/10.1002/jssc.202000718. IF_{2020} 3,64 **Sdílené prvoautorství.*

9.2 Publikace bez vztahu k tématu disertační práce

a) V časopisech s impaktovým faktorem

1. Remlova E, Dostalova T, **Michalusova I**, Jelinkova H, Vranova J. Hubacek M: Infantile Hemangioma – Pulse Dye Laser Versus Surgical Therapy. *Laser Physics* 2014, 24 (5) Article number 055601. DOI: 10.1088/1054-660X/24/5/055601. **IF_{2014} 1,03**
2. Remlova E, Dostalova T, **Michalusova I**, Vranova J, Navratil L, Rosina J: Hemangioma Curative Effect of PDL, Alexandrie, Er: YAG and CO(2) Lasers. *Photomedicine and Laser Surgery,* 2011 29(12):815-25. DOI: https://doi.org/10.1089/pho.2011.3058. **IF_{2011} 1,25**

b) V časopisech bez impaktového faktoru

1. **Michalusová I**, Dostálová T, Kozák J, Hubáček M: Vaskulární anomálie – hemangiomy. Možnosti jejich diagnostiky a terapie. (Přehledový článek) Prakt. zub. Lék., roč. 59, 2011, č. 5, s. 94-100.

2. **Michalusová I.**, Hubáček M., Dostálová T.: Primární chirurgická terapie 12 denního pacienta s hemangiomem. (Kazuistika) LKS, 2012, roč. 22, č.9, str.: 173-196

3. Mališ J., Stará V., Bláhová K., Bučková H., Faberová R., Štěrba J., Klovrzová S., Kynčl M.,Černý M., Hrdlička R., Mojžíšová M., Vaculík M., Kozák J., Katra R., **Michalusová I.**, Sukop A., Rygl M., Hercogová J., Arenberger P, Šmucler R., Čapková Š.: Infantilní hemangiomy. Současné léčebné postupy. (Přehledový článek) Česko-Slovenská Pediatrie, roč. 4/72, 07/2017, s. 245-254

10. Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1 Vizuální změny vzorků prasečích čelistních kostí po aplikaci různých preinkubačních kroků. Bez preinkubace A); po 30 minutách preinkubace deionizovanou vodou B), 8 M močovinou C) a propan-2-olem D). Převzato z (Michalusová et al., 2020b). *30*

Obrázek 2 Vennovy diagramy identifikovaných proteinů po 30 minutách preinkubace deionizovanou vodou, 8 M močovinou a propan-2-olem v A) horní čelist a B) dolní čelist. Převzato z (Michalusová et al., 2020b). *31*

Obrázek 3 Vennovy diagramy identifikovaných proteinů, které mají souvislost s funkcí kostních tkání po 30 minutách preinkubace deionizovanou vodou, 8 M močovinou a propan-2-olem v A) horní čelist a B) dolní čelist. Převzato z (Michalusová et al., 2020b). *31*

Obrázek 4 Schéma pracovního postupu. Převzato z (Hynek et al., 2021). *33*

Obrázek 5 Vennovy diagramy všech proteinů (A) a proteinů charakteristických pro kostní tkáně (B) identifikovaných ve vzorcích maxilárních a mandibulárních kostí bez předinkubačního kroku a s předinkubací v propan-2-olu (čísla odpovídají počtu identifikovaných proteinů alespoň ve čtyřech vzorcích maxilárních nebo mandibulárních kostí) (převzato z (Hynek et al., 2021)). *34*

Obrázek 6 Rozlišení mezi zdravými a patologickými stavy kostních tkání bez preinkubace (A) a s 30minutovou preinkubací vzorku v propan-2-olu před tryptickým štěpením (B) ((převzato z (Hynek et al., 2021)). *35*

Obrázek 7 Schéma postupu založeného na přímém štěpení následovaného LC-MS/MS (převzato z (Michalus et al., 2022)). *36*

Obrázek 8 Rozlišení mezi kulturami buněk modelů kostních tkání in vitro s indukovanou rakovinou a kontrolními kulturami kostních buněk (A) a mezi kulturami kostních buněk s indukovaným zánětem a kontrolními kulturami kostních buněk (B). Převzato z (Michalus et al., 2022). *38*

Obrázek 9 Rozlišení mezi kulturami buněk modelů kostních tkání in vitro s indukovanou rakovinou a buněčnou kulturou s indukovaným zánětem (A), mezi všemi třemi kulturami kostních buněk s indukovanou rakovinou, zánětem a kontrolními kulturami kostních buněk (B) a mezi kontrolními kulturami kostních buněk a vzorky lidských maxilárních kostí (C). Převzato z (Michalus et al., 2022). *38*

Obrázek 10 Schéma pracovního postupu s koncovkou CZE (převzato z (Michalusová et al., 2020a)) *40*

Obrázek 11 CE–UV profily vzorků prasečí čelistní kosti štěpené trypsinem a chymotrypsinem (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)). *40*

Obrázek 12 Rozlišení vzorků kostních tkání štěpených trypsinem a chymotrypsinem s využitím matematické analýzy PCA pro hodnocení získaných CE-UV profilů (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)). *41*

Obrázek 13 CE–UV profily vzorků prasečí čelistní a lýtkové kosti štěpené trypsinem. (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)). *41*

Obrázek 14 Rozlišení vzorků prasečích čelistních a lýtkových s využitím matematické analýzy PCA pro hodnocení získaných CE-UV profilů (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)). *42*

Obrázek 15 CE–UV profily vzorků zdravých lidských čelistních kostí (vlevo) a kostních tkání postižených zánětem. (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)). *42*

Obrázek 16 Rozlišení vzorků zdravých lidských kostních tkání a zánětlivých lidských kostních tkání s využitím matematické analýzy PCA pro hodnocení získaných CE-UV profilů (Převzato z (Michalusová et al., 2020a)). *43*

Tabulka 1 Počty identifikovaných proteinů při využití různých variant techniky. 33

Tabulka 2 Počty proteinů identifikovaných v in vitro kostních kulturách a maxilárních kostech 37

11. Přílohy – publikace, které jsou podkladem disertační práce a ocenění

International Journal of Mass Spectrometry 455 (2020) 116375

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Mass Spectrometry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijms

Direct tryptic cleavage in bone tissue followed by LC-MS/MS as a first step towards routine characterization of proteins embedded in alveolar bones

I. Michalusova [a], D. Trubacova [b], P. Cejnar [c], S. Kuckova [b], J. Santrucek [b], R. Hynek [b, *]

[a] First Faculty of Medicine Charles University, Katerinska 32, CZ-121 08, Prague 2, Czech Republic
[b] Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28, Prague 6, Dejvice, Czech Republic
[c] Department of Computing and Control Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28, Prague 6, Dejvice, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 January 2020
Received in revised form
30 April 2020
Accepted 2 June 2020
Available online 7 June 2020

Keywords:
Alveolar bones
Peptide mapping
LC-MS/MS
Principal component analysis
Oral surgery

ABSTRACT

While methods like radiology or histology are routinely used in oral surgery, a simple and effective method for characterization of alveolar bones at the molecular level is missing. This is primarily due to the fact that proteomic analysis of hard tissue represents a serious analytical challenge. In this study, we developed a simple technique for the proteomic characterization of bone tissue in the field of oral surgery. After a prewashing step with different solvents, specific digestion with trypsin was performed directly in porcine alveolar bone tissues without the prior reduction and alkylation of disulfide bonds. The released peptides were then analyzed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. When 2-propanol was used in the pre-incubation step, this approach identified 487 proteins in the maxillary (upper jaw) bone and 443 proteins in the mandibular (lower jaw) bone, 40 of each being specifically ascribed to bone tissue. This suggests that routine use of our technique can provide deeper insights into the field of oral surgery at the molecular level. Furthermore, it could also have diagnostic potential in differentiating between the proteomic patterns of healthy and pathological alveolar bone tissue. The mass spectrometry proteomics data are available via ProteomeXchange with identifier PXD018836.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite the fact that advanced proteomic techniques can provide useful insight into various physiological and pathological processes at the molecular level, they are not commonly used for bone tissue evaluation in oral and maxillofacial surgical practice. Routine use generally requires methods that are simple, straightforward and user-friendly. Proteomic techniques can meet these requirements, as demonstrated by their use in the analysis of oral fluids [1–13] and soft dental tissue [14–25]. Thus, their implementation in oral surgery appears at least feasible. However, use of the proteomic analysis of hard dental tissue, such as alveolar bones, dental cementum or tooth tissue, in routine oral surgery necessitates the development of novel approaches that are significantly simpler than those currently used.

The major challenge in the proteomic analysis of hard dental tissue is that the proteins which need to be analyzed are buried in an insoluble matrix. Some of them can be extracted for analysis [26], but a significant number remain embedded. Another approach is the demineralization of hard dental tissue [27–29] or dentoalveolar tissue [30,31]. This technique can be more effective with respect to the number of proteins identified, but it involves many steps and is overly time-consuming. An additional problem, which neither of these approaches resolves, is the poor solubility of the numerous matrix proteins in hard tissue [27,28].

To have a chance of being implemented in routine oral surgery, any new technique must respect the "keep-it-simple" principle. Our goal was to investigate the development of just such a technique, the aim at this point not being to identify the maximum number of proteins, but to shed light at the molecular level on oral hard tissue. We applied our experience with a straightforward technique for the digestion of insoluble materials [32,33] to such tissues. Because porcine and human bones have similar properties, with porcine bone often used as a grafting material in human

* Corresponding author.
E-mail address: hynekr@vscht.cz (R. Hynek).

https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375
1387-3806/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

maxillofacial surgery [34–41], porcine alveolar bone was chosen as a model for method development. And because the tooth-bearing maxillary (upper jaw) and mandibular (lower jaw) bones differ in their mineral densities [42], they were used as models for testing the broader potential of our approach.

2. Materials and methods

2.1. Specific cleavage of alveolar bone samples with trypsin

Approximately 3 mg of each alveolar bone sample (porcine maxillary bone or porcine mandibular bone) was placed into a 1.5-mL Eppendorf tube. The samples were then incubated for 30 min at ambient temperature (22 °C) in either 1 mL of deionized water, 1 mL of 8 M urea solution or 1 mL of 2-propanol. Prewashing with each solvent was applied to 10 samples of porcine jawbone, five of which were taken from maxillary bone (upper jaw) and five from mandibular bone (lower jaw). Thus, 30 bone samples were analyzed in total.

The supernatant was then removed by the pipette. Subsequently, all samples were incubated for 5 min in 50 mM ammonium hydrogencarbonate (NH_4HCO_3) solution. After the supernatant was again removed, specific digestion was carried out in 15 μL (samples were submerged) of 20 μg/mL sequencing grade trypsin (Promega) in 50 mM NH_4HCO_3 at 37 °C for 3 h. Specific digestion was performed without reduction and alkylation of the disulfide bonds. The solution containing the released peptides was purified on ZipTip packed with reversed phase (C_{18}) resin and dried at room temperature.

2.2. Mass spectrometry and protein identification

Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis was performed using a Dionex Ultimate 3000 RSLCnano ultra-high-performance liquid chromatograph (Dionex, Dreieich, Germany) coupled with an ESI-Q-TOF Maxis Impact mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The dry samples were dissolved in 10 μL of loading buffer (water:-acetonitrile:formic acid at a ratio of 97:3:0.1). The samples (3 μL) were applied to an Acclaim PepMap 100 C_{18} trap column (100 μm × 2 cm, reverse phase particle size 5 μm; Dionex, Dreieich, Germany) at a flow rate of 5 μL/min for 5 min. Then, they were separated by reverse phase chromatography carried out at a flow rate of 0.3 μL/min through an Acclaim PepMap RSLC C18 column (75 μm × 150 mm, reverse phase particle size 2 μm; Dionex, Dreieich, Germany). The following gradient was used for the separation: 0 min 3% B; 5 min 3% B; 95 min 35% B; 97 min 90% B; 108 min 90% B; 110 min 3% B; 120 min 3% B. The composition of mobile phase A was 0.1% formic acid in water and of mobile phase B was 0.1% formic acid in acetonitrile. The peptides were eluted directly into the ESI source (Captive spray; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Measurements took place in DDA (data dependent analysis) mode with precursor selection in the range of 400–1400 *m/z*. From each MS spectrum, up to 10 precursors could be fragmented. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [43] partner repository with the dataset identifier PXD018836.

2.3. Mathematical analysis of obtained data

Peptides in the raw spectra were identified and quantified by MaxQuant label-free quantification software (version 1.6.1 for Windows) [44] using *Sus scrofa* NCBI protein database (assembly Sscrofa11.1). Reverse sequences were selected for target-decoy database strategy [45] and a 1% false discovery rate (FDR) was applied to both peptide spectrum match and protein group levels. Trypsin was set as the proteolytic enzyme and two missed cleavages were allowed; no fixed modification was selected. Methionine oxidation and broken cysteine disulfide bonds (Cys-Cys) were searched as variable protein modifications. The Bruker Q-TOF instrument setting was used with default tolerances: 0.07 Da for the first search and 0.006 Da for the main peptide search at the MS level. Protein identification was performed using the default 40 ppm as mass tolerance at the MS/MS level for TOF analyzer. The minimum required peptide length was set to seven amino acids. Only unique peptides were used for quantification. Protein groups identified through target-decoy database strategy ('Reverse' column in the MaxQuant proteinGroups file) and proteins not identified by MS/MS spectrum ('Only identified by site' column in the MaxQuant proteinGroups file) were removed and are not included in any subsequent analyses. For each sample, it was assumed that proteins would be identified if at least two peptide fragments for a given protein were detected by MS/MS and if at least one of those was unique. However, not all of the peptides obtained by *in silico* trypsin digest were detected for each protein identified in a sample and, thus, the protein intensity quantification values used for principal component analysis (PCA) were computed as follows: for each unique peptide detected for a given protein, MaxQuant label-free quantification value (LFQ) was divided by peptide length and the maximum of these values used as the protein intensity quantification value.

R software (version 3.5.0 for Windows) was used for all statistical analyses, with multiMS-toolbox [46,47] used for PCA. For PCA, each sample was represented as a data vector consisting of protein intensity quantification values for each protein detected by at least two peptide fragments, one of which was unique.

To estimate the variation in the protein intensity quantification values among the samples, the proteins detected in at least four of five samples were enumerated for each prewashing method and each bone substrate (for overall numbers, see Table 1). For each such protein, the coefficient of variation, based on protein intensity quantification values and five samples, was estimated using the following unbiased estimation formula:

$$\widehat{c}_v = \left(1 + \frac{1}{4n}\right)\frac{s}{\overline{x}}$$

where n is the number of samples (i.e., 5), s is the sample standard deviation and $\overline{x}$ is the mean value. For each prewashing method and each bone substrate, these coefficients of variation were sorted in descending order and are depicted in Fig. 6.

3. Results and discussion

3.1. Initial hypothesis

Our goal of developing a simple procedure for the characterization of proteins contained in alveolar bones involved completely redesigning the complicated isolation of intact proteins from bone

Table 1
Counts of proteins identified using different prewashing steps.

Identified proteins[a]	Water	8 M urea	2-propanol
Total in maxillary bone	97	240	487
Total in mandibular bone	92	217	443
Bone-related in maxillary bone	11	31	40
Bone-related in mandibular bone	13	31	40

[a] Counts of proteins identified in at least four of the five samples according to the criteria described in 2.3.

tissue. Our redesign was based on the assumption that small molecules of trypsin (molecular weight 23.8 kDa) can penetrate the porous structure of bone tissue and, in so doing, digest proteins, as we previously demonstrated for other insoluble materials [32,33]. We assumed that the released peptide fragments would then diffuse into the solution and that, after a simple cleaning step, it would be possible to analyze them by LC-MS/MS. Based on this hypothesis, we proposed an extremely simple workflow (Fig. 1) by which samples are ready for LC-MS/MS analysis after a few routine steps: pre-incubation/washing; specific cleavage by trypsin; purification by ZipTip followed by drying.

3.2. Identification of proteins after specific digestion with trypsin

The sliced alveolar bone samples were partially covered by blood. From the viewpoint of our aim, soluble (mainly blood) proteins represented undesirable contamination that could hinder the successful identification of proteins specific to the bone structure. Thus, prior to digestion, we reduced their concentration in each sample by implementing a prewashing step. We tested this step by prewashing samples with one of three different solvents (deionized water, 8 M urea solution or 2-propanol). In each case, prewashing was applied to 10 samples of porcine jawbone (five maxillary, five mandibular) so that 30 samples were analyzed in total (see 2.1 for details). The differences in the effects of the prewashing procedures were observable visually (see Fig. 2 for maxillary bone samples). The weakest visual change was observed after prewashing with deionized water (the most intense reddish color) while the strongest visual change was seen after the application of 2-propanol (almost white). Similar visual effects were observed for the mandibular bone samples (not shown).

In terms of the LC-MS/MS identification of proteins, for a protein to be considered identified by specific trypsin digestion after prewashing with a given solvent, it must be identified in at least four of the five samples in accordance with the criteria specified in section 2.3. The counts of proteins identified when the respective solvents were employed are summarized in Table 1. The overlap between the various counts is obvious from the Venn diagrams depicted in Fig. 3. While the vast majority of proteins identified after prewashing with deionized water represent a subset of those found after prewashing with 2-propanol, a certain amount of proteins (19 in the case of maxillary bone and 22 in the case of mandibular bone) were exclusively identified by prewashing with 8 M urea solution.

There were clearly big differences in the protein counts identified by specific trypsin digestion and these differences were dependent on the prewashing solvent used. The lowest total amount of proteins identified in both bone types was found after using deionized water. A higher amount was identified using 8 M urea, but the highest amount was obtained after prewashing with 2-propanol (487 for maxillary bone, 443 for mandibular bone). The higher amount of identifications obtained after washing with urea rather than water might be due to the denaturing effect of 8 M urea on proteins leading to easier cleavage by trypsin. The number of proteins identified after prewashing with 2-propanol was so much higher than those identified after washing with water that some other effect of 2-propanol should be considered (discussed below). On the other hand, despite the different mineral densities of maxillary and mandibular bones [42], the differences in the number of proteins identified in them were not that large. The consistency of the results obtained for the maxillary and mandibular bones is important in terms of the potential further application of our method in oral surgery practice; such application is dependent on evidence of successful results for both types of bone.

The proteins identified by LC-MS/MS can by divided into three groups. The first group mainly consists of blood proteins, such as hemoglobins, albumins and immunoglobulins, which we cannot expect to be completely removed by prewashing. The second groups are proteins that occur in different types of tissues, including bone tissue. The third group is composed of proteins that are highly likely to play significant roles in bone tissue. The identification of proteins from the third group confirms the effectiveness of our approach and the soundness of the hypothesis on which it is based. Thus, we primarily focus our attention on them in what follows.

Prewashing with 2-propanol before specific cleavage by trypsin led not only to the identification of the highest total number of proteins but also to a significant increase in the number of proteins that can be ascribed to tissue in both the maxillary and mandibular bones (Table 1). The count of bone-related proteins identified after using 2-propanol was approximately four times higher than that identified after prewashing with water. The overlaps depicted after the different prewashing steps are shown in the Venn diagrams below (Fig. 4), which unambiguously show the strong effect of 2-propanol in bone-related protein identification. The bone-related proteins found after prewashing with water and urea were all a subset of those identified when 2-propanol was involved.

One possible explanation for the effect of 2-propanol could be that some organic solvents seem to have a positive influence on the proteolytic cleavage of certain proteins. For example, the influence

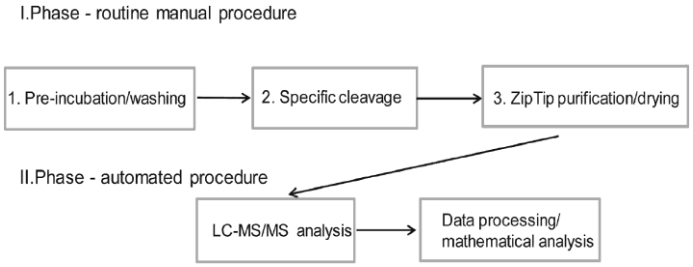


Fig. 1. Scheme of the workflow.

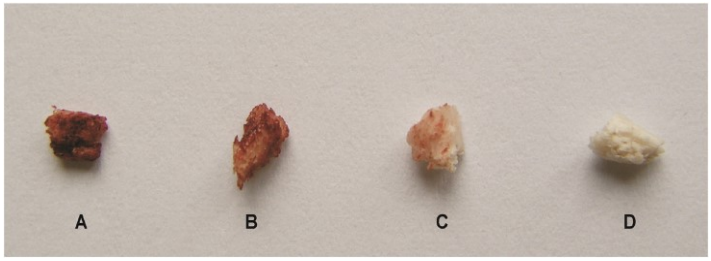


Fig. 2. Visual changes in maxillary bone pieces. Without any prewashing A); after 30 min of prewashing with deionized water B) or 8 M urea C) or 2-propanol D).

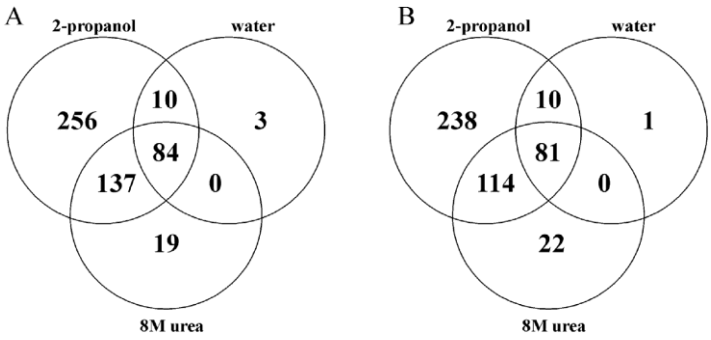


Fig. 3. Venn diagrams of total proteins identified after 30 min prewashing with deionized water, 8 M urea or 2-propano in A) maxillary and B) mandibular bone.

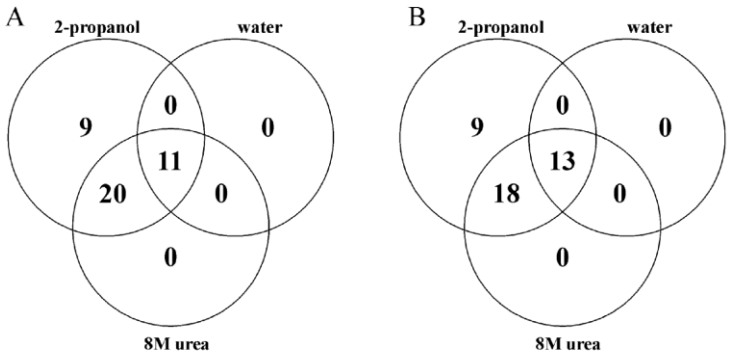


Fig. 4. Venn diagrams of bone-related proteins identified after 30 min prewashing with deionized water, 8 M urea or 2-propanol in A) maxillary and B) mandibular bone.

of organic solvents (acetonitrile, acetone) on the digestion of selected model proteins (cytochrome *c*, myoglobin) with trypsin in free solution was described [48]. On the other hand, the fact that this study reported cleavage by trypsin directly in the presence of different organic solvents should be considered; in our study, only 2-propanol was used in the prewashing step, with the subsequent specific cleavage performed directly in bone tissue placed in a solution of 50 mM NH_4HCO_3. Thus, an alternative explanation is that the use of 2-propanol for prewashing leads to changes that subsequently facilitate trypsin access to the cleavage site of proteins embedded in the bone structure.

Table 2
Reproducibility of protein identifications among the samples.

Identified proteins in at least number of 5 samples	Water					8 M urea					2-propanol				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Total in maxillary bone	240	173	130	97	68	474	390	305	240	181	674	606	554	487	402
Total in mandibular bone	270	185	136	92	62	436	348	277	217	134	681	604	522	443	361
Bone related in maxillary bone	23	17	15	11	10	37	35	33	31	30	40	40	40	40	40
Bone related in mandibular bone	27	23	18	13	9	35	34	33	31	19	40	40	40	40	39

3.3. *Reproducibility of protein identifications in the samples and of protein intensities*

For the identified proteins, the reproducibility among the samples is summarized in Table 2.

Table 2 shows that after prewashing with deionized water less than one third of the total proteins identified in at least one sample were identified in all five samples. Better reproducibility was obtained for the samples prewashed with urea, but the results for 2-propanol were clearly the best. In terms of the identification of bone-related proteins, the benefit for reproducibility of using 2-propanol is again obvious.

PCA found no sample with overall outlying protein intensity quantification values for the different solvents used and for the bone types among the sample (Fig. 5). In particular, the overall variance for the samples prewashed with 2-propanol was not excessive for the maxillary bone samples and was minimal for the mandibular bone samples.

To assess the reproducibility of protein quantification, coefficients of variation for protein intensity quantification values were calculated and are presented in Fig. 6. Lower coefficients of variation (i.e., under 0.5) were obtained for only a few proteins after prewashing with deionized water, for more proteins when using 8 M urea and for the highest amount of proteins after using 2-propanol. Using relative numbers, washing with 2-propanol also led to the highest ratio of proteins with lower coefficients of variation to proteins with higher coefficients of variation. The curves for the maxillary and mandibular bone samples are very similar in the cases of deionized water and 2-propanol. The 8 M curves are also similar, but with the mandibular bone showing greater variation.

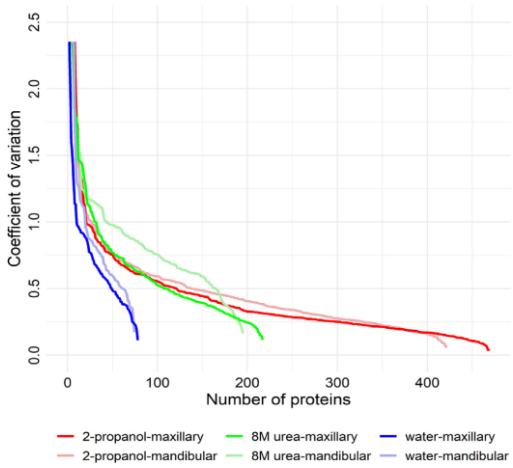


Fig. 6. Coefficients of variation for proteins identified after prewashing step with deionized water, 8 M urea and 2-propanol in maxillary and mandibular bone samples.

3.4. *Comments on bone-related proteins identified in maxillary and mandibular bones*

The proteins anticipated to be specifically associated with bone tissue are summarized in Table 3 for the 2-propanol prewashing

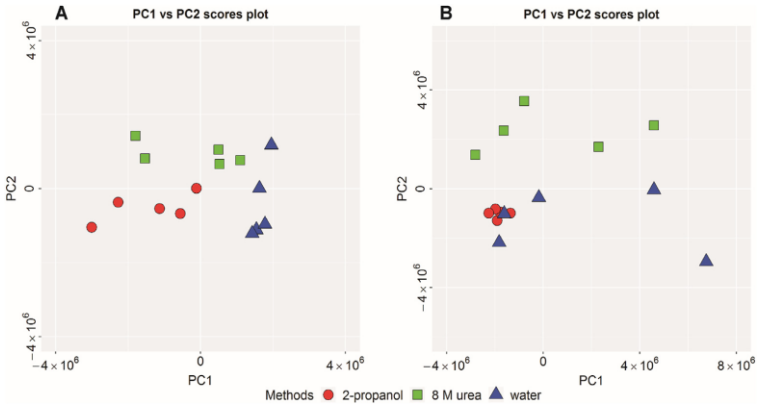


Fig. 5. PCA scores plot (first two components) for vectors of protein intensity quantification values of all detected proteins for each sample after 30 min of pre-incubation in deionized water, 8 M urea solution or 2-propanol and for A) maxillary bone, B) mandibular bone.

Table 3
Bone-related proteins identified by LC-MS/MS after prewashing with 2-propanol.

Protein ID[a]	Protein name	Peptides[b] maxillary	Peptides[b] mandibular	MW (kDa)
XP_020931400.1	collagen alpha 3(VI) chain	77	78	335
XP_013848274.2	collagen alpha-1(XII) chain isoform X2	77	52	333
XP_020922812.1	collagen alpha-1(I) chain isoform X1	72	76	139
NP_001230584.1	collagen alpha-2(I) chain precursor	62	58	129
NP_001230226.1	collagen alpha-1(III) chain precursor	38	32	139
XP_005668408.1	periostin isoform X2	36	40	90
NP_001193280.1	periostin isoform 2 precursor	36	39	87
NP_001193276.1	periostin isoform 1 precursor	35	38	93
XP_020938805.1	tenascin isoform X8	33	31	245
NP_999395.1	tenascin precursor	29	28	191
XP_020919318.1	tenascin-N isoform X1	23	20	162
XP_013848366.1	annexin A2 isoform X1	20	19	39
XP_003133690.2	fibronectin	20	13	289
XP_005672670.3	annexin A6	16	16	76
XP_003129266.2	annexin A5	15	14	36
XP_001925971.4	plastin-3	12	8	71
XP_020938158.1	collagen alpha-2(VI) chain	12	8	109
XP_020926755.1	collagen alpha-1(VI) chain	11	11	109
XP_005662305.1	asporin isoform X1	11	11	42
NP_999085.1	decorin precursor	11	13	40
NP_001230268.1	lumican precursor ;	11	10	39
XP_020930354.1	collagen alpha-2(V) chain isoform X1	10	7	140
XP_003135523.1	biglycan isoform X2	9	10	41
XP_020941477.1	mimecan isoform X1	9	6	34
XP_003354522.1	procollagen C-endopeptidase enhancer 1	9	6	50
XP_020927747.1	clusterin isoform X2	8	7	52
XP_013854105.1	reticulocalbin-3 ;reticulocalbin-3	8	7	37
XP_005668942.1	chondroadherin	7	6	41
XP_005667062.1	osteopontin isoform X2	7	6	34
XP_005668474.1	plastin-2	7	5	70
XP_005661592.2	versican core protein isoform X2	7	6	262
XP_005652426.1	alpha-2-HS-glycoprotein	6	6	39
NP_001014971.1	collagen alpha-1(V) chain precursor	5	5	184
NP_001167604.1	calreticulin precursor	5	5	48
NP_001157470.1	annexin A1	5	5	39
XP_020925236.1	plastin-1	4	4	71
NP_001231880.1	leucine-rich repeat-containing protein 59	4	4	35
XP_003130153.1	fibromodulin	4	4	43
XP_003484071.1	calumenin isoform X1	3	3	37
XP_003124829.1	osteomodulin	3	2	49

[a] Proteins identified in at least four of the five samples according to the criteria described in section 2.3.
[b] Number of unique peptide fragments identified by LC-MS/MS is the average value of all five samples of the respective bone type. Proteins are listed in descending order of number of unique peptide fragments identified in maxillary bone.

step, and in Table S1 and Table S2 (in Supplementary material) for urea and deionized water, respectively.

As with the counts of total proteins (Table 1), the numbers of bone-related proteins identified in the maxillary and mandibular bone samples were very similar. While there were some differences between the maxillary and mandibular bone samples in terms of the numbers of unique peptide fragments identified by LC-MS/MS, the numbers of specific bone proteins identified in the two bone types were identical for prewashing with 2-propanol (Table 3). The identification of bone matrix proteins is highly significant because it shows the ability of our technique to identify proteins firmly embedded in bone structures, thereby highlighting its potential further application in oral surgery practice.

Thus far, studies focused on the proteomic analysis of hard tissue (bone or dental tissues) have generally used either demineralization [27–31] or extraction procedures [26,49,50]. Compared with demineralization, extraction techniques are less time-consuming, but a significant number of proteins remain embedded in bone. Even the promising extraction procedure based on hydroxyapatite chromatography [49] remains too complicated to be easily used in routine analysis. To our best knowledge, we used the most straightforward approach based on specific cleavage directly in alveolar bone tissue without prior demineralization and without the prior reduction and alkylation of disulfide bonds. Other approaches using specific cleavage directly in an insoluble matrix without the need for complicated pretreatment have been reported for insoluble materials [32,33], but not for fresh bone tissue.

The identified bone proteins (Table 3) are known to play various biological roles in bone tissue, including in healing processes after oral surgery. For example, the abundant collagen is frequently used in dental implantology to prevent epithelial migration and enable regenerative cells to repopulate damaged tissue [51]. Periostin appears to play a significant role in the regeneration of the periodontal ligament and alveolar bone after surgical procedures [52]. Biglycan is a small leucine-rich proteoglycan that influences bone mineralization; suppression of its gene has been shown to lead to an osteoporosis-like phenotype and reduce bone mass growth rate in knock-out mice [53].

4. Conclusions

We have developed a simple technique of prewashing before trypsin digestion for the direct extraction of proteins in alveolar maxillary and mandibular bone tissue. Followed by LC-MS/MS, it results in the identification of significant numbers of proteins. When 2-propanol is used for the prewashing step, the amount of identified proteins, particularly those that can be specifically ascribed to bone tissue, is significantly enhanced. Because it does

not require time-consuming demineralization and because it overcomes the issue of the poor solubility of numerous matrix proteins in hard tissue, this technique could be a first step towards the routine use of bone proteomics in the field of oral and maxillofacial surgery.

We believe that reported procedure could be applied to the generation of proteomic profiles for human alveolar bones in different pathological states. This would provide molecular-level insights and lead to a deeper understanding of alveolar bone pathology. Mentioned technique could become a useful complement, or even alternative, to the standard histological evaluation of alveolar bone tissue.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

I. Michalusova: Writing - original draft, Methodology. **D. Trubacova:** Formal analysis. **P. Cejnar:** Formal analysis. **S. Kuckova:** Methodology, Supervision. **J. Santrucek:** Formal analysis, Data curation. **R. Hynek:** Methodology.

Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Czech Ministry of Education Youth and Sports for the Development of a Research Organization. P. C. acknowledges support for algorithmic software optimization by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant LTAIN19007 Development of Advanced Computational Algorithms for evaluating post-surgical rehabilitation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375.

References

[1] S. Tsuchida, M. Satoh, H. Umemura, K. Sogawa, Y. Kawashima, S. Kado, S. Sawai, M. Nishimura, Y. Kodera, K. Matsushita, F. Nomura, Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers, Proteomics 12 (2012) 2190–2202.
[2] S. Tsuchida, M. Satoh, H. Umemura, K. Sogawa, Y. Kawashima, S. Kado, S. Sawai, M. Nishimura, Y. Kodera, K. Matsushita, F. Nomura, Application of proteomic technologies to discover and identify biomarkers for periodontal diseases in gingival crevicular fluid: a review, PROTEOM-Clin. Appl. 8 (2014) 232–240.
[3] R.C. Baliban, D. Sakellari, Z. Li, P.A. DiMaggio, B.A. Garcia, C.A. Floudas, Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples, J. Clin. Periodontol. 39 (2012) 203–212.
[4] L.H. Ngo, I.B. Darby, P.D. Veith, A.G. Locke, E.C. Reynolds, Mass spectrometric analysis of gingival crevicular fluid biomarkers can predict periodontal disease progression, J. Periodontal. Res. 48 (2013) 331–341.
[5] C.M. Silva-Boghossian, A.P.V. Colombo, M. Tanaka, C. Rayo, Y. Xiao, W.L. Siqueira, Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions, PloS One 8 (2013) 75898.
[6] L.G. Carneiro, C. Venuleo, F.G. Oppenheim, E. Salih, Proteome data set of human gingival crevicular fluid from healthy periodontium sites by multidimensional protein separation and mass spectrometry, J. Periodontal. Res. 47 (2012) 248–262.
[7] L.G. Carneiro, H. Nouh, E. Salih, Quantitative gingival crevicular fluid proteome in health and periodontal disease using stable isotope chemistries and mass spectrometry, J. Clin. Periodontol. 41 (2014) 733–747.
[8] W.J. Rody Jr., L.S. Holliday, K.P. McHugh, S.M. Wallet, V. Spicer, O. Krokhin, Mass spectrometry analysis of gingival crevicular fluid in the presence of external root resorption, Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop. 145 (2014) 787–798.
[9] J.S. Kinne, T. Morelli, M. Oh, T.M. Braun, C.A. Ramseier, J.V. Sugai, W.V. Giannobile, Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression, J. Clin. Periodontol. 41 (2014) 113–120.
[10] C.W. Bassim, K.S. Ambatipudi, J.W. Mays, D.A. Edwards, S. Swatkoski, H. Fassil, K. Baird, M. Gucek, J.E. Melvin, S.Z. Pavletic, Quantitative salivary proteomic differences in oral chronic graft-versus-host disease, J. Clin. Immunol. 32 (2012) 1390–1399.
[11] Y.R. Chianeh, K. Prabhu, Biochemical markers in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma, Asian Pac. J. Trop. Dis. 4 (2014) 33–40.
[12] M. Levine, Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins, Int. J. Dent. (2011) 1–13, 2011.
[13] L. Zhang, H. Xiao, S. Karlan, H. Zhou, J. Gross, D. Elashoff, D. Akin, X. Yan, D. Chia, B. Karlan, D.T. Wong, Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer, PloS One 5 (2010) 15573.
[14] A. Eckhardt, M. Jágr, S. Pataridis, I. Miksík, Proteomic analysis of human tooth pulp: proteomics of human tooth, J. Endod. 40 (2014) 1961–1966.
[15] E. Reichenberg, M. Redlich, P. Cancemi, B. Zaks, S. Pitaru, S. Fontana, I. Pucci-Minafra, A. Palmon, Proteomic analysis of protein components in periodontal ligament fibroblasts, J. Periodontol. 76 (2005) 1645–1653.
[16] T. Yamazoe, K. Aoki, H. Simokawa, K. Ohya, Y. Takagi, Gene expression of bone matrix proteins in a calcified tissue appeared in subcutaneously transplanted rat dental pulp, J. Med. Dent. Sci. 49 (2002) 57–66.
[17] N.S. Sandanayake, J. Sinclair, F. Andreola, M.H. Chapman, A. Xue, G.J. Webster, A. Clarkson, A. Gill, I.D. Norton, R.C. Smith, J.F. Timms, S.P. Pereira, A combination of serum leucine-rich α-2-glycoprotein 1, CA19–9 and interleukin-6 differentiate biliary tract cancer from benign biliary strictures, Br. J. Canc. 105 (2011) 1370–1378.
[18] V. Pääkkönen, S. Ohlmeier, U. Bergmann, M. Larmas, T. Salo, L. Tjäderhane, Analysis of gene and protein expression in healthy and carious tooth pulp with cDNA microarray and two-dimensional gel electrophoresis, Eur. J. Oral Sci. 113 (2005) 369–379.
[19] X. Wei, L. Wu, J. Ling, L. Liu, S. Liu, W. Liu, M. Li, Y. Xiao, Differentially expressed protein profile of human dental pulp cells in the early process of odontoblast-like differentiation in vitro, J. Endod. 34 (2008) 1077–1084.
[20] S. Tete, F. Mastrangelo, A.P. Scioletti, M. Tranasi, F. Raicu, M. Paolantonio, L. Stuppia, R. Vinci, E. Gherlone, C. Ciampoli, M.T. Sberna, P. Conti, Microarray expression profiling of human dental pulp from single subject, Clin. Invest. Med. 31 (2008) 55–61.
[21] J.L. McLachlan, A.J. Smith, I.J. Bujalska, P.R. Cooper, Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries, Biochem. Biophys. Acta 1741 (2005) 271–281.
[22] U. Eckhard, G. Marino, S.R. Abbey, G. Tharmarajah, I. Matthew, C.M. Overall, The human dental pulp proteome and N-terminome: Levering the unexplored potential of semitryptic peptides enriched by TAILS to identify missing proteins in the human proteome project in underexplored tissues, J. Proteome Res. 14 (2015) 3568–3582.
[23] Y.K. Paik, W.S. Hancock, Uniting ENCODE with genome-wide proteomics, Nat. Biotechnol. 30 (2012) 1065–1067.
[24] L. Wu, X. Wei, J. Ling, L. Liu, S. Liu, M. Li, Y. Xiao, Early osteogenic differential protein profile detected by proteomic analysis in human periodontal ligament cells, J. Periodontal. Res. 44 (2009) 645–656.
[25] L. Wu, X. Wei, J. Ling, L. Liu, A differential expression proteomic study of human periodontal ligament cell during osteogenic differentiation, Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 44 (2009) 212–216.
[26] C.R. Salmon, D.M. Tomazela, K.G. Ruiz, B.L. Foster, A.F. Paes Leme, E.A. Sallum, M.J. Somerman, F.H. Nociti Jr., Proteomics analysis of human dental cementum and alveolar bone, J. Proteomics 91 (2013) 544–555.
[27] J.D. Termine, A.B. Belcourt, P.J. Christner, K.M. Conn, M.U. Nylen, Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel, J. Biol. Chem. 255 (1980) 9760–9768.
[28] J.D. Termine, A.B. Belcourt, M.S. Miyamoto, K.M. Conn, Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. II. Separation and purification of fetal bovine dentin phosphoprotein, J. Biol. Chem. 255 (1980) 9769–9772.
[29] M.J. Hubbard, J.C. Kon, Proteomic analysis of dental tissues, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 771 (2002) 211–220.
[30] C.R. Salmon, A.P.O. Giorgetti, A.F. Paes Leme, R.R. Domingues, T.N. Kolli, B.L. Foster, F.H. Nociti Jr., Microproteome of dentoalveolar tissues, Bone 101 (2017) 219–229.
[31] F.M. Savi, G.I. Brierly, J. Baldwin, C. Theodoropoulos, M.A. Woodruff, Comparison of different decalcification methods using rat mandibles as a model, J. Histochem. Cytochem. 65 (2017) 705–722.
[32] R. Hynek, S. Kuckova, J. Hradilova, M. Kodicek, Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry as a tool for fast identification of protein binders in color layers of paintings, Rapid Commun. Mass Spectrom. 18 (2004) 1896–1900.
[33] S. Kuckova, M. Crhova, L. Vankova, A. Hnizda, R. Hynek, M. Kodicek, Towards proteomic analysis of milk proteins in historical building materials, Int. J. Mass Spectrom. 284 (2009) 42–46.
[34] U. Nannmark, L. Sennerby, The bone tissue response to prehydrated and collagenated cortico-cancellous porcine bone grafts: a study in rabbit maxillary defects, Clin. Implant Dent. Relat. Res. 10 (2008) 264–270.

[35] A. Barone, R. Crespi, N.N. Aldini, M. Fini, R. Giardino, U. Covani, Maxillary sinus augmentation: histologic and histomorphometric analysis, Int. J. Oral Maxillofac. Implants 20 (2005) 519–525.
[36] G. Orsini, A. Scarano, M. Piattelli, M. Piccirilli, S. Caputi, A. Piattelli, Histologic and ultrastructural analysis of regenerated bone in maxillary sinus augmentation using a porcine bone-derived biomaterial, J. Periodontol. 77 (2006) 1984–1990.
[37] A. Barone, M. Ricci, U. Covani, U. Nannmark, I. Azarmehr, J.L. Calvo-Guirado, Maxillary sinus augmentation using prehydrated corticocancellous porcine bone: hystomorphometric evaluation after 6 months, Clin. Implant Dent. Relat. Res. 14 (2012) 373–379.
[38] M.P. Ramirez Fernandez, J.L. Calvo-Guirado, R. Arcesio-Delgado Ruiz, J.E. Mate Sanchez De-Val, V.V. Ortega, L.M. Olmes, Bone response to hydroxyapatites with open porosity of animal origin (porcine [OsteoBiol mp3] and bovine [Endobon]): a radiological and histomorphometric study, Clin. Oral Implants Res. 22 (2011) 767–773.
[39] J.L. Calvo-Guirado, M.P. Ramirez Fernandez, B. Negri, R.A. Delgado Riuz, J.E.M. Sanchez De-Val, G. Gomez-Moreno, Experimental model of bone response to collagenized xenografts of porcine origin (OsteobiolR MP3): a radiological and histomorphometric study, Clin. Implant Dent. Relat. Res. 15 (2013) 143–151.
[40] L. Pagliani, P. Andersson, M. Lanza, A. Nappo, D. Verrocchi, S. Volpe, L. Sennerby, A collagenated porcine bone substitute for augmentation at Neoss implant sites: a prospective 1-year multicenter case series study with histology, Clin. Implant Dent. Relat. Res. 14 (2012) 746–758.
[41] G. Iezzi, A. Piattelli, A. Giuliani, C. Mangano, A. Barone, L. Manzon, M. Degidi, A. Scarano, A. Filippone, V. Perrotti, Molecular, cellular and pharmaceutical aspects of bone grafting materials and membranes during maxillary sinus-lift procedures. Part 2: detailed characteristics of the materials, Curr. Pharmaceut. Biotechnol. 18 (2017) 33–44.
[42] H. Devlin, K. Horner, D. Ledgerton, A comparison of maxillary and mandibular bone mineral densities, J. Prosthet. Dent 79 (1998) 323–327.
[43] Y. Perez-Riverol, A. Csordas, J. Bai, M. Bernal-Llinares, S. Hewapathirana, D.J. Kundu, A. Inuganti, J. Griss, G. Mayer, M. Eisenacher, E. Pérez, J. Uszkoreit, J. Pfeuffer, T. Sachsenberg, S. Yilmaz, S. Tiwary, J. Cox, E. Audain, M. Walzer, A.F. Jarnuczak, T. Ternent, A. Brazma, J.A. Vizcaíno, The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data, Nucleic Acids Res. 47 (D1) (2019) D442–D450 (PubMed ID: 30395289).
[44] S. Tyanova, T. Temu, J. Cox, The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics, Nat. Protoc. 11 (2016) 2301–2319.
[45] J.E. Elias, S.R. Gygi, Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics, Methods Mol. Biol. 604 (2010) 55–71.
[46] S.H. Kuckova, G. Rambouskova, R. Hynek, P. Cejnar, D. Oltrogge, R. Fuchs, Evaluation of mass spectrometric data using principal component analysis for determination of the effects of organic lakes on protein binder identification, J. Mass Spectrom. 50 (2015) 1270–1278.
[47] P. Cejnar, S. Kuckova, A. Prochazka, L. Karamonova, B. Svobodova, Principal component analysis of normalized full spectrum mass spectrometry data in multiMS-toolbox: an effective tool to identify important factors for classification of different metabolic patterns and bacterial strains, Rapid Commun. Mass Spectrom. 32 (2018) 871–881.
[48] W.K. Russell, Z.Y. Park, D.H. Russell, Proteolysis in mixed Organic–Aqueous solvent systems: applications for peptide mass mapping using mass spectrometry, Anal. Chem. 73 (2001) 2682–2685.
[49] T.P. Cleland, D. Vashishth, Bone protein extraction without demineralization using principles from hydroxyapatite chromatography, Anal. Biochem. 472 (2014) 62–66.
[50] S.M. Lyon, A. Mayampurath, M.R. Rogers, D.J. Wolfgeher, S.M. Fisher, S.L. Volchenboum, R.R. Reid, A method for whole protein isolation from human cranial bone, Anal. Biochem. 515 (2016) 33–39.
[51] M.G. Patino, M.E. Neiders, S. Andreana, B. Noble, R. Cohen, Collagen as an implantable material in medicine and dentistry, J. Oral Implantol. 28 (2002) 220–225.
[52] J. Du, M. Li, Functions of Periostin in dental tissues and its role in periodontal tissues' regeneration, Cell. Mol. Life Sci. 74 (2017) 4279–4286.
[53] T. Xu, P. Bianco, L.W. Fisher, G. Longenecker, E. Smith, S. Goldstein, J. Bonadio, A. Boskey, A.M. Heegaard, B. Sommer, K. Satomura, P. Dominguez, C. Zhao, A.B. Kulkarni, P.G. Robey, M.F. Young, Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice, Nat. Genet. 20 (1998) 78–82.

Check for updates

Radovan Hynek[1#]
Iva Michalus[2#]
Pavel Cejnar[3]
Jiří Šantrůček[1]
Sabina Seidlová[1]
Štěpánka Kučková[1]
Petra Sázelová[4]
Václav Kašička[4]

[1]Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, Prague 6, 166 28, Czech Republic
[2]First Faculty of Medicine, Charles University, Kateřinská 32, Prague 2, 121 08, Czech Republic
[3]Department of Computing and Control Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, Prague 6, 166 28, Czech Republic
[4]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo 542/2, Prague 6, 166 10, Czech Republic

Received May 3, 2021
Revised August 12, 2021
Accepted August 26, 2021

Research Article

In-bone protein digestion followed by LC-MS/MS peptide analysis as a new way towards the routine proteomic characterization of human maxillary and mandibular bone tissue in oral surgery

Proteomic characterization of alveolar bones in oral surgery represents an analytical challenge due to their insoluble character. The implementation of a straightforward technique could lead to the routine use of proteomics in this field. This work thus developed a simple technique for the characterization of bone tissue for human maxillary and mandibular bones. It is based on the direct in-bone tryptic digestion of proteins in both healthy and pathological human maxillary and mandibular bone samples. The released peptides were then identified by the LC-MS/MS. Using this approach, a total of 1120 proteins were identified in the maxillary bone and 1151 proteins in the mandibular bone. The subsequent partial least squares–discrimination analysis (PLS-DA) of protein data made it possible to reach 100% discrimination between the samples of healthy alveolar bones and those of the bone tissue surrounding the inflammatory focus. These results indicate that the in-bone protein digestion followed by the LC-MS/MS and subsequent statistical analysis can provide a deeper insight into the field of oral surgery at the molecular level. Furthermore, it could also have a diagnostic potential in the differentiation between the proteomic patterns of healthy and pathological alveolar bone tissue. Data are available via ProteomeXchange with the identifier PXD026775.

Keywords:
In-bone protein digestion / LC-MS/MS / Mandibular bone / Maxillary bone / Oral surgery / Peptide mapping
DOI 10.1002/elps.202100211

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

1 Introduction

Although proteomics has been rapidly developing in the past decades, the common use of proteomic analysis still lags behind in some areas of biomedicine. One of such areas is the proteomic characterization of tissue in oral surgery. While significant progress has been achieved in the analysis of soft dental tissue [1–4], the routine use of proteomics for the characterization of hard dental tissue continues to be an analytical challenge. Some proteins can be relatively easily extracted [5] and subsequently analyzed, but a major part of proteins remains trapped in the insoluble matrix. The techniques used for their analysis involve demineralization [6–10], which is complicated, time-consuming and thus not suitable for their routine use in oral surgery. Another problem remaining even after demineralization is the low solubility of various matrix proteins contained in hard tissue [6, 7].

In 1989, Eckerskorn and Lottspeich reported specific digestion of proteins directly in SDS-PAGE, followed by the separation and isolation of the released peptide fragments by RP-HPLC and the subsequent determination of their amino-acid sequences by gas-phase sequencing [11]. This approach

Correspondence: Dr. Radovan Hynek, Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
E-mail: hynekr@vscht.cz
Additional corresponding author: Dr. Václav Kašička, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo 542/2, 166 10 Prague 6, Czech Republic
E-mail: kasicka@uochb.cas.cz

Abbreviations: **DA**, discrimination analysis; **LFQ**, label-free quantification; **PLS**, partial least squares

[#]R. H. and I. M. have contributed equally to this work.
Color online: See article online to view Figs. 1, 3, and 4 in color.

© 2021 Wiley-VCH GmbH

is based on the simple idea that intact proteins do not have to be laboriously isolated from the gel before specific cleavage with trypsin. Instead, a piece of gel is submerged into a buffered trypsin solution. Relatively small molecules of trypsin penetrate through the porous gel structure and specifically cleave the proteins buried in the gel. Since the released peptide fragments are small, they can easily diffuse into the solution. They can then be analyzed by a selected technique. This strategy has led to a revolution in proteomics; it has been modified to be compatible with other rapidly developing proteomic techniques, particularly MS [12–18]. Later, direct tryptic cleavage was successfully used for the analysis of the proteins contained in color layers of historical paintings [19] and followed by proteomic analyses of other insoluble materials, such as mortars or ossified aortic valves [20–23].

Recently, we have developed a new method for bone-protein identification based on the direct in-bone tryptic cleavage of proteins followed by the LC-MS/MS separation and identification of the released protein-peptide fragments using porcine alveolar bones as model samples [24]. A similar approach, in-bone tryptic protein digestion followed by the CE profiling of the released peptides, has been successfully applied for the differentiation of human healthy and inflammatory alveolar bone tissue obtained from oral surgery [25].

The aim of the current study is to implement our above-mentioned straightforward approach of in-bone tryptic protein digestion followed by the LC-MS/MS analysis of the released peptides [24] for the proteomic characterization of the surgical leftovers of 29 human samples of both healthy and pathological maxillary and mandibular bone tissue.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All the chemicals used were at least of analytical reagent grade. Propan-2-ol (hypergrade for LC-MS) and TFA (for ZipTip purification) were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Acetonitrile (LC-MS grade) and ammonium hydrogen carbonate (NH_4HCO_3) were supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA) and Porcine Pierce Trypsin Protease, MS Grade (TPCK-treated) was supplied by Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). RP C_{18} ZipTip pipette tips were obtained from Millipore Corporation (Bedford, MA, USA).

2.2 Human maxillary and mandibular bone samples

Human maxillary and mandibular bone samples have been collected as surgery leftovers. The informed consent of all participating subjects has been obtained. The permission of the local authority (ethical committee) is attached. All samples of both healthy and inflammatory tissue were collected from the bone tissue located in the corresponding part of the alveolar septum during surgery performed on third molars. The collected samples were promptly mechanically cleaned of blood using tweezers, scalpel, and/or dental drill, and stored at −80°C before processing. In total, 29 samples originating from healthy and pathological maxillary and mandibular bone tissue were collected and subsequently processed.

2.3 The specific cleavage of proteins in bone samples

Approximately 3 mg of each bone sample (almost the whole leftover) was placed into a 1.5 mL Eppendorf tube. The samples were divided into two groups. The first group, containing eight samples from maxillary bone and seven samples from mandibular bone, was directly subjected to tryptic hydrolysis, without any pre-incubation step. The second group of samples (seven samples from maxillary bone and seven samples from mandibular bone) was first pre-incubated for 30 min in 100 μL of propan-2-ol at the temperature of 50°C under shaking at 700 rpm in an Eppendorf Thermomixer compact (Hamburg, Germany). The supernatant was then removed by a pipette.

Subsequently, all samples were vortexed for 1 min with 100 μL of 50 mM ammonium hydrogen carbonate (NH_4HCO_3) solution at laboratory temperature (22°C). After the supernatant was again removed, specific digestion was carried out with the samples submerged in 15 μL of 20 μg/mL sequencing-grade trypsin in 50 mM NH_4HCO_3 at 37°C for 3 h. This specific digestion was performed without the reduction and alkylation of disulfide bonds. The solution containing the released peptides was purified on ZipTip packed with RP (C_{18}) resin. The samples were eluted to 0.2 mL Eppendorf PCR tubes and dried in the Thermomixer without shaking at 50°C for approximately 2 h.

2.4 Mass spectrometry and protein identification

Mass spectra were acquired using a Maxis Impact ESI-QToF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) connected with a Dionex Ultimate3000 RSLCnano UHPLC chromatograph (Thermo Scientific). Dry samples were resuspended with 3% v/v acetonitrile and 0.1% v/v formic acid. Subsequently, the samples were loaded on an Acclaim PepMap 100 trap column (100 μm × 2 cm, RP, particle size: 5 μm; Dionex) using the flow rate of 5 μL/min. After 5 min of washing, the flow was directed to an Acclaim PepMap RSLC C18 analytical column (75 μm × 150 mm, RP, particle size: 2 μm; Dionex). The mobile phase A was 0.1% v/v formic acid in water and the mobile phase B was 0.1% v/v formic acid in acetonitrile. Peptides were eluted with a linear gradient of 3–35% B for 90 min followed by column wash (90% B) and re-equilibration of the columns (3% B) before loading the next sample. The eluted peptides were

© 2021 Wiley-VCH GmbH

introduced directly into a Captive spray ESI source (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Spray voltage was set to 1400 V, the temperature to 150°C, and the flow of dry nitrogen to 3 L/min. Measurements were performed in the data-dependent analysis mode. Mass spectra were recorded every 3 s in the range of 50–2200 m/z. Precursors for collision-induced dissociation were selected in the range of 400–1400 m/z and MS/MS spectra were collected at the speed of 4–16 Hz depending on the intensity of the precursors. The preferred charge range was 2–5, with singly-charged precursors being excluded; 1 min dynamic exclusion time was applied. Both profile and line spectra were saved. The MS proteomics data were deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [26] partner repository with the dataset identifier PXD026775. The initial data summary set was exported from MaxQuant to Excel and is available in Supporting Information Table S1. From this list, the proteins with known biological roles in bone tissue were selected; they are summarized in Table 2.

2.5 Mathematical analysis of the data obtained

Peptides in the raw spectra were identified and quantified by MaxQuant label-free quantification (LFQ) software (version 1.6.7 for Windows) [27] using the *Homo sapiens* NCBI protein database (assembly GRCh38.p13) and the UniProt *Homo sapiens* proteome database (UP000005640). Reverse sequences were selected for target-decoy database strategy [28]. A 1% false discovery rate was applied to both peptide-spectrum match and protein-group levels. Trypsin was set as the proteolytic enzyme and two missed cleavages were allowed; no fixed modification was selected. Methionine oxidation and broken cysteine disulfide bonds (Cys-Cys) were searched as variable protein modifications. The Bruker Q-TOF instrument setting was used with the following default tolerances: 0.07 Da for the first search and 0.006 Da for the main peptide search at the MS level. Proteins were identified using the default 40 ppm as mass tolerance at the MS/MS level for the TOF analyzer. The minimum required peptide length was set to seven amino acids. Only unique peptides were used for quantification. Protein groups identified through target-decoy database strategy (the "Reverse" column in the MaxQuant proteinGroups file) and proteins not identified by the MS/MS spectrum (the "Only identified by site" column in the MaxQuant proteinGroups file) were removed and are not included in any subsequent analyses. The overall protein intensity was estimated as a sum of MaxQuant LFQ values for unique detected peptides. Partial least squares–discrimination analysis (PLS-DA) [29] for the estimation of the accuracy of classification was run in the R software (version 4.0.3 for Windows) [30] using "caret" (6.0.86) and "pls" (2.7.3) packages. The optimal number of latent variables for PLS-DA was determined using the one-SE (standard error) rule and leave-one-out cross-validation.

3 Results and discussion

3.1 The identification of proteins after their in-bone tryptic digestion

Our recently developed simple technique for protein identification using porcine alveolar bones as model samples [24] was verified for samples from human maxillary and mandibular bones. The method is based on direct in-bone tryptic protein digestion, releasing specific peptide fragments from the proteins buried in the insoluble matrix, and on their subsequent separation by LC and identification by tandem MS. The scheme of the workflow is depicted in Fig. 1; and it is described in more detail in Sections 2.3–2.5.

We have tested two variants of sample preparation for the in-bone tryptic protein digestion. Since our intention was to keep the procedure for the identification of a reasonable amount of proteins in bone tissue as simple and straightforward as possible, we first tested the procedure with direct in-bone trypsin protein digestion after simple bone washing with ammonium hydrogen carbonate. In this variant, 15 samples of human alveolar bones (eight maxillary and seven mandibular) were only briefly rinsed with ammonium hydrogen carbonate solution (see Section 2.3) before their specific digestion by trypsin. On the other hand, our interest was focused on the analysis of proteins embedded in the insoluble bone matrix. For this reason, together with the previously reported positive effects of organic solvents on the specific cleavage of proteins [31], we have included a relatively short (30 min) pre-incubation of bone samples in propan-2-ol at 50°C for the reduction of the contamination of bone proteins with soluble (mainly blood) proteins before rinsing the bones with ammonium hydrogen carbonate and subsequent in-bone protein digestion (see Section 2.3 for details). The pre-incubation step was applied to 14 samples of human alveolar bones (seven maxillary, seven mandibular). In total, 29 alveolar bone samples were characterized (see Section 2.3 for details).

The numbers of the proteins identified in maxillary and mandibular bone samples of different patients for both of the above-mentioned variants of in-bone tryptic protein digestion are summarized in Table 1.

For bone-related proteins, their biological roles are discussed more deeply in Section 3.2. A higher number of proteins in both maxillary and mandible bone samples were identified when propan-2-ol was used in the pre-incubation step. Although the increase of the number of identified proteins (mostly in the range 10–26%) is much lower than that in the previous study, when involvement of propan-2-ol in pre-incubation step led to the identification of approximately four times higher number of proteins [24], the positive effect of sample pre-incubation in propan-2-ol is obvious. An explanation could be that propan-2-ol positively influences subsequent digestion by trypsin. Partially, it could be ascribed to the delipidation of the sample, which could facilitate the penetration of trypsin into proteins trapped in the bone tissue. Another reason could be the denaturation of proteins, which

© 2021 Wiley-VCH GmbH

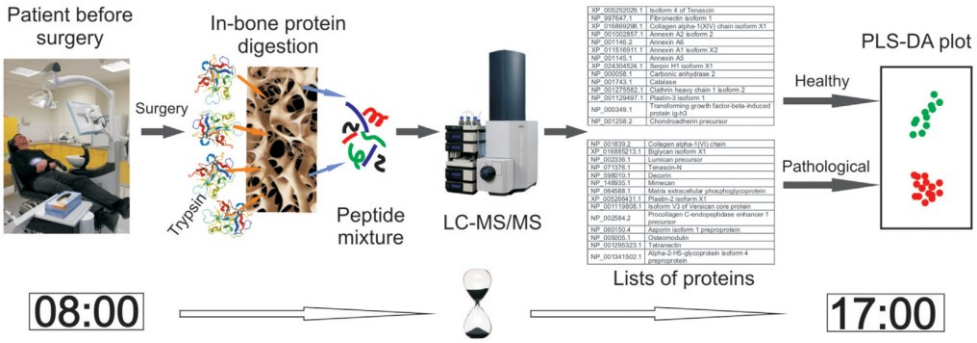


Figure 1. Scheme of the workflow.

Table 1. Numbers of identified proteins using different variants of the technique

	Number of identified proteins*	
Type of identified proteins	No pre-incubation	30 min pre-incubation in propan-2-ol
All proteins in maxillary bone	999/535/518	1120/630/655
All proteins in mandibular bone	1008/447/501	1151/491/489
Bone-related proteins in maxillary bone	51/49/46	62/58/52
Bone-related proteins in mandibular bone	53/52/49	56/53/50

*Total number of identified proteins at least in one sample/total number of identified proteins at least in four samples/average number of identified proteins per sample.

could improve the access of trypsin to cleavage sites. The positive effects of organic solvents on the specific cleavage of proteins were reported earlier [31]; in our study, however, propan-2-ol was used only before the in-bone protein digestion by trypsin. Therefore, the tryptic digestion itself was performed only in the water solution of ammonium hydrogen carbonate. A similar effect has recently been observed also for porcine alveolar bone samples [24].

Both variants of in-bone protein digestion made it possible to identify a satisfactorily high number of proteins in both maxillary and mandibular bone samples (see Table 1). This is an interesting finding because maxillary and mandibular bone tissues differ significantly in their mineral densities. It was reported that mineral density of the maxillary bone is in average approximately two times lower than the mineral density of mandibular bone. This finding seems to be connected with higher failure rate of dental implants in maxillary bones [32]. Thus, the fact that reported technique provides similar results for both maxillary and mandibular bone samples (see more in section 3.3) is extremely important for its applicability in oral surgery because it is not necessary to seek for different methodological approaches for the analysis of the samples from maxillary and mandibular bones.

Venn diagrams showing overlaps between the above-mentioned sets of all proteins (bone-related as well as others) identified in at least four samples are depicted in Fig. 2A. The differences in numbers of all the proteins identified using different variants of the technique applied are more noticeable in the case of maxillary bone samples, in which the differences in numbers of proteins identified using and non-using propan-2-ol pre-incubation are higher than in the case of mandibular bones. The similar finding has been observed for bone-related proteins identified in at least four bone samples (see Fig. 2B).

The above data show that it is reasonable to involve simple bone pre-incubation in propan-2-ol before in-bone tryptic protein digestion. Propan-2-ol is a commonly used organic solvent, and its application does not represent a significant complication of the sample preparation procedure.

3.2 The biological and clinical importance of bone-related proteins identified in maxillary and mandibular bone samples

As mentioned above, more bone-related proteins (i.e., proteins specifically associated with bone tissue) were identified when the in-bone protein digestion was preceded by 30 min bone pre-incubation in propan-2-ol. These proteins are summarized in Table 2. (For the bone-related proteins identified without the propan-2-ol pre-incubation step, see Supporting Information Table 2).

The sets of the identified bone-related proteins found in maxillary and mandibular bone samples are very similar. Only a few bone-related proteins, particularly their isoforms, have been found exclusively in either the maxillary or the mandibular bone (see Table 2). Several types of collagen have been matched with a high number of unique peptide fragments. This is not surprising, because collagen is a

© 2021 Wiley-VCH GmbH

Table 2. Bone-related proteins identified by LC-MS/MS after pre-incubation with propan-2-ol

		Maxillary bones		Mandibular bones		
Protein ID	Protein name	Number of samples[a]	Number of peptides[b]	Number of samples[a]	Number of peptides[b]	M_r (kDa)
NP_000079.2	Collagen alpha-1(I) chain preproprotein	7	57	6	56	138.91
NP_000080.2	Collagen alpha-2(I) chain	7	48	7	45	129.15
NP_476 508.2	Isoform 2 of Collagen alpha-3(VI) chain	7	44	7	44	321.35
NP_0 04361.3	Collagen alpha-1(XII) chain	7	43	7	38	333.14
NP_000081.2	Collagen alpha-1(III) chain	7	30	7	30	138.56
XP_0 052 52029.1	Isoform 4 of Tenascin	6	24	7	15	230.86
NP_997 647.1	Fibronectin isoform 1	7	22	7	15	272.33
NP_0 012 73594.1	Isoform 5 of Periostin	7	17	7	23	90.423
NP_0 013 17446.1	Periostin isoform 8 precursor	7	17	7	24	90.142
NP_0 06466.2	Periostin isoform 1 precursor	7	17	7	24	93.313
XP_01 686 9298.1	Collagen alpha-1(XIV) chain isoform X1	7	15	7	14	193.51
NP_0 010 02857.1	Annexin A2 isoform 2	7	11	7	9	38.60
NP_0 01146.2	Annexin A6	7	10	7	7	75.87
XP_01 151 6911.1	Annexin A1 isoform X2	7	9	7	9	38.71
NP_0 01145.1	Annexin A5	7	9	6	4	35.94
XP_02 430 4524.1	Serpin H1 isoform X1	7	9	7	8	46.44
XP_01 152 0273.1	Thrombospondin-1 isoform X1	7	9	7	5	123.16
NP_000058.1	Carbonic anhydrase 2	7	8	7	5	29.25
NP_0 01743.1	Catalase	7	8	6	3	59.76
NP_0 012 75582.1	Clathrin heavy chain 1 isoform 2	7	8	7	6	192.06
NP_0 011 29497.1	Plastin 3 isoform 1	7	7	7	5	70.81
NP_000349.1	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	7	7	7	3	74.68
NP_0 01258.2	Chondroadherin precursor	7	6	7	4	40.48
XP_01 152 7753.1	Collagen alpha-2(VI) chain isoform X1	7	6	7	6	108.58
NP_0 01839.2	Collagen alpha-1(VI) chain	7	6	6	5	108.34
XP_01 688 5213.1	Biglycan isoform X1	7	5	6	6	41.65
NP_0 02336.1	Lumican precursor	6	5	7	7	38.43
NP_07 1376.1	Tenascin-N	7	5	7	9	144.03
NP_598 010.1	Decorin	7	5	N/A	N/A	39.75
NP_0 010 35147.1	Isoform D of Osteopontin	7	5	6	4	33.016
XP_0 067 16347.1	Isoform 2 of Clusterin	7	5	7	3	57.832
NP_148 935.1	Osteoglycin (Mimecan)	6	4	5	3	33.92
NP_06 4588.1	Matrix extracellular phosphoglycoprotein	7	4	4	7	55.66
XP_0 052 66431.1	Plastin-2 isoform X1	7	4	N/A	N/A	70.29
NP_0 011 19808.1	Isoform V3 of Versican core protein	7	4	7	2	74.29
NP_0 02584.2	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 precursor	6	4	6	2	47.97
NP_000573.1	Isoform 5 of Osteopontin	7	4	6	4	33.843
NP_0 012 38759.1	Osteopontin isoform 5	7	4	6	3	37.245
NP_06 0150.4	Asporin isoform 1 preproprotein	7	3	6	3	43.30
NP_0 05005.1	Osteomodulin	6	3	4	1	49.49
NP_0 012 95323.1	Tetranectin	7	3	6	1	17.79
NP_0 013 41502.1	Alpha-2-HS-glycoprotein isoform 4 preproprotein	7	2	7	2	36.35
NP_0 02014.2	Fibromodulin	7	2	6	2	32.77
NP_0 04334.1	Calreticulin	7	2	5	2	48.14
XP_01 686 8640.1	Collagen alpha-1(XXII) chain isoform X6	5	2	4	1	154.48
NP_569 712.2	Collagen alpha-1(XVIII) chain isoform 2 preproprotein	6	2	5	1	135.51
XP_01 150 8875.1	Collagen alpha-2(V) chain isoform X1	7	2	6	1	139.8
NP_000891.2	Matrix Gla protein	7	1	6	1	12.35
NP_0 011 20973.2	Isoform 3 of Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	6	1	N/A	N/A	51.05
XP_01 151 9350.1	Collagen alpha-1(IV) chain isoform X1	5	1	N/A	N/A	154.16
NP_542 411.2	Collagen alpha-2(XI) chain isoform 1 preproprotein	6	1	N/A	N/A	171.77
NP_0 01837.2	Collagen alpha-2(IV) chain	4	1	5	1	167.55
NP_954 642.1	Osteocalcin	6	1	6	1	10.96

(*Continued*)

© 2021 Wiley-VCH GmbH

Table 2. Continued

Protein ID	Protein name	Maxillary bones		Mandibular bones		
		Number of samples[a]	Number of peptides[b]	Number of samples[a]	Number of peptides[b]	M_r (kDa)
NP_0 013 07629.1	Annexin	7	1	N/A	N/A	33.55
NP_0 01126.3	Aggrecan	5	1	N/A	N/A	79.61
NP_000156.1	Gap junction alpha-1 protein	4	1	N/A	N/A	43.00
NP_0 013 07808.1	Annexin A7 isoform 4	4	1	5	1	46.07
XP_01 151 0002.1	Secreted phosphoprotein 24 (Fragment)	4	1	4	1	15.14
NP_06 5701.2	Reticulocalbin-3	3	1	2	1	37.493
NP_0 011 86600.1	Calumenin isoform c precursor	1	1	N/A	N/A	38.05
XP_01 686 5288.1	Thrombospondin-4 isoform X2	2	1	N/A	N/A	71.4
NP_0 04958.2	Bone sialoprotein 2	1	1	N/A	N/A	35.147
NP_0 012 73358.1	Isoform 4 of Thrombospondin type-1 domain-containing protein 4	N/A	N/A	1	1	73.408
NP_0 010 92284.1	Isoform 2 of Sarcalumenin	N/A	N/A	1	1	54.43
XP_01 686 9755.1	Collagen alpha-1(V) chain	N/A	N/A	4	1	183.56
NP_0 01847.3	Collagen alpha-1(XVI) chain precursor	N/A	N/A	5	1	157.75
XP_01 153 6573.1	Transmembrane protein 119 isoform X1	N/A	N/A	4	1	29.20

[a]The number of samples in which protein was identified. [b] Number of unique peptide fragments identified by LC-MS/MS in maxillary and mandibular bone samples, respectively. Proteins are listed according number of unique peptide fragments identified in maxillary bone in descending order.

highly abundant protein in connective tissue. It is commonly used in dental implantology for its ability to prevent epithelial migration, which allows cells with regenerative character to heal the injured area [33]. Another protein identified with a high number of peptide fragments is tenascin, which is an extracellular matrix glycoprotein highly abundant in bones, where it influences osteoblast adhesion and differentiation, and often present around healing wounds [34]. Fibronectin is a large (440 kDa) glycoprotein that binds to other extracellular matrix proteins, such as collagen, as well as to membrane-spanning receptor proteins called integrins and is involved in numerous processes, such as cell adhesion or wound healing [35]. Fibronectin has been shown to affect osteoblast function [36]. Periostin is known as an extracellular matrix protein that seems to play a pivotal role in the regeneration of periodontal ligament and maxillary and mandibular bones after surgery

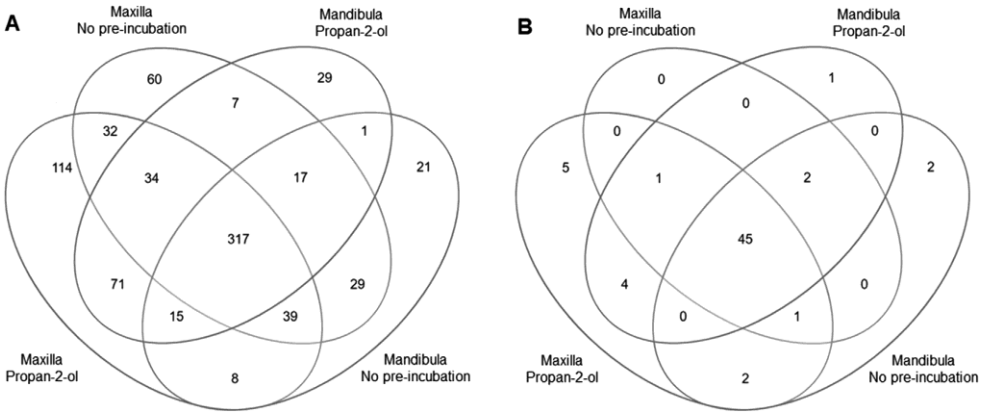


Figure 2. Venn diagrams of all the proteins (A) and bone-related proteins (B) identified in maxillary and mandibular bone samples without any pre-incubation step and with pre-incubation in propan-2-ol (the numbers correspond to the numbers of proteins identified at least in four samples of the maxillary or mandibular bones and using the digestion variant with no pre-incubation or with pre-incubation in propan-2-ol, respectively).

© 2021 Wiley-VCH GmbH

[37]. Increased expression levels of periostin have been found to be connected with breast-cancer bone metastases [38]. Annexin is a common name for a group of proteins abundant in bone matrix vesicles, where they might play a role in Ca^{2+} entry into the vesicles during hydroxyapatite formation [39]. Serpins (serine protease inhibitors) are a superfamily of proteins first identified to act on chymotrypsin-like serine proteases [40, 41]. SerpinH1 mutation has been reported to be connected with osteogenesis imperfecta [42]. Glycoprotein thrombospondin is an osteoblast-derived component of mineralized extracellular matrix [43]. Plastin 3 influences bone remodeling through the regulation of osteoclast activity, which unveils a novel possibility to counteract osteoporosis [44]. Chondroadherin is a matrix protein considered to play a role in maintaining bone cells on bone collagen matrices [45]. Biglycan is a proteoglycan playing a role in bone mineralization and the rate of bone-mass growth [46]. Moreover, it is an important participant in bone pathology, including its role in the regulation of osteosarcoma cell growth [47]. Lumican is a significant proteoglycan component of bone matrix that is secreted by differentiating and mature osteoblasts [48]. Decorin is a major proteoglycan in bones, where it modulates collagen matrix assembly and mineralization [49]. Osteopontin plays a role in bone metabolism, homeostasis, and the adhesion of several bone-related cells; it seems to be closely related to the occurrence and development of many bone-related diseases, such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, and osteosarcoma [50]. Clusterin is an anti-apoptotic glycoprotein involved in the regulation of cell proliferation. It has been suggested that secreted clusterin protein inhibits osteoblast differentiation of bone-marrow mesenchymal stem cells by suppressing the ERK1/2 signaling pathway [51]. Osteoglycin (also known as mimecan) has recently been shown to be a coordinator of bone and glucose homeostasis [52]. Asporin seems to be associated with bone and joint diseases, such as lumbar disc disease osteoarthritis [53]. Osteomodulin, also called osteoadherin, belongs to the family of small leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix [54]. The expression of osteomodulin in osteoblasts is induced by osteoclastic activity, which indicates its involvement in bone homeostasis [55]. Tetranectin is a protein composed of four identical, noncovalently bound polypeptides, which seem to play a role in bone mineralization during osteogenesis [56]. Alpha-2-HS-glycoprotein, also known as fetuin-A, may be involved, among other proteins, in the formation of bone tissue [57]. Fibromodulin is a proteoglycan from the small leucine-rich repeat protein family suggested to have a role in dental-tissue and alveolar-bone formation [58]. Calreticulin, known as a calcium-binding chaperone, has been reported to inhibit inflammation-induced osteoclastogenesis and bone resorption [59]. Osteocalcin is secreted exclusively by osteoblasts [60] and could serve as the bone-formation marker to assess jaw-bone quality before dental-implant treatment [61]. Reticulocalbin is a calcium-binding protein located in the lumen of endoplasmic reticulum, which has been found, among others, in the secretome of osteoblasts [62]. Calumenin is another calcium-binding protein present in the osteoblast secretome [63]. Bone sialoprotein is a component of mineralized tissue, such as bone, dentin, cementum, and calcified cartilage. It has been reported to play a functional role in bone formation and osteoclastogenesis [64]. Transmembrane protein 119, known also as osteoblast induction factor, plays a pivotal role in bone formation and biomineralization; it has been reported to be unregulated in osteosarcoma [65].

3.3 Mathematical analysis of the data obtained

Since surgery leftovers of alveolar bone samples originated either from completely healthy tissue without any inflammation or from tissue surrounding the inflammatory focus, PLS-DA was applied in order to find out whether it would be possible to discriminate between the above-mentioned groups of samples.

The important question is the normalization or standardization of the recorded protein intensity in the spectra. The normalization technique used, MaxQuant LFQ normalization, is known to normalize the sample intensity in such a way that the ratio of the majority of proteins between the samples is as close to the one as possible [66]. If most of the proteins in the cells have the intensity levels constant or independent of the studied difference, this normalization even overcomes the potentially different number of cells in the samples and, for example, allows the quantification of the original cell cultures from their mixtures [66]. In our case, PLS-DA could then be applied to the vectors of the LFQ-normalized intensity values of the identified proteins [66]. The accuracy of PLS-DA classification between healthy and inflammatory bone samples reached 73% (with one PLS latent variable used only as the optimal number was determined by cross-validation) when bone pre-incubation in propan-2-ol was avoided in the sample preparation. On the other hand, with the bone pre-incubation in propan-2-ol, the accuracy of discrimination increased to 100% (with two PLS latent variables determined as the optimal number). Only proteins identified in at least four samples of any participating group (see Table 1) were used for the analysis. The PLS scores using the PLS kernel algorithm [67, 68] for the final classification model for both variants of in-bone protein digestion are graphically expressed in Fig. 3.

The five most important proteins for discrimination between healthy and pathological (inflammatory) alveolar bone tissue for both variants of in-bone protein digestion (with and without sample pre-incubation in propan-2-ol) are shown in Fig. 4 and their calculated ratios in pathological and healthy tissue are provided in Supporting Information Table S3). Since the present study focuses on the analysis of proteins trapped in insoluble bone tissue (while inflammatory proteins are often soluble), the correlation of the levels of the mentioned discriminating proteins with pathological states can be anticipated to be rather indirect. Y-box-binding protein 1 (lower level in pathological tissue) is known to have various functions, including translational repression, RNA

© 2021 Wiley-VCH GmbH

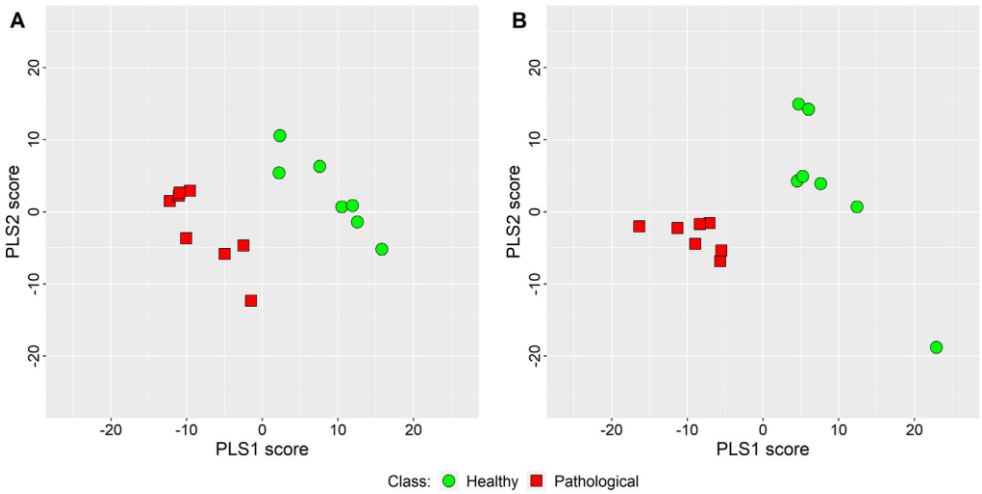


Figure 3. Orthonormal projection of the first and the second partial least squares (PLS) latent variable scores used for classification between healthy and pathological states of alveolar bone tissues without (A) and with 30 min sample pre-incubation in propan-2-ol before tryptic protein digestion (B). In the absence of pre-incubation, only one (the first) latent variable was used for the classification as was determined by cross-validation.

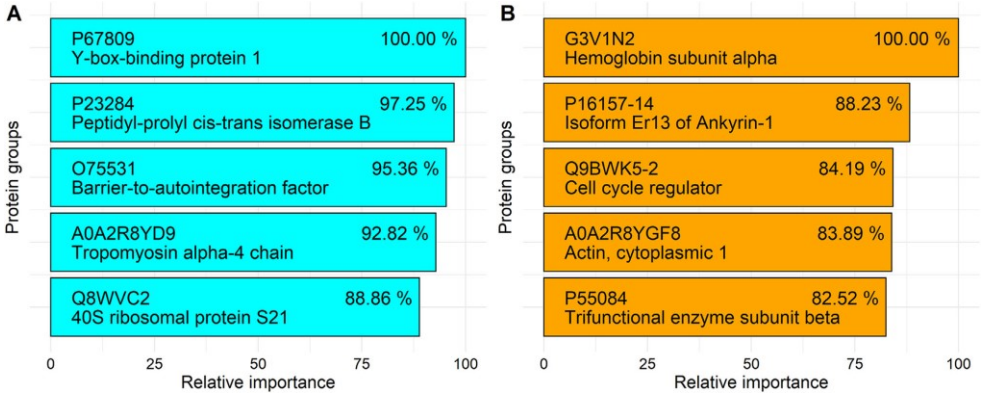


Figure 4. The five most important proteins for discrimination between healthy and pathological states of alveolar bone tissue without (A) and with 30 min sample pre-incubation in propan-2-ol before tryptic protein digestion (B). The numerical values represent relative weights of proteins.

stabilization, mRNA splicing, and DNA repair [69]. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase B (higher level in pathological tissue) catalyzes the *cis-trans* isomerization of proline imidic peptide bonds and thus may assist in protein folding [70]. Barrier-to-autointegration factor B (higher level in pathological tissue) is a DNA-bridging protein, which plays an important role in nuclear assembly and chromatin organization [71]. Tropomyosin alpha-4 (lower level in pathological tissue) has been reported to stabilize cytoskeleton actin filaments in non-muscle cells [72]. Ribosomal protein S21 (lower level in pathological tissue) is one of the ribosomal proteins contained in the small subunit 40 S [73]. The presence of the hemoglobin is rather undesirable since the goal of this study was to investigate mainly the differences in insoluble proteins. The problem is that hemoglobin is a highly abundant protein contained also inside of the bone tissues and the mechanical cleaning of surface of the samples from blood as described in Section 2.2 is not sufficient to remove it

© 2021 Wiley-VCH GmbH

completely. The hemoglobin (higher level in pathological tissue) is a well-described protein generally known to provide oxygen transportation. Nevertheless, interesting findings related to this protein, such as the recently reported role of the products of hemoglobin oxidation in the triggering of inflammatory response, may still be revealed [74]. Ankyrin-1 (lower level in pathological tissue) has the ability to bind to other membrane proteins and thus play a role in cell stability, cell movement, and other cell functions. Ankyrin also cooperates with cytoskeletal proteins and cell adhesion molecules [75]. Cell-cycle regulators (higher level in pathological tissue) play a role in DNA repair during S and G2 phases [76]. Actin (higher level in pathological tissue) is a highly conserved protein that plays a role in organelle trafficking, cell migration, and the regulation of gene transcription [77]. Mitochondrial trifunctional enzyme (lower level in pathological tissue) is a protein attached to the inner mitochondrial membrane that catalyzes three out of the four steps in beta oxidation [78].

Taking into account the enhanced number of all the identified proteins as well as bone-related proteins (see Section 3.1) and the potential for considerably better discrimination between healthy and pathological states of alveolar tissue, the involvement of the bone pre-incubation in propan-2-ol provides significant benefits for protein identification in oral surgery.

In order to explore impartial the potential differences between protein intensity profiles of samples from the two different types of bones, PLS-DA was also run between groups of samples obtained from maxillary and mandibular bones. The accuracy of PLS-DA classification between maxillary and mandibular bone samples reached only 53% when no pre-incubation in propan-2-ol was used (including healthy and pathological samples in both groups) and 64% when propan-2-ol pre-incubation was used (also with regular distribution of healthy and pathological samples in both groups). Thus the protein intensity profiles of samples are rather independent of the analyzed bone. This is favorable finding since it indicates that the both types of bone samples can be successfully analyzed by the same methodological approach.

4 Concluding remarks

We have implemented a straightforward technique based on specific protein digestion by trypsin directly in biological source materials and the subsequent LC-MS/MS analysis of the released peptide fragments in the field of oral surgery. The technique has been verified on human maxillary and mandibular bone samples. It has shown that bone pre-incubation in propan-2-ol before in-bone protein digestion improved the identification of proteins in maxillary and mandibular bone samples and allowed to achieve 100% discrimination between the samples of healthy bone tissue and the samples of tissue surrounding the inflammatory focus.

The implemented procedure of direct in-bone protein digestion by trypsin is so fast and simple that it could be routinely performed by a dental assistant. Since this procedure does not require complicated and time-consuming demineralization, it is able to provide data already on the day of the surgery (see the time axis in Fig. 1). Therefore, the technique as a whole could serve as a complement, or even an alternative, to the standard histological evaluation of maxillary and mandibular bone tissues. The implemented technique has the potential to be routinely used in the field of oral surgery. It could thus bring a deeper insight into this fascinating field on the molecular level.

P.C. acknowledges support for algorithmic software optimization by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, the grant no. LTAIN19007, entitled Development of Advanced Computational Algorithms for Evaluating Post-surgery Rehabilitation. The work has been supported by the Czech Science Foundation, project no. 18–02597S (V.K.), and by the Czech Academy of Sciences, project no. RVO 61388963.

The authors have declared no conflict of interest.

Ethical statement

The authors declare that the local ethical committee approval has been received and that the informed consent of all the participating subjects has been obtained.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

5 References

[1] Tete, S., Mastrangelo, F., Scioletti, A. P., Tranasi, M., Raicu, F., Paolantonio, M., Stuppia, L., Vinci, R., Gherlone, E., Ciampoli, C., Sberna, M. T., Conti, P., *Clin. Invest. Med.* 2008, *31*, 55–61.

[2] Eckhardt, A., Jágr, M., Pataridis, S., Mikšík, I., *J. Endod.* 2014, *40*, 1961–1966.

[3] Eckhard, U., Marino, G., Abbey, S. R., Tharmarajah, G., Matthew, I., Overall, C. M., *J. Proteome Res.* 2015, *14*, 3568–3582.

[4] Wu, L., Wei, X., Ling, J., Liu, L., Liu, S., Li, M., Xiao, Y., *J. Periodontal Res.* 2009, *44*, 645–656.

[5] Salmon, C. R., Tomazela, D. M., Ruiz, K. G., Foster, B. L., Paes Leme, A. F., Sallum, E. A., Somerman, M. J., Nociti, F. H., Jr., *J. Proteomics* 2013, *91*, 544–555.

[6] Termine, J. D., Belcourt, A. B., Christner, P. J., Conn, K. M., Nylen, M. U., *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 9760–9768.

[7] Termine, J. D., Belcourt, A. B., Miyamoto, M. S., Conn, K. M., *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 9769–9772.

[8] Hubbard, M. J., Kon, J. C., *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002, *771*, 211–220.

© 2021 Wiley-VCH GmbH

[9] Salmon, C. R., Giorgetti, A. P. O., Paes Leme, A. F., Domingues, R. R., Kolli, T. N., Foster, B. L., Nociti, F. H., Jr., *Bone* 2017, *101*, 219–229.

[10] Savi, F. M., Brierly, G. I., Baldwin, J., Theodoropoulos, C., Woodruff, M. A., *J. Histochem. Cytochem.* 2017, *65*, 705–722.

[11] Eckerskorn, C., Lottspeich, F., *Chromatographia* 1989, *28*, 92–94.

[12] Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., Ferrara, P., *Anal. Biochem.* 1992, *203*, 173–179.

[13] Hellman, U., Wernstedt, C., Góñez, J., Heldin, C. H., *Anal. Biochem.* 1995, *224*, 451–455.

[14] Jenö, P., Mini, T., Moes, S., Hintermann, E., Horst, M., *Anal. Biochem.* 1995, *224*, 75–82.

[15] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., *Anal. Chem.* 1996, *68*, 850–858.

[16] Borchers, C., Peter, J., Hall, M., Kunkel, T., Tomer, K., *Anal. Chem.* 2000, *72*, 1163–1168.

[17] Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., Mann, M., *Nat. Protoc.* 2006, *1*, 2856–2860.

[18] Granvogl, B., Gruber, P., Eichacker, L. A., *Proteomics* 2007, *7*, 642–654.

[19] Hynek, R., Kučková, S., Hradilová, J., Kodíček, M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, *18*, 1896–1900.

[20] Křížková, M. C., Kučková, S. H., Šantrůček, J., Hynek, R., *Constr. Build. Mater.* 2014, *50*, 219–225.

[21] Kučková, S., Cejnar, P., Šantrůček, J., Hynek, R., *Phys. Sci. Rev.* 2019, *4*, 20180011.

[22] Zeman, A., Šmíd, M., Havelcová, M., Coufalová, L., Kučková, S., Velcovská, M., Hynek, R., *J. Asian Earth Sci.* 2013, *77*. 311–317.

[23] Smrhová, T., Junková, P., Kučková, S., Suchý, T., Supová, M., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2020, *31*, 32.

[24] Michalusová, I., Trubačová, D., Cejnar, P., Kučková, S., Šantrůček, J., Hynek, R., *Int. J. Mass Spectrom.* 2020, *455*, 116375.

[25] Michalusová, I., Sázelová, P., Cejnar, P., Kučková, S., Hynek, R., Kašička, V., *J. Sep. Sci.* 2020, *43*, 3949–3959.

[26] Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A. F., Ternent, T., Brazma, A., Vizcaíno, J. A., *Nucleic Acids Res.* 2019, *47*, D442–D450.

[27] Tyanova, S., Temu, T., Cox, J., *Nat. Protoc.* 2016, *11*, 2301–2319.

[28] Elias, J. E., Gygi, S. R., *Methods Mol. Biol.* 2010, *604*, 55–71.

[29] Barker, M., Rayens, W., *J. Chemom.* 2003, *17*, 166–173.

[30] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020,https://www.R-project.org/.

[31] Russell, W. K., Park, Z. Y., Russell, D. H., *Anal. Chem.* 2001, *73*, 2682–2685.

[32] Devlin, H., Horner, K., Ledgerton, D., *J. Prosthet. Dent.* 1998, *79*, 323–327.

[33] Patino, M. G., Neiders, M. E., Andreana, S., Noble, B., Cohen, R., *J. Oral Implantol.* 2002, *28*, 220–225.

[34] Morgan, J. M., Wong, A., Yellowley, C. E., Genetos, D. C., *J. Cell Biochem.* 2011, *112*, 3354–3363.

[35] Pankov, R., Yamada, K. M., *J. Cell Sci.* 2002, *115*, 3861–3863.

[36] Bentmann, A., Kawelke, N., Moss, D., Zentgraf, H., Bala, Y., Berger, I., Gasser, J. A., Nakchbandi, I. A., *J. Bone Miner. Res.* 2010, *25*, 706–715.

[37] Du, J., Li, M., *Cell Mol. Life Sci.* 2017, *74*, 4279–4286.

[38] Contié, S., Voorzanger-Rousselot, N., Litvin, J., Clézardin, P., Garnero, P., *Int. J. Cancer* 2011, *128*, 352–360.

[39] Genge, B. R., Wu, L. N., Wuthier, R. E., *J. Biol. Chem.* 1990, *265*, 4703–4710.

[40] Silverman, G. A., Whisstock, J. C., Bottomley, S. P., Huntington, J. A., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pak, S. C., Reichhart, J. M., Bird, P. I., *J. Biol. Chem.* 2010, *285*, 24299–24305.

[41] Whisstock, J. C., Silverman, G. A., Bird, P. I., Bottomley, S. P., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pak, S. C., Reichhart, J. M., Huntington, J. A., *J. Biol. Chem.* 2010, *285*, 24307–24312.

[42] Lindert, U., Weis, M. A., Rai, J., Seeliger, F., Hauser, I., Leeb, T., Eyre, D., Rohrbach, M., Giunta, C., *J. Biol. Chem.* 2015, *290*, 17679–17689.

[43] Robey, P. G., Young, M. F., Fisher, L. W., McClain, T. D., *J. Cell Biol.* 1989, *108*, 719–727.

[44] Neugebauer, J., Heilig, J., Hosseinibarkooie, S., Ross, B. C., Mendoza-Ferreira, N., Nolte, F., Peters, M., Hölker, I., Hupperich, K., Tschanz, T., Grysko, V., Zaucke, F., Niehoff, A., Wirth, B., *Hum. Mol. Genet.* 2018, *27*, 4249–4262.

[45] Mizuno, M., Fujisawa, R., Kuboki, Y., *Calcif. Tissue Int.* 1996, *59*, 163–167.

[46] Xu, T., Bianco, P., Fisher, L. W., Longenecker, G., Smith, E., Goldstein, S., Bonadio, J., Boskey, A., Heegaard, A. M., Sommer, B., Satomura, K., Dominguez, P., Zhao, C., Kulkarni, A. B., Robey, P. G., Young, M. F., *Nat. Genet.* 1998, *20*, 78–82.

[47] Aggelidakis, J., Berdiaki, A., Nikitovic, D., Papoutsidakis, A., Papachristou, D. J., Tsatsakis, A. M., Tzanakakis, G. N., *Front. Oncol.* 2018, *8*, 470.

[48] Raouf, A., Ganss, B., McMahon, C., Vary, C., Roughley, P. J., Seth, A., *Matrix Biol.* 2002, *21*, 361–367.

[49] Mochida, Y., Parisuthiman, D., Pornprasertsuk-Damrongsri, S., Atsawasuwan, P., Sricholpech, M., Boskey, A. L., Yamauchi, M., *Matrix Biol.* 2009, *28*, 44–52.

[50] Si, J. Y., Wang, C. W., Zhang, D. H., Wang, B., Hou, W. W., Zhou, Y., *Med. Sci. Monitor* 2020, *26*, e919159.

[51] Abdallah, B. M., Alzahrani, A. M., Kassem, M., *Bone* 2018, *110*, 221–229.

[52] Lee, N. J., Ali, N., Zhang, L., Qi, Y., Clarke, I., Enriquez, R. F., Brzozowska, M., Lee, I. C., Rogers, M. J., Laybutt, D. R., Center, J. R., Baldock, P. A., Herzog, H., *Mol. Metab.* 2018, *13*, 30–44.

[53] Ikegawa, S., *Curr. Med. Chem.* 2008, *15*, 724–728.

[54] Sommarin, Y., Wendel, M., Shen, Z., Hellman, U., Heinegârd, D., *J. Biol. Chem.* 1998, *273*, 16723–16729.

© 2021 Wiley-VCH GmbH

[55] Ninomiya, K., Miyamoto, T., Imai, J., Fujita, N., Suzuki, T., Iwasaki, R., Yagi, M., Watanabe, S., Toyama, Y., Suda, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, *362*, 460–466.

[56] Weber, U. M., Ibaraki, K., Schjorring, P., Durkin, M. E., *J. Cell Biol.* 1994. *127*, 1767–1775.

[57] Szweras, M., Liu, D., Partridge, E. A., Pawling, J., Sukhu, B., Clokie, C., Jahnen-Dechent, W., Tenenbaum, H. C., Swallow, C. J., Grynpas, M. D., Dennis, J. V., *J. Biol. Chem.* 2002, *277*, 19991–19997.

[58] Goldberg, M., Ono, M., Septier, D., Bonnefoix, M., Kilts, T. M., Bi, Y., Embree, M., Ameye, L., Young, M. Y., *Cells Tissues Organs* 2009, *189*, 198–202.

[59] Fischer, C. R., Mikami, M., Minematsu, H., Nizami, S., Goo Lee, H., Stamer, D., Patel, N., Yu Soung, D., Back, J. H., Song, L., Drissi, H., Lee, F. Y., *J. Orthop. Res.* 2017, *35*, 2658–2666.

[60] Moser, S. C., van der Eerden, B. C. J., *Front. Endocrinol.* 2019, *9*, 794.

[61] Yasuda, K., Okada, S., Okazaki, Y., Hiasa, K., Tsuga, K., Abe, Y., *Int. J. Implant Dent.* 2020, *6*, 67.

[62] Sanchez, C., Mazzucchelli, G., Lambert, C., Comblain, F., DePauw, E., Henrotin, Y., *PLoS One* 2018, *13*, e0194591.

[63] Sanchez, C., Mazzucchelli, G., Lambert, C., Comblain, F., DePauw, E., Henrotin, Y., *Bone Biol.* 2018, *26*, S89.

[64] Malaval, L., Wade-Guéye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J. P., Burt-Pichat, B., Duboeuf, F., Boivin, G., Jurdic, P., Lafage-Proust, M. H., Amédée, J., Vico, L., Rossant, J., Aubin, J. E., *J. Exp. Med.* 2008, *205*, 1145–1153.

[65] Jiang, Z. H., Peng, J., Yang, H. L., Fu, X. L., Wang, J. Z., Liu, L., Jiang, J. N., Tan, Y. F., Ge, Z. J., *Exp. Mol. Med.* 2017, *49*, e329.

[66] Cox, J., Hein, M. Y., Luber, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M., *Mol. Cell. Proteomics* 2014, *13*, 2513–2526.

[67] Mevik, B. H., Wehrens, R., *J. Stat. Software* 2007, *18*, 1–24.

[68] Dayal, B. S., MacGregor, J. F., *J. Chemometrics* 1997, *11*, 73–85.

[69] Eliseeva, I. A., Kim, E. R., Guryanov, S. G., Ovchinnikov, L. P., Lyabin, D. N., *Biochemistry* 2011, *76*, 1402–1433.

[70] Davis, T. L., Walker, J. R., Campagna-Slater, V., Finerty, P. J., Jr., Paramanathan, R., Bernstein, G., MacKenzie, F., Tempel, W., Ouyang, H., Lee, W. H., Eisenmesser, E. Z., Dhe-Paganon, S., *PLOS Biol.* 2010, *8*, e1000439.

[71] Segura-Totten, M., Kowalski, A. K., Craigie, R., Wilson, K. L., *J. Cell Biol.* 2002, *158*, 475–485.

[72] Manstein, D. J., Meiring, J. C. M., Hardeman, E. C., Gunning, P. W., *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2020, *41*, 11–22.

[73] Bhat, K. S., Morrison, S. G., *Nucleic Acids Res.* 1993, *21*, 2939–2939.

[74] Erdei, J., Toth, A., Nagy, A., Nyakundi, B. B., Fejes, Z., Nagy B., Jr., Novak, L., Bognar, L., Balogh, E., Paragh, G., Kappelmayer, J., Bacsi, A., Jeney, V., *Front. Immunol.* 2020, *11*, 228.

[75] Cunha, S. R., Mohler, P. J., *J. Cell. Mol. Med.* 2009, *13*, 4364–4376.

[76] Arnoult, N., Correia, A., Ma, J., Merlo, A., Garcia-Gomez, S., Maric, M., Tognetti, M., Benner, C. W., Boulton, S. J., Saghatelian, A., Karlseder, J., *Nature* 2017, *549*, 548–552.

[77] Drazic, A., Aksnes, H., Marie, M., Boczkowska, M., Varland, S., Timmerman, E., Foyn, H., Glomnes, N., Rebowski, G., Impens, F., Gevaert, K., Dominguez, R., Arnesen, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, *115*, 4399–4404.

[78] Liang, K., Li, N. N., Wang, X., Dai, J. Y., Liu, P. L., Wang, C., Chen, X. W., Gao, N., Xiao, J. Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, *115*, 7039–7044.

© 2021 Wiley-VCH GmbH

Received: 26 August 2022 | Revised: 3 October 2022 | Accepted: 8 October 2022

DOI: 10.1002/jssc.202200694

RESEARCH ARTICLE

JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of peptides separated from the insoluble matrix by in-sample tryptic protein digestion for rapid discrimination of various induced pathological states of human bone models in oral surgery

Iva Michalus[1] | **Tran Van Nguyen**[2] | **Jitka Viktorová**[2] | **Pavel Cejnar**[3] | **Jiří Šantrůček**[2] | **Štěpánka Kučková**[2] | **Petra Sázelová**[4] | **Václav Kašička**[4] | **Radovan Hynek**[2]

[1]First Faculty of Medicine Charles University, Prague 2, Czech Republic

[2]Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague 6, Czech Republic

[3]Department of Computing and Control Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague 6, Czech Republic

[4]Electromigration Methods, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague 6, Czech Republic

Correspondence
Václav Kašička, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo 542/2, 160 00 Prague 6, Czech Republic.
Email: kasicka@uochb.cas.cz
Radovan Hynek, Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Email: hynekr@vscht.cz

Funding information
The Czech Ministry of Education, Youth and Sports Inter-Cost, Grant/Award Numbers: LTC19007, LTAIN1907; The Czech Academy of Sciences, Grant/Award Number: RVO 61388963

For the understanding of pathological states of bone tissues in oral surgery, it would be desirable to have the possibility to simulate these processes on bone cell models in vitro. These cultures, similarly to bone tissues, contain numerous proteins entrapped in the insoluble matrix. The major goal of this study was to verify whether a method based on direct in-matrix protein digestion could be suitable for the discrimination between different induced pathological states of bone cell models cultivated in vitro. Using in-sample specific protein digestion with trypsin followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of released peptides, 446 proteins (in average per sample) were identified in a bone cell in vitro model with induced cancer, 440 proteins were found in a model with induced inflammation, 451 proteins were detected in control in vitro culture, and 491 proteins were distinguished in samples of vestibular laminas of maxillary bone tissues originating from six different patients. Subsequent partial least squares – discrimination analysis of obtained liquid chromatography-tandem mass spectrometry data was able to discriminate among in vitro cultures with induced cancer, with induced inflammation, and control cultivation. Thus, the direct in-sample protein digestion by trypsin followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of released specific peptide fragments from the insoluble matrix and mathematical analysis of the mass spectrometry data

Article Related Abbreviations: DA, discriminant analysis; FBS, fetal bovine serum; hOBs, human osteoblasts; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PLS, partial least squares; RPMI, Roswell Park Memorial Institute.

 © 2022 Wiley-VCH GmbH.

seems to be a promising tool for the routine proteomic characterization of in vitro human bone models with induced different pathological states.

KEYWORDS
cancer, inflammation, in-sample protein digestion, liquid chromatography, mass spectrometry

1 | INTRODUCTION

Proteomic analysis of the insoluble materials represents an analytical challenge in general since the proteins contained therein are usually firmly entrapped in the insoluble matrix. Conventional approaches how to solve this problem are based on a hard effort to isolate proteins prior to their specific cleavage. On the other hand, techniques using direct in-sample specific digestion, which are able to release specific peptide fragments from entrapped proteins without the need for their time-consuming isolation, were already used for the analysis of proteins in various insoluble materials [1–6]. Recently, methods using direct in-bone protein digestion followed by CE or MS/MS analysis of released peptides were reported [7–9].

Bone cell cultures represent a similar insoluble matrix with entrapped proteins as above mentioned bones. They can serve as a suitable model system for the implementation of routine proteomic characterization of pathological states of bone tissues in oral surgery. In vitro bone models allow the use of human cells to gain more relevant preclinical research results because these models dispose of the interactions and mechanisms that usually represent a simplified in vivo situation [10]. Until today, many models based on bone-forming cells (osteoblasts) and bone-resorbing cells (osteoclasts) have been generated to simulate the bone remodeling process and its associated diseases [11–15]. Using these in vitro models based on osteoblast and osteoclasts co-culture systems, the effect of quercetin [16], glucosamine [15], clodronate, alendronate [17, 18], miR-21 [19], melatonin, strontium, vitamin D3, and vitamin K2 [14] in bone disorders were investigated. The obtained results pointed out the importance of the utility of bone-mimicking in vitro models to screen drugs for bone-related diseases. Moreover, a co-culture system of breast cancer cells and osteoclasts was performed to study osteoclastogenesis induction and the metastatic microenvironment [20]. Similarly, using an osteoblast model, prostate cancer cells stimulated osteoblastogenesis through extracellular vesicles [21].

The second type of co-culture models are indirect co-culture models, which are based on the exchange of soluble factors and elimination of direct cell-to-cell interactions. However, even though this approach is less complicated, in some specific applications could be inappropriate, for example, bone morphogenetic protein 2, which plays dynamic and pivotal roles in osteogenesis, is produced effectively only under direct co-culture of epithelial cells and mesenchymal stem cells [22].

The last approach uses bone-like materials (bone slices) allowing the achievement of functional human osteoclasts with characteristic actin morphology and the expression of cathepsin K and CD51/61. This approach very closely replicates the in vivo situation [23].

The major aim of this work was to verify the potential of the in-sample protein digestion approach for the discrimination between different induced pathological states of bone cell cultures in relation to oral surgery.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemicals

The following chemical reagents and cell culture components were purchased from Merck (Darmstadt, Germany): Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, trypsin/EDTA solutions, an antibiotic mixture (penicillin and streptomycin), phosphate-buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), macrophage colony-stimulating factor, receptor activator of nuclear factor K-B ligand, ACN (LC-MS grade), NH_4HCO_3, propan-2-ol (hypergrade for LC-MS), and TFA. Porcine Pierce Trypsin Protease, MS Grade (treated with L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone) was supplied by Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Reversed-phase C_{18} ZipTip pipette tips were obtained from Millipore Corporation (Bedford, MA, USA).

2.2 | Human bone cell cultures

Human osteoblasts (hOBs) (Innoprot, Spain), THP-1 cells (ATCC, TIB-202) and CEM/C1 cells (ATCC, CRL-2265) were maintained in RPMI 1640 medium s with 10% FBS and 1% (m/v) antibiotic/antimycotic solution. For osteoclast differentiation, THP-1 cells (2.5×10^5 cells/ml) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with

10% FBS, 1% (m/v) antibiotic/antimycotic solution and 100 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate for 48 h.

For co-culture, the bone slices (Boneslices, Denmark) shipped in 70% (v/v) ethanol were transferred to 48-well plates, washed in PBS, and dried overnight. 8×10^3 hOBs were seeded on bone slices. The medium was exchanged every 2–3 days. After 13 days, 1×10^5 differentiated THP-1 cells were seeded on the top of the hOBs. The co-culture was then performed in the differentiated medium by adding osteoclastogenic differentiation factors including macrophage colony-stimulating factor (50 ng/ml) and receptor activator of nuclear factor K-B ligand (50 ng/ml). The medium was exchanged every 2–3 days until day 28 [23]. For the bone model with induced cancer, cancer cells were added on day 25 into the bone model by replacing 50% of the medium with the new medium containing CEM cells (1.5×10^3 cells/well) [24]. To stimulate the inflammatory process, the bone models were treated with bacterial lipopolysaccharide at a concentration of 1 μg/ml as an inflammatory stimulus for 3 days [25]. After treatment, bone tissues were washed with PBS and stored at −80°C before further analysis. Sampling from each group (control, cancer, and inflammation) was performed in three biological repetitions. Each biological repetition was divided into two technical repetitions for further analysis.

2.3 | Human maxillary bone tissues

Human maxillary healthy bone tissues have been collected as surgery leftovers. The informed consent of all participating subjects has been obtained. The permission of the local authority (ethical committee) is attached. All samples were collected from the bone tissue of the vestibular lamina during surgery performed on the third molars. The collected samples were promptly mechanically cleaned from blood using tweezers, scalpel, and/or dental drill, and stored at −80°C before processing. In total, six samples originating from six different patients were collected and subsequently processed.

2.4 | In-samples specific protein digestion

The procedure based on our previously reported direct in-bone tryptic protein digestion [8, 9] was adapted for bone cell cultures with induced cancer, inflammation, and control groups. Briefly, three independent pellets were processed from each group (together nine pellets). Approximately 6 mg of each pellet (about one-quarter of the entire pellet) were placed into a 1.5 ml Eppendorf tube (together nine separate Eppendorf tubes) and pre-incubated for 30 min in 100 μl of propan-2-ol at the temperature of 50°C under shaking at 700 rpm in an Eppendorf Thermomixer compact (Hamburg, Germany). The supernatant was then removed by a pipette. Subsequently, all samples were vortexed for 1 min with 100 μl of 50 mM NH_4HCO_3 solution at laboratory temperature (22°C). After the supernatant was again removed, specific digestion was carried out with the samples submerged in 15 μl of 20 μg/ml sequencing-grade trypsin in 50 mM NH_4HCO_3 at 37°C for 3 h. This specific digestion was performed without the reduction and alkylation of disulfide bonds. The solution containing the released peptides was purified on ZipTip packed with reversed-phase (C_{18}) resin. The samples were eluted into 0.2 ml Eppendorf tubes. Each bone culture sample was divided into two separate Eppendorf tubes. Subsequently, samples were dried in the thermomixer without shaking at 50°C for approximately 2 h. Additionally, six maxillary bone tissue samples were placed into six separate Eppendorf tubes (approx. 3 mg of each sample) and processed analogically as described above. After purification on ZipTip, the samples were eluted into 0.2 ml Eppendorf tubes (six separate Eppendorf tubes) and dried in the Thermomixer without shaking at 50°C for approximately 2 h.

2.5 | LC-MS/MS analysis

Mass spectra were acquired using a Maxis Impact ESI-QToF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) connected with a Dionex Ultimate3000 RSLCnano UHPLC chromatograph (Thermo Scientific). Dry samples were resuspended in 10 μl of 3% v/v ACN and 0.1% v/v formic acid. Subsequently, the samples were loaded on an Acclaim PepMap 100 trap column (100 μm × 2 cm, C18 RP, particle size: 5 μm; Dionex) using the flow rate of 7 μl/min. The injection volume was 3 μl. After 5 min of washing, the flow was directed to an Acclaim PepMap RSLC C18 analytical column (75 μm × 150 mm, C18 RP, particle size: 2 μm; Dionex). The mobile phase A was 0.1% v/v formic acid in water and the mobile phase B was 0.1% v/v formic acid in ACN. Peptides were eluted with a linear gradient of 3%–35% B for 90 min followed by column wash (90% B) and re-equilibration of the columns (3% B) before loading the next sample. The mobile phase flow rate during the separation of peptides was set to 0.3 μl/min. The eluted peptides were introduced directly into a Captive spray ESI source (Bruker Daltonics). The spray voltage was set to 1 050 V, the temperature to 150°C, and the flow of dry nitrogen to 3 L/min. Measurements were performed in the data-dependent analysis mode. Mass spectra were recorded every 3 s in the range of m/z 50–2200. MS spectrum was recorded every 3 s. Precursors for collision-induced dissociation were selected in the range of m/z

400–1400 and MS/MS spectra were collected at the speed of 4–16 Hz depending on the intensity of the precursors. The preferred charge range was 2–5, with singly charged precursors being excluded; 1-min dynamic exclusion time was applied. Both profile and line spectra were saved.

2.6 | Mathematical analysis of MS data

Discrimination analysis of MS data was run similarly to in [8] or [9]. Peptides in the raw spectra were identified and quantified by MaxQuant label-free quantification software (version 1.6.7 for Windows) [26] using the *Homo sapiens* NCBI protein database (assembly GRCh38.p14) and the UniProt *Homo sapiens* proteome database (UP000005640; accessed May 25, 2022). Reverse sequences were selected for the target-decoy database strategy [27]. A 1% false discovery rate was applied to both peptide-spectrum match and protein-group levels. Trypsin was set as the proteolytic enzyme and two missed cleavages were allowed; no fixed modification was selected. Methionine oxidation, proline oxidation, and broken cysteine disulfide bonds (Cys-Cys) were searched as variable protein modifications. The Bruker Q-TOF instrument setting was used with the following default tolerances: 0.07 Da for the first search and 0.006 Da for the main peptide search at the MS level. Proteins were identified using the default 40 ppm as mass tolerance at the MS/MS level for the TOF analyzer. The minimum required peptide length was set to seven amino acids. Only unique peptides were used for quantification. Protein groups identified through the target-decoy database strategy (the "Reverse" column in the MaxQuant proteinGroups file) and proteins not identified by the MS/MS spectrum (the "Only identified by site" column in the MaxQuant proteinGroups file) were removed and are not included in any subsequent analyses. The overall protein intensity was computed as follows: for each unique peptide detected for a given protein, MaxQuant label-free quantification value was divided by peptide length, and the maximum of these values was used as the protein intensity quantification value. The initial data summary set was exported from MaxQuant to Excel and can be seen in Table S1. Partial least squares – discrimination analysis (PLS-DA) [28] for the estimation of the accuracy of classification was run in the R software (version 4.0.3 for Windows) [29] using "caret" (6.0.86) and "pls" (2.7.3) packages. For the estimation of the accuracy of classification, the values of technical repetitions were averaged. The optimal number of latent variables for PLS-DA was determined using the one-standard error rule and repeated k-fold cross-validation scheme ($k = 3$, times = 3).

Since proteins contained in the culture medium were soluble and were washed away together with other soluble proteins present in the samples prior to in-sample digestion of proteins entrapped in the insoluble matrices, the obtained MS data were not analyzed against the Bos Taurus databank.

TABLE 1 Numbers of proteins identified in bone cell cultures and vestibular laminas

	Number of identified proteins*		
Samples' origin	**1**	**2**	**3**
Cell culture with induced cancer	532	466	446
Cell culture with induced inflammation	546	460	440
Cell culture control	533	478	451
Vestibular laminas of maxillary bones	623	530	491

*Total number of proteins identified at least in one sample (column no. 1), at least in 50% of samples (column no. 2), and an average number of proteins identified per sample (column no. 3).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | In-sample specific protein digestion followed by LC-MS/MS analysis of released peptides

The scheme of the applied procedure is shown in Figure 1. For detailed descriptions, see Sections 2.4, 2.5, and 2.6. The method was tested on in vitro bone models prepared as described above (Section 2.2). The goal was to verify whether the method could have the potential to become a suitable tool for the characterization of cell bone models. The bone models in vitro could be used for high-throughput screening of potential drugs, which is unfortunately a limitation of current bone disorders research. This technique uses in-sample protein digestion with trypsin, which leads to the liberation of specific peptides directly from the insoluble matrix of bone cell models. Subsequently, the released peptide fragments are purified on ZipTip packed with reversed-phase (C_{18}) resin and analyzed by LC-MS/MS. In order to keep the procedure as fast and as simple as possible, the reduction and alkylation of the disulfide bonds (usually used in peptide mapping of proteins) were avoided in this study.

The numbers of the proteins identified in bone cultures with induced cancer, inflammation, and control as well as in the vestibular laminas of maxillary bones are summarized in Table 1. It is important to emphasize that the presented study is focused on a fraction of proteins, which remain entrapped in the insoluble matrix after preincubation step with propan-2-ol and subsequent washing with 50 mM NH_4HCO_3 solution.

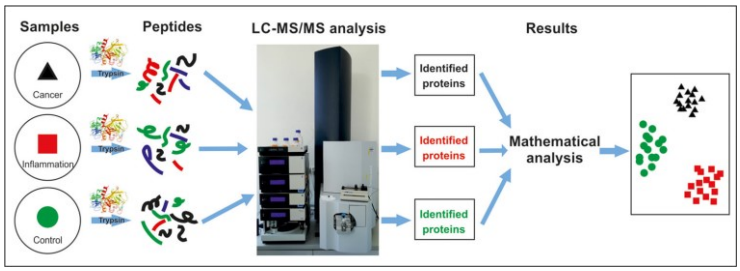


FIGURE 1 Scheme of the applied procedure based on direct in-sample specific protein digestion with trypsin followed by LC-MS/MS analysis of released peptides and mathematical analysis of MS data

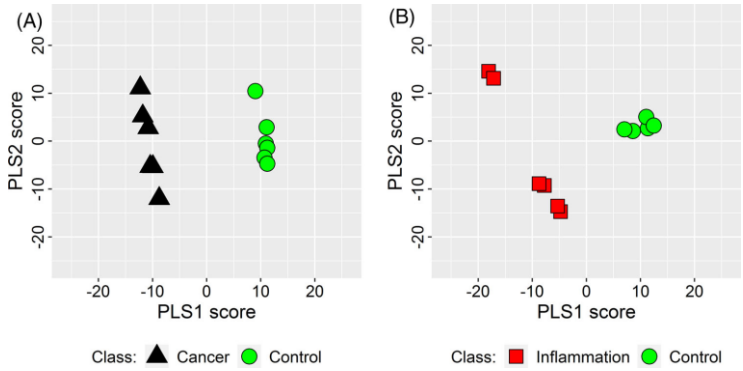


FIGURE 2 Orthonormal projection of the first and the second partial least squares (PLS1 and PLS2, respectively) latent variable scores used for discrimination between bone cell cultures with induced cancer and control bone cell cultures (A) and between bone cell cultures with induced inflammation and control bone cell cultures (B). For simplicity, biological and technical replicates are drawn using the same symbols. Some symbols are overlapping

Average counts per sample of identified proteins in the different in vitro bone models cell cultures as well as in the samples from human maxillary bones from vestibular lamina were roughly similar, namely 446 proteins in bone cell culture with the induced cancer, 440 in culture with induced inflammation, 451 proteins in control cell culture, and 491 proteins in human maxillary bones from the vestibular lamina.

3.2 | Mathematical analysis of obtained data

Partial least squares – discrimination analysis (PLS-DA) was applied in order to ascertain if the applied technique of in-sample protein digestion has the potential to discriminate between different groups of in vitro bone cell culture samples. The discrimination between bone cell cultures with induced cancer and control culture is graphically expressed in Figure 2A and discrimination between bone cell cultures with induced inflammation and control culture is shown in Figure 2B. The accuracy of discrimination between cancer and control was 94% (one latent variable) and the accuracy between inflammation and control was 83% (one latent variable).

Figure 3A shows that it is also possible to discriminate between two different pathological conditions, namely between cancer and inflammation with reached accuracy of 94% (three latent variables). This finding is promising since it indicates that described technique based on in-sample protein digestion can have a potential to discriminate between different pathological states. It is strongly desirable that this method could be used as a complement or even an alternative to the traditional histological characterization of pathological states of bone tissues in oral surgery. This traditional histological evalua-

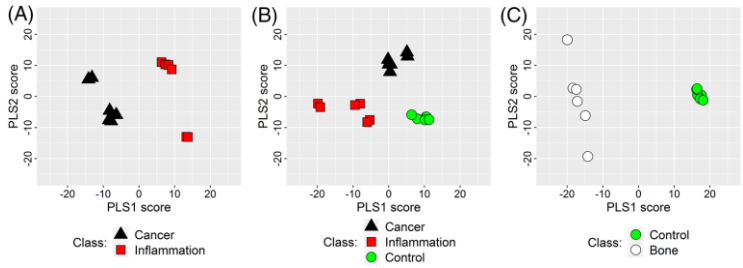


FIGURE 3 Orthonormal projection of the first and the second partial least squares (PLS1 and PLS2, respectively) latent variable scores used for discrimination: between bone cell cultures with induced cancer and cell culture with induced inflammation (A), among all three bone cell cultures with induced cancer, inflammation, and control bone cell cultures (B), and between control bone cell cultures and samples of vestibular laminas of human maxillary bones (C). For simplicity, biological and technical replicates are drawn using the same symbols. Some symbols are overlapping

tion of bone tissues is very laborious and time-consuming. Complete discrimination among all three in vitro bone cell cultures is shown in Figure 3B. The reached accuracy was 77% (two latent variables).

In addition, the discrimination between samples of vestibular laminas of human maxillary bones and control cell culture with an accuracy of 100% (one latent variable) is depicted in Figure 3C. This discrimination is not very surprising since it can be explained by the different natures of in vitro bone models and real human bone tissues.

Mathematical analysis (PLS-DA – relative importance) indicated the most important protein for discrimination between the cancer bone cell model and the control bone cell model Galectin-1 (ID in Uniprot database - P09382). The level of galectin-1 was approximately 16 times increased on average in cancer bone in vitro model samples in comparison with control in vitro model culture samples. The increase of galectin-1 expression benefits tumor growth since it can modulate cell adhesion, migration, survival, and signaling [30]. Galectin-1 levels significantly increased in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma [31], ovarian cancer [32], and lung cancer [33]. Galectin-1 plays an important role in cancer progression with different mechanisms such as the ability to promote tumor growth through regulating hypoxia-inducible factor-1α [34] and the effect on tumor migration by mediating the Akt/mTOR signaling pathway [35].

Additionally, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (ID in Uniprot database – P12004), unconventional myosin-Id isoform X2 (ID in Uniprot database - O94832), and proteolipid protein 2 (ID in Uniprot database - Q04941) were identified in bone cell culture samples with induced cancer but not in the control cell culture group. PCNA is known as a famous marker in various tumors [36]. It has been extensively used in breast cancer diagnosis and prognosis [37, 38] and a higher level of PCNA expression also correlated with a shorter disease-free period [39]. PCNA expression was not detected in normal and inflammatory tissues, but a significant increase in expression was seen in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical squamous cell cancer [40]. Yang et al. (2015) demonstrated that cervical carcinoma high-expressed lncRNA 1 functions as an oncogene in cervical cancer that directly binds PCNA mRNA to enhance its expression [41]. Myosin-X, an unconventional myosin, has crucial functions in many cell processes including wound healing, filopodial formation, angiogenesis, the regulation of growth cone formation and turning, and invadopodia formation [42]. Recent studies reported that Myosin-X is upregulated via an EGR1-dependent pathway in mutant p53 breast tumors in aggressiveness and metastasis in patients with breast cancer [43, 44]. Moreover, protease-activated receptor 2 enhanced the expression of MYO10 in colorectal cancer to induce cell migration contributing to the invasion of cancer cells at the edge of the tumor [45]. Proteolipid protein 2 (PLP2) is an integral ion channel membrane protein of the endoplasmic reticulum [46]. PLP2 has been observed as an oncogene in some cancers such as multiple myeloma [47], human gliomas [48], malignant melanoma [49], renal cell carcinoma [50], and breast cancer [51]. High PLP2 levels are present in patients with disease progression and poor prognosis [47, 50].

4 | CONCLUDING REMARKS

The technique based on direct in-sample protein digestion in an insoluble matrix followed by LC-MS/MS analysis of released specific peptide fragments and mathematical analysis of the obtained MS data proved to be potentially applicable as a relatively simple and effective tool for the proteomic characterization of the bone cell mod-

els cultivated in vitro with different induced pathological conditions. This method could contribute to a better understanding of these processes at a molecular level. Additionally, it could help to develop a procedure for the routine characterization of human bone tissues in the field of oral surgery. Potentially, in the future, this method could be used as mostly automated complemental or alternative procedure towards traditional laborious and time-consuming histological evaluation requiring a highly experienced specialist – histologist.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the project from the Czech Ministry of Education, Youth and Sports Inter-Cost, grant number LTC19007, and by the Czech Academy of Sciences, project no. RVO 61388963. P.C. acknowledges support for algorithmic software optimization by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant LTAIN19007 development of advanced computational algorithms for evaluating post-surgical rehabilitation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available on request from the authors.

ORCID

Iva Michalus https://orcid.org/0000-0002-4311-6711
Jitka Viktorová https://orcid.org/0000-0003-0857-153X
Pavel Cejnar https://orcid.org/0000-0002-2369-651X
Jiří Šantrůček https://orcid.org/0000-0003-0832-757X
Štěpánka Kučková https://orcid.org/0000-0002-9974-7862
Petra Sázelová https://orcid.org/0000-0001-8391-4884
Václav Kašička https://orcid.org/0000-0003-1719-1432
Radovan Hynek https://orcid.org/0000-0002-6018-5321

REFERENCES

1. Křížková MC, Kučková SH, Šantrůček J, Hynek R. Peptide mass mapping as an effective tool for historical mortar analysis. Constr Build Mater. 2014;50:219–25. https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2013.09.059
2. Hynek R, Kučková S, Hradilová J, Kodíček M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a tool for fast identification of protein binders in color layers of paintings. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004;18:1896–900. https://doi.org/10.1002/rcm.1570
3. Smrhová T, Junková P, Kučková S, Suchý T, Supová M. Peptide mass mapping in bioapatites isolated from animal bones. J Mater Sci Mater Med. 2020;31:32. https://doi.org/10.1007/s10856-020-06371-z
4. Kučková S, Cejnar P, Šantrůček J, Hynek R. Characterization of proteins in cultural heritage using MALDI–TOF and LC–MS/MS mass spectrometric techniques. Phys Sci Rev. 2019;4–5:20180011. https://doi.org/10.1515/psr-2018-0011
5. Hrdličková Kučková S, Rambousková G, Hynek R, Cejnar P, Oltrogge D, Fuchs R. Evaluation of mass spectrometric data using principal component analysis for determination of the effects of organic lakes on protein binder identification. J Mass Spectrom. 2015;50:1270–8. https://doi.org/10.1002/jms.3699
6. Zeman A, Šmíd M, Havelcová M, Coufalová L, Kučková Š, Velčovská M, Hynek R. The structure and material composition of ossified aortic valves identified using a set of scientific methods. J Asian Earth Sci. 2013;77:311–7. https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2013.07.001
7. Michalusová I, Sázelová P, Cejnar P, Kučková Š, Hynek R, Kašička V. Capillary electrophoretic profiling of in-bone tryptic digests of proteins as a potential tool for the detection of inflammatory states in oral surgery. J Sep Sci. 2020;43:3949–59. https://doi.org/10.1002/jssc.202000718
8. Michalusová I, Trubačová D, Cejnar P, Kučková S, Šantrůček J, Hynek R. Direct tryptic cleavage in bone tissue followed by LC-MS/MS as a first step towards routine characterization of proteins embedded in alveolar bones. Int J Mass Spectrom. 2020;455:116375. https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375
9. Hynek R, Michalus I, Cejnar P, Šantrůček J, Seidlová S, Kučková Š, Sázelová P, Kašička V. In-bone protein digestion followed by LC-MS/MS peptide analysis as a new way towards the routine proteomic characterization of human maxillary and mandibular bone tissue in oral surgery. Electrophoresis 2021;42:2552–62. https://doi.org/10.1002/elps.202100211
10. Sieberath A, Della Bella E, Ferreira AM, Gentile P, Eglin D, Dalgarno K. A Comparison of osteoblast and osteoclast in vitro co-culture models and their translation for preclinical drug testing applications. Int J Mol Sci. 2020;21:912.
11. Borciani G, Montalbano G, Baldini N, Cerqueni G, Vitale-Brovarone C, Ciapetti G. Co–culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches. Acta Biomater. 2020;108:22–45. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.043
12. Penolazzi L, Lolli A, Sardelli L, Angelozzi M, Lambertini E, Trombelli L, Ciarpella F, Vecchiatini R, Piva R. Establishment of a 3D-dynamic osteoblasts–osteoclasts co-culture model to simulate the jawbone microenvironment in vitro. Life Sci. 2016;152:82–93. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.035
13. Jeon OH, Panicker LM, Lu Q, Chae JJ, Feldman RA, Elisseeff JH. Human iPSC-derived osteoblasts and osteoclasts together promote bone regeneration in 3D biomaterials. Sci Rep. 2016;6:26761 https://doi.org/10.1038/srep26761
14. Mandatori D, Penolazzi L, Pelusi L, Lambertini E, Michelucci F, Porreca A, Cerritelli P, Pipino C, Di Iorio A, Bruni D, Di Nicola M, Buda R, Piva R, Pandolfi A. Three-Dimensional Co-Culture system of human osteoblasts and osteoclast precursors from osteoporotic patients as an innovative model to study the role of nutrients: focus on vitamin K2. Nutrients 2021;13:2823.
15. Lambertini E, Penolazzi L, Pandolfi A, Mandatori D, Sollazzo V, Piva R. Human osteoclasts/osteoblasts 3D dynamic co-culture system to study the beneficial effects of glucosamine on bone microenvironment. Int J Mol Med. 2021;47:57. https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4890
16. Forte L, Torricelli P, Boanini E, Gazzano M, Rubini K, Fini M, Bigi A. Antioxidant and bone repair properties of

quercetin-functionalized hydroxyapatite: An in vitro osteoblast–osteoclast–endothelial cell co-culture study. Acta Biomater. 2016;32:298–308 https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.013
17. Dolci LS, Panzavolta S, Torricelli P, Albertini B, Sicuro L, Fini M, Bigi A, Passerini N. Modulation of Alendronate release from a calcium phosphate bone cement: An in vitro osteoblast-osteoclast co-culture study. Int J Pharm. 2019;554:245–55 https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.023
18. Hayden RS, Vollrath M, Kaplan DL. Effects of clodronate and alendronate on osteoclast and osteoblast co-cultures on silk–hydroxyapatite films. Acta Biomater. 2014;10:486–93 https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.028
19. Smieszek A, Marcinkowska K, Pielok A, Sikora M, Valihrach L, Marycz K. The Role of miR-21 in Osteoblasts–Osteoclasts coupling in vitro. Cells 2020;9:479.
20. Mercatali L, Spadazzi C, Miserocchi G, Liverani C, De Vita A, Bongiovanni A, Recine F, Amadori D, Ibrahim T. Development of a human preclinical model of osteoclastogenesis from peripheral blood monocytes co-cultured with breast cancer cell lines. JoVE 2017:e56311. https://doi.org/10.3791/56311
21. Lanning B, Webber J, Uysal-Onganer P, Jiang WG, Clayton A, Dart DA. Prostate cancer cell extracellular vesicles increase mineralisation of bone osteoblast precursor cells in an in vitro model. Biology 2021;10:318.
22. Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. FASEB J. 2005;19:1-26. https://doi.org/10.1096/fj.04-2529fje
23. Schmid FV, Kleinhans C, Schmid FF, Kluger PJ. Osteoclast formation within a human Co-Culture system on bone material as an in vitro model for bone remodeling processes. J Funct Morphol Kinesiol. 2018;3:17.
24. Marino S, Bishop RT, de Ridder D, Delgado-Calle J, Reagan MR. 2D and 3D In Vitro Co-Culture for cancer and bone cell interaction studies. Meth Mol Biol. 2019;1914:71–98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_5
25. Fasolino I, Raucci MG, Soriente A, Demitri C, Madaghiele M, Sannino A, Ambrosio L. Osteoinductive and anti-inflammatory properties of chitosan-based scaffolds for bone regeneration. Mater Sci Eng C. 2019;105:110046. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110046
26. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. Nat Protoc. 2016;11:2301–19. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136
27. Elias JE, Gygi SP, in: Hubbard SJ, Jones AR, editors. Proteome bioinformatics. Totowa, NJ: Humana Press; 2010, pp. 55–71.
28. Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. J Chemometr. 2003;17:166–73. https://doi.org/10.1002/cem.785
29. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2021.
30. Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. Cell Mol Life Sci. 2007;64:1679–700. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7044-8
31. Martinez-Bosch N, Barranco LE, Orozco CA, Moreno M, Visa L, Iglesias M, Oldfield L, Neoptolemos JP, Greenhalf W, Earl J, Carrato A, Costello E, Navarro P. Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: potential use as biomarker. Oncotarget 2018;9:32984–96. 10.18632/oncotarget.26034
32. Chen L, Yao Y, Sun L, Zhou J, Liu J, Wang J, Li J, Tang J. Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. J Ovar Res. 2015;8:78. https://doi.org/10.1186/s13048-015-0206-7
33. Carlini MJ, Roitman P, Nuñez M, Pallotta MG, Boggio G, Smith D, Salatino M, Joffé EDBdK, Rabinovich GA, Puricelli LI. Clinical relevance of galectin-1 expression in non-small cell lung cancer patients. Lung Cancer. 2014;84:73–8. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.01.016
34. Zhao X-Y, Chen T-T, Xia L, Guo M, Xu Y, Yue F, Jiang Y, Chen G-Q, Zhao K-W. Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. Carcinogenesis 2010;31:1367–75. https://doi.org/10.1093/carcin/bgq116
35. White NMA, Masui O, Newsted D, Scorilas A, Romaschin AD, Bjarnason GA, Siu KWM, Yousef GM. Galectin-1 has potential prognostic significance and is implicated in clear cell renal cell carcinoma progression through the HIF/mTOR signaling axis. Br J Cancer. 2014;110:1250–9. https://doi.org/10.1038/bjc.2013.828
36. Lv Q, Zhang J, Yi Y, Huang Y, Wang Y, Wang Y, Zhang W. Proliferating cell nuclear antigen has an association with prognosis and risks factors of cancer patients: a systematic review. Mol Neurobiol. 2016;53:6209–17. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9525-3
37. Chi J-R, Yu Z-H, Liu B-W, Zhang D, Ge J, Yu Y, Cao X-C. SNHG5 promotes breast cancer proliferation by sponging the miR-154-5p/PCNA axis. Mol Ther Nucl Acids. 2019;17:138–49. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.05.013
38. Malkas LH, Herbert BS, Abdel-Aziz W, Dobrolecki LE, Liu Y, Agarwal B, Hoelz D, Badve S, Schnaper L, Arnold RJ, Mechref Y, Novotny MV, Loehrer P, Goulet RJ, Hickey RJ. A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. Proc Natl Acad Sci. 2006;103:19472–7. https://doi.org/10.1073/pnas.0604614103
39. Juríková M, Danihel Ľ, Polák Š, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. Acta Histochem. 2016;118:544–52. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002
40. Wang J-L, Zheng B-Y, Li X-D, Ångström T, Lindström MS, Wallin K-L. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. Clin Cancer Res. 2004;10:2407–14. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0242
41. Yang M, Zhai X, Xia B, Wang Y, Lou G. Long noncoding RNA CCHE1 promotes cervical cancer cell proliferation via upregulating PCNA. Tumor Biol. 2015;36:7615–22. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3465-4
42. Courson DS, Cheney RE. Myosin-X and disease. Exp Cell Res. 2015;334:10–5. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.03.014
43. Arjonen A, Kaukonen R, Mattila E, Rouhi P, Högnäs G, Sihto H, Miller BW, Morton JP, Bucher E, Taimen P, Virtakoivu R, Cao Y, Sansom OJ, Joensuu H, Ivaska J. Mutant p53-associated myosin-X upregulation promotes breast cancer invasion and metastasis. J Clin Invest. 2014;124:1069–82. https://doi.org/10.1172/jci67280
44. Cao R, Chen J, Zhang X, Zhai Y, Qing X, Xing W, Zhang L, Malik YS, Yu H, Zhu X. Elevated expression of myosin X in tumours contributes to breast cancer aggressiveness and metastasis.

Br J Cancer. 2014;111:539–50. https://doi.org/10.1038/bjc.2014.298
45. Zhang X, Fang Q, Ma Y, Zou S, Liu Q, Wang H. Protease activated receptor 2 mediates tryptase-induced cell migration through MYO10 in colorectal cancer. Am J Cancer Res. 2019;9:1995–2006.
46. Feng Z, Zhou W, Wang J, Qi Q, Han M, Kong Y, Hu Y, Zhang Y, Chen A, Huang B, Chen A, Zhang D, Li W, Zhang Q, Bjerkvig R, Wang J, Thorsen F, Li X. Reduced expression of proteolipid protein 2 increases ER stress-induced apoptosis and autophagy in glioblastoma. J Cell Mol Med. 2020;24:2847–56 https://doi.org/10.1111/jcmm.14840
47. Bai H, Zhu Y, Xu P, Chen B. PLP2 expression as a prognostic and therapeutic indicator in high-risk multiple myeloma. Bio Med Res Int. 2020;2020:1. https://doi.org/10.1155/2020/4286101
48. Chen Y-H, Hueng D-Y, Tsai W-C. Proteolipid protein 2 overexpression indicates aggressive tumor behavior and adverse prognosis in human gliomas. Int J Mol Sci. 2018;19:3353.
49. Ding Z, Jian S, Peng X, Liu Y, Wang J, Zheng L, Ou C, Wang Y, Zeng W, Zhou M. Loss of MiR-664 expression enhances cutaneous malignant melanoma proliferation by upregulating PLP2. Medicine 2015;94:e1327. https://doi.org/10.1097/md.0000000000001327
50. Xiao W, Wang C, Chen K, Wang T, Xing J, Zhang X, Wang X. MiR-765 functions as a tumour suppressor and eliminates lipids in clear cell renal cell carcinoma by downregulating PLP2. EBio Med. 2020;51:102622. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.102622
51. Zou Y, Chen Y, Yao S, Deng G, Liu D, Yuan X, Liu S, Rao J, Xiong H, Yuan X, Yu S, Zhu F, Wang Y, Xiong H. MiR-422a weakened breast cancer stem cells properties by targeting PLP2. Cancer Biol Ther. 2018;19:436–44 https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1433497

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Michalus I, Van Nguyen T, Viktorová J, Cejnar P, Šantrůček J, Kučková Š, Sázelová P, Kašička V, Hynek R. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of peptides separated from the insoluble matrix by in-sample tryptic protein digestion for rapid discrimination of various induced pathological states of human bone models in oral surgery. J Sep Sci. 2022;45:4388–4396. https://doi.org/10.1002/jssc.202200694

Received: 2 July 2020 | Revised: 4 August 2020 | Accepted: 6 August 2020

DOI: 10.1002/jssc.202000718

JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE

RESEARCH ARTICLE

Capillary electrophoretic profiling of in-bone tryptic digests of proteins as a potential tool for the detection of inflammatory states in oral surgery

Iva Michalusová[1,*] | **Petra Sázelová**[2,*] | **Pavel Cejnar**[3] | **Štěpánka Kučková**[4] | **Radovan Hynek**[4] | **Václav Kašička**[2]

[1] First Faculty of Medicine of Charles University, Prague, Czech Republic

[2] Department of Electromigration Methods, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

[3] Department of Computing and Control Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic

[4] Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic

Correspondence
Dr. Václav Kašička, Department of Electromigration Methods, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo n. 2, 166 10 Prague 6, Czechia.
Email: kasicka@uochb.cas.cz
Prof. Dr. Radovan Hynek, Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czechia
Email: hynekr@vscht.cz

*Iva Michalusová and Petra Sázelová contributed equally to this work.

The commonly used histological assessment of pathological states of alveolar bone tissues in oral surgery needs laborious and time-consuming processing by an experienced histologist. Therefore, a simpler and faster methodology is required in this field. Following this demand, this paper reports a straightforward approach using the tryptic cleavage of proteins directly in bone without its demineralization, followed by the capillary electrophoresis-ultraviolet detection profiling of the yielded protein digest. Cleavage-derived peptides were separated by capillary electrophoresis in acidic background electrolytes, pH 2.01–2.54. The best resolution of peptide fragments with the highest peak capacity was achieved in the background electrolyte composed of 55 mM H_3PO_4, 14 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH 2.01. The differences in the obtained capillary electrophoresis-ultraviolet detection profiles with characteristic patterns for particular bone samples were subsequently discriminated by linear discriminant analysis over principal components. This approach was first verified on porcine bone tissues as model samples; jawbone and calf bone tissues could be discriminated with an accuracy of 100%. Subsequently, the method was capable of differentiating unequivocally between human healthy and inflammatory alveolar bone tissues obtained from oral surgery. This procedure seems to be promising as complement or even an alternative to the traditional histological discrimination between healthy and inflammatory bone tissues in oral surgery.

KEYWORDS
alveolar bones, capillary electrophoresis, in-bone protein digestion, linear discriminant analysis, principal component analysis

1 | INTRODUCTION

The traditional histological evaluation of bone tissues requires very complicated sample processing involving their time-consuming demineralization followed by a laborious assessment by an experienced histologist. This makes the waiting time for a qualified diagnosis too long, which brings complications and could often even represent a health risk. For this reason, a fast, inexpensive and automatically interpretable technique would be welcome in the field of oral surgery.

Article Related Abbreviation: PCA-LDA, linear discriminant analysis over principal components

 © 2020 Wiley-VCH GmbH

A promising approach could be the use of a specific proteolytic cleavage followed by analysis of the resulting peptide fragments by chromatographic or electrophoretic methods and/or by MS. However, the major challenge in the proteomic analysis of hard dental tissues is that the proteins to be analyzed are embedded in an insoluble matrix. Some of them can be extracted for LC, CE, or MS analysis [1], but a significant number remain entrapped in the bone structure. Another approach is the demineralization of hard dental tissue [2,3] or dentoalveolar tissue [4,5]. Nevertheless, since this procedure involves many steps and is excessively time consuming, its implementation would not bring significant advantages over the above-mentioned histological techniques. An additional problem, resolved by neither of these approaches, is the poor solubility of the numerous matrix proteins in the hard tissues [2].

For any new technique to have a chance of being implemented as a diagnostic method in routine oral surgery practice, it must respect the "keep-it-simple" principle. Our goal was to investigate the development of a simple technique that would enable quick discrimination between healthy and inflammatory states of bone tissues in the field of oral surgery. The possibility of a specific cleavage of proteins contained in gel without the need for their isolation was described by Shevchenko et al. as the so-called in-gel digestion [6]. A similar straightforward technique using digestion with trypsin directly in the insoluble matrix has also been described for the analysis of proteins in some other materials [7,8]. A promising approach using the direct tryptic cleavage of porcine bone tissues followed by LC–MS/MS has recently been reported [9]. In the case of direct in-bone digestion, relatively small molecules of trypsin (molar mass 23.8 kg/mol) can penetrate the porous structure of the bone tissue and digest the embedded proteins. Subsequently, the released peptide fragments diffuse into the solution, after which they can be analyzed. The advantage of LC–MS/MS analysis is the possibility to identify the individual proteins, but its deficiency is that it is less available than the cheaper, more affordable, and more straightforward technique — CE with UV-absorption detection. Additionally, CE has a higher potential to distinguish between the samples containing components differing in their charge numbers/states (e.g. singly or multiply phosphorylated and non-phosphorylated forms of proteins) [10] than the LC methods with MS detection, where the analysis of phosphorylated proteins is complicated because of problems with their ionization. These problems need to be solved, e.g. by in-situ peptide enrichment [11].

CE is a powerful separation method with wide applicability in the analysis of proteins [12,13] and peptides [14,15], including their complex mixtures in proteomic, peptidomic, and metabolomic studies [16–20]. CE–UV and CE–MS profiling of complex protein mixtures, such as proteins in biological fluids, various human, animal, and plant tissues, and food extracts, enables differentiation of the origin and character of these samples, e.g. healthy or sick, wild or transgenic, original or falsified, etc. In addition to CE profiling of the extracts of the whole proteins, complex protein mixtures can be evaluated using a shot-gun proteomic approach [21]. Following this methodology, the proteins are first enzymatically hydrolyzed into peptide fragments and the produced complex peptide mixtures are separated by HPLC and/or CE methods. The obtained mixture of peptides is thus more complex than the original mixture of proteins. Nevertheless, since peptides are easier to separate by CE and detect by MS than proteins, more peptides and proteins can be identified. Peptide and protein identifications are achieved by comparing the MS/MS spectra derived from peptide fragmentation with the theoretical MS/MS spectra generated from the in silico digestion of a protein database. This approach is frequently used for the investigation of complex protein/peptide mixtures in proteomic/peptidomic studies [22-24] as well as for the characterization of particular proteins by their peptide maps [25, 26]. From proteolytic enzymes, trypsin is the most frequently used for protein digestion because of its high specificity of the cleavage peptide bond behind Lys and Arg amino acid residues. For example, tryptic digest peptide mapping has been used for the CE profiling of normal and some pathological hemoglobins [27], for the fast detection of the phosphorylation of human and porcine pepsinogens [10], and for the discrimination of wild and genetically modified maize varieties [28]. Native and glycated proteins have been distinguished by the analysis of their tryptic digests by open-tubular capillary electrochromatography with the salophene-lanthanide-Zn^{2+} complex as stationary phase [29] or with bare gold nanoparticles-based stationary phase [30]. The CE monitoring of in-line tryptic digestion has recently been applied for the analysis of polylysine-drug conjugate [31].

For the statistical analysis of the CE–UV profiles recorded, either the peaks can be extracted from normalized and registered profiles and the subsequent analysis is run on the peak values only, as is common in MS-related techniques [32], or the analysis can be run over the whole profiles [33] for the techniques where the peak positions are not easily distinguishable. The principal component analysis (PCA) of sample data vectors then provides an overview of the significant sources of variance in the experiment. If these sources of variance match the pre-defined division of samples into the groups studied, the subsequent application of linear discriminant analysis (LDA) could lead to an effective classifier. Otherwise, a more powerful

TABLE 1 The composition, pH, and mobility of electroosmotic flow, μ_{eof}, of the used background electrolytes (BGEs) 1–5, and the electric current, I, of the CE experiments performed at the separation voltage 12 kV, and the capillary coolant temperature 20°C

BGE	Composition	pH	$\mu_{eof} \times 10^9$ [$m^2\ V^{-1}\ s^{-1}$]	I [μA]
BGE 1	500 mM acetic acid	2.54	14.6	6
BGE 2	2 M acetic acid	2.21	8.7	10
BGE 3	200 mM acetic acid, 200 mM formic acid	2.20	12.7	13
BGE 4	200 mM iminodiacetic acid	2.26	7.3	23
BGE 5	55 mM H_3PO_4, 14 mM Tris	2.01	4.7	25

techniques, such as the partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) [34,35] can be employed.

The objective of the current work was to develop suitable experimental conditions for the enzymatic (tryptic) direct in-bone digestion of proteins on a microscale followed by CE separation with the UV-absorption detection of the cleavage-generated complex mixtures of peptides. The obtained CE–UV profiles of the tryptic protein digests should be, after baseline adjustment and normalization, statistically evaluated by the linear discriminant analysis over principal components (PCA-LDA), with the aim to find qualitative and/or quantitative differences in the CE–UV profiles and to identify the samples originating from different types of bone tissues. This approach could be potentially used for the discrimination of healthy and inflammatory or other pathological states of human alveolar bone tissues in maxillofacial surgery.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemicals

All the chemicals used were of analytical reagent grade. Phosphoric, formic, and acetic acids, sodium hydroxide, and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Lachema (Brno, Czechia). Iminodiacetic acid was obtained from Sigma (Prague, Czechia) and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) was supplied by Serva (Heidelberg, Germany). Propan-2-ol (hypergrade for LC–MS) was provided by Merck (Darmstadt, Germany). Tyramine hydrochloride (used as the internal standard in CE analyses) and ammonium hydrogencarbonate were purchased from Fluka (Buchs, Germany). The background electrolytes (BGEs) were prepared from particular chemicals and Milli-Q water and filtered through a 0.45 μm filter (Millipore, Bedford, MA, USA) prior to use. Porcine Pierce™ Trypsin Protease, MS Grade (TPCK treated), was supplied by Thermo Scientific™ (Waltham, MA, USA). Bovine Pierce™ Chymotrypsin Protease (TLCK treated), MS Grade, was supplied by Thermo Scientific™.

2.2 | Bone samples

Porcine bone samples were obtained from a local slaughterhouse. After a routine slaughter, the bones were placed in a box with dry ice and transported. Human alveolar bone samples were collected as surgery leftovers. All samples were stored at –80°C before processing.

2.3 | Specific cleavage of bone samples

Approximately 2 mg of each alveolar bone sample (porcine jawbone, porcine calf bone and human jawbones from healthy and inflammatory tissues) were placed in a 1.5 mL Eppendorf tube (each sample was treated in a separate Eppendorf tube). Six samples of each bone were then incubated for 30 min at the temperature of 50°C in 1 mL of propan-2-ol under shaking at 700 rpm in a thermomixer compact (Eppendorf). The supernatant was then removed by a pipette. Subsequently, all samples were incubated in 1 mL of 50 mM ammonium hydrogencarbonate (NH_4HCO_3) solution in Milli-Q water at laboratory temperature for 5 min. After the supernatant was removed again, specific digestion was carried out in 25 μL (the samples were submerged) of a solution of either 20 μg/mL sequencing grade trypsin in 50 mM NH_4HCO_3 at 37°C for 3 h or using 20 μg/mL solution of chymotrypsin under the same conditions as those applied for digestion by trypsin. Specific digestion was performed without the reduction and alkylation of disulfide bonds in order to simplify and speed up sample preparation. The bone substrate was then removed from the samples with tweezers and the remaining solution containing the released peptides was centrifuged for 5 min in a table microspin centrifuge (Eppendorf) at 9700 × g; the supernatant was transferred to 0.2 mL Eppendorf PCR tubes and dried in a thermomixer at 50°C without shaking for approximately 2 h.

2.4 | Capillary electrophoresis

CE analyses were carried out in a P/ACE MDQ System (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). Data acquisition and evaluation were performed using the P/ACE System MDQ software, Karat version, supplied by Beckman, and a Clarity chromatographic and electrophoretic station (DataApex, Prague, Czechia). The CE apparatus was

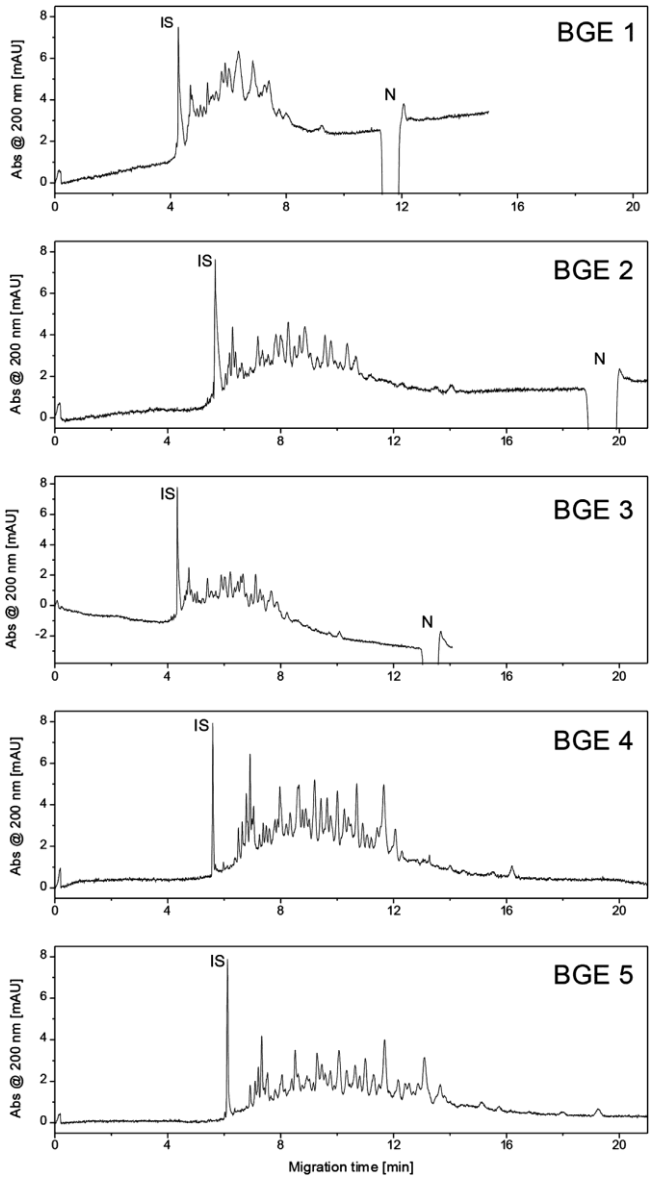


FIGURE 1 The original CE-UV profiles (with no data pretreatment) of tryptic peptide fragments of in-bone digested proteins from porcine calf bone in the BGEs 1–5. IS, the internal standard (0.02 mM tyramine hydrochloride); N, the negative peak in the position of the electroosmotic flow marker (water). For the composition of the BGEs and other experimental conditions, see Table 1 and Section 2.4

equipped with a UV-vis spectrophotometric photodiode array detector (190–600 nm) set at the detection wavelength 200 nm. The CE analyses were performed in an internally uncoated fused silica capillary (total/effective length 40/30 cm, id/od 50/375 μm) with an outer polyimide coating (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA).

A new capillary was consecutively washed with 1 M NaOH, water, and the BGE with 2 bar pressure for 5 min each, and then conditioned in the BGE at a separation voltage of 12 kV for 10 min. Between analytical runs, the capillary was gradually rinsed with 1 M NaOH (1 bar × 5 min), water (2 bar × 2 min), and BGE (2 bar × 2 min).

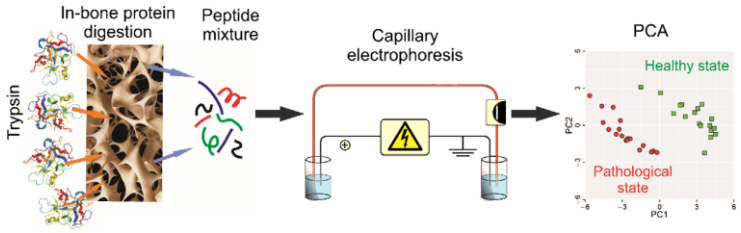


FIGURE 2 A scheme of the workflow

The capillary was thermostated by a circulating liquid coolant to 20°C.

The dried samples of protein tryptic digests were dissolved in 10 μL of Milli-Q water containing an internal standard (IS), tyramine hydrochloride, at the concentration of 0.02 mM. The samples were injected hydrodynamically with 13.8–20.7 mbar pressure for 10–20 s. The CE analyses were performed at the separation voltage of 12 kV and the electric current of 6–25 μA. The composition of the BGEs used as well as other experimental conditions of the CE analyses are presented in Table 1. For each processed sample, three technical replicates were run on CE.

2.5 | Mathematical analysis of CE–UV profiles

All the statistical analyses were run in R for Windows software [36] version 3.6.2.

2.5.1 | Baseline adjustment

To compare the intensity values from the recorded CE–UV profile, the linear baseline was first estimated and adjusted using a two-step algorithm: The recorded profile was re-interpolated to obtain $I(t)$ intensities in 2^{15} equidistant points covering the migration time from 0 to 20 min. The temporal normalization factor was estimated as $|\max I(t)| - |\text{median} I(t)|$ and the I(t) values were divided by the temporal normalization factor to scale the intensities to a comparable range, resulting in *scaledI*(t) values. Coefficients a, b for the best-matching baseline $a \cdot t + b$ for *scaledI(t)* were obtained using the Levenberg–Marquardt algorithm (R package 'minpack.lm' version 1.2.1) minimizing the sum of the squares of *scaledI(t)* and $a \cdot t + b$ values. The subtraction of $a \cdot t + b$ was followed by the second baseline estimation $c \cdot t + d$. Here, only the intensity values below twice the median value (i.e. disregarding the values of high peaks) were used for a better estimation of the baseline. The second estimated baseline was also subsequently subtracted. The intensities were then multiplied by the previously used temporal normalization factor to obtain intensities similar to the original intensity range.

2.5.2 | CE-UV profile registration

After baseline adjustment, one profile was selected as the template profile, to which all the other sample profiles were registered. Each profile was divided by its max $I(t)$ value to obtain relative intensity values *relI*(t). Using the Levenberg-Marquardt algorithm (R package "minpack.lm" version 1.2.1) the best-matching coefficients A, B, C, and D were obtained, minimizing the sum of the squares of $relI_{\text{template}}$ (t_{template}) and the intensity values $C \cdot relI_{\text{sample}}(A \cdot t_{\text{template}} + B) + D$, employing linear registration in both the time component ($A \cdot t_{\text{template}} + B$) and the intensity component ($C \cdot relI_{\text{sample}}(t_{\text{sample}}) + D$). All the registered profiles were finally examined visually to confirm the determined normalization coefficients. The scripts for baseline adjustment and the CE–UV profile registration used can be downloaded at: http://uprt.vscht.cz/capillary_electrophoresis.

2.5.3 | Principal component analysis, linear discriminant analysis

Principal component analysis was run on the *relI*(t) intensities of registered profiles including all three technical replicates for each sample. The analysis was carried out in R for Windows together with the multiMS-toolbox version 2.09 [33, 37] and visualized using ggplot2 R package (version 3.2.1).

For linear discriminant analysis over principal components (PCA-LDA), the *relI*(t) intensities of three CE-UV technical replicates for each sample were first averaged and the analysis was carried out using the R package "caret" version 6.0.85. Data vectors were centered and the points with zero variance among the samples were

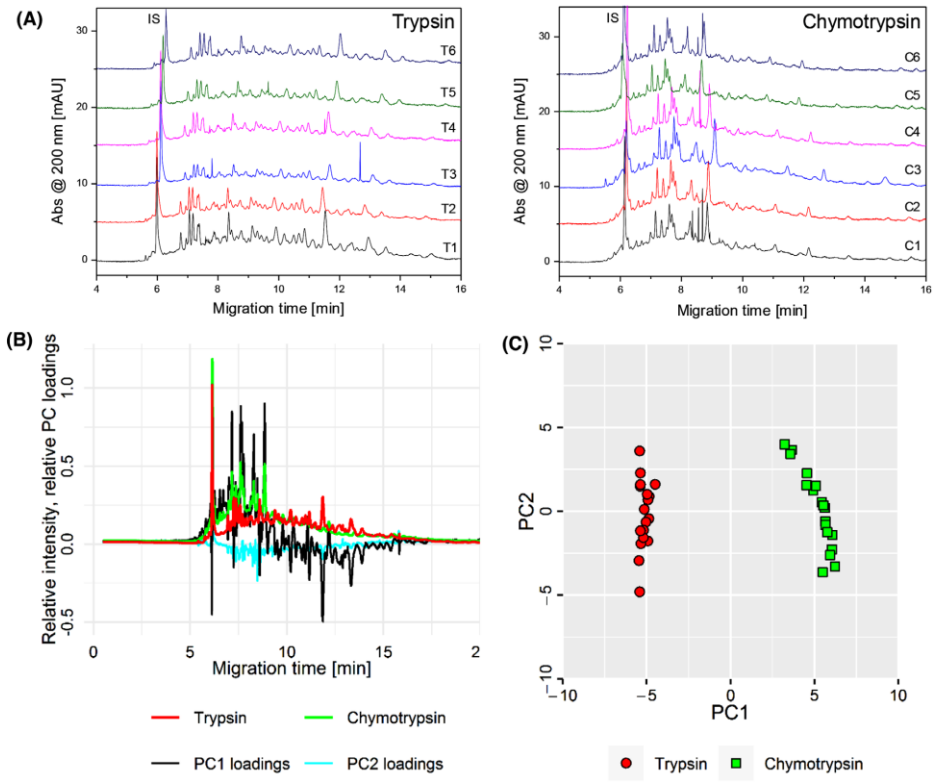


FIGURE 3 (A) The original CE–UV profiles (with no data pretreatment) of porcine jawbone protein samples in-bone digested by trypsin (left records) and by chymotrypsin (right records) in the BGE 5. IS, the internal standard (0.02 mM tyramine hydrochloride). For the BGE 5 composition and other experimental conditions, see Table 1 and Section 2.4. (B) The baseline-adjusted and registered CE-UV profiles of trypsin and chymotrypsin digested samples and the relative loadings of the first two principal components. (C) A PCA score plot for the baseline-adjusted and registered CE-UV profiles of all technical replicates of samples digested by trypsin and chymotrypsin

removed. Eleven samples were then used for the training of the PCA-LDA classifier and one sample was used for validation, repeating the procedure twelve times (once for each different sample, i.e. leave-one-out cross-validation), and the overall accuracy of the model was computed.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | The optimization of the CE method

With respect to the character of the tryptic peptide fragments of in-bone digested proteins (solubility, high charge, and size variability, the wide range of isoelectric points) and considering our experience with previous CE separations of the tryptic digests of proteins in acidic conventional and isoelectric buffers [28], we have decided to analyze these peptides by CE in strongly acidic BGEs, pH 2.0–2.5, free of any additives, because the previously tested additives (hydroxypropylcellulose, hydroxyethylcellulose, polyvinylalcohol, and methanol) did not improve the separation of the analyzed proteins and peptides. In the strongly acidic BGEs applied, most of the tryptic peptides are positively charged and separated as cations based on their different charge/size ratio. The advantage of low-pH BGEs is that the dissociation of the silanol groups of the bare fused silica capillary is suppressed, which reduces the adsorption of positively charged peptides onto the inner capillary wall and preserves the high separation efficiency of CE. Three types of acidic BGEs have been tested: (i) the BGEs composed of highly concentrated weak acids: acetic acid and the acetic/formic acids mixture, (ii) isoelectric

BGE (iminodiacetic acid), and (iii) classical acid/salt-based BGE (Tris-phosphate). The full composition of the BGEs tested as well as the other experimental conditions of CE analyses are presented in Table 1.

First, a tryptic digest of proteins from the porcine calf bone (available in high amount) was used for the development and optimization of the suitable BGE composition and other CE separation conditions. Representative records of the CE separations of the tryptic digests of pig calf bone proteins in the above BGEs 1–5 (see Table 1) are presented in Figure 1. The number of fully or at least partially resolved peaks with the signal/noise ratio > 3 (further referred to as "resolved peaks") varied from 23–32 in the highly concentrated weak acids-based BGEs 1–3 (0.5 or 2 M acetic acid, and 200/200 mM acetic/formic acids, pH 2.54–2.20, respectively) to 39–42 in the isoelectric BGE 4 (0.2 M iminodiacetic acid, pH 2.26), and up to 43–46 in the classical Tris/phosphate BGE 5 (55 mM H_3PO_4, 14 mM Tris, pH 2.01). Based on these results, the BGE 5, providing the highest number of resolved peaks (peak capacity), was selected for further comparative analyses of tryptic and chymotryptic peptide fragments of in-bone digested proteins from porcine jawbone and for comparative analyses of tryptic digests of proteins from porcine jawbone and calf bone.

3.2 | Analysis workflow

Based on the assumption that the specific peptide fragments generated by the direct in-bone enzymatic (tryptic or chymotryptic) digestion of proteins and released in this way into the surrounding cleavage solution could be separated by CE with the subsequent PCA and PCA-LDA evaluation of normalized CE-UV profiles, we have suggested a simple workflow containing several routine steps and automated mathematical (statistical) analysis (see Figure 2). This workflow was first tested using porcine bone samples, available in relatively high amounts.

The sliced alveolar bone samples were partially covered by blood. In terms of our aim, the soluble (mainly blood) proteins represented undesirable contamination, which could hinder the acquisition of the characteristic pattern of proteins firmly captured in the bone matrix. Prior to tryptic or chymotryptic digestion, we thus minimized the concentration of blood proteins in each sample by washing them with propan-2-ol (see Section 2.3 for details).

The differences between the CE–UV profiles of peptide fragments from porcine jawbone proteins cleaved with trypsin (left records) and chymotrypsin (right records) are obvious both from the individual CE–UV profiles of six independently prepared samples of tryptic and chymotryptic protein digests shown in Figure 3A and from the averaged normalized profiles shown in Figure 3B. Subsequent PCA analysis of the averaged CE–UV profiles of tryptic and chymotryptic protein digests showed no outliers as an artifact of improper normalization (see Figure 3C). Loadings for the first and second principal component identified visual changes in peak intensities as the most important factor of variance for normalized profiles (see Figure 3B). Subsequent linear discriminant analysis over principal components (PCA-LDA) carried out on profiles averaged over technical replicates was able to reach the accuracy of 100% for the discrimination of both groups of samples using leave-one-out cross-validation. This finding was not surprising, because the cleavage sites of trypsin and chymotrypsin are rather different and strongly different patterns could thus be expected. This successful discrimination of these two peptide mixtures was important for the verification of the suggested approach.

A comparison of CE–UV profiles and the PCA of protein digests from porcine jawbone and calf bone samples, both in-bone digested by trypsin, is depicted in Figure 4. Since the proteins of these samples come from the bones of the same species (pig) and were cleaved with the same enzyme, trypsin, the digests contained mixtures of more similar peptide fragments than in the case of tryptic and chymotryptic digests of the same bones. This was reflected in fewer visually observed differences in the CE–UV profiles of these samples (see Figure 4A and B), than in the CE–UV profiles of the tryptic/chymotryptic samples shown in Figure 3A and B. Despite this fact, PCA-LDA was still able to distinguish between these two different bone samples based on both qualitative (peak migration times) and quantitative (peak areas) differences in the obtained patterns with 100% accuracy. Loadings for the first two principal components confirm that the most important sources of variance are the identified peaks in the profiles (see Figure 4B and C).

The findings above have indicated the capability of the suggested procedure to distinguish between bone samples with different protein levels. Since differences in protein levels in healthy bone tissue and bone in pathological states may be expected, we have applied this procedure for the analysis of human jawbone samples from healthy and inflammatory bone tissues. The CE–UV profiles of these samples are shown in Figure 5.

The differences in electropherograms may be observed in Figure 5A and the identified differences in normalized profiles in Figure 5B. The subsequent discrimination analysis (PCA-LDA) of six samples of healthy jawbone and six samples of inflammatory jawbone obtained from 12 different people was able to discriminate between both groups of samples with 100% accuracy (see also Figure 5C).

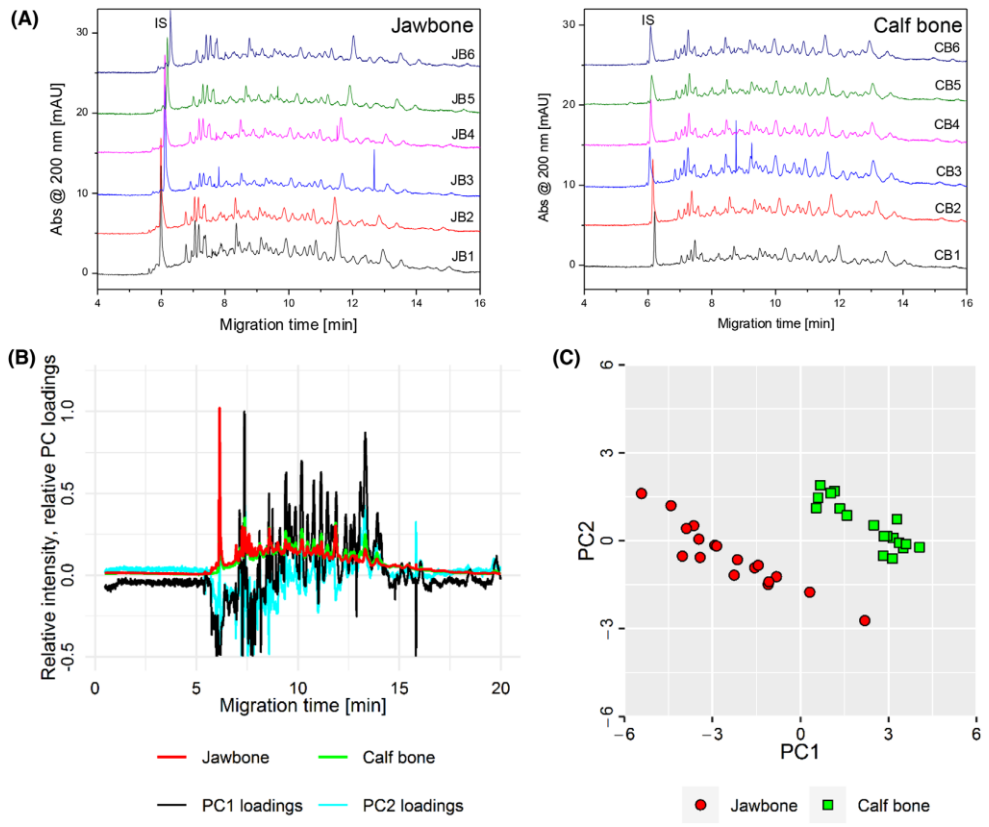


FIGURE 4 (A) The original CE–UV profiles (with no data pretreatment) of tryptic digests of proteins from porcine jawbone (left records) and calf bone samples (right records) in the BGE 5. IS, the internal standard (0.02 mM tyramine hydrochloride). For the BGE 5 composition and other experimental conditions, see Table 1 and Section 2.4. (B) The baseline-adjusted and registered CE–UV profiles of tryptic digests of proteins of the above jawbone and calf bone samples and the relative loadings of the first two principal components. (C) A PCA score plot for the baseline-adjusted and registered CE–UV profiles of all technical replicates of jawbone and calf bone samples

As can be seen from Figure 5B, the identified sources of inter-group variance depicted by relative loadings for the first two principal components correspond to the peaks in the profiles and vary in their intensities. The 100% degree accuracy is promising for future applications because it indicates that this technique could have a diagnostic potential based on the characteristic patterns of jawbone in healthy and inflammatory or other potential pathological states. The specific in-bone digestion is so simple that it could be performed routinely in oral surgery practice. The use of CE for the separation step is also a significant advantage because this technique is faster, easier and generally more available than the more powerful but more expensive and less available MS methods. An additional advantage of CE is the fact that the phosphorylation degree of peptides/proteins, resulting in relevant charge/size ratio (mobility) differences, is better manifested by the differences in CE–UV profiles than by the differences in the MS spectra due to problems with the suppressed ionization of phosphorylated peptides. The possibility of using CE to discriminate between peptide/protein samples based on different phosphorylation status is very important because changes in protein phosphorylation may often be characteristic of some inflammatory or other pathological processes.

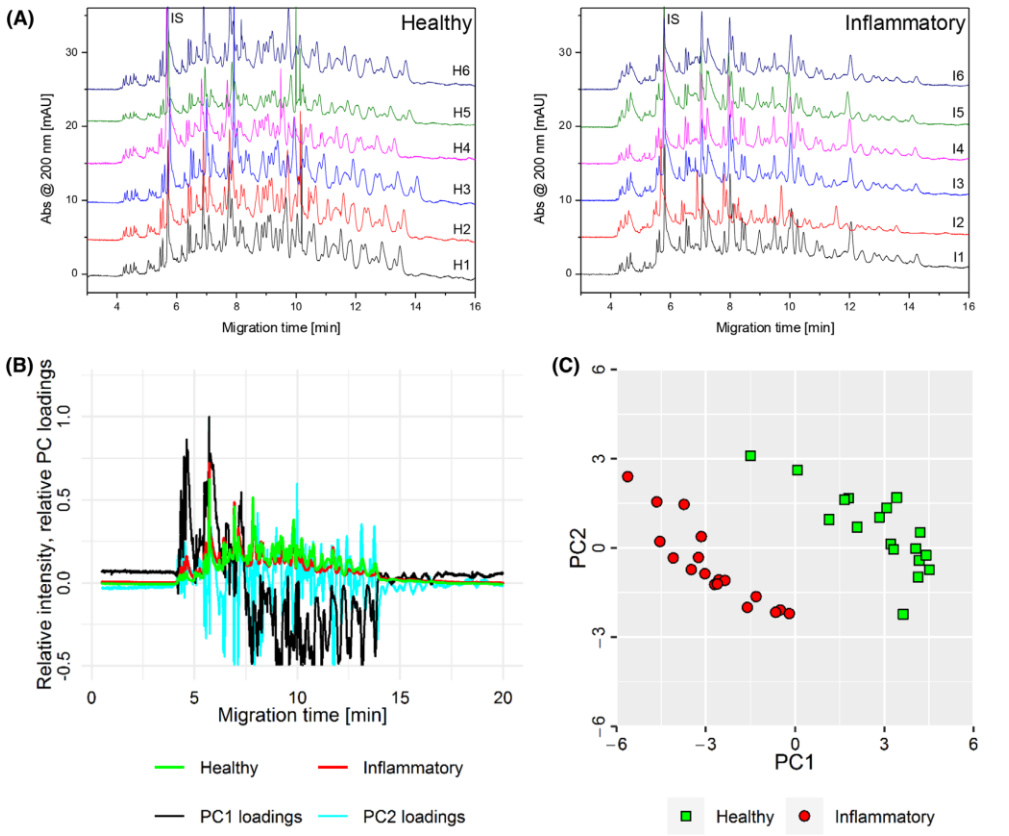


FIGURE 5 (A) The original CE–UV profiles (with no data pretreatment) of tryptic digests of proteins from human jawbone samples taken from healthy tissue (left records) and inflammatory tissue (right records) in the BGE 5. IS, the internal standard (0.02 mM tyramine hydrochloride). For the BGE 5 composition and other experimental conditions, see Table 1 and Section 2.4. (B) The baseline-adjusted and registered CE–UV profiles of tryptic digests of proteins of the healthy and inflammatory tissues of the human jawbone and the relative loadings of the first two principal components. (C) A PCA score plot for the baseline-adjusted and registered CE–UV profiles of all technical replicates of human jawbone samples taken from healthy and inflammatory tissues

4 | CONCLUDING REMARKS

We have developed a new straightforward, very fast and inexpensive procedure, which in future could be used as a useful complement or in some cases even an alternative to the traditional histological assessment of bone tissues in the field of oral surgery. Sample processing is rather easy; it could be performed by a technical assistant in a chemical laboratory. The method would be able to provide results within several hours. Whereas traditional histology of bone tissues (after time-consuming and complicated sample processing) requires assessment by an experienced histologist, the evaluation of CE–UV profiles can be automated, thus excluding the possibility of human errors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the Czech Science Foundation, project no. 20–03899S, and by the Czech Academy of Sciences, project no. 61388963. P.C. acknowledges support for algorithmic software optimization by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant LTAIN19007 Development of Advanced Computational Algorithms for Evaluating Post-surgery Rehabilitation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

ETHICAL STATEMENT

The authors declare that the approval of the local ethical committee has been received and that the informed consent of all participating subjects has been obtained. The permission of the local authority (Ethical Committee) is attached.

ORCID

Štěpánka Kučková https://orcid.org/0000-0002-9974-7862
Václav Kašička https://orcid.org/0000-0003-1719-1432

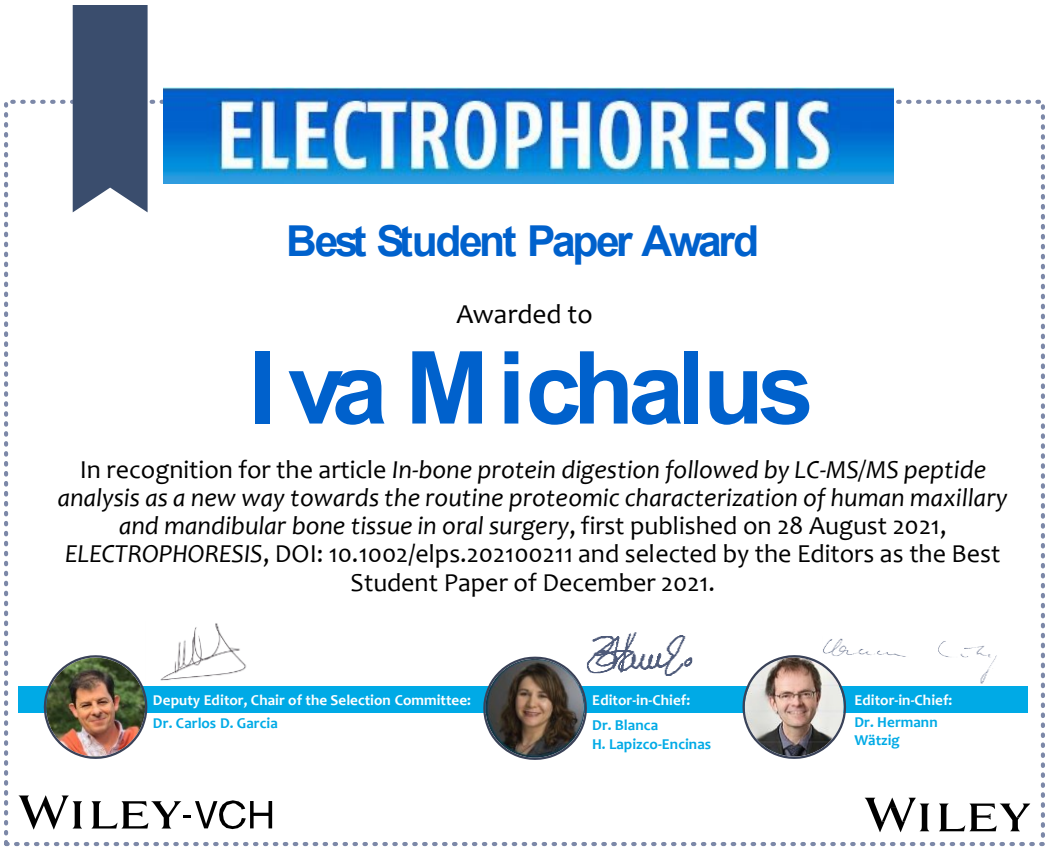
REFERENCES

1. Salmon C. R., Tomazela D. M., Ruiz K. G. S., Foster B. L., Leme A. F. P., Sallum E. A., Somerman M. J., Nociti F. H., Proteomic analysis of human dental cementum and alveolar bone. J Proteomics. 2013;91:544–555.
2. Termine J. D., Belcourt A. B., Christner P. J., Conn K. M., Nylen M. U., Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins .1. Principal molecular-species in developing bovine enamel. J Biol Chem. 1980;255:9760–9768.
3. Hubbard M. J., Kon J. C., Proteomic analysis of dental tissues. J Chromatogr B 2002;771:211–220.
4. Salmon C. R., Giorgetti A. P. O., Leme A. F. P., Domingues R. R., Kolli T. N., Foster B. L., Nociti F. H., Microproteome of dentoalveolar tissues. Bone 2017;101:219–229.
5. Savi F. M., Brierly G. I., Baldwin J., Theodoropoulos C., Woodruff M. A., Comparison of different decalcification methods using rat mandibles as a Model. J Histochem Cytochem. 2017;65:705–722.
6. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M., Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. Anal Chem. 1996;68:850–858.
7. Hynek R., Kučková S., Hradilová J., Kodíček M., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a tool for fast identification of protein binders in color layers of paintings. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004;18:1896–1900.
8. Kučková S., Crhová M., Vaňková L., Hnízda A., Hynek R., Kodíček M., Towards proteomic analysis of milk proteins in historical building materials. Int J Mass Spectrom. 2009;284:42–46.
9. Michalusová I., Trubačová D., Cejnar P., Kučková S., Santrůček J., Hynek R., Direct tryptic cleavage in bone tissue followed by LC-MS/MS as a first step towardsroutine characterization of proteins embedded in alveolar bones. Int J Mass Spectrom. 2020;455: https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375.
10. Hynek R., Kašička V., Kučerová Z., Káš J., Fast detection of phosphorylation of human pepsinogen A, human pepsinogen C and swine pepsinogen using a combination of reversed- phase high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for peptide mapping. J Chromatogr B 1997;688:213–220.
11. Krásný L., Pompach P., Strnadová M., Hynek R., Valis K., Havlíček V., Novák P., Volný M., High-throughput workflow for identification of phosphorylated peptides by LC-MALDI-TOF/TOF-MS coupled to in situ enrichment on MALDI plates functionalized by ion landing. J Mass Spectrom. 2015;50:802–811.
12. Štěpánová S., Kašička V., Recent applications of capillary electromigration methods to separation and analysis of proteins. Anal Chim Acta. 2016;933:23–42.
13. Dawod M., Arvin N. E., Kennedy R. T., Recent advances in protein analysis by capillary and microchip electrophoresis. Analyst 2017;142:1847–1866.
14. Kašička V., Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2015-mid 2017). Electrophoresis 2018;39:209–234.
15. Kašička V., Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2017-mid 2019). Electrophoresis 2020;41:10–35.
16. Štěpánová S., Kašička V., Recent developments and applications of capillary and microchip electrophoresis in proteomics and peptidomics (2015-mid 2018). J Sep Sci. 2019;42:398–414.
17. Shen X. J., Yang Z. C., Mccool E. N., Lubeckyj R. A., Chen D. Y., Sun L. L., Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry for top-down proteomics. Trends Anal Chem. 2019;120, Art. No. 115644.
18. Zhang Z. B., Zhu G. J., Peuchen E. H., Dovichi N. J., Preparation of linear polyacrylamide coating and strong cationic exchange hybrid monolith in a single capillary, and its application as an automated platform for bottom-up proteomics by capillary electrophoresis-mass spectrometry. Microchim Acta 2017;184:921–925.
19. Latosinska A., Siwy J., Mischak H., Frantzi M., Peptidomics and proteomics based on CE-MS as a robust tool in clinical application: The past, the present, and the future. Electrophoresis 2019;40:2294–2308.
20. Zhang W., Segers K., Mangelings D., Van Eeckhaut A., Hankemeier T., Vander Heyden Y., Ramautar R., Assessing the suitability of capillary electrophoresis-mass spectrometry for biomarker discovery in plasma-based metabolomics. Electrophoresis 2019;40:2309–2320.
21. McDonald W. H., Yates J. R., Shotgun proteomics: Integrating technologies to answer biological questions. Curr Opin Mol Ther. 2003;5:302–309.
22. Herrero M., Ibanez E., Cifuentes A., Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics. Electrophoresis 2008;29:2148–2160.
23. Simo C., Dominguez-Vega E., Marina M. L., Garcia M. C., Dinelli G., Cifuentes A., CE-TOF MS analysis of complex protein hydrolyzates from genetically modified soybeans - A tool for foodomics. Electrophoresis 2010;31:1175–1183.
24. Štěpánová S., Kašička V., Recent developments and applications of capillary and microchip electrophoresis in proteomic and peptidomic analyses. J Sep Sci. 2016;39:198–211.
25. Hynek R., Kašička V., Kučerová Z., Káš J., Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis to the peptide mapping of pepsin isoenzymes. J Chromatogr B 1996;681:37–45.
26. Simo C., Gonzalez R., Barbas C., Cifuentes A., Combining peptide modeling and capillary electrophoresis mass spectrometry for characterization of enzymes cleavage patterns: Recombinant versus natural bovine pepsin A. Anal Chem. 2005;77:7709–7716.
27. Ross G. A., Lorkin P., Perrett D., Separation and tryptic digest mapping of normal and variant haemoglobins by capillary electrophoresis. J Chromatogr. 1993;636:69–79.

28. Sázelová P., Kašička V., Leon C., Ibanez E., Cifuentes A., Capillary electrophoretic profiling of tryptic digests of water soluble proteins from Bacillus thuringiensis-transgenic and non-transgenic maize species. Food Chem. 2012;134:1607–1615.
29. Sedláková P., Eckhardt A., Lacinová K., Pataridis S., Mikšík I., Král V., Kašička V., Separation of tryptic peptides of native and glycated BSA using open-tubular CEC with salophene-lanthanide-Zn^{2+} complex as stationary phase. J Sep Sci. 2009;32:3930–3935.
30. Mikšík I., Lacinová K., Zmatlíková Z., Sedláková P., Král V., Sýkora D., Řezanka P., Kašička V., Open-tubular capillary electrochromatography with bare gold nanoparticles-based stationary phase applied to separation of trypsin digested native and glycated proteins. J Sep Sci. 2012;35:994–1002.
31. Ladner Y., Mas S., Coussot G., Montels J., Perrin C., In-line tryptic digestion of therapeutic molecules by capillary electrophoresis with temperature control. Talanta 2019;193: 146–151.
32. Cox J., Hein M. Y., Luber C. A., Paron I., Nagaraj N., Mann M., Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. Mol Cell Proteomics 2014;13:2513–2526.
33. Cejnar P., Kučková S., Procházka A., Karamonová L., Svobodová B., Principal component analysis of normalized full spectrum mass spectrometry data in multiMS-toolbox: An effective tool to identify important factors for classification of different metabolic patterns and bacterial strains. Rapid Commun Mass Spectrom. 2018;32:871–881.
34. Barker M., Rayens W., Partial least squares for discrimination. J Chemometr. 2003;17:166–173.
35. Lee L. C., Liong C. Y., Jemain A. A., Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: a review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. Analyst 2018;143:3526–3539.
36. R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2019.
37. Kučková S. H., Rambousková G., Hynek R., Cejnar P., Oltrogge D., Fuchs R., Evaluation of mass spectrometric data using principal component analysis for determination of the effects of organic lakes on protein binder identification. J Mass Spectrom. 2015;50:1270–1278.

How to cite this article: Michalusová I, Sázelová P, Cejnar P, Kučková Š, Hynek R, Kašička V. Capillary electrophoretic profiling of in-bone tryptic digests of proteins as a potential tool for the detection of inflammatory states in oral surgery. *J Sep Sci*. 2020;43:3949–3959.
https://doi.org/10.1002/jssc.202000718

11.5 Příloha 5 – ocenění publikace uvedené v příloze 2



ELECTROPHORESIS

Best Student Paper Award

Awarded to

Iva Michalus

In recognition for the article *In-bone protein digestion followed by LC-MS/MS peptide analysis as a new way towards the routine proteomic characterization of human maxillary and mandibular bone tissue in oral surgery*, first published on 28 August 2021, *ELECTROPHORESIS*, DOI: 10.1002/elps.202100211 and selected by the Editors as the Best Student Paper of December 2021.

Deputy Editor, Chair of the Selection Committee: Dr. Carlos D. Garcia

Editor-in-Chief: Dr. Blanca H. Lapizco-Encinas

Editor-in-Chief: Dr. Hermann Wätzig

WILEY-VCH WILEY