

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E41042



**IDENTIFICATION OF CHOLANGIOCARCINOMA-
ASSOCIATED PROTEINS USING PROTEOMICS**

MR. PONLAPAT YONGLITTHIPAGON

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

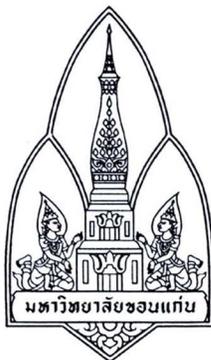
2011

600255449

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E41042



**IDENTIFICATION OF CHOLANGIOCARCINOMA-
ASSOCIATED PROTEINS USING PROTEOMICS**



MR. PONLAPAT YONGLITTHIPAGON

**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY**

2011

**IDENTIFICATION OF CHOLANGIOCARCINOMA-ASSOCIATED
PROTEINS USING PROTEOMICS**

MR. PONLAPAT YONGLITTHIPAGON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PATHOBIOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2011

พลลพัธุ์ ขงฤทธิปรกรณ์. 2554. การศึกษาโปรตีนของมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์.

วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ. ดร. บรรจบ ศรีภา, รศ. ชวลิต ไพโรจน์กุล,
ดร. เขียวลักษณ์ น้ํากระมล

บทคัดย่อ

E 41042

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่มีอัตราการตายสูงและพบได้น้อยทั่วโลก แต่มีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทยซึ่งเป็นแหล่งแพร่ระบาดของพยาธิใบไม้ตับชนิด *Opisthorchis viverrini* โดยทั่วไป การตรวจวินิจฉัยของมะเร็งท่อน้ำดีใช้การตรวจภาพรังสี การตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อ และการตรวจหาตัวบ่งชี้มะเร็งในเลือด อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีตัวบ่งชี้ที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีตั้งแต่ระยะเริ่มต้น ดังนั้นการค้นหาโปรตีนบ่งชี้จำเพาะสำหรับวินิจฉัยและพยากรณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง โปรตีโอมิกส์เป็นหนึ่งในวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง สำหรับวิเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่าง ๆ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิคต่าง ๆ ทางโปรตีโอมิกส์ในระดับเซลล์ไลน์ของมะเร็งท่อน้ำดีและตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ในขั้นต้นผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค two-dimensional electrophoresis (2-DE) และ matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนที่แสดงออกในสองส่วนของเซลล์ คือ membrane proteomes และ cytosolic proteomes ของเซลล์ไลน์มะเร็งท่อน้ำดี 4 ชนิดคือ KKU-K100, KKU-M156, KKU-M139 และ KKU-M213 เปรียบเทียบกับ H69 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของเซลล์เยื่อท่อน้ำดีปกติ พบว่าในจำนวน membrane proteins 20 ชนิดที่มีการแสดงออกอย่างแตกต่างกันนั้น นักวิจัยได้เลือก annexin A2 (ANXA2) ซึ่งเป็น phospholipid-binding protein และเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเนื้อร้ายในมะเร็งชนิดอื่นเพื่อนำมา validate โดยการใช้เทคนิค immunohistochemistry พบว่าหาก ANXA2 มีการแสดงออกมากผิดปกติในมะเร็งท่อน้ำดี ผู้ป่วยจะมีพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และเมื่อใช้เทคนิคเดียวกันนี้ศึกษา cytosolic proteomes พบว่าในจำนวน 48 โปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกันนั้น ผู้วิจัยได้เลือก peroxiredoxin 1 (PRX1), ezrin-radixin-moesin-binding protein (EBP50) และ enolase 1 (ENO1) ซึ่งเกี่ยวข้องกับเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดอื่นเพื่อนำมา validate ผลการทดลองพบว่าระดับการแสดงออกที่ลดลงของโปรตีน PRX1 และเพิ่มขึ้นของโปรตีน EBP50 และ ENO1 ใน

E41042

มะเร็งท่อน้ำดี ต่างมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอัตราการรอดของผู้ป่วยและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

ในแง่ของการตรวจหาปริมาณโปรตีนผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค iTRAQ และ liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบ whole cell lysate proteomes ของเซลล์ไลน์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-OCA17, KKU-M156 และ KKU-K100 เปรียบเทียบกับ H69 พบว่ามีโปรตีน 628 ชนิด ที่แสดงออกแตกต่างกันในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้งสามไลน์จากระดับการแสดงออกของโปรตีน candidates ในผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค iTRAQ ผู้วิจัยได้เลือกโปรตีน cathepsin-D (CATD), catenin delta-1 (CTND1) และ transgelin-3 (TGLN3) เพื่อนำมาตรวจหาการแสดงออกและตำแหน่งโปรตีนโดยใช้เทคนิค immunohistochemistry ผลการทดลองพบว่า CATD และ CTND1 แสดงออกเพิ่มสูงขึ้นชัดเจนใน bile duct hyperplasia และมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับท่อน้ำดีปกติ อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค high-throughput เช่น โปรตีโอมิกส์ในเซลล์ไลน์ อาจมีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่ไม่สอดคล้องกับผลทดลองในตัวอย่างผู้ป่วย ผู้วิจัยพบว่า TGLN3 ไม่สามารถตรวจหาได้ทั้งในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและท่อน้ำดีปกติ ในขณะที่การแสดงออกของ TGLN3 สามารถตรวจพบได้ในระดับ moderate expression ในเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ปกติซึ่งใช้เป็น positive control ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า CATD และ CTND1 อาจจะมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับมะเร็งท่อน้ำดี และจำเป็นต้องได้รับการวิเคราะห์เพิ่มเติมในชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวนมากขึ้น นอกจากนี้โปรตีน candidates ที่พบในการศึกษานี้ยังถือเป็นก้าวแรกในการค้นหาตัวบ่งชี้มะเร็งในแง่ของการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคในอันดับต่อไป

เนื่องจากการลุกลามของมะเร็ง มีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคของผู้ป่วย ผู้วิจัยได้ศึกษาโปรตีโอมิกส์ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจากบริเวณ invasive front และ intratumoral areas ของ frozen sections ผู้ป่วยรายเดียวกันจำนวน 10 ราย โดยใช้เทคนิค laser capture microdissection โปรตีนที่สกัดออกมาถูก identify และ quantify โดยใช้ LC-MS/MS และ iTRAQ analysis ตามลำดับอย่างไรก็ดีในการศึกษานี้ ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์โปรตีนได้สำเร็จเนื่องจากปริมาณโปรตีนไม่เพียงพอ ทั้งนี้เนื้อมะเร็งท่อน้ำดีที่เก็บแบบ formalin-fixed paraffin-embedded tissues ควรถูกนำมาใช้แทน frozen tissues ในการทดลองครั้งต่อไป เนื่องจากผลการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้มีปริมาณและคุณภาพใกล้เคียงกัน

Ponlapat Yonglithipagon. 2010. **Identification of Cholangiocarcinoma-Associated Proteins Using Proteomics**. Doctor of Philosophy Thesis in Pathobiology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Banchob Sripa
 Assoc. Prof. Dr. Chawalit Pairojkul
 Dr. Yaovalux Chamgramol

ABSTRACT

E 41042

Cholangiocarcinoma (CCA), a fatal bile duct cancer, is a rare cancer worldwide but it is highly prevalent in Thailand where the liver fluke, *Opisthorchis viverrini* is endemic. Diagnosis of this cancer conventionally based on radio-imaging and tissue biopsy or serum marker confirmation. However, to date, there are no specific markers for early CCA. Hence, there is an imperative need for discovery of diagnostic and prognostic markers for CCA. Proteomics is one of the most promising methods for discovery of disease-associated biomarkers. This study, therefore, attempted to characterize CCA-associated proteins utilizing mass spectrometry based on proteomic analyses of CCA cell lines as well as primary cancer specimens.

For CCA proteomics, two-dimensional electrophoresis (2-DE) and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) were used to identify differential expressed proteins in four CCA cell lines including K100-K100, K100-M156, KKU-M139 and KKU-M213 compared with the H69 cell line, which is an immortalized biliary cell line. Proteomes of the membrane and cytosolic fractions were analyzed. Among the 20 up-regulated membrane proteins identified across CCA cell lines, annexin A2 (ANXA2), a phospholipid-binding protein associated with tumor invasion and metastasis, was chosen for validation by immunohistochemical (IHC) analysis. The results showed that up-regulation of ANXA2 can serve as a marker for poor prognosis of CCA. From the cytosolic proteomes, 48 differentially expressed proteins in CCA cell lines were identified in comparison to the cytosolic proteome of the control. Over-expression of peroxiredoxin 1 (PRX1), ezrin-radixin-moesin-binding protein (EBP50) and enolase 1 (ENO1), which have been found to be associated with tumor progression in several

E41042

cancers were selected for verification in this study. IHC analysis showed that down-regulation of PRX1, and up-regulation of EBP50 and ENO1 in CCAs were significantly associated with patient survival as well as tumor invasion and/or distant metastasis. Therefore, these protein candidates may also serve as prognostic markers for CCA.

Regarding protein quantification, a comparative iTRAQ-coupled liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system was used to analyze the whole cell lysate proteomes of the three CCA cell lines including KKU-OCA17, KKU-M156 and KKU-K100, compared to the H69. Among the 628 differentially expressed proteins across the three CCA cell lines, cathepsin-D (CATD), catenin delta-1 (CTND1) and transgelin-3 (TGLN3) were selected for verification by IHC regarding their expression levels compared to the H69 in the iTRAQ analysis. High expression of CATD and CTND1 were observed in the bile duct hyperplasia and CCA tissues compared to normal bile ducts. In contrast, the expression of TGLN3 was not detected in the normal bile ducts or CCAs, while moderate expression of TGLN3 was clearly observed in the positive control, normal colon tissues. The results suggested that CATD and CTND1 may hold promise as potential biomarkers for CCA. Further investigation by IHC in a large number of CCA tissues is needed. The protein candidates identified in the current study provide an important first step towards developing effective biomarkers for diagnosis and prognosis of CCA.

Tumor invasion is associated with poor prognosis. In this study laser capture microdissection (LCM) was used to isolate cancer cells from the invasive front and its intratumoral counterpart of 10 frozen CCA specimens from 10 different patients. Proteins were then characterized and quantified by LC-MS/MS and iTRAQ analysis. Protein identification, however, was not successful due to inadequate protein concentration. Further study should be done using formalin-fixed paraffin-embedded tissues because significant proteomic information can be still obtained from this type of sample preparation as compared to the fresh frozen tissue samples.

**Goodness Portion to the Present Thesis is Dedicated
for my Parents and Entire Teaching Staff**

ACKNOWLEDGMENTS

First and foremost I would like to express my sincerest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Banchob Sripa for his kindness in facilitating my receiving the Royal Golden Jubilee PhD scholarship. I appreciated his selflessly contributing of time, ideas and resources to make my PhD experience productive, stimulating and successful. I shall ever strive to emulate the excellent example he set of as a successful scientist and great lecturer.

I am also indebted to my co-advisor Associate Professor Dr. Chawalit Pairojkul. The enthusiasm he has for his research was contagious and motivational for me. I am especially grateful to Dr. Yaovalux Chamgramol for her warm advice and personal interest. I wish to express my sincere gratitude to my overseas advisors, Professor Dr. Alex Loukas and Dr. Jason Mulvenna for their great efforts to assist me in many different ways while I was working abroad at the Queensland Institute of Medical Research (QIMR) in Brisbane and James Cook University in Cairns, Australia. I would have been lost without them.

My special additional thanks go to all the teaching staff in Department of Pathology who provided foundational knowledge and practical skills. I am indebted to my colleagues at Tropical Disease Research Laboratory, Khon Kaen University, especially Mr. Manop Sripa, Mr. Suwit Balthaisong, Mrs. Arpa Surapaitoon and Mrs. Jenjira Somprakon for their kind assistance with giving wise advice, helping me get through the difficult times and caring they provided. This study was financially supported by the Royal Golden Jubilee PhD scholar (Grant No. PHD/0194/2548) and ICIDR-NIAID, NIH, USA (Award No. U01AI065871).

Lastly, and most importantly, my undying gratitude would be conveyed to both my father, Wichai (who just passed during the final stages of my dissertation preparation) and my mother, Pensri, whose moral and spiritual guidance brought light and life to my heart, so that my mind was freed, thus enabling me to strive towards ever higher ideals and goals. To them I dedicate this thesis.

Ponlapat Yonglithipagon

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Background and rationale of the study	1
1.2 Objectives of the study	2
1.3 Scope and limitation of the study	3
1.4 Anticipated outcomes	3
CHAPTER II UP-REGULATION OF ANNEXIN A2 IN CHOLANGIOCARCINOMA CAUSED BY OPISTHORCHIS VIVERRINI AND ITS IMPLICATION AS A PROGNOSTIC MARKER	4
2.1 Introduction	4
2.2 Materials and Methods	5
2.3 Results	13
2.4 Discussion	23
CHAPTER III PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF PEROXIREDOXIN 1 AND EZRIN-RADIXIN-MOESIN-BINDING PHOSPHOPROTEIN 50 IN CHOLANGIOCARCINOMA	27
3.1 Introduction	27
3.2 Materials and Methods	28
3.3 Results	32
3.4 Discussion	46

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
CHAPTER IV PROTEOMICS-BASED IDENTIFICATION OF ENOLASE 1 AS A POTENTIAL PROGNOSTIC MARKER IN CHOLANGIOCARCINOMA	49
4.1 Introduction	49
4.2 Materials and Methods	50
4.3 Results	54
4.4 Discussion	66
CHAPTER V ITRAQ PROTEOMICS-BASED ANALYSIS OF POTENTIAL SIGNATURES OF CHOLANGIOCARCINOMA	69
5.1 Introduction	69
5.2 Materials and Methods	72
5.3 Results	77
5.4 Discussion	94
CHAPTER VI SUBSTRUCTIVE PROTEOMIC APPROACH TO THE CHOLANGIOCARCINOMA INVASIVE FRONT	99
6.1 Introduction	99
6.2 Materials and Methods	100
6.3 Results and Discussion	104
CHAPTER VII CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS	108
REFERENCES	112
APPENDICES	128
RESEARCH PUBLICATIONS	141
CURRICULUM VITAE	142

LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1 Membrane proteins differentially expressed in <i>O. viverrini</i> -induced CCA cell lines identified by MALDI-TOF MS	15
Table 2.2 Clinicopathological variables and the expression status of ANXA2 in <i>O. viverrini</i> -induced CCA tissues	20
Table 2.3 Risk factors for overall survival in <i>O. viverrini</i> associated CCA	22
Table 3.1 List of differentially expressed cytosolic proteins from 4 CCA cell lines identified by MALDI-TOF MS	34
Table 3.2 Clinicopathological variables and the expression status of PRX1 and EBP50 in CCA tissues	42
Table 3.3 Clinical risk factors for overall survival in CCA patients	45
Table 4.1 Total number of differentially expressed cytosolic proteins from 4 CCA cell lines identified by MALDI-TOF MS	56
Table 4.2 Clinicopathological variables and the expression status of ENO1 in CCA tissues	64
Table 4.3 Association between overall survival in patients with CCA and risk factors	66
Table 5.1 Summary of the number of proteins identified in whole cell lysates of CCA and H69 cell lines	78
Table 5.2 Summary of identified proteins that were increased in CCA cell lines	81
Table 5.3 Summary of identified proteins that were decreased in CCA cell lines	88
Table 5.4 Number of protein identified at critical false discovery rates	95
Table 6.1 Summary of iTRAQ-labeled proteins identified in ten cases of pairwise invasive and non-invasive cholangiocarcinoma	106

LIST OF TABLES (Cont.)

	Page
Table A.1 <i>Opisthorchis viverrini</i> -induced cholangiocarcinoma cell lines and normal biliary cell line	134
Table A.2 Immunohistochemical grading of ANXA2, PRX1, EBP50 and ENO1 proteins in human CCAs	135

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 Schematic explanation of the protocol for interactive stereological immunoscoreing based on systematic random sampling	11
Figure 2.2 Overview of combined proteomics and TMA procedures	12
Figure 2.3 Displayed membrane protein profiles of <i>O. viverrini</i> -induced CCA cell lines identified by 2-DE	14
Figure 2.4 Western blot analysis of ANXA2 in 2-DE gel of purified membrane proteins from M139 cell line	16
Figure 2.5 MALDI-TOF peptide mass fingerprint of the tryptic digest of ANXA2	17
Figure 2.6 Immunohistochemical staining of ANXA2	19
Figure 2.7 Survival curves using Kaplan-Meier method	21
Figure 2.8 Structure of ANXA2	23
Figure 3.1 2-DE maps of cytosolic proteins of human cholangiocarcinoma cell lines	33
Figure 3.2 PMF of tryptic digests of peroxiredoxin 1, ezrin, moezin obtained by MALDI-TOF MS	39
Figure 3.3 Immunohistochemistry of PRX1 and EBP50	44
Figure 3.4 Kaplan-Meier cumulative survival curves for overall survival of CCA patients according to the expression status of PRX1 and EBP50	46
Figure 4.1 Comparative proteomic analysis of 2-DE gels of CCA cell lines	55
Figure 4.2 PMF of tryptic digests of enolase 1 obtained by MALDI-TOF MS	61
Figure 4.3 Immunohistochemistry of enolase 1	63
Figure 4.4 Kaplan-Meier cumulative survival curves for overall survival of CCA patients categorized by the expression status of enolase1	65
Figure 5.1 Structure of reagents of isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)	74

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 5.2 Pie chart showing various cellular compartments	79
Figure 5.3 Peak areas at the low m/z end showing a relative abundance of the up- and down-regulated proteins	89
Figure 5.4 Tissue sections of cholangiocarcinoma-immunostained cathepsin-D	91
Figure 5.5 The expression of catenin delta-1 in CCA tissues detected by IHC	92
Figure 5.6 Immunoreactivity of transgelin 3	93
Figure 6.1 Overview of the study design for laser capture microdissection	102
Figure 6.2 Outline of the strategy used to develop cell specific protein expression analysis integrating laser capture microdissection and proteomics	103
Figure 6.3 Photographs of laser capture microdissection of hematoxylin-stained sections of cholangiocarcinoma	105

LIST OF ABBREVIATIONS

ACN	Acetonitrile
2DE	Two-dimensional gel electrophoresis
BSA	Bovine serum albumin
CCA	Cholangiocarcinoma, bile duct cancer
°C	Degrees Celsius
Da	Dalton(s)
DAB	3-3'diaminobenzidine tetrahydrochloride
DMN	<i>N</i> -nitrosodimethylamine or NDMA
DTT	Dithiothreitol
DW	Distilled water
<i>et al.</i>	et alii/alia (Latin), and other people or things
<i>et c.</i>	et cetera (Latin), and the rest
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid
e.g.	exempli gratia (Latin), for example
g	Gram(s)
xg	Gravity, relative centrifugal force
h	Hour(s)
HCl	Hydrochloric acid
H&E	Hematoxylin and eosin staining
HRP	Horseradish peroxidase
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
IAA	Iodoacetamide
IARC	International Agency for Research on Cancer
IEF	Isoelectric focusing
IPG	Immobilized pH gradient
kDa	Kilodalton(s)
kg	Kilogram(s)
L/l	Liter(s)
LC-MS-MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

μ l	Microliter(s)
μ g	Microgram(s)
mg	Milligram(s)
ml	Milliliter(s)
min	Minute(s)
M	Molar
mA	Milli-ampere(s)
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
μ M	Micromolar(s)
MMTS	Methyl methanethiosulfonate
<i>Mr</i>	Relative molecular mass
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MS	Mass spectrometry
m/z	Mass to charge ratio
<i>p</i>	<i>p</i> -value
%	Percent
PBS	Phosphate-buffered saline
<i>pI</i>	Isoelectric point
ROS	Reactive oxygen species
RT	Room temperature
SCX	Strong cation exchange
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sec	Second(s)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	Unit(s)
v/v	Volume/Volume
WHO	World Health Organization
wk	Week
w/v	Weight by Volume

LIST OF ABBREVIATIONS

ACN	Acetonitrile
2DE	Two-dimensional gel electrophoresis
BSA	Bovine serum albumin
CCA	Cholangiocarcinoma, bile duct cancer
°C	Degrees Celsius
Da	Dalton(s)
DAB	3-3'diaminobenzidine tetrahydrochloride
DMN	<i>N</i> -nitrosodimethylamine or NDMA
DTT	Dithiothreitol
DW	Distilled water
<i>et al.</i>	et alii/alia (Latin), and other people or things
<i>etc.</i>	et cetera (Latin), and the rest
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid
e.g.	exempli gratia (Latin), for example
g	Gram(s)
xg	Gravity, relative centrifugal force
h	Hour(s)
HCl	Hydrochloric acid
H&E	Hematoxylin and eosin staining
HRP	Horseradish peroxidase
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
IAA	Iodoacetamide
IARC	International Agency for Research on Cancer
IEF	Isoelectric focusing
IPG	Immobilized pH gradient
kDa	Kilodalton(s)
kg	Kilogram(s)
L/l	Liter(s)
LC-MS-MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

μ l	Microliter(s)
μ g	Microgram(s)
mg	Milligram(s)
ml	Milliliter(s)
min	Minute(s)
M	Molar
mA	Milli-ampere(s)
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
μ M	Micromolar(s)
MMTS	Methyl methanethiosulfonate
<i>Mr</i>	Relative molecular mass
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MS	Mass spectrometry
m/z	Mass to charge ratio
<i>p</i>	<i>p</i> -value
%	Percent
PBS	Phosphate-buffered saline
<i>pI</i>	Isoelectric point
ROS	Reactive oxygen species
RT	Room temperature
SCX	Strong cation exchange
SDS–PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
sec	Second(s)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	Unit(s)
v/v	Volume/Volume
WHO	World Health Organization
wk	Week
w/v	Weight by Volume