Fej-nyaki daganatok mikrokörnyezetének molekuláris vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Járai Tamás

Pécs
2017

Fej-nyaki daganatok mikrokörnyezetének molekuláris vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:
Dr. Járai Tamás
PTE KK Fül-orr-gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinika

Doktori Iskola vezetője:
Prof. Dr. Sümegi Balázs egyetemi tanár
PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Kutatási témavezető:
Dr. Márk László, egyetemi docens
PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Klinikai témavezető:
Dr. Lujber László, egyetemi docens
PTE KK Fül-orr-gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinika

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pécs
2017

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS 5

1.1. FEJ- NYAKI DAGANATOK EPIDEMIOLÓGIÁJA 6

1.2. ETIOLÓGIA ÉS RIZIKÓFAKTOROK 10

1.2.1. DOHÁNYZÁS 10

1.2.2. ALKOHOLFOGYASZTÁS 11

1.2.3. ROSSZ SZÁJHIGIÉNÉ 11

1.2.4. INFECTIÓK 12

1.2.5. ALULTÁPLÁLTSÁG, HELYTELEN TÁPLÁLKOZÁS 13

1.2.6. IMMUNSZUPRESSZÍV ÁLLAPOTOK 13

1.2.7. ÉLETKOR ÉS NEM, MINT RIZIKÓFAKTOR 13

1.2.8. KÜLSŐ TÉNYEZŐK, FOGLALKOZÁS 14

1.2.9. ENDOGÉN, GENETIKAI TÉNYEZŐK 14

1.3. A KORAI FELISMERÉS ÉS KEZELÉS JELENTŐSÉGE 16

1.4. PREVENCIÓS LEHETŐSÉGEK 17

2. ELMÉLETI ALAPOK 19

2.1. KARCINOGENEZIS 19

2.2. TUMORMARKEREK 21

3. NYÁLDIAGNOSZTIKA 23

3.1. A NYÁL ÖSSZETÉTELE 23

3.2. NYÁL FEHÉRJÉK 25

4. VIZSGÁLATAINK CÉLJA **27**

5. ANALÍTIKAI MÓDSZEREK **28**

5.1. MINTAVÉTEL 28

5.2. ELEKTROFORÉZIS 28

5.3. TÖMEGSPEKTROMETRIA 30

5.3.1. TÖMEGSPEKTRMÉTER FELÉPÍTÉSE ÉS MŰKÖDÉSE 30

5.3.2. MINTAELŐKÉSZÍTÉS 31

5.3.3. IONFORRÁSOK 32

5.3.4. ANALIZÁTOR 33

5.3.5. DETEKTOR 36

5.3.6. FRAGMENTÁLÁS ÉS TANDEM TÖMEGSPEKTROMETRIA 36

5.3.7. A TÖMEGSPEKTRUM 37

5.3.8. FEHÉRJÉK AZONOSÍTÁSA -PEPTIDE MASS FINGERPRINTING 37

5.4. KÉPALKOTÓ TÖMEGSPEKTROMETRIA (MALDI IMAGING) 38

5.5. IMMUNHISZTOKÉMIA, KONFOKÁLIS MIKROSZKÓPIA 40

6. EREDMÉNYEK **42**

6.1. FEHÉRJE BIOMARKEREK AZONOSÍTÁSA NYÁLMINTÁKBÓL 42

6.1.1. BETEGANYAG 42

6.1.2. SDS PAGE GÉLELEKTROFORÉZIS 43

6.1.3. TÖMEGSPEKTROMETRIÁS ELEMZÉS 45

6.1.4. AZONOSÍTOTT FEHÉRJÉK 47

6.2. BIOMARKERKÉNT AZONOSÍTOTT FEHÉRJÉK LOCALIS EXPRESSZIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA KÉPALKOTÁSI

TÖMEGSPEKTROMETRIÁS VIZSGÁLATOKKAL 51

6.2.1. BETEGANYAG, MINTAVÉTEL 51

6.2.2. KÉPALKOTÓ TÖMEGSPEKTROMETRIA 54

7. MEGBESZÉLÉS 59

8. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA 63

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 65

10. FÜGGELÉK 66

11. IRODALOMJEGYZÉK 76

12. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK 88

12.1. A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK ÉS PREZENTÁCIÓK 88

12.2. EGYÉB TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK 90

12.3. TARTOTT ELŐADÁSOK 93

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	szerzett immunhiányos tünetegyüttes
ANX	annexin
BNO	betegségek nemzetközi osztályozása
CHCA	α-ciano-4-hidroxi-fahéjsav
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
EBV	Epstein-Barr vírus
EDTA	etilén dioxid tetra acetát
HE	hematoxilin eozin
HIV	humán immunszupresszív vírus
HPV	humán papilloma vírus
IARC	International Agency for Research on Cancer:Nemzetközi Rákkutató Ügynökség
IMS	imaging mass spectrometry
ISD	in source decay: ionizációs folyamat során kezdődő hasadás
CID	collision induced dissociation
ETD	electron transfer dissociation
JCV	"John Cunningham" vírus
kDA	kilo-Dalton
KSH	Központi Statisztikai Hivatal
m/z	tömeg/töltés arány
MALDI	mátrix-segítette lézer deszorpciós ionizáció
MS	mass sectrometry
MTP	massive target plate
PBS	phosphate-buffered saline
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
CMC	carboxymethyl cellulose
ITO	irridium-ón-oxid
PMF	peptide mass fingerprint: peptid „ujjlenyomat”
PSD	post source decay: indulástól kezdődő hasadás
SDS	nátrium dodecil szulfát
TOF	time-of-flight: repülési idő

1. BEVEZETÉS

A fej-nyaki daganatok több, mint 90%-a laphámrák, ezek 5 éves túlélési aránya csupán mintegy 60%. Ennek legfőbb oka, a betegek 20-40%-ánál kialakuló lokális recidíva az azonos vagy szomszédos anatómiai régióban még szövettanilag tumormentesnek bizonyuló reszekciós szélek esetén is. Ezen daganatok gyakran előrehaladott stádiumban kerülnek felismerésre a specifikus tünetek hiányának és a diagnosztikai nehézségeknek köszönhetően. Minél előrehaladottabb stádiumú a daganat, annál invazívabb diagnosztikus és terápiás eljárások szükségesek. Ezért egy korai molekuláris diagnózis alapvető jelentőséggel bírna a túlélés növelése céljából. Az utóbbi évtizedekben a túlélési ráta nem sokat javult a diagnosztikus és terápiás módszerek fejlődése ellenére.

A tumorgenezis pontos biológiai alapjai a mai napig tisztázatlanok. Multifaktoriális eredete magába foglalja a genetikai alterációkat, hibásan regulált epitheliális differenciációt, abnormális proliferációt, megváltozott szabályozó folyamatokat. Ezen mechanizmusok pontos molekuláris tisztázása elősegítené a neoplasztikus folyamatok kialakulásának illetve progressziójának ismeretét. Így nagy segítséget nyújthatna új diagnosztikus, prevenciós és terápiás módszerek kidolgozásához

A dolgozat célkitűzései ezekből az adatokból adódtak – szükség volna egy olyan szélesebb körben is elérhető módszerre, amely lehetővé tenné a daganatok korai felismerését és lehetőséget adna nyomon követésre, prognosztika megbecsülésére, ezen túl információt adna a tumorgenezis pathomechanizmusára is, amely további terápiás lehetőségeket rejthet magában.

1.1 FEJ- NYAKI DAGANATOK EPIDEMIOLÓGIÁJA

A fej-nyaki régió laphámkarcinómája a 6. leggyakoribb daganatos megbetegedésnek számít világszerte [1], évente mintegy 540 000 új esetet diagnosztizálnak. A diagnosztikus és terápiás lehetőségek fejlődésének ellenére az 5 éves túlélési arány az elmúlt 30 évben nem emelkedett számottevően, jelenleg is csupán 60%-ra tehető, komoly közegészségügyi problémát jelentve [2]. A magas mortalitás egyik fő oka, hogy az esetek 20-40%-ában jelentkezik recidíva még akkor is, ha a kimetszés szövettanilag az épben történt. A túlélési mutatókat tovább rontja az, hogy a betegség sokszor előrehaladott stádiumban kerül felismerésre. Ilyen esetekben a sugár-, és/vagy kemoterápiával kombinált radikális kimetszés jelenti az egyetlen megoldást, mely sok esetben az életminőség kifejezett romlását vonja maga után.

Hazánkban a hat leggyakoribb kiemelt haláloki csoport közül a kardiovaszkuláris eredetű után másodikként a daganatok okozta halálozás szerepel. Az európai mortalitási adatok szerint a magyar férfiak az első, míg a magyar nők a második helyen állnak a daganatos mortalitási statisztikát illetően [3]. A hazai Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint a felső légúti- és tápcsatornai daganatok által okozott halálesetek száma nagymértékben megnőtt az 1970-es évek óta, ez különösen az ajak- és szájüregi malignus folyamatoknak köszönhető, melyek száma háromszorosára növekedett, mortalitások közel ötszörösére nőtt [4,5]. Ez a növekedés nagyjából az ezredfordulóig tartott, majd kis csökkenést mutatva a Magyar Központi Statisztikai Hivatal Demográfiai Évkönyve a 2005-ös évre vonatkozóan 15,5/100 000 főben állapította meg a malignus ajak-, szájüregi- és garatdaganatok mortalitási mutatóját [6]. A nemzetközi adatok azt mutatják, hogy Magyarország már 1992-ben is vezette a malignus szájüregi daganatokkal kapcsolatos mortalitási statisztikákat 39,5/100 000 fővel. Ez a szám jelentősen magasabb, mint

Franciaországban, mely a második helyen állt 29,1/100 000 fős arányával. 1959-től 1992-ig a magyar mortalitási arány 8,11-szeresére emelkedett [7].

Európában továbbra is évről évre emelkedik az új daganatos megbetegedések előfordulásának gyakorisága, 2005-ben 3,2 millió új daganatos megbetegedést diagnosztizáltak, ami 300 ezerrel több, mint az előző évben volt. Magyarországon – a háziorvosok nyilvántartása szerint – 1999 és 2005 között mindkét nem esetében 30 százalék körüli növekedés mutatható ki.

A fej-nyaki laphámrákok incidenciájának növekedését a nyugati világban egyértelműen a dohányzás elterjedésével és a megnövekedett alkoholfogyasztással kapcsolták össze.

A Nemzetközi Rákregiszter adatai alapján a fej-nyaki daganatok előfordulása 3-10-szeresére nőtt egy generációnyi idő alatt. Ez a növekedés az alkoholfogyasztás és dohányzás elterjedésével magyarázható. A fej-nyaki laphámrákos megbetegedések többnyire a 40 év feletti korosztályt érintik, ezen belül is a veszélynek leginkább kitett korcsoport a 45-65 év közöttieké, de a fiatalkori dohányzás és alkoholfogyasztás miatt ezen alsó határ csökkenése várható. A fej-nyaki laphámkarcinóma előfordulási aránya relatíve alacsonyabb nőknél: a férfi/nő arány hozzávetőlegesen 10:1 [8-11].

A különböző lokalizációjú tumorok halálozási adatait illetően is riasztó a helyzet mindkét nem szájüregi daganatainál. Magyarország az európai országok között mortalitásban az első helyen áll mindkét nem esetében egyaránt. Mortalitásban és incidenciában, valamint az esetszámok növekedési dinamikájában is európai listavezetők vagyunk [12]. A táblázatban piros színnel jelöltük a szájüregi rákok mortalitásának feltűnően magas növekményét az 1975-ös és 1999-es értékek között, valamint a növekmény további változásait a 2004-es, majd tovább a 2013-as évig.

A fej-nyaki daganatok mortalitása szignifikánsan megváltozott az elmúlt 50 évben,

Európát tekintve megduplázódott. Amíg a magyarországi összdaganatos halálozás 2,8-szorosára nőtt az 1948 és 2000 közötti időszakban, addig a fej-nyaki daganatos halálozás 6-szorosára emelkedett. Az adatok azt mutatják, hogy a legdinamikusabban emelkedő halálozási arány Magyarországon a fej-nyaki daganatok esetében figyelhető meg, ez az arány Európán belül nálunk a legmagasabb.

Az 1970-es évek óta a mortalitás közel hatszorosára nőtt, míg Európa-szerte csak megkétszereződött, így hazánk az európai országok élén áll [13,14]. Bár a 2000-es évektől az incidencia stagnálni látszik, de még ebben is elmaradva a 6% csökkenést mutató európai átlagtól [15].

Daganat	Esetszám		Növekmény (%-os)	Esetszám	Változás (%-os)	Esetszám	Változás (%-os)
	1975	1999		2004		2013	
Ajak-és szájüregi rák (C00-C14)	462	1618	250	1690	+15	1431	-15
Légcső-hörgő, tüdőrák (C3480-C3490)	4169	7883	89	8260	+9	8591	+4
Vastag- ésvégbélrák (C18-C21)	3025	4912	62	4979	+2	5107	+2
Emlőrák (C5010-C5060, C5080-C5090)	1650	2381	44	2285	-6	2167	-5
Prosztatarák (C61H0)	1196	1387	16	1275	-9	1211	-5

1. táblázat: Öt nagy halálozási gyakoriságú daganat növekedési dinamikája 40 év alatt Magyarországon

(KSH Demográfiai évkönyv)

A gégetumor miatti halálozás Európát tekintve Magyarországon, Romániában, Lengyelországban és Szlovákiában a legmagasabb. A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC) adatai szerint a dohányzás okozza Európában a szájüregi daganatok 60%-át a férfi,

40%-át a nőbetegeknél [16-18]. Míg a dohányzás és rendszeres alkoholfogyasztás önmagában 2-3-szorosára, addig ezen két rizikófaktor együttes megléte mintegy 15-szörösére növeli a daganat kialakulásának kockázatát. A genetikai prediszpozíció és a mutációk iránti egyéni érzékenység is szerepet játszik a tumorok kialakulásában. A HPV infekció további lehetséges faktorként jön szóba, tekintve, hogy a HPV 16-os és 18-as típusa a fej-nyaki daganatok 70%-ából kimutatható.

1.2. ETIOLÓGIA ÉS RIZIKÓFAKTOROK

A fej-nyaki daganatok kialakulását befolyásoló etiológiai tényezők közül elsősorban az elvileg megváltoztatható magatartásformák, mint a dohányzás és túlzott alkoholfogyasztás szerepe emelhető ki [19,20]. A hazai dohányzási szokások Európában a legrosszabbak között vannak, valamint az egy főre eső töményszesz-fogyasztásban is élen járunk, így nem is meglepő, hogy napjainkban Magyarországon fordul elő a legtöbb szájüregi és garatrák.

1.2.1. Dohányzás

A legfontosabb oki tényező a dohányzás. Jelentőségét csak fokozza az a tény, hogy egy szintén „előkelő" helyen lévő tumornak, a tüdődaganatnak is fő rizikótényezője. Karcinogenezis szempontjából nemcsak a cigaretta formájában történő fogyasztás a fontos, hiszen a dohányzás füsttel, vagy füst nélkül is rendkívül káros. A tubákolás az orrüregi daganatok, a pipázás az ajakrák, a dohány- és bételdió-rágcsálás pedig a buccarák előfordulási gyakoriságát fokozza. A passzív dohányzás kétszeresére növeli a dohányosokkal együtt élők körében a légúti rákban történő megbetegedések valószínűségét.

Magyarországon a 15 éves és idősebb lakosság csaknem harmada, összességében több mint 2,5 millió ember dohányzik, többségük napi rendszerességgel. Mellettük még további másfél millióan vannak azok, akik valaha dohányoztak, de már leszoktak, tehát összességében négymillió felnőtt volt/ van személyesen a dohányzás által érintve (nem számítva a passzív dohányosokat)

Rendszeresen dohányzó felnőtt férfiak aránya: **32,7** %

Rendszeresen dohányzó felnőtt nők aránya: **22,6** %

A passzív dohányzók aránya: **43,9** %

A dohányzás hirtelen abbahagyása csak lassan vezet eredményhez, a magas kockázatot legalább 3 évig nem befolyásolja, ezután a rizikó csak fokozatosan csökken, és csak kb. 10-15 év múlva éri el a nemdohányzók szintjét.

1.2.2. Alkoholfogyasztás

Szintén alapvető etiológiai tényező az alkoholfogyasztás minden formája. A hazánkban jellemző alkoholfogyasztási szokások kedveznek a daganatok kialakulásának. A fogyasztott ital mennyisége mellett fontos az alkohol minősége is: a Magyarországon jellemző tömény szeszesital fogyasztás kiemelten káros hatású. Az italok mennyisége sem elhanyagolható, a paraméterként is felhasználható „egyszerre elfogyasztott mennyiség" Magyarországon 0,47 dl/férfi és 0,25 dl/nő.

Régóta ismert, hogy a dohányzás és a masszív alkoholfogyasztás növeli a fej-nyaki tumorok kockázatát. A két etiológiai faktor két-háromszorosára növeli ezen daganatok előfordulásának rizikóját. A két rizikófaktor együttes előfordulása azonban 15-szörösére emeli, mivel az etanol elősegíti a dohányfüst karcinogén anyagainak felszívódását. Ugyanakkor a teljes absztinencia 60-80%-os mortalitás csökkenéshez vezet [21,22].

1.2.3. Rossz szájhigiéne

A rossz szájhigiéne önmagában is mechanikai irritatív tényezőt, így krónikus gyulladást, sőt, prekancerózus elváltozásokat eredményez (kárieszes fogak, törött gyökerek, elégtelen fogművek, fogkő és plakk akkumuláció), emellett a plakk mikroflórája által termelt acetaldehid direkt kémiai karcinogén hatással bír [18].

A rossz szájhigiénia kutatások szerint emeli az orális HPV fertőzés gyakoriságát, melynek etiológiai szerepét főleg olyan, fiatal páciensek esetében vetik fel, ahol az egyéb, hagyományos kockázati tényezők kizárhatók.

1.2.4. Infekciók

Nagy populációkon mért eredmények mutatják, hogy a fejlett országokban a dohányzás és az önpusztító életmód visszaszorulásának ellenére a daganatos morbiditás és mortalitás nem csökken, az adatok legfeljebb stagnálást mutatnak. Ez a vírusos eredetű, vagy más kórokozók által okozott daganatokra tereli a figyelmet. Bizonyos daganatok virális eredete napjainkban már nem kétséges. Ma már jól ismert az ún. onkogén vírusok csoportja (pl.: HPV, EBV, HCV, adenovírusok, HV6).

A szájüregi és oropharyngealis daganatok 40-60%-ában mutatható ki a HPV DNS-e. Ezekben az esetekben típusosan fiatal (40 év alatti) nők érintettek – meglévő vagy hiányzó egyéb rizikófaktorok mellett – és az esetek több, mint 95%-ában a magas malignitású 16-os szerotípus mutatható ki a nyelvgyök, tonsillo-lingualis átmenet környékén elhelyezkedő tumorból [23-30]. Ritkább a HPV-pozitivitás a férfiak és a dohányzó fej-nyaki daganatos betegek körében, így a – méhnyakrák etiológiájában is szereplő – vírusinfekciót a szexuális szokásokkal hozzák összefüggésbe [31]. Szövettanilag jellemző rájuk a nagyfokú differenciálatlanság, valamint, hogy a kemo- és irradiációs terápia iránti szenzitivitásuk nagyobb, túlélésük pedig hosszabb.

Az Epstein-Barr vírus (EBV) hatását főleg a nasopharyngealis karcinóma kapcsán bizonyították. Más tanulmányok szerint a HPV, az EBV illetve a JCV együttes vagy külön jelenléte összefüggésbe hozható a hám eredetű szájüregi daganatokkal. Több vírusinfekció illetve a HIV pozitivitás fennállása emeli a malignus szájüregi daganatok kifejlődését [32].

A gombás fertőzések (pl. Candida albicans) opportunista fertőző ágensként helyi vagy szisztémás immunszuppresszió esetén fordulnak elő a szájnyálkahártya normális flórájának sérülésekor. Tapasztalatok mutatták, hogy a terbafine gombaellenes gyógyszer gátolja a szájüregi daganatok növekedését [33].

1.2.5. Alultápláltság, helytelen táplálkozás

A túlzott mennyiségű füstölt élelmiszer fogyasztása, főleg alkoholfogyasztással párosulva emeli a daganatos megbetegedések rizikóját, de a nagy arányban fogyasztott zsíros, fűszeres, rost- és vitaminszegény ételek, valamint az élelmiszeripari adalék- és tartósító anyagok karcinogén hatása is régóta ismert.

A felszívódási zavarok kb. 10-15%-ban lehetnek a szájüregi daganatok okai [34]. Malnutríció többféle módon is kialakulhat, a fej nyaki daganatos betegeket jól jellemzi az alkoholisták alultáplált állapota, amikor a szervezet számára szükséges tápanyagoknak csak igen kis része jut be. Ilyenkor az antioxidáns és védőfaktorok bevitelének csökkenése önmagában is komoly rizikótényező. Ez tovább rontja az alkoholbeteg általános állapotát, fokozva a szájüregi daganat kialakulásának rizikóját. A krónikus vashiány (Plummer-Winson szindróma) alultápláltsággal, krónikus alkoholfogyasztással (A- és E vitaminhiánnyal) szövődve a nyelv és postcricoid terület karcinómáinak etiológiai faktora lehet nőknél [35,36].

1.2.6. Immunszupresszív állapotok

Az immunrendszer károsodása szintén okozhatja a rosszindulatú szájüregi daganatok kifejlődését. Leírtak összefüggést a Crohn-betegség miatti ledált immunrendszer és a szájüregi daganat között, valamint megfigyelhető AIDS betegek kezelése után késői következményként bizonyos tumorféleségek (köztük a szájüregi daganatok) számának növekedése [37].

1.2.7. Életkor és nem, mint rizikófaktor

A fej-nyaki laphámrákok néhány évvel ezelőtt Európában, így hazánkban is , döntően 40 év felett fordultak elő, az elmúlt években azonban a fiatalabb korosztály egyre nagyobb arányú érintettségét látjuk. Érdekes, hogy a korábban már említett HPV DNS-t ritkábban lehet

kimutatni a dohányzó betegek daganataiban és elsősorban szexuális habitussal mutatott összefüggést [31].

A nemek közötti különbségek részben az addiktív tényezők gyakoriságbeli különbözőségével, részben pedig habitusbeli okokkal is magyarázhatók – a férfiak közt hétszer több a dohányos, és négyszer több az alkoholista, valamint gyakrabban hanyagolják el fogazatukat, és később fordulnak orvoshoz, mint a nők. A 60 év feletti nőkre vonatkozó, emelkedő mortalitásról szóló adatok a nők körében megfigyelhető „férfias életmód" megjelenésével és térhódításával magyarázhatók.

1.2.8. Külső tényezők, foglalkozás

Ionizáló sugárexpozíció – különösen gyermekkorban – fokozza a pajzsmirigyrák és a nyálmirigytumor kialakulásának veszélyét. A pontos pathomechanizmust nem ismerve a levegőszennyezettség, a rossz szociális viszonyok, a stressz ugyancsak szerepet játszhatnak a karcinogenezis folyamatában, a betegek késői orvoshoz fordulása az előrehaladott stádiumok miatt pedig a túlélési esélyeket rontja. Az orrüreg és a paranasalis sinusok karcinómáinak magasabb incidenciája jól ismert bútormunkások, kárpitosok, építőmunkások, és ékszerkészítők körében, mely a fűrészpor, azbeszt- és nikkelpor inhalációval magyarázható, a szabadban dolgozók pedig az ultraibolya sugárzás okozta ajakrák veszélyének vannak kitéve.

1.2.9. Endogén, genetikai tényezők

A fej-nyaki tumorok kialakulásának kockázatát exogén (környezeti) és endogén (genetikai) tényezők kölcsönhatása határozza meg. A környezeti hatás érvényesüléséhez a szervezet állapota lényegesen hozzájárul, ezt az egyéni érzékenységet nagymértékben endogén, genetikai tényezők határozzák meg. Az exogén tényezők közül a legtöbb jól ismert, mint a dohányzás, az alkoholfogyasztás, valamint a környezeti karcinogén anyagok fej-nyaki

daganatok kialakulásának kockázatára gyakorolt hatása. Míg az örökletes, ún. magas penetranciájú genetikai faktorokat jól ismerjük, addig az alacsony penetranciájú, ún. egyéni érzékenységi tényezők szerepe még sok daganatnál, így a fej-nyaki daganatoknál sem pontosan tisztázott.

1.3. A KORAI FELISMERÉS ÉS KEZELÉS JELENTŐSÉGE

A fej-nyaki daganatok magas mortalitásának talán legfőbb oka, hogy a betegek legtöbbször csak a betegség előrehaladott stádiumában kerülnek felismerésre, amikor a terápiás lehetőségek eleve korlátozottak. Nincsenek kizárólag csak a fej-nyaki tumorokra jellemző tünetek, a daganatok sokáig „rejtve" maradhatnak, sokszor egy-egy banális betegségtől csak a szimptómák fennállásának hossza alapján lehet elkülöníteni őket. Az ide sorolható nem specifikus tünetek a rekedtség, nehézlégzés, nyelési nehezítettség, idegentest érzés, (vér-)köhögés, orrvérzés, (véres/gennyes) orrfolyás, a nyelv mozgásainak korlátozottsága, fülbe sugárzó vagy lokális fájdalom, foetor, növekvő fájdalmatlan csomó a nyakon, nem gyógyuló sebek a bőrön, ezen felül az általános tumoros tünetek (súlyvesztés, éjszakai izzadás, fáradékonyság). 2-3 hétig fennálló említett panaszok esetén szakorvoshoz kell irányítani a beteget. A fej-nyaki régió daganatainál jellemző, hogy míg a korai nyaki áttétképzés gyakori – ennek megfelelően gyakran jelentkeznek betegek nyaki duzzanattal a szakrendeléseken -, addig a hematogén metasztázis-képződés igen ritkán és késői stádiumban jelentkezik. A nyaki metasztázis egy fontos prognosztikai tényező, azonban még klinikailag N0 nyak esetén is kb. 60-70 % az okkult áttétképzés lehetősége. Amennyiben a diagnózis korai és nincs nyaki áttét, sebészi megoldás vagy sugárterápia általában kiváló hosszú távú eredményhez vezet, azonban a betegek többsége nem ebbe a csoportba tartozik, legtöbb esetben csak kiterjesztett műtét jön szóba sebészi terápiaként. A primer zárást meghiúsító, vagy funkcióvesztéshez vezető szövethiány esetén rekonstrukciós műtét végzendő, melynek lehetőségei és eredményei is erősen betegfüggők. Természetesen időben felismert betegség esetén a szerv és funkciómegőrző ún. onkoplasztikai beavatkozások is nagyobb sikerrel végezhetők. Késői diagnózis esetén a radikális kimetszést sugárterápia vagy kombinált kemo-, sugárterápia követi, illetve az ebből eredő életminőség romlás.

1.4. PREVENCIÓS LEHETŐSÉGEK

Annak ellenére, hogy az esetszámok stagnálni látszanak az utóbbi években, a szokatlanul magas halálozási arány miatt mind a primer, mind a szekunder prevencióra is nagyobb hangsúlyt kellene fektetni, hogy ez a népegészségügyi probléma leküzdhetővé váljon. A primer prevencióval (közösségi kampányok, kortársoktatás) az incidencia tényleges csökkenését lehetne elérni, míg a szekunder prevenció részét képező szűrőprogramok lehetővé tennék a tumorok korai diagnosztizálását, így növelnék a kezelés sikerességének mértékét - becslések szerint egy jól megszervezett, a teljes társadalomra kiterjedő szűrőprogrammal a jelenlegi 50%-os 5 éves túlélés akár 80%-ra is emelkedhetne.

Annak ellenére, hogy a fej-nyaki régió fizikális vizsgálata egyszerű, a manifeszt elváltozások már viszonylag korán felfedezhetőek, szűrővizsgálat jelenleg nincs hazánkban. A szűrőprogramok sikerességét az is gátolta/gátolja, hogy a leginkább érintett társadalmi réteg tagjai jelennek meg a legkisebb számban a fogorvosnál, fül-orr-gégészeti szakrendelésen. A vizsgálati módszer tekintetében sincs egységes álláspont: míg a magas kockázatú csoportoknál eredményesnek bizonyultak a megtekintésen, tapintáson alapuló tükrös fogorvosi és homloktükrös-spatulás fül-orr-gégészeti módszerek, addig ezek kevésbé alkalmasak az átlagos kockázatú csoportok esetében. A fej-nyaki tumorok nem felelnek meg a szervezett, népegészségügyi szűréshez szükséges kritériumoknak, így továbbra is csak alkalomszerű szűrések lehetségesek.

A **primer prevenció** a karcinogén anyagok elkerülésére összpontosít, fej-nyaki rákok esetében például a mérsékeltebb alkoholfogyasztásra és dohányzás mellőzésére. A primer prevenciós tevékenység hatékonyságának vitathatatlan bizonyítéka az USA Kalifornia államában lezajlott dohányzásellenes kampány, amelynek során az egy főre eső

cigarettafogyasztás felére csökkent, és az ezt követő években a tüdőrák incidenciája mindkét nem esetében erősen csökkent, férfiaknál több mint 50 %-kal [17].

A **szekunder prevenció** (szűrés) a betegség korai, premorbid stádiumában való felismerését célozza. A primer és szekunder prevenció határán a molekuláris és prediktív epidemiológia játszik fontos szerepet a daganatok prevenciójában.

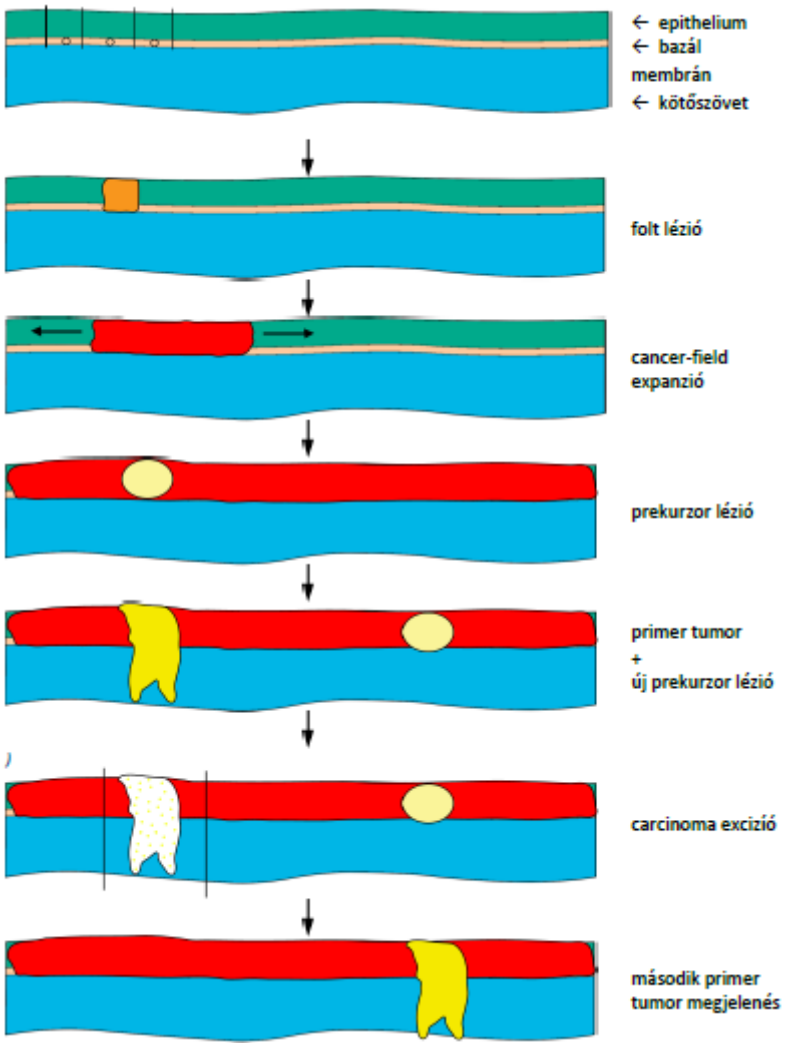
A primer és a szekunder prevenció határán mozog a prediktív és molekuláris epidemiológia, mely a korai biomarkerek segítségével, mint érzékeny biológiai indikátorokkal az expozíció→betegség folyamat valamely lépését a definitív betegség diagnosztikus markereinek pozitivitása előtt jelzi [38]. A korai biomarkerek a daganatos betegségek esetében nemcsak prognózist, hanem a magas rizikót, a veszélyeztetettséget is jelezhetik, így primer prevenciós intézkedések (kemo-, immun-és genetikai prevenció), intervenciók végrehajtásának kiindulási alapjai lehetnek: munkavédelem, a munka-és környezet-egészségügyi expozíció csökkentése vagy az egyének kiemelése a káros környezetből [39].

A **tercier prevenció** a betegek rehabilitációját, a szövődmények, a metasztázisok, a recidívák kivédését jelenti. Célja a betegségekből fakadó károsodások, a tartós egészségdeficitet okozó (az életminőséget rontó, funkciózavart, tartós fájdalmat, tartós ellátást okozó) állapotok megelőzése. Módszere a gondozás és rehabilitáció.

2. ELMÉLETI ALAPOK

2.1. KARCINOGENEZIS

A daganatképződés egy többlépcsős folyamat, melyhez genetikai, epigenetikai módosulások kellenek a normál sejtekben, amiket pedig különböző környezeti hatások idéznek elő, és így válnak tumorsejtekké. Az utóbbi évek kutatásaira alapozva megalkották az úgynevezett *cancer-field* elméletet, mely széles körben elfogadott a fej-nyak tumorok kialakulásának sémás mechanizmusaként. A teljesen ép nyálkahártya basalis membránjának sejtjeiben a folyamatos környezeti ingerek hatására genomikai változások jönnek létre, megalkotva így a rák-őssejtet (cancer stem cell), melyből osztódással „leánysejtek" (daughter cell) képződnek, azonos genetikai állománnyal. Ezek létrehoznak egy „folt-léziót" (patch). Tehát klonális expanzió révén létrejön a cancer-field. Ez sok esetben nem mutat különbséget sem klinikailag, sem hisztopatológiailag a normális nyálkahártyához képest, mivel az eltérés a genotípust érinti, és nem feltétlenül jelenik meg fenotípusosan is. Megjelenhet egy prekurzor-lézió, leukoplakia formájában is, a további klonális szelekció révén pedig előbb in situ karcinóma, majd a bazálmembránt áttörve invazív karcinóma alakulhat ki. Fontos klinikai következménye ennek az elméletnek, hogyha a primer tumor sebészi excizíója során visszamarad ebből a cancer field-ből, akkor abból újabb tumor fejlődhet ki [41-43].



1.ábra: A cancer-field elmélet sematikus ábrája

2.2. TUMORMARKEREK

Az orvostudomány régi törekvése, hogy a rosszindulatú daganatos megbetegedéseket korán felismerje, majd a gyógykezelés során a beteg állapotát folyamatosan kövesse. A daganatos folyamatokban számos abnormális sejt termel a sejtciklus más-más időpontjában különböző anyagokat, melyek detektálhatóak a testfolyadékokban és a ráksejtek felszínén biokémiai vagy immunhisztokémiai módszerekkel. Ezek az anyagok/termékek láthatóvá tehetőek és mérhetőek, így tumormarkerként használhatóak. A tumorsejteknek vannak megkülönböztető biológiai jegyei, mint például invázióra való hajlam, metasztázis, korlátlan proliferáció, apoptózis elöli kitérés, angiogenezis, melyek mind összetett molekuláris útvonalak által mediált, és ezen komponensek közül bármelyik lehet potenciális tumormarker. [44,45]

Tumormarkernek tekintünk minden olyan testazonos anyagot, amelynek megjelenése vagy koncentrációjának változása jelzi a tumort.

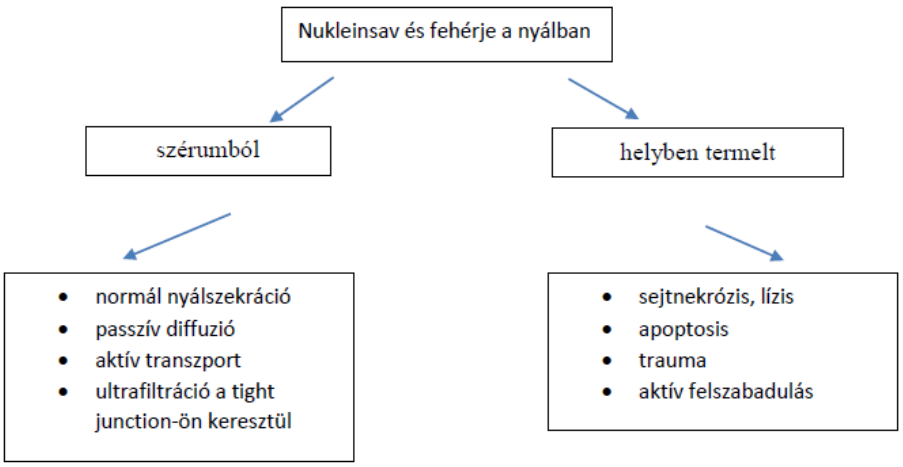
A tumormarkerek alapvetően két csoportra oszthatók [46]:

• *Elsődleges (primer) markerek.* Olyan molekulák, amelyeket a daganatsejtek termelnek, és mennyiségi változásuk a vérből vagy a daganatszövetből kimutatható. Szerkezetük szerint igen sokfélék lehetnek: fehérjék, kis molekulatömegű hormonok, nukleinsavak stb.

• *Másodlagos (szekunder) markerek.* A tumor növekedési sajátságaiból és a szervezet válaszreakcióiból származó molekulák. Elvben bármilyen mérhető laboratóriumi paraméter felfogható szekunder markernek. Ezek a paraméterek egyáltalán nem daganat specifikusak, de jelzik a szervezet érintettségét.

Sok tanulmány foglalkozott már a nyálban lévő tumormarkerek kutatásával. Annak pontos mechanizmusa, hogy a tumormarkerek miként kerülnek a nyálba, még nem ismert.

Talán a szérumból származnak, de az is lehet, hogy helyileg termelődnek. A következő ábra mutatja a lehetséges mechanizmusokat.



2.ábra: Tumormarkerek nyálba kerülésének lehetséges útjai

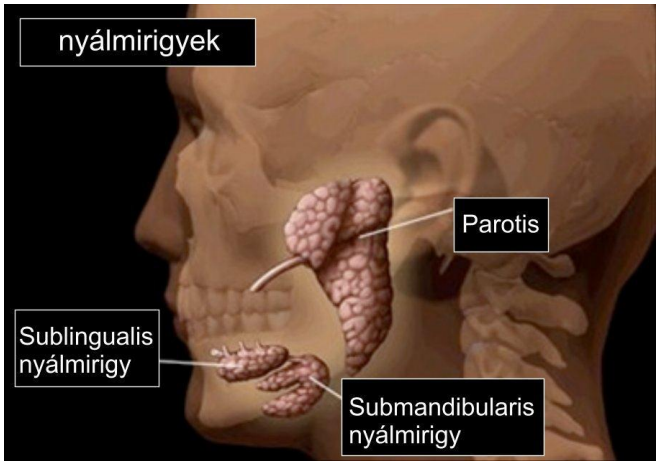
3. NYÁLDIAGNOSZTIKA

A humán nyál egy összetett biológiai folyadék. Nagy mennyiségben tartalmaz fehérjéket, amik jelentős feladatokat látnak el a szájüregen belül, a védelmi funkciókat illetően, és azon kívül is. Az összetétel változik napszakonként, a kor előrehaladtával, gyógyszeradagolással, szisztémás-, autoimmun megbetegedések, infekció esetén, illetve malignus folyamatokban. A nyálban található fehérjék, fehérje töredékek, és egyéb patológiás biomarkerek analitikai vizsgálata nagyban hozzájárul a modern diagnosztika fejlődéséhez. Napjainkban számos olyan kutatás folyik, amely a betegségekre jellemző fehérjék és egyéb biomarkerek kimutatását célozza, hiszen könnyen hozzáférhető, noninvazív, nem időigényes, nem drága és nagy mennyiség nyerhető belőle [47-50]. Nagy hátrányának gondolták régebben, hogy a markerek kisebb mennyiségben találhatóak meg a nyálban, mint a szérumban [51,52]. Azonban ma már az új technikáknak köszönhetően bármi mérhető a nyálban is, úgy ahogy a szérumban. Így akár a szájüreg vérkeringésének is tekinthető a nyál [44].

3.1. NYÁL ÖSSZETÉTELE

Három fő páros nagy nyálmirigy található, ezek a glandula parotidea, a glandula submandibularis, és a glandula sublingualis, melyek a kivezető csöveiken keresztül kapcsolódnak a szájüreghez. Ezen felül több száz kis nyálmirigy található a szájpadláson, az ajkak belső felszínén, ill. a buccán is. A parotis a nyáltermelés 25%-áért, a submandibularis mirigy 65%-áért, a sublingualis 4%-áért felelős. Ezeken kívül mintegy 8%-a a kisnyálmirigyekben termelődik, pl.: nyelvben (gl. apicis linguae, gl. radicis linguae) és ajakban (gl. labiales), bukkában (gl. buccales), szájpadon (gl. palatinae) és a sulcus gingivalis

is hozzájárul a nyál összetételéhez A tubuloalveolaris mirigyek váladékuk alapján lehetnek szerózusak, mucinózusak és kevertek. A parotis tisztán szerózus, a submandibularis kétharmad részt szerózus, egyharmad részt mucinózus, a sublingualis kétharmad részben mucinózus, és csak egyharmad részben szerózus acinusokból épül fel [47].



3. ábra: A nagy nyálmirigyek elhelyezkedése

Az emberi nyálmirigyek 1000-1500 ml nyálat termelnek naponta. A nyálat alapvetően feloszthatjuk a nyálmirigy specifikus nyálra, és a teljes nyálra („whole saliva”), amely már tartalmazza a szájüregben lévő, és a külvilágból bekerülő baktériumokat, az epitheliális sejteket, ételmaradékokat, vérből származó anyagokat. A kevert nyál normálisan 99,3% vizet, és 0,7% szárazanyagot tartalmaz, mely anorganikus sókból és organikus anyagokból: amiláz, maltáz, mucin, serum albumin, globulin stb áll. A szekretált humán nyál mennyisége és összetétele sok tényezőtől függ, például a „flow rate”-től, napszaktól, a nyálmirigyek típusától és méretétől, az elválasztást megindító stimulus típusától és hatásának időtartamától, étrendtől, szedett gyógyszerektől, életkortól, nemtől és vércsoporttól. Az elválasztott nyál mennyisége 0,3- 7 ml/perc és 0,5- 1,5 l/nap között változik. Hipotóniás oldat, pH-ja 6,2 és 7,4-es tartomány között változik.

3.2. NYÁLFEHÉRJÉK

A humán kevert nyál fehérjekoncentrációja normálisan 1-3 g/l, ez több mint 1300 különféle fehérjét jelent. Ezen érték külső stimuláció hatására nem változik szignifikánsan, a szekréció szoros neurológiai kontroll alatt van. A pszichés állapot viszont erősen befolyásolja a nyálfehérjék megoszlását (szerózus ill. mucinózus nyál). A komplex nyálban lévő proteinek mennyisége főként a fő nyálmirigyekből és a kis nyálmirigyekből származik, de a vér, a szájüregi szövetek és a mikroorganizmusok is hozzájárulnak ehhez. Körülbelül 53%-a a nyálproteineknek a vérből és egyéb szövetekből származik és kb. 5%-a az epitheliumból. A teljes nyál proteintartalma alkalmas sokféle fiziológiai és biokémiai vizsgálatra. Ez azért lehetséges, mert a proteinek szekréciója neurológiai kontroll alatt áll és a termelés stimulustól függ. Másrészt a jelentős számú proteinmodifikáció az orális környezetben megy végbe, ahol számos gazdaszervezetből és baktériumoktól származó enzim hat a nyálmirigyekből kiáramló proteinekre [53-56].

A nyál különféle funkcióit fehérjemolekulák sokasága biztosítja. Így a lubrikálásért mucinok, prolin-gazdag glikoproteinek és a nyál víztartalma felelősek. Antimikrobiális aktivitást mutatnak a defenzinek, az amiláz, a lizozim, a laktoferrin, a mucinok, a cisztatinok, illetve a hisztatinok. A pufferkapacitást a bikarbonát, a foszfátion és különböző fehérjék biztosítják. A remineralizációban fontosak a kálcium- és foszfátionok. A falat megformálásához vizet és mucint használunk fel. Az ízleléshez víz és gustin, míg beszédhez víz és mucin szükséges [57,58].

A proteomika elmúlt évtizedekben bekövetkezett robbanásszerű fejlődésének köszönhetően a nyál, mint új diagnosztikus eszköz az érdeklődés előterébe került. A fehérjék nagy pontosságú azonosításából, valamint a szintjükön bekövetkező módosulások meghatározásából adódóan a proteomika a korai kimutatás ígéretes módszerének tűnik. A becslések szerint a sejtben található fehérjék kb. 20 %-a választódik ki a nyálba. Ez a tény

teszi lehetővé új, fej-nyaki laphám karcinómára jellemző biomarkerek kimutatását szöveti „szekretómok” vizsgálatán keresztül, melyek mind a nyálból, mind a tumorhoz közeli folyadékból, illetve a szérumból is kimutathatók. A fej-nyaki laphámrákok esetében a nyál ideális forrásnak tűnik. Az emberi nyál relatíve könnyen, nagy mennyiségben non-invazív módon gyűjthető, ez a tulajdonság a nagy teljesítményt nyújtó vizsgálati módszerekkel együttesen egy megbízható, a mindennapi klinikai gyakorlat számára alkalmas anyaggá teszi. Egyelőre nem létezik még szájüregi daganatok korai felismerésére kidolgozott lakossági szűrés.

4. VIZSGÁLATAINK CÉLJA

1. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy nyálból kimutathatók-e fej-nyaki daganatos betegekre jellemző tumorspecikus biomarkernek számító proteinek?

2. Az azonosított proteinek mennyire specifikusak fej-nyaki daganatokra?

3. Az azonosított tumormarkernek vélt proteinek valóban megtalálhatók-e a a daganatos, illetve a környező szövetekben?

4. A proteinek szövetekben való megoszlásának vizsgálatával a mikrokörnyezetében lezajló változások mennyire jellemezhetők - tumorgenezis?

5. További célunk volt egy gyors, megbízható és lehetőség szerinti egyszerű vizsgálati protokoll kidolgozása, mely a későbbiekben egy nagy betegszámú tanulmány alapjául szolgálhatna.

5. ANALITIKAI MÓDSZEREK

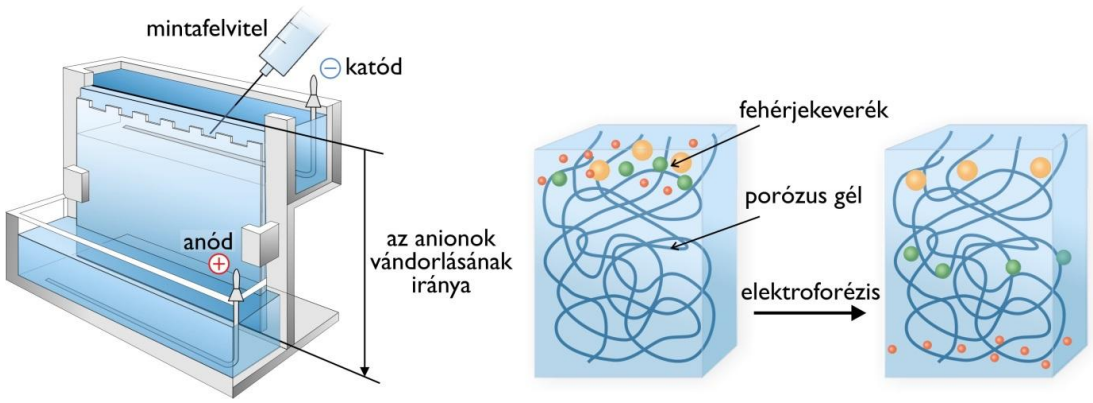
5.1.MINTAVÉTEL

A nyálminták gyűjtésére hideg csapvizes öblítést követően, stimulálás nélkül került sor reggel 8 és délelőtt 10 óra között mind a tumoros, mind a kontrollcsoportban egy széles körben elfogadott módszer szerint. Röviden, a résztvevőket megkértük, hogy a begyűjtés előtt öblítsék ki a szájüregüket háromszor csapvízzel; a nyálmintákat a nem-stimulált szájüregben, a bukkális redőből 5 ml-es fecskendővel vettük, majd Eppendorf csőben (Eppendorf Austria GmbH, Bécs, Ausztria) jégen tároltuk. Ezt követően a mintákat 2500/min fordulaton, 12 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A nyálminták felülúszóját további vizsgálatokig -80°C-on tároltuk. A kutatást a Pécsi Tudományegyetem Ember- és Állatkutatási Etikai Bizottsága hagyta jóvá az Ember- és Állatkísérleti Etikai Kódex-szel összhangban (eng. sz. 3382/2009).

5.2. ELEKTROFORÉZIS

A fehérjék azonosításához legtöbbször nem tiszta, nem csak egyféle fehérjét tartalmazó oldat áll rendelkezésünkre. A benne lévő fehérjéket szét kell választani. Az elektroforetikus módszerek mára a legérzékenyebb, legsokfélébb és legnépszerűbb szeparációs technikák közé tartoznak. Lényegük, hogy vizes közegben létrehozott elektromos térben a töltéssel rendelkező molekulák elmozdulnak az ellentétes töltésű elektród felé. Ha a vándorlásuk iránya vagy sebessége különböző, a molekulák egymástól elválaszthatók. A vándorlás sebessége függ a molekula töltésétől, tömegétől és a súrlódási együtthatótól, továbbá az elektromos tértől.

Fehérjék esetében a legjobb felbontást az SDS-PAGE biztosítja. Az akrilamid-monomerek polimerizációra képesek, így hosszú, el nem ágazó polimer láncokat alkotnak. A metilén-bisz-akrilamid a láncok közt hidakat képez, így a gél egyetlen térhálós szerkezetű polimerré alakul. A monomerek koncentrációjával szabályozható a gél pórusnagysága, vagyis az áteresztőképessége. A poliakrilamid géleket általában két üveglap között, géllemez formájában polimerizálják, az elektroforézis függőleges helyzetben történik. Az SDS a fehérjét denaturálja, mintegy "kitekeri" a fehérjéket, apoláros részével azok belső, hidrofób magját fellazítja, és mivel anionos detergens, a fehérjéket negatív töltésekkel látja el. A kötődött SDS mennyisége egyenesen arányos a lánc hosszával, vagyis a fehérjék molekulatömegével. Ez más szóval azt jelenti, hogy az SDS kezelés után az összes fehérje relatív töltése nagyjából azonos lesz. Ráadásul a kezelés hatására az egyes fehérjék alakja is hasonlóvá válik. A negatív töltésű SDS molekulák taszítják egymást, ezért az SDS-kezelt fehérjék valószínűleg közel rúd alakúak lesznek. Mindez azt eredményezi, hogy az egyes fehérjék kizárólag méretük szerint elválaszthatók lesznek. Mivel a molekulaméret arányos a molekulatömeggel, az SDS-PAGE végső soron molekulatömeg szerint szeparál. Ismert molekulatömegű fehérjékkel kalibrálva lehetőség nyílik a fehérjénk molekulasúlyának meghatározására [55,56].

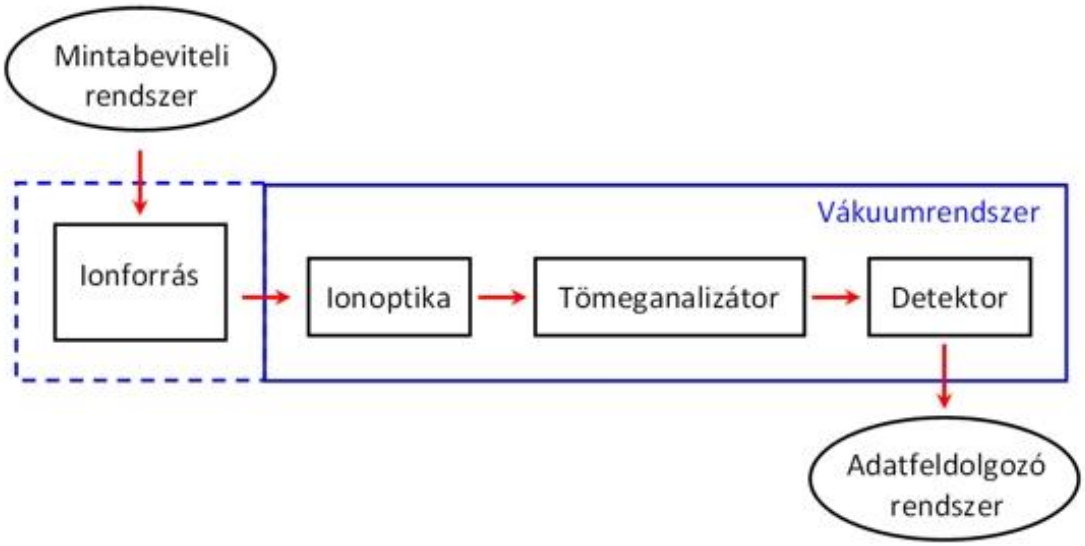


4. ábra: Fehérjék elválasztása poliakrilamid gél lemezben

5.3. TÖMEGSPEKTROMETRIA

A tömegspektrometria (mass spectrometry, MS) egy olyan analitikai technika, amely szerves és szervetlen komponensekből képződött ionok tömeg/töltés (m/z) arányának vizsgálatát teszi lehetővé. A módszer azon alapul, hogy az elemzett anyag részecskéiből keletkezett ionok elektromágneses tér hatására relatívtömegük és töltésük hányadosa szerint szétválaszthatók.

5.3.1. A tömegspektrométer felépítése és működése



5.ábra: Tömegspektrométer működési elvének sematikus rajza

A tömegspektrométer főbb részei a következőek:

1. minta előkészítő-bevivő rendszer,

2. ionforrás,

3. analizátor

4. detektor

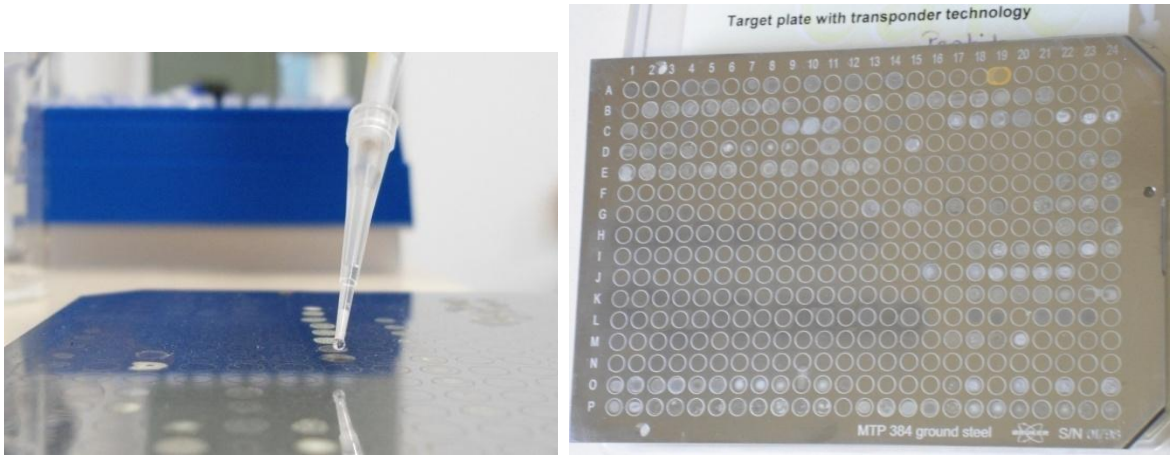
5. kapcsolódó számítógépes adatfeldolgozó és irányító rendszer.

Az analizátor, a detektor és az ionforrások viszonylag jelentős vákuum (10^{-4}–10^{-7}mbar) mellett üzemeltethetők. A nagyvákuum az ionizáció hatékonyságának növelését, másrészt az ion-molekula ütközések minimalizálását szolgálja. Ezek a nem kívánt kölcsönhatások módosíthatnák az ionok repülési pályáit, részben vagy teljesen kiolthatnák töltésüket, így reprodukálhatatlanná tehetnék a tömegspektrumot. A modern tömegspektrométerekben a nagyvákuumot két lépésben állítják elő. Elsőként egy elővákuum-szivattyú 10^{-2}–10^{-3} mbar vákuumot hoz létre, erre a célra általában rotációs szivattyút alkalmaznak. A 10^{-4}–10^{-7} mbar nagyvákuumot egy vagy több turbómolekuláris szivattyú biztosítja. A nagyvákuum alkalmazása nagyban növeli az érzékenységet és a felbontást is.

5.3.2. Mintaelőkészítés

Tömegspektrometriával elméletileg bármilyen halmazállapotú sokkomponensű rendszer vizsgálható, azonban ezt nagyban befolyásolja az alkalmazott mintabeviteli és ionizációs technika. Illékony vegyületeket (például: gázok, könnyen párolgó anyagok) közvetlenül be lehet vezetni a forrásba, ahol az ionizáció megtörténik. Ha a vegyület nem ilyen, akkor először fel kell oldani, oldat formájában cseppenteni a targetlemezre (5. ábra), majd valamilyen alkalmas megoldással gázfázisba juttatni; ez történhet elektromos erőtér vagy porlasztás és szárítógáz segítségével. Az oldószer helyes megválasztása alapvetően befolyásolja a tömegspektrum minőségét.

Általánosságban kerülendő a pufferek és a nem illékony sók alkalmazása.



6.ábra: Minták felcseppentése a mintatartó lemezre

5.3.3. Ionforrások

Ionforrásnak nevezzük a tömegspektrométer azon részét, melynek segítségével a minta molekuláiból gázfázisok képződnek. A méréshez szükség van a vizsgált részecskék ionizálására, mivel a készülékben való mozgatásuk az elektromos töltésükre gyakorolt hatás alapján történik.

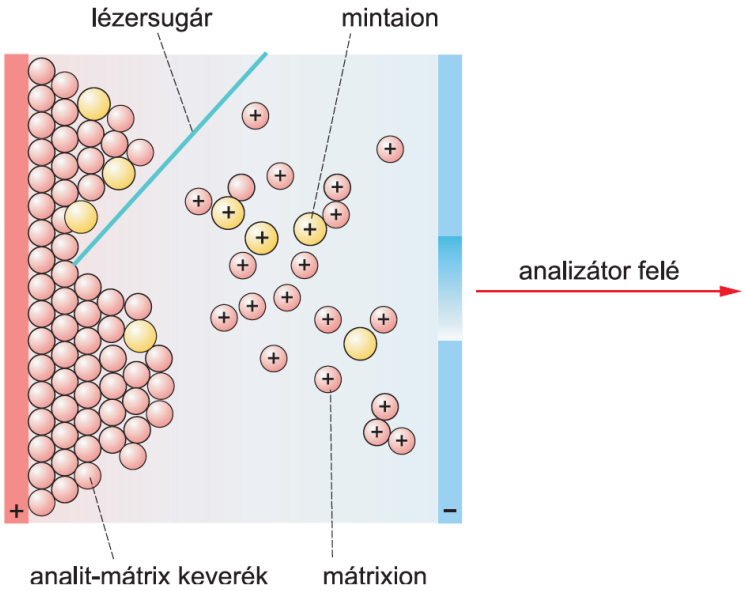
Optimális ionizálási feltételek kellenek a megfelelő érzékenység eléréséhez, a maximális szerkezeti információ kinyeréséhez.

Az ionizációs technika megválasztását főként a vizsgálandó molekula és az azt körülvevő mátrix határozza meg. Mivel univerzálisan alkalmazható ionizációs technika nincs, így a készülékek fejlődésénél meghatározó szerepű a különböző ionforrások cseréjének gyorsasága és egyszerűsége. A legrégibb és igen gyakran alkalmazott eljárás az elektron-ionizáció vagy a kémiai ionizáció.

Az 1980-as években mutatták be a mátrix segített lézer deszorpciós ionizációt (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – MALDI). Ez a módszer képes volt nagyméretű biomolekulák ionizálására. Ennek a módszernek a lényege, hogy az előzetesen előkészített

mintamolekulákhoz kis molekulatömegű, szerves ún. mátrixanyagot keverünk, amely elnyeli és közvetíti a lézer energiáját a vizsgálandó anyagnak, illetve ionizálja azt, miközben meggátolja a keletkezett ionok fragmentációját. A mintát tulajdonképpen a gerjesztett, ionizált mátrixmolekulák fogják ionizálni, miközben egy lépésben végbemegy a lézer deszorpció és ionizáció. A keletkezett ionok egy gyorsítón keresztül jutnak az MS analizátorba (6. ábra).

Tripszinnel emésztett biomolekulák vizsgálatához általában α-ciano-4-hidroxi-fahéjsavat (CHCA) használunk mátrixként. Alkalmazásával igen magas szenzitivitású vizsgálatok végezhetők, kb. 10 kDa méréshatárig [59].



7. ábra: MALDI működésének sematikus rajza

[*A fehérjekutatás modern módszertana, Medicina kiadó, 2011.*]

5.3.4. Analizátor

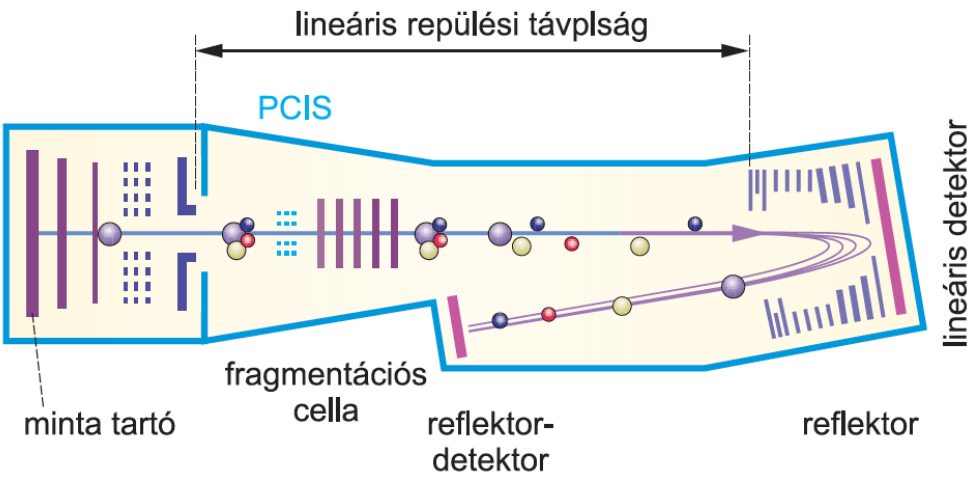
Az analizátorban a képződött ionok szétválasztása történik a tömegük és a töltésük hányadosa szerint. Minél kisebb az ion tömege és minél nagyobb a töltése, annál nagyobb

sebességre képes szert tenni egy adott térerősség hatására. Tulajdonképpen ezt használják ki az ionok transzportján alapuló módszerek. Az újabb, modernebb készülékek inkább az ionok szelektív tárolása révén választják szét a részecskéket. Az analizátor jellemző paraméterei a maximális vizsgálható tömeg, az áteresztőképesség (a detektált és a képződött ionok számának hányadosa), illetve a maximális felbontóképesség. A legfejlettebb tömegspektrométerek esetében az utóbbi érték elérheti az egymilliót is.

Az egyik legelterjedtebb analizátor típus az ún. quadrupol tömegszűrő elven működik. Itt az ionok négy párhuzamos hengeres rúd között haladnak, amelyekre egyenáramot és nagyfrekvenciás váltóáramot kapcsoltak. A szemben lévő rudak azonos, a szomszédosak ellentétes polaritásúak, így közöttük oszcilláló elektromos tér alakul ki.

Az ide bejutó ionok különböző amplitúdójú kitéréseket végezve haladnak, a rudak közti ideális pályát csak meghatározott m/z értékű ionok képesek tartani. A quadrupol készülékek viszonylag egyszerűbben működtethetők, gyorsak, jól kombinálhatók különféle ionforrásokkal. Hátrányuk, hogy tömegpontosságuk és felbontóképességük viszonylag alacsony. Hasonló elven működik az ioncsapda is, amelynél egy gyűrű alakú és két másik elektród között jön létre az oszcilláló háromdimenziós elektromágneses tér.

Az elektrotechnika fejlődésével lehetővé vált igen kicsiny időkülönbségek pontos észlelése, amely a repülési időn (time-of-flight, TOF) alapuló elválasztás alapját képezi. A megoldás lényege, hogy a repülési csőbe azonos időpillanatban, azonos kinetikai energiával rendelkező ionok kis csomagjai érkeznek, és a detektort az m/z arányos repülési idő után érik el. A TOF készülékekkel ma már igen jó felbontóképesség, széles mérési tartomány érhető el, illetve alkalmazásukkal megvalósítható többféle fragmentációs lehetőség is. Megfelelő ionforrással (MALDI) kombinálva a nagyobb biomolekulák vizsgálatában nélkülözhetetlenek [59]. A MALDI-hoz ideális a repülési idő analizátor, mivel általa kihasználható a több száz daltonos felső tömeghatár, valamint nagy felbontás és érzékenység érhető el.



8. ábra: A repülési idő analizátor felépítése és működési elve

[*A fehérjekutatás modern módszertana, Medicina kiadó, 2011.*]

Vizsgálatainkban MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight) típusú eszközt használtunk a mérések elvégzésére. Ez a technika a nem illékony biopolimerek, peptidek, fehérjék, valamint szintetikus rendszerek szerkezetének komplex tanulmányozására kitűnően alkalmas. A tömegspektrométerek rendkívül kis anyag mennyiségű minták (femtomolnyi mennyiségben) gyors, pontos, megbízható analízisére alkalmasak, az elválasztástechnikában használatos módszerekkel jól kombinálható készülékek. Minőségi analízist végezhetünk, a gép alkalmas a nagy áteresztőképességet igénylő mérésekre (high throughput típus), hiszen akár napi 6500 mérést is képes elvégezni automatizált üzemmódban. Használatával szekvencia információkhoz juthatunk, és kémiai módosítások pontos kimutatására valamint verifikációra is alkalmas. Mennyiségi mérésre nem használható, erre inkább kromatográfiás méréseket alkalmazhatunk. A vizsgált minták áttekintő felmérése (screening) egyszerűen és gyorsan elvégezhető. Az eszköz fenntartása relatíve olcsó, működési elvéből fakadóan nem jellemző a meghibásodása.

5.3.5. Detektor

A tömegspektrométerben haladó ionok csoportja lényegében a forrástól a detektorig tartó elektromos áramot jelent. A készülékek detektorai a hozzájuk érkező rendkívül kis ionáramot (10–10–10–15 A) érzékelik, és értékével arányos analóg elektromos jelet képeznek.

5.3.6. Fragmentálás és tandem tömegspektrometria

Ha viszonylag kis energiával ionizáljuk a vizsgálandó anyagunkat, akkor a molekulák egészben maradnak, és a tömegükre és töltésükre jellemző un. molekulacsúcsot [M+, M–] kapunk. Többnyire azonban jóval nagyobb mennyiségű információ nyerhető, ill. speciális problémákra (pl. több anyag elkülönítése, szekvenálás) jobb megoldást jelent, ha a részecskéket kinetikus energia hozzáadásával pontosan szabályozott módon széttördeljük, fragmentáljuk. Ez a folyamat végbemehet az ionizációs folyamat során, ill. röviddel utána (in source és post source decay, ISD, PSD), vagy az analizátorban egy inert gázzal való ütközés révén (collision induced dissociation, CID; és electron transfer dissociation, ETD).

Természetesen ilyenkor csak azok a fragmentumok, más szóval leányionok jönnek szóba, amelyek az eredeti töltést tovább hordozzák. Ezt a jelenséget használja ki a tandem tömegspektrometria – jelölése: MS/MS vagy MSn –esetében, amikor két egymás után kapcsolt analizátor közé egy jellemzően argon, hélium vagy nitrogén gázzal működtetett ütközési cellát (collision cell) iktatnak. Itt lehetőség van az első analizátorban szétválasztott ionok egyenkénti fragmentálására, és a leányionok szelektív vizsgálatára.

5.3.7. A tömegspektrum

A tömegspektrum a tömeg/töltés (m/z) arány és az ionintenzitás függvényszerű ábrázolása. A legmagasabb csúcs a báziscsúcs, ehhez viszonyítjuk az összes többi komponenst. Az abszolút ionmennyiség arányos a mintában jelen levő anyagmennyiséggel, a fragmentumok relatív ionintenzitásai pedig a molekulatípusra és az alkalmazott mérési eljárásra jellemzőek. A készülékre, így a kapott tömegspektrumra is jellemző a felbontóképesség, amely azt a $R = m/\Delta m$ értéket jelenti, ahol m a tömegszám, melytől egy szomszédos csúcsot még éppen el tudunk különíteni. Ehhez meg kell adni, hogy a két csúcs közös átfedő szakasza legfeljebb milyen relatív magasságú lehet, Δm a két csúcs tömegének különbsége (ill. helyesebb m/z és $\Delta[m/z]$ értékekről beszélni). A felbontóképesség a nagyobb tömegek felé haladva általában csökken, tipikusan 15000–100000 értékű.

5.3.8. Fehérjék azonosítása - PMF (Peptide Mass Fingerprinting)

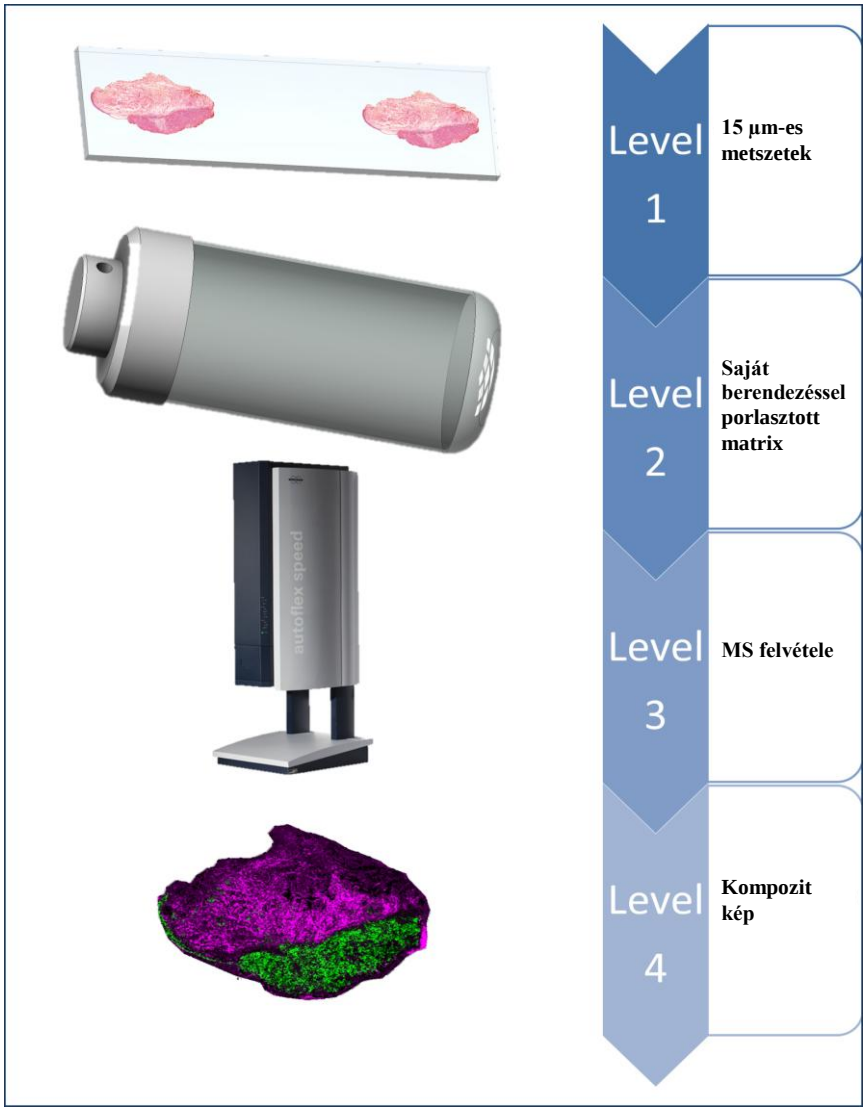
A fehérjék proteolítikus hasítási termékeinek adatbázisban történő lekeresésén alapuló vizsgálatok alapját az képezi, hogy a fehérjék adott specificitású enzimmel, vagy kémiai úton való emésztése révén kapott peptidekhez a szekvenciájuknak megfelelő tömegek tartoznak. Ez azt jelenti, hogy adott szekvenciával rendelkező fehérje egy tömeglistát ad meghatározott emésztés során, amit az adatbázis lekeresések az adatbázisban lévő fehérjék elméleti emésztése során kapott peptidek tömeglistájával hasonlítanak össze. Ilyen adatbázis kereső programok például a Mascot, SwissProt, NCBInr. Az adatbázis keresés felhasználja a peptidek MS/MS spektrumát, amely alapján lehetséges aminosav szekvenciákat határoz meg, összevetve ezt az adatbázisban lévő fehérjék szekvenciájával.

5.4. KÉPALKOTÓ TÖMEGSPEKTROMETRIA (MALDI-IMAGING)

Napjaink egyik legígéretesebb peptid és protein biomarker diagnosztikai alkalmazása a MALDI TOF/TOF tömegspektrometriára épülő képalkotó módszer (MALDI Imaging), amelynek során egy speciális mintatartóra 10-20 mikronos szövettani metszetet és mátrixot szárítunk. Ezt követően a mintáról előre meghatározott szisztémában és lézerintenzitással több ezer tömegspektrumot veszünk fel. Ezeket a megfelelő szoftver az egyes m/z értékekhez tartozó intenzitások alapján képként jeleníti meg. A módszer óriási előnye, hogy párhuzamosan alkalmazható az egyéb (in vivo fluoreszcens, NMR, MRI, CT, FT-IR) képalkotási módszerekkel, így olyan új tudományos és diagnosztikai eredményeket szolgáltathat, amelyek forradalmasítják a klinikai diagnosztika mai módszertanát. A MALDI imaging lehetőséget ad a fehérjék vizsgálatára direkt in situ a szöveti felszíneken, vagy vékony metszetekben, megőrizve a szövet szerkezeti integritását [60-64]. Következésképp olyan kép hozható létre, mely igen hasonlatos a szövettani metszetéhez és a molekuláris komponensek térbeli eloszlását mutatja [65-70]. Így nem csak ép és kóros szövet közötti különbség tehető láthatóvá, hanem lehetőséget ad arra is, hogy a malignus transzformáció olyan korai szakaszát észleljük, amely szövettanilag még nem detektálható [71,72].

A képalkotási tömegspektrometria lehetőséget ad arra, hogy a szövettani információkat kombináljuk egy jelölésmentes analítikai módszerrel. Az eljárás során 15 μm-es fagyasztott metszeteket készítettünk -17°C-on CMC (carboxymethyl cellulose) beágyazást követően a metszeteket speciális ITO (Irridium-ón-oxid) bevonatos üveg tárgylemezre vesszük fel (Part No. 237001, Bruker Daltonics, Bréma, Németország). A metszeteket először jéghideg 70%-, majd 90%-os vizes etanol oldattal mostuk 1-1 percig. Nitrogén gázos szárítást követően mustársav mátrixot használtunk, amelyet 50 ciklusban porlasztottunk a mintára az általunk kifejlesztett piezoelektromos berendezés segítségével. A 7 mg/ml-es mátrix oldat minden nap frissen készült acetonitril és 0,2%-os TFA oldatában (6/4, v/v). A tömegspektrometriás

vizsgálatokat egy Bruker Autoflex Speed MALDI TOF/TOF 1 kHz-es szilárd fázisú Smartbeam lézerrel szerelt tömegspektrométerrel végeztük el. A méréseket pozitív ionizációs módban, lineáris detektálás mellett végeztük m/z 3000 és 30000 tartományon belül. Térbeli felbontásnak 80 mikrométert használtunk, pixelenként 300 lézerlövésből származó tömegspektrumok átlagát rögzítettük. Az adatok kiértékelés FlexImaging 3.0 és FlexControl 3.4 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) használatával történt. ClinProTools 2.2 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) szolgált a reprezentatívnak tartott területek tömegspektrum alapú statisztikai analízisére. A statisztikai elemzések során a szoftver elvégezte a spektrumok újrakalibrálását, spektrális kiértékelését, normalizálását és a különböző adathalmazok statisztikai algoritmusokkal történő modellezését.



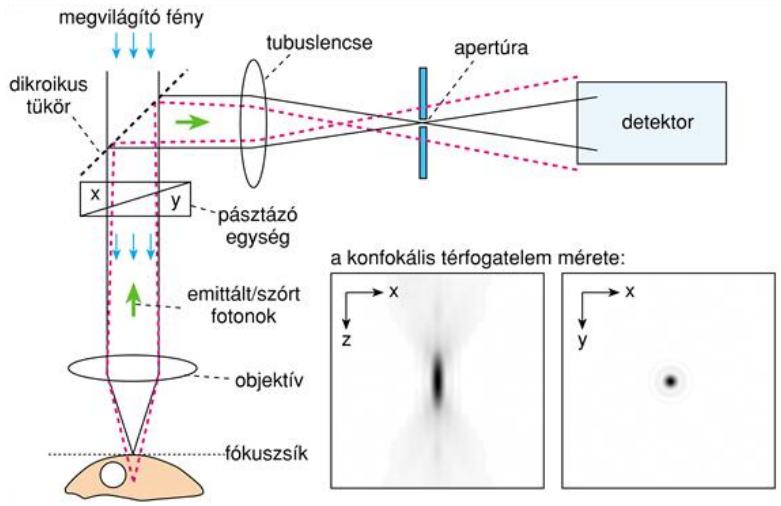
9. ábra: Képalkotási tömegspektrometria folyama

5.5. IMMUNHISZTOKÉMIA, KONFOKÁLIS MIKROSZKÓPIA

A sejtek morfológiai sajátságait vizsgálhatjuk festés után hagyományos képalkotó eljárásokkal, de ellenanyagokkal való specifikus jelölés segítségével pontosabb molekuláris információkra tehetünk szert. A sejtek intracelluláris és sejtfelszíni fehérjemolekulái ellen fejlesztett specifikus poli- vagy monoklonális ellenanyagokkal, enzim vagy kovalensen kötött fluoreszcens jelzés felhasználásával immunhisztokémiai eljárással mikroszkópos megfigyeléseket tehetünk a sejtek fehérje alkotóelemeiről.

A konfokális mikroszkóp fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatára alkalmas. Jobb felbontású képeket ad, mint a hagyományos fluoreszcens mikroszkópok, és képes "optikai szeletelésre", vagyis képet alkotni a minta egyetlen szeletéről. A kapott digitális kép számítógéppel kezelhető és elemezhető. Több szelet képét összerakva a fluorofór térbeli elhelyezkedése is vizsgálható.

A hagyományos mikroszkópokkal szemben, ahol a minta egy területét éri a megvilágítás, a konfokális mikroszkópnál egyszerre csak a minta egy pontját világítják meg. A lézer fényforrás fényét az objektív lencse a minta egy pontjára fókuszálja (ez esetben az objektív játssza a kondenzor szerepét is), majd a mintából eredő fluoreszcens, ill. visszavert fényt ugyancsak az objektív gyűjti össze. Mivel egyszerre csak a minta egyetlen pontját világítja meg, a konfokális elrendezés önmagában nem ad képet. Ahhoz, hogy képet kapjunk, sorra végig kell pásztázzuk a vizsgálandó terület minden egyes pontját. Ezt a jelenleg használatos rendszerek többségénél pásztázó nyalábbal oldják meg (beam scanning). Ekkor az eltérített nyaláb sorra végigfut a terület minden pontján, épp úgy, ahogy az elektronsugár a tévéképernyőn. A detektor minden egyes pontban megméri a fény intenzitását, ezekből a konfokális mikroszkópia összerakja a képet.



10. ábra: Konfokális mikroszkópia elve

6. EREDMÉNYEK

Kísérleti munkánk praktikusan két fázisra tagolódott. Az elsőben elvégeztük a beteganyagból származó nyálminták proteomikai elemzését annak érdekében, hogy fehérje biomarkereket azonosítsunk. A második fázisban a betegek szövettani metszeteiből származó mintákat képalkotási tömegspektrometria segítségével vizsgáltuk a biomarkerként azonosított proteinek lokális eloszlásának, expressziójának meghatározása céljából. Ezért dolgozatom is ezt a felépítést követi, így az eredmények részben két nem egyező számú beteganyagon végzett multimodális vizsgálat eredményeit mutatom be.

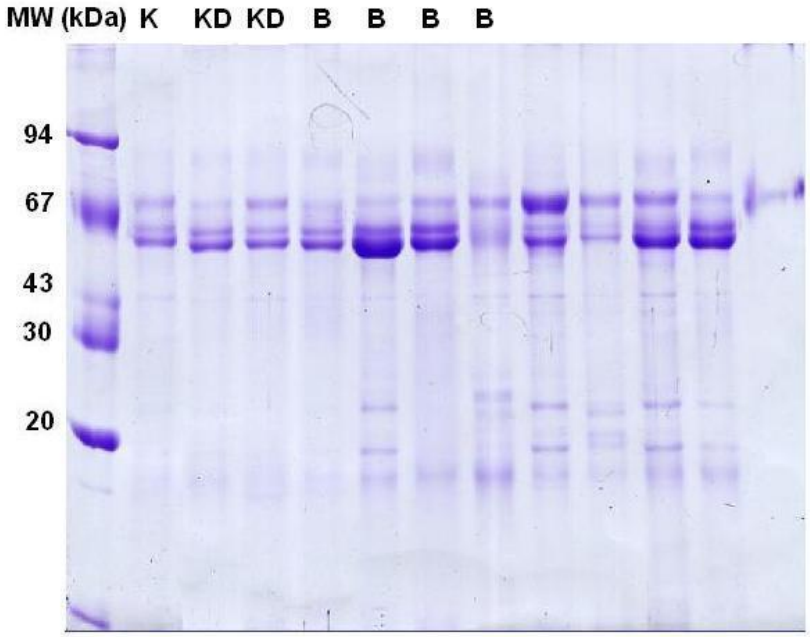
6.1. FEHÉRJE BIOMARKEREK AZONOSÍTÁSA NYÁLMINTÁKBÓL

6.1.1. Beteganyag

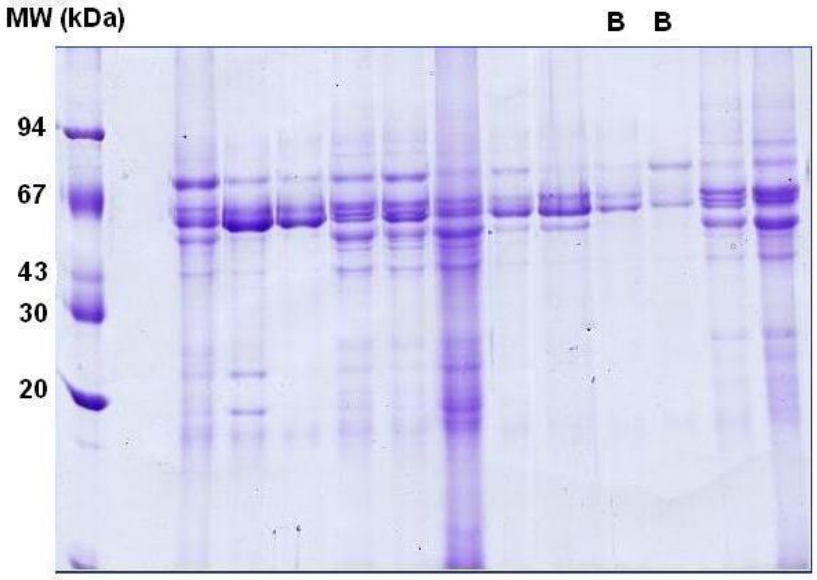
A kutatásban 25, az anyaggyűjtésbe beleegyező, fej-nyaki tumorban szenvedő beteg (10 nő, 15 férfi) vett részt; az átlagéletkor 56,48 év volt (a legfiatalabb beteg 22, a legidősebb 78 éves volt). A **függelék 2. táblázata** szemlélteti részletesen az összes vizsgált, fej-nyaki tumorban szenvedő beteg adatait. A fej-nyaki tumoros betegeket egy 25 egészséges önkéntesből álló kontrollcsoporttal (15 dohányzó, 10 nem dohányzó) hasonlítottuk össze kor és nem szerint. A tumoros csoportban 19 betegnél malignus, 6 betegnél benignus fej-nyaki daganat állt fenn. A fej-nyaki laphámkarcinómával diagnosztizált betegek mindegyike erős dohányosnak számított (legalább 1 csomag cigaretta naponta). A betegek közül senki sem részesült terápiában a nyálminta gyűjtését megelőzően.

6.1.2. SDS-PAGE gélelektroforézis

Ultra Turrax homogenizátort használva, a nyálmintákat 20 mM Tris/HCl pufferoldatban (pH 7,4) homogenizáltuk, mely 3 mM EDTA-t, 5 mM beta-merkaptoetanolt és 1% SDS-t (nátrium dodecilszulfát) tartalmazott. 1%-os brómfenol-kék hozzáadása után a mintákat 2 percig forraltuk, majd centrifugáltuk (8000 g 2 percig). SDS-PAGE-t végeztünk 12%-os gélen Laemmli módszere szerint [73]. A molekulatömeg meghatározásához alacsony móltömeg kalibrációs kitet (Pharmacia) használtunk. A géleket Coomassie brilliant blue R-250-nel festettük meg, majd a festéket egy 5% (v/v) ecetsavat valamint 16% (v/v) metanolt tartalmazó oldattal eliminált uk. Az előkészített mintákat SDS-poliakrilamid gélen futattuk, hogy a fehérjék méret szerint szétváljanak. Az elektroforetogrammon tisztán kivehető a különbség a kontrol és a tumoros nyálminták összetételében (11-12. ábra)



11. ábra: Néhány kontrol és patológás minta elektroforetomgrammja (K: kontrol, KD: kontrol dohányos, B: benignus elváltozás, malignus elváltozások jelölés nélkül, A minták: 1K, 1KD, 2KD, 3, 7, 9, 11, 4, 6, 8, 13)



12. ábra: Malignus és benignus elváltozások elektroforetogrammja (B: benignus, malignus elváltozások jelölés nélkül, A minták: 1, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23))

Az elektroforetikus futtatás után a géleket bescanneltük, majd a vizuális összehasonlító elemzés után, az extra sávokat, amelyek a betegek mintáiban keletkeztek, szikével kimetszettük.

A gél darabokat szobahőmérsékleten dehidráltuk, majd 10 µL tripszin (0.04 mg × mL-1) Tris puffer (2,5 mM, pH 8,5) oldattal 37°C-on 1 éjszakán át inkubáltuk. A kivont peptideket 15 perces ultrahangos fürdőben 15 µL acetonitril és hangyasav (49/50/1v/v/v) vizes oldatban tartottuk. Az oldatból való kivonás után a peptideket liofilizáltuk, és újra feloldottuk vízben. A liofilizált fehérje triptikus emésztményének vizes oldatát a mintatartó lemezre (MTP 384 massive target plate, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) vittük fel. A mintatartó tálcán minden egyes 1 µL térfogatú mintaoldathoz 1µL telített mátrix oldatot kevertünk. A mátrix oldatot minden felhasználás előtt frissen készítettük: α-ciano-4-hidroxi-fahéjsavat (CHCA) acetonitril /0,1% TFA (1/2 v/v)-ben oldva.

6.1.3. Tömegspektrometriás elemzés

A tömegspektrometriás méréshez Autoflex II TOF/TOF típusú (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) készüléket használtuk. A MALDI TOF „peptid mass fingerprint (PMF)” elkészítésére a LIFT mode for PSD (post source decay) és CID (collision induced decay) fragmentációt alkalmaztuk automatizált üzemmódban, FlexControl 2.4 számítógépes program vezérlésével. A PMF-hez 20 kV gyorsító feszültséget használtunk. A műszer 337 nm-en emittáló pulzáló nitrogén lézert alkalmaz a minta és a mátrix elpárologtatásához és ionizációjához (model MNL-205MC, LTB Lasertechnik Berlin GmbH., Berlin, Germany). Minden egyes mérés előtt külső tömegkalibrációt végeztünk a Bruker Peptide Calibration Standard szet segítségével (#206195 Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A mérések során m/z 800 és 5000 között detektáltuk a tömegspektrumokat, és minden egyes mérési eredményt 500 egymást követő lézerlövés egyesített adataiból számoltunk ki.

13. ábra: Bruker Daltonics, Autoflex II tömegspekrometriás készülék [http://www.medwow.com/med/mass-spectrometer/bruker/autoflex-ii-linear-tof/60250.model-spec]

A fehérjék PMF azonosítása MSDB (Swiss-Prot) és NCBInr adatbázisok alkalmazásával, majd MASCOT adatbázis (MASCOT Server 2.2 search engine, MatrixScience Ltd., London, UK) keresőmotor és Bruker BioTools 3.0 software (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) segítségével történt. A keresés során az egyszeresen pozitív töltésű monoizotópos peptidcsúcsokat vettük figyelembe, keresési hibahatárnak 100 ppm-et, illetve 1 kihagyott triptikus hasítási helyet adtunk meg. Az adatok további feldolgozását a Bruker FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics, Bremen,Germany) és a Bruker FlexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) programok segítségével végeztük el. A MALDI-TOF/TOF tömegspektrometria felhasználásával azonosítottuk azokat a fehérjéket, melyek jelenléte kimutatható a betegségek manifesztációja során, illetve amik diagnosztikai értékűek lehetnek. A meghatározás során rögzítettük az elsődleges tömegspektrumot, majd ezt követően a nagyobb intenzitású, vagy diagnosztikailag jelentős peptideket PSD,- vagy CID fragmentációval tovább bontottuk. Így tudtuk meghatározni a peptidek pontos elsődleges szerkezetét és annak módosulásait [54,55]. A daganatos betegekre jellemző kimetszett sávokban lévő peptidekről készült MALDI TOF/TOF MS vizsgálatban fehérjéket identifikáltunk. Azokat a proteineket, melyek a daganatos minták több, mint 85%-ban azonosíthatók voltak a **3. táblázatban** tüntettük fel. A legnagyobb mennyiségben jól ismert, általános funkciójú proteineket találtunk a daganatos és az egészséges önkéntesek mintáiban, mint amiláz, keratinok és aktin. Emellett az annexin 1, zinc finger protein 28, regulator G-protein 3, indoleamine 2,3-dioxygenase, OFD1 protein és CEP290 proteinek emelkedett szintje volt regisztrálható a daganatos betegek nyálmintáiban.

No	*Protein name*	*Accession number*	*Matched peptides*	*Theoretical MW (Da)*	*Mascot score*	*Sequence coverage %*
1	Annexin 1	gi: 4502101	12	38690	127	40
2	Cytokeratin 4	gi:194387942	10	56193	95	18
3	Cytokerain 13	gi: 30377	8	45837	77	20
4	Zinc finger protein 28	gi: 56542871	5	77418	54	13
5	Regulator G-protein	gi: 62865654	10	67240	103	22
6	Indoleamine 2,3-dyoxigenase	gi: 215274147	5	45396	60	12
7	Unnamed protein product	gi: 194375299	5	37325	71	18
8	OFD 1 protein	gi: 64654925	12	111675	82	16
9	Chain A, human salivary amylase	gi: 14719766	11	55857	109	31
10	Unnamed protein product	gi: 47077030	7	38266	67	26
11	Keratin type 1 cytoskeletal	gi: 24430192	19	51236	218	41
12	CEP 290 protein	gi: 14250413	7	19223	89	39
13	COL6A3	gi: 219841772	12	278032	67	6

3. táblázat: A daganatos minták több, mint 85%-ban azonosítható proteinek

6.1.4 Azonosított fehérjék

Annexin A1

Az Annexin család tagja, Ca-dependens fehérje. A foszfolipáz A2 gátlása révén az inflammatorikus ágensek: prosztaglandinok, leukotriének képződése nem jön létre, így gyulladáscsökkentőnek tekinthetjük. Biológiailag aktív szerepét kimutatták különböző gyulladásos patomechanizmusokon túl a sejtproliferáció működtetésében, a sejtpusztulás szignalizációjakor, illetve a karcinogenezisben is. Az NFκB 35 szignáltranszdukciós jelátvitelt gátolja, amit a tumorsejtek arra használnak, hogy fokozzák a sejtproliferációjukat,

és elkerüljék az apoptózist. Így fontos szerepük van tehát a karcinogenezisben, lassítják a tumor progresszióját. Nem csak szájüregi tumorok esetén mutatható ki, hanem emlő, cervix, prostata, oesophagus rák és hajas sejtes leukémia esetén is. Hajas sejtes leukémiában megnő a szintje, az emlőráknál pedig szabályozza az ösztrogén proliferatív funkcióit: itt úgy viselkedik akár egy tumorszuppresszor gén, illetve a DNS károsodások ellen is véd. Ez a sokoldalúság az ANX A1 fehérjét a jól használható tumormarkerek közé emeli [74-78]. Ezen kívül a veleszületett és szerzett immunrendszer erősítésében is részt vesz, például a T sejteket stimulálja. Néhány autoimmun betegség (rheumatoid arthritis, lupus erythematosus) kezelésében is értek el már eredményeket az ANX A1 segítségével.

Cink-ujj fehérjék

A cink-ujj fehérjék a transzkripciós faktorok családjába tartoznak, így olyan DNS kötő fehérjék, melyek a génátírást szabályozzák. A transzkripciós faktorok doménstruktúrája hasonló: tartalmaznak egy DNS-kötő domént, amely felismeri a megfelelő szekvenciaelemet, és egy aktivációs domént, amely segíti az átírást. A cink-ujj fehérjék nevüket DNS-kötő doménjük jellegzetes szerkezetéről kapták. A polipeptidlánc ezen régiója kesztyűujjszerű kitüremkedéseket alkot. Az ujjak alapjának kritikus helyeit cinkionok stabilizálják. A cink-ujj az N-terminálistól haladva két béta-lemezt tartalmaz, majd ezt egy alfa-hélix követi. Az alfa-hélix merül a DNS nagy árkába. A cinkion a bétalemezek egy-egy cisztein aminosav oldalláncát, valamint az alfa-hélix két hisztidinjét (esetenként ciszteineket) tartja össze koordinatív kötésekkel, s ezzel szilárdítja meg az egész szerkezetet. A cink-ujj alfa hélixe a DNS nagy árkában három szomszédos bázispárral létesít kötést. A cink-ujj motívumot használó szabályozó fehérjében mindig több (például 3-5) motívum sorakozik egymást követve, így annyiszor három bázispárral létesít fehérjekapcsolatot, ahány cink-ujja van.

S100 A8 A9

Az S100 protein család az alacsony molekulatömegű calciumkötő fehérjékhez tartozik és cellularis folyamatok nagy számát szabályozza. Az S100A9 egy 13 kDa protein, mely Ca kötést követően az S100A8-cal interakcióba lép egy funkcionális heterodimert a calprotectint létrehozva. Mindhárom protein eredetileg gyulladásos sejtek által kibocsátott immunogenikus proteinként volt azonosítva, de pontos biológiai funkciójuk a mai napig sem ismert. A sejtciklus szabályozásában is tulajdonítanak nekik szerepet. Az extracellularis S100A8/9 apoptotikus hatását kimutatták különböző tumorsejtekre. A normál epidermiszben csak minimálisan expresszálódnak. Különböző hatásokra adott stresszválaszként az expressziójuk fokozódik/kiváltódik. Magas plazmaszintjeiket mérték számos gyulladásos folyamatban kellő szignifikanciával [79,80]. Overexpressziójuk figyelhető meg gyulladás kiváltotta karcinogenezis során is. A krónikus gyulladás különböző daganatok kialakulását is elősegíti. Ahogy a gyulladás angiogenezist idéz elő, indukálja a tumor növekedést elősegítő faktorok és anti-apoptotikus gének expresszióját is. Végezetül a károsodott sejtek apoptózisát a gyulladás gátolja, így azok tumor progresszió irányában menekülhetnek meg az apoptózistól. AZ S100A8/9 protein különbözőképp szabályozott a különféle daganatokban, és szerepet tulajdonítanak neki a daganatos sejtek proliferációjának és a metasztázis kialakulásában [81-84]. A calprotectin expressziója, a klinikopatológiai jellemzők és a betegek prognózisa közötti korreláció daganat típusonként változik, azt sugallva, hogy a molekulák funkciója igen sokrétű lehet. Egyre több bizonyíték szól amellett, hogy az S100 A8 és A9 mind pro-, mind anti tumorgenetikus hatást kifejthetnek. A calprotectin up regulációja a hiperproliferatív daganatok karakterisztikus vonása, másrészt a fehérje citotoxikus és apoptotikus hatással bír más daganatoknál [85]. Tanulmányok bizonyítják, hogy az ilyen immunmediátor molekulák tumor ellenes és tumor promoter tulajdonságokkal is bírhatnak, melyeket a mikrokörnyezetük

alakít ki végül. Tumor promoter gyulladás és anti tumor immunitás bizonyos pontig együtt is jelen lehet a tumorgenezis bizonyos pontjáig, környezeti-mikrokörnyezetei hatások alakítják az egyensúlyt közöttük [86-88].

Korábbi tanulmányok mutatták, hogy az S100A8 potenciális tumor biomarker lehet, prediktív értéke és specificitása nem ismert [89-95]. Driemel és munkatársai mutattak rá arra, hogy az S100A8 és A9 különbözik a normál nyálkahártya, gyulladásos és hiperproliferatív léziókban, valamint orális HNSCC-ben 100%-os szenzitivitással és mintegy 91%-os specificitással [96]. Jou és munkatársai állításai szerint az S100A8 protein potenciális biomarker, miután a szájüregi laphámkarcinóma különböző stádiumain vizsgáltak nyálmintákat [97].

6.2. BIOMARKERKÉNT AZONOSÍTOTT FEHÉRJÉK LOCALIS EXPRESSZIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA KÉPALKOTÁSI TÖMEGSPEKTROMETRIÁS VIZSGÁLATOKKAL

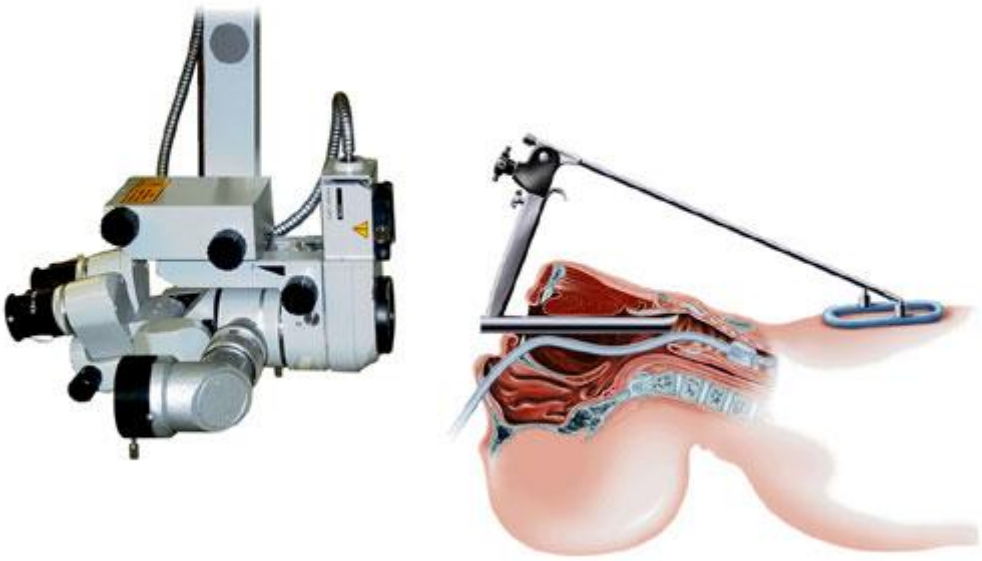
Mint azt a korábbi metodikai fejezetben ismertettem a képalkotási tömegspektrometria egy jelölésmentes, univerzálisan alkalmazható módszer a különböző lipidek, peptidek, fehérjék lokális eloszlásának és relatív koncentrációinak vizsgálatára. Ennek eredményeképp képalkotási méréseink során számos olyan korábban biomarkerként azonosított fehérjét detektáltunk, amelyek megjelenése a neoplasztikus vagy stromalis környezetre korlátozódott. Dolgozatomban ezek közül csak kettőt emelnék ki, amelyek jelenléte az epitheliális eredetű neoplasztikus elváltozásokban a mai napig is számos kérdést vet fel. Ez a két fehérje a kalciumkötő fehérjék közé tartozó S100 proteinek közé sorolható S100A8 és A9. Az S100 proteinek a számos sejtfolyamatot szabályozó kalciumkötő proteinek családjának legnagyobb alcsoportját képviselik, intracelluláris folyamatokat szabályoznak, mint a sejt növekedése, motilitás, sejtciklus-szabályozás, transzkripció és sejtdifferenciáció. Melanomában az emelkedett S100B protein-koncentráció stádiumtól független rizikófaktornak bizonyult. Szérumszintje alkalmas a prognózis becslésére, valamint megfelelő eszköz a terápia monitorozására és a beteg követésére is.

Mint az köztudott és számos tanulmányban ismertetett az S100A8 és A9 megjelenése nem ismert fej-nyaki laphámkarcinómák esetén [79,84]. Vizsgálataink, saját méréseink során éppen ellenkezőjét tapasztaltuk.

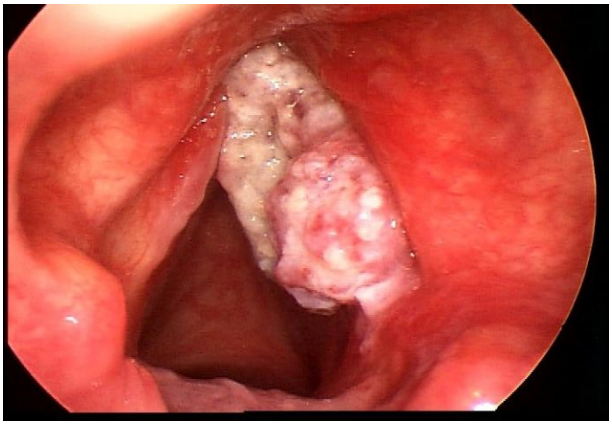
6.2.1. Beteganyag, mintavétel

Ebben a vizsgálati szakaszban 32 önként jelentkező fej-nyaki daganatos beteg vett

részt (6 nő, 26 férfi), átlagéletkoruk 60,44 év (43 - 81 év) (**függelék 4. táblázat**). Minden betegtől az előzőekben már részletesen tárgyalt módszerrel nyálmintát gyűjtöttünk. Ezt követően a fej-nyaki betegek kivizsgálási protokolljának megfelelően minden beteg úgynevezett direct laryngoscopián esett át. A legtöbbször általános narkózisban végzett vizsgálat célja egyrészt a szövettani mintavétel, másrészt pedig a folyamat pontos kiterjedésének megítélése, mely sok esetben indirekt vizsgálattal nem kivitelezhető. A beavatkozás alapvető fontosságú a diagnózis felállításához, és pozitív szövettani eredmény esetén a kezelés megtervezéséhez. Direct laryngoscopia során a beteg a műtőasztalon hanyatt fekszik, a fejét hátrahajtva. A gégéhez direkt, szájon át jutunk el az egyenes, cső alakú laryngoscoppal, melynek végét az epiglottis alá, a gége űrterébe vezetjük, nyelét pedig külön asztalkára támasztjuk. A megvilágítást külső fényforrásból vezetett hideg fénnyel biztosítjuk. A vizsgáló mindkét keze szabad a különböző beavatkozásokhoz. Az eljárás hatékonysága fokozható, ha operációs mikroszkóppal kombináljuk, és a gégét ennek segítségével vizsgáljuk át, a szükséges beavatkozásokat is így végezzük (laryngomicroscopia, laryngomicrochirurgia)



14. ábra: Direct laryngoscopiás vizsgálat

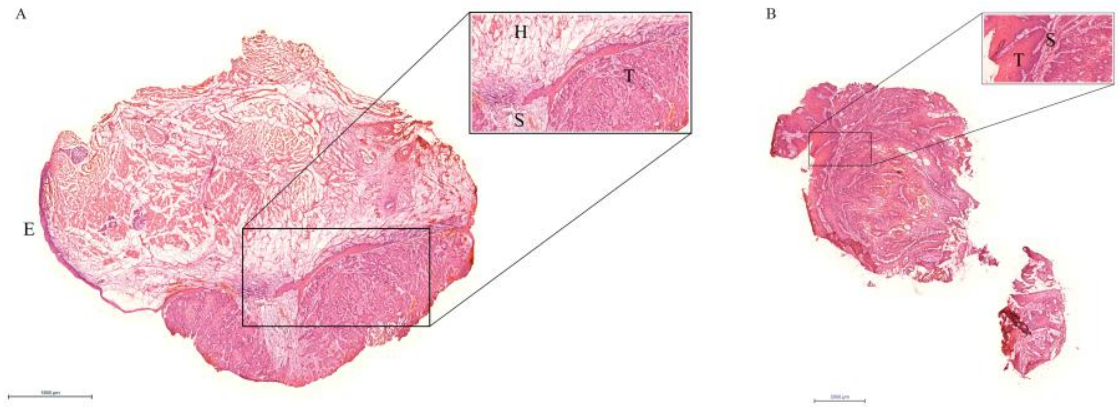


15. ábra: Jobb gégefelet érintő elszarusodó laphámkarcinóma direct laryngoscopiás képe

A vizsgálat során a daganatra gyanús elváltozás mellett a környező stromális és a daganattól távoli, makroszkóposan is egészségesnek vélt területből is mintát vettünk.

Szövettani vizsgálathoz 4 µm vastag metszeteket készítettünk *Leica CM1860 UV cryostat (Biomarker Kft., Budapest, Hungary)* segítségével. A metszetek standard hematoxylin- eosin festést kaptak, a dokumentációhoz *Pannoramic Desk digital dia scannnert (3D Histech, Budapest, Hungary*) használtunk, az adatokat *a Pannoramic Viewer 1.*15 software-rel értékeltük. Szövettanilag minden minta jól differenciált laphámkarcinómának bizonyult. In situ hibridizációs méréseink alapján minden minta HPV negatívnak bizonyult.

A 6.1.2. és 6.1.3. fejezetben már részletezett módon a proteinek azonosítását elvégeztük a szövettani minták nem daganatos, stromalis és tumoros területeiről egyaránt. Eredményeinket a **függelék 5. táblázata, valamint a függelék 1. ábra (A,B,C)** mutatja.

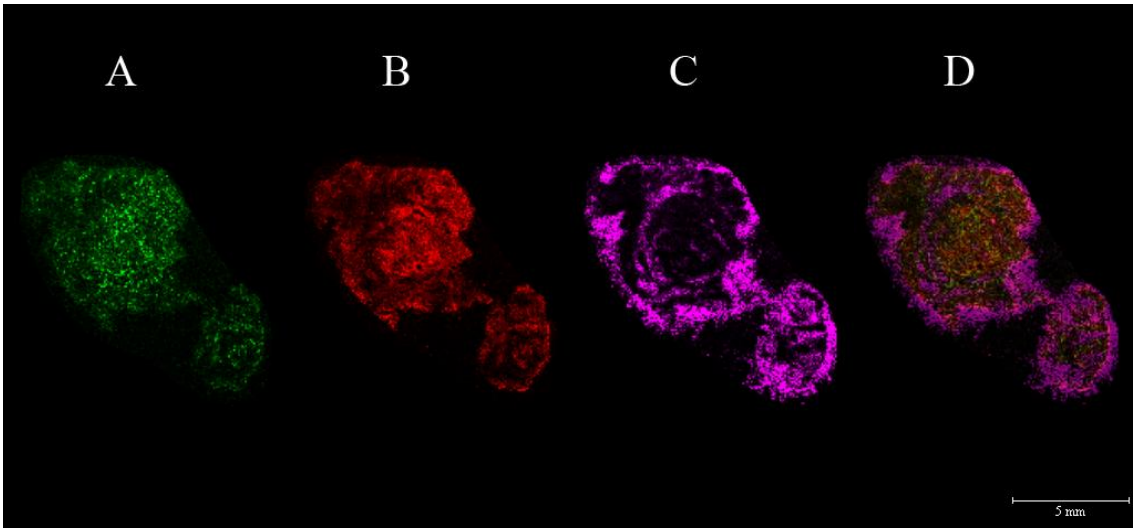


16. ábra: Standard haematoxylin-eosin festésű szövettani metszetek. Mindkét minta szövettanilag jól differenciált laphámkarcinómát mutat alacsony mitotikus aktivitással, minimális atípiával és minimális keratinizációs jelleggel. **A:** Gége laphámkarcinóma szövettani metszete. 73 éves férfibeteg (sample code B9), a jobb hangszalagot érintő daganat igazolását követően teljes dózisú irradiáció, majd reziduális daganat miatt salvage total laryngectomia, majd lokális kiújulás miatt újabb műtét. Fibroblasztokban gazdag, kissé ödémás neostroma **(S)** és krónikus gyulladás jelei figyelhetők meg a daganathoz **(T)** közel, egészséges izomszövet **(M)** és nyilvánvalóan ép nyálkahártya **(E)**. **B:** 64 éves férfibeteg (sample code B2) bal hangszalagot roncsoló invazív laphámkarcinómájának szövettani metszete teljes gégeeltávolítást követően. Neostroma **(S)**, tumor **(T)**.

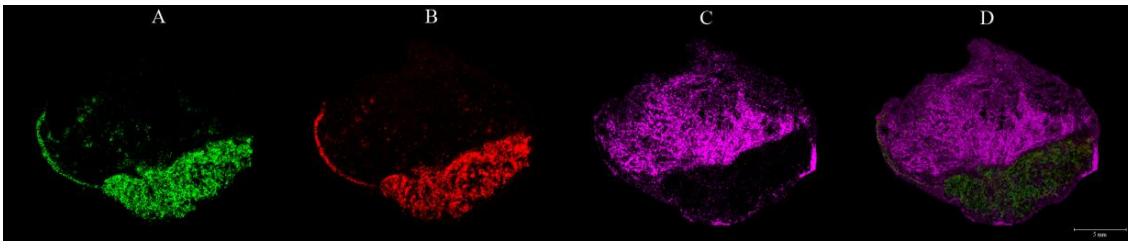
6.2.2. Képalkotó tömegspektrometria

A kiválasztott fej-nyaki daganatos betegek CMC-be ágyazott fagyasztott metszeteit előkészítettük MALDI IMS vizsgálatra: A szövetmetszteket 80 µm-es laterális felbontással vizsgáltuk MALDI TOF/TOF képalkotási tömegspektrometria segítségével. A közvetlen szöveti meghatározást 3 parallel ismétlésben végeztük. A szövettanilag nem daganatosnak bizonyult régiókat használtuk a vizsgák minták kontrolljaiként. Minden metszet szignifikáns lokális különbséget mutatott az m/z 5000 - m/z 16000 tartomány több proteincsúcsában is.

Ezek a molekuláris változások nagyon jól korreláltak a kórszövettani eredményekkel. Ebben a vizsgálatban, S100A8 (17A és 18A), és az S100A9 (17B és 18B) helyi megoszlását vizsgáltuk fehérjék felhasználásával MALDI TOF / TOF tömegspektrometriás imaging segítségével. Nyilvánvalóvá vált, hogy a calgranulinok overexperssziója a daganatos és a neostromalis területekre lokalizálódik, nem figyelhető meg a nem daganatos, egészséges szövetekben.

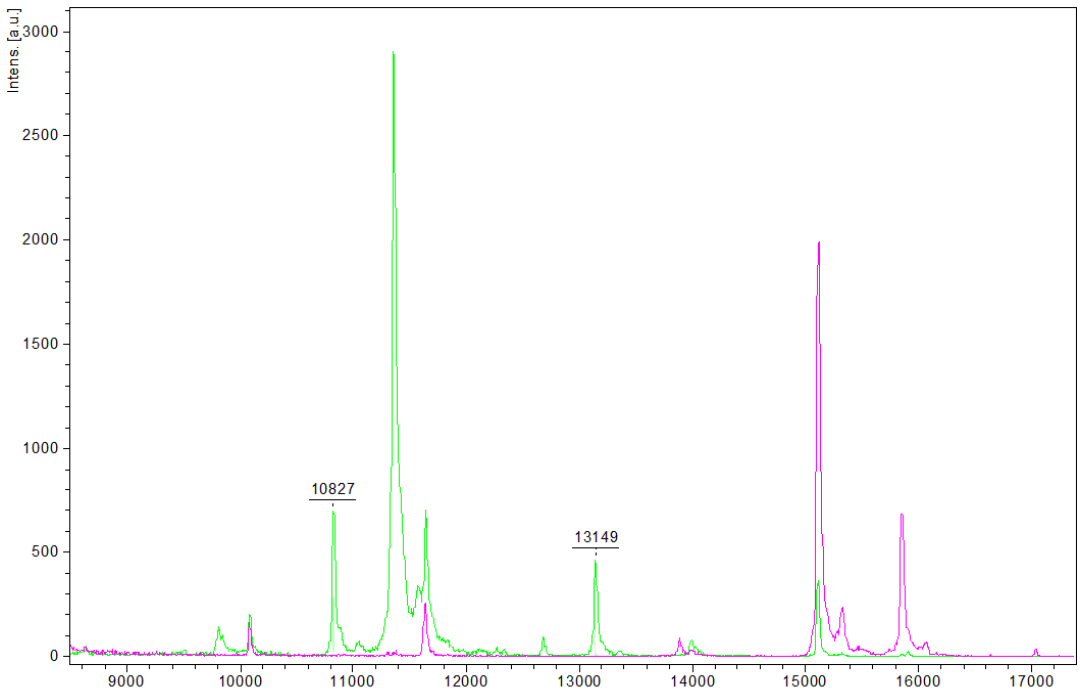


17. ábra: A vizsgált proteinek eloszlásai imaging MS segítségével a B9-es szövettani metszeteken. S100A8 (**A**), S100A9 (**B**), hemoglobin alfa lánc (**C**). **D:** A három vizsgált protein eloszlásának kompozit képe.



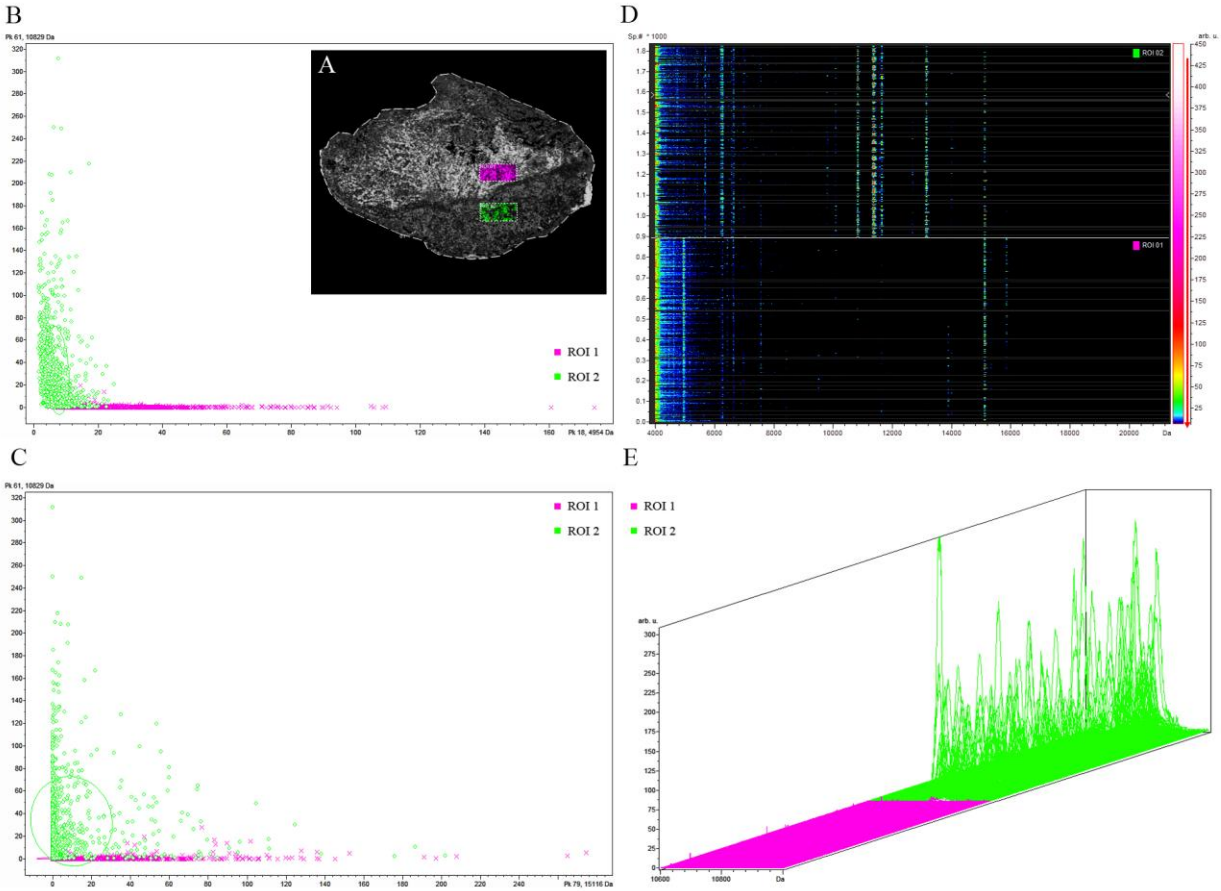
18. ábra: A vizsgált proteinek eloszlásai imaging MS segítségével a B2-es szövettani metszeteken. S100A8 (**A**), S100A9 (**B**), hemoglobin alfa lánc (**C**). **D:** A három vizsgált protein eloszlásának kompozit képe.

A normál izomszövet láthatóvá tételéhez a hemoglobin alfa lánc (m/z 15120) tömegspektrometriás jelét használtuk (17C és 18C). A további adatfeldolgozáshoz és statisztikai analízishez a nem daganatos és daganatos területek reprezentatív régióit kiválasztottuk (ROI1 és ROI2). Hozzávetőlegesen 900 spot adatainak szummációját használva állapítottuk meg az átlagos m/z értéket. A 19. ábra ROI1 és ROI2 átlagos spektrumait mutatja az m/z 8000-18000 tartományban. A spektrogrammokon több elkülönülő jel is észlelhető, mint például az m/z 10827 és m/z 13149 csúcsok, megfelelve az S100A8 és S100A9 proteineknek. Gel-based MALDI TOF/TOF MS analízis segítségével a S100A8 jelenléte bizonyítható volt. A mintákból kinyertük a proteineket, melyeket aztán gél elektroforézissel különítettünk el. Triptikus emésztést követően a fehérjéket azonosítottuk.



19. ábra: Reprezentatív tömegspektrumok a tumoros (zöld) és az egészséges (magenta) területekről. Jellemzően a m/z 10827 and m/z 13149 értékek mutatják az S100A8 and S100A9 proteinek jelenlétét

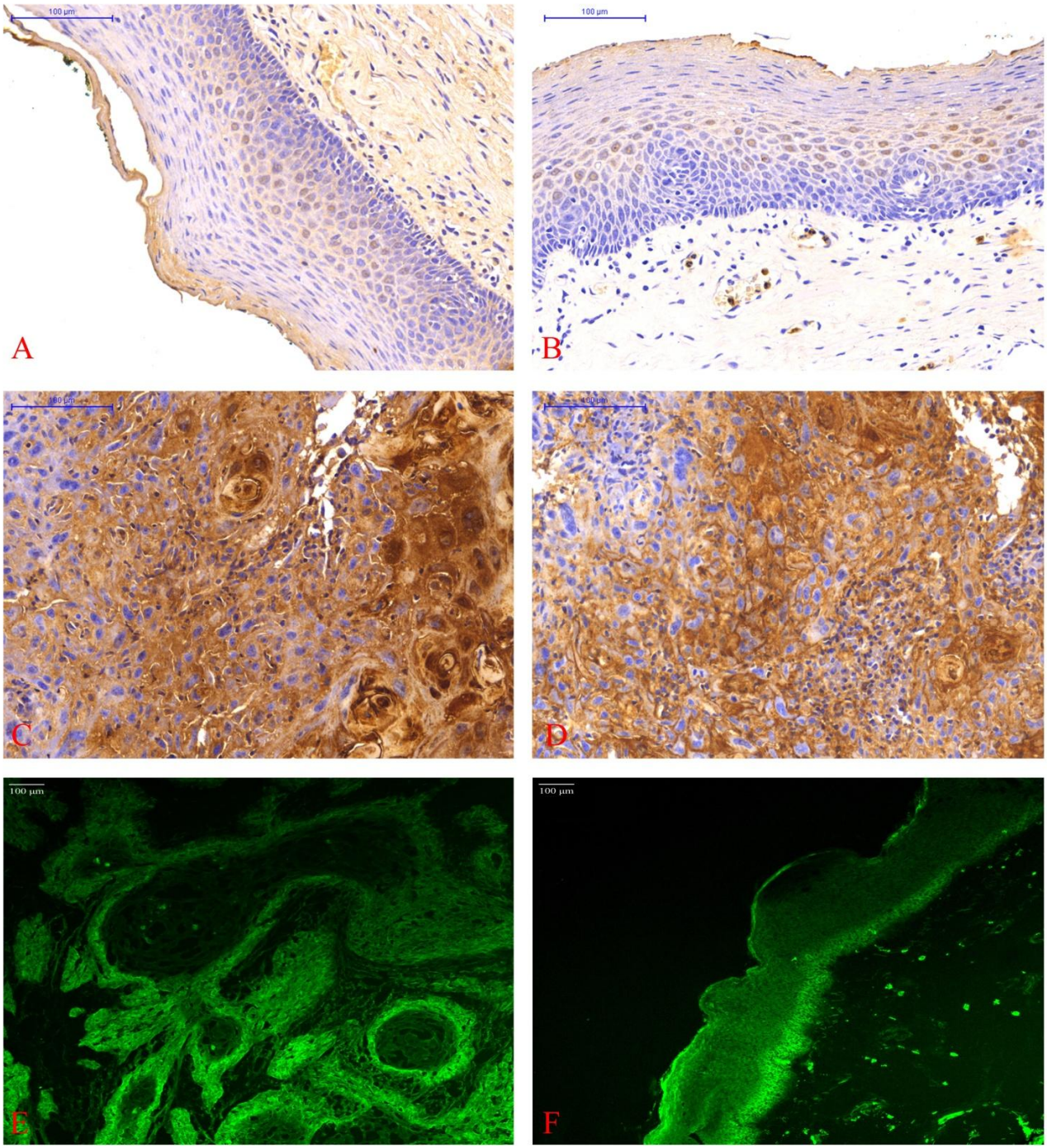
További bizonyítékként az S100A8 néhány reprezentatív triptikus peptidjét szekvenáltuk LID (Laser Induced) fragmentációval. A reprezentatív fragmentációs spektrum a függelékben látható **(függelék 2. ábra)**, aholis a GNFHAVYR szekvencia jellemzője az S100A8 fehérjére (*Homo sapiens*, NP 002955). A két kijelölt terület (ROI 1 és ROI 2) 900-900 tömegspektrumát statisztikailag hasonlítottuk össze. A kijelölt területek statisztikai elemzéseinek eredményeit az 19. ábrán mutatom be. A daganatos és az egészséges területek között szignifikáns különbségek mutathatóak ki. Meglepetésként észleltük a calgranulin jelenlétét a nem daganatos hámfelszínen is a B2 mintában (E régió a 16. A ábrán). Itt enyhe hiperplázia volt észlelhető, de szignifikáns gyulladás, vagy invazív jelleg nem.



20. ábra: A MALDI TOF MS eredményeinek statisztikai analízise, Panel **A** a kiválasztott reprezentatív régiók (ROI1 és ROI2) elhelyezkedését mutatja. A **B** és **C** panelek néhány

diszkriminatív m/z értékkel végzett cluster analízis eredményeit foglalja össze. A **D** és **E** panelek a tömegspektrometriás eredmények gélszerű és spektrális ábrázolását mutatja be.

A calgranulin A és B láthatóvá tételéhez, FITC konjugált egér monoklonális antitesteket használtunk. (Calgranulin A (CF145): sc-53033, Calgranulin B (MRP1H9): sc-53187, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). A konfokalis scanning mikroszkópiához a felolvasztott CMC-be ágyazott 15 mikrométeres metszeteket háromszor PBS-ben mostuk, mielőtt 4% paraformaldehiddel fixáltuk 10 percig. PBS mosást követően a metszeteket egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk FITC-konjugált Calgranulin A vagy Calgranulin B antitestekkel, majd egy újabb PBS mosást követően Vectashield mátrixban tárgylemezre helyeztük a mintákat. A szövetmetszeteket Zeiss LSM 710 Axio Observer (10x Zeiss Plan Apochromat, 0.45 NA) inverz konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk 488 nm-es argon ion lézer segítségével (Carl Zeiss, Jena, Germany). A képek analízisére Fuji Image 1.48 szoftvert használtunk (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Nem daganatos hám a daganatos minta környezetében szolgált negatív kontrollként. Mind az S100A8 mind az S100A9 festődése a parabazális hámsejtek magjaira lokalizálódott, míg erős festődést találtunk a lamina propria neutrophyl granulocytáiban. A daganatos sejtek erős festődést mutattak az S100A8 és S100A9 tekintetében egyaránt. A fehérjék expressziója többnyire a sejtfelszínre, a hámsejtek cytoplasmájára és a neostromára lokalizálódott. Továbbá az S100A8 és S100A9 nyálbéli szekréciója volt észlelhető minden betegnél.



21. ábra: Immunhisztokémia és fluoreszcens konfokális mikroszkópia eredményei a B2-s mintán. Panel **A** és **B** az S100A8 és A9 festődését mutatja a normál hámban. Jól látható az S100A8 (**C**) és S100A9 (**D**) szignifikáns up regulációja a daganatos területeken. A fluoreszcens konfokális mikroszkópiának megfelelően az S100A8 (**E**) és S100A9 (**F**) up regulációja egyértelműen megfigyelhető a daganatos területeken.

7. MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt néhány évben a proteomika jelentős fejlődésen ment át, jelenleg képesek vagyunk azonosítani és jellemezni sejtekből, szövetekből és biológiai folyadékokból kivont fehérjéket, valamint meghatározni azok relatív mennyiségét. Ez nem lenne lehetséges különböző tudományágak szoros együttműködése nélkül.

A proteomika nagy jelentősége abban van, hogy a genom szintjén kódolt és a fehérjék szintjén végrehajtott jelátvitel, szabályozás, enzimatikus aktivitás és szerkezeti sajátosságok közvetlenül vizsgálhatók fehérje szinten. Az expresszált és módosult fehérjékről nemcsak genomikai módszerekkel nyerhető információ. Ez részben a fehérjék bonyolultabb szerkezetének köszönhető a genoméhoz viszonyítva. A fehérjék kialakulásuk és funkcionalitásuk megszerzése közben érési folyamaton mennek át. Körülbelül 300 kémiai módosulás ismert, mely a fehérjék riboszómákban történő szintézise után történik. Ezen változások következtében egy sejtben néhány nagyságrenddel több fehérje fordul elő, mint gén.

A fej-nyaki laphámrák a felső aerodigesztiv rendszer daganatainak széles családját foglalja magába, melyekre a magas morbiditás és mortalitás a jellemző. A tumorsejtek heterogén microkörnyezete, amelyet chronicus gyulladás jellemez, több komponensből (neostroma, új erek, infiltráló immunsejtek) vitális jelentőségű a tumorok kialakulásában és viselkedésében. Ennek a cellularis és molekuláris szintű diverzitásnak tudható be, hogy mindeddig egyetlen megbízható tumormarkert sem ismerünk a HNSCC korai stádiumú diagnózisához [98].

Vizsgálataink első fázisában azonosítottunk néhány, potenciálisan molekuláris biomarkernek bizonyuló fej-nyaki laphámkarcinómára jellemző fehérjét humán nyálmintából. A klinikai proteomika egy igen fiatal tudományág, mely lehetőséget nyújt eddig ismeretlen

hátterű betegségek molekuláris patogenezisének megismerésére, valamint olyan biomarkerek feltérképezésére, melyek a későbbi diagnosztikában nyújthatnak segítséget, mivel nem csak komplett fehérjéket, hanem azok peptidjeit és fragmentumait is vizsgálhatjuk segítségével.

A fej-nyaki laphámrákok rossz túlélési arányának javításában az elsődleges és valószínű recidiváló tumorok korai felismerése a legfontosabb. Egy non-invazív módszert használva sikerült nyálból több olyan fehérjét azonosítanunk, melyek biomarkerként is használhatóak. Szerepük a fej-nyaki tumorok patogenezisében bizonyított, habár a pontos mechanizmus még nem tisztázott. Korábban ezen peptideket szérumból, illetve tumorszövetből izolálták már, azonban kutatócsoportunknak elsőként sikerült nem invazív módszerrel, nyálból kimutatni ezen biomarkereket.

Meggyőződésünk, hogy ez a felfedezés a módszer széleskörű elterjedéséhez vezet. A korábbi izolálási módszerekkel ellentétben, a nyál vizsgálata egyszerű, nem invazív, és akár szűrővizsgálatra is alkalmas lehet. A biomarkerek várhatóan megkönnyítik a primér daganatok és a recidívák korai észlelését is. Terveink között szerepel ezen peptidek részletesebb vizsgálata, beleértve azok szenzitivitását, specificitását, valamint tovább vizsgáljuk a nyálmintákat újabb biomarkereket és azok daganat-specifikusságát keresve. Célunk a betegadatok gondos feldolgozása, figyelembe véve a tumor lokalizációt, a pontos szövettan típust, a beteg életkorát és nemét, káros szokásait (dohányzás és alkoholfogyasztás). További specifikus vizsgálatok szükségesek a különböző kezelések, mint sebészet, sugárterápia vagy kombinált kemoirradiáció eredményeit illetően.

Munkánk második fázisa során a MALDI-t használtuk az S100A8 és A9 molekuláris vizsgálatára szövetmintákban és emberi nyálban. Az imaging eredmények validálására immunhisztokémia és SDS-PAGE alapú MALDI TOF/TOF proteomikai vizsgálatok szolgáltak. Eredményeink azt mutatták, hogy az S100A8 ésA9 jelen van a nyálban, mint potenciális biomarker HNSCC esetén. Továbbá a proteinek overexpressziója figyelhető meg a

daganatos szövetekben és a környező stromális régióban, de nincs jelen az ép szövetekben.

Az S100 protein család alacsony tömegű proteineket foglal magába, melyek különböző cellularis folyamatok szabályozói, többek között proliferáció, differenciáció, motilitás, neovaszkularizáció, immunválasz, gyulladás és apoptózis. Az jól ismert, hogy a calgranulinok (S100A8 és A9), valamint heterodimerjük a calprotectin vélhetően nagy szerepet játszanak a sejtciklus szabályozásában. Napjainkban az S100A8/A9 emelkedett szintét igazolták számos emberi daganattípusban, mint colorectalis karcinóma, emlő, prosztata, máj, hólyag és tüdőtumorok, míg down-regulációja volt megfigyelhető emberi laphámdaganatoknál, ugyanígy a fej-nyakiaknál is [99-106]. Ugyanakkor az S100A9 a gyomorkarcinómát kísérő/infiltráló gyulladásos sejtekben specifikusan expresszálódik, és szintje jól korrelál a daganat korai stádiumával [84,86].

Vizsgálataink az S100A8 és S100A9 lokális expressziójának szignifikáns emelkedését mutatták a szövettani mintákban. Továbbá sikerült az S100A8 proteint a daganatos betegek nyálmintáiban is kimutatni, ez hiányzik az egészségeseknél. A korábbi tanulmányok és a mi eredményeink is azt igazolják, hogy a MALDI IMS megbízható módszer az egészséges és daganatos folyamatok szöveti szintű elkülönítésére [107,108]. Ráadásul a calgranulinok up-regulációja a nem daganatos, de hiperplasztikus hámban azt sugallja, hogy az S100A8 és S100A9 potenciális biomarkerei lehetnek a fej-nyaki laphámrák kialakulásának igen korai szakaszában.

A calgranulinok up-regulációja a daganatos és hiperplasztikus hámban, és a nyálban való expressziójuk azt sugallja, hogy ezek a HNSCC korai diagnózisának potenciális biomarkerei lehetnek.

8. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Módszerünkkel sikerült nyálból több olyan fehérjét azonosítanunk, melyek szoros összefüggésbe hozhatók a fej-nyaki laphám karcinómával. Annak ellenére, hogy a daganatos folyamat kialakulásában betöltött pontos szerepüket még nem ismerjük, feltételezhető, hogy a karcinogenezis korai szakaszának biomarkereinek tekinthetőek. Korábban ezen peptideket szérumból, illetve tumorszövetből már izolálták, azonban **nyálból kutatócsoportunknak sikerült elsőként kimutatni ezen potenciális biomarkereket.**

2. Vizsgálataink eredményei alapján kimutattuk, hogy, az **S100A8 és A9** fehérjék, mint **potenciális biomarkerek jelen vannak a nyálban fej-nyaki laphámrák fennállása esetén.**

3. Vizsgálataink az S100A8 és S100A9 lokális expressziójának szignifikáns emelkedését mutatták a szövettani mintákban. **A proteinek overexpressziója a daganatos szövetekben és a környező stromális régióban figyelhető meg**, de nincs jelen az ép szövetekben.

4. A sejtciklus szabályozásában bizonyított szerepű calgranulinok up-regulációja a daganatos szövetekben és a nem daganatos, de hiperplasztikus hámban azt sugallja, hogy az S100A8 és S100A9 peptidek a **tumorok mikrokörnyezetében lezajló változásokat mutatva potenciális biomarkerek lehetnek a tumorgenezis igen korai szakaszában**.

5. A calgranulinok (S100 A8 és A9) lokális eloszlása alapján megmagyarázható az a szakirodalomban megfigyelhető kettősség, amely azt mutatja, hogy az említett fehérjék

mennyisége csökkenhet illetve növekedhet tumoros minták esetén. A látszólagos ellentmondás azzal magyarázható, hogy az S100 A8 és A9 fehérjék nem csupán a neoplasztikus szövetre, de a stromális állományra és a hiperplasztikus epitheliális szövetre egyaránt jellemző. A korábbi tanulmányokban vizsgált minták ezt a heterogenitást tükrözték

6. **Vizsgálati protokollunk** egy **jól működő, standardizálható** módszer, mely bármikor **reprodukálható.** A biomarkerek stabil kimutathatósága előrevetíti annak lehetőségét, hogy az általunk kidolgozott nyálminta vizsgálati eljárás a későbbiekben, a klinikai gyakorlatban **szűrővizsgálatok végzésére alkalmas lehet.**

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom témavezetőimnek, Dr. Márk László és Dr. Lujber László egyetemi docens uraknak a PTE ÁOK Biokémiai Intézetéből és a PTE KK Fül-Orr-Gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinikáról, akik odaadással segítették dolgozatom megírását. Mindkét Intézet számos dolgozóját köszönet illeti a kutatások háttérmunkálatainak elvégzéséért.

Külön köszönettel tartozom intézetvezetőmnek, Dr. Gerlinger Imre professzor úrnak, a kitartó ösztönzésért, amivel a klinikai munka rutinjából kiszakítva a tudományos élet felé terelt, valamint, hogy biztosította számomra, hogy a mindennapi klinikai munka mellett időt fordíthassak a tudományos munkára is.

Legnagyobb hálámat a körülöttem élő családomnak szeretném kifejezni, tudva azt, hogy milyen sokat segítettek a türelmükkel, szeretetükkel. Feleségem Tímea, kisfiam Dávid, valamint szüleim biztatása és áldozatvállalása mindenben segített.

10. FÜGGELÉK

Nem	Kor	Diagnózis	Dohányzás
Tumoros csoport – benignus tumor			
Férfi	64	Parotis tumor	Igen
Nő	66	Álhangszalag cysta	Nem
Nő	57	Parotis tumor	Igen
Férfi	59	Krónikus laryngitis	Igen
Nő	22	Parotis tumor	Nem
Férfi	49	Garati papilloma	Igen
Tumoros csoport – malignus tumor			
Férfi	51	Gége és garati laphámcc.	Igen
Férfi	53	Gingiva laphámcc.	Igen
Férfi	49	Garati laphámcc.	Igen
Férfi	57	Supraglotticus laphámcc.	Igen
Férfi	60	Algarati laphámcc.	Igen
Nő	61	Hangszalagi laphámcc.	Igen
Nő	55	Hangszalagi laphámcc.	Igen
Férfi	59	Subglotticus laphámcc.	Igen
Nő	51	Supraglotticus laphámcc.	Igen
Férfi	55	Nyaki laphámcc. (Ø primer tumor)	Igen
Férfi	48	Nyaki laphámcc. (Ø primer tumor)	Igen
Férfi	52	Algarati laphámcc.	Igen
Nő	69	Hangszalagi laphámcc.	Igen
Férfi	63	Hangszalagi laphámcc.	Igen
Nő	60	Nyelőcső laphámcc.	Igen
Férfi	65	Hangszalagi laphámcc.	Igen
Nő	57	Hangszalagi laphámcc.	Igen
Férfi	78	Parotis tumor	Igen
Nő	52	Algarati laphámcc.	Igen

2. táblázat: Az első fázisban vizsgált betegek paraméterei

Kor	Diagnózis	TNM	Stádium
56	hypopharynx tumor	T3N0M0	III
73	hypopharynx tumor	T2N0M0	II
53	hypopharynx tumor	T3N3M1	IV
51	hypopharynx tumor	T4N2M0	IV
60	hypopharynx tumor	T2N2M1	IV
55	supraglotticus tumor	T3N0M0	III
55	transglotticus tumor	T3N0M0	III
60	hypopharynx tumor	T2N3M0	IV
49	hypopharynx tumor	T4N2M0	IV
65	hypopharynx tumor	T2N1M0	III
81	hypopharynx tumor	T2N0M0	II
56	transglotticus tumor	T4N0M0	IV
48	mesopharynx tumor	T2N3M0	IV
65	hypopharynx tumor	T3N2M1	IV
68	mesopharynx tumor	T2N0M0	III
65	supraglotticus tumor	T4N0Mx	IV
50	mesopharynx tumor	T4N3Mx	IV
66	szájüregi tumor	T2N0M0	II
49	hypopharynx tumor	T4N0Mx	IV
60	szájüregi tumor	T1N1M0	III
58	supraglotticus tumor	T4N0M0	IV
62	hypopharynx tumor	T4N2Mx	IV
71	mesopharynx tumor	T2N1M0	III
69	hypopharynx tumor	T1N0M0	I
63	transglotticus tumor	T3N0M0	III
74	mesopharynx tumor	T2N0M0	III
56	szájüregi tumor	T3N2M0	IV
50	supraglotticus tumor	T3N2M0	IV
64	supraglotticus tumor	T3N2M0	IV
51	hypopharynx tumor	T2N1M0	III
61	hypopharynx tumor	T4N3M0	IV
70	szájüregi tumor	T3N2M0	IV

4. táblázat: A második fázisban vizsgált betegek paraméterei

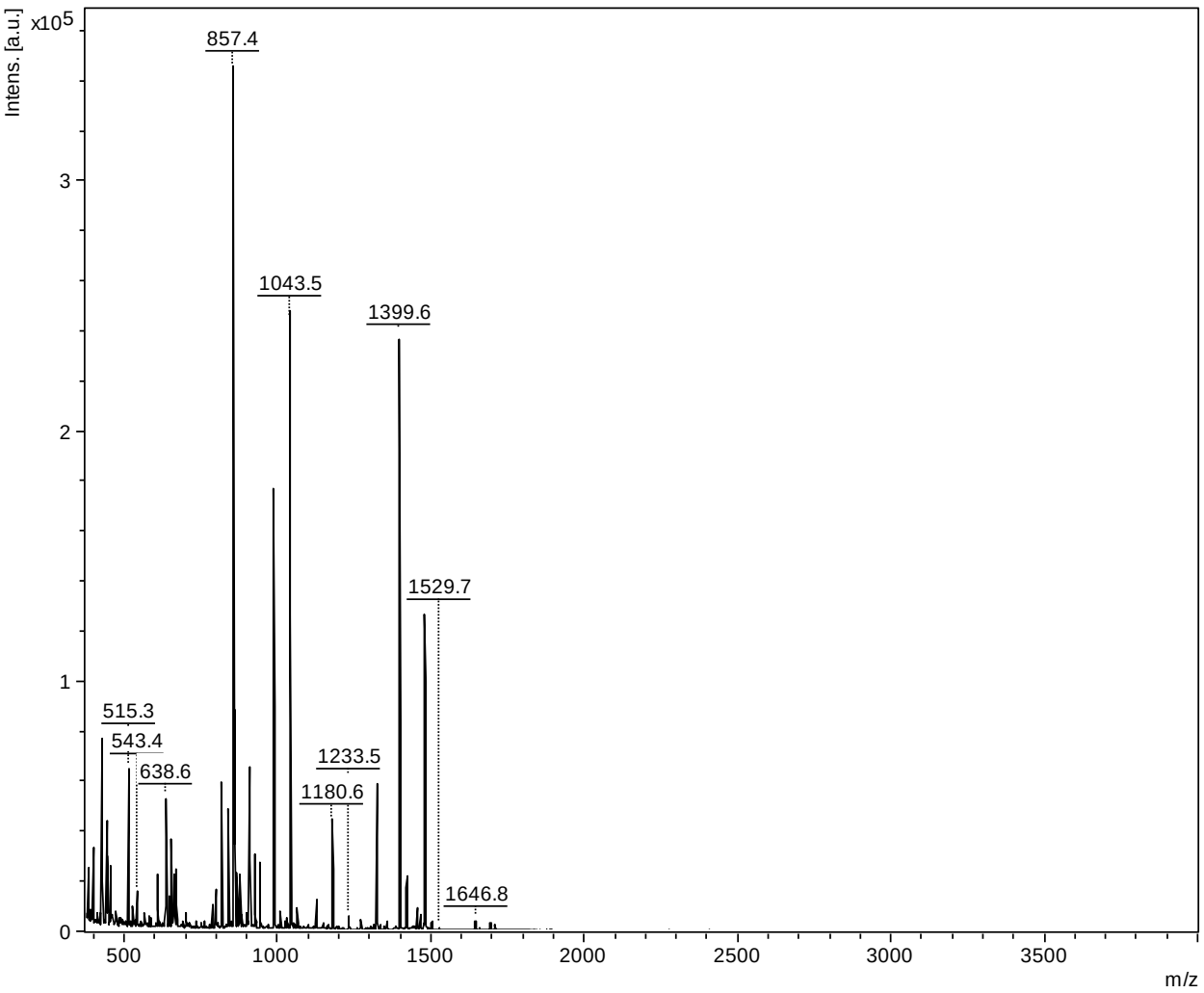
AccesionNo.	Protein name	MW/kDa	Mascot score	Peptides	SC %
gi|83754467	Chain A, Molecular Basis For The Recognition Of Phosphorylated And Phosphoacetylated Histone H3	29.24	118	24	43.41
gi|51859376	H3 histone, family 3A	15.27	116	19	51.47
gi|18645167	Annexin A2, isoform 2	38.55	116	25	52.51
gi|119597993	annexin A2, isoform CRA_c	32.42	91	17	43.55
gi|3660145	Chain B, Crystal Structure Of S-Nitroso-Nitrosyl Human Hemoglobin A	15.86	90	10	75.34
gi|300508775	Chain B, Human Hemoglobin A Mutant Beta H63w Carbonmonoxy-Form	15.90	90	11	84.25
gi|194374253	unnamed protein product	14.04	90	16	45.53
gi|358440049	Chain A, Crystal Structure Of Human Galectin-7 In Complex With A Galactose-Benzylphosphate Inhibitor	14.73	90	9	45.11
gi|119610321	hCG1749005	16.17	90	15	44.37
gi|4757756	annexin A2 isoform 2	38.57	89	19	38.64
gi|347447337	Chain B, Crystal Structure Of Human Nucleosome Core Particle Containing H4k44q Mutation	11,64	87	17	87.74
gi|662841	heat shock protein 27	22.31	87	12	46.73
gi|4504517	heat shock protein beta-1	22.76	87	13	48.78
gi|4504299	histone H3.1t	15.49	87	15	47.79
gi|119618340	hypothetical protein MGC15619, isoform CRA_b	36.85	85	17	23.13
gi|1166436	histone H3.3	6.89	85	12	63.33
gi|30354619	YWHAZ protein, partial	35.31	81	25	36.88

gi|124504316	HIST2H4B protein	11.37	80	16	81.37
gi|56203471	histone cluster 2, H3, pseudogene 2	15.42	80	16	46.32
gi|119575948	histone 1, H4e	15.28	80	18	69.57
gi|229361	myoglobin	17.04	79	12	63.40
gi|414587	ribosomal protein L10	23.90	78	17	47.80
gi|61679604	Chain B, T-To-T(High) Quaternary Transitions In Human Hemoglobin: Deshis146beta Deoxy Low-Salt	15.72	78	11	84.14
gi|46014946	Chain B, Crystal Structure Of Human Hemoglobin E At 1.73 A Resolution	15.85	78	11	78.08
gi|12006350	60S ribosomal protein L15	24.14	77	17	47.55
gi|296863397	Chain B, The Nucleosome Containing A Testis-Specific Histone Variant, Human H3t	11.64	77	17	84.91
gi|480312323	Chain L, Crystal Structure Of Broadly And Potently Neutralizing Antibody 3bnc117 In Complex With Hiv-1 Gp120	22.98	77	10	37.86
gi|358440049	Chain A, Crystal Structure Of Human Galectin-7 In Complex With A Galactose-Benzylphosphate Inhibitor	14.73	76	8	55.64
gi|45219796	Histone cluster 1, H3i	15.41	75	14	45.59
gi|4504517	heat shock protein beta-1	22.76	75	11	40.98
gi|999565	Chain B, Oxygen Affinity Modulation By The N-Termini Of The Beta Chains In Human And Bovine Hemoglobin	15.75	71	9	62.07
gi|307776567	Chain A, Structure Of 14-3-3 Isoform Sigma In Complex With A C-Raf1 Peptide And A Stabilizing Small Molecule Fragment	26.75	71	20	40.17
gi|3660145	Chain B, Crystal Structure Of S-Nitroso-Nitrosyl Human Hemoglobin A	15.86	71	9	62.33
gi|453056145	Chain A, Molecular Tweezers Modulate 14-3-3 Protein-protein Interactions	26.49	70	21	44.07
gi|410170435	uncharacterized protein LOC101060017	34.27	70	21	35.17

gi|194390512	unnamed protein product	17.82	70	12	56.33
gi|51094756	similar to t-complex 1; T-complex locus TCP-1; t-complex 1 (a murine tcp homolog)	19.81	70	12	48.35
gi|3660145	Chain B, Crystal Structure Of S-Nitroso-Nitrosyl Human Hemoglobin A	15.86	69	9	62.33
gi|194374253	unnamed protein product [Homo sapiens]	14.04	68	11	45.53
gi|71042776	Chain A, 14-3-3 Protein Theta (Human) Complexed To Peptide	29.17	67	18	31.25
gi|410171656	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101060667	39.14	67	22	34.06
gi|218783334	immunoglobulin light chain	23.15	65	10	46.26
gi|148664230	ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2	104.04	65	24	16.95
gi|99031801	Chain L, Crystal Structure Of A Glycosylated Fab From An Igm Cryoglobulin With Properties Of A Natural Proteolytic Antibody	23.33	65	10	46.05
gi|11275302	anti TNF-alpha antibody light-chain Fab fragment	23.50	65	9	40.65
gi|258588258	Chain A, Germline V-Genes Sculpt The Binding Site Of A Family Of Antibodies Neutralizing Human Cytomegalovirus	23.68	65	10	45.83
gi|21614544	protein S100-A8	10.82	65	7	50.54
gi|62897717	lactate dehydrogenase A variant	36.66	64	12	32.23
gi|1166436	histone H3.3	6.89	63	7	46.67
gi|42476296	tropomyosin 2 (beta) isoform 1	32.83	63	16	42.61
gi|119618339	hypothetical protein MGC15619, isoform CRA_a	37.31	63	15	20.74
gi|155030216	sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A isoform 1	150.73	62	29	13.01
gi|1066082	DNA-binding protein	25.78	60	11	34.84

gi|119602933	hCG18094	79.40	60	24	20.35

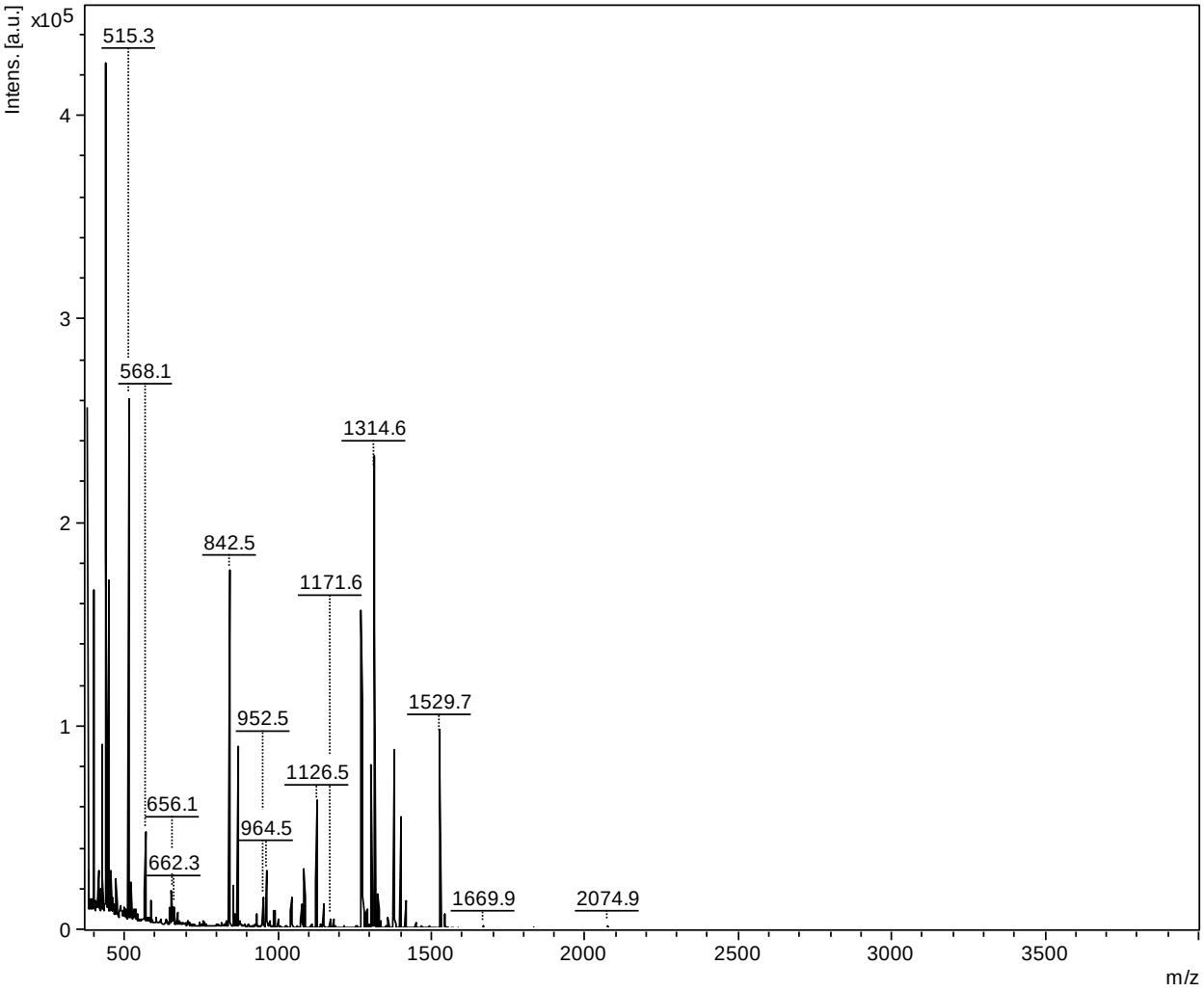
5. táblázat: A gélelektroforézis alapú tömegspektromteriás proteomikai elemzések összefoglalása. SC%: szekvencia lefedettség, MW: molekulatömeg



LEG7_HUMAN **Mass:** 15123 **Score: 80** **Expect:** 0.0012 **Matches:** 11

Galectin-7 OS=Homo sapiens GN=LGALS7 PE=1 SV=2

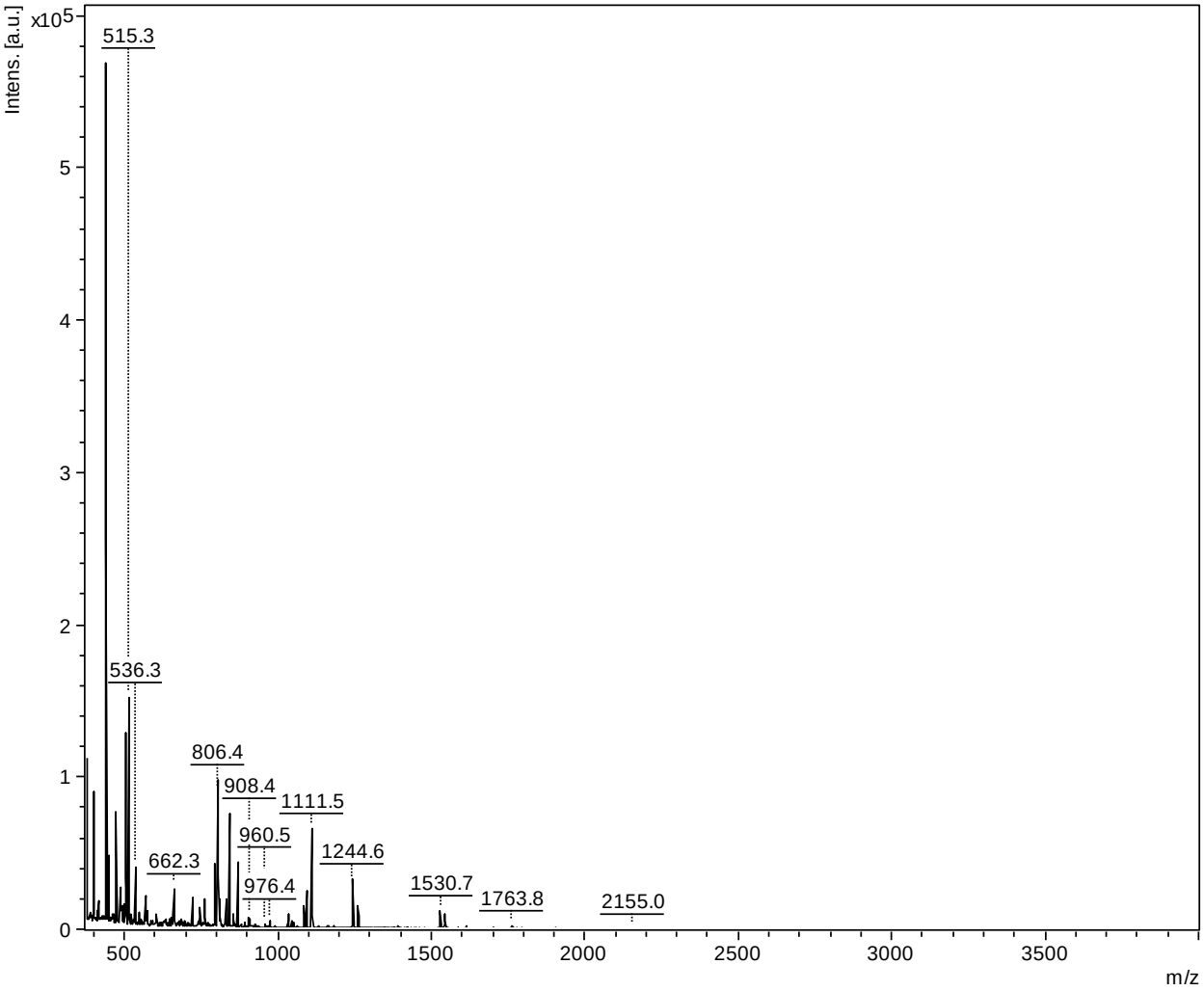
1. A. ábra: Az SDS-PAGE szeparálás után triptikusan emésztett fehérjék peptidjeinek elemzése során kapott reprezentatív tömegspektrumok (**A** - Galectin-7, **B** - Hemoglobin subunit beta, **C** - Annexin A2)



HBB_HUMAN **Mass:** 16102 **Score: 86** **Expect:** 0.00024 **Matches:** 12

Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2

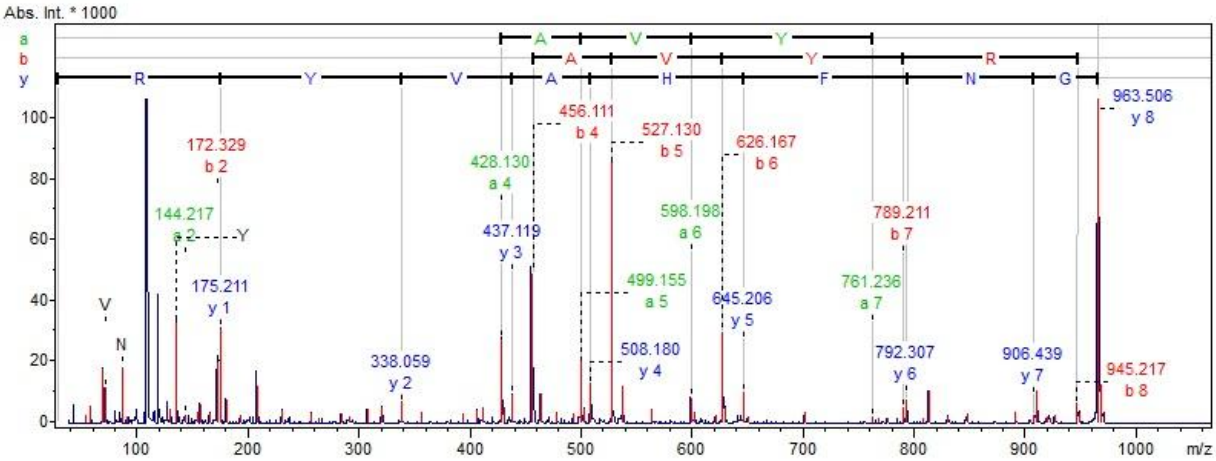
1. B. ábra: Az SDS-PAGE szeparálás után triptikusan emésztett fehérjék peptidjeinek elemzése során kapott reprezentatív tömegspektrumok (**A** - Galectin-7, **B** - Hemoglobin subunit beta, **C** - Annexin A2)



ANXA2_HUMAN **Mass:** 38808 **Score: 100** **Expect:** 1.1e-05 **Matches:** 23

Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2

1. C. ábra: Az SDS-PAGE szeparálás után triptikusan emésztett fehérjék peptidjeinek elemzése során kapott reprezentatív tömegspektrumok (**A** - Galectin-7, **B** - Hemoglobin subunit beta, **C** - Annexin A2)



2. ábra: A mintából származó S100A8 fehérje jellemző peptidjének szekvencia elemzése közvetlenül a szövetmetszetről történő MALDI TOF/TOF tandem tömegspektrometriás vizsgálattal.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55:74-108, 2005.

2. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D et al. Head and neck cancer. Lancet. 371:1695-1709, 2008.

3. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2002 database. http://www.dep.iarc.fr.

4. Élő J, Gyenes M. A szájüreg, a garat és a gége daganatainak megelőzése, korai felismerése és kezelése. Orvostovábbképző Szemle. 10:13-17, 2003.

5. Ottó Sz, Kásler M. A rosszindulatú daganatok morbiditási és mortalitási helyzete. Motesz magazin. 2:14-21, 2007.

6. Demográfiai Évkönyv. Magyar Központi Statisztikai Hivatal. 66-67, 2005.

7. Várkondi E, Gyory F, Nagy A, Kiss I, Ember I, Kozma L. Oncogene amplification and overexpression of oncoproteins in thyroid papillary cancer. In vivo. 19:465-470, 2005.

8. Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? Oral Oncol. 36:387-9, 2000.

9. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res. 48:3282-7, 1988.

10. Ide R, Mizoue T, Fujino Y, Hoshiyama Y, Sakata K, Tamakoshi A et al. Cigarette smoking, alcohol drinking, and oral and pharyngeal cancer mortality in Japan. Oral Dis. 14:314-9, 2008.

11. Decker J, Goldstein JC. Risk factors in head and neck cancer. N Engl J Med. 306:1151-5, 1982.

12. Kásler M. (szerk). Onkoterápiás protokoll. Springer, Budapest 1994.

13. KáslerM., Ottó Sz. Európai és hazai kihívások az onkologiában. Magyar Onkologia. 52:21-33, 2008.

14. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. J Natl Cancer Inst. 99:777-89, 2007.

15. Gaudi I, Kásler M. A rosszindulatú daganatos halálozás változása 1975 és 2001 között Magyarországon. Magyar Onkológia. 46:291–295, 2002.

16. Ottó Sz, Kásler M. A hazai és nemzetközi daganatos halálozási és megbetegedési mutatók alakulása. A népegészségügyi programok jellegzetességei és várható eredményei. Magyar Onkológia. 49:99–107, 2005

17. Ottó Sz, Kásler M. A rosszindulatú daganatok morbiditási és mortalitási helyzete. MOTESZ Magazin. 2:14–21, 2007

18. Ottó Sz., Kásler M. Rákmortalitás és -incidencia hazánkban, az európai adatok tükrében. Magyar Onkologia. 2:111-117, 2002.

19. Johnson, Newell W. Az oralis carcinomák etiológiája és rizikófaktorai, különös tekintettel a dohányzásra és az alkoholfogyasztásra. Magyar Onkológia. 45:115-122, 2001.

20. Ottó Sz. A hazai „népegészségügyi szűrővizsgálatok” programjának epidemiológiai indoklása. Orvosi Hetilap. 48:2347–2351, 2003.

21. Paterson IC, Eveson JW, Prime SS. Molecular changes in oral cancer may reflect aetiology and ethnic origin. Eur J. Cancer B: Oral Oncol. 32B(3):150-3, 1996.

22. Sonkodi I. Orális és maxillofaciális medicina. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió. 453-476, 2006.

23. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, KochWM et al. Case–control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med. 356:1944-56, 2007.

24. Wu L et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst. 92:709-20, 2000.

25. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? Curr Opin Oncol. 11:191-9, 1999

26. Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. Lancet. 363:1488-9, 2004.

27. Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. J Infect Dis. 189:686-98, 2004.

28. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14:467-75, 2005.

29. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 344:1125-31, 2001.

30. Mendenhall WM, Logan HL. Human papillomavirus and head and neck cancer. Am J Clin Oncol. 32:535-539, 2009.

31. Túri K, Barabás P, Csurgay K, Léhner Gy, Lőrincz A, Németh Zs. An analysis of the epidemiological and etiological factors of oral tumors of young adults in a Central-Eastern European population. Pathol Oncol Res. 19(3):353-63, 2013.

32. Correnti M, González X, Avila M, Perrone M, Rivera H. Human papillomavirus and Epstein Barr virus in oral hairy leukoplakia among HIV positive Venezuelan patients. Acta Odontol Latinoam. 23(2):117-23, 2010.

33. Chien MH, Lee TS, Kao C, Yang SF, Lee WS. Terbinafine inhibits oral squamous cell carcinoma growth through anti-cancer cell proliferation and anti-angiogenesis Mol Carcinog. 51(5):389-99, 2012.

34. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. Oral Oncol. 45(4-5):340-50, 2009.

35. Ribári O. Fül-orr-gégészet Fej-nyak sebészet. Medicina Kiadó, Budapest 1999.

36. Rubin P. Clinical oncology: a multidisciplinary approach for physicians and students (8th ed.), W.B. Saunders Co., Philadelphia, 2001.

37. Simard EP, Pfeiffer RM, Engels EA. Spectrum of cancer risk late after AIDS onset in the United States. Arch Intern Med. 170(15):1337-45, 2010.

38. Ember I, Kiss I, Sándor J, Varga Cs, Gyöngyi Z, Németh K, Fehér K, Lukács P, Dombi Zs. A daganatok és a daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája. Orvosi Hetilap. 145:507-514, 2004.

39. Ember I, Kiss I, Sándor J, Németh K. A prevenció elvei, gyakorlati megvalósítása és nehézségei. Qui prodest? Egészségtudomány. 47:254-272, 2003.

40. Braakhuis BJ, M., Brakenhoff RH, Leemans CR. Head and neck cancer: molecular carcinogenesis. Annals of Oncology. 16 (Supplement 2): ii249-250, 2005.

41. Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? Oncologist. 10(7):493-500, 2005.

42. Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. J Oral Pathol Med. 33:317- 322 7, 2004.

43. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA et al. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. Cancer Res. 63:1727-1730, 2003.

44. Krishna Prasad RB, Sharma A, Babu HM. An insight into salivary markers in oral cancer. Dent Res J. 10(3):287–295, 2013.

45. Speight PM, Morgan PR. The natural history and pathology of oral cancer and precancer. Comm Dent Health. 10(Suppl 1):31, 1993.

46. A fehérjekutatás modern módszertana, Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest 2011.

47. Zhou L, Cheng L, Tao L, Jia X, Lu Y, Liao P. Detection of hypopharyngeal squamous cell carcinoma using serum. Acta Oto-Laryngologica. 126:853-860, 2006.

48. Huq LN, Cross JK, Ung M, Myroforidis H, Veith DP, Chen D, Staton D, He H, Ward RB, Reynolds CE. Rewiev of the Salivary Proteome and Peptidome and Saliva-derived Peptide Therapeutics. Int J Pept Res Ther. 13:547-567, 2007.

49. Samaranayake L. Saliva as a diagnostic fluid. Int Dent J. 57:295–9, 2007.

50. Szanto I, Mark L, Bona A, Maasz, Sandor B, Gelencser G, Turi Z, Gallyajs F jr. High-throughput screening of saliva for early detection of oral cancer: a pilot study. Technol Cancer Res Treat. 11(2):181-8, 2012.

51. Miller SM. Saliva testing: A nontraditional diagnostic tool. Clin Lab Sci. 7:39–44, 1994.

52. Hofman FL. Human Saliva as a Diagnostic Specimen. J Nutr. 131:1621S-1625S. 2001.

53. Tenouvo J. Antimicrobial Agents in Saliva-Protection for the Whole Body. J Dent Res. 81:807-809, 2002.

54. Lamkin MS, Oppenheim FG. Structural Features of Salivary Function. Crit Rev Oral Biol Med. 4:251-259, 1993.

55. Strecfus CF, Bigler L. Saliva as a diagnostic fluid. Oral dis. 8: 69-76, 2002.

56. Tung FF, Schein AH. The Appereance of Administered Proteins in Saliva. J Dent Res. 43:423-432, 1964.

57. Kaufman E, Lamster IB. Diagnostic Applications of Saliva- A Review. Crit Rev Oral Biol Med. 13:197-212,2002.

58. Levine Mj, Reddy Ms, Tabak La, Loomis Re, Bergey Ej, Jones Pc, Cohen Re, Stinson Mw, Al-Hashimi I. Stuctural Aspects of Salivary Glycoproteins. J Dent Res. 66:436-441, 1987.

59. Talián M., Márk L, Melegh B: In: Kovács LG, Debreceni L (szerk.). Tömegspektrometria. Gyakorlati laboratóriumi medicina, Literatúra medicina, 2008.

60. Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM. Proteomics in diagnostic pathology - Profiling and imaging proteins directly in tissue sections. Am. J. Pathol. 165(4):1057-68, 2004.

61. Chaurand P, Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli R. Imaging mass spectrometry: Principles and potentials. Toxicol. Pathol. 33(1):92-101, 2005.

62. Li L, Garden RW, Sweedler JV. Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling. Trends Biotechnol. 18(4):151-160, 2000.

63. Chaurand P, Stoeckli M, Caprioli RM. Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. Anal. Chem. 71(23):5263-70, 1999.

64. Chaurand p, Schwartz SA, Billheimer D, Xu BGJ, Crecelius A, Caprioli RM. Integrating histology and imaging mass spectrometry. Anal. Chem. 76(4):1145-55, 2004.

65. Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. Nat. Med. 7 7(4):493-6, 2001.

66. Reyzer ML, Caprioli RM. MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: A new tool for biomarker discovery. J. Prot. Res. 4(4):1138-42, 2005.

67. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. Anal. Chem. 69(23):4751-60, 1997.

68. Dreisewerd K, Kingston R, Geraerts WPM, Li KW. Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of nervous tissues to identify peptides involved in male copulatory behavior in Lymnaea stagnalis. Internat. J. Mass Spectr., 169, 291 1997.

69. Caldwell RL, Caprioli RM. Tissue profiling by mass spectrometry - A review of methodology and applications. Mol. Cell. Prot. 4(4):394-401, 2005.

70. Reyzer ML, Caldwell RL, Dugger TC, Forbes JT, Ritter CA, Guix M, Arteaga CL, Caprioli RM. Early changes in protein expression detected by mass spectrometry predict tumor response to molecular therapeutics. Cancer Res. 64(24):9093-100, 2004.

71. Alexandrov T, Becker M, Guntinas-Lichius O, Ernst G, von Eggeling F. MALDIimaging segmentation is a powerful tool for spatial functional proteomic analysis of human larynx carcinoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 139(1):85-95, 2013.

72. Wehder L, Ernst G, Crecelius AC, Guntinas-Lichius O, Melle C, Schubert US, von Eggeling F. Depicting the Spatial Distribution of Proteins in Human Tumor Tissue Combining SELDI and MALDI Imaging and Immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem. 58(10):929-37, 2010.

73. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259):680-5, 1970.

74. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. Mem Inst Oswaldo Cruz.100(1):39–48, 2005.

75. Zhong LP, Wei KJ, Yang X, Zhang L, Zhou XJ, Pan HY, Li J, Chen WT, Zhang ZY. Increased expression of Annexin A2 in oral squamous cell carcinoma. Arch of oral biology. 54(1): 17-25, 2009.

76. Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. FASEB J. 21(4):968–75, 2007.

77. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol. 9(1):62–70, 2009.

78. Perretti M, Flower RJ. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. J Leukoc Biol. 76(1):25–9, 2004.

79. Ghavami S, Chitayat S, Hashemi M, Eshraghi M, Chazin WJ, Halayko AJ, Kerkhoff C. S100A8/A9: A Janus-faced molecule in cancer therapy and tumorgenesis. Eur. J. Pharmacol. 625(1-3):73-83, 2009.

80. Markowitz J, Carson WE. Review of S100A9 biology and its role in cancer. Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer. 1835(1):, 100-9, 2013.

81. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. Int. J. Biochem. Cell Biol. 33(7):637-68, 2001.

82. Kim SK, Kim EJ, Leem SH, Ha YS, Kim YJ, Kim WJ. Identification of S100A8-correlated genes for prediction of disease progression in non-muscle invasive bladder cancer. BMC Cancer. 10:21, 2010.

83. Dowling P, Wormald R, Meleady P, Henry M, Curran A, Clynes M. Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. J. Prot. 71(2):168-75, 2008.

84. Khammanivong A, Wang C, Sorenson BS, Ross KF, Herzberg MC. S100A8/A9 (Calprotectin) Negatively Regulates G2/M Cell Cycle Progression and Growth of Squamous Cell Carcinoma. PLoS One. 8(7): e69395, 2013.

85. Luley K, Noack F, Lehnert H, Homann N. Local calprotectin production in colorectal cancer and polyps-active neutrophil recruitment in carcinogenesis. Int. J. Colorec. Dis. 26(5):603-7, 2011.

86. Fan B, Zhang LH, Jia YN, Zhong XY, Liu YQ, Cheng XJ, Wang XH, Xing XF, Hu Y, Li YA, Du H, Zhao W, Niu ZJ, Lu AP, Li JY, Ji JF. Presence of S100A9-positive inflammatory cells in cancer tissues correlateswith an early stage cancer and a better prognosis in patients with gastric cancer. BMC Cancer. 12:316, 2012.

87. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? Curr. Op. Immunol. 19(2):203-8, 2007.

88. Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, Smyth MJ. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 105(2):652-6, 2008.

89. Gebhardt C, Breitenbach U, Tuckermann JP, Dittrich BT, Richter KH, Angel P. Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fosdependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis. Oncogene. 21(27):4266-76, 2002.

90. Ito Y, Arai K, Nozawa R, Yoshida H, Hirokawa M, Fukushima M, Inoue H, Tomoda C, Kihara M, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Miyauchi A. S100A8 and S100A9 Expression Is a Crucial Factor for Dedifferentiation in Thyroid Carcinoma. Anticancer Res. 29(10):4157-61, 2009.

91. Driemel O, Escher N, Ernst G, Melle C, von Eggeling F. S100A8 Cellular Distribution in Normal Epithelium, Hyperplasia, Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma and Its Concentration in Serum. Anal. Quant. Cytol. Histol. 32(4):219-24, 2010.

92. Sapkota D, Bruland O, Bøe OE, Bakeer H, Elgindi OA, Vasstrand EN, Ibrahim SO. Expression profile of the S100 gene family members in oral squamous cell carcinomas. J. Oral Pathol. Med. 37(10):607-15, 2008.

93. Arai K, Takano S, Teratani T, Ito Y, Yamada T, Nozawa R. S100A8 and S100A9 overexpression is associated with poor pathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. Curr. Cancer Drug Targ. 8(4):243-52, 2008.

94. Hermani A, Hess J, De Servi B, Medunjanin S, Grobholz R, Trojan L, Angel P, Mayer D.. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. Clin. Cancer Res. 11(14):5146-52, 2005.

95. Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D. S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. Exp. Cell Res. 312(2):184-97, 2006.

96. Driemel O, Murzik U, Escher N, Melle C, Bleul A, Dahse R, Reichert TE, Ernst G, von Eggeling F. Protein profiling of oral brush biopsies: S100A8 and S100A9 can differentiate between normal, premalignant, and tumor cells. Prot. Clin. Appl. 1(5):486-93, 2007.

97. Jou YJ, Hua CH, Lin CD, Lai CH, Huang SH, Tsai MH, Kao JY, Lin CW. bS100A8 as potential salivary biomarker of oral squamous cell carcinoma using nanoLCMS/ MS. Clin. Chim. Acta. 436:121-9, 2014.

98. Yonezawa K, Nishiumi S, Kitamoto-Matsuda J, Fujita T, Morimoto K, Yamashita D, Saito M, Otsuki N, Irino Y, Shinohara M, Yoshida M, Nibu K.Serum and tissue metabolomics of head and neck cancer. Cancer Genom. Proteom. 10(5):233-8, 2013.

99. Wang G, Wang X, Wang S, Song H, Sun H, Yuan W, Cao B, Bai J, Fu S. Colorectal cancer progression correlates with upregulation of S100A11 expression in tumor tissues. Int. J. Colorec. Dis. 23(7):675-82, 2008.

100. Tsuna M, Kageyama S, Fukuoka J, Kitano H, Doki Y, Tezuka H, Yasuda H. Significance of S100A4 as a Prognostic Marker of Lung Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res. 29(7):2547-54, 2009.

101. Yang WS, Moon HG, Kim HS, Choi EJ, Yu MH, Noh DY, Lee C. Proteomic Approach Reveals FKBP4 and S100A9 as Potential Prediction Markers of Therapeutic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Cancer. J. Proteom. Res. 11(2):1078-88, 2012.

102. Duan L, Wu R, Ye L, Wang H, Yang X, Zhang Y, Chen X, Zuo G, Zhang Y, Weng Y, Luo J, Tang M, Shi Q, He T, Zhou L. S100A8 and S100A9 Are Associated with

Colorectal Carcinoma Progression and Contribute to Colorectal Carcinoma Cell Survival and Migration via Wnt/beta-Caten Pathway. PLoSOne. 8(4):e62092, 2013.

103. Ha YS, Kim MJ, Yoon HY, Kang HW, Kim YJ, Yun SJ, Lee SC, Kim WJ. mRNA Expression of S100A8 as a Prognostic Marker for Progression of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. Korean J. Urol. 51(1):15-20, 2010.

104. Minami S, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Kawashima Y, Yoshio K, Ishii J, Matsumoto K, Nagashio R, Okayasu I. Proteomic study of sera from patients with bladder cancer: usefulness of S100A8 and S100A9 proteins. Cancer Genom. Proteom. 7(4):181-9, 2010.

105. Su YJ, Xu F, Yu JP, Yue DS, Ren XB, Wang CL. Up-regulation of the expression of S100A8 and S100A9 in lung adenocarcinoma and its correlation with inflammation and other clinical features. Chin. Med. J. 123(16):2215-20, 2010.

106. Grebhardt S, Müller-Decker K, Bestvater F, Hershfinkel M, Mayer D.Impact of S100A8/A9 expression on prostate cancer progression in vitro and in vivo. J. Cell Physiol. 229(5):661-71, 2014.

107. Meding S, Balluff B, Elsner M, Schöne C, Rauser S, Nitsche U, Maak M, Schäfer A, Hauck SM, Ueffing M, Langer R, Höfler H, Friess H, Rosenberg R, Walch A. Tissue-based proteomics reveals FXYD3, S100A11 and GSTM3 as novel markers for regional lymph node metastasis in colon cancer. J. Pathol. 228(4):459-70, 2012.

108. Willems SM, van Remoortere A, van Zeijl R, Deelder AM, McDonnell LA, Hogendoorn PC. Imaging mass spectrometry of myxoid sarcomas identifies proteins and lipids specific to tumour type and grade, and reveals biochemical intratumour heterogeneity. J. Pathol. 222(4):400-9, 2010.

12. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

11.1. A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK ÉS PREZENTÁCIÓK

1. **Járai T,** Maász G, Burián A, Bóna Á, Jámbor É, Gerlinger I, Márk L. Mass spectrometry-based salivary proteomics for discovery of head and neck squamous cell carcinoma. Pathology And Oncology Research 18(3):623-8, 2012 (IF:1.555)

2. **Járai T,** Schmidt J, Kajtar B, Raics K, Nyitrai M, Lujber L, Tornoczky T, Mark L. Local Expression of Calgranulins in the Tumor Microenvironment of Head Neck Squamous Cell Carcinoma. Journal of Proteomics (under review)

3. **Járai T**,Habon K, Károly B, Márk L, Móricz P, Gerlinger I. Fehérje biomarkerek azonosítása nyálból protemikai módszerrel fej- nyaki daganatoknál. Nemzeti Fül-, Orr-, Gégészeti Kongresszus, Budapest, 2010

4. **Járai T,** Maasz G, Schmidt J, Burián A, Kajtár B, Szanyi I, Lujber L, Gerlinger I, Raics K, Márk L. Calgranulinok (S100A8/A9) localis expressiojának vizsgálata fej-nyaki laphámcarcinomákban: tömegspektrometriás imaging vizsgálatok. MFOE 43. Kongresszus, Tapolca, 2014

5. Papai Z, Schmidt J, **Jarai T**, Maasz G, Mark L. Local expression of calgranulins in head neck squamous cell carcinoma, 32nd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Balatonszárszó, 2014.05.11-14 (poszter)

6. Papai Z, **Jarai T**, Schmidt J, Burian A, Kajtar B, Maasz G, Raics K, Futo K, Lukacs A, Lujber L, Mark L. Local expression of calgranulins (S100 A8/A9) in head neck

squamous cell carcinoma: an imaging mass spectrometric approach, 30th International Symposium on MicroScale Bioseparations, Pécs, 2014.04.27-05.01 (poszter)

7. Schmidt J, Papai Z, **Jarai T**, Burian A, Kajtar B, Tornoczky T, Mark L. Molecular Heterogenity of Head Neck Squamous Cell Carcinoma. 2014. OURCON II. Imaging Mass Spectrometry Conference, Antalya, Turkey, 2014. November 18-21.

11.2. EGYÉB TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

1. Pytel J, Hajas T, **Járai T.** A középfül rezonancia-frekvencia és az otoakusztikus emisszió frekvenciaspektrumának összefüggése. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 43, 1997 (7-13)
2. **Járai T**. Otoakusztikus emisszió az univerzális objektív újszülöttkori hallásszűrésben. Békésy-díjas pályamunka Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete 2001
3. Gerlinger I, Lujber L, **Járai T**,Pytel J. KTP-532 laser-assisted endoscopic nasal sinus surgery. Clinical Otolaryngology 28. 2., 67-71(2003) (IF: 0.665)g
4. Gerlinger I, **Járai T**, Pytel J. Laserfizikai alapismeretek klinikusoknak. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 48, (3), 2002 (165-176)
5. Móricz P, Hajas T, **Járai T**, Lujber L, Ráth G, Gerlinger I, Pytel J. Provox hangprotézis a pécsi Fül-, Orr-, Gégeklinikán (1996. május-2002. május). Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 49, (1), 2003 (17-21)
6. Pytel J, **Járai T**, Bognár. Auditoros stedy-state válaszok. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (1), 2004 (55-59)
7. Gerlinger I, Ráth G, **Járai T**, Pytel J. Lézerrel asszisztált dobhártyapótlás a mellső negyedeket érintő és szubtotális perforációk eseteiben. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (300-305)
8. **Járai T**, Somogyvári K, Gerlinger I, Ráth G, Pytel J. A mellékpajzsmirigy intraoperatív identifikálásának lehetőségei. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (312-319)
9. Nagy Gy, Bauer M, **Járai T**, Németh A, Pytel J. A saccotomia szerepe a Meniere betegség kezelésében. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (345-348)

10. Ráth G, Balázs K, Gerlinger I, Móricz P, **Járai T**, Bauer M, Pytel J. Gyermekkori tympanoplasticák hosszú távú audiológiai nyomonkövetése. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (358366)
11. Somogyvári K, **Járai T**, Kálmán E, Kovács K, Pytel J. Mellékpajzsmirigy identifikálása contact endoscopos technikával cadaveren. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (367-371)
12. Tóth E, **Járai T**, Pytel J. Orrműtétek eredményességének nyomonkövetése akusztikus rhinometria segítségével. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 50, (4), 2004 (376-379)
13. Gerlinger I, **Járai T**, Lujber L, Pytel J. Poland's syndrome and head-and-neck tumour: an unusual association causing a reconstruction dilemma. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 264, 2007 (553-556) (IF: 0.648)
14. Somogyvári K, Bakó P, **Járai T**, Szigeti N. Szokásostól eltérően készített percutan endoscopos gastrostoma fej- nyak daganatos betegeken. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 53, (1), 2007
15. Gerlinger I, **Járai T,** Lujber L, Pavlovics G, Pytel J. Fej-nyak tumor Poland szindrómás betegben : rekonstrukciós dilemmát okozó ritka kombináció. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 53, (3), 2007
16. Szanyi I, Bauer M, Gerlinger I, **Járai T,** Gőbel G, Lujber L, Szabadi E, Fehér K, Ember A, Ember I, Kiss I. Changes in expression of oncogenes and TP53 tumour suppressor gene as biomarkers in head and neck cancers. Eur Arch Otorhinolaryngol. 268(7):1041-6, 2011 (IF: 1.287)
17. **Járai T,** Maász G, Burián A, Bóna Á, Jámbor É, Gerlinger I, Márk L. Mass spectrometry-based salivary proteomics for discovery of head and neck squamous cell carcinoma. Pathology And Oncology Research 18(3):623-8, 2012

18. **Járai T,** Piski Z, Lujber L, Gerlinger I. Az arteria sphenopalatina endoszkópos ellátása makacs hátsó orrvérzések eseteiben - technika, buktatók, anatómiai variációk. Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 59, (3), 2013
19. **Járai T,** Pápai Z, Schmidt J, Burian A, Kajtar B, Raics K, Nyitrai M, Gerlinger I, Tornoczky T, Mark L. Local Expression of S100A8/A9 in the Tumor Microenvironment of Head Neck Squamous Cell Carcinoma. Journal of Mass Spectrometry (under review)
20. Gerlinger I, Molnár K**,** **Járai T,** Menyhei G**,** Lujber L**,** Hegedüs I**,** Nepp N**,** Harmat K**,** Bölcsföldi T. B**.** Vezérfonal a fej-nyaki paragangliomák kivizsgálásához és kezeléséhez**.**

    Fül-Orr-Gégegyógyászat 63, (3) 2017

Könyvrészlet: *Pytel J, **Járai T**, Somogyvári K, Gerlinger I, Móricz P.* Intraoperative identification of parathyroid glands

in: Liber Amicorum, TorGraf 2009, Editor: Luisa Bellussi (p. 257-262)

11.3. TARTOTT ELŐADÁSOK

1. **Járai T.**, Németh A., Gerlinger I., Pytel J.: Zaj okozta finomstruktúrális változások az otoakusztikus emisszióban- állatkísérletes. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése, Győr, 1999
2. **Járai T.:** Otoakusztikus emisszió az univerzális objektív újszülöttkori hallásszűrésben- Békésy díjas előadás. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése, Pécs, 2001
3. **Járai T.,** Pytel, J., Vincze O., Mazácsné Nádas A.: „Hármas kritériumrendszer" az újszülöttek tranziens otoakusztikus emissziójának kiértékelésében. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése, Pécs, 2001
4. **Járai, T.**, Pytel, J.: Tonsillectomia és adenotomia. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Tudományos Ülése, Budapest, 2001.
5. **Járai, T.**, Pozsgai, Zs., Vincze, O., Pytel, J.: Auditoros neuropathia. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése, Zalakaros, 2002
6. **Járai, T.**, Vincze, O., Pozsgai, Zs., Pytel, J.: Auditoros neuropathia. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése, Tihany, 2003
7. **Járai T.**, Somogyvári K., Pytel J.: Új módszer a mellékpajzsmirigy intraoperatív azonosítására. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Tudományos Ülése, Budapest, 2004
8. **Járai T.**, Somogyvári K., Pytel J.: Új módszer a mellékpajzsmirigy intraoperatív azonosítására. Nemzeti Fül-, Orr-, Gégészeti Kongresszus, Sopron, 2004
9. **Járai T.**, Nagy Gy., Pytel J.: Hallástréning Program hallókészülék viselők és cochlearis implantáltak számára. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése, Debrecen, 2004

10. **Járai T.**, Pytel J.: Auditoros steady-state válasz. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése, Szeged, 2005
11. **Járai T.**, Lujber L., Gerlinger I., Móricz P.: Poland szindróma fej-nyak tumoros betegnél–rekonstrukciós dilemmát okozó ritka előfordulás. Nemzeti Fül-, Orr-, Gégészeti Kongresszus, Debrecen, 2006
12. **Járai T.**, Pytel J., Szabó T., Ráth G.: Tonsillectomia hagyományos és bipolaris módszerrel – prospektív tanulmány. Nemzeti Fül-, Orr-, Gégészeti Kongresszus, Debrecen, 2006
13. Lujber L.,**Járai T.:** Szokásostól eltérően készített percutan endoscopos gastrostoma fej-nyak daganatos betegeken . Nemzeti Fül-, Orr-, Gégészeti Kongresszus, Debrecen, 2006
14. **Járai T.:** Kontakt endoszkópia a laryngo-microchirurgiában. MFOE 40. Jubileumi Kongresszusa, Siófok, 2008
15. **Járai T.:** Kontakt endoszkópia. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesülete Tudományos Ülése, Budapest, 2009
16. **Járai T.,** Somogyvári K., Czotter O., Lujber L., Pytel J., Gerlinger I.: Contact endoscopia a pajzsmirigysebészetben. Nemzeti Fül-, Orr-, Gégészeti Kongresszus, Budapest, 2010
17. **Járai T.**,Habon K., Károly B., Márk L., Móricz P., Gerlinger I.: Fehérje biomarkerek azonosítása nyálból protemikai módszerrel fej- nyaki daganatoknál. Nemzeti Fül-, Orr-, Gégészeti Kongresszus, Budapest, 2010
18. **Járai T.,** Lőrincz B., Gerlinger I.: Multidisciplinaris tumor management a Hamburgi Egyetem Fej-Nyaki Onkológiai Centrumában. MFOE 42. Kongresszus, Pécs, 2012
19. **Járai T.,** Gerlinger I.: Arteria sphenopalatina endoscopos ligaturája a makacs hátsó orrvérzés ellátásában. Technika, buktatók, anatomiai variációk. MFOE 42. Kongresszus, Pécs, 2012

20. **Járai T.**, Pavlovics G., Nepp N., Oberna F.: Reconstructive options in the treatment of head and neck tumors. VI. International Forum On Plastic Surgery, Budapest, 2013
21. **Járai T.,** Pavlovics G.: Poland szindróma fej-nyak tumoros betegnél – rekonstrukciós dilemmát okozó ritka kombináció. Magyar Sebész Társaság 62. Kongresszusa, Győr, 2014
22. **Járai T.,** Maasz G., Schmidt J., Burián A., Kajtár B., Szanyi I., Lujber L., Gerlinger I., Raics K., Márk L.: Calgranulinok (S100A8/A9) localis expressiojának vizsgálata fej-nyaki laphámcarcinomákban: tömegspektrometriás imaging vizsgálatok. MFOE 43. Kongresszus, Tapolca, 2014
23. **Járai T.,** Katona G., Paput L., Gerlinger I., Hempel M.: Fülkagyló rekonstrukció együlésben végzett Vibrant Soundbridge implantációval microtia kapcsán. Egy bátor műtéti megoldás tanulságai. Magyar Fül-, Orr-, Gége és Fej-, Nyaksebész Orvosok Egyesülete Gyermek Fül.-Orr-Gégészeti Szekciójának XXI. Kongresszusa, Hajdúszoboszló, 2015.
24. **Járai T.**: Orrplasztika. Tippek és trükkök. III. Szegedi Rhinológiai Napok. Szeged, 2015.
25. **Járai T.,** Pavlovics G., Kiss Sz., Gerlinger I.: Facialis paresist követő statikus arcrekonstrukció autolog fascia lataval. MFOE 43. Kongresszus, Szeged, 2016
26. **Járai T.,** Vástyán A., Lujber L., Pytel J., Gerlinger I.: Orrstátusz rendezése „Utolsó simítás...” MFOE Gyermek Fül-orr-gégészeti Szekciójának XXII. Vándorgyűlése, Siófok, 2017
27. **Járai T.,** Vástyán A., Pytel J.: Orrstátusz rendezése „Utolsó simítás...” MPHEST 2017. évi Kongresszusa, Kecskemét, 2017

Pathol. Oncol. Res. (2012) 18:623–628
DOI 10.1007/s12253-011-9486-4

RESEARCH

Mass Spectrometry-Based Salivary Proteomics for the Discovery of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Tamas Jarai · Gabor Maasz · Andras Burian · Agnes Bona · Eva Jambor · Imre Gerlinger · Laszlo Mark

Received: 9 October 2011 / Accepted: 1 December 2011 / Published online: 15 February 2012
© Arányi Lajos Foundation 2012

Abstract The 5-year survival rates for cases of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) are only some 60%, mainly because 20%–40% of the patients develop a local relapse in the same or an adjacent anatomic region, even when the surgical margins are histologically tumour-free. Tumours are often discovered in an advanced stage because of the lack of specific symptoms and the diagnostic difficulties. The more advanced the stage of the tumour, the more invasive the diagnostic and treatment interventions needed. An early molecular diagnosis is therefore of vital importance in order to increase the survival rate. The aim of this study was to develop an efficient rapid and sensitive mass spectrometric method for the detection of differentially expressed proteins as tumour-specific biomarkers in saliva from HNSCC patients. Whole saliva samples were collected from patients with HNSCC and from healthy subjects. The proteins were profiled by using SDS PAGE, MALDI TOF/TOF mass spectrometry and the Mascot database search engine. Several potential tumour markers were identified, including annexin A1, beta- and gamma-actin, cytokeratin 4 and 13, zinc finger proteins and P53 pathway proteins. All of these proteins play a proven role in tumour genesis, and have not been detected previously in saliva. Salivary proteomics is a non-invasive specific method for cancer diagnosis and follow-up treatment. It provides facilities for the readily reproducible and reliable detection of tumours in early stages.

Keywords Biomarker discovery · MALDI TOF MS · Saliva · Tumor

T. Jarai · A. Burian · I. Gerlinger
Department of Oto-rhino-laryngology, Head and Neck Surgery, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary

G. Maasz · A. Bona · E. Jambor · L. Mark (✉)
Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School, University of Pecs, Szigeti str. 12, 7624 Pecs, Hungary
e-mail: laszlo.mark@aok.pte.hu

Introduction

Squamous cell carcinomas of the head and neck region (HNSCCs) are the 6th most common malignancies worldwide [1], affecting around half million new patients yearly. In spite of the improvement made in diagnostic and therapeutic tools, the survival rate has not changed over the past 30 years and is constantly around 60% [2]. One of the main reasons is the developement of recurrences in 20–40% of the cases, even though the excision is carried out in histologically proven intact regions. The survival rate is worsened by lateness of the diagnosis in patients rehospitalized with developed tumours. In such a stage, radical excision combined with radio- or possibly chemotherapy is the only possible treatment, which does not increase the quality of life for every patient.

The data of the World Cancer Registry Report demonstrate that the incidence of the head and neck cancers has increased 3-10-fold in a generation. This increase was explained in terms of the spreading of smoking and alcohol consumption. Planocellular carcinoma of the head and neck occurs mostly in those over the age of 40, but in the past few years even younger subjects are being affected in greater numbers. HNSCC is relatively rare in women: the ratio between males and females is around 10:1 [3–6].

The mortality rate of HNSCC has changed significantly during the past 50 years: it has doubled in Europe. While the mortality rate of malignancies in Hungary increased up to 2.8-fold between 1948 and 2000, that of head and neck cancers increased around 6-fold. The data demonstrate that the most dynamic increase in mortality rate in Hungary is caused by head and neck cancers, their proportion being the highest in Europe. The highest rates of mortality from laryngeal cancers in Europe are reported from Hungary, Poland, Slovakia and Romania. The IARC data indicate that about 60% of oral malignancies in males and 40% of those in females in Europe are caused by smoking. Smoking alone and a regular alcohol intake alone increase the incidence of these cancers 2–3-fold, but coexistence of these two aetiological factors leads to a 15-fold increase in incidence. A genetic predisposition and personal mutative sensitivity also play a role. HPV infection is also a further possible factor since HPV 16 and 18 are detected in 70% of cervical tumours [7–13].

An early diagnosis is of major importance in the fight against malignancies. However, head and neck cancers can present a poor symptomatology for a long period, and they may cause non-specific symptoms, such as dysphagia, a lump sensation, huskiness, a stinging sensation and rarely pain. Neck metastasis is an important prognostic factor, but even in the evenet of clinically N0 neck, the possibility of occult metastasis is around 30–40% [14, 15]. If the diagnosis is made early and there are no metastases, surgery or radiotherapy generally leads to very good long-term results, but most of the patients do not belong in this group. When the diagnosis is made later, the radical excision is followed by radiotherapy or radio-chemotherapy, with a resultant worsened quality of life. In spite of these interventions, the rate of recurrence is relatively high and the 5-year survival rate is some 50–60%.

The exploding development of proteomics in recent decades has led to the use of saliva as a new diagnostic tool. Proteomics furnishes high accuracy in the identification of proteins, and determination of changes in their levels is therefore a promising approach for early detection. It has been estimated that approximately 20% of the cellular proteins are secreted. This would allow the identification of novel HNSCC biomarkers via the analysis of tissue "secretomes" that can be detected in saliva as in tumour proximal fluid or serum. For HNSCCs, saliva seems an ideal source. Human saliva can easily be collected in relatively large quantities by a non-invasive method [16–19], this, together with methodological improvements allowing high throughput, makes it a medium of potential value for early detection, possibly in everyday clinical use [20–25]. A population-based screening program for oral cancer has not yet been achieved, though "opportunistic screening" has been suggested [26–28].

Materials and Methods

Clinical Sample Collection

A total of 25 consenting head and neck cancer patients (10 females, 15 males) participated in the research; their mean age was 56.48 (range 22 to 78 years). Table 1 shows the detailed parameters on all the investigated HNSCC patients. The HNSCC patients were compared with a control group composed of 25 healthy volunteers (15 smokers, 10 non-smokers), matching in age and gender. In the tumour group, 19 patients had a malignant and 6 a benign tumour in the head and neck region. The subjects with HNSCC were all heavy smokers (at least 1 pack per day). None of the patients had undergone treatment prior to saliva sample collection.

All the subjects were asked to attend without having any drink or food since the night before. Following mouth rinsing with tap water, unstimulated whole saliva samples were collected between 8 a.m. and 10 a.m. from both the patients and the control group, by means of a widely accepted procedure

Table 1 Parameters of all investigated patients

Sex	Age	Diagnosis	Smoker
Tumor group - benign			
M	64	Parotid tumour	Yes
F	66	Ventricular cyst	No
F	57	Parotid tumour	Yes
M	59	Chronic laryngitis	Yes
F	22	Parotid tumour	No
M	49	Pharyngeal papilloma	Yes
Tumor group - malignant			
M	51	Laryngeal and pharyngeal SCC	Yes
M	53	Gingival SCC	Yes
M	49	Pharyngeal SCC	Yes
M	57	Supraglottic SCC	Yes
M	60	Hypopharyngeal SCC	Yes
F	61	Vocal chord SCC	Yes
F	55	Vocal chord SCC	Yes
M	59	Subglottic SCC	Yes
F	51	Supraglottic SCC	Yes
M	55	Cervical SCC (no primary tumor)	Yes
M	48	Cervical SCC (no primary tumor)	Yes
M	52	Hypopharyngeal SCC	Yes
F	69	Vocal chord SCC	Yes
M	63	Vocal chord SCC	Yes
F	60	Oesophageal SCC	Yes
M	65	Vocal chord SCC	Yes
F	57	Vocal chord SCC	Yes
M	78	Parotid tumour	Yes
F	52	Hypopharyngeal SCC	Yes

[29, 30]. Briefly, the participants were asked to rinse their mouth three times with tap water before collection; saliva specimens were taken with 5 ml syringes from the buccal fold int he non-stimulated oral cavity and cooled on ice in Eppendorf tubes (Eppendorf Austria GmbH, Vienna, Austria). This was followed by centrifugation at 2,500 rpm for 12 min at 4°C. The supernatants of the saliva samples were subsequently stored frozen at −80°C until further analysis. The studies were approved by the Ethics Committee on Human and Animal Research at Pécs University in accordance with the Ethical Codex of Human and Animal Experiments (licence no. : 3382/2009).

Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

With an Ultra Turrax homogenizer, saliva samples were homogenized in 20 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) containing 3 mM EDTA, 5 mM beta-mercaptoethanol and 1% SDS. After the addition of 1% bromephenol blue, the samples were boiled for 2 min and clarified by centrifugation (8,000 g for 2 min). SDS-PAGE was carried out on 12% gel by the method of Laemmli [31], similarly as described earlier [32]. A low molecular weight calibration kit (Pharmacia) was used for the estimation of molecular weight. Gels were stained with Coomassie brillant blue R-250 and destained with a solution containing 5% (v/v) acetic acid and 16% (v/v) methanol.

Tryptic Digestion and MALDI TOF/TOF Mass Spectrometry (MS)

The spots of interest were excised from the gel with a razorblade, placed in Eppendorf tubes, and destained by washing three times for 10 min in 200 μL of 50% (v/v) acetonitrile, 50 mM NH_4HCO_3 solution. Proteins were then reduced with 20 mM dithiotreitol, 100 mM NH_4HCO_3 and 5%acetonitrile for 1 h at 55°C. The gel pieces were dehydrated at room temperature and covered with 10 μL of modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA; sequencing grade) (0.04 mg mL^{-1}) in Tris buffer (2.5 mM, pH 8.5) and left to stand at 37°C overnight. The spots were crushed and the peptides were extracted for 15 min in an ultrasonic bath with 15 μL of an aqueous solution of acetonitrile and formic acid (49/50/1 v/v/v) After extraction, the solution of the peptides was lyophilized and redissolved in water. The aqueous solutions of the lyophilized protein tryptic digests were purified by using ZipTip C_{18} solid-phase extraction (Millipore Kft., Budapest, Hungary) and directly loaded onto the target plate (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) by mixing 1.0 μL of each solution with the same volume of a saturated matrix solution prepared fresh every day by dissolving α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in acetonitrile/0.1% TFA (1/2, v/v) The mass spectrometer used in this work was an Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) operated in the reflector mode for MALDI TOF peptide mass fingerprint (PMF) or LIFT mode for post-source decay (PSD) and collision-induced decay (CID) MALDI TOF/TOF with an automated mode using FlexControl 2.4 software. An accelerating voltage of 20 kV was applied for PMF. The instrument uses a 337 nm pulsed nitrogen laser, model MNL-205MC (LTB Lasertechnik Berlin GmbH, Berlin, Germany). External calibration was performed in each case with a Bruker Peptide Calibration Standard (#206195 Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Peptide masses were acquired in the range m/z 800 to m/z 5,000. Each spectrum was produced by accumulating data from 500 consecutive laser

Table 2 Proteomic parameters of the identified salivary proteins in HNSCC patients

No	Protein name	Accession number	Matched peptides	Theoretical MW (Da)	Mascot score	Sequence coverage %
1	Annexin 1	gi: 4502101	12	38690	127	40
2	Cytokeratin 4	gi:194387942	10	56193	95	18
3	Cytokerain 13	gi: 30377	8	45837	77	20
4	Zinc finger protein 28	gi: 56542871	5	77418	54	13
5	Regulator G-protein	gi: 62865654	10	67240	103	22
6	Indoleamine 2,3-dyoxigenase	gi: 215274147	5	45396	60	12
7	Unnamed protein product	gi: 194375299	5	37325	71	18
8	OFD 1 protein	gi: 64654925	12	111675	82	16
9	Chain A, human salivary amylase	gi: 14719766	11	55857	109	31
10	Unnamed protein product	gi: 47077030	7	38266	67	26
11	Keratin type 1 cytoskeletal	gi: 24430192	19	51236	218	41
12	CEP 290 protein	gi: 14250413	7	19223	89	39
13	COL6A3	gi: 219841772	12	278032	67	6

shots. Singly charged monoisotopic peptide masses were searched against MSDB, Swiss-Prot and NCBInr databases by utilizing the MASCOT Server 2.2 search engine (www.matrixscience.com, Matrix Science Ltd., London, UK) and Bruker BioTools 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A maximum of one missed tryptic cleavage was considered, and the mass tolerance for monoisotopic peptide masses was set to 100 ppm. For the proteins not identified by MALDI TOF, we proceeded with PSD and CID MALDI TOF/TOF analysis. Bruker FlexControl 2.4 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was used for the control of the instrument and Bruker FlexAnalysis 2.4 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for spectrum evaluation.

Results

This work focused on the identification of potential protein biomarkers for HNSCCs from unstimulated whole saliva samples. The potentially HNSCC-regulated proteins were separated and digested with trypsin, and the resulting tryptic peptides were investigated by MALDI TOF/TOF MS for protein identification. The proteins, which were identified in over 85% of the investigated pathological saliva samples, are listed in Table 2. The most abundant well-known proteins that were found in all the saliva samples from the HNSCC patients and the healthy volunteers were salivary amylase, keratins and actins. Additionally, increased levels of annexin 1, zinc finger protein 28, regulator G-protein 3, indoleamine 2,3-dioxygenase, OFD1 protein and CEP290 protein were identified in most of the saliva samples from the malignant cancer patients.

Discussion

In this study we identified several HNSCC-regulated salivary proteins as potential molecular biomarkers. Clinical proteomics is a very young discipline, which provides a tool with which to acquire information about a molecular pathogenesis and to explore biomarkers. Biomarkers can assist in later diagnoses; not only complete proteins, but also their peptides and fragments can be examined.

The great significance of proteomics lies in the fact that signal transmission, regulation, enzymatic activity and structural features encoded by the genome and implemented at the level of the proteins can be directly analysed at the proteome level. Information about expressed and amended proteins can not be obteined only with genomic methods. This is partly due to the more complex structure of the proteome in comparison with the genome. Proteins pass through a process of ripening during the formation and acquisition of functionality. Approximately 300 chemical modifications are known which may occur after protein synthesis in ribosomes. In consequences of these changes, several orders of magnitude more proteins than genes occur in the cell [33].

Over the past few years, proteomics has developed considerably, and we are now able to identify and characterize proteins extracted from cells, tissues and biological fluids, and to determine their relative amounts. This would not be possible without the close cooperation of various disciplines [34, 35].

The early detection of primary and possibly recurrent tumours is the key to improvement of the poor survival rate of HNSCCs [36]. Using a non-invasive method, we have succeeded in identifying a number of low molecular weight peptides from saliva which can serve as biomarkers. Their role in the pathogenensis of head and neck tumours has already been demonstrated, though the exact mechanism is not yet clear. These peptides had previously been isolated only from serum or tumour tissue [37–49].

We believe that this discovery will lead to the widespread use of the method. In contrast with earlier methods of isolation, the saliva test is simple and non-invasive, and could even be used in screening. The biomarkers are expected to facilitate the early detection of both primary and recurrent tumours. We plan a more detailed investigation of these peptides, including their sensitivity and specivicity, together with the further screening of samples, searching for other biomarkers and their tumor-specific breakdown. Our goal is a thorough processing of the patient data, taking into account the tumour localization, the histology, the patient's age and sex, harmful habits (smoking and alcohol consumption) and any drug intake. Further specific examinations are needed regarding the results of various treatments such as surgery, radiotherapy or combined chemoirradiation.

Acknowledgements The present work was supported by the Hungarian National Scientific Research Foundation (OTKA No. K72592, CNK78480), TIOP 1.3.1-10/1-2010-0008, TIOP 1.3.1-07/1, DDEK Kft., SciEx Kft., GVOP 0179 and PTE AOK KA 34039-11/2009 and KA 2011.

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55:74–108
2. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D et al (2008) Head and neck cancer. Lancet 371:1695–1709
3. Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J et al (2000) Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? Oral Oncol 36:387–389
4. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S et al (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res 48:3282–3287
5. Ide R, Mizoue T, Fujino Y, Hoshiyama Y, Sakata K, Tamakoshi A et al (2008) Cigarette smoking, alcohol drinking, and oral and pharyngeal cancer mortality in Japan. Oral Dis 14:314–319
6. Decker J, Goldstein JC (1982) Risk factors in head and neck cancer. N Engl J Med 306:1151–1155

7. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP et al (2007) Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. J Natl Cancer Inst 99:777–789
8. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM et al (2007) Case–control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med 356:1944–1956
9. Wu L et al (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst 92:709–720
10. Gillison ML, Koch WM, Shah KV (1999) Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? Curr Opin Oncol 11:191–199
11. Gillison ML, Lowy DR (2004) A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. Lancet 363:1488–1489
12. Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES et al (2004) Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. J Infect Dis 189:686–698
13. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14:467–475
14. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P et al (2001) Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 344:1125–1131
15. Mendenhall WM, Logan HL (2009) Human papillomavirus and head and neck cancer. Am J Clin Oncol 32:535–539
16. Fliss MS, Usadel H, Caballero OL et al (2000) Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. Science 287:2017–2019
17. Sidransky D (1997) Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. Science 278:1054–1059
18. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG et al (2001) Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine- DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. Cancer Res 61:939–942
19. Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF et al (2007) Tumorspecific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. Clin Cancer Res 13:1179–1185
20. Franzmann EJ, Reategui EP, Pedroso F et al (2007) Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16:1348–1355
21. Nagler R, Bahar G, Shpitzer T et al (2006) Concomit antanalysis of salivary tumormarkers–a new diagnostic tool for oral cancer. Clin Cancer Res 12:3979–3984
22. Tavassoli M, Brunel N, Maher R et al (1998) p53 antibodies in the saliva of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. Int J Cancer 78:390–391
23. Xie H, Onsongo G, Popko J et al (2008) Proteomics analysis of cells inwhole saliva from oral cancer patients via value-added three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry. Mol Cell Proteomics 7:486–498
24. Karpova MA, Moshkovskii SA, Toropygin IY, Archakov AI (2010) Cancer specific MALDI-TOF profiles of blood serum and plasma: biological meaning and perspectives. J Proteomics 73:537–551
25. Lee KD, Lee HS, Jeon CH (2011) Body fluid biomarkers for early detection of head and neck squamos cell carcinomas. Anticancer Res 31:1161–116
26. Baker H, Patel V, Molinolo AA, Shillitoe EJ, Ensley JF, Yoo GH et al (2005) Proteome-wide analysis of head and neck squamous cell carinomas using laser-capture microdissecton and tandem mass spectrometry. Oral Oncol 41:183–199
27. El-Naggar AK, Mao L, Staekel G et al (2001) Genetic heterogeneity in saliva from patients with oral squamous carcinomas: implications in molecular diagnosis and screening. J Mol Diagn 3:164–170
28. Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, Elashoff D, Wei R, Loo JA, Wong DT (2008) Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. Clin Cancer Res 14:6246–6252
29. Aizenbud D, Peri-Front Y, Nagler RM (2008) Salivary analysis and antioxidants in cleft lip and palate children. Arch Oral Biol 53:517–522
30. Navazesh M (1993) Methods for collecting saliva. Ann N Y Acad Sci 694:72–77
31. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685
32. Gaal V, Mark L, Kiss P, Kustos I, Tamas A, Kocsis B, Lubics A, Nemeth V, Nemeth A, Lujber L, Pytel J, Toth G, Reglodi D (2008) Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. J Mol Neurosci 36:321–329
33. Baak JP, Path FR, Hermsen MA, Meijer G, Schmidt J, Janssen EA (2003) Genomics and proteomics in cancer. Eur J Cancer 39:1199–1215
34. Dowling P, Wormald R, Meleady P, Henry M, Curran A, Clynes M (2008) Analysis of the saliva proteome from patients with head and nack squamos cell carcinoma reveals differenes in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. J Proteomics 71:168–175
35. Mahfouz ME, Rodrigo JP, Takes RP, Elsheikh MN, Rinaldo A, Brakenhoff RH, Ferlito A (2010) Current potential and limitations of molecular diagnostic methods in head and neck cancer. Eur Arch Otorhinolaryngol 267:851–860
36. Mydlarz WK, Hennessey PT, Califano JA (2010) Advances and perspectives in the molecular diagnosis of head and neck cancer. Expert Opin Med Diag 4:53–65
37. Xia SH, Hu LP, Hu H, Ying WT, Xu X, Cai Y, Han YL, Chen BS, Wei F, Qian XH, Cai YY, Shen Y, Wu M, Wang MR (2002) Three isoforms of annexin I are preferentially expressed in normal esophageal epithelia but down-regulated in esophageal squamous cell carcinomas. Oncogene 21:6641–6648
38. Schaaij-Visser TB, Bremmer JF, Braakhuis BJ, Heck AJ, Slijper M, van der Waal I, Brakenhoff RH (2010) Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. Oral Oncol 46:123–127
39. Matsumoto I, Yamamoto M (2005) Differential expression of the keratin-4, -13,-14, -17 and transglutaminase 3 genes during the development of oral squamous cell carcinoma from leukoplakia. Oral Oncol 41:607–613
40. Pedrero JMG, Fernandez MP, Morgan RO, Zapatero AH, Gonzalez MV, Nieto CS, Rodrigo JP (2004) Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. Am J Pathol 164:73–79
41. Raynal P, Pollard HB (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and-phosospholipid-binding proteins. Biochim Biophys Acta 1197:63–64
42. Ohkura S, Kondoh N, Hada A, Arai M, Yamazaki Y, Sindoh M, Takahashi M, Mussunoor S, Murray GI (2008) The role of annexins in tumour development and progression. J Pathol 216:131–140
43. Lin CY, Jeng YM, Chou HY, Hsu HC, Yuan RH, Chiang CP et al (2008) Nuclear localization of annexin A1 is a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. J Surg Oncol 97:544–550
44. Lo WY, Tsai MH, Tsai Y, Hua CH, Tsai FJ, Huang SY, Tsai CH, Lai CC (2007) Identification of overexpressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. Clin Chim Acta 376:101–107
45. Makridakis M, Vlahou A (2010) Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. J Proteomics 73:2291–2305
46. Schaaij-Visser T, Brakenhoff RH, Leemans CR, Heck AJR, Slijper M (2010) Protein biomarker discovery for head and neck cancer. J Proteomics 73:1790–1803

47. Schaaij-Visser TB, Graveland AP, Gauci S, Braakhuis BJ, Buijze M, Heck AJ et al (2009) Differential proteomics identifies protein biomarkers that predict local relapse of head and neck squamous cell carcinomas. Clin Cancer Res 15:7666–7675
48. Wadsworth JD, Somers K, Stack BC, Cazare L, Malik G, Adam BL, Wright GL, Semmes JO (2004) Identification of patients with head and neck cancer using serum protein profiles. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 130:98–104
49. Wu W, Tang X, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L (2002) Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Clin Exp Metastasis 19:319–326

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Proteomics

Manuscript Draft

Manuscript Number: JPROT-D-16-00223

Title: Local Expression of S100A8/A9 in the Tumor Microenvironment of Head Neck Squamous Cell Carcinoma

Article Type: SI:10th anniversary CEEPC

Section/Category: Original Article

Keywords: calgranulin, imaging mass spectrometry, MALDI, molecular pathology, saliva, tumorigenesis

Corresponding Author: Dr. Laszlo Mark, Ph.D., M.A., M.Sc.

Corresponding Author's Institution: University of Pecs

First Author: Tamas Jarai

Order of Authors: Tamas Jarai; Janos Schmidt; Bela Kajtar; Katalin Raics; Miklos Nyitrai; Imre Gerlinger; Tamas Tornoczky; Laszlo Mark, Ph.D., M.A., M.Sc.

Abstract: Head and neck squamous cell carcinoma includes a diverse group of tumors from the upper aerodigestive tract with high morbidity and mortality. Additionally, the heterogeneous microenvironment of the cancer cells, characterized by chronic inflammation and consisting of various components including neostroma, growing blood vessels and infiltrating immune cells, is of a vital importance in cancer development and behavior. Because of this cellular and molecular diversity no reliable clinical markers were validated to diagnose the early stage HNSCC.
In this study, we used MALDI mass spectrometry for molecular profiling of S100A8 and S100A9 proteins from tissue samples and human saliva. The imaging mass spectrometry results were validated by immunohistochemistry and SDS-PAGE based MALDI TOF/TOF MS proteomic investigations.
Our results showed that S100A8/A9 proteins are presented in human saliva as potential biomarkers in case of HNSCC. Moreover, the overexpression of S100A8/A9 proteins is localized in the cancer cells and in the supportive stromal regions and is not presented in the healthy tissue areas.
The upregulation of calgranulins in the neoplastic and hyperplastic epithelium as well as their salivary secretion suggest that the S100A8 and S100A9 proteins are potential biomarkers for very early stage tumorigenesis in HNSCC.

Suggested Reviewers: Akos Vertes
vertes@gwu.edu

Zsolt Ablonczy
ablonczy@musc.edu

Ingela Lankoff
ingela.lanekoff@kemi.uu.se

Karoly Vekey
vekey.karoly@ttk.mta.hu

UNIVERSITY OF PÉCS
Medical School
Institute of Biochemistry and Medical Chemistry

Dr. Laszlo Drahos
Quest Editor of "10 Years of CEEPC" Thematic Issue

Dear Editor,

We would like to submit our original research paper entitled **" Local Expression of Calgranulins in the Tumor Microenvironment of Head Neck Squamous Cell Carcinoma"** by Jarai et al. for publication procedures in the **"10 Years of CEEPC** " Thematic Issue of *Journal of Proteomics.*

The aim of the study is the MALDI-based imaging mass spectrometric analyses of HNSCC tissue samples with high spatial resolution. Additionally, the imaging mass spectrometric results were validated by immunohistochemitry and fluorescent confocal microscopy.
Previous studies published down-regulation of calgranulins (S100A8/A9) in tumours from epithelial origin. It is in contrary to our findings which show significant local overexpression of S100A8 and S100A9 proteins in neoplastic and neostromal regions of squamous cell carcinoma. On the basis of our results, we suggest that S100A8 and A9 proteins are important factors of tumorigenesis and they are early stage specific biomarkers of HNSCC.
We declare that the manuscipt or any parts of it have not been and will not be submitted elsewhere for publication if accepted by *Journal of Proteomics*. We state that the results are original and every author agrees with the submission.

Sincerely Yours,

Laszlo Mark, MSc, MA, PhD
associate professor

H-7624 Pécs · Szigeti út 12. · Hungary
Phone: +36 72 536 222 · Fax: +36 72 536 225

***Significance**

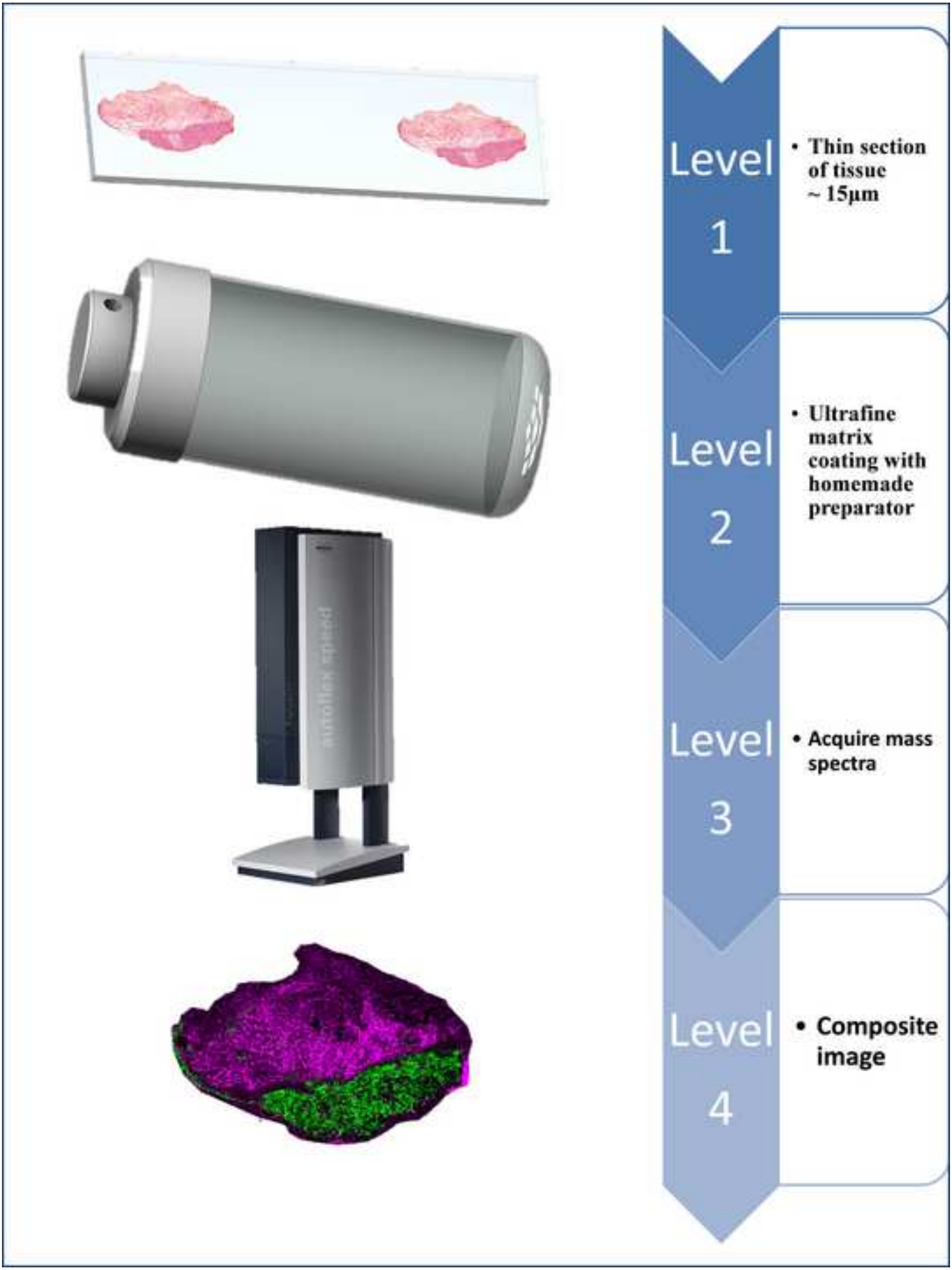
Significance

The aim of the study is the Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometric (MALDI IMS) analysis of HNSCC tissue samples with high spatial and spectral resolution.

Previous studies published down-regulation of calgranulins (S100A8/A9) in tumours from epithelial origin. It is in contrary to our findings which show significant local overexpression of S100A8 and S100A9 proteins in neoplastic and neostromal regions of squamous cell carcinoma. On the basis of our results, we suggest that S100A8 and A9 proteins are important factors of tumorigenesis and they are early stage specific biomarkers of HNSCC.

Graphical Abstract

Click here to download high resolution image



*Manuscript
Click here to download Manuscript: Jarai j Prot.docx Click here to view linked References

Local Expression of Calgranulins in the Tumor Microenvironment of Head Neck Squamous Cell Carcinoma

Tamas Jarai[1], Janos Schmidt[2,3,4,5], Bela Kajtar[6], Katalin Raics[4,7], Miklos Nyitrai[3,4,7], Imre Gerlinger[1], Tamas Tornoczky[6], Laszlo Mark[2,3,4,5]*

***Corresponding Author:** Laszlo Mark, Department of Analytical Biochemistry, Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs, Szigeti str. 12., H-7624 Pecs, Hungary, Tel.: +36 72 536222, Fax: +36 72 536225. E-mail: laszlo.mark@aok.pte.hu

[1]Department of Oto-rhino-laryngology, Head and Neck Surgery, Medical School, University of Pecs, Pecs, H-7623, Hungary

[2]Department of Analytical Biochemistry, Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School, University of Pecs, Pecs, H-7624, Hungary

[3]Imaging Center for Life and Material Sciences, University of Pecs, Pecs, H-7624, Hungary

[4]Janos Szentagothai Research Center, University of Pecs, Pecs, H-7624, Hungary

[5]PTE-MTA Human Reproduction Research Group, Pecs, H-7624, Hungary

[6]Department of Pathology, Medical School, University of Pecs, Pecs, H-7624, Hungary

[7]Institute of Biophysics, Medical School, University of Pecs, Pecs, H-7624, Hungary

Abstract

Head and neck squamous cell carcinoma includes a diverse group of tumors from the upper aerodigestive tract with high morbidity and mortality. Additionally, the heterogeneous microenvironment of the cancer cells, characterized by chronic inflammation and consisting of various components including neostroma, growing blood vessels and infiltrating immune cells, is of a vital importance in cancer development and behavior. Because of this cellular

and molecular diversity no reliable clinical markers were validated to diagnose the early stage HNSCC.

In this study, we used MALDI mass spectrometry for molecular profiling of S100A8 and S100A9 proteins from tissue samples and human saliva. The imaging mass spectrometry results were validated by immunohistochemistry and SDS-PAGE based MALDI TOF/TOF MS proteomic investigations.

Our results showed that S100A8/A9 proteins are presented in human saliva as potential biomarkers in case of HNSCC. Moreover, the overexpression of S100A8/A9 proteins is localized in the cancer cells and in the supportive stromal regions and is not presented in the healthy tissue areas.

The upregulation of calgranulins in the neoplastic and hyperplastic epithelium as well as their salivary secretion suggest that the S100A8 and S100A9 proteins are potential biomarkers for very early stage tumorigenesis in HNSCC.

Keywords

calgranulin, imaging mass spectrometry, MALDI, molecular pathology, saliva, tumorigenesis

Introduction

In the last few decades it has become apparent to understand the behavior of cells and tissues at subcellular level. Abnormal cell cycle regulation and growth are main features of cancer, contributing to malignant transformation and tumorigenesis. The molecular mechanisms vary in different types of cancer and the spatial distribution of proteins that may promote growth and proliferation in these complex functional units is of high interest [1].

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) imaging mass spectrometry enables the evaluation of protein signals directly in situ on tissue surfaces or thin sections maintaining the morphological integrity of the tissue [2-6]. As a consequence, we can generate an image showing a close analogy to the histology and the spatial distribution of molecular components [7-12]. Thus, not only differences between normal and neoplastic tissues may be identified, but potentially early phases of transformation may be detected that are histologically invisible [13, 14].

The S100 protein family, a subclass of low molecular weight calcium ion binding proteins, regulates a variety of cellular interactions. S100A9 (calgranulin B) is a 13 kDa protein, after calcium binding it interacts with the S100A8 (calgranulin A) to form the functional heterodimer called calprotectin. S100A9, S100A8 and the S100A8/A9 heterodimer were originally identified as immunogenic proteins released by inflammatory cells, but their biological functions still remain unclear. They are also thought to have a regulatory role in cell cycle progression. Extracellular S100A8/A9 has been shown to have apoptotic effect on various tumor cells. In normal epidermis S100A8 and S100A9 are expressed only at minimum level. Their expression is induced in response to stress at specific conditions. High plasma S100A8/A9 levels are measured in a number of inflammatory disorders with significant correlation [15, 16]. They are overexpressed during inflammatory-induced carcinogenesis as well. Chronic inflammation aggravates the development of many

malignancies. As inflammation promotes angiogenesis, it induces the expression of tumor growth-promoting factors and anti-apoptotic genes. Finally apoptosis of damaged cells is suppressed in the inflamed tissue, so they may escape the apoptotic pathways resulting to the promotion of tumor progression. The S100A8/A9 protein is differentially regulated in various cancers and it has been implicated in the regulation of tumor cell proliferation and metastasis [17-20]. Correlation among calprotectin expression, clinicopathological features and patient prognosis varies in different cancer types. It suggests that the function of this molecule can be diverse. Growing evidence indicates that S100A8, S100A9 and heterodimer S100A8/A9 can exhibit both pro- and anti-tumorigenic functions. The upregulation of calprotectin is a characteristic feature of hyperproliferative carcinomas, on the other hand these proteins may promote cytotoxicity and apoptosis in several cancer types [21]. Studies have been suggested, that immune mediators such as these molecules can play both tumor promoting and anti-tumor roles, depending on the cancer microenvironment. Tumor promoting inflammation and anti-tumor immunity may co-exist at different points along the path of tumorigenesis, and environmental and microenvironmental conditions dictate the balance between the two [22-24].

In previous studies S100A8 has been suggested as a potential tumor biomarker, however the predictive value and the specificity are little known [25-31]. Driemel and colleagues showed that S100A8 and S100A9 can differentiate between normal mucosa, inflammatory and hyperproliferative lesions, and oral squamous cell carcinoma (OSCC) with a sensitivity of 100% and specificity of 91% [32]. Moreover Jou et al. stated S100A8 protein as a probable salivary biomarker after analysis of salivary proteins at different stages of OSCC [44].

In this study, we determined the histopathological status and spatial distribution of S100A8 and S100A9 proteins in HNSCC tissue. The technique has been applied to laryngeal carcinoma samples (n=32), including cancerous, stromal and the healthy regions as well.

Calprotectin distributed differently between the cancer and stromal regions were visualized, and we determined whether each region was clearly distinguished. Our results showed overexpression of S100A8 and S100A9 proteins localized in the cancer cells and in the supportive stromal regions but were not presented in the healthy tissue areas. Accordingly S100A8/A9 protein is a tumor specific biomarker for HNSCC.

Materials and Methods

Pathological Samples

In this study, a total of 32 consenting head and neck cancer patients (6 females, 26 males) participated; their mean age was 60.44 (range of 43 to 81 years) (Table 1). For clinical histology four µm thick sections were prepared by Leica CM1860 UV cryostat (Biomarker Kft., Budapest, Hungary), the slides were stained with standard hematoxylin and eosin and documented by Pannoramic Desk digital slide scanner (3D Histech, Budapest, Hungary) using the Pannoramic Viewer 1.15 software for data evaluation. Histologically, all cases were described as well-differentiated squamous carcinoma. According to our in-situ hybridization measurements all collected samples were negative for Human papillomavirus.

The studies were approved by the Ethics Committee on Human and Animal Research at University of Pecs in accordance with the Ethical Codex of Human and Animal Experiments (licence no.: 3382/2009).

MALDI Imaging Mass Spectrometry

Imaging mass spectrometry gives the possibility to combine the histological information with a label-free mass spectrometric imaging technology. The 15 µm thick tissue samples (n=5) were cryo-sectioned at -17°C after CMC (carboxymethyl cellulose) embedding and thaw-mounted onto ITO-coated conductive glass slides (Part No. 237001, Bruker Daltonics,

Bremen, Germany). The sections were washed first with ice-cold 70%, then 90% aqueous ethanol solution 1-1 minute long each. After drying under a stream of nitrogen gas, sinapinic acid (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) matrix was applied in 50 deposition-drying cycles by using an automated piezoelectric spray device. The 7 mg/ml matrix solution is prepared freshly every day by dissolving of sinapinic acid (SA) in acetonitrile and 0.2% aqueous trifluoroacetic acid in the ratio of 6:4 (Spectranal quality, Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary). Mass spectra were acquired on an Autoflex Speed MALDI TOF/TOF mass spectrometer equipped with a 1 kHz Smartbeam-II solid-state laser (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The MALDI measurements were performed in positive linear mode in a detection range of m/z 3000 to 30000. The lateral resolution for MALDI imaging was set to 80 μm. A total of 300 laser shots were summarized from each position. The acquisition and evaluation was carried out using the FlexImaging 3.0 and FlexControl 3.4 softwares (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

The ClinProTools 2.2 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was used for spectra-based statistical data analysis of the selected regions of interest. The raw data pretreatment including recalibration, spectral alignment, peak normalization, peak detection and peak area calculation of spectra of patient cohorts were carried out automatically by ClinProTools using manufacturer's default settings. The ClinProTools provides numerous and highly sophisticated statistical algorithms, which generate models to differentiate between patient cohorts. Models are calculated with the genetic algorithm, where the best peak clusters are combined into a new feature while the non-predictive clusters are discarded and these cycles are running until the optimal peak combination is found. During the statistical evaluation the specificity, sensitivity, false positive and negative ratios and the P-values were successfully calculated.

Protein Identification

Microdissections of non-tumorous, stromal and tumorous tissues were used for identification of the proteins. The tissue samples were homogenized in 20 mM Tris/HCl buffer (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary), pH 7.4 containing 3 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary), 5 mM beta mercaptoethanol and 1% SDS (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) by using Ultra Turrax homogenizer. After addition of 1% bromophenol blue, the samples were boiled for 2 minutes and clarified by centrifuging (at 8000 g for 2 min). SDS-PAGE was carried out on 12% gel by Laemmli's method [45]. A low molecular weight calibration kit (Pharmacia) was used for estimation of the molecular weight. To increase the quality of the separation and visibility of the spots the gel was run at 4ºC. Gels were stained with Coomassie brillant blue G-250 (Bio-Rad, Budapest, Hungary) and destained with a solution containing 5% (v/v) acetic acid (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) and 16% (v/v) methanol (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary).

The spots of interest were excised from the gel with a razorblade, placed into Eppendorf tubes, and destained by washing three times in 200 µL of 50% (v/v) acetonitrile solution containing 50 mM NH_4HCO_3 (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) for 10 minutes. Proteins were then reduced by 50 µL of 20 mM dithiotreitol (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary), 100 mM NH_4HCO_3 and 5% acetonitrile for 1 hour at 55°C and alkylated in 50 µL of 20 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) solution. The gel pieces were dehydrated at room temperature by a Speed Vac Concentrator (Eppendorf Concentrator Plus, Eppendorf Austria, Wien, Austria) and covered with 10 µL of modified trypsin (Promega, Madison, WI, sequencing grade) (0.04 mg × mL^{-1}) in Tris buffer (2.5 mM, pH 8.5) and left at 37°C overnight. The excised spots were crushed and peptides were extracted in an ultrasonic bath 15 minutes long with 15 µL aqueous solution of acetonitrile and formic acid (49/50/1 v/v/v).

After extraction the peptide solutions were lyophilized and redissolved in 0.1% TFA. The aqueous solutions of the lyophilized protein digests were concentrated and desalted by using C_{18} ZipTip SPE pipette tips (Millipore Kft, Budapest, Hungary) then the purified peptides were eluted directly onto the target plate (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) by using of 3 µL of a saturated matrix solution, prepared freshly every day by dissolving α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) in acetonitrile/0.1% TFA (1/2, v/v). The mass spectrometer used in this work was an Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) operated in reflectron mode for peptide mass fingerprinting (PMF) or LIFT mode for LID (laser induced decay) and CID (collision induced decay). The FlexControl 2.4 software was used to control the instrument. The accelerating voltage was set to 20.00 kV. The instrument uses a 337 nm nitrogen laser (model MNL-205MC, Lasertechnik Berlin GmbH., Berlin, Germany). External calibration was performed in each case using Bruker Peptide Calibration Standard (#206195 Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Peptide masses were acquired in the range of m/z 700 to m/z 5000. Each spectrum was produced by the accumulating data from 1000 consecutive laser shots. Singly charged monoisotopic peptide masses were searched against Swiss-Prot and NCBI nr databases by utilizing the MASCOT database search engine (version 2.2) (www.matrixscience.com, Matrix Science Ltd., London, UK) and Bruker ProteinScape server 2.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Maximum one missed tryptic cleavage was considered, and the mass tolerance for monoisotopic peptide masses was set to 80 ppm. Additionally laser induced decay (LID) fragmentation of the matched peptides were carried out for MALDI TOF/TOF to provide further evidence for the presence of the identified proteins.

Immunohistochemistry and Confocal Microscopy

For visualization of calgranulin A and B, FITC conjugated mouse monoclonal antibodies (Calgranulin A (CF145): sc-53033, Calgranulin B (MRP1H9): sc-53187, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) were used.

For confocal scanning microscopy, defrosted CMC embedded tissue sections (15 μm) were washed three times with phosphate buffer saline (PBS) before fixation with 4% paraformaldehyde for 10 min. Two minutes long washing steps were repeated 3 times followed by 45 minutes long permeabilization in 0.1% TritonX diluted in PBS, containing 5% bovine serum albumin and 0.1% NaN_3. After washing with PBS, tissue sections were incubated for an hour at room temperature with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Calgranulin A or Calgranulin B antibodies. After another wash with PBS, the tissue sections were allowed to dry right before mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom). The 0.17 mm thick coverslips were sealed with nail varnish. The sections were imaged using a Zeiss LSM 710 Axio Observer inverted confocal laser scanning microscope equipped with 488 nm argon ion laser excitation (Carl Zeiss, Jena, Germany). Transmission images were also collected. The microscope uses continuous spectral detection across the complete visible wavelength range, enabling complete freedom by setting the emission wavelengths with narrow spectral bandwidth.

The applied objective was a 10x Zeiss Plan Apochromat (0.45 NA). Image processing for contrast and brightness was performed using Fiji ImageJ 1.48 software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). As a control the same sections were used in their non-tumorous regions, where the applied excitation laser power was the same (2.0-2.5 mW).

For immunohistochemistry, the same antibodies were utilized with an anti-mouse secondary antibody. A peroxidase 3,3′-diaminobenzidine system was used for visualization with hematoxylin counterstain.

Results

The CMC embedded tissue cryo-sections of the selected patients (n=5) of HNSCC were prepared for protein MALDI IMS and investigated with a lateral resolution of 80 µm using an Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF MS. The direct tissue profiling was carried out in three technical replicates from each selected patient. The histopathologically non-neoplastic regions of the analyzed samples were used as controls (Figure 1). Each tissue section showed significant local alterations of several protein peaks in the range of m/z 5000 to m/z 16000. These molecular changes correlated very well with the histopathological results. In this study, we focused on the local distributions of S100A8 (Figures 2A and 3A), and S100A9 (Figures 2B and 3B) proteins by using MALDI TOF/TOF imaging mass spectrometry. Evidently, the overexpression of calgranulins is localized in the neoplastic and neostromal regions, but it was not observed in the non-neoplastic healthy tissue. For visualization of the benign skeletal muscle tissue a mass spectrometric signal of hemoglobin alpha chain (m/z 15120) was used (Figures 2C and 3C). For data processing and statistical analysis, representative non-neoplastic and tumor cell-specific regions of interest (ROI) were selected (ROI 1 and ROI 2). Approximately 900 spot spectra within each ROI were summed up to obtain an average ROI m/z profile. Figure 4 shows the average spectral profiles of ROI 1 and ROI 2 within the selected range of m/z 8000-18000. On these spectra several discriminative signals are presented such as m/z 10827 and m/z 13149 peaks of S100A8 and S100A9 proteins, respectively. With the help of gel-based MALDI TOF/TOF MS analysis the presence of S100A8 protein was proven. The proteins were extracted from the microdissections of the samples and then the extracts were separated by gel electrophoresis. After tryptic digestion the proteins were identified (Supplementary Figure 1). For further evidence some representative tryptic peptides of S100A8 have been sequenced directly from the tissue by LID fragmentation. A representative fragmentation spectrum is showed on Supplementary

Figure 2, where the resulted sequence of GNFHAVYR is unique for protein S100A8 (Homo sapiens, NP 002955). The spot spectra of ROI 1 and ROI 2 were distinguished by ClinProTools software. The complete list and the statistical values of the detected peaks are shown in the electronic supplementary files (Supplementary Figure 3). The results of the spectral-based statistical analyses have been presented on Figure 5. The bases on the cluster analysis (Figures 5B and 5C) as well as the graphical view of the spot spectra (Figs. 5D and 5E) show significant differences detected between the tumor and healthy regions.

Surprisingly, the presence of calgranulin was detected in the non-tumorous epithelial surface (Region E on Figure 1A) of sample B2. Here, mild hyperplasia can be detected, but significant inflammation or invasive lesions could not be observed.

Figure 6 shows the results of immunohistochemistry in sample B2. Non-neoplastic epithelium around the tumor region was chosen as negative control. Both S100A8 and S100A9 staining was limited to nuclei of parabasal epithelial cells, while strong staining was observed in neutrophilic granulocytes within capillaries of the lamina propria. In the neoplastic cells strong staining pattern was observed corresponding to both S100A8 and S100A9. Expression of the proteins was localized mostly to the cell surface and the cytoplasm of epithelial cells as well as in the neostroma.

Discussion

HNSCC includes a diverse group of tumors from the upper aerodigestive tract. Additionally, the heterogeneous microenvironment of the cancer cells, characterized by a chronic inflammation and consisting of various components including neostroma, growing blood vessels and infiltrating immune cells, is of a vital importance in cancer development and behavior. Because of this cellular and molecular diversity no reliable clinical markers were validated to diagnose the early stage HNSCC [33].

The S100 family of proteins includes a group of small acidic proteins regulating a variety of cellular pathways, among others proliferation, differentiation, motility, neovascularization, immune response, inflammation and apoptosis. It is well known, that calgranulins (S100A8 and A9) as well their heterodimer (calprotectin) are thought to have regulatory role in cell progression. Nowadays, increased S100A8/A9 levels were detected in several types of human cancers, such as colorectal, breast, prostate, skin, liver, bladder and lung [30, 34-41] while down-regulation was detected for human cancers of squamous epithelial cells such as HNSCC [20]. However, S100A9 was specifically expressed in inflammatory cells infiltrating gastric cancer tissues and its level correlates with an early stage diagnosis of cancer [22].

In this report, we showed significant local expression of S100A8 and S100A9 in HNSCC tissue samples. The previous studies [42, 43] and our results confirm MALDI IMS as a powerful technique for tissue-based differentiation of neoplastic and non-neoplastic molecular alterations. Moreover, the upregulation of calgranulins in the non-neoplastic but hyperplastic epithelium suggests that the S100A8 and S100A9 may be potential biomarkers for very early stage tumorigenesis in HNSCC.

Acknowledgements

The authors thank their patients for their courage and generosity. This study was supported by the Hungarian National Scientific Research Foundation (OTKA Grant No. NN109841, K104984). The research was supported by PTE AOK KA 34039-2009, 2011, 2012-2013 (13-18). The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pecs, Hungary.

References

[1] von Eggeling F, Melle C, Ernst G. Microdissecting the proteome. Proteomics 2007; 7:2729-37.

[2] Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM. Proteomics in diagnostic pathology - Profiling and imaging proteins directly in tissue sections. American Journal of Pathology 2004; 165:1057-106.

[3] Chaurand P, Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: Principles and potentials. Toxicol Pathol 2005; 33:92-101.

[4] Li LJ, Garden RW, Sweedler JV. Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling. Trends Biotechnology 2000; 18:151-60.

[5] Chaurand P, Stoeckli M, Caprioli RM. Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. Analytical Chemistry 1999; 71: 5263-70.

[6] Chaurand P, Schwartz SA, Billheimer D, Xu BGJ, Crecelius A, Caprioli RM. Integrating histology and imaging mass spectrometry. Analytical Chemistry 2004; 76:1145-55.

[7] Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. Nature Medicine 2001; 7:493-96.

[8] Reyzer ML, Caprioli RM. MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: A new tool for biomarker discovery. Journal Proteome Research 2005; 4:1138-42.

[9] Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. Analytical Chemistry 1997; 69:4751-60.

[10] Dreisewerd K, Kingston R, Geraerts WPM, Li KW. Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of nervous tissues to identify peptides involved in male copulatory behavior in Lymnaea stagnalis. Internat. Journal of Mass Spectrometry 1997; 169:291-9.

[11] Caldwell RL, Caprioli RM. Tissue profiling by mass spectrometry - A review of methodology and applications. Molecular Cellular Proteomics 2005; 4:394-401.

[12] Reyzer ML, Caldwell RL, Dugger TC, Forbes JT, Ritter CA, Guix M, Arteaga CL, Caprioli RM. Early changes in protein expression detected by mass spectrometry predict tumor response to molecular therapeutics. Cancer Research 2004; 64:9093-100.

[13] Alexandrov T, Becker M, Guntinas-Lichius O, Ernst G, von Eggeling F. MALDI-imaging segmentation is a powerful tool for spatial functional proteomic analysis of human larynx carcinoma. Journal Cancer Research and Clinical Oncology 2013; 139:85-95.

[14] Wehder L, Ernst G, Crecelius AC, Guntinas-Lichius O, Melle C, Schubert US, von Eggeling F. Depicting the Spatial Distribution of Proteins in Human Tumor Tissue Combining SELDI and MALDI Imaging and Immunohistochemistry. Journal Histochemistry and Cytochemistry 2010; 58:929-37.

[15] Ghavami S, Chitayat S, Hashemi M, Eshraghi M, Chazin WJ, Halayko AJ, Kerkhoff C. S100A8/A9: A Janus-faced molecule in cancer therapy and tumorgenesis. European Journal of Pharmacology 2009; 625:73-83.

[16] Markowitz J, Carson WE. Review of S100A9 biology and its role in cancer. Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer. 2013, 1835, 100.

[17] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. International Journal Biochemistry and Cell Biology 2001; 33:637-68.

[18] Kim SK, Kim EJ, Leem SM, Ha YS, Kim YJ, Kim WJ. Identification of S100A8-correlated genes for prediction of disease progression in non-muscle invasive bladder cancer. BMC Cancer 2010; 10:21-30.

[19] Dowling P, Wormald R, Meleady P, Henry M, Curran A, Clynes M. Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. Journal of Proteomics 2008; 71:168-75.

[20] Khammanivong A, Wang C, Sorenson BS, Ross KF, Herzberg MC. S100A8/A9 (Calprotectin) Negatively Regulates G2/M Cell Cycle Progression and Growth of Squamous Cell Carcinoma. PLoS One 2013; 8:e69395.

[21] Luley K, Noack F, Lehnert H, Homann N. Local calprotectin production in colorectal cancer and polyps-active neutrophil recruitment in carcinogenesis. International Journal of Colorectal Disease 2011;26:603-7.

[22] Fan B, Zhang LH, Jia YN, Zhong XY, Liu YQ, Cheng XJ, Wang XH, X.F. Xing, Hu Y, Li YA. Presence of S100A9-positive inflammatory cells in cancer tissues correlates with an early stage cancer and a better prognosis in patients with gastric cancer. BMC Cancer 2012; 12:316-27.

[23] Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? Current Opinion in Immunology 2007; 19:203-8.

[24] Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, Smyth MJ. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. Proceedings of National Academy of Sciences USA 2008; 105:652-6.

[25] Gebhardt C, Breitenbach U, Tuckermann JP, Dittrich BT, Richter KH, Angel P. Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis. Oncogene 2002; 21: 4266-76.

[26] Ito Y, Arai K, Nozawa R, Yoshida H, Hirokawa M, Fukushima M, Inoue H, Tomoda C, Kihara M, Higashiyama T. S100A8 and S100A9 Expression Is a Crucial Factor for Dedifferentiation in Thyroid Carcinoma. Anticancer Research 2009; 29:4157-61.

[27] Driemel O, Escher N, Ernst G, Melle C, von Eggeling F. S100A8 Cellular Distribution in Normal Epithelium, Hyperplasia, Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma and Its Concentration in Serum. Analytical Quantitative Cytology and Histology 2010; 32:219-24.

[28] Sapkota D, Bruland O, Boe OE, Bakeer H, Elgindi OAA, Vasstrand EN, Ibrahim SO. Expression profile of the S100 gene family members in oral squamous cell carcinomas. Journal of Oral Pathology and Medicine 2008; 37:607-15.

[29] Arai K, Takano S, Teratani T, Ito Y, Yamada T, Nozawa R. S100A8 and S100A9 overexpression is associated with poor pathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. Current Cancer Drug Targets 2008; 8:243-52.

[30] Hermani A, Hess J, De Servi B, Medunjanin S, Grobholz R, Trojan L, Angel P, Mayer D. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. Clinical Cancer Research 2005; 11:5146-52.

[31] Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D. S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. Experimental Cell Research 2006; 312:184-97.

[32] Driemel O, Murzik U, Escher N, Melle C, Bleul A, Dahse R, Reichert TE, G. Ernst, von Eggeling F. Protein profiling of oral brush biopsies: S100A8 and S100A9 can differentiate between normal, premalignant, and tumor cells. Proteomics Clinical Applications 2007; 1:486-93.

[33] Yonezawa K, Nishiumii S, Kitamoto-Matsuda J, Fujita T, Morimoto K, Yamashita D, Saito M, Otsuki N, Irino Y, Shinohara M. Serum and tissue metabolomics of head and neck cancer. Cancer Genomics and Proteomics 2013; 10:233-38.

[34] Wang G, Wang X, Wang S, Song H, Sun H, Yuan W, Cao B, Bai J, Fu S. Colorectal cancer progression correlates with upregulation of S100A11 expression in tumor tissues. International Journal Colorectal Disease 2008; 23:675-82.

[35] Tsuna M, Kageyama SI, Fukuoka J, Kitano H, Doki Y, Tezuka H, Yasuda H. Significance of S100A4 as a Prognostic Marker of Lung Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Research 2009; 29:2547-54.

[36] Yang WS, Moon HG, Kim HS, Choi EJ, Yu MH, Noh DY, Lee C. Proteomic Approach Reveals FKBP4 and S100A9 as Potential Prediction Markers of Therapeutic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Cancer. Journal of Proteome Research 2012; 11:1078-88.

[37] Duan L, Wu R, Ye L, Wang H, Yang X, Zhang Y, Chen X, Zuo G, Zhang Y, Weng Y. S100A8 and S100A9 Are Associated with Colorectal Carcinoma Progression and Contribute to Colorectal Carcinoma Cell Survival and Migration via Wnt/beta-Caten Pathway. PLoS One 2013; 8:e62092.

[38] Ha YS, Kim MJ, Yoon HY, Kang HW, Kim YJ, Yun SJ, Lee SC, Kim WJ. mRNA Expression of S100A8 as a Prognostic Marker for Progression of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. Korean Journal of Urology 2010; 51:15-20.

[39] Minami S, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Kawashima Y, Yoshio K, Ishii J, Matsumoto K, Nagashio R, Okayasu I. Proteomic study of sera from patients with bladder cancer: usefulness of S100A8 and S100A9 proteins. Cancer Genomics and Proteomics 2010; 7:181-9.

[40] Su YJ, Xu F, Yu JP, Yue DS, Ren XB, Wang CL. Up-regulation of the expression of S100A8 and S100A9 in lung adenocarcinoma and its correlation with inflammation and other clinical features. Chinese Medical Journal 2010; 123:2215-20.

[41] Grebhardt S, Muller-Decker K, Bestvater F, Hershfinkel M, Mayer D. Impact of S100A8/A9 expression on prostate cancer progression in vitro and in vivo. Journal of Cell Physiology 2014; 229:661-71.

[42] Meding S, Balluff B, Elsner M, Schone C, Rauser S, Nitsche U, Maak M, Schafer A, Hauck SM, Ueffing M. Tissue-based proteomics reveals FXYD3, S100A11 and GSTM3 as novel markers for regional lymph node metastasis in colon cancer. Journal of Pathology 2012; 228:459-70.

[43] Willems SM, van Remoortere A, van Zeijl R, Deelder AM, McDonnell LA, Hogendoorn PCW. Imaging mass spectrometry of myxoid sarcomas identifies proteins and lipids specific to tumour type and grade, and reveals biochemical intratumour heterogeneity. Journal of Pathology 2010; 222:400-9.

[44] Jou YJ, Hua CH, Lin CD, Lai CH, Huang SH, Tsai MH, Kao JY, Lin CW. S100A8 as potential salivary biomarker of oral squamous cell carcinoma using nanoLC-MS/MS. Clinica Chimica Acta 2014; 436:121-9.

[45] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-5.

Age/years	Diagnosis	TNM	Stage
56	hypopharyngeal tumor	T3N0M0	III
73	hypopharyngeal tumor	T2N0M0	II
53	hypopharyngeal tumor	T3N3M1	IV
51	hypopharyngeal tumor	T4N2M0	IV
60	hypopharyngeal tumor	T2N2M1	IV
55	supraglottic laryngeal tumor	T3N0M0	III
55	transglottic laryngeal tumor	T3N0M0	III
60	hypopharyngeal tumor	T2N3M0	IV
49	hypopharyngeal tumor	T4N2M0	IV
65	hypopharyngeal tumor	T2N1M0	III
81	hypopharyngeal tumor	T2N0M0	II
56	transglottic laryngeal tumor	T4N0M0	IV
48	mesopharyngeal tumor	T2N3M0	IV
65	hypopharyngeal tumor	T3N2M1	IV
68	mesopharyngeal tumor	T2N0M0	III
65	supraglottic laryngeal tumor	T4N0Mx	IV
50	mesopharyngeal tumor	T4N3Mx	IV
66	oral cavity tumor	T2N0M0	II
49	hypopharyngeal tumor	T4N0Mx	IV
60	oral cavity tumor	T1N1M0	III
58	supraglottic laryngeal tumor	T4N0M0	IV
62	hypopharyngeal tumor	T4N2Mx	IV
71	mesopharyngeal tumor	T2N1M0	III
69	hypopharyngeal tumor	T1N0M0	I
63	transglottic laryngeal tumor	T3N0M0	III
74	mesopharyngeal tumor	T2N0M0	III
56	oral cavity tumor	T3N2M0	IV
50	supraglottic laryngeal tumor	T3N2M0	IV
64	supraglottic laryngeal tumor	T3N2M0	IV
51	hypopharyngeal tumor	T2N1M0	III
61	hypopharyngeal tumor	T4N3M0	IV
70	oral cavity tumor	T3N2M0	IV

Table 1: The parameters of the investigated patients

Figure Legends

Figure 1: Histopathological analyses of hematoxylin and eosin stained tissue sections. Presented representative samples show a well-differentiated squamous carcinoma with minimal signs of keratinisation, low mitotic activity and minimal cytological atypia. **A,** Tissue section of a laryngeal squamous carcinoma of a 73-year-old male patient (sample code B9). After diagnosis of a tumor of the right vocal cord, local radiotherapy was administered that induced partial remission. After the completion of radiotherapy, total laryngectomy was performed. Six months later local recurrence was detected and removed. Fibroblast-rich, slightly edematous neostroma (S) and chronic inflammation at the base of the tumor (T), normal skeletal muscle (H) and apparently normal mucosa (E). **B,** Tissue sample from an invasive squamous carcinoma of the left vocal cord of a 64-year-old male patient who underwent total laryngectomy (sample code B2). Neostroma (S), tumor (T).

Figure 2: Imaging MS shows spatial localization for selected proteins of interest on B9 tissue section. Spatial localization of S100A8 (**A**), S100A9 (**B**), hemoglobin alpha chain (**C**) by imaging MS. Panel **D** is a composite image of the three investigated proteins.

Figure 3: Imaging MS shows spatial localization for selected proteins of interest on B2 tissue section. Spatial localization of S100A8 (**A**), S100A9 (**B**), hemoglobin alpha chain (**C**) by imaging MS. Panel **D** is a composite image of the three investigated proteins.

Figure 4: Representative average mass spectra obtained from the tumorous (green) and from the healthy (magenta) regions of interest. The signals of m/z 10827 and m/z 13149 are showed the presence of S100A8 and S100A9 proteins, respectively.

Figure 5: Spectral-based statistical analyses of the MALDI TOF MS results. Panel **A** shows the locations of the regions of interest (ROI 1 and ROI 2). Panels **B** and **C** show the results of the cluster analyses by using some discriminative m/z values. Gel-view and normal representation of the spectral differences between ROI 1 and ROI 2 are showed on panel **D** and **E**, respectively.

Figure 6: Results of immunohistochemistry and fluorescence scanning confocal microscopy in sample B2. Panel **A** and **B** show the staining of S100A8 and A9 in the normal epithelium, respectively. In contrast, significant up-regulation of S100A8 (**C**) and S100A9 (**D**) was detected in the tumorous regions. According to the results of fluorescent confocal microscopy the expression of S100A8 (**E**) and S100A9 (**F**) are clearly observed in the neoplastic regions.

Supplementary Figure 1: Sequencing of S100A8 unique peptide.

Representative MALDI TOF/TOF MS fragmentation profile of a unique peptide of S100A8 protein.

Supplementary Figure 2: Detailed statistical results of the data set.

The statistical analysis made by ClinProTools software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). DAve – Difference between the maximum and minimum average peak area of all classes, PTTA – P-value of T-test or ANOVA, PWKW – P-value of Wilcoxon or Kruskal-Walis test, PAD – P-value of Anderson-Darling test.

Figure 1

Click here to download high resolution image

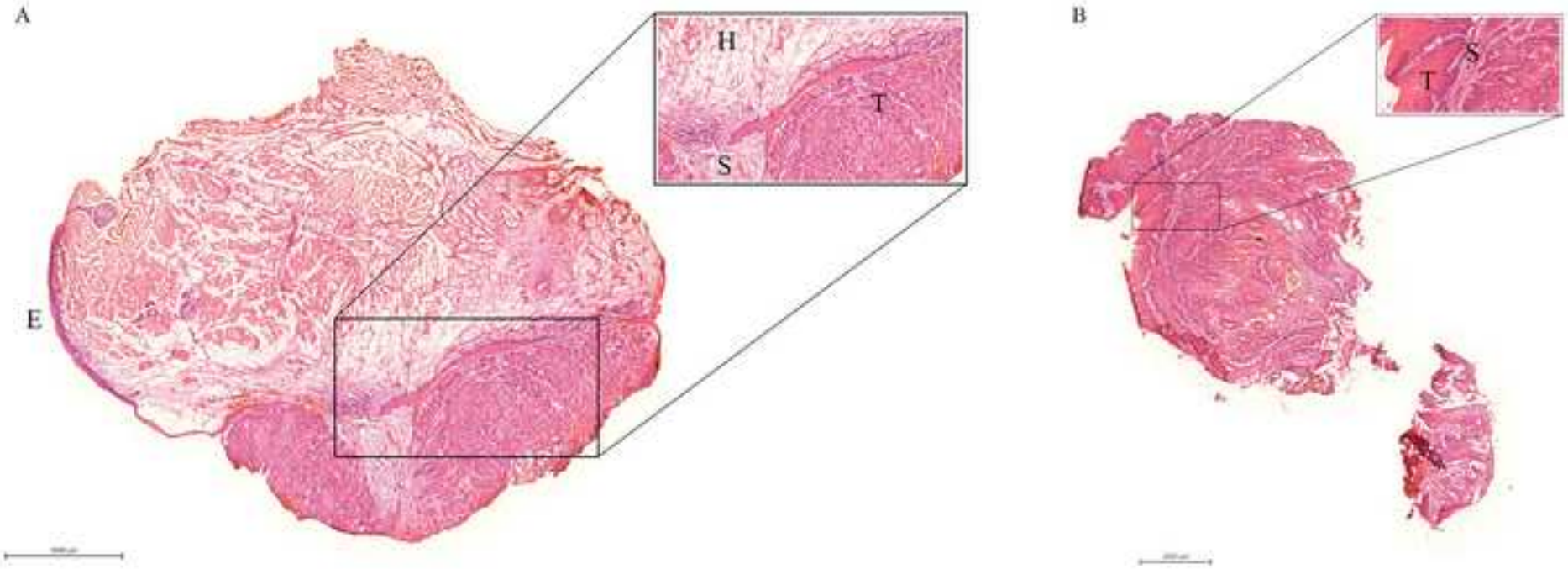


Figure 2
Click here to download high resolution image

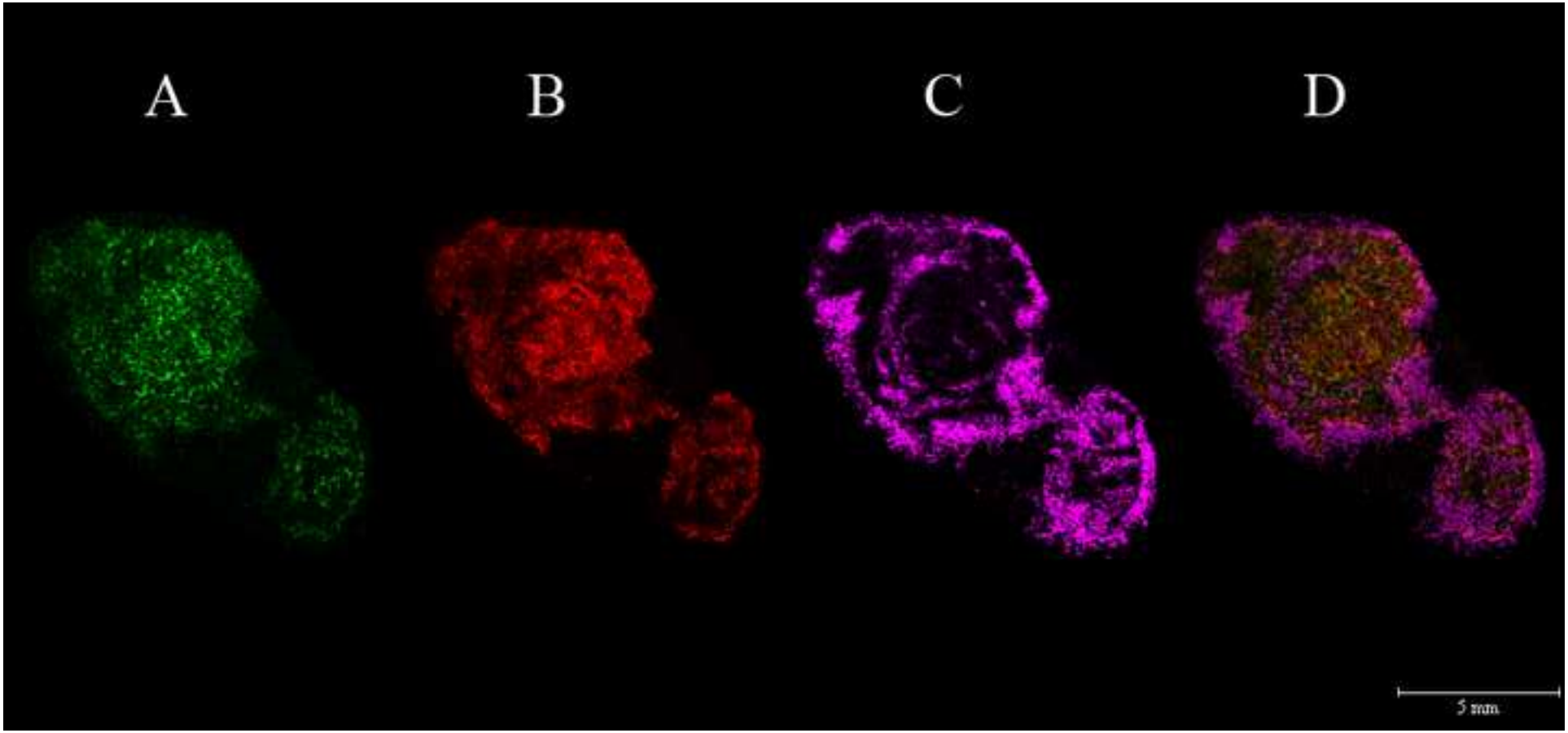


Figure 3

Click here to download high resolution image

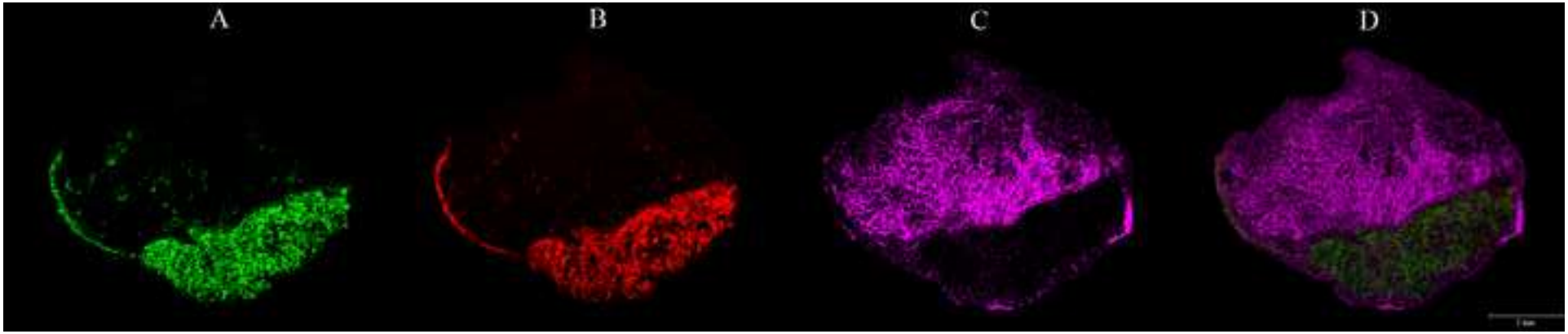


Figure 4

Click here to download high resolution image

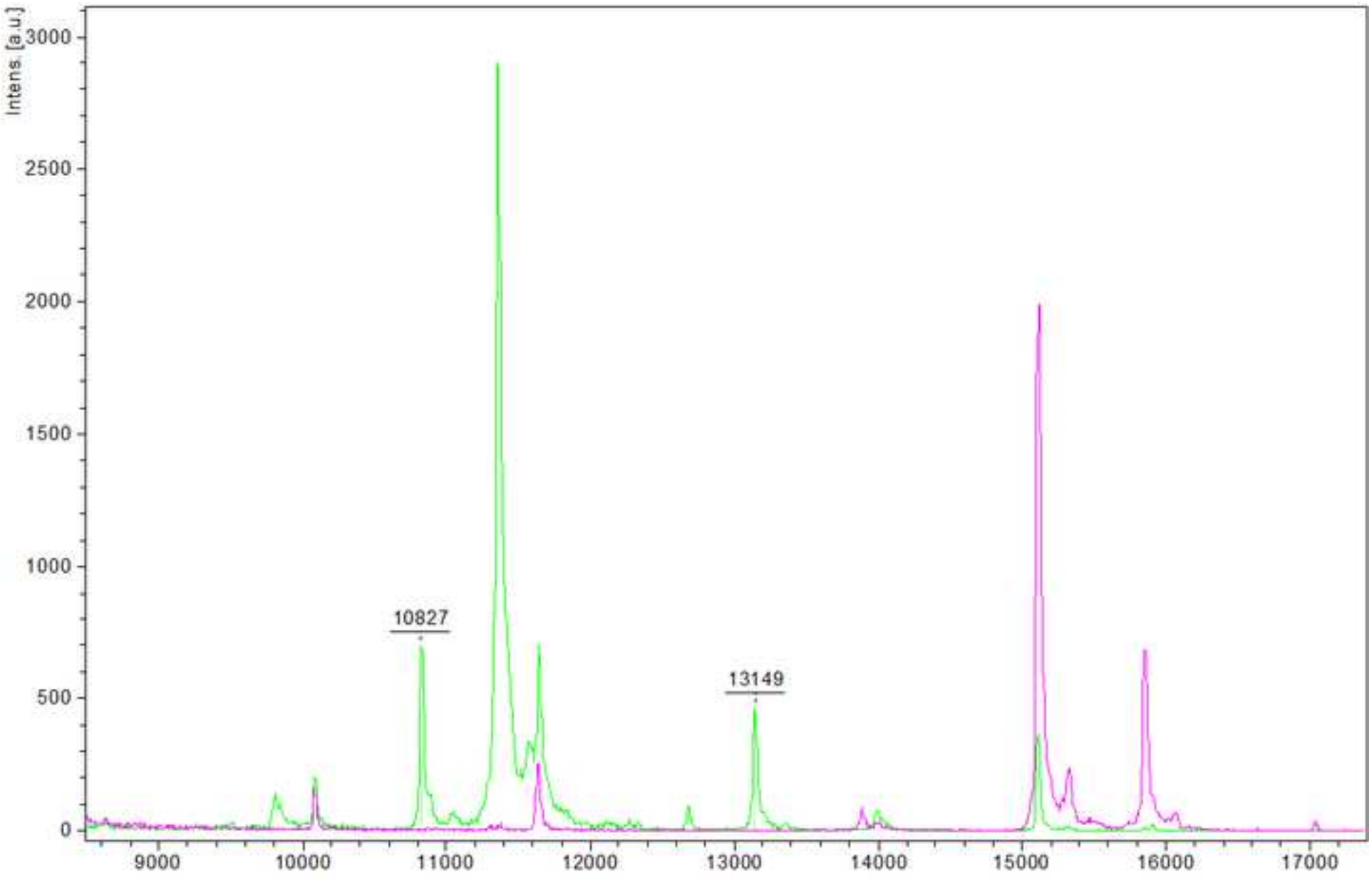


Figure 5

Click here to download high resolution image

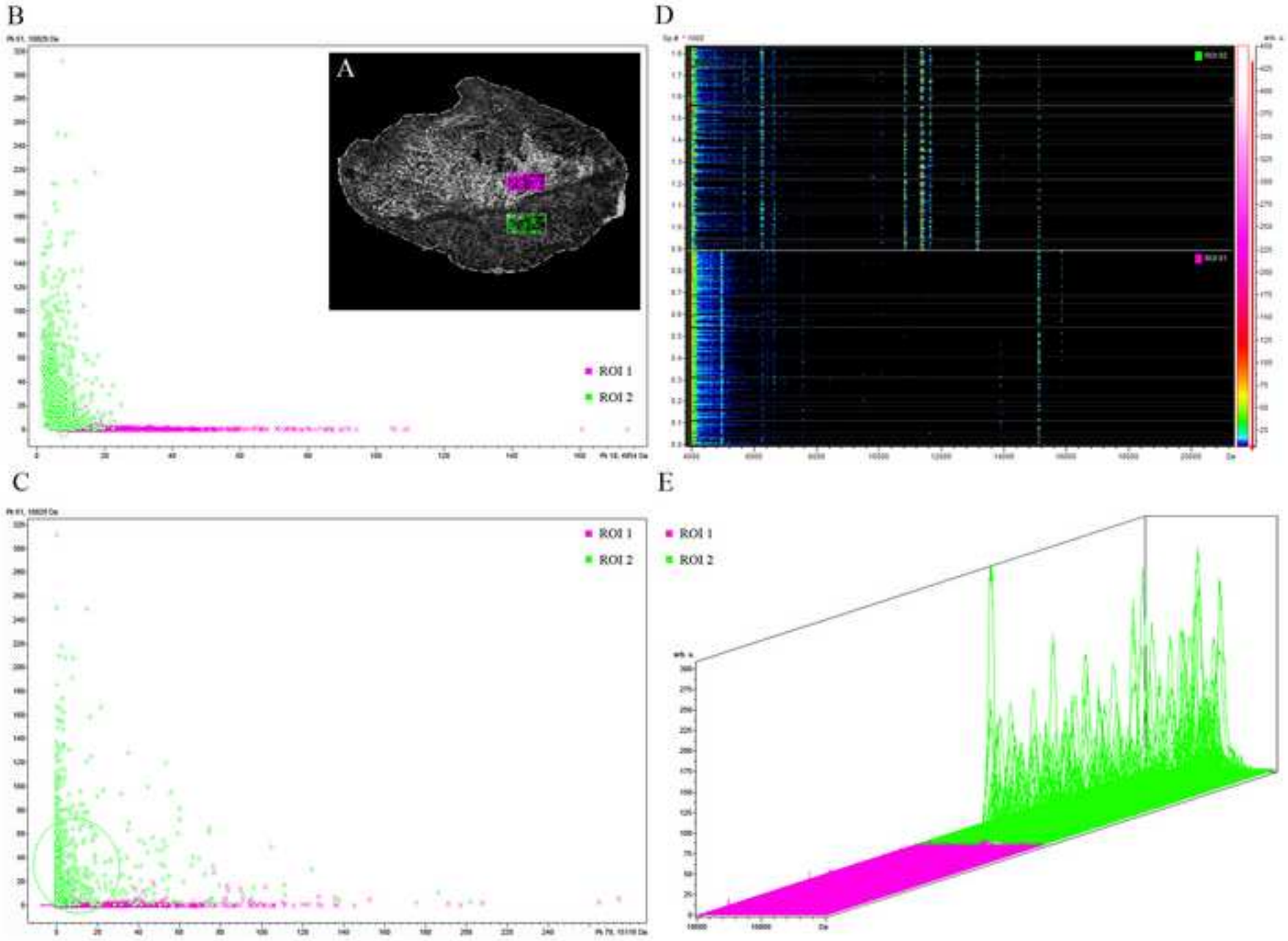
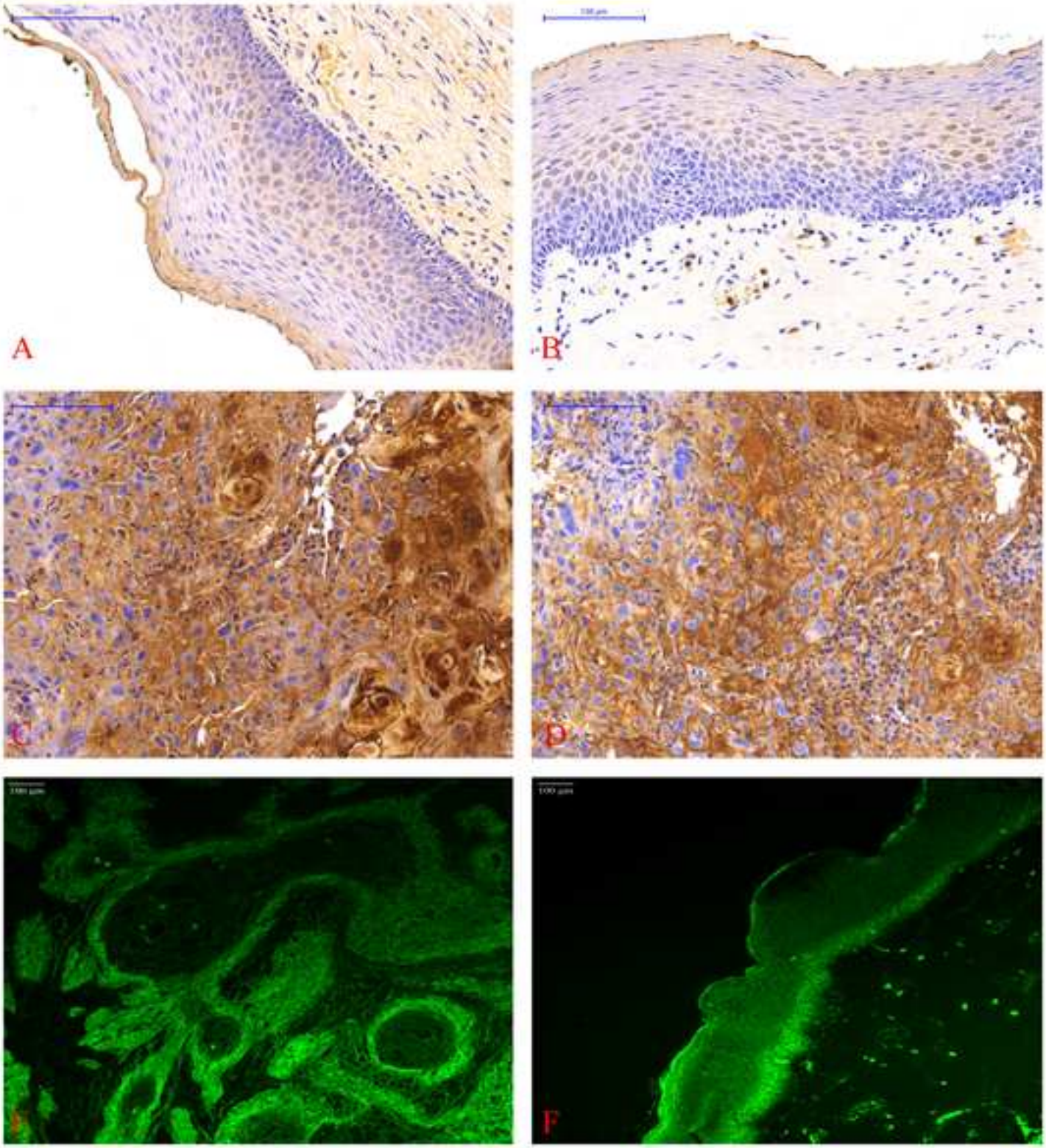


Figure 6

Click here to download high resolution image



Supplementary figure1

Click here to download Supplementary material: Suppl table.docx

Supplementary figure 2

Click here to download Supplementary material: Supplementary Figure 2.tif

Supplementary figure 3

Click here to download Supplementary material: Supplementary Figure 3.pdf

***Conflict of Interest**

Click here to download Conflict of Interest: coi_disclosure.pdf