

**Patológiai biomarkerek tömegspektrofotometriás vizsgálata
fej-nyaki tumoros betegeken**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Készítette:

Dr. Burián András

PTE KK Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinika

Doktori Iskola vezetője:

Dr. Gallyas Ferenc egyetemi tanár

PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

A kutatás témavezetője:

Dr. Márk László egyetemi docens

PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Klinikai témavezető:

Dr. Lujber László egyetemi tanár

PTE KK Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinika

Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT

2025



TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
I. BEVEZETÉS.....	4
II. CÉLKITŰZÉS.....	4
III. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	5
BETEGANYAG.....	5
MINTAELŐKÉSZÍTÉS.....	5
TÖMEGSPEKTROMETRIAI ANALÍZIS.....	6
FEHÉRJEAZONOSÍTÁS.....	7
STATISZTIKAI ÉS BIOINFORMATIKAI ANALÍZIS.....	7
IV. EREDMÉNYEK.....	7
V. MEGBESZÉLÉS.....	9
KUTATÁSUNK LIMITÁCIÓI.....	9
KUTATÁSUNK HOZADÉKA.....	10
JÖVŐBENI TÖREKVÉSEINK.....	10
VI. ÖSSZEFOGLALÁS.....	11
VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	11
VIII. IRODALOMJEGYZÉK	12
FÜGGELÉK.....	25
PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	27
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY MÁSOLATA.....	32

Rövidítések jegyzéke

ALDH3A2 - zsíros aldehyd dehidrogenáz 3A2
c-MET - c-mesenchymal-epithelial transition/c-mezenhimális-epiteliális átalakulás
COTL1 - koaktozin-szerű fehérje
DNS - deoxiribonukleinsav
DSG1 - desmoglein-1
DYNLL1 - citoplazmatikus dinein könnyű lánc 1
EGFR - epidermális növekedési faktor receptor
ESI - elektropray ionizáció
FFPÁ - formalin-fixált paraffinba ágyazott
FNYLHK - fej-nyaki laphámkarcinóma
GALHK - gége-algarati laphámkarcinóma
HE - hematoxin-eozin
HPV - humán papilloma vírus
HGF - hepatocita növekedési faktor
IPA - Ingenuity Pathway Analysis
KRT9 vagy K1C9 - I-es típusú citoskeletális keratin 9
LC - folyadékkromatográfia
LHK - laphámkarcinóma
MALDI - mátrix-asszisztált lézer deszorpció/ionizáció
miRNS - mikroRNS
mRNS - messenger/hírvivő RNS
MRM - multiple reaction monitoring/többszörös reakció monitorozás
MS - tömegspektrometria
m/z - tömeg/töltés hányados
NCL - nukleolin
NFE2L2 - nukleáris faktor eritroid 2- szerű 2 faktor
REIMS - rapid evaporatív ionizációs tömegspektrometria
RNS - ribonukleinsav
SNRNP200 - U5 kis nukleáris ribonukleoprotein 200 kDa helikáz
snRNS - small nuclear/kis magi RNS
SPRR2D - kis prolinban gazdag fehérje 2D
TMED2 - transzmembrán emp24 domént tartalmazó fehérje 2
TNC - tenascin-C
TOF - time-of-flight/repülési idő

I. BEVEZETÉS

A fej-nyaki laphámkarzinóma (FNYLHK) a világon a hetedik leggyakoribb rosszindulatú daganatos megbetegedés. Évente mintegy 660 000 új esetet diagnosztizálnak, így a betegség jelentős terhet ró az egészségügyi rendszerre és a betegek életminőségére. Az FNYLHK-k közé tartoznak a malignus gége és algarati laphámkarzinómák (GALHK) is. Bár a diagnosztikai és terápiás eljárások az elmúlt évtizedekben jelentős fejlődésen mentek keresztül, a betegek túlélése nem javult számottevően. Ennek egyik fő oka, hogy a betegséget gyakran csak előrehaladott stádiumban diagnosztizálják, amikor a kezelési lehetőségek korlátozottabbak, emellett a daganat agresszív biológiai viselkedése is nehezíti a kezelés sikerét.

Emiatt a korai tumorfelismerés kulcsfontosságú a betegek túlélési esélyeinek javításában. A hagyományos diagnosztikai módszerekkel (fizikális vizsgálat, képalkotó eljárások, mintavétel) párhuzamosan továbbra is nagy igény mutatkozik a tumormarkerek kutatása iránt. A tumormarkerek olyan molekulák (pl. fehérjék, DNS-szakaszok), amelyek a daganat jelenlétekor megváltozott mennyiségben vannak jelen a szervezetben. Ideális esetben a tumormarkerek segítségével a daganatok korai stádiumban diagnosztizálhatóak, emellett a terápia hatékonysága, valamint az esetleges tumorkiújulás is monitorozható. A tumoron hordozott fehérjék nem csak diagnosztikai szempontból jöhetnek szóba, de terápiás targetet is jelenthetnek biológiai terápia számára.

A proteomikai módszerek közül a tömegspektrometria (MS) alkalmazása új utakat nyitott a tumormarkerek kutatásában. Az MS a töltéssel rendelkező részecskék tömegének meghatározására szolgáló analitikai módszer. Az eljárás során a vizsgálandó anyagot ionizálják, majd az ionokat elektromágneses térben szétválasztják tömeg/töltés (m/z) arányuk alapján. Az így kapott spektrum alapján azonosíthatók és mennyiségileg meghatározhatók a vizsgált anyag összetevői. A módszer lehetőséget nyújt a fenotípusosan tumoros és egészséges szövetek közötti fehérjeösszetétel különbségek azonosítására is. Így nem csupán a detektált fehérjék, de ezek mennyiségi eltérései is potenciális tumormarkerekként szolgálhatnak.

II. CÉLKITŰZÉS

Jelen tanulmányban célkitűzésünk a szöveten belüli fehérjekülönbségek jelölésmentes tömegspektrometriai vizsgálata volt GALHK és a környező normál fenotípusú nyálkahártya összehasonlításával formalin-fixált paraffinba ágyazott (FFPÁ) szövettani metszeteken

potenciális tumormarkerek után kutatva. Azon feltételezésünket kívántuk igazolni, miszerint egyes fehérjék túl - vagy alulexpresszálnak GALHK-kban. Emellett a nemzetközi szakirodalmat és az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) adatbázist alapul véve térképeztük fel az általunk azonosított, esetlegesen tumormarkerként és jövőbeni terápiás célpontként szóba jövő fehérjék jelátviteli utakban betöltött szerepét.

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

Beteganyag

A kutatásba 16, szövettanilag igazolt GALHK-s férfi beteg került bevonásra. A betegek átlagéletkora 61 év volt (a legfiatalabb beteg 45, míg a legidősebb 79 éves volt). A résztvevők mindannyian erős dohányosnak minősültek, emellett rendszeres alkoholfogyasztásról számoltak be. A diagnosztizált tumorok mind primer esetként kerültek felismerésre. A diagnózis direkt laringoszkópia során történt. A direkt laringoszkópia során a feltárással szolgáló laringoszkópot a hanyatt fekvő, hiperextendált nyaki pozíciójú beteg száján keresztül a gége-algarat régióba vezettük. A tumorkiterjedés intraoperatív meghatározása operációs mikroszkóppal vagy gégészeti endoszkóppal végzett vizualizációval történt. A diagnosztikus mintavételt gégemikrosebészeti fogóval végeztük. Az analizálandó szövetmintákat FFPÁ szöveti blokkokból történő metszéssel nyertük.

Mintaelőkészítés

A mintaelőkészítést deparaffinálással kezdtük: a festetlen metszeteket xilollal, 90, 70 és 50 m/m %-os etanollal, majd 50 mM koncentrációjú ammónium-bikarbonáttal mostuk. Az antigénelőhívás 100 mM koncentrációjú Tris-Hcl pufferoldattal történt (97 °C, 30 perc). A patológus által előzetesen bejelölt, szövettanilag malignusnak tartott területeket egy vékony tűvel mikrodisszekáltuk a tárgylemezekről, majd SDS lízis puffert tartalmazó 2 ml-es Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. A tumorról szomszédos, fenotípusosan tumormentes szövetrészeket azonos módon disszekáltuk és inkubáltuk lízis pufferben. Centrifugálást követően jéghideg etanolra adtuk a felülúszóhoz 9-szeres volumenfeleslegben. A mintákat egy éjszakán keresztül 4 °C-on pihentettük a fehérjék kicsapására. Az így nyert pelletet kétszer mostuk abszolút alkohollal, majd a fehérjék szolubilizálása következett 8 M ureával. A redukciót és alkilálást egy éjszakán át tartó tripszines emésztés követte 37 °C-on. Az így

keletkező triptikus peptideket Pierce C18 spin oszlopokon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) tisztítottuk.

Tömegspektrometriai analízis

A vizsgálatra szolgáló készülék egy Bruker MAXIS II ETD Q-TOF (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) volt, melyet egy Ultimate 3000 nanoRSLC rendszerhez (Dionex, Sunnyvale, Kalifornia, USA) csatoltunk. A mintákat egy Acclaim PepMap100 C-18 csapdázó oszlopra (100 μm x 20 mm, Thermo Scientific, Sunnyvale, Kalifornia, USA) injektáltuk, melyet online csatoltunk egy ACQUITY UPLC M-Class Peptide BEH C18 oszlophoz (130 Å, 1,7 μm , 75 μm x 250 mm, Waters, Milford, Massachusetts, USA). A peptidek elválasztása 48 °C-on, 300 nl/perc áramlási sebességgel, 4%-os „B” oldószerrel történt 11 percig, majd 50 %-os „B” oldószerrel 120 percig. „A” oldószernek víz 0.1 %-os hangyasav elegyét, míg „B” oldószernek acetonitril 0.1 %-os hangyasav keverékét alkalmaztuk. Az injektált anyagmennyiség 0.5 μg volt. A minták ionizációját pozitív elektropray módban végeztük CaptiveSpray nanoBooster ionforrással. A kapilláris feszültséget 1300 V-ra állítottuk, a nanoBooster nyomását 0.2 Barra, míg a szárító gáz hőmérséklete 150 °C volt 3 l/perc áramlási sebesség mellett. A külső tömegkalibrálást az Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornia, USA) alacsony koncentrációjú tömegkeverékének közvetlen bejuttatásával végeztük. A belső tömegkalibráláshoz nátrium-formiátot használtunk referenciaként. A tömegspektrumok felvétele 2.5 s fix ciklusidővel 150-2200-ig terjedő m/z tartományban 3 Hz sebességgel történt. Az ütközés-indukált disszociáció során az intenzív prekursorok esetén 16 Hz sebességgel, míg a kis intenzitású prekursorok esetén 4 Hz sebességgel történt a tandem tömegspektrometriás felvétel. Az egyszeresen töltött peptideket kizártuk az analízisből, kizárólag a többszörösen töltött peptidek kerültek fragmentálásra. Az ütköztetési energia beállítása automatikusan, a gyártó ajánlása szerint történt, figyelembe véve a prekursor m/z arányát és az ionok töltöttségi állapotát. Azon prekursorokat, melyekről tandem tömegspektrometriás felvétel készült, a következő 2 perc során kizártuk a kiválasztásból, kivéve, ha a prekursor szintje háromszorosra emelkedett. A nyers mérési adatokat Compass DataAnalysis 4.3 szoftverrel (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) kalibráltuk újra.

Fehérjeazonosítás

A fehérjéket a humán Swiss-Prot adatbázisból (2015. májusi frissítés) azonosítottuk a 2.5-ös verziójú Mascot kereső motor (Matrix Science, London, Egyesült Királyság) segítségével az alábbi paraméterek szerint: 7 ppm peptidtömeg tolerancia, 0.05 Da fragment tömeg tolerancia, két kihagyott hasítási hely, ciszteinek karbamidometilációja mint fix módosulás, deamidáció, oxidáció mint változó módosulás. A fehérjék azonosítása 1%-os téves találati arány mellett történt. Jelölés-mentes félkvantitatív mennyiségi meghatározásra a 1.5.3.30-as verziójú MaxQuant szoftvert használtuk alapértelmezett paraméterekkel. MaxQuant analízisnek csak azon fehérjéket vetettük alá, amelyeket előzőleg Mascot-tal azonosítottunk.

Statisztikai és bioinformatikai analízis

Az így nyert adatokat diszkriminancia analízisnek, valamint páros t-próba tesztnek vetettük alá a fenotípusosan tumoros és normál szövetet leginkább jellemző fehérjék azonosítására. Bioinformatikai analízis céljára az Ingenuity Pathway Analysis szoftvert használtuk (www.ingenuity.com, Mountain View, Kalifornia, USA), ennek segítségével térképeztük fel az általunk azonosított fehérjék bármely ismert jelátviteli folyamatban elfoglalt helyét és egymással való esetleges kapcsolatukat.

IV. EREDMÉNYEK

A jelölés nélküli proteomikai módszerrel összesen 1164 proteint detektáltunk legalább 2 egyedi peptidet alapul véve.

A diszkriminancia analízis révén a tumoros és nem tumoros csoportra jellemzően 18 fehérjét azonosítottunk.

A páros t-próba teszt segítségével esetleges statisztikailag szignifikáns különbség meglétét vizsgáltuk az összetartozó tumoros-nem tumoros mintapárok között ezen 18 protein tekintetében. A p értéket 0.1-nek határoztuk meg, figyelembe véve az összetartozó tumoros-nem tumoros mintapárok alacsony számát ($n=16$).

Mindezek eredményeként az alábbi 8 fehérje mutatott szignifikánsan magasabb szintet a tumoros szövetben:

- Tenascín-C (TNC)
- Transzmembrán emp24 domént tartalmazó fehérje 2 (TMED2)
- Citoplazmatikus dinein könnyű lánc 1 (DYNLL1)
- Koaktozin-szerű fehérje (COTL1)
- Kis prolinban gazdag fehérje 2D (SPRR2D)
- Nukleolin (NCL)
- U5 kis nukleáris ribonukleoprotein 200 kDa helikáz (SNRNP200)
- Zsíros aldehyd dehidrogenáz 3A2 (ALDH3A2)

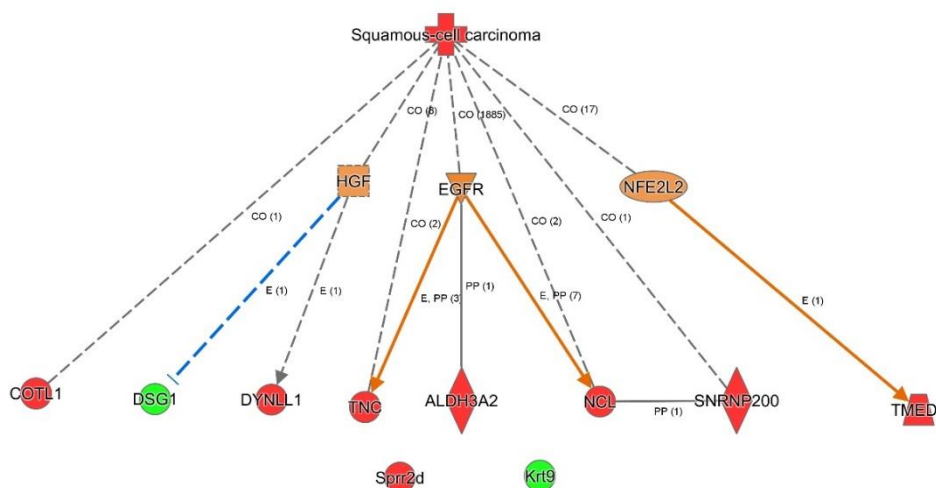
Két fehérje bizonyult emelkedettnek a tumor melletti fenotípusosan ép szövetben:

- Dezoglein-1 (DSG1) és az
- I-es típusú citoskeletális keratin 9 (KRT9 vagy K1C9)

A bioinformatikai analízis nem talált kapcsolatot az azonosított fehérjék között, viszont 6 interakciót térképeztünk fel 6 általunk azonosított fehérje (ALDH3A2, DSG1, DYNLL1, NCL, TMED2, TNC) és 3 ismert molekula (epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), hepatocita növekedési faktor (HGF), és nukleáris faktor eritroid 2- szerű 2 faktor (NFE2L2)) között. Az általunk azonosított proteinek ismert jelátviteli utakban való láthatóvá tétele révén számos esetleges jövőbeli diagnosztikai és terápiás felhasználás vizionálására is kísérletet tettünk.

A talált fehérjék között IPA-val azonosított interakciók (CO: korreláció; PP: fehérje-fehérje kötés; E: expresszió)

New My Pathway 1



© 2000-2018 QIAGEN. All rights reserved.

V. MEGBESZÉLÉS

A molekuláris diagnosztika területén zajló folyamatos technikai fejlődés ellenére a tumormarker kutatás jelenleg is nagy kihívást jelent. Az utóbbi években az érdeklődés fokozatosan a proteomika felé irányult, mely azon megfigyelést helyezi előtérbe, hogy a tumor által termelt proteinek és poszttranszlációs módosulásaik legalább annyira fontosak mint a tumor genetikája.

A FFPÁ szövetminták vizsgálata a FNYLHK-kra vonatkozóan kevésbé elterjedt. A FFPÁ szövetek proteomikai analízisével foglalkozó közlemények között elenyészően találunk említést FNYLHK-kra vonatkozóan. Kezdetben a szolid tumorok proteomikai analízise kizárólag gyorsfagyasztott szövetmintákon valósulhatott meg, mely mind idő, mind térbeli logisztikai nehézségekkel jár. Ezt kiküszöbölendő, és a FFPÁ szövetminták széles rendelkezésre állásból adódóan érhetően megnövekedett az utóbbiak vizsgálata iránti igény, ezért döntött kutatócsoportunk is ezen minták vizsgálata mellett.

A kutatás során azonosított fehérjék eltérő módon befolyásolják a tumor mikrokörnyezetét. A tumorban szignifikánsan overexpresszálnak bizonyult proteinek (TNC, TMED2, DYNLL1, COTL1, NCL, SPRR2D, SNRNP200, ALDH3A2) a tumorsejtek proliferációjának, migrációjának és inváziójának irányában hatnak. A fenotípusosan ép szövetben overexpresszált két fehérje (DSG1, KRT9) a szöveti mikrokörnyezet stabilizálásában és a sejtek adhéziójában játszanak szerepet.

A FNYLHK-ban, így a GALHK-ban is overexpresszált proteinekre ígéretes terápiás célpontokként tekinthetünk. Ezen fehérjék gátlása a tumorsejt proliferáció, migráció és szöveti invázió csökkentése révén új antitest alapú fej-nyak onkológiai kezelések előtt nyithat utat.

Kutatásunk limitációi

Az SPRR2D-re és K1C9-re vonatkozóan nem találtunk adatot az IPA adatbázisban. Ez feltehetően a két fehérje és a laphámkarcinómák közötti kapcsolatra vonatkozó adatok IPA adatbázisbeli hiányára vezethető vissza. Az adatbázisban tárolt adatok bővülése a kérdéses fehérjék tekintetében vélhetően új interakciókra világíthat rá a közeljövőben. Tanulmányunk első olvasatra relatíve mérsékelt számú minta vizsgálatán alapult, azonban fontos leszögezni, hogy elsődleges célunk egy kísérleti jellegű kutatás folytatása volt, mellyel a tumoros és a

tumort övező fenotípusosan egészséges szövet közötti fehérjeösszetétel különbségeket kívántuk megvizsgálni GALHK-ban.

Kutatásunk hozadéka

Fontosnak tartjuk hangsúlyozni, hogy - ellentétben MS-án alapuló korábbi kutatásokkal – a szövetek közötti fehérjesűrűség különbségeket kizárólag FFPÁ GALHK szövetmintákon vizsgáltuk jelölés nélküli LC/MS proteomikai módszerrel. A FFPÁ mintákon történő kvantitatív LC/MS vizsgálati módszer régóta vita tárgyát képezi. Ellenzői a formalin által előidézett keresztkötéseket és melléktermékeket hozzák fel a módszer ellenérveként. Azonban az extrakciós eljárások fejlődésének köszönhetően a FFPÁ szövetmintákból történő proteinkinyerés megbízhatósága és diagnosztikai pontossága a friss fagyasztott szövetmintákéval megegyező. Továbbá az LC/MS módszer FFPÁ szövetmintákon való alkalmazása szintén egyenértékűnek mutatkozott a friss fagyasztott mintákon végzett vizsgálatokkal. Emellett a jelölésmentes proteomikai eljárások számos előnnyel bírnak a jelöléses módszerekkel szemben. Egyfelől jelölés során az egyes mintaelőkészítési lépések mind magukban hordozzák a proteinvesztéséből fakadó adatvesztés lehetőségét. Másfelől egyes jelölési technikáknak előfeltétele bizonyos molekuláris alkotóelemek megléte (pl. cisztein tartalmú peptidek).

Kezdeti biztató eredményeinken túl jelen tanulmány klinikailag releváns aspektusokkal is bír. Amellett, hogy sikerült a GALHK-k és a szomszédos, fenotípusosan ép szövet közötti proteomikai különbségekre rávilágítanunk, olyan markerként és targetként esetlegesen szóba jövő fehérjéket azonosítottunk GALHK-ban, melyek eddig nem voltak az érdeklődés előterében. Ezen túlmenően a FFPÁ mintákon történő jelölésmentes LC/MS megbízhatósága lehetővé teszi már meglévő szövettani minták vizsgálatát is. Gondolatmenetünk alapján a gazdag szövettani archívumok ezirányú széleskörű bevonása jelentősen hozzájárulhatna a jövőbeni tumormarker kutatáshoz, emellett szükségtelenné tenné a költséges és időigényes friss fagyasztásos eljárást.

Jövőbeni törekvéseink

Proteomikai méréseink időpontjában sajnálatosan még nem álltak széles körben rendelkezésre az azonosított fehérjék verifikálására alkalmas monoklonális antitestek. A jövőben ezen

antitestek birtokában lehetőségünk nyílna a tanulmányozott fehérjék szöveten belüli eloszlásának tanulmányozására, mely esetlegesen segíthetne közelebb kerülni a tumorszövet és az azt körülvevő stroma interakciójának megértéséhez.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A FNYLHK-kra jellemző potenciális biomarkerek felfedezése amellet, hogy alapvető fontosságú, legalább annyira kihívást jelent még napjainkban is. A folyamatosan finomodó technikai háttér a proteomika és ezzel együtt a MS rohamos fejlődéséhez is hozzájárult. A műszeres háttér és a kiforrott mintaelőkészítési eljárások birtokában komplex vegyületek, szövetminták elemzése is lehetővé vált. A MS alkalmazása magától értetődően a tumormarker kutatást sem hagyta érintetlenül. Más daganattípusokhoz hasonlóan a FNYLHK-ra jellemző fehérjék azonosítása is elérhető közelségbe került. A tumorra jellemző biomarkerek megismerése kulcsfontosságú a korai felismerésben. A biomarkerek nem csupán szűrővizsgálati jelleggel bírnak, a tumorkiújulás felismerésében és a kezelésre adott válasz megítélésében is lényeges szerepet játszanak. A GALHK-ra jellemző fehérjék azonosításával mi is egy további lépést kívántunk tenni a tumormarker kutatásban. Emellet az FFPÁ szövetmintákon általunk történő jelölésmentes LC/MS módszer ígéretes eljárásnak tűnik a GALHK-kra jellemző potenciális biomarkerek kutatásában.

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt a kutatásban résztvevő 16 önkéntes betegünknek tartozom köszönettel, hogy hozzájárulásukkal a betegségükkel folytatott küzdelem ellenére is készséggel hozzájárultak jelen kutatás végigviteléhez.

Emellet szeretnék köszönetet mondani Dr. Márk László és Dr. Lujber László témavezetőimnek szakmai támogatásukért és tudományos munkámmal kapcsolatban tett értékes észrevételeikért. Hálával tartozom Dr. Turiák Lillának és Dr. Ács Andrásnak az MTA TTK Tömegspektrometriai Kutatócsoport részéről nyújtott önzetlen segítségéért és áldozatos munkájáért, melynek révén megvalósulhatott a szövetminták tömegspektrometriai vizsgálata. Köszönetemet szeretném kifejezni Kőnigné Péter Anikó és Hegedűs Zoltán felé a statisztikai és bioinformatikai

analízisben nyújtott erőfeszítéseikért. A hisztopatológiai háttér munka biztosításáért Professzor Dr. Tornóczki Tamást és Kneif Józsefnét szeretném köszönettel illetni. Továbbá köszönettel tartozom Professzor Dr. Gerlinger Imre volt és Dr. Szanyi István jelenlegi klinika-igazgatónak, hogy lehetővé tették számomra PhD munkám folytatását. Végül, de nem utolsósorban köszönetet szeretnék mondani Feleségemnek és Gyermekeimnek, hogy nélkülözni tudtak jelen kutatás véghezvitele érdekében.

VIII. IRODALOMJEGYZÉK

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 71:209-249.
2. Johnson D E, Burtneß B, Leemans C R, Lui V W Y, Bauman J E, Grandis JR (2020) Head and neck squamous cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers 26:92.
3. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C et al (2009) Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18:541-50.
4. Chang JS, Lo HI, Wong TY, Huang CC, Lee WT, Tsai ST et al (2013) Investigating the association between oral hygiene and head and neck cancer. Oral Oncol 49:1010-7.
5. Li WQ, Park Y, Wu JW, Goldstein AM, Taylor PR, Hollenbeck AR et al (2014) Index-based dietary patterns and risk of head and neck cancer in a large prospective study. Am J Clin Nutr 99:559-66.
6. Choi SH, Terrell JE, Fowler KE, McLean SA, Ghanem T, Wolf GT et al (2016) Socioeconomic and Other Demographic Disparities Predicting Survival among Head and Neck Cancer Patients. PLoS One 11:e0149886.
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. Marur S, Forastiere AA (2008) Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc 83:489-501.

9. Marur S, D'Souza G, Westra WH (2010) HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 11: 781-9.
10. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S et al (2013) Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *J Clin Oncol* 31:4550-4559.
11. Cohen N, Fedewa S, Chen AY (2018) Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 30:381-395.
12. O'Malley BW Jr, Weinstein GS, Snyder W, Hockstein NG (2006) Transoral robotic surgery (TORS) for base of tongue neoplasms. *Laryngoscope* 116:1465-72.
13. Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T et al (2018) Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 393:51-60.
14. Fujiwara T, Eguchi T, Sogawa C, Ono K, Murakami J, Ibaragi S et al (2018) Carcinogenic epithelial-mesenchymal transition initiated by oral cancer exosomes is inhibited by anti-EGFR antibody cetuximab. *Oral Oncol* 86:251-257.
15. Burtneiss B, Rischin D, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G Jr et al (2022) Pembrolizumab Alone or With Chemotherapy for Recurrent/Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in KEYNOTE-048: Subgroup Analysis by Programmed Death Ligand-1 Combined Positive Score. *J Clin Oncol* 40:2321-2332.
16. McBride S, Sherman E, Tsai CJ, Baxi S, Aghalar J, Eng J et al (2021) Randomized Phase II Trial of Nivolumab With Stereotactic Body Radiotherapy Versus Nivolumab Alone in Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 39:30-37.
17. Wang X, Eisbruch A (2016) IMRT for head and neck cancer: reducing xerostomia and dysphagia. *J Radiat Res* 57(Suppl 1):i69-i75.
18. Li XB, Krishnamurti U, Bhattarai S, Klimov S, Reid MD, O'Regan R et al (2016) Biomarkers Predicting Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Am J Clin Pathol* 145:871-8.
19. Tokodai K, Narimatsu H, Nishida A, Takaya K, Hara Y, Kawagishi N et al (2016). Risk factors for recurrence in stage II/III colorectal cancer patients treated with curative surgery: The impact of postoperative tumor markers and an infiltrative growth pattern. *J Surg Oncol* 114:368-74.

20. Stauber J, MacAleese L, Franck J, Claude E, Snel M, Kaletas BK et al (2010) On-tissue protein identification and imaging by MALDI-ion mobility mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 21:338-347.
21. Erich K, Reinle K, Müller T, Munteanu B, Sammour DA, Hinsenkamp I et al (2019) Spatial distribution of endogenous tissue protease activity in gastric carcinoma mapped by MALDI mass spectrometry imaging. *Mol Cell Proteomics* 18:151-161.
22. Chaurand P, Stoeckli M, Caprioli RM (1999) Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.* 71:5263-70.
23. Chaurand P, Schwartz SA, Billheimer D, Xu BGJ, Crecelius A, Caprioli RM (2004) Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76:1145-55.
24. Tanaka K, Hiroaki W, Yutaka I, Satoshi A, Yoshikazu Yoshida, Tamio Yoshida, Matsuo T. (1988). "Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2 (8): 151-153.
25. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. (1985). "Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules". *Anal. Chem.* 57: 2935-9.
26. Schäfer KC, Dénes J, Albrecht K, Szaniszló T, Balog J, Skoumal R et al (2009) In vivo, in situ tissue analysis using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl.* 48:8240-2.
27. Balog J, Sasi-Szabó L, Kinross J, Lewis MR, Muirhead LJ, Veselkov K et al (2013) Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Sci Transl Med.* 5:194ra93.
28. Marchione DM, Garcia BA, Wojcik J (2018) Proteomic approaches for cancer epigenetics research. *Expert Rev Proteomics* 27:1-15.
29. Cillero-Pastor B, Eijkel GB, Blanco FJ, Heeren RM (2015) Protein classification and distribution in osteoarthritic human synovial tissue by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. *Anal Bioanal Chem* 407:2213-22.
30. Kaneva IN, Longworth J, Sudbery PE, Dickman MJ (2018) Quantitative proteomic analysis in *Candida albicans* using SILAC-based mass spectrometry. *Proteomics* 8:e1700278.
31. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A et al (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1:376-86.

32. Yang C, Xu L, Zhang N, Islam F, Song W, Hu L et al (2017) iTRAQ-based proteomics of sunflower cultivars differing in resistance to parasitic weed *Orobancha cumana*. *Proteomics* <https://doi.org/10.1002/pmic.201700009>
33. Ralhan R, Desouza LV, Matta A, Tripathi SC, Ghanny S, Datta Gupta S et al (2008) Discovery and verification of head-and-neck cancer biomarkers by differential protein expression analysis using iTRAQ labeling, multidimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 7:1162-73.
34. Chelius D, Bondarenko PV (2002) Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Proteome Res* 1:317-323.
35. Pang M, Bai XY, Li Y, Bai JZ, Yuan LR, Ren SA et al (2016) Label-free LC-MS/MS shotgun proteomics to investigate the anti-inflammatory effect of rCC16. *Mol Med Rep* 14:4496-4504.
36. Fowler CB, O' Leary TJ, Mason JT et al (2013) Toward improving the proteomic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Expert Rev Proteomics* 10:389-400.
37. Shi S-R, Liu C, Balgley BM, Lee C, Taylor CR (2006) Protein extraction from formalin fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry. *J Histochem Cytochem* 54:739-743.
38. Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotech* 26:1367-1372.
39. De Wever O, Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200:429-47.
40. Hanahan D, Coussens LM (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21:309-22.
41. Wolff C, Schott C, Porschewski P, Reischauer B, Becker KF (2011) Successful protein extraction from over-fixed and long-term stored formalin-fixed tissues. *PLoS One* 31:e16353.
42. Groseclose MR, Massion PP, Chaurand P, Caprioli RM (2008) High-Throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. *Proteomics* 8:3715-3724.
43. Casadonte R, Caprioli RM (2011) Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. *Nat Protoc* 6:1695-1709.
44. Morita Y, Ikegami K, Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Tanaka H et al (2010) Imaging mass spectrometry of gastric carcinoma in formalin-fixed paraffinembedded tissue microarray. *Cancer Sci* 101:267-273.

45. Addis MF, Tanca A, Pagnozzi D, Rocca S, Uzzau S (2009) 2-D PAGE and MS analysis of proteins from formalin-fixed, paraffinembedded tissues. *Proteomics* 9:4329-4339.
46. Paulo JA, Lee LS, Banks PA, Steen H, Conwell DL (2012) Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded pancreatic tissue using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Pancreas* 41:175-185.
47. Azimzadeh O, Atkinson MJ, Tapio S (2021) Quantitative Proteomic Analysis Using Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Human Cardiac Tissue. *Methods Mol Biol.* 2261:525-533.
48. Xiao Z, Li G, Chen Y, Li M, Peng F, Li C et al (2010) Quantitative proteomic analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded nasopharyngeal carcinoma using iTRAQ labeling, two-dimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *J Histochem Cytochem* 58:517-527.
49. Patel V, Hood BL, Molinolo AA, Lee NH, Conrads TP, Braisted JC et al (2008) Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. *Clin Cancer Res* 14:1002-1014.
50. Hoffmann F, Umbreit C, Krüger T, Pelzel D, Ernst G, Kniemeyer O et al (2019) Identification of Proteomic Markers in Head and Neck Cancer Using MALDI-MS Imaging, LC-MS/MS, and Immunohistochemistry. *Proteomics Clin Appl.* 13:e1700173.
51. Huang W, Chiquet-Ehrismann R, Moyano JV, Garcia-Pardo A, Orend G (2001) Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res* 61:8586-8594.
52. Chiquet-Ehrismann R (2004) Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36:986-90.
53. Ishiwata T, Takahashi K, Shimanuki Y, Ohashi R, Cui R, Takahashi F et al (2005) Serum tenascin-C as a potential predictive marker of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 25:489-495.
54. Saito Y, Shiota Y, Nishisaka M, Owaki T, Shimamura M, Fukai F (2008) Inhibition of angiogenesis by a tenascin-c peptide which is capable of activating beta1-integrins. *Biol Pharm Bull* 31:1003-1007.
55. Tanaka K, Hiraiwa N, Hashimoto H, Yamazaki Y, Kusakabe M (2004) Tenascin-C regulates angiogenesis in tumor through the regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer* 108:31-40 17.
56. Schenk S, Chiquet-Ehrismann R, Bategay EJ (1999) The fibrinogen globe of tenascin-C promotes basic fibroblast growth factor-induced endothelial cell elongation. *Mol Biol Cell* 10:2933-2943.

57. Zagzag D, Shiff B, Jallo GI, Greco MA, Blanco C, Cohen H et al (2002) Tenascin-C promotes microvascular cell migration and phosphorylation of focal adhesion kinase. *Cancer Res* 62:2660-2668.
58. Nagaharu K, Zhang X, Yoshida T, Katoh D, Hanamura N, Kozuka Y et al (2011) Tenascin C induces epithelial-mesenchymal transition like change accompanied by SRCactivation and focal adhesion kinase phosphorylation in human breast cancer cells. *Am J Pathol* 178:754-63.
59. Wang Z, Han B, Zhang Z, Pan J, Xia H (2010) Expression of angiopoietin-like 4 and tenascin C but not cathepsin C mRNA predicts prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 15:39-46.
60. Yang ZT, Yeo SY, Yin YX, Lin ZH, Lee HM, Xuan YH et al (2016) Tenascin-C, a Prognostic Determinant of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* 11:e0145807.
61. Jansen MP, Foekens JA, van Staveren IL, Dirkzwager-Kiel MM, Ritstier K, Look MP et al (2005) Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. *J Clin Oncol* 23:732-40.
62. Berndt A, Richter P, Kosmehl H, Franz M (2015) Tenascin-C and carcinoma cell invasion in oral and urinary bladder cancer. *Cell Adh Migr* 9:105-11.
63. Booth C, Harnden P, Selby PJ, Southgate J (2012) Towards defining roles and relationships for tenascin-C and TGFbeta-1 in the normal and neoplastic urinary bladder. *J Pathol* 198:359-68.
64. San Martin R, Pathak R, Jain A, Jung SY, Hilsenbeck SG, Piña-Barba MC et al (2017) Tenascin-C and Integrin $\alpha 9$ Mediate Interactions of Prostate Cancer with the Bone Microenvironment. *Cancer Res* 77:5977-5988.
65. Kilian O, Dahse R, Alt V, Zardi L, Hentschel J, Schnettler R et al (2008) mRNA expression and protein distribution of fibronectin splice variants and high-molecular weight tenascin-C in different phases of human fracture healing. *Calcified tissue international* 83:101-11.
66. Zidar N, Gale N, Kambic V, Fischinger J (2001) Expression of tenascin and fibronectin in benign epithelial hyperplastic lesions and squamous carcinoma of the larynx. *Anticancer Res* 21:451-4.
67. Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Adány R (2000) Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Laryngoscope* 110:84-92.
68. Zakariyah A, Hou W, Slim R, Jerome-Majewska L (2012) TMED2/p24 β 1 is expressed in all gestational stages of human placentas and in choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 33:214-9.

69. Han J, Zhang M, Froese S, Dai FF, Robitaille M, Bhattacharjee A et al (2015) The Identification of Novel Protein-Protein Interactions in Liver that Affect Glucagon Receptor Activity. *PLoS One* 10:e0129226
70. Shi-Peng G, Chun-Lin C, Huan W, Fan-Liang M, Yong-Ning C, Ya-Di Z et al (2017) TMED2 promotes epithelial ovarian cancer growth. *Oncotarget* 8:94151-94165.
71. Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK et al (2009) miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck* 31: 642-654.
72. Sørensen BS, Horsman MR, Vorum H, Honoré B, Overgaard J, Alsner J (2009) Proteins upregulated by mild and severe hypoxia in squamous cell carcinomas in vitro identified by proteomics. *Radiother Oncol* 92:443-9.
73. Froidevaux-Klipfel L, Poirier F, Boursier C, Crépin R, Poüs C, Baudin B et al (2011) Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Proteomics* 11:3877-86.
74. den Hollander P, Kumar R (2006) Dynein light chain 1 contributes to cell cycle progression by increasing cyclin-dependent kinase 2 activity in estrogen-stimulated cells. *Cancer Res* 66:5941-9.
75. de Hostos EL, Bradtke B, Lottspeich F, Gerisch G (1993) Coactosin, a 17 kDa F-actin binding protein from Dictyostelium discoideum. *Cell Motil Cytoskeleton* 26:181-191.
76. Jeong HC, Kim GI, Cho SH, Lee KH, Ko JJ, Yang JH et al (2011) Proteomic analysis of human small cell lung cancer tissues: up-regulation of coactosin-likeprotein-1. *J Proteome Res* 10:269-76.
77. Hummerich L, Müller R, Hess J, Kokocinski F, Hahn M, Fürstenberger G et al (2006) Identification of novel tumour-associated genes differentially expressed in the process of squamous cell cancer development. *Oncogene* 25:111-21.
78. Xia L, Xiao X, Liu WL, Song Y, Liu TJJ, Li YJ et al (2018) Coactosin-like protein CLP/Cotl1 suppresses breast cancer growth through activation of IL-24/PERP and inhibition of non-canonical TGFβ signaling. *Oncogene* 37:323-331.
79. Vermeij WP, Backendorf C (2010) Skin cornification proteins provide global link between ROS detoxification and cell migration during wound healing. *PLoS One* 5:e11957.
80. Ampil FL (1985) The controversial role of radiotherapy in spindle cell carcinoma (pseudosarcoma) of the head and neck. *Radiat Med* 3:225-229.
81. Durham JS, Nash J, Rothery G, Dalby JE and Stell PM (1990) Anaplastic carcinoma presenting with cervical lymphadenopathy. *Clin Otolaryngol* 15:529-534.

82. Chuang R, Crowe DL (2007) Understanding genetic progression of squamous cell carcinoma to spindle cell carcinoma in a mouse model of head and neck cancer. *Int J Oncol* 30:1279-87.
83. Gao W, Chan JY, Wong TS (2014) Long Non-Coding RNA Deregulation in Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int* 2014:405860
84. Gao W, Chan JY, Wong TS (2014). Differential expression of long noncoding RNA in primary and recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014:404567.
85. Fang Z, Zhang S, Wang Y, Shen S, Wang F, Hao Y et al (2016) Long non-coding RNA MALAT-1 modulates metastatic potential of tongue squamous cell carcinomas partially through the regulation of small proline rich proteins. *BMC Cancer* 16:706
86. Ugrinova I, Monier K, Ivaldi C, Thiry M, Storck S, Mongelard F et al (2007) Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol Biol* 8:66:1-16.
87. Srivastava M, Pollard HB (1999) Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J* 13:1911-1922.
88. Watanabe T, Hirano K, Takahashi A, Yamaguchi K, Beppu M, Fujiki H et al (2009) Nucleolin on the cell surface as a new molecular target for gastric cancer treatment. *Biol Pharm Bull* 33:796-803.
89. Li L, Zhang Z, Wang C, Miao L, Zhang J, Wang J et al (2014) Quantitative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for laryngeal carcinoma. *PLoS One.* 9:e90181.
90. Benaglio P, McGee TL, Capelli LP, Harper S, Berson EL, Rivolta C (2011) Next generation sequencing of pooled samples reveals new SNRNP200 mutations associated with retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 32:e2246-58.
91. Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C (1998) Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 251:549-557.
92. Demozay D, Rocchi S, Mas JC, Grillo S, Pirola L, Chavey C et al (2004) Fatty aldehyde dehydrogenase: potential role in oxidative stress protection and regulation of its gene expression by insulin. *J Biol Chem* 279:6261-6270.
93. De Laurenzi V, Rogers GR, Hamrock DJ, Marekov LN, Steinert PM, Compton JG et al (1996) Sjögren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene. *Nat Genet* 12:52-7.
94. Saw YT, Yang J, Ng SK, Liu S, Singh S, Singh M et al (2012) Characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes in ovarian cancer tissues and sphere cultures. *BMC Cancer* 12:329.

95. Chi LM, Lee CW, Chang KP, Hao SP, Lee HM, Liang Y et al (2009) Enhanced Interferon Signaling Pathway in Oral Cancer Revealed by Quantitative Proteome Analysis of Microdissected Specimens Using $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ Labeling and Integrated Two-dimensional LC-ESI-MALDI Tandem MS. *Mol Cell Proteomics* 8:1453-1474.
96. Xiao N, Cao H, Chen CH, Kong CS, Ali R, Chan C et al (2013) A Novel Aldehyde Dehydrogenase-3 Activator (Alda-89) Protects Submandibular Gland Function from Irradiation without Accelerating Tumor Growth. *Clin Cancer Res* 19:4455-4464.
97. Long NP, Lee WJ, Huy NT, Lee SJ, Park JH, Kwon SW (2016) Novel Biomarker Candidates for Colorectal Cancer Metastasis: A Meta-analysis of In Vitro Studies *Cancer Inform* 15(Suppl 4):11-7.
98. Amagai M, Hashimoto T, Green KJ, Shimizu N, Nishikawa T (1995) Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 104:895-901.
99. Nagvekar S, Spadigam A, Dhupar A (2016) Determining the potential of desmoglein 3 as a sensitive and specific immunohistochemical marker for the detection of micrometastasis in patients with primary oral squamous cell carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn)* 20:374-380.
100. Huang CC, Lee TJ, Chang PH, Lee YS, Chuang CC, Jhang YJ et al (2010) Desmoglein 3 is overexpressed in inverted papilloma and squamous cell carcinoma of sinonasal cavity. *Laryngoscope* 120:26-9.
101. Chen YJ, Chang JT, Lee L, Wang HM, Liao CT, Chiu CC et al (2007) DSG3 is overexpressed in head neck cancer and is a potential molecular target for inhibition of oncogenesis. *Oncogene* 26:467-76.
102. Patel V, Martin D, Malhotra R, Marsh CA, Doçi CL, Veenstra TD et al (2013) DSG3 as a biomarker for the ultrasensitive detection of occult lymph node metastasis in oral cancer using nanostructured immunoarrays. *Oral Oncol* 49:93-101.
103. Trivedi S, Mattos J, Gooding W, Godfrey TE, Ferris RL (2013) Correlation of tumor marker expression with nodal disease burden in metastatic head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 149:261-8.
104. Khan K, Hardy R, Haq A, Ogunbiyi O, Morton D, Chidgey M (2006) Desmocollin switching in colorectal cancer. *Br J Cancer* 95:1367-70.
105. Teh MT, Parkinson EK, Thurlow JK, Liu F, Fortune F, Wan H (2011) A molecular study of desmosomes identifies a desmoglein isoform switch in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 40:67-76.

106. Chiang SY, Tsai ML, Wang CY, Chen A, Chou YC, Hsia CW et al (2012) Proteomic analysis and identification of aqueous humor proteins with a pathophysiological role in diabetic retinopathy. *J Proteomics* 75:2950-9.
107. Kang HS, Hong SN, Park HR, Kwon MJ, Lee JH, Kim JJ (2014) Proteomics analysis for *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Korean J Gastroenterol* 64:10-7.
108. Kolialexi A, Tsangaris GT, Sifakis S, Gourgiotis D, Katsafadou A, Lykoudi A et al (2017) Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset preeclampsia. *Expert Rev Proteomics* 14:269-276.
109. Vafadar-Isfahani B, Ball G, Coveney C, Lemetre C, Boocock D, Minthon L et al (2012) Identification of SPARC-like 1 Protein as Part of a Biomarker Panel for Alzheimer's Disease in Cerebrospinal Fluid. *J Alzheimers Dis* 28:625-636.
110. Yi W, Peng J, Zhang Y, Fu F, Zou Q, Tang Y (2013) Differential protein expressions in breast cancer between drug sensitive tissues and drug resistant tissues. *Gland Surg* 2:62-8.
111. Real FX, Vilá MR, Skoudy A, Ramaekers FC, Corominas JM (1993) Intermediate filaments as differentiation markers of exocrine pancreas. II. Expression of cytokeratins of complex and stratified epithelia in normal pancreas and in pancreas cancer. *Int J Cancer* 54:720-7.
112. Yang HY, Kwon J, Park HR, Kwon SO, Park YK, Kim HS et al (2012) Comparative proteomic analysis for the insoluble fractions of colorectal cancer patients. *J Proteomics* 75:3639-53.
113. Baker H, Patel V, Molinolo AA, Shillitoe EJ, Ensley JF, Yoo GH et al (2005) Proteome-wide analysis of head and neck squamous cell carcinomas using laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry. *Oral Oncol* 41:183-99.
114. Vidotto A, Polachini GM, de Paula-Silva M, Oliani SM, Henrique T, López RVM et al (2018) Differentially expressed proteins in positive versus negative HNSCC lymph nodes. *BMC Med Genomics* 11:73.
115. Peng X, Gong FM, Ren M, Ai P, Wu S, Tang J et al (2016) Proteomic analysis of docetaxel resistance in human nasopharyngeal carcinoma cells using the two-dimensional gel electrophoresis method. *Anticancer Drugs* 27:748-55.
116. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y et al (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236:313-22.
117. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K et al (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475:106-9.

118. Guan L, Nambiar DK, Cao H, Viswanathan V, Kwok S, Hui AB et al (2023) NFE2L2 Mutations Enhance Radioresistance in Head and Neck Cancer by Modulating Intratumoral Myeloid Cells. *Cancer Res* 83:861-874.
119. Wicker CA, Hunt BG, Krishnan S, Aziz K, Parajuli S, Palackdharry S et al (2021) Glutaminase inhibition with telaglenastat (CB-839) improves treatment response in combination with ionizing radiation in head and neck squamous cell carcinoma models. *Cancer Lett* 502:180-188.
120. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW (2003) Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 278:8135-45.
121. Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-12.
122. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R et al (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302.
123. Lemmon MA (2009) Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res* 315:638-48.
124. Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225.
125. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y (2004) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 903-913.
126. Swindle CS, Tran KT, Johnson TD, Banerjee P, Mayes AM, Griffith L et al (2001) Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J Cell Biol* 154:459-68.
127. Engel J (1989) EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett* 251:1-7.
128. Panayotou G, End P, Aumailley M, Timpl R, Engel J (1989) Domains of laminin with growth-factor activity. *Cell* 56:93-101.
129. Nelson J, Allen WE, Scott WN, Bailie JR, Walker B, McFerran NV et al (1995) Murine epidermal growth factor (EGF) fragment (33- 42) inhibits both EGF- and laminin-dependent endothelial cell motility and angiogenesis. *Cancer Res* 55:3772-3776.
130. Diersch S, Wirth M, Schneeweis C, Jörs S, Geisler F, Siveke JT et al (2016) Kras(G12D) induces EGFR-MYC cross signaling in murine primary pancreatic ductal epithelial cells. *Oncogene* 35:3880-6.
131. R (2008) Identification Di Segni A, Farin K, Pinkas-Kramarski of nucleolin as new ErbB receptors - interactingprotein. *PLoS One* 3:e2310.

132. Alaoui-Jamali MA, Song DJ, Benlimame N, Yen L, Deng X, Hernandez-Perez M et al (2003) Regulation of multiple tumor microenvironment markers by overexpression of single or paired combinations of ErbB receptors. *Cancer Res* 63:3764-74.
133. De Herdt MJ, Baatenburg De Jong RJ (2008) HGF and c-MET as potential orchestrators of invasive growth in head and neck squamous cell carcinoma. *Front Biosci* 13:2516-26.
134. Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Coccia E, Capogreco M, Colella G et al (2006) Effect of c-Met expression on survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 27:115-21.
135. Beilmann M, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P (2000) Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes. *Blood* 95:3964-9.
136. Pothula SP, Xu Z, Goldstein D, Biankin AV, Pirola RC, Wilson JS et al (2016) Hepatocyte growth factor inhibition: a novel therapeutic approach in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 114:269-80.
137. Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M (2001) Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20:8125-35.
138. Egloff AM, Grandis JR (2008) Targeting epidermal growth factor receptor and SRC pathways in head and neck cancer. *Semin Oncol* 35:286-97.
139. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, Drummond JA, Peng SA, Saade RE et al (2014) Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 20: 6582-6592.
140. Winzelberg GG, Greenstein R, Ferrucci JT Jr (1980) Retinitis pigmentosa and colon cancer: a previously unreported association. *Cancer* 45:2897-8.
141. Foerster S, Kacprowski T, Dhople VM, Hammer E, Herzog S, Saafan H et al (2013) Characterization of the EGFR interactome reveals associated protein complex networks and intracellular receptor dynamics. *Proteomics* 13:3131-44.
142. Salvetti A, Couté Y, Epstein A, Arata L, Kraut A, Navratil V et al (2016) Nuclear functions of nucleolin through global proteomics and interactomic approaches. *J Proteome Res* 15:1659-69.
143. Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HA, de Jong A et al (2004) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* 279:6235-6243.

144. Metz B, Kersten GF, Baart GJ, de Jong A, Meiring H, ten Hove J et al (2006) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin. *Bioconjug Chem* 17:815-822.
145. Turiák L, Shao C, Meng L, Khatri K, Leymarie N, Wang Q et al (2014) Workflow for combined proteomics and glycomics profiling from histological tissues. *Anal Chem* 86:9670-8.
146. Sprung RW Jr, Brock JW, Tanksley JP, Li M, Washington MK, Slebos RJ et al (2009) Equivalence of protein inventories obtained from formalin-fixed paraffin-embedded and frozen tissue in multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry shotgun proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 8:1988-1998.
147. Luk VN, Wheeler AR (2009) A digital microfluidic approach to proteomic sample processing. *Anal Chem* 81:4524-4530.
148. Zhou H, Ranish JA, Watts JD, Aebersold R (2002) Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 20:512-515.

FÜGGELÉK

Páros t-próba

(az összetartozó tumoros-ép szövetmintapárookra diszkriminanciaanalízis alapján legjellemzőbb 18 fehérje vonatkozásában)

		Relatív sűrűség	Standard	Standard	A különbség 95% -os konfidencia			Szabad-	Szignifikancia
		átlagértékek	deviáció	hibaátlag	alsó	felső	t-érték	ságfok	(p-érték)
1.pár	TENA_HUMAN ép – TENA_HUMAN tumoros	-2348325,00000	1371919,61000	396039,07810	-3220001,13400	-1476648,86600	-5,930	11	0,000
2.pár	TMED2_HUMAN ép – TMED2_HUMAN tumoros	-150133,33330	85444,86083	24665,80670	-204422,40780	-95844,25882	-6,087	11	0,000
3.pár	DYL1_HUMAN ép – DYL1_HUMAN tumoros	-183083,33330	326385,56630	94219,39728	-390458,82850	24292,16187	-1,943	11	0,078
4.pár	PSMD3_HUMAN ép – PSMD3_HUMAN tumoros	-53666,66667	145052,55060	41873,06456	-145828,66040	38495,32703	-1,282	11	0,226
5.pár	DCXR_HUMAN ép – DCXR_HUMAN tumoros	-35258,33333	123515,69980	35655,91127	-113736,46490	43219,79825	-0,989	11	0,344
6.pár	DSG1_HUMAN ép – DSG1_HUMAN tumoros	1390166,66700	2209880,78000	637937,63150	-13924,59339	2794257,92700	2,179	11	0,052
7.pár	COTL1_HUMAN ép – COTL1_HUMAN tumoros	-264333,33330	397229,34370	114670,23430	-516720,81730	-11945,84941	-2,305	11	0,042
8.pár	K1C9_HUMAN ép – K1C9_HUMAN tumoros	73326666,67000	97159973,93000	28047668,55000	11594164,41000	135059168,90000	2,614	11	0,024
9.pár	OSTF1_HUMAN ép – OSTF1_HUMAN tumoros	-21475,00000	81984,66736	23666,93488	-73565,57247	30615,57247	-0,907	11	0,384
10.pár	IF6_HUMAN ép – IF6_HUMAN tumoros	-3266,66667	193252,24370	55787,11746	-126053,28430	119519,95100	-0,059	11	0,954
11.pár	ACOC_HUMAN ép – ACOC_HUMAN tumoros	8716,66667	91136,93826	26308,96792	-49188,98130	66622,31463	0,331	11	0,747
12.pár	SPR2D_HUMAN ép – SPR2D_HUMAN tumoros	-103300,00000	134895,60270	38941,00627	-189008,57690	-17591,42307	-2,653	11	0,022
13.pár	NUCL_HUMAN ép – NUCL_HUMAN tumoros	-1271858,33300	1047332,64900	302338,89340	-1937301,75100	-606414,91570	-4,207	11	0,001
14.pár	TXNL1_HUMAN ép – TXNL1_HUMAN tumoros	-41316,66667	84232,22050	24315,74759	-94835,26627	12201,93293	-1,699	11	0,117
15.pár	U520_HUMAN ép – U520_HUMAN tumoros	-691750,00000	768104,41110	221732,64430	-1179780,26000	-203719,74050	-3,120	11	0,010
16.pár	UD17_HUMAN ép – UD17_HUMAN tumoros	-9275,00000	163882,95780	47308,93491	-113401,26370	94851,26367	-0,196	11	0,848
17.pár	AL3A2_HUMAN ép – AL3A2_HUMAN tumoros	-86083,33333	144985,55310	41853,72405	-178202,75890	6036,09220	-2,057	11	0,064
18.pár	TBB6_HUMAN ép – TBB6_HUMAN tumoros	-230333,33330	647338,93520	186870,65420	-641632,87020	180966,20350	-1,233	11	0,243

A pirosszínű kiemelés a tumorszövetben az ép szövethez képest szignifikánsan túlexpresszáladó fehérjéket jelöli (p érték < 0,1) .

A zöldszínű kiemelés a tumorszövetben az ép szövethez képest szignifikánsan alulexpresszáladófehérjéket jelöli (p érték < 0,1) .

FÜGGELÉK**Az azonosított proteinek listája**

A fehérjét kódoló gén jelölése	A kódolt protein azonosító száma	Mascot pontszám	Molekulasúly (kDa)	Szekvencia lefedettség (%)	Peptidszám*
TNC	TENA_HUMAN	354	240,7	8,3	13
TMED2	TMED2_HUMAN	59,1	22,7	12,2	3
DYNLL1	DYL1_HUMAN	82,3	8	21,6	5
COTL1	COTL1_HUMAN	72,7	15,9	5,4	3
SPRR2D	SPR2D_HUMAN	89,1	7,9	46,8	3
NCL	NUCL_HUMAN	316,2	76,6	17,9	11
SNRNP200	U520_HUMAN	51,5	244,4	1,3	2
ALDH3A2	AL3A2_HUMAN	64,6	54,8	7,9	3
DSG1	DSG1_HUMAN	175	113,7	6,9	5
KRT9	K1C9_HUMAN	1493,3	62	68,2	37

* átlagos peptidszám, mely alapján az egyes proteinek azonosításra kerültek

A pirosszínű kiemelés a tumorszövetben az ép szövethez képest szignifikánsan túlexpresszáldó fehérjéket jelöli (p érték < 0,1) .

A zöldszínű kiemelés a tumorszövetben az ép szövethez képest szignifikánsan alulexpresszáldó fehérjéket jelöli (p érték < 0,1) .

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Jelen PhD dolgozat témájához kapcsolódó elsőszerzős közlemény:

Burian A, Lujber L, Gerlinger I, Jarai T, Orosz E, Turiak L, Acs A, Hegedus Z, Peter AK, Tornoczki T, Gombos K, Mark L. Label-Free Semiquantitative Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Proteomics Analysis of Laryngeal/Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples - a Pilot Study. (*Pathol Oncol Res.* 26(4):2801-2807., 2020). **IF: 2,77**

Jelen PhD dolgozat témájához kapcsolódó társszerzős közlemény:

Jarai T, Maasz G, Burian A, Bona A, Jambor E, Gerlinger I, Mark L. Mass spectrometry-based salivary proteomics for the discovery of head and neck squamous cell carcinoma. (*Pathol Oncol Res.* 623-8., 18 (3), 2012) **IF: 2,06**

Schmidt J, Kajtar B, Juhasz K, Peter M, Járai T, Burian A, Kereskai L, Gerlinger I, Tornoczki T, Balogh G, Vigh L, Mark L, Balogi Zs. Lipid and protein tumor markers for head and neck squamous cell carcinoma identified by imaging mass spectrometry. (*Oncotarget.* 11(28):2702-2717., 2020) **IF: 3,34**

Jelen PhD dolgozat témájához nem kapcsolódó elsőszerzős közlemények:

Burián A, Járai T, Gerlinger I, Csobó D, Lujber L. Minimál invazív video-asszisztált thyreoidectomia (MIVAT) - kezdeti lépések a Pécsi Tudományegyetem Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinikán
(*Fül-, Orr-, Gégegyógyászat* 58 (2), 2012)

Burián A, Gerlinger I, Móricz P, Somogyvári , Lujber L. Varrógéppel asszisztált transoralis diverticulostomia kapcsán szerzett kezdeti tapasztalatok a PTE KK Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikán
(*Fül-, Orr-, Gégegyógyászat* 59 (4), 2013)

Burián A, Harmat K, Nepp N, Tóth I, Pap I, Gerlinger I. „Power stapes” - Új műtéti megoldás a stapesfixációhoz társuló közepes és nagyfokú kevert típusú halláscsökkenések kezelésében (*Fül-, Orr-, Gégegyógyászat* 64 (1), 2018)

Burian A, Gerlinger I, Toth T, Piski Z, Rath G, Bako P. Stapedotomy with incus vibroplasty - A novel surgical solution of advanced otosclerosis and its place among existing therapeutic modalities - Hungarian single institutional experiences.
(*Auris Nasus Larynx*, pii: S0385-8146(18)30318-3, 2019) **IF: 1,55**

Burian A, Smatanova K, Bocskai T, Giran J, Szanyi I. Impact of ipsilateral false vocal fold resection on swallowing following transoral laser cordectomies - A fiberoptic endoscopic evaluation of swallowing study.
(*Am J Otolaryngol.* 46(3):104622, 2025) **IF:1,78**

Jelen PhD dolgozat témájához nem kapcsolódó társszerzős közlemények:

Lujber L, Burian A. Giant nasal mass causing feeding difficulty in tuberous sclerosis
(*Otolaryngol Head Neck Surg.* 511-2., 145 (3), 2011) **IF: 3,135**

Szanyi I, Gerlinger I, Lujber L, Szabadi E, Burián A, Révész P, Ember I, Kiss I. Onkogén és tumorszuppresszor génexpresszió változások biológiai markerként való alkalmazása malignus fej-nyaki daganatokban
(*Fül-, Orr-, Gégegyógyászat* 57 (2), 2011)

Szanyi I, Somogyvári K, Burián A, Kiss I, Gerlinger I. Citokróm P450 1A1 és az uridin-difoszfát-glukuronoziltranszferáz 1A1 allél-polimorfizmusának hatása a malignus fej-nyaki daganatok kialakulásának kockázatára és prognózisára
(*Fül-, Orr-, Gégegyógyászat* 59 (4), 2013)

Revesz P, Piski Z, Burian A, Harmat K, Gerlinger I. Delayed facial paralysis following uneventful KTP laser stapedotomy: Two Case Reports and a Review of the Literature.
(*Case Rep Med.* 2014;2014:971362. Epub 2014 Nov 11) **IF:0,58**

Somogyvari K, Gerlinger I, Lujber L, Burian A, Moricz P. Radiofrequency transoral microsurgical procedures in benign and malignant laryngeal and hypopharyngeal lesions (Institutional experiences)

(The Scientific World Journal Paper 926319. 4 p., 2015) IF: 1,29

Lodder WL, Burian A, Gerlinger I, Dijkers FG, Halmos GB. De granulaire celtumor van de larynx – het belang van histopathologisch onderzoek van alle verwijderde laryngeale afwijkingen.

(Nederlands Tijdschrift voor Keel-Neus-Oorheelkunde 138-141, 21(3), 2015)

Piski Z, Gerlinger I, Nepp N, Revesz P, Burian A, Farkas K, Lujber L. Clinical benefits of polyurethane nasal packing in endoscopic sinus surgery

(Eur Arch Otorhinolaryngol., 1449-1454, 274(3) 2017) IF: 1,59

Orosz E, Gombos K, Petrevszky N, Csonka D, Haber I, Kaszas B, Toth A, Molnar K, Kalacs K, Piski Z, Gerlinger I, Burian A, Bellyei S, Szanyi I. Visualization of mucosal field in HPV positive and negative oropharyngeal squamous cell carcinomas: combined genomic and radiology based 3D model.

(Sci Rep. 8;10(1):40., 2020) IF: 4,08

Lujber L, Burián A, Böröczki G, Telegdy I, Fábián GA, Vincze Á. Új és olcsó modell a felső gasztrointesztinális endoszkópia és a perkután endoszkópos gasztrosztómia gyakorlására

(Fül -, Orr -, Gégegyógyászat 54 (3), 2008)

Gerlinger I, Révész P, Piski Z, Burian A, Móricz P. Eseménytelen lézer stapedotomiát követő késői nervus facialis paresis – esetismertetés és irodalmi áttekintés

(Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 57 (3), 2011)

Piski Z, Mózes R, Burián A, Révész P, Gerlinger I, Pytel J. Korral járó hallászavarok korai kimutatása

(Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 57 (3), 2011)

Móricz P, Somogyvári K, Burián A, Piski Z, Révész P, Gerlinger I. Hypertonicitás okozta aphonia megoldása myotomiával hangprotézis beültetése után

(Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 59 (2), 2013)

Piski Z, Büki A, Nepp N, Burián A, Révész P, Gerlinger. Nasocranialis fistulák zárása "káddugó" technikával és többbrétegű rekonstrukcióval

(Idegyógy Szemle. 211-6., 69(5-6), 2016) IF: 0,33

Bocskai T, Karádi K, Burián A, Kovács N, Bogár L, Lujber L. A narkózis hatása a kognitív funkciókra

(Idegyógyászati Szemle 69(7-8), 2016) IF: 0,33

Lujber L, Gerlinger I, Burián A. Az orrvérzés modern szemléletű ellátása

(Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 63 (4), 2017)

Pap I, Burián A, Szanyi I, Gerlinger I. Endoszkópos fülbészettel szerzett kezdeti tapasztalatok a PTE KK, Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinikán

(Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 64 (4), 2018)

Uzsaly J, Gerlinger I, Tornóczki T, Molnár K, Tóth A, Burián A. Rekurráló szájfenéki cisztát utánzó malignus szájüregi tumor - Esetismertetés és a szájfenéki submucosus folyamatok differenciáldiagnosztikája.

(Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 65 (3), 2019)

Jakab-Péter K, Gerlinger I, Smatanová K, Burián A. Fül-orr-gégészeti vezérfonal - Minimum ismeretanyag, amelyet minden orvosnak tudnia kell.

(Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 66 (2), 2020)

Jakab-Péter K, Gerlinger I, Burián A. A PET/CT helye a fej-nyaki tumorok kivizsgálásában.

(Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 66 (3), 2020)

Smatanová K, Burián A, Dršata J, Krtičková J, König-Péter A, Mejzlík J, Chrobok V. Comparison of Short and Long-Term Results after Injection Laryngoplasty with Radiesse® Voice and Thyroplasty Type I in Unilateral Vocal Fold Palsy.

(Acta Medica (Hradec Kralove) 66 (3), 2023) IF: 0,76

Szalenko-Tőkés Á, Tóbiás Z, Ambrus A, Burián A, Rovó L, Bach Á. Injekciós laryngoplastica alkalmazása féloldali hangajakbénulás esetén.

(Orvosi Hetilap 166 (26), 2025) IF: 0,73

Smatanová K., Szanyi I., Burián A. Kiterjedt fiatalkori visszatérő légúti papillomatosis műtéti megoldása optikai képkiemelés használatával – Esetismertetés és a szóba jövő terápiás lehetőségek áttekintése.

(Fül-, Orr-, Gégegyógyászat 70 (2), 2024)



Label-Free Semiquantitative Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Proteomics Analysis of Laryngeal/Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples - a Pilot Study

Andras Burian¹ · Laszlo Lujber¹ · Imre Gerlinger¹ · Tamas Jarai² · Eva Orosz¹ · Lilla Turiak³ · Andras Acs^{3,4} · Zoltan Hegedus^{5,6} · Aniko Konigne Peter⁷ · Tamas Tornoczki⁸ · Katalin Gombos⁹ · Laszlo Mark^{6,10}

Received: 25 July 2019 / Accepted: 11 June 2020 / Published online: 21 June 2020

© The Author(s) 2020

Abstract

Squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck region is the sixth most frequent malignancy with high mortality rate. Due to its poor prognosis it is considered a growing public health problem worldwide inspite of existing treatment modalities. Thus, early diagnosis of new diseases and recurrences is emerging on one hand, but on the other hand troublesome in the lack of reliable tumor markers in this field. The rapid development of proteomics has opened new perspectives in tumor marker discovery. Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) as the gold standard in proteomics enables the semi-quantitative analysis of proteins within various tissues. Abundance differences between tumor and normal tissue also can be interpreted as tumor specific changes. The aim of this study was to identify potential tumor markers of laryngeal/hypopharyngeal SCC by revealing abundance changes between cancerous and the surrounding phenotypically healthy tissue. After separating the phenotypically cancerous and healthy parts of formalin-fixed paraffin-embedded tissues, each sample underwent protein recovery process and tryptic digestion for label-free semi-quantitative LC/MS analysis. Eight proteins showed significantly higher abundance in tumor including tenascin, transmembrane emp24 domain-containing protein 2, cytoplasmic dynein light chain 1, coactosin-like protein, small proline-rich protein 2D, nucleolin, U5 small nuclear RNP 200-kDa helicase and fatty aldehyde dehydrogenase. Desmoglein-1 and keratin type I cytoskeletal 9 were down-regulated in tumor. Using Ingenuity Pathway Analysis we mapped the signaling pathways these proteins play role in regarding other tumors. Based on these findings these proteins may serve as promising biomarkers in the fight against laryngeal/hypopharyngeal SCCs.

Keywords Biomarker discovery · Laryngeal cancer · LC/MS · Squamous cell carcinoma · Proteomics

✉ Laszlo Mark
laszlo.mark@aok.pte.hu

¹ Clinical Centre, Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, University of Pecs, Munkacsy M Str 2, Pecs H-7621, Hungary

² Tolna County Balassa Janos Hospital, Beri Balogh Adam Str 5-7, Szekszard H-7100, Hungary

³ MS Proteomics Research Group, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Magyar tudosok Blvd 2, Budapest H-1117, Hungary

⁴ Ph.D. School of Pharmaceutical Sciences, Semmelweis University, Ulloi Str 26, Budapest H-1085, Hungary

⁵ Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Temesvari Blvd 62, Szeged H-6726, Hungary

⁶ Medical School, Institute of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs, Szigeti Str 12, Pecs H-7624, Hungary

⁷ Medical School, Institute of Bioanalysis, University of Pecs, Honved Str 1, Pecs H-7624, Hungary

⁸ Medical School, Institute of Pathology, University of Pecs, Szigeti Str 12, Pecs H-7624, Hungary

⁹ Clinical Centre, Department of Laboratory Medicine, University of Pecs, Ifjusag Str 13, Pecs H-7624, Hungary

¹⁰ MTA-PTE Human Reproduction Research Group, Edesanyak str. 1, Pecs H-7624, Hungary

Introduction

Head neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the 6th most frequent malignancy [1] related with nicotine and alcohol abuse [2]. Its incidence is three-fold higher in males. Due to the aspecific symptoms most HNSCCs are diagnosed with advanced stage indicating growing public health problem worldwide. The low 5-year overall survival rate has not changed significantly in the past decade despite surgical and oncological innovations [3].

Thus, early diagnosis and better understanding of tumor behavior is essential. HNSCCs probably produce several proteins that could be utilized as tumormarkers. In possession of reliable markers not only screening and early recognition, but early detection of recurrence could be achieved. In addition, some markers may serve as promising targets for biological therapies.

Due to rapid proteomics development, a new way has opened in biomarker discovery. Beside evaluating epigenetic modifications, on-tissue protein distribution investigation and protein imaging also became available [4]. As potential biomarkers are mostly unknown, labeling can not be used in discovery contrary to label-free semiquantitative methods. Without labeling, intensity of distinct peptides appropriately follows their abundance changes. Nevertheless, label-free methods are more cost-efficient. LC/MS possesses these advantages. Its high throughput feature also makes it powerful in protein discovery. Initially, proteomic analysis of solid tumors with mass spectrometry (MS) was available only on fresh frozen samples. Therefore, growing demand for analysis of formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue samples appeared. Development of tissue preparation protocols enabled the elimination of formaldehyde induced protein cross-linkings disturbing MS. Overcoming this formerly limiting factor, an invaluable perspective has opened in retrograd analysis due to broad histological sample archives used in daily clinical practice.

The present study aims to investigate protein abundance differences between laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinoma (LHSCC) and phenotypically normal tissue on FFPE samples to identify potential tumor markers. Furthermore, based on the literature and Ingenuity Pathway Analysis (IPA), we aim to map the pathways these proteins take part in other malignant tumors in order to evaluate them as possible candidates for target therapy of HNSCCs in the future.

Material and Methods

Patients

Sixteen consenting patients (16 males, median age 61 yrs., range from 45 yrs. to 79 yrs) diagnosed with LHSCC were enrolled. Heavy smoking and regular alcohol consumption were reported in all cases. All tumors were advanced primary

cases (stage III-IV.A). Exclusion criteria included non-SCC histology, HPV positivity, previous oncological treatment and recurrence or second primary tumor.

Method

Clinical examination included biopsy from all tumors for diagnosis prior to treatment. Biopsy samples were fixed in formalin followed by paraffin-embedding, sectioning and hematoxylin-eosin (HE) staining. Histological examination confirmed HNSCC in all cases.

For research purposes, all corresponding paraffin-embedded tissue blocks were retrieved and further sections (15 μ m thickness) were made from original blocks and placed to conventional histological plate without staining. In addition, another HE stained section (7 μ m thickness) was made from blocks with one obvious malignant field marked by the pathologist on the contralateral side of the plate. Based on this marking, identical part of each plate containing unstained paraffin-fixed section was drawn around in the same way. Deparaffinization was performed by washing the unstained slides with xylol, ethanol 90% (m/m), ethanol 70% (m/m), ethanol 50% (m/m) and 50 mM ammonium-bicarbonate, respectively. Antigen retrieval was performed with 100 mM Tris-HCl buffer (97 °C, 30 min). According to the marked field lining histologically obvious malignant part, the tissue was microdissected with a fine needle and collected to 2 ml Eppendorf tube containing SDS lysis buffer. Tumor adjacent normal tissue was also microdissected and each sample was incubated in the lysis buffer (97 °C, 30 min). After centrifugation ice cold absolute ethanol was added to the supernatant with 9 volume surplus. Samples were kept at 4 °C overnight for protein precipitation. The pellet was washed twice with absolute ethanol, proteins were solubilized with 8 M urea. Reduction and alkylation were followed by overnight trypsin digestion. The resulting tryptic peptides were cleaned using Pierce C18 spin columns (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The MS used for analysis was a Bruker mAXIS II ETD Q-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) coupled to an Ultimate 3000 nanoRSLC system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Samples were injected on an Acclaim PepMap100 C-18 trap column (100 μ m $\times$ 20 mm, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) online coupled to an ACQUITY UPLC M-Class Peptide BEH C18 column (130 Å, 1.7 μ m, 75 μ m $\times$ 250 mm, Waters, Milford, MA, USA). Peptides were separated at 48 °C with a flow rate of 300 nl/min, 4% solvent B from 0 to 11 min, followed by a 120 min gradient to 50% solvent B. Solvent A consisted of water +0.1% formic acid, while Solvent B was acetonitrile +0.1% formic acid. The injected sample amount was 0.5 μ g. Sample ionization was achieved in the positive electrospray ionization mode via a CaptiveSpray nanoBooster ionsource. The capillary voltage was 1300 V, the nanoBooster pressure was 0.2 Bar, drying gas was 150 °C, the flow rate was 3 l/min. External mass calibration was done using the low concentration tuning mix

from Agilent technologies via direct infusion. Internal mass calibration was performed via lock mass for each run using sodium formate. The MS spectra were recorded with a fix cycle time (2.5 s) over the mass range of m/z 150–2200 at 3 Hz with a minimal precursor mass of m/z 322. The CID was performed at 16 Hz for abundant precursors and at 4 Hz for ones of low abundance. Singly charged peptides were excluded from analysis, only multiple charged peptides were chosen for fragmentation. Collision energy for precursor signals was set automatically followed by the manufacturer's recommendations based on the isolation m/z , isolation mass range width and ion charge state. Active exclusion of 2 min. After 1 spectra was used except if the intensity of the precursor was elevated threefold. For protein analysis raw data were recalibrated using the Compass DataAnalysis software 4.3 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Data were processed by the ProteinScape 3.0 software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Proteins were identified by searching against the human Swissprot database (2015_08) using the Mascot search engine version 2.5 (Matrix Science, London, UK) applying the following search parameters: 7 ppm peptide mass tolerance, 0.05 Da fragment mass tolerance, 2 missed cleavages, carbamidomethylation of cysteines as fixed modification, deamidation (NQ) and oxidation (M) as variable modifications and proteins were identified using 1% FDR limit. Label-free quantitation (LFQ) was then performed using MaxQuant (software version 1.5.3.30), applying default parameters. MaxQuant analysis searched only for proteins identified previously by Mascot. Each LC-MS/MS run was aligned using the "match between runs" feature (match time window 0.8 min, alignment time window 15 min). The acquired data underwent discriminant analysis and paired sample t-test searching for proteins most characteristically describing tumor and normal tissue. Bioinformatic analysis were performed by IPA software (Ingenuity Databases, Mountain View, CA, USA) to place identified proteins in known signalling pathways.

Results

1164 proteins were identified with at least 2 unique peptides among the samples. Discriminant analysis revealed 18 proteins describing either the tumor or normal tissue group. Paired sample t-test were used to test for statistical significance between each pair regarding these most descriptive 18 proteins (Table 1). The p value was determined 0,1 considering the low number of sample pairs of coherent tumor and normal tissue ($n = 16$). Thus, 8 proteins showed significantly higher density in tumor including tenascin (TNC), transmembrane emp24 domain-containing protein 2 (TMED2), dynein light chain 1, cytoplasmic (DYNLL1), coactosin-like protein (COTL1), small proline-rich protein 2D (SPRR2D), nucleolin (NCL), U5 small nuclear RNP 200-kDa helicase (SNRNP200) and fatty aldehyde dehydrogenase (ALDH3A2). Two proteins, desmoglein-1 (DSG1) and keratin

type I cytoskeletal 9 (KRT9) had significantly higher density in the adjacent phenotypically normal tissue. Data and physiological roles of identified proteins are demonstrated in Table 2.

Discussion

Despite rapid development of molecular diagnostics, tumormarker discovery is still challenging. In the past few years the interest of tumor research has gradually turned to proteomics highlighting the observation that secreted proteins are as important as tumor genetics. MS coupled with LC is considered as the „gold standard“ quantitative method in tumor protein research. Due to the continuously evolving technical background, growing effort on investigation of HNSCC proteome has also appeared. Initially, studies targeted in vitro cell lines. Analysis of solid tumor tissues opened new ways in tumormarker discovery, as these include the surrounding microenvironment also contributing to the malignant nature of HNSCCs [5]. MS-based protein analysis had been previously possible only on fresh frozen tissue samples with the necessity of organization steps including planned cryosection and coordination of sample preparation. These drawbacks can be overwhelmed by FFPE tissues utilizing deparaffination process [6]. Among existing papers reporting proteomic analysis on FFPE samples, only a few reports address HNSCC [7]. Discovering possible tumor markers can be achieved by finding proteins exclusively expressed by tumor tissue, but protein abundance differences between normal and tumor tissue can also be interpreted as a possible tumor marker. Our aim was to explore protein abundance differences between phenotypically normal and tumor tissue on FFPE laryngeal-hypopharyngeal tumor samples. To our knowledge no LC/MS based proteomic studies exist exclusively investigating LHSCC on FFPE samples.

We found eight and two proteins with significantly higher and lower abundance in LHSCC, respectively, compared to adjacent normal tissue (Table 2).

We foremost found TNC, DYNLL1, COTL1, SPRR2D, SNRNP200, TMED2 and ALDH3A2 abundant in LHSCC by LC/MS. Similar to our findings, one LC/MS study also found NCL levels elevated in LHSCC [8].

We first found DSG1 down-regulated in LHSCC with LC/MS, albeit rather isoform switch among desmogleins seems to be determining in tumor invasivity.

We identified K1C9 down-regulated. One possible explanation for down-regulation is the dedifferentiation. The other probable hypothesis in our opinion is the lack of detectable tryptic peptides of cytokeratins in peritumoral microenvironment due to non-tryptic digestion during invasion.

IPA found no connection between proteins, but we uncovered existing interactions being considered as possible targets for future therapies in LHSCCs (Fig. 1).

Table 1 Paired sample t-test (for the most descriptive 18 proteins of corresponding tumor-normal tissue samples)

	Paired Differences					t	df	Significance <i>p</i> value (2-tailed)	
	Mean value of relative density	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference					
				Lower	Upper				
Pair 1	TENA_HUMAN Normal – TENA_HUMAN Tumor	–2,348,325,00000	1,371,919,61,000	396,039,07810	–3,220,001,13,400	–1,476,648,86,600	–5930	11	0,000
Pair 2	TMED2_HUMAN Normal – TMED2_HUMAN Tumor	–150,133,33,330	85,444,86,083	24,665,80,670	–204,422,40,780	–95,844,25,882	–6087	11	0,000
Pair 3	DYL1_HUMAN Normal – DYL1_HUMAN Tumor	–183,083,33,330	326,385,56,630	94,219,39,728	–390,458,82,850	24,292,16,187	–1943	11	0,078
Pair 4	PSMD3_HUMAN Normal – PSMD3_HUMAN Tumor	–53,666,66,667	145,052,55,060	41,873,06456	–145,828,66,040	38,495,32,703	–1282	11	0,226
Pair 5	DCXR_HUMAN Normal – DCXR_HUMAN Tumor	–35,258,33,333	123,515,69,980	35,655,91,127	–113,736,46,490	43,219,79,825	–989	11	0,344
Pair 6	DSG1_HUMAN Normal – DSG1_HUMAN Tumor	1,390,166,66,700	2,209,880,78,000	637,937,63,150	–13,924,59,339	2,794,257,92,700	2179	11	0,052
Pair 7	COTL1_HUMAN Normal – COTL1_HUMAN Tumor	–264,333,33,330	397,229,34,370	114,670,23,430	–516,720,81,730	–11,945,84,941	–2305	11	0,042
Pair 8	KIC9_HUMAN Normal – KIC9_HUMAN Tumor	73,326,666,67,000	97,159,973,93,000	28,047,668,55,000	11,594,164,41,000	135,059,168,90,000	2614	11	0,024
Pair 9	OSTF1_HUMAN Normal – OSTF1_HUMAN Tumor	–21,475,00000	81,984,66,736	23,666,93,488	–73,565,57,247	30,615,57,247	–907	11	0,384
Pair 10	IF6_HUMAN Normal – IF6_HUMAN Tumor	–3266,66,667	193,252,24,370	55,787,11,746	–126,053,28,430	119,519,95,100	–059	11	0,954
Pair 11	ACOC_HUMAN Normal – ACOC_HUMAN Tumor	8716,66,667	91,136,93,826	26,308,96,792	–49,188,98,130	66,622,31,463	331	11	0,747
Pair 12	SPR2D_HUMAN Normal – SPR2D_HUMAN Tumor	–103,300,00000	134,895,60,270	38,941,00627	–189,008,57,690	–17,591,42,307	–2653	11	0,022
Pair 13	NUCL_HUMAN Normal – NUCL_HUMAN Tumor	–1,271,858,33,300	1,047,332,64,900	302,338,89,340	–1,937,301,75,100	–606,414,91,570	–4207	11	0,001
Pair 14	TXNL1_HUMAN Normal – TXNL1_HUMAN Tumor	–41,316,66,667	84,232,22,050	24,315,74,759	–94,835,26,627	12,201,93,293	–1699	11	0,117
Pair 15	U520_HUMAN Normal – U520_HUMAN Tumor	–691,750,00000	768,104,41,110	221,732,64,430	–1,179,780,26,000	–203,719,74,050	–3120	11	0,010
Pair 16	UD17_HUMAN Normal – UD17_HUMAN Tumor	–9275,00000	163,882,95,780	47,308,93,491	–113,401,26,370	94,851,26,367	–196	11	0,848
Pair 17	AL3A2_HUMAN Normal – AL3A2_HUMAN Tumor	–86,083,33,333	144,985,55,310	41,853,72,405	–178,202,75,890	6036,09220	–2057	11	0,064
Pair 18	TBB6_HUMAN Normal – TBB6_HUMAN Tumor	–230,333,33,330	647,338,93,520	186,870,65,420	–641,632,87,020	180,966,20,350	–1233	11	0,243

Boldface entries under “Significance *p* value (2-tailed)” indicate proteins significantly overexpressed in tumor tissue comparing to the adjacent phenotypically normal tissue ($p < 0,1$)

Italicized entries under “Significance *p* value (2-tailed)” indicate proteins with significantly lower abundance in tumor tissue ($p < 0,1$) comparing to the adjacent phenotypically normal tissue

Table 2 Data of identified proteins

Gene symbol	Accession	Role	HNSCC related literature referral	IPA findings	Mascot score	MW (kDa)*	Σ SC (%)**	Σ Peptides***
TNC	TENA_HUM-AN	ECM adhesion, angiogenesis, EMT	overexpression as adverse prognostic factor in oral SCC (<i>mRNA expression analysis</i>)	activating EGFR due to EGF-like repeats	354	240.7	8.3	13
TMED2	TMED2_HUM-AN	trafficking between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, cytoskeletal re-arrangement, cell migration	up- and downregulation in oral and hypopharyngeal SCC (<i>miRNA expression and gene expression analysis, low sample number, n = 5</i>)	overexpression mediated by NFE2L2 (<i>a transcription factor that may promote carcinogenesis</i>)	59.1	22.7	12.2	3
DYNLL1	DYL1_HUM-AN	intracellular microtubular vesicle transport, maintenance of cytoskeleton	up-regulation under hypoxic conditions on FaDuDD HNSCC cell line (<i>LC-MS/MS</i>)	indirectly facilitating HGF/c-MET pathway	82.3	8	21.6	5
COTL1	COTL1_HUM-AN	F-actin binding protein, cellular motility	no reports found	tumor associated protein in chemical-induced SCC model [†]	72.7	15.9	5.4	3
SPRR2D	SPR2D_HUM-AN	function in skin barrier, wound healing, quenching of ROS, terminal differentiation marker of stratified squamous epithel	up-regulated in oral SCC and NPC (<i>RNA analysis</i>)	no data found	89.1	7.9	46.8	3
NCL	NUCL_HUM-AN	co-factor in transcription regulation and RNA transport	overexpressed in laryngeal SCC (<i>LC-MS/MS on snap frozen tissue samples</i>)	recruiting EGFR mediated signaling pathways, facilitating EGFR cytoplasmic tail dimerization, direct binding with SNRNP200 playing role in RNA metabolism	316.2	76.6	17.9	11
SNRNP200	U520_HUM-AN	DeXH box protein, pre-mRNA splicing	no reports found	gene mutation in human cutaneous SCC, direct binding with NCL acting as nuclear interacting partner	51.5	244.4	1.3	2
ALDH3A2	AL3A2_HUM-AN	detoxification of aldehydes originating from lipid peroxidation processes	down-regulated in oral SCC (<i>¹⁶O/¹⁸O proteomics analysis using ESI-ion trap and MALDI-TOF/TOF MS</i>)	direct binding with EGFR [‡]	64.6	54.8	7.9	3
<i>DSG1</i>	DSG1_HUM-AN	desmosome forming	isoform switch among DSGs in HNSCC (<i>RNA analysis</i>)	indirectly down-regulated by HGF in malignant melanoma	175	113.7	6.9	5
<i>KRT9</i>	K1C9_HUM-AN	intermediate filament of intracytoplasmatic cytoskeleton	down-regulated in HNSCC lymph node metastasis (<i>MALDI-Q-TOF MS/MS</i>); up-regulated in NPC (<i>ESI-Q-TOF-MS</i>)	no data found	1493.3	62	68.2	37

Boldface entries under “Gene symbol” indicate proteins significantly overexpressed in tumor comparing to the adjacent phenotypically normal tissue ($p < 0,1$)

Italicized entries under “Gene symbol” indicate proteins with significantly lower abundance in tumor ($p < 0,1$) comparing to the adjacent phenotypically normal tissue

c-MET: hepatocyte growth factor receptor; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; ECM: extracellular matrix; EMT: endothelial-mesenchymal transition; HGF: hepatocyte growth factor;

HNSCC: head neck cancer squamous cell carcinoma; NFE2L2: nuclear factor, erythroid 2 like 2; NPC: nasopharyngeal carcinoma, ROS: reactive oxygen species; SCC: squamous cell carcinoma

*molecular weight in kDa

**average sequence coverage in percentage

***the average number of peptides each protein was identified with

† without identified participating pathways

‡ with unknown significance

Theoretically, inhibition of TMED2 or its inducer NFE2L2 may suggest a promising tool against HNSCC invasion. NCL can act both as a recruiter and overexpressed protein of EGFR mediated pathways and can facilitate dimerization of EGFR's cytoplasmic tail. Thus NCL overexpression can be both consequence and initiator of EGFR activation. Therefore interfering NCL can also be promising in EGFR-positive HNSCCs, while down-regulation may serve as a marker of anti-EGFR therapy efficacy.

TNC containing EGF-like repeats may serve as targets against EGFR-positive HNSCCs. Inhibiting EGFR results in TNC down-regulation. Considering the diverse correlations between TNC and EGFR, TNC can serve both a potential target in HNSCC and therapeutic response marker in anti-EGFR treatment.

DYNLL1-related cytoskeletal rearrangement and tumor cell migration can be theoretically inhibited by anti-HGF therapy, as DYNLL1 shows indirect interaction with HGF in HGF/c-MET pathway in HNSCC.

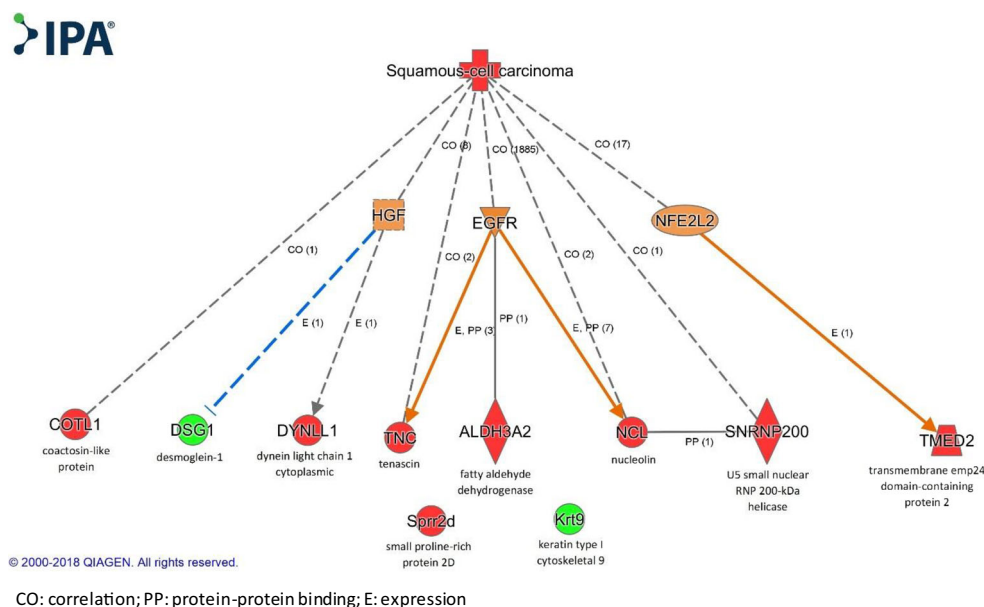
IPA found indirect inhibition of DSG1 by HGF in malignant melanoma highlighting that DSG1 down-regulation contributes to cell-cell adhesion disruption easing invasion. Thus inhibition of HGF can exert anti-tumor effect with

maintaining cell-to-cell junctions via stabilizing desmosomes by DSG1 overexpression. Considering that EGFR pathway shares common signals with HGF-mediated routes resulting redundancy and frequently moderate therapeutic response to anti-EGFR treatment, combined inhibition of EGFR and c-MET/HGF pathway is emerging. Interfering redundant pathways (p44/p42 MAPK, PI3K/AKT, STAT) may have the desired anti-cancer effect. Until routinely applied anticancer drug combinations are available simultaneously targeting HGF, EGF and NFE2L2 mediated pathways, inhibition of overexpressed DYNLL1, TNC, NCL and TMED2 may exert anti-tumor effect on HNSCC beyond their diagnostic role.

IPA also found unclear interactions. COTL1 is suggested as tumor-associated protein upregulated on mouse carcinogenesis model. SNRNP200 gene mutation was reported in human cutaneous SCC. IPA found EGFR-ALDH3A2 direct binding with unknown significance. NCL-SNRNP200 direct binding demonstrates NCL's place in RNA metabolism and identifies SNRNP200 as a nuclear interacting partner.

Contrary to previous MS studies, abundance differences were determined using label-free LC/MS based proteomics exclusively on FFPE LHSCE samples. Feasibility of quantitative LS/MS methods on FFPE samples had been

Fig. 1 Note: This data is mandatory. Please provide



questionable for a long time due to cross-links and formaldehyde induced adducts [9]. Various extraction innovations made protein recovery from FFPE samples as reliable and diagnostically accurate as from fresh-frozen samples [10]. Labeling has several disadvantages compared to label-free technique: protein loss due to each manipulation step, necessity of prerequisites (e.g. presence of cysteine-containing peptides) and high costs. These disadvantages also can be bypassed with label-free methods.

Our study also has limitations. Interestingly, IPA did not detect SPRR2D and Krt9. This is probably due to the lack of available IPA data. Continuous amplification of stored data can reveal new interactions. The other drawback of our study is the moderate sample number. It should be noted that our primary aim was to design a pilot study for evaluation of protein abundance differences between LHSCC and adjacent healthy tissue.

Conclusion

Considering our initial favorable results, this study has clinical relevance. Beside highlighting the proteomic difference between LHSCC and adjacent normal tissue, we found possible LHSCC markers/targets that had not been in focus till date. On the other hand, we proposed the potential in involving large histopathological sample archives taking the reliability of label-free LC/MS on FFPE samples into account facilitating protein discovery. Nevertheless, this easy access to HNSCC samples would make fresh frozen sectioning unnecessary offering a cost-efficient and time-saving solution.

Acknowledgements L.T. is grateful for funding from the National Research Development and Innovation Office (NKFIH PD-121187). L.T. acknowledges support from the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. The work has been supported by GINOP-2.3.3-15-2016-00021.

Funding Information Open access funding provided by University of Pécs.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were

made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Marur S, Forastiere AA (2008) Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 83:489–501
2. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, la Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang ZF, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P (2009) Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck Cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 18:541–550
3. Arghiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008) Head and neck cancer. *Lancet* 371:1695–1709
4. Erich K, Reinle K, Müller T, Munteanu B, Sammour DA, Hinsenkamp I, Gutting T, Burgermeister E, Findeisen P, Ebert MP, Krijgsveld J, Hopf C (2019) Spatial distribution of endogenous tissue protease activity in gastric carcinoma mapped by MALDI mass spectrometry imaging. *Mol Cell Proteomics* 18: 151–161
5. Hanahan D, Coussens LM (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21:309–322
6. Paulo JA, Lee LS, Banks PA, Steen H, Conwell DL (2012) Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded pancreatic tissue using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Pancreas* 41:175–185
7. Carnielli CM, Macedo CCS, De Rossi T, Granato DC, Rivera C, Domingues RR et al (2018) Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nat Commun* 9:3598
8. Li L, Zhang Z, Wang C, Miao L, Zhang J, Wang J, Jiao B, Zhao S (2014) Quantitative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for laryngeal carcinoma. *PLoS One* 9:e90181
9. Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HA, de Jong A et al (2004) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* 279:6235–6243
10. Fowler CB, O'Leary TJ, Mason JT et al (2013) Toward improving the proteomic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Expert Rev Proteomics* 10:389–400

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.