

# **Untersuchungen zur DNaseX- und TKTL1 Expression bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Nadtotschi, geb. Melnitschenko, Tatjana

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. M. Grimm
2. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. G. Klein

## INHALTSVERZEICHNIS

|   |    |
|---|----|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....   | 3  |
| <b>1 Einleitung</b> .....   | 5  |
| 1.1 Prognostische Biomarker .....   | 5  |
| 1.2 Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle .....  | 6  |
| 1.3 Krebsmerkmale von Tumoren .....   | 12 |
| 1.4 DNaseX als Marker für Apoptoseresistenz.....  | 13 |
| 1.5 Transketolase-like 1 als Marker für gesteigerten Tumorstoffwechsel .....  | 14 |
| 1.6 Epitop Detektion in Monozyten (EDIM)-Technologie.....   | 16 |
| <b>2 Zielsetzung und Fragestellung</b> .....  | 18 |
| <b>3 Material und Methoden</b> .....  | 20 |
| 3.1 Patientenkollektiv.....   | 20 |
| 3.2 Immunhistochemie (IHC) und Quantifizierung.....   | 21 |
| 3.3 Zellkultur und Immunzytochemie (ICC).....   | 24 |
| 3.4 Immunhistochemische und immunzytochemische Doppelfärbung .....  | 25 |
| 3.5 Durchflusszytometrie von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Tumor-Zelllinien<br>und EDIM-Bluttest.....   | 25 |
| 3.6 Bestimmung der EDIM-Scores .....  | 26 |
| 3.7 Statistische Analyse .....  | 26 |
| <b>4 Ergebnisse</b> .....   | 29 |
| 4.1 Immunhistochemische Analyse von DNaseX.....   | 29 |
| 4.2 Assoziation klinisch-pathologischer Verlaufsparemeter mit DNaseX (Apo10)<br>Expression .....  | 29 |
| 4.3 Vergleich der Beobachter-assoziierten quantitativen Auswertung der DNaseX<br>(Apo10) Expression mit der Computer-assistierten Analyse .....                         | 30 |
| 4.4 Prognostische Wertigkeit von DNaseX (Apo10).....  | 31 |
| 4.5 Assoziation klinisch-pathologischer Verlaufsparemeter mit TKTL1<br>Expression .....   | 32 |
| 4.6 Vergleich der Beobachter-assoziierten quantitativen Auswertung der TKTL1<br>Expression mit der Computer-assistierten Analyse .....                                  | 33 |
| 4.7 Prognostische Wertigkeit von TKTL1 .....  | 33 |
| 4.8 Prognostische Wertigkeit der DNaseX (Apo10)/TKTL1-Subgruppen.....   | 34 |
| 4.9 Immunzytochemie .....   | 36 |
| 4.10 Durchflusszytometrische, immunhistochemische und immunzytochemische<br>Analyse von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Tumorzellen.....                                    | 36 |
| 4.11 Sensitivität und Spezifität der EDIM-DNaseX (Apo10) und EDIM-TKTL1-<br>Bluttests bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinom verglichen mit gesunden<br>Blutspendern..... | 37 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>5</b>  | <b><i>Diskussion.....</i></b>                     | <b>41</b> |
| <b>6</b>  | <b><i>Beantwortung der Fragestellung.....</i></b> | <b>47</b> |
| <b>7</b>  | <b><i>Zusammenfassung .....</i></b>               | <b>50</b> |
| <b>8</b>  | <b><i>Literaturverzeichnis .....</i></b>          | <b>52</b> |
| <b>9</b>  | <b><i>Abkürzungsverzeichnis .....</i></b>         | <b>59</b> |
| <b>10</b> | <b><i>Abbidungsverzeichnis.....</i></b>           | <b>61</b> |
| <b>11</b> | <b><i>Tabellenverzeichnis .....</i></b>           | <b>62</b> |
| <b>12</b> | <b><i>Danksagung.....</i></b>                     | <b>63</b> |
| <b>13</b> | <b><i>Lebenslauf .....</i></b>                    | <b>64</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Prognostische Biomarker

Obwohl seit vielen Jahrzehnten an der molekularen Charakterisierung von Tumorerkrankungen mittels Biomarkern für Neoplasien geforscht wird, ist es bisher nicht gelungen, für die wichtigsten Tumorentitäten Tumor-/oder Biomarker mit ausreichender Sensitivität und Spezifität zu etablieren. Generell gibt es bisher noch keine Tumor-/Biomarker, die unabhängig von der Tumorentität universell eingesetzt werden können. Auch für das Mundhöhlenkarzinom sind bisher trotz zahlreicher Vorarbeiten zur Detektion und molekularen Charakterisierung von Tumorerkrankungen keine sicheren Marker etabliert [1, 2].

Eine Erkrankung geht mit einer Vielzahl von Veränderungen im Körper einher. Der Metabolismus wird angeregt, manche Substanzen neu zu bilden, andere Stoffe werden in geringerem Maße produziert. Die Analyse solcher Veränderungen kann Kenntnisse darüber vermitteln, ob ein pathologischer Prozess vorhanden ist und ob Therapieansätze Wirkung zeigen. Außerdem kann dies hilfreich sein, gezielt Behandlungsstrategien festzulegen und den Therapieverlauf zu kontrollieren. Körpereigene Indikatoren für biologische und pathologische Prozesse werden als Biomarker bezeichnet und können wertvolle Hinweise über das Risiko der Entstehung, Vorhandensein und Progression einer Erkrankung liefern. Außerdem ist es möglich, über deren Bestimmung das pharmakologische Ansprechen auf die Behandlungsmaßnahmen zu beurteilen und somit Personengruppen zu identifizieren, die möglicherweise nicht oder in erhöhtem Maße von einem Therapieansatz profitieren. Solche biologische Indikatoren sind daher von großer Relevanz für das Behandlungsmonitoring und Prognose vieler Tumorentitäten [3].

Die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Patienten mit einer malignen Erkrankung des Kopf-Hals-Bereichs wird durch bestimmte Prognosefaktoren beeinflusst. Die Einschätzung über deren Relevanz spielt eine wichtige Rolle für eine frühzeitige therapeutische Intervention. Die Ermittlung weiterer prognoserelevanter Kriterien würde neben klinisch-pathologischen Verlaufsparmetern zur Identifizierung potentieller Risikogruppen für die

Rezidivdiagnostik beitragen und eventuelle Konsequenzen für die Therapie aufzeigen.

Biomarker lassen sich auf verschiedenen biologischen Ebenen identifizieren: auf Genomebene (DNA), Transkriptomebene (mRNA) und Proteinebene (Proteom). Das Proteom charakterisiert im Gegensatz zu DNA- oder mRNA-Ebenen den tatsächlichen Phänotyp von potentiellen tumorspezifischen Markern, indem es biologisch relevante Strukturen aufzeigt. Die Proteinebene bietet sich daher am ehesten an, wichtige Hinweise auf metabolische Veränderungen sowie mögliche therapierelevante Tumormarker zu geben.

Neben der Identifizierung potentieller tumorspezifischer Proteom-Parameter im Blut wird einer weiteren Konzeption große diagnostische Bedeutung beigemessen. Die Analyse von Gewebeproben stellt bei der Detektion der Biomarker ein geeignetes Instrument der Früherkennung dar, da sie im Tumorgewebe in den höchsten Konzentrationen vorliegen. Weiterhin lassen sich zuverlässige tumorspezifische Parameter im malignen Gewebe auffinden, die entweder durch den Tumor selbst oder seine Umgebung exprimiert oder modifiziert werden. Die primäre Detektion von tumorassoziierten Markern im neoplastischen Gewebe stellt daher einen potentiellen diagnostischen Nutzen dar und sollte bestenfalls durch eine minimal-invasive und kostengünstige Nachweismethode wie eine Blutuntersuchung validiert werden. Eine innovative Konzeption kann künftig durch eine hochsensitive und hochspezifische Analyse der Gewebetumormarker auch im Blut von onkologischen Patienten einen sinnvollen Beitrag zur Früherkennung und Therapiemonitoring des Mundhöhlenkarzinoms leisten [4].

## **1.2 Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle**

Das Mundhöhlenkarzinom (orales Plattenepithelkarzinom, OPC, engl. oral squamous cell carcinoma, OSCC) gilt mit einer jährlichen globalen Inzidenz von 7,1% aller malignen Erkrankungen als 6. häufigste Tumorentität [5-8]. Deutschlandweit erkrankten im Jahre 2008 ca. 13.010 Menschen an einem Mundhöhlenkarzinom und für das Jahr 2012 wurde mit einer weiteren Inzidenzzunahme gerechnet [9]. In den letzten Jahren wurde den humanen Papillomaviren (HPV), vor allem HPV-16, eine zunehmende Rolle in der Ent-

stehung von präkanzerösen und kanzerösen Veränderungen der Mundhöhle zugeschrieben [10, 11]. Bereits 1999 wurde eine Zunahme der Inzidenz des oralen Plattenepithelkarzinoms auf bis zu 15,75% [12] beobachtet, die mit dem Auftreten von HPV, insbesondere bei jungen Patienten (<40. Lebensjahr) und Patienten ohne typischen Nikotin- und Alkoholabusus assoziiert ist [12-14]. Insgesamt können ca. 25% aller Mundhöhlenkarzinome in Verbindung mit einer HPV-Infektion gebracht werden [13], wobei der Zusammenhang zwischen HP-Viren und Karzinogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms von anderen Autoren dementiert wird [15, 16]. Auch ein möglicher karzinogener Einfluss des Bakteriums *Helicobacter pylori* (HP) auf die Entstehung oraler Neoplasien wird diskutiert [17-23]. Chronisch einwirkende Noxen, wie der regelmäßige Nikotin- und Alkoholabusus gelten als die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms. Das relative Risiko an einem oralen Plattenepithelkarzinom zu erkranken ist bei Rauchern im Vergleich zu der Normalbevölkerung bis zu 38-fach erhöht und steht in direkter Verbindung zu Dauer und Quantität des Nikotinkonsums [24]. Neben diesen Hauptrisikofaktoren gibt es eine Reihe anderer Einflussgrößen, die eine synergistische Rolle bei der Entwicklung der neoplastischen Veränderungen im intraoralen Milieu spielen. Als solche prädisponierende Kriterien, die als Promoter in Gegenwart von Initiatoren wie Tabak und Alkohol fungieren, werden die mangelnde Mundhygiene, Ernährungsdefizite in Form von Vitamin A und Vitamin C Mangel und mechanische Irritationen, etwa durch schlecht sitzenden Zahnersatz oder scharfe Zahnkanten, diskutiert [25].

In über 90% der Fälle handelt es sich bei Mundhöhlenkarzinomen histologisch um Plattenepithelkarzinome, überwiegend gut differenziert, wobei auch seltener Basalzellkarzinome und Adenokarzinome der Mundhöhle diagnostiziert werden [26, 27]. Am häufigsten sind orale Plattenepithelkarzinome der Zunge und des Mundbodens, gefolgt von Karzinomen des Alveolarfortsatzes/Gingiva, seltener sind diese Tumoren im Bereich des Gaumens, der Wangenschleimhaut und der Lippen lokalisiert [28].

Die Behandlung des Mundhöhlenkarzinoms erfolgt unter Beachtung des Tumor-Stadiums, des Gradings sowie des Alters und Allgemeinzustandes des Patienten. Die TNM-Klassifikation (TNM-System; engl.: TNM Classification of Malignant Tumours, kurz TNM staging system, **Tabelle 1**, S.8) ermöglicht die Union internationale contre le cancer (UICC)-Tumorstadieneinteilung (**Tabelle 2**, S.8) des Mundhöhlenkarzinoms [26, 27].

**Tabelle 1:** Zusammenfassende Darstellung der TNM-Klassifikation des Mundhöhlenkarzinoms [26, 27]. TNM ist eine Abkürzung für: T, Tumorgroße, Beschreibung von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors; N=Nodus/Nodes=Lymphknoten, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen; M=Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen.

| <b>T-Status</b> |                                  |  |
|-----------------|----------------------------------|--|
| T1              | Tumor bis 2 cm                   |  |
| T2              | Tumor über 2 cm, maximal 4 cm    |  |
| T3              | Tumor über 4 cm                  |  |
| T4              | Infiltration von Nachbarorganen  |  |
|                 | T4a                              | Lippe<br>Infiltration durch kortikalen Knochen, oder den N. alveolaris inf., oder Mundhöhlenboden, oder in Haut von Kinn oder Nase<br>Mundhöhle<br>Infiltration durch kortikalen Knochen, oder in die äußere Muskulatur der Zunge, oder Kieferhöhle, oder Gesichtshaut |
|                 | T4b                              | Infiltration des Spatium masticatorium, oder Proc. pterygoideus, oder Schädelbasis, oder Tumor umschließt A. carotis interna   |
| <b>N-Status</b> |                                  |  |
| N1              | solitäre Metastase, maximal 3 cm |  |
| N2              |                                  |  |
|                 | N2a                              | solitäre Metastase über 3 cm, maximal 6 cm   |
|                 | N2b                              | mehrere Metastasen ipsilateral, keine über 6 cm  |
|                 | N2c                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Metastasen bilateral, oder</li> <li>• Metastase über 6 cm</li> </ul>  |
| N3              |                                  |  |
|                 | N3                               | Metastase über 6 cm  |
| <b>M-Status</b> |                                  |  |
| M1              | Fernmetastasen                   |  |

**Tabelle 2:** Zusammenfassende Darstellung der UICC-Stadien des Mundhöhlenkarzinoms [26, 27].

| <b>UICC-Stadien</b> |            |            |    |
|---------------------|------------|------------|----|
| I                   | T1         | N0         | M0 |
| II                  | T2         | N0         | M0 |
| III                 | T1, T2     | N1         | M0 |
|                     | T3         | N0, N1     | M0 |
| IVA                 | T1, T2, T3 | N2         | M0 |
|                     | T4a        | N0, N1, N2 | M0 |
| IVB                 | T4b        | jedes N    | M0 |
|                     | jedes T    | N3         | M0 |
| IVC                 | jedes T    | jedes N    | M1 |



Sofern der Allgemeinzustand des Patienten es zulässt, sollte bei kurativ resektablen Mundhöhlenkarzinomen die Operation in Kombination mit einer sofortigen Rekonstruktion durchgeführt werden. Bei fortgeschrittenen Karzinomen sollte zusätzlich eine adjuvante Therapie erfolgen [29-31].

Die Rekonstruktion im Bereich der Mundhöhle mit mikrochirurgisch anastomosierten Transplantaten stellt eine bewährte Methode dar. In vielen Fällen ist die Technik des mikrovaskulären Gewebetransfers bereits im Rahmen der Tumorsektion indiziert, um eine sichere Defektdeckung zu erreichen [31]. Das Leitlinienprogramm Onkologie von 2012 (S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom, [31]) gibt für die Strahlentherapie, ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie, folgende Empfehlung: eine neoadjuvante oder alleinige adjuvante Chemotherapie hat beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle in Verbindung mit der Operation keinen positiven Effekt. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium (UICC III/IV), nicht operablem und nicht metastasiertem Mundhöhlenkarzinom soll, besonders in den Altersgruppen bis 70 Jahren, eine primäre Radiochemotherapie einer alleinigen Strahlentherapie vorgezogen werden. Alternativ zu einer Radiochemotherapie kann eine Kombination der Strahlentherapie mit Cetuximab (Handelsname: Erbitux®), durchgeführt werden. Eine postoperative Radio- oder Radiochemotherapie soll bei fortgeschrittener T-Kategorie (T3/T4), knappen oder positiven Resektionsrändern, perineuraler Invasion, Gefäßinvasion und/oder Lymphknotenbefall/Lymphangiosis erfolgen. Die postoperative Strahlentherapie soll konventionell fraktioniert werden und bei durchschnittlichem Risiko mit 54-60 Gray (Gy) in 27-30 Fraktionen über 5,5-6 Wochen sowie bei Tumoren mit erhöhtem Rezidivrisiko mit 66 Gy in 33 Fraktionen über 6,5 Wochen erfolgen. Die postoperative Strahlentherapie sollte auch möglichst früh begonnen werden und innerhalb eines Zeitraums von höchstens 11 Wochen nach der Operation beendet werden. Sofern die Indikation zu einer Radiotherapie gestellt wurde, sollte bei Patienten mit erhöhten histopathologischen Risikokriterien für ein Tumorrezidiv (Resektionsrand <5mm und/oder LK Kapseldurchbruch/extrakapsuläres Tumorwachstum) nach erfolgter Tumorsektion die adjuvante Behandlung in Form einer Radiochemotherapie mit Cisplatin erfol-

gen. Patienten mit kleinen und zugänglichen Tumoren (T1/T2) der Mundhöhle können in ausgewählten Fällen durch eine interstitielle Brachytherapie behandelt werden.

Beim Mundhöhlenkarzinom kommt es in 20-40% zu einer okkulten Metastasierung in die Halslymphknoten. Nahezu immer sind dabei die Level I-III, nur sehr selten das Level V betroffen [31]. Gemäß der gängigen Klassifikation nach Robbins werden folgende sechs Lymphknotenlevel unterschieden, die bei der Neck-dissection ausgeräumt werden können (**Tabelle 3**, S. 10) [31, 32].

**Tabelle 3:** Zusammenfassende Darstellung der Halslymphknoten (Level I-VI) [31, 32].

| Halslymphknoten |  |   |
|-----------------|--|---|
| Level           | Bezeichnung                              | anatomische Begrenzung  |
| IA und IB       | Submentale und submandibuläre Knoten     | ventral und dorsal des vorderen Digastrikusbauches  |
| IIA und IIB     | obere juguläre Lymphknotengruppe         | Ventral und dorsal der V. jugularis   |
| III             | mittlere juguläre Lymphknotengruppe      | Zwischen Höhe des Zungenbeins und Membrana cricothyroidea                                     |
| IV              | untere juguläre Lymphknotengruppe        | Zwischen Höhe der Membrana cricothyroidea und Clavicula                                       |
| VA und VB       | hinteres Halsdreieck                     | zwischen M. sternocleidomastoideus und M. trapezius oberhalb und unterhalb des M. omohyoideus |
| VI              | anteriore prätracheale Lymphknotengruppe | zwischen Höhe des Hyoids und Jugulum  |

Abhängig von der Intention spricht man von einer elektiven (prophylaktischen) Neck-dissection (chirurgische Resektion der Halslymphknoten und des umgebenden Gewebes zwischen Mandibula und Clavicula), wenn ein cN0-Befund vorliegt, und einer kurativen Neck-dissection, wenn sich aufgrund der klinischen und radiologischen Voruntersuchungen der Verdacht auf das Vorliegen einer oder mehrerer Lymphknotenmetastasen ergeben hat. Bezüglich des Ausmaßes der Neck-dissection werden folgende Modifikationen unterschieden [31-33]:

- Radikale Neck-dissection: Ausräumung der Level I-V zusammen mit Opferung des N. accessorius, der V. jugularis und des M. sternocleidomastoideus.
- Modifizierte radikale Neck-dissection: Ausräumung der Level I-V unter Erhalt einer oder mehrerer nicht-lymphatischer Strukturen.

- Selektive Neck-dissection: Ausräumung von weniger Levels als I-V; beim Mundhöhlenkarzinom in der Regel Ausräumung der Level I-III.
- Erweiterte Neck-dissection: Ausräumung oder Entfernung zusätzlicher Lymphknotengruppen oder nicht-lymphatischer Strukturen.

Eine Heilung ist nur durch eine vollständige chirurgische Entfernung des Tumors im gesunden Gewebe (R0-Resektion) erreichbar. Der Resektionsstatus und die Lymphknotenmetastasierung gehören nach wie vor zu den wichtigsten Prognoseparametern des oralen Plattenepithelkarzinoms. Bei etwa der Hälfte aller Patienten mit Mundhöhlenkarzinom wird im weiteren Verlauf der Erkrankung ein lokales Tumorrezidiv oder lokoregionäre Lymphknotenmetastasierung diagnostiziert, die mit äußerst schlechter Prognose assoziiert sind [34]. Außerdem wird bei ca. einem Drittel der Tumorpatienten im postoperativen Zeitraum von 20 Jahren zusätzlich noch ein Zweitkarzinom nachgewiesen [24]. Trotz intensiver Bemühungen um Fortschritte in der Diagnostik und fortlaufender Optimierung der etablierten Therapieschemata, liegt die relative Überlebensrate nach fünf Jahren (5-Jahres-Überlebensrate) bei lediglich 45-65% [9, 28, 35, 36]. Insbesondere die primäre Diagnostik des Mundhöhlenkarzinoms hat keine nennenswerten molekularbiologischen Innovationen zu verzeichnen [37]. Der Fokus der aktuellen onkologischen Grundlagenforschung liegt daher auf der Identifizierung neuer tumorspezifischer Marker, die künftig für die Entwicklung von neuen individualisierten und zielgerichteten diagnostischen und therapeutischen Strategien eingesetzt werden können. In einigen Untersuchungen zu potentiellen Tumor-assoziierten Parametern konnten bereits zahlreiche prognostisch relevante Gewebebiomarker detektiert werden [5]. Von besonderem Interesse sind dabei Forschungsansätze im Bereich serologisch bestimmbarer Tumormarker. Die bisher für andere Tumorentitäten untersuchten Tumormarker wie das Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCC), das karzinoembryonale Antigen (CEA) sowie das Cytokeratin-Fragment 19 (CYFRA 21-1), etc. konnten sich für das Therapiemonitoring beim Mundhöhlenkarzinom aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität jedoch nicht durchsetzen [38-41].

### 1.3 Krebsmerkmale von Tumoren

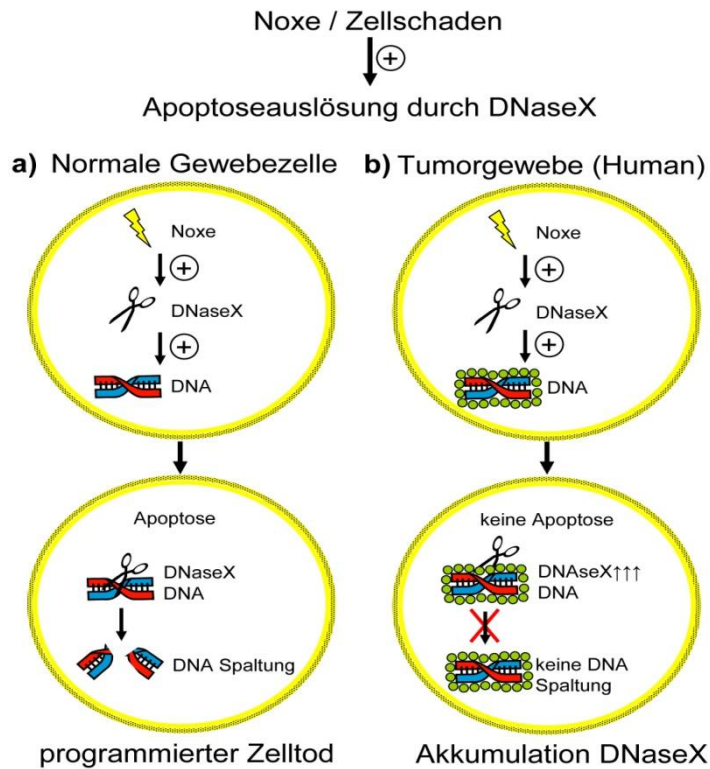
Damit sich überhaupt ein Malignom entwickeln kann, müssen Tumorzellen intrinsische und extrinsische (immunologische) Barrieren überwinden. In erster Linie bedeutet das, dass Tumorzellen die immunologische Überwachung des Organismus umgehen müssen [42]. Dies alleine ist für eine progressive maligne Transformation jedoch nicht ausreichend. Nach dem Modell von Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg müssen Tumorzellen weitere charakteristische physiologische Eigenschaften erlangen, die durch eine Anhäufung chromosomaler Aberrationen und Mutationen in der Tumorzelle zustande kommen [43]. Hauptsächlich handelt es sich bei betroffenen genomischen Regionen um Gene für Regulation der Mitose, des programmierten Zelltodes und DNA-Reparatur. Jede einzelne Etappe im komplexen mehrstufigen Prozess der Karzinogenese reflektiert die „Gesetzlosigkeit“ der Genexpression und Epigenetik und verleiht den betroffenen Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber Nachbarzellen. Eine einzelne Mutation löst jedoch noch keine Tumorerkrankung aus. In der Regel führt erst eine Akkumulation verschiedener genomischer Veränderungen zu einer unkontrollierten zellulären Expansion. Für die meisten malignen Tumoren steigt die Inzidenz mit dem Lebensalter. Auch bei der Entstehung des Mundhöhlenkarzinoms spielt das Alter (insbesondere die Expositionsdauer der o.g. Noxen) eine wichtige Rolle, wobei eine maligne zelluläre Expansion vom Zusammentreffen mehrerer unabhängiger Ereignisse in einer Zelle abhängig ist. Bei einem solchen Einzelereignis kann es sich um die Aktivierung eines Protoonkogens oder die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens handeln. Mindestens sechs unabhängige Ereignisse müssen eintreten, damit sich ein Mundhöhlenkarzinom entwickeln kann. Dies wird daher mit zunehmendem Alter durch eine progressive Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen immer wahrscheinlicher. Durch diese Veränderungen werden die Tumorzellen mit neuen Eigenschaften ausgestattet, wodurch sie unabhängig von äußeren Signalen überleben und sich weiter vermehren können. Im Jahr 2000 klassifizierten Hanahan und Weinberg initial sechs erworbene Eigenschaften (1.-6.) maligner Tumore, die als ‘Hallmarks of Cancer’ bezeichnet werden [43] und 2011 vier weitere Schlüs-

selmerkmale (7.-10.) von Tumorerkrankungen [44], die Gegenstand aktueller Forschungen sind: 1. Unabhängigkeit von / Selbstversorgung mit Wachstumsignalen, 2. Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstumssignalen, 3. Resistenz gegenüber Apoptose, 4. Unbegrenztes Replikationspotential, 5. Fähigkeit zur Angiogenese, 6. Fähigkeit zur Invasion und Metastasenbildung, 7. Genomische Instabilität und Mutation, 8. Veränderter Tumorzellmetabolismus: 9. Inflammatorisches Tumormikromilieu, 10. Inaktivierung der Anti-Tumor-Immunantwort.

#### **1.4 DNaseX als Marker für Apoptoresistenz**

Unter Apoptose versteht man den programmierten (kontrollierten) Zelltod. Sie sorgt bei multizellulären Organismen für eine natürliche Entfernung nicht mehr benötigter oder unerwünschter Zellen. Normale Zellen sind in der Lage, diesen "Selbstmord", z.B. durch Aktivierung von Caspasen (Cysteiny-Aspartasen, Effektorphase) zu begehen, wenn sie irreparable Schäden aufweisen. Tumorzellen reagieren jedoch oftmals nicht mehr auf die Signale, die diesen programmierten Zelltod einleiten sollen. Die Apoptose-Initiierung kann durch extrinsische (Rezeptor-vermittelte, Typ I), intrinsische (DNA-Schaden-vermittelte, Typ II) Wege und zellulären Stress (Typ III) induziert werden. Ansätze zur Identifikation von Prognoseparametern für Tumorerkrankungen finden sich daher auch im Bereich der Apoptoresistenz [43].

DNaseX markiert gutartige oder bösartige Tumorzellen mit Proliferationsstörung [45-47] und wird als hochsensitiver Tumormarker verschiedenster Tumorentitäten verwendet [47]. Der Apo10-Antikörper wurde gegen eine Sequenz der DNaseX generiert [45, 46]. DNaseX gehört zu der DNase1-Proteinfamilie, zu der außerdem auch die DNase1, DNaseX (DNase1-like 1), DNase1-like 2 and DNase1-like 3 (DNase gamma) zählen [45, 46]. Er erkennt ein besonderes Epitop, das in Tumorzellen, aber auch in einigen Immunzellen, die im Thymus durch Apoptose eliminiert werden, exprimiert wird. Im Tumorgewebe ist die Funktion der DNaseX - eine Endonuklease, die normalerweise die nukleäre DNA zerschneidet - durch ein Protein (Proteinkinase B, Akt) geblockt [44, 47-49], wodurch verhindert wird, dass die Tumorzelle durch Apoptose abstirbt (Apoptoresistenz) (**Abbildung 1**, S. 14).



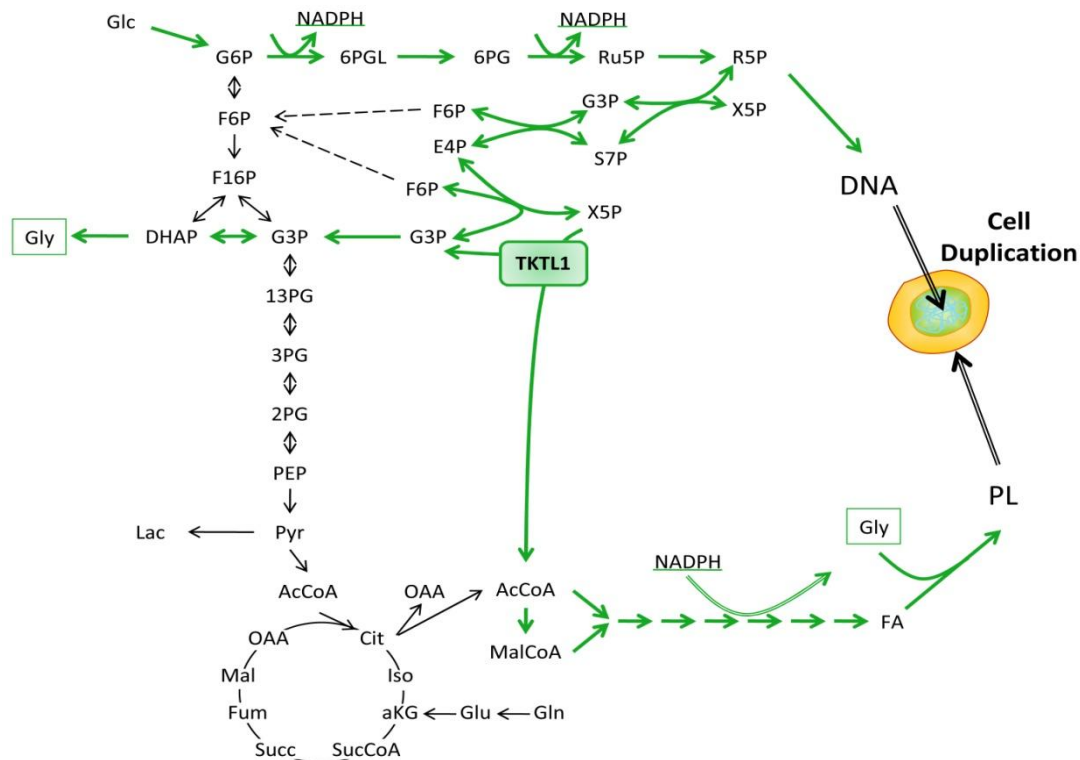
**Abb. 1:** Darstellung der funktionellen Rolle der DNaseX in Normalgewebe (a, links) und in humanem Tumorgewebe (b, rechts).

Physikalische oder chemische Noxen (z.B. UV-Strahlung, Zellgifte) führen durch Aktivierung von DNaseX in normalen Gewebezellen (a, links) zum programmierten Zelltod (falls endogene Reparaturmechanismen versagen). In humanen Tumorzellen (b, rechts) ist eine Akkumulation von DNaseX festzustellen, die durch Apoptoseresistenz einer insuffizienten DNaseX Wirkung (Blockierung durch Proteine, grüne Marker) verursacht wird und somit diagnostisch nutzbar ist.

## 1.5 Transketolase-like 1 als Marker für gesteigerten Tumorstoffwechsel

Tumorzellen können ihren biochemischen Metabolismus zugunsten einer erhöhten Proliferation ändern. So sind entartete Zellen befähigt, trotz energetischer Insuffizienz und Anwesenheit von Sauerstoff, Glukose anaerob zu Laktat abzubauen (aerobe Glykolyse, [50]). Dadurch wird für die Tumorzellen ein Selektionsvorteil erreicht. Ein gesteigerter Glukoseumsatz sowie eine vermehrte Laktatproduktion werden als ungünstige Parameter für die Prognose von Tumoren aufgefasst. Für den Abbau von Glukose zu Laktat ist der Embden-Meyerhof-Weg (Glykolyse) und der Pentosephosphatweg (PPP) zuständig. Aufgrund der vermehrten Laktatbildung entwickeln die Tumorzellen eine Resistenz gegenüber säureinduzierter Zelltoxizität. Diese begünstigt neben der hochregulierten Glykolyse das Tumorwachstum und fördert die Invasivität des Malignoms. Das Transketolase-like 1 (TKTL1) Enzym markiert invasive Tumorzellen mit einem aggressiven biologischen Phänotyp, die aufgrund ihres Sauerstoff-unabhängigen Metabolismus auch unter hypoxischen

Bedingungen wachsen können. Das TKTL1-Enzym stellt eine während der Evolution der Säugetiere mutierte Form des ursprünglichen Transketolaseproteins dar, das besondere Enzymeigenschaften aufweist und nicht nur für die Bereitstellung von Ribose-5-P für Nukleinsäuresynthese sowie für eine erhöhte Laktatproduktion verantwortlich ist [4, 51-66], sondern auch Acetyl-CoA generiert, das zur Bildung von Fettsäuren genutzt wird (**Abbildung 2**, S.16). Das TKTL1-Enzym stellt damit eine bisher nicht identifizierte neue direkte Verbindung des Zucker- mit dem Fettstoffwechsel dar. In Situationen, die aufgrund einer erhöhten Radikalfreisetzung oder einer Apoptosegefahr für die Krebszellen bedrohlich sind, wird der Glukoseflux durch eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase sowie eine Aktivierung von TIGAR (Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator [67]) aus dem Embden-Meyerhof-Weg in den PPP in Richtung der TKTL1 Enzymaktivität umgeleitet, wodurch die Aktivität der Mitochondrien reduziert werden kann. Hierdurch wird die Radikalproduktion und die die Apoptoseauslösung gehemmt, wodurch diese metabolische Veränderung zur verstärkten Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapien und zu einer sehr schlechten Prognose führt [66, 68]. Auch für Kopf-Hals-Tumoren wurde TKTL1 als metabolischer Marker beschrieben, der mit einer deutlich verkürzten Überlebenszeit von Tumorpatienten assoziiert ist [69]. Da einhergehend mit der TKTL1-Enzymaktivität auch Milchsäure-/Laktat produziert wird, das zu einer Matrixdegradation führt, sind diese Tumoren invasiv wachsend und bilden vermehrt Metastasen [70].



**Abb. 2:** Darstellung der TKTL1 Funktion: Der PPP dient der Bereitstellung von reduziertem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Koenzym für die Fettsäure- und Steroidbiosynthese und von Ribose-5-Phosphat (Ribose-5-P) zur Nukleinsäuresynthese. In der zweiten Phase katalysieren die beiden Enzyme Transketolase und Transaldolase durch Umlagerung von C2- bzw. C3-Körpern die Bildung von Fruktose-6-Phosphat (Fruktose-6-P) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) aus Ribulose-5-P. In Tumorzellen ist TKTL1 an der Bereitstellung von Acetyl-CoA beteiligt, welches zur Fettsäurebiosynthese sowie zur Synthese anti-apoptischer Moleküle benötigt wird (bisher unpublizierte Daten der Univ. Barcelona, Cascante et al.).

## 1.6 Epitop Detektion in Monozyten (EDIM)-Technologie

Monozyten und Makrophagen sind an den unspezifischen (angeborenen) und spezifischen (adaptiven, erworbenen) Immunmechanismen beteiligt.

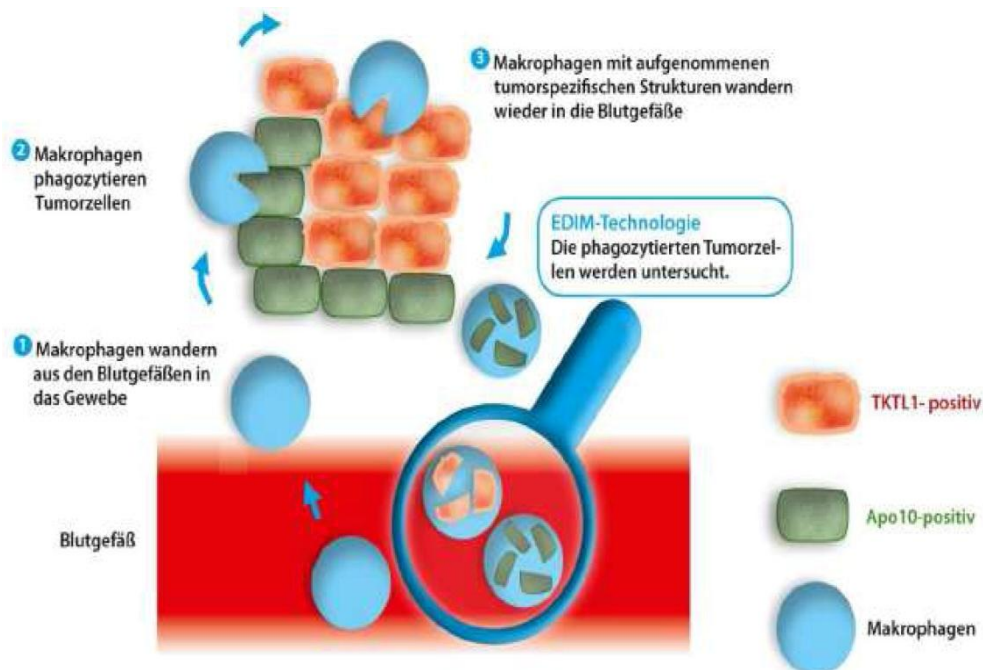
Das Epitop Detektion in Monozyten (EDIM)-Testverfahren [4] für DNaseX (Apo10) und TKTL1 (EDTA Blut) mittels Durchflusszytometrie stellt eine neue Methode dar, Tumorzellbestandteile in (Blut-)Monozyten/Makrophagen nachzuweisen. In Tumorzellen bilden sich durch molekulare und biochemische Änderungen Proteine wie DNaseX (Apo10) und TKTL1, die mit Hilfe der EDIM-Technologie für eine Diagnose und Charakterisierung von Tumoren genutzt werden können. Wenn das Immunsystem benigne oder maligne Tumorzellen erkennt, werden Abwehrmechanismen wie die Phagozytose ausgelöst. Dieses Erkennen und Eliminieren von unerwünschten Zellen wird hochspezifisch von Monozyten/Makrophagen durchgeführt, die anschließend wieder in das Blut



zurückkehren und über eine einfache Blutentnahme isoliert werden können [4, 71, 72] (**Abbildung 3**, S.17).

Diese Eigenschaft des Immunsystems nutzt das EDIM-Testverfahren, das mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt wird. Hierbei werden durch spezifische Antikörper Makrophagen (CD14/CD16 positiv) im Blut markiert und detektiert und gleichzeitig die Präsenz von Proteinen in Makrophagen (DNaseX, TKTL1) bestimmt [71].

Das EDIM-Testverfahren ist 1. hochspezifisch: Die natürlichen Mechanismen des menschlichen Immunsystems werden genutzt; 2. hochsensitiv: Antigene werden in Makrophagen angereichert; 3. Die EDIM-Technologie fungiert wie eine nichtinvasive Biopsie. Tumore, bei denen keine Biopsie möglich ist und die operativ nicht entfernbar sind, werden über die Makrophagen erreicht.



**Abb. 3:** EDIM-Testverfahren (Epitop Detektion in Monozyten) für DNaseX (Apo10) und TKTL1: In Tumorzellen bilden sich durch molekulare und biochemische Änderungen Proteine wie DNaseX (Apo10) und TKTL1, die mit Hilfe der EDIM-Technologie für eine Diagnose und Charakterisierung von Tumoren genutzt werden können (Quelle: [www.tavarlin.com](http://www.tavarlin.com))

## 2 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der Studie ist die Beantwortung der Frage, ob DNaseX (Apo10) und TKTL1 als aussagekräftige Prognose- und Therapiestratifikationsmarker retrospektiv (durch Tumorgewebeanalyse) und prospektiv (durch eine Blutanalyse) für Patienten mit Mundhöhlenkarzinom validierbar sind.

Zukünftig kann hierdurch Patienten eine individuell besser wirksame und gleichzeitig schonendere Diagnostik (als nicht-invasive Biopsie) sowie Therapie angeboten und langfristig die Lebensqualität sowie die Prognose für Tumorpatienten verbessert werden.

In der geplanten Untersuchung sollen daher folgende Ziele erreicht werden:

1. Der retrospektive Nachweis von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Tumorgewebeproben von Patienten mit Mundhöhlenkarzinom sowie deren prognostischer Wert als Biomarker.
2. Der prospektive Nachweis von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Makrophagen (EDIM-Technologie) in einer Kohorte von Tumorpatienten als diagnostischen Bluttest.
3. Den Hinweis, dass die Entnahme von Biopsien durch die Detektion von Biomarkern wie DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Makrophagen die Tumordiagnostik-/therapie ergänzen (postoperative Qualitätskontrolle im Sinne einer R0-Resektion) können.

Daher ergeben sich für die vorliegende Untersuchung folgende Fragestellungen:

1. Ist der Nachweis von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Tumorgewebeproben mit der Prognose (klinisch-pathologische Verlaufparameter, tumorspezifisches Überleben) von Tumorpatienten assoziiert?
2. Ist der Nachweis von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Makrophagen (EDIM-Test) als ergänzender diagnostischer Test für Tumorpatienten geeignet?

3. Kann der DNaseX (Apo10) und TKTL1-EDIM-Test als diagnostisches Tool als postoperative Qualitätskontrolle im Sinne einer R0-Resektion die bisherige Tumorthherapie ergänzen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Patientenkollektiv

Die Studie erfasst *retrospektiv* ein Kollektiv von insgesamt 161 Patienten (n=161) mit histologisch gesichertem oralen Plattenepithelkarzinom, die in einem Zeitintervall von 10 Jahren in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen behandelt und nachbeobachtet wurden [47]. Gewebeproben von 10 gesunden Personen (n=10) mit normaler Mundschleimhaut dienten als Kontrollen. Die histologische Einteilung wurde entsprechend der 7. Auflage der Union International Contere le Cancer – TNM Klassifikation bestimmt [26, 27]. Das Kollektiv umfasste R0-resezierte Patienten der UICC-Stadien I-IV, die mit kurativer Absicht operiert wurden. Informationen über den Status der Resektionsränder wurden der endgültigen histopathologischen Auswertung entnommen. Tumorfremie Resektionsränder von 10mm oder mehr wurden als tumorfrei (R0) eingestuft. Die Tumoren wurden nach Lokalisation, Tumorgöße und Differenzierungsgrad klassifiziert. Die mittlere Nachbeobachtungszeit lag bei 52 Monaten mit einer Standardabweichung von  $\pm 38,9$  Monaten. Patienten- und Tumorcharakteristiken sind in **Tabelle 4** (S.31) zusammengestellt. Die Tumorproben, wie auch das normale Gewebe, wurden mit Einverständniserklärung der Patienten sofort nach chirurgischer Resektion gesammelt (Genehmigung der Ethikkommission, Zulassungsnummer 001/2012BO219). Das verwendete Gewebe war formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE; formalin-fixed, paraffin-embedded) Archivmaterial aus der histopathologischen Routinearbeit, welches unter standardisierten Bedingungen hergestellt wurde. Die Diagnose des oralen Plattenepithelkarzinoms wurde von der Abteilung für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen bestätigt. Die Auswahl geeigneter Gewebeproben wurde von erfahrenen Pathologen anhand von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Routinepräparaten getroffen. Ungeachtet des vorangegangenen histopathologischen Befundes wurden die Präparate aller verfügbaren Tumorproben der ausgewählten Patienten einer intensiven histopathologischen Beurteilung unterzogen. Die Follow-up-Daten stammten aus dem lokalen Tumorregister. Diese Daten wurden vom letzten ambulanten

Besuch oder dem Datum des Auftretens eines lokoregionären Rezidives oder des Tumor-spezifischen Todes generiert.

Die Stadienbestimmung (Tumorstaging) wurde nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC von 2010 durchgeführt [26, 27]. Das Grading wurde nach WHO-Kriterien durchgeführt [26, 27]. Tumor-Charakteristika (UICC-Stadium, pT-Kategorien, pN-Kategorien, cM-Kategorien, R-Status) und Patienteneigenschaften (Geschlecht, Alter, Anamnese, bisherige Behandlung) wurden in einer Datenbank (Excel, Microsoft) gespeichert.

Die Studie analysierte zudem *prospektiv* 50 Patienten mit histologisch gesichertem oralem Plattenepithelkarzinom (n=50) mithilfe des EDIM-Bluttests und außerdem eine Kontrollgruppe gesunder Blutspender (n=74) (Genehmigung der Ethikkommission, Zulassungsnummer 023/2013BO2).

### **3.2 Immunhistochemie (IHC) und Quantifizierung**

Durch die Immunhistochemie können bestimmte Proteine (Antigene) in einer Gewebeprobe sichtbar gemacht werden. Zunächst wurden von den Gewebeproben mittels Mikrotom Serienschritte von 2µm Dicke hergestellt und auf adhäsive Objektträger (Hartenstein, Würzburg) aufgebracht. Diese Präparate wurden in Xylol (2x10 Minuten, J.T. Baker, Deventer, Niederlande) entparaffiniert sowie einer absteigenden Alkoholreihe (3 Minuten 100% Ethanol, 3 Minuten 90% Ethanol, 3 Minuten 80% Ethanol, 3 Minuten 70% Ethanol) und anschließend mit Wasser rehydratisiert.

Um die Antigenbindung zu verbessern, bzw. wieder zu ermöglichen, welche durch die Formalinfixierung teilweise verloren gegangen war, wurde das Gewebe zunächst hitzeinduziert demaskiert (HIER; heat induced epitope retrieval). Für das HIER wurden die Präparate 10 Minuten in einem Dampfgarer in Citratpuffer pH=6 (Dako, Hamburg, Deutschland) gekocht. Dadurch wurden Quervernetzungen der Epitope, welche durch die Formalinfixierung und Paraffineinbettung entstanden und die Antigenität stören, wieder rückgängig gemacht. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Präparate bei Raumtemperatur 20 Minuten in Normalserum (2%) und Rindersealbumin (BSA) (0,5%) inkubiert. Außerdem wurde das Gewebe für 5 Minu-

ten in eine 3% Wasserstoffperoxid-Lösung gestellt, um endogene Peroxidasen zu blocken. Endogenes Biotin wurde durch die Verwendung des Avidin/Biotin Blocking Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) geblockt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit den unkonjugierten Primärantikörpern oder den Kontrollantikörpern (**Tabelle 5**, S.23) verdünnt in Dako REAL® Antikörperverdünnungslösung (Dako, Hamburg) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Hernach wurde ein Biotin-konjugierter affinitätsgereinigter Esel anti-Maus oder Esel Anti-Ratte IgG Antikörper 20 Minuten inkubiert. Dabei handelt es sich um einen biotinylierten Sekundärantikörper, der einen Komplex mit an Meerrettichperoxidase (HRP; horseradish peroxidase) konjugierten Streptavidinmolekülen (LSAB2 System, Dako, Hamburg) im Folgeschritt bildet. Daraufhin wurde das Gewebe für 5 Minuten mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Biogenex, San Ramon, USA) inkubiert. HRP oxidiert das Chromogen zu einem braunen Endprodukt. Schließlich wurden die Präparate mit Hämalaun gegengefärbt und mit Glycergel (Dako, Hamburg) eingedeckt.

Für die immunhistochemische Analyse wurden zwei monoklonale anti-DNaseX (Deoxyribonucleasel-like 1, DNaseI-like 1) Antikörper verwendet: Apo10 (TAVARTIS GmbH, Hainburg, Deutschland, Ratte anti-Human) und ab54750 (Abcam, Cambridge, UK, Maus anti-Human).

Darüber hinaus kamen monoklonale anti-TKTL1 Antikörper (TAVARTIS GmbH, Hainburg, Deutschland, Maus anti-Human) und Isotyp-Kontroll-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) zum Einsatz. Die Sequenzspezifität des Apo10-Antikörpers wurde durch Vorinkubation mit immunogenem DNaseX-Peptid nachgewiesen.

**Tabelle 5:** Zusammenfassende Darstellung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie, sowie Angaben über Verdünnung, Herkunft und Hersteller der Antikörper. AP, alkalische Phosphatase; HRP, horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase).

| Zielprotein                            | Herkunft                 | Verdünnung       | Firma   |
|--|--------------------------|------------------|---|
| DNaseX (Apo10)                         | Ratte (monoklonal)       | 1:100 (5µg/ml)   | TAVARTIS GmbH (Hainburg, Deutschland)                       |
| DNaseX (DNaseI-like 1)                 | Maus (monoklonal)        | 1:100 (10µg/ml)  | Abcam (Cambridge, UK)                                       |
| TKTL1                                  | Maus (monoklonal)        | 1:100 (5µg/ml)   | TAVARTIS GmbH (Hainburg, Deutschland) Klon JFC12T10 [73]    |
| Isotyp-Kontrollantikörper              | Maus, Ratte (monoklonal) | 1:50 (5-10µg/ml) | BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)                     |
| Sekundärantikörper-Biotin (Anti-Maus)  | Esel                     | 1:200 (5µg/ml)   | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Suffolk, England) |
| Sekundärantikörper-Biotin (Anti-Ratte) | Esel                     | 1:200 (5µg/ml)   | Jackson ImmunoResearch laboratories Inc. (Suffolk, England) |
| Sekundärantikörper-AP (Anti-Ratte)     | Esel                     | 1:200 (5µg/ml)   | Jackson ImmunoResearch laboratories Inc. (Suffolk, England) |
| Sekundärantikörper-HRP (Anti-Maus)     | Esel                     | 1:200 (5µg/ml)   | Jackson ImmunoResearch laboratories Inc. (Suffolk, England) |

In den immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten wurden jeweils fünf repräsentative Vergrößerungsfelder („high-power fields“, 1 HPF=0.237 mm<sup>2</sup>, x200 Vergrößerung) ausgewählt und die Anzahl der TKTL1 positiven Tumorzellen zunächst Beobachter-assoziiert semiquantitativ analysiert. Definiert als Prozentsatz immunhistochemisch TKTL1 positiver Tumorzellen in Bezug auf immunhistochemisch TKTL1 negative Tumorzellen, wurde das Ergebnis auf einer Skala von 0 bis 3 wie folgt bestimmt: 0, <10%, 1, 10-30%, 2, 30-60%, 3, >60%. Die Signalintensitäten wurde mit 1+, 2+ und 3+ bestimmt. Anschließend wurde eine kombinierte Punktzahl (0-9) für jede Probe durch Multiplizieren der Werte dieser beiden Gruppen berechnet [74]. TKTL1 positive Proben wurden mit 1-9 Punkten, TKTL1 negative Proben mit 0 Punkten bewertet. Das Ergebnis der Auszählung in repräsentativen Vergrößerungsfeldern wurde ebenfalls von einem weiteren unabhängigen Untersucher bestimmt.

Darüber hinaus wurde eine Computer-assistierte semiquantitative Analyse der TKTL1 Expression durch ImageJ Software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) mit dem „Immunomembrane-Plug-in“ (<http://imtmicroscope.uta.fi/immunomembrane>) verwendet. Damit konnte eine semiquantitative Analyse von TKTL1 positiven Gewebeproben in identischen Vergrößerungsfeldern durch angefertigte JPEG-Bilder (Fotos) erstellt werden. Hieraus ergab sich ebenfalls eine kombinierte Punktzahl (0-20) für jede Probe durch Addieren (als fester Programmalgorithmus) dieser Werte, die sich aus Vollständigkeit der Färbung (0-10 Punkte) und Signalintensität (0-10 Punkte) berechnete [75]. TKTL1 positive Proben wurden mit 1-20 Punkten, TKTL1 negative Proben mit 0 Punkten bewertet.

Die DNaseX (Apo10) Expression wurde ebenfalls in jeweils fünf repräsentativen Vergrößerungsfeldern durch zwei unabhängige Untersucher quantitativ analysiert und als Prozentsatz immunhistochemisch Apo10 positiver Tumorzellen in Bezug auf immunhistochemisch Apo10 negative Tumorzellen bestimmt. Darüber hinaus wurde eine Computer-assistierte quantitative Analyse der Apo10 Expression durch ImageJ Software mit dem „Immunoratio-Plug-in“ (<http://imtmicroscope.uta.fi/immunoratio>) analysiert und das Ergebnis in Prozent ausgedrückt [76].

Alle Fotos wurden mit einer Canon-Kamera (Krefeld, Deutschland) aufgenommen und in den Microsoft Office Picture Manager importiert.

### **3.3 Zellkultur und Immunzytochemie (ICC)**

Als Positivkontrolle der DNaseX (Apo10) und TKTL1 Expression wurden Tumor-Zelllinien BICR3 und BICR56 (European Collection of Cell Cultures, ECACC) [77] durch Immunzytochemie (ICC) an Zytospins ( $1 \times 10^4$  Tumorzellen) analysiert. Die Zytospins wurden 10 Minuten in Aceton (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) fixiert und dann 5 Minuten getrocknet [78]. Die immunzytochemische Färbung erfolgt nach oben genannter Prozedur analog zur IHC. BICR3 und BICR56-Zellen wurden in DMEM F-12-Medium (Invitrogen, Belgien) mit 10% FCS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 1% Fungizid und Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C und 5% CO kultiviert.



### **3.4 Immunhistochemische und immunzytochemische Doppelfärbung**

Eine sequentielle Doppelfärbung (Co-Expression) wurde für DNaseX (Apo10) mit TKTL1 analysiert. Als Sekundärantikörper für die IHC/ICC-Doppelfärbung von Apo10 wurden ein mit alkalischer Phosphatase (AP)-konjugierter affinitäts-gereinigter Esel anti-Ratte IgG sowie für TKTL1 ein HRP-konjugierter affinitäts-gereinigter Esel anti-Maus IgG (Jackson ImmunoResearch, **Tabelle 5**, S.23) verwendet.

Hierzu erfolgte die Inkubation des ersten Primärantikörpers Apo10 oder des Kontrollantikörpers über Nacht bei 4°C, gefolgt von der Inkubation mit AP-konjugiertem Sekundärantikörper. Daraufhin wurde das Gewebe für 20 Minuten mit Fast Red (Biogenex, San Ramon, USA) inkubiert. AP oxidiert das Chromogen zu einem roten Endprodukt. Anschließend wurden die Objektträger mit dem zweiten Primärantikörper TKTL1 oder Kontrollantikörper über Nacht bei 4°C und anschließend mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Daraufhin wurde für max. 5 Minuten DAB (Biogenex, San Ramon, USA) appliziert und die ausreichende Entwicklung der braunen Färbung lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun und das Eindecken der Präparate mit Glycergel (Dako, Hamburg).

### **3.5 Durchflusszytometrie von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Tumor-Zelllinien und EDIM-Bluttest**

Grundlage einer Durchflusszytometrie ist eine (gefärbte) Einzelzellsuspension, die einzeln einen fokussierten Laserstrahl passiert. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Bei der Messung werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und gelangen einzeln in die Durchflusszelle (flow cell), in der sie durch Laserlicht angeregt werden. Detektiert wird zum einen die Lichtstreuung, zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht z.B. der mit Apo10 und TKTL1-Antikörper-gekoppelten Fluorophore.

Als Positivkontrolle der Apo10 und TKTL1 Expression wurden Tumor-Zelllinien BICR3 und BICR56 gemäß Herstellerangaben [4, 46] durchflusszytometrisch ( $1 \times 10^6$  Tumorzellen) analysiert. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte

oder Phycoerythrin (PE)-konjugierte Apo10 und TKTL1-Antikörper wurden durch TAVARLIN AG (Pfungstadt, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Beim EDIM-Test wurden zusätzlich zu FITC- oder PE-konjugierten Apo10 und TKTL1-Antikörpern, Allophycocyanin (APC)-konjugierte CD14/CD16 Makrophagen-spezifische Antikörper eingesetzt um den Anteil Apo10 und TKTL1 positiver Makrophagen im Blut zu bestimmen [47, 71].

### **3.6 Bestimmung der EDIM-Scores**

Die Auswertung des EDIM Tests beschreibt die relative Anzahl CD14+/CD16+ Monozyten, die Apo10 oder TKTL1 positiv sind, verglichen mit der Gesamtzahl aller gemessenen CD14+/CD16+ Monozyten der Blutprobe, multipliziert mit dem Faktor 10. Eine Apo10-Score von 139 bedeutet, dass 13,9% der CD14+/CD16+ Monozyten Apo10 positiv sind [4, 46]. Das Analyseverfahren und die Ergebnisse des EDIM-Tests wurden durch ein externes Institut (Dr. Steffen Schmitt, Leiter der Zytometrie Core Facility FACS® am Deutschen Krebsforschungszentrum, DKFZ) validiert [47].

### **3.7 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse erfolgte durch die MedCalc Software, Version 12.7.0 (Mariakerke, Belgien). Die Überlebenszeit wurde als die Zeit von der Tumorresektion bis zum Wiederauftreten einer tumorbedingten Erkrankung (lokoregionäres Rezidiv/tumorbedingter Tod) bestimmt. Die Überlebensrate in Bezug auf die Untersucher-assoziierte (semi-)quantitative Auswertung der DNaseX (Apo10) und TKTL1-Markierung der Mundhöhlenkarzinome wurde univariat mit der Kaplan-Meier Methode ermittelt [79]. Der Cut-off Wert immunhistochemisch Apo10- und TKTL1 positiver, versus Apo10- und TKTL1 negativer Gewebeproben wurde bei 10% festgelegt (s.o.). Zur Analyse der Signifikanz bei univariater Überlebensanalyse der Apo10- und TKTL1 Markierung wurde die Log-Rank-Teststatistik [80] verwendet. Die multivariate Analyse aller Faktoren, die signifikante Unterschiede bei univariater Analyse ergaben, wurde durch das Cox-Hazard-Modell analysiert [81]. Um Assoziationen oder Unterschiede der quantitativen Auswertung Apo10- und TKTL1 markierter Tumoren mit klinischen Merkmalen zu analysieren, wurde der Chi-Quadrat-Vierfeldertest

( $\chi^2$ -Test) durchgeführt. Falls die Voraussetzungen hierfür nicht erfüllt waren (z.B. wegen zu kleiner Stichprobengröße) wurde der exakte Fisher-Test (Fisher-Yates-Test, exakter Chi-Quadrat-Test) verwendet. Die Reproduzierbarkeit (Reliabilität) bei der Übereinstimmung der Beobachter-assoziierten vs. Computer-assistierten Auswertung wurde mittels des nicht-parametrischen Kendall's tau ( $\tau$ ) Korrelationskoeffizienten durchgeführt, weil dieser Koeffizient keine lineare Beziehung zwischen beiden Methoden/Variablen voraussetzt.

Die prospektiv durchgeführte Diagnosestudie (Pilotstudie) mittels EDIM-Bluttest an 50 Patienten mit Mundhöhlenkarzinom dient dazu, die Validität von DNaseX (Apo10)- und TKTL1 im Blut als diagnostischen Tests zu untersuchen und dessen Spezifität und Sensitivität zu ermitteln. Außerdem benötigt man einen Standard, mit dem der Krankheitsstatus einer Person zweifelsfrei festgestellt werden kann. Zu den Gütekriterien eines diagnostischen Verfahrens zählen die Validität und die Reliabilität. Die Validität ist die Fähigkeit eines diagnostischen Systems, zwischen Patienten mit Mundhöhlenkarzinom und tumorfreien Patienten (gesunde Blutspender oder Tumorpatienten mit z. n. kurativer R0-Resektion) durch einen Schwellenwert für DNaseX (Apo10)- und TKTL1 als Serumbiomarker zu unterscheiden. Die Validität eines diagnostischen Systems wird durch Sensitivität und die Spezifität bestimmt. Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Analysen [82] wurde bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts in der Medizin eingesetzt und etablierte sich dort als Analyse-Verfahren in der Krankheitsdiagnostik. Das Finden einer Diagnose kann man als Folge von binären Einzelentscheidungen (Tumorerkrankung: ja/nein) auffassen. Bei diesen Einzelunterscheidungen werden diagnostische Tests eingesetzt, die zwischen zwei Zuständen entscheiden sollen: Krankheit vorhanden/nicht vorhanden. Entsprechend ist auch das Testresultat eine Ja/Nein-Aussage: krank (=positiv)/nicht krank (=negativ). Bei Tests mit quantitativen Ergebnissen, wie z.B. bei Laborwerten, erfolgt die Überführung in eine solche binäre Aussage mit einem Trennwert (Cut-Off Wert). Der diagnostische Test weist eine Trennschärfe auf, wenn sich die Kurve signifikant von der Diagonalen (links unten-rechts oben) unterscheidet. Im Idealfall (100%ige Trennschärfe) liegt die Kurve auf der linken bzw. oberen Begrenzungs-Seite des umschließenden Quadrates. Je größer

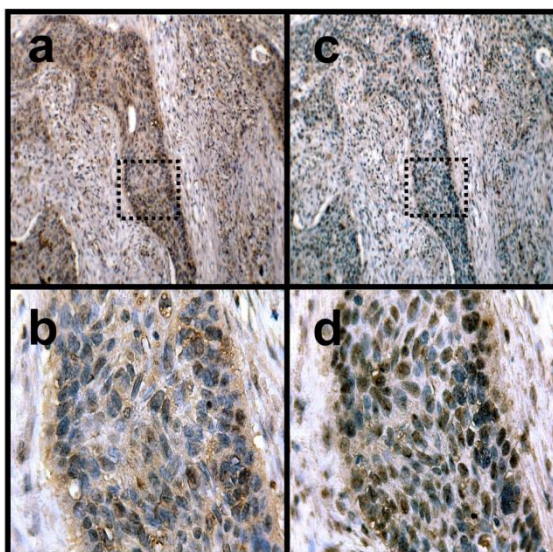
also der Abstand der ROC-Kurve von der Diagonalen, desto besser die Trennschärfe des Tests. Ein Maß für die Güte des Tests (Qualitätskontrolle) ist die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC: Area under Curve). Die Fläche kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen, wobei ein höherer Wert die bessere Güte anzeigt. AUC berechnet man am einfachsten mit der sogenannten Trapezmethode, die im Allgemeinen die Fläche gut abschätzt. Der Cut-off Wert ist ein Schwellenwert, der den pathologischen vom physiologischen (gesunden) Bereich trennt, bzw. den Bereich der beiden Biomarker ermittelt, der als Therapieerfolg einer R0-Resektion (postoperative Verlaufskontrolle) gewertet werden kann. Um die Unterschiede der EDIM-Apo10 und EDIM-TKTL1 Scores von gesunden oder kurierten Personen nach Tumorerkrankung zu ermitteln, wurde daher eine ROC-Analyse mit gesunden Blutspendern als Kontrollen durchgeführt. Als Schwellenwert (Cut-off Wert) wurde der Punkt mit der höchsten diagnostischen Sensitivität und Spezifität (höchste diagnostische Genauigkeit) bestimmt. Als Cut-off Werte wurden für EDIM-Apo10 ein Score von  $>109$  bestimmt und für EDIM-TKTL1 ein Score von  $>117$  ermittelt. Der kombinierte Cut-off Wert beider EDIM-Scores (Summe aus EDIM-Apo10 und-TKTL1-Score) wurde bei  $>227$  bestimmt und entspricht dem Score mit dem höchsten Youden-Index. P-Werte  $<0,05$  wurden statistisch als signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Immunhistochemische Analyse von DNaseX

Für die immunhistochemische Analyse der DNaseX Expression im Tumorgeewebe wurden zwei monoklonale Antikörper eingesetzt. **Abbildung 4** (S. 29) zeigt eine spezifische zytoplasmatische und fokal nukleäre Färbung des Antikörpers ab54750 in Tumor- und Stromazellen. In malignen Zellen wurde im Vergleich zu Normalgewebe (normale Mundschleimhaut) eine Überexpression der DNaseX nachgewiesen. Die DNaseX-Färbung mit dem Antikörper ab54750 war auch in den Zellen der gesunden menschlichen Mundschleimhaut (n=6/10 Proben) nachweisbar.

Apo10 wurde im Normalgewebe (normale Mundschleimhaut) nicht exprimiert. Tumorzellen zeigten hingegen eine starke nukleäre Expression von Apo10 (**Abbildung 4**, S.29).

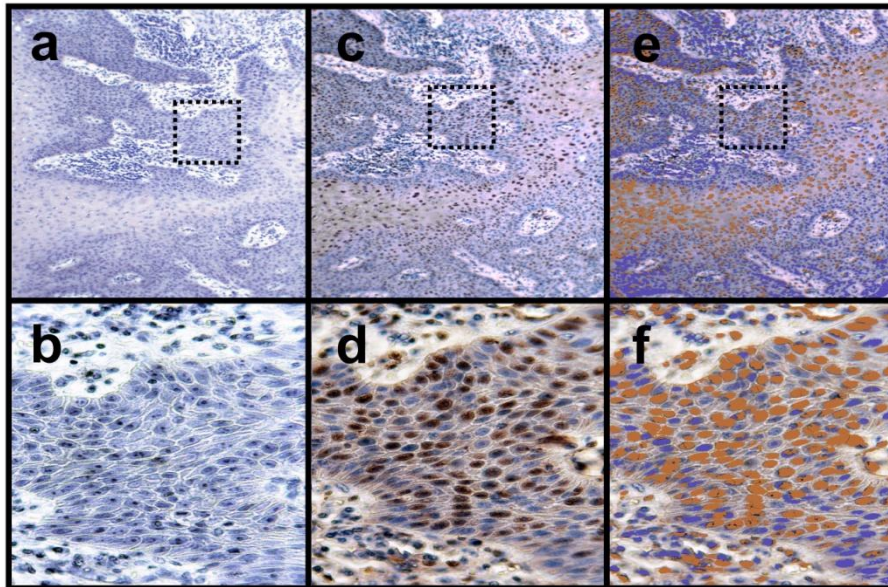


**Abb. 4:** Die immunhistochemische DNaseX-Analyse der ab54750 Färbung im Vergleich zur Apo10 Färbung. Der Antikörper ab54750 weist ein zytoplasmatisches und ein nukleäres Färbemuster auf (a, b), wohingegen die Apo10 Färbung fast ausschließlich im Zellkern nachweisbar ist (c, d). Die blaue Farbe entspricht der Haemalaun Kerngegenfärbung. Vergrößerung x100 (a, c) und x400 (b, d)

### 4.2 Assoziation klinisch-pathologischer Verlaufsparemeter mit DNaseX (Apo10) Expression

Der Cut-off Wert immunhistochemisch Apo10 positiver versus Apo10 negativer Gewebeproben wurde bei der semiquantitativen Analyse der DNaseX Expression bei >10% festgelegt. Die immunhistochemische Markierung der DNaseX (Apo10) wurde in 82% der Tumoren (n=132/161) nachgewiesen (**Abbildung 5**, S.30). **Tabelle 4** (S.31) zeigt die klinisch-pathologischen Verlaufsparemeter und

prognostische Faktoren von 161 Patienten mit Mundhöhlenkarzinom mit positiver und negativer DNaseX Expression im Tumorgewebe. Eine positive DNaseX (Apo10) Expression in Tumorproben war signifikant mit der Tumorgröße ( $pT3/4$ ,  $p=0,0194$ ) und fortgeschrittenen Tumorstadien (UICC III/IV,  $p<0,0025$ ) assoziiert.



**Abb. 5:** Darstellung der DNaseX beim oralen Plattenepithelkarzinom durch Immunhistochemie: a, b, Kontrolle - Spezifitätsnachweis: Blockierung des AK mit DNaseX Sequenz-spezifischem Peptid, keine Färbung; c, d, nukleäre DNaseX Expression (braun, Diaminobenzidin); e, f, DNaseX positive Tumorzellen analysiert durch ImageJ software (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) mit Immunratio-Plug-in. Pseudokoloriertes Farbbild der semiquantitativen Auswertung (e, f), Vergrößerung x100 (a, c, e, oben) und x400 (b, d, f, unten). FFPE, formalin-fixed paraffin embedded; AK, Antikörper.

#### 4.3 Vergleich der Beobachter-assoziierten quantitativen Auswertung der DNaseX (Apo10) Expression mit der Computer-assistierten Analyse

Um die Zuverlässigkeit beider Analyseverfahren (Beobachter-assoziierte quantitative Auswertung vs. Computer-assistierte Analyse) zu demonstrieren, wurde eine Korrelationsanalyse der Ergebnisse durchgeführt. Es bestand eine signifikante Korrelation beider Quantifizierungsmethoden (Apo10 Expression:  $r=0,868$ ;  $p<0,0001$ ).

**Tab. 4: Klinisch-pathologische Verlaufsparemeter sowie Apo10 und TKTL1 Expression von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom (n=161).**

| Eigenschaften             | Patientenzahl       |  | p-Wert    | Patientenzahl                                     |  | p-Wert     |
|---------------------------|---------------------|--|-----------|---|--|------------|
|                           | Gesamtzahl<br>n=161 | Apo10 Expression<br>negativ (<10%)<br>n=29 (18%) |           | Apo10 Expression<br>positiv (≥10%)<br>n=132 (82%) | TKTL1 Expression<br>negativ (<10%)<br>n=93 (58%) |            |
| Alter (Jahre)             |                     |  | 0.9050    |   |  | 0.2624     |
| <62                       | 90 (55.9%)          | 17 (19%)   |           | 48 (53%)  | 42 (47%)   |            |
| ≥62                       | 71 (44.1%)          | 12 (17%)   |           | 45 (63%)  | 26 (37%)   |            |
| Geschlecht                |                     |  | 0.8016    |   |  | 0.4501     |
| männlich                  | 122 (75.8%)         | 23 (19%)   |           | 73 (60%)  | 49 (40%)   |            |
| weiblich                  | 39 (24.2%)          | 6 (15%)  |           | 20 (51%)  | 19 (49%)   |            |
| Tumorklassifikation       |                     |  | 0.8991    |   |  | 0.8782     |
| Lippen                    | 11 (6.8%)           | 3 (27%)  |           | 9 (82%)   | 2 (18%)  |            |
| Zunge                     | 41 (25.5%)          | 8 (20%)  |           | 21 (51%)  | 20 (49%)   |            |
| Mundboden                 | 64 (39.8%)          | 10 (16%)   |           | 37 (58%)  | 27 (42%)   |            |
| Gaumen                    | 15 (9.3%)           | 0 (0%)   |           | 6 (40%)   | 9 (60%)  |            |
| Wangenschleimhaut         | 8 (5.0%)            | 3 (38%)  |           | 6 (75%)   | 2 (15%)  |            |
| Alveolarkamm              | 22 (13.7%)          | 5 (23%)  |           | 14 (64%)  | 8 (36%)  |            |
| Grading                   |                     |  | 0.4765*   |   |  | 0.7396*    |
| G1                        | 41 (25.5%)          | 10 (24%)   |           | 23 (56%)  | 18 (44%)   |            |
| G2                        | 106 (65.8%)         | 15 (14%)   |           | 63 (59%)  | 43 (41%)   |            |
| G3                        | 13 (8.1%)           | 3 (23%)  |           | 6 (46%)   | 7 (54%)  |            |
| G4                        | 1 (0.6%)            | 1 (100%)   |           | 1 (100%)  | 0 (0%)   |            |
| TumorgroÙe                |                     |  | 0.0194**  |   |  | 0.0018**   |
| pT1                       | 64 (39.8%)          | 14 (22%)   |           | 46 (72%)  | 18 (28%)   |            |
| pT2                       | 42 (26.1%)          | 11 (26%)   |           | 25 (59%)  | 17 (41%)   |            |
| pT3                       | 17 (10.6%)          | 0 (0%)   |           | 5 (29%)   | 12 (71%)   |            |
| pT4                       | 38 (23.6%)          | 4 (11%)  |           | 17 (45%)  | 21 (55%)   |            |
| Lymphknotenmetastasierung |                     |  | 0.5638    |   |  | 0.0008     |
| pN0                       | 118 (73.3%)         | 23 (19%)   |           | 78 (66%)  | 40 (34%)   |            |
| pN1-3                     | 43 (26.7%)          | 6 (14%)  |           | 15 (35%)  | 28 (65%)   |            |
| UICC Stadium              |                     |  | 0.0025*** |   |  | <0.0001*** |
| UICC I                    | 48 (29.8%)          | 12 (25%)   |           | 42 (88%)  | 6 (12%)  |            |
| UICC II                   | 36 (22.4%)          | 11 (31%)   |           | 23 (64%)  | 13 (36%)   |            |
| UICC III                  | 31 (19.3%)          | 1 (3%)   |           | 11 (35%)  | 20 (65%)   |            |
| UICC IV                   | 46 (28.6%)          | 5 (11%)  |           | 17 (37%)  | 29 (63%)   |            |
| Lokoregionäres Rezidiv    |                     |  | 0.0125    |   |  | <0.0001    |
| nein                      | 117 (72.7%)         | 27 (23%)   |           | 81 (69%)  | 36 (31%)   |            |
| ja                        | 44 (27.3%)          | 2 (5%)   |           | 12 (27%)  | 32 (73%)   |            |

UICC, International Union against Cancer; \*G1/2 vs. G3/4; \*\*pT1/2 vs. pT3/4; \*\*\*UICC I/II vs. UICC III/IV

#### 4.4 Prognostische Wertigkeit von DNaseX (Apo10)

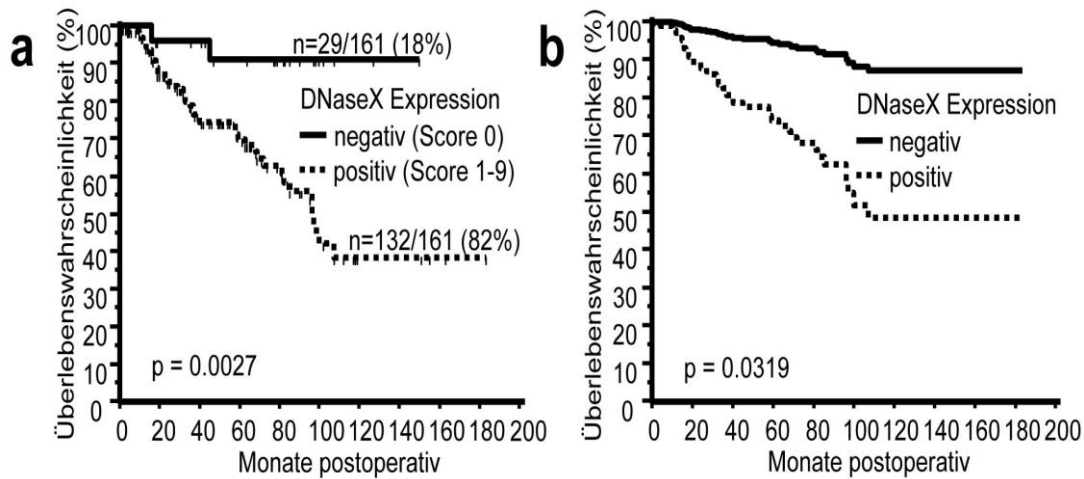
Um Unterschiede im Überleben von Patienten mit Mundhöhlenkarzinom nach erfolgreicher kurativer chirurgischer (R0) Resektion zu analysieren, wurden die Patienten in zwei Subgruppen (positive und negative Apo10 Expressoren, dichotome Variablen) unterteilt.

Das Überleben in der Subgruppe mit positiver Apo10 Expression (Apo10+: n=132, p=0,0027, HR=6,4509) war signifikant schlechter verglichen mit Patienten ohne Apo10 Expression (**Abbildung 6**, S.32).

Die univariate Überlebensanalyse aller (n=161) Patienten mit Mundhöhlenkarzinom zeigte Lymphknotenmetastasierung (pN1-3, HR=2,1145, p=0,0139) als wichtige Einflußgröße für schlechtes tumorbedingtes Überleben. Für fortgeschrittene TumorgroÙe (pT3/4, HR=1,3865, p=0.3080) bzw. schlechte Differenzierung des Tumors (Grading, G3/4, HR=0.9199, p=0.8885) konnte jedoch kein Zusammenhang mit dem Überleben analysiert werden.

Die multivariate Analyse nach dem Cox-Hazard-Modell demonstrierte eine positive Apo10 Expression, jedoch nicht Lymphknotenmetastasierung als unabhän-

gigen prognostischen Faktor für schlechtes tumorbedingtes Überleben: Apo10+: Exp (b) 4, 8016;  $p=0,0319$  (**Abbildung 6**, S.32); N+, pN1-3: Exp (b) 1, 5781,  $p=0,1690$ .

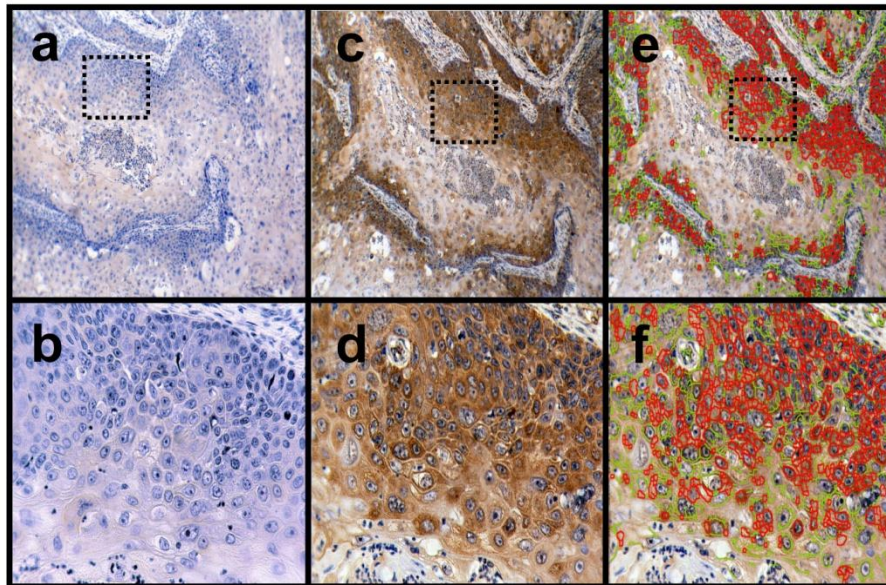


**Abb. 6** Univariate (a, Kaplan-Meier Plot) und multivariate (b, Cox-Regression) Überlebensanalyse zeigen ein signifikant schlechteres tumorfreies Überleben von Patienten mit positivem DNaseX Nachweis im Tumorgewebe.

#### 4.5 Assoziation klinisch-pathologischer Verlaufsparemeter mit TKTL1 Expression

Die immunhistochemische Analyse der TKTL1 Expression in den Tumorgewebeproben wurde mit einem spezifischen anti-TKTL1 monoklonalen Antikörper JFC12T10 durchgeführt (**Abbildung 7**, S.33). Einige Voruntersuchungen zeigten die Fähigkeit des JFC12T10 das TKTL1-Protein spezifisch zu erkennen, ohne dabei Kreuzreaktionen mit TKT oder TKTL2 einzugehen [57, 73]. Normalgewebe (normale Mundschleimhaut) zeigte keine TKTL1 Expression auf (n=0/10 Proben). In 42 % der Mundhöhlenkarzinome (n=68/161) konnte eine gesteigerte TKTL1 Expression nachgewiesen werden. **Tabelle 4** (S.31) zeigt die klinisch-pathologischen Verlaufsparemeter und prognostische Faktoren von 161 Patienten mit TKTL1 negativen und TKTL1 positiven Tumoren. TKTL1 Expression war signifikant mit Tumorgröße (pT3/4,  $p=0,0018$ ), fortgeschrittenen Tumorstadien (UICC III/IV,  $p<0,0001$ ) und Lymphknotenmetastasierung (pN1-3,  $p=0,0008$ ) assoziiert.





**Abb. 7:** Darstellung der TKTL1 Expression beim oralen Plattenepithelkarzinom durch Immunhistochemie: a, b, IgG-Kontrolle; c, d, cytoplasmatische TKTL1 Expression (braun, Diaminobenzidin); e, f, TKTL1 positive Tumorzellen analysiert durch ImageJ software (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) mit Immunomembrane-Plug-in. Pseudokoloriertes Farbbild der semiquantitativen Auswertung (e, f), Vergrößerung x100 (a, c, e, oben) und x400 (b, d, f, unten). FFPE, formalin-fixed paraffin embedded; AK, Antikörper.

#### 4.6 Vergleich der Beobachter-assoziierten quantitativen Auswertung der TKTL1 Expression mit der Computer-assistierten Analyse

Analog zur DNaseX (Apo10) Untersuchung wurde eine Korrelationsanalyse der TKTL1-Ergebnisse durchgeführt. Der Vergleich der Beobachter-assoziierten quantitativen Auswertung der TKTL1 Expression mit der Computer-assistierten Analyse zeigte eine signifikante Korrelation beider Quantifizierungsmethoden (TKTL1 Expression:  $\tau=0,886$ ,  $p<0,0001$ ).

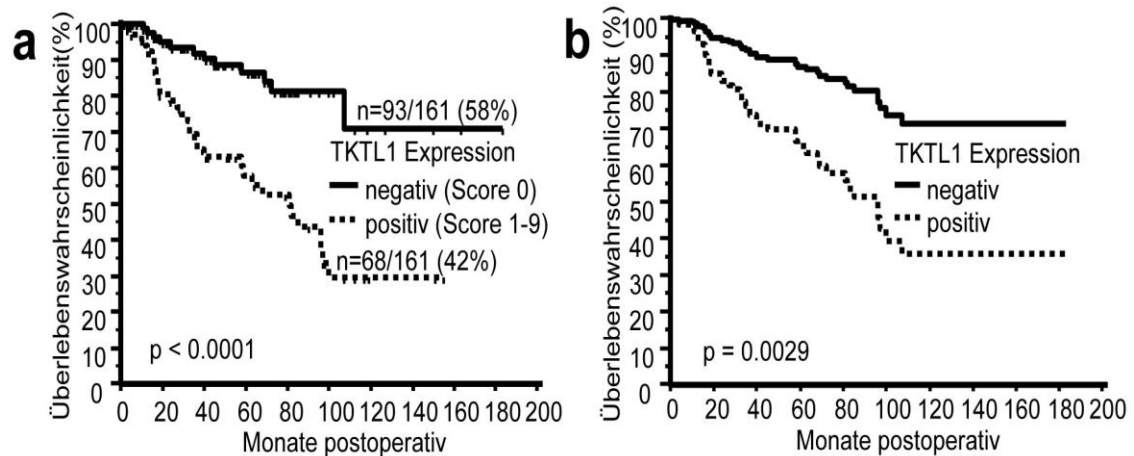
#### 4.7 Prognostische Wertigkeit von TKTL1

Um Unterschiede im Überleben von Patienten nach erfolgreicher (R0) kurativer chirurgischer Resektion von Mundhöhlenkarzinomen zu analysieren, wurden die Patienten in zwei Subgruppen (positive und negative TKTL1 Expressoren, dichotome Variablen) unterteilt.

Das Überleben in der Subgruppe mit positiver TKTL1 Expression (TKTL1+) war signifikant schlechter als das Überleben der Patienten, bei denen keine TKTL1

Expression nachgewiesen wurde (TKTL1+: n=68,  $p < 0,0001$ , HR=3,8382, **Abbildung 8**, S.34).

Multivariate Analyse nach dem Cox-Hazard-Modell zeigt, dass die positive TKTL1 Expression ein unabhängiger prognostischer Faktor in allen (n=161) Tumorgewebeproben ist. TKTL1+ : Exp ( b ) 4,9078,  $p = 0,0029$  (**Abbildung 8**, S.34).



**Abb. 8:** Univariate (a, Kaplan-Meier Plot) und multivariate (b, Cox-Regression) Überlebensanalyse zeigen ein signifikant schlechteres tumorfreies Überleben von Patienten mit positivem TKTL1 Nachweis im Tumorgewebe.

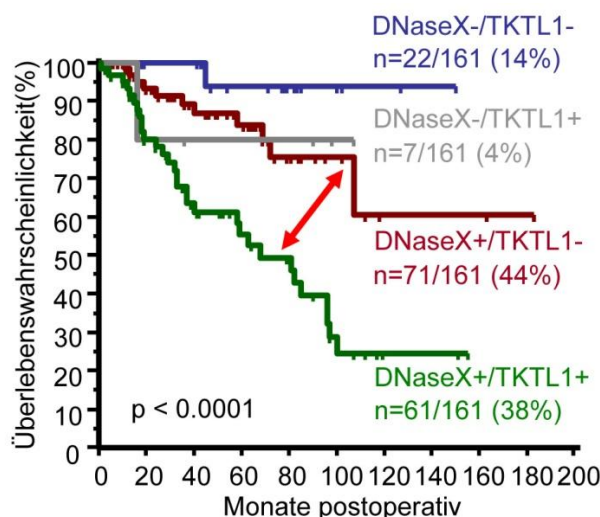
#### 4.8 Prognostische Wertigkeit der DNaseX (Apo10)/TKTL1-Subgruppen

Alle Tumorpatienten wurden in vier Subgruppen eingeteilt: Apo10-/TKTL1-, Apo10+/TKTL1-, Apo10-/TKTL1+ und Apo10+/TKTL1+. Hierbei wurde DNaseX als Biomarker für Apoptoseresistenz in Tumoren betrachtet und TKTL1 als Tumormarker für erhöhten Tumorzellmetabolismus, der mit Invasion und negativer Prognose assoziiert ist. **Tabelle 6** (S.35) zeigt die Subgruppenanalyse mit klinisch-pathologischen Verlaufsparemtern und prognoserelevanten Faktoren. Die Untergruppe mit positiver Expression beider Biomarker im Gewebe (Apo10+/TKTL1+, n=61/161, 38%) zeigte das schlechteste tumorbedingte Überleben ( $p = 0,0002$ ). Die günstigste Prognose wurde für die Subgruppe der Patienten demonstriert, die weder DNaseX-, noch TKTL1 Expression in Tumorgeweben aufwies (Apo10-/TKTL1-, n=22/161, 14%) (**Abbildung 9**, S.35).

**Tab. 6:** Apo10 und TKTL1 Subgruppenanalyse von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom (n=161).

| Eigenschaften             | Patientenzahl       |                             |                             |                           |                             | p-Wert     |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------|
|                           | Gesamtzahl<br>n=161 | Apo10-/TKTL1-<br>n=22 (14%) | Apo10+/TKTL1-<br>n=71 (44%) | Apo10-/TKTL1+<br>n=7 (4%) | Apo10+/TKTL1+<br>n=61 (38%) |            |
| Alter (Jahre)             |                     |                             |                             |                           |                             | 0.2468     |
| <62                       | 90 (55.9%)          | 13 (15%)                    | 35 (39%)                    | 4 (4%)                    | 38 (42%)                    |            |
| ≥62                       | 71 (44.1%)          | 9 (13%)                     | 36 (51%)                    | 3 (4%)                    | 23 (32%)                    |            |
| Geschlecht                |                     |                             |                             |                           |                             | 0.3179     |
| männlich                  | 122 (75.8%)         | 18 (15%)                    | 55 (45%)                    | 5 (4%)                    | 44 (36%)                    |            |
| weiblich                  | 39 (24.2%)          | 4 (10%)                     | 16 (41%)                    | 2 (5%)                    | 17 (44%)                    |            |
| Tumorlokalisation         |                     |                             |                             |                           |                             | 0.4899     |
| Lippe                     | 11 (6.8%)           | 3 (27%)                     | 6 (55%)                     | 0 (0%)                    | 2 (18%)                     |            |
| Zunge                     | 41 (25.5%)          | 5 (12%)                     | 16 (39%)                    | 3 (7%)                    | 17 (42%)                    |            |
| Mundboden                 | 64 (39.8%)          | 7 (11%)                     | 30 (47%)                    | 3 (5%)                    | 24 (37%)                    |            |
| Gaumen                    | 15 (9.3%)           | 0 (0%)                      | 6 (40%)                     | 0 (0%)                    | 9 (60%)                     |            |
| Wangenschleimhaut         | 8 (5.0%)            | 3 (37.5%)                   | 3 (37.5%)                   | 0 (0%)                    | 2 (25%)                     |            |
| Alveolarkamm              | 22 (13.7%)          | 4 (18%)                     | 10 (45%)                    | 1 (5%)                    | 7 (32%)                     |            |
| Grading                   |                     |                             |                             |                           |                             | 0.8621*    |
| G1                        | 41 (25.5%)          | 8 (19%)                     | 15 (37%)                    | 2 (5%)                    | 16 (39%)                    |            |
| G2                        | 106 (65.8%)         | 10 (9%)                     | 53 (50%)                    | 5 (5%)                    | 38 (36%)                    |            |
| G3                        | 13 (8.1%)           | 3 (23%)                     | 3 (23%)                     | 0 (0%)                    | 7 (54%)                     |            |
| G4                        | 1 (0.6%)            | 1 (100%)                    | 0 (0%)                      | 0 (0%)                    | 0 (0%)                      |            |
| Tumorgroße                |                     |                             |                             |                           |                             | 0.0002**   |
| pT1                       | 64 (39.8%)          | 14 (22%)                    | 32 (50%)                    | 0 (0%)                    | 18 (28%)                    |            |
| pT2                       | 42 (26.1%)          | 8 (19%)                     | 17 (41%)                    | 3 (7%)                    | 14 (33%)                    |            |
| pT3                       | 17 (10.6%)          | 0 (0%)                      | 5 (29%)                     | 0 (0%)                    | 12 (71%)                    |            |
| pT4                       | 38 (23.6%)          | 0 (0%)                      | 17 (45%)                    | 4 (10%)                   | 17 (45%)                    |            |
| Lymphknotenmetastasierung |                     |                             |                             |                           |                             | 0.0007     |
| pN0                       | 118 (73.3%)         | 19 (16%)                    | 59 (50%)                    | 4 (3%)                    | 36 (31%)                    |            |
| pN1-3                     | 43 (26.7%)          | 3 (7%)                      | 12 (28%)                    | 3 (7%)                    | 25 (58%)                    |            |
| UICC Stadium              |                     |                             |                             |                           |                             | <0.0001*** |
| UICC I                    | 48 (29.8%)          | 12 (25%)                    | 30 (63%)                    | 0 (0%)                    | 6 (12%)                     |            |
| UICC II                   | 36 (22.4%)          | 8 (22%)                     | 15 (42%)                    | 3 (8%)                    | 10 (28%)                    |            |
| UICC III                  | 31 (19.3%)          | 1 (3%)                      | 10 (32%)                    | 0 (0%)                    | 20 (65%)                    |            |
| UICC IV                   | 46 (28.6%)          | 1 (2%)                      | 16 (35%)                    | 4 (9%)                    | 25 (54%)                    |            |
| Lokoregionäres Rezidiv    |                     |                             |                             |                           |                             | <0.0001    |
| nein                      | 117 (72.7%)         | 21 (18%)                    | 60 (51%)                    | 6 (5%)                    | 30 (26%)                    |            |
| ja                        | 44 (27.3%)          | 1 (2%)                      | 11 (25%)                    | 1 (2%)                    | 31 (71%)                    |            |

UICC, International Union against Cancer; \*G1/2 vs. G3/4; \*\*pT1/2 vs. pT3/4; \*\*\*UICC I/II vs. UICC III/IV

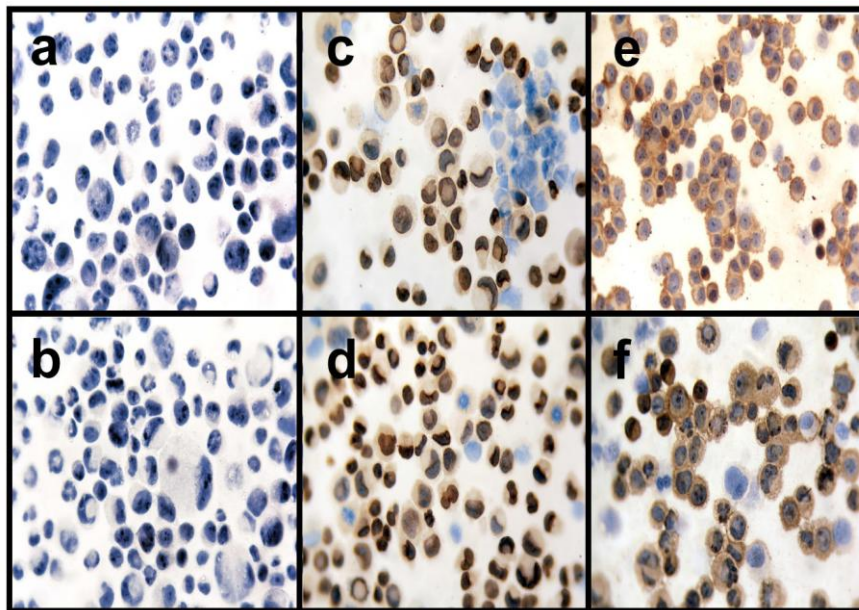


**Abb. 9:** Subgruppenanalyse der DNaseX und TKTL1 Expression beim oralen Plattenepithelkarzinom durch Immunhistochemie (n=161 FFPE samples).

Die univariate (Kaplan-Meier Plot) Überlebensanalyse zeigt ein signifikant schlechteres tumorfreies Überleben von DNaseX+ Patienten mit positiver TKTL1 Expression (grüne Linie, DNaseX+/TKTL1+) verglichen mit Patienten, die keine TKTL1 Expression (rote Linie, DNaseX+/TKTL1-) aufwiesen (roter Pfeil), bzw. negativ sind für beide Marker (blaue Linie, DNaseX-/TKTL1-).

## 4.9 Immunzytochemie

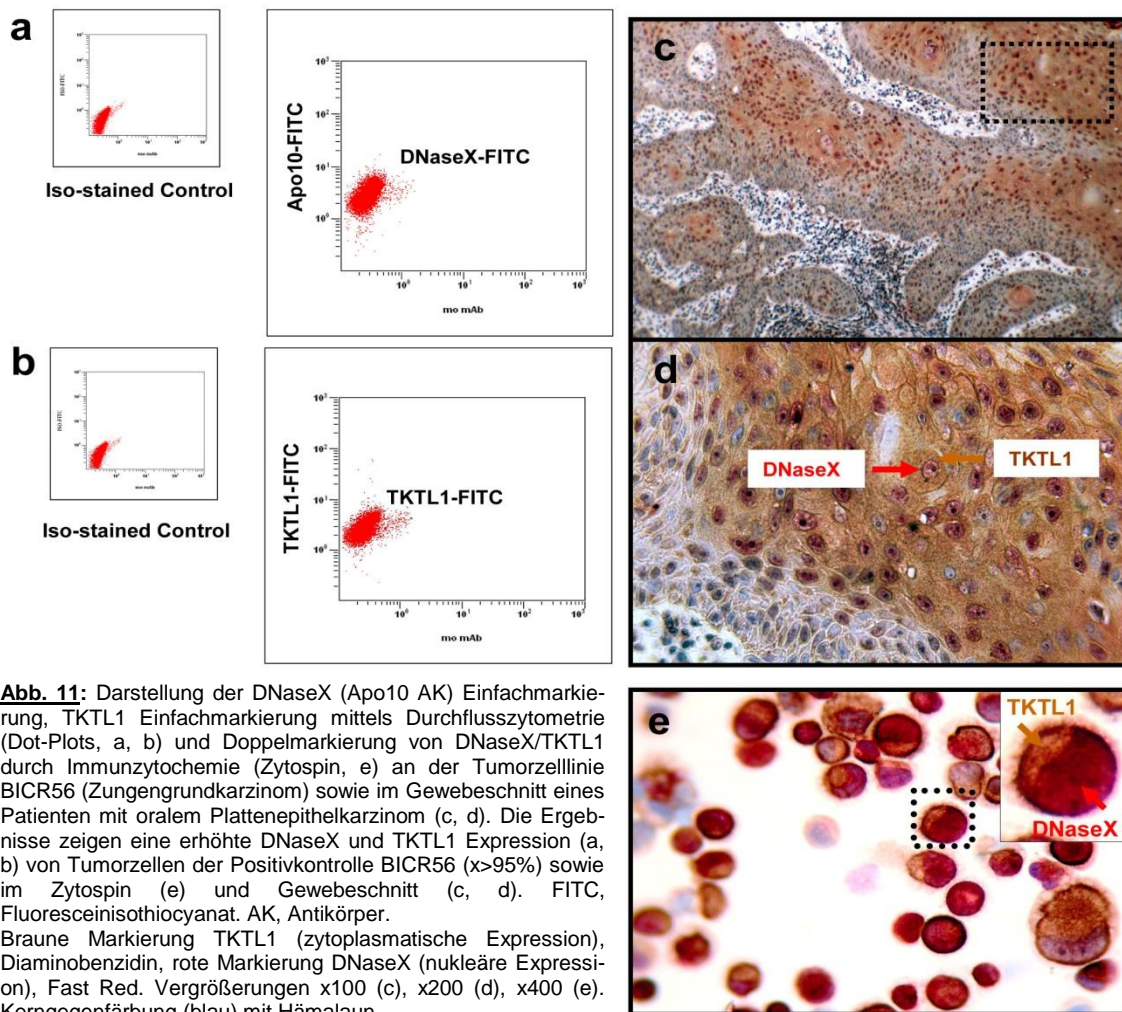
Die Einfachmarkierung der DNaseX (Apo10) und TKTL1 Expression der Tumor-Zelllinien des Mundhöhlenkarzinoms BICR3 und BICR56 in Zytospins dienten als zusätzliche Positivkontrolle und bestätigten die Expression beider Epitope in Tumorzellen (**Abbildung 10**, S.36).



**Abb. 10:** Darstellung der DNaseX (Apo10) und TKTL1 Expression an einer Tumor-Zelllinie (BICR56) durch Immunzytochemie. Die IgG-Kontrollen (a, b) zeigen keine Markierung; c, d, nukleäre DNaseX (Apo10) Expression (braun, Diaminobenzidin); e, f, cytoplasmatische TKTL1 Expression (braun, Diaminobenzidin); Vergrößerung x400.

## 4.10 Durchflusszytometrische, immunhistochemische und immunzytochemische Analyse von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Tumorzellen

Die durchflusszytometrische Untersuchung von DNaseX (Apo10) und TKTL1 an der Tumor-Zelllinie eines Zungengrundkarzinoms (BICR56) diente als weitere Positivkontrolle der Expression beider Zielmoleküle in Tumorzellen. Für die Ermittlung einer Co-Expression von DNaseX (Apo10)+/TKTL1+ in Tumorzellen wurden immunhistochemische und immunzytochemische Doppelmarkierungen (an Gewebeschnitten und Zytospins der Tumor-Zelllinie BICR56) durchgeführt (**Abbildung 11**, S.37).



**Abb. 11:** Darstellung der DNaseX (Apo10 AK) Einfachmarkierung, TKTL1 Einfachmarkierung mittels Durchflusszytometrie (Dot-Plots, a, b) und Doppelmarkierung von DNaseX/TKTL1 durch Immunzytochemie (Zytospin, e) an der Tumorzelllinie BICR56 (Zungengrundkarzinom) sowie im Gewebeschnitt eines Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom (c, d). Die Ergebnisse zeigen eine erhöhte DNaseX und TKTL1 Expression (a, b) von Tumorzellen der Positivkontrolle BICR56 ( $x > 95\%$ ) sowie im Zytospin (e) und Gewebeschnitt (c, d). FITC, Fluoresceinisothiocyanat. AK, Antikörper. Braune Markierung TKTL1 (zytoplasmatische Expression), Diaminobenzidin, rote Markierung DNaseX (nukleäre Expression), Fast Red. Vergrößerungen x100 (c), x200 (d), x400 (e). Kerngegenfärbung (blau) mit Hämalaun.

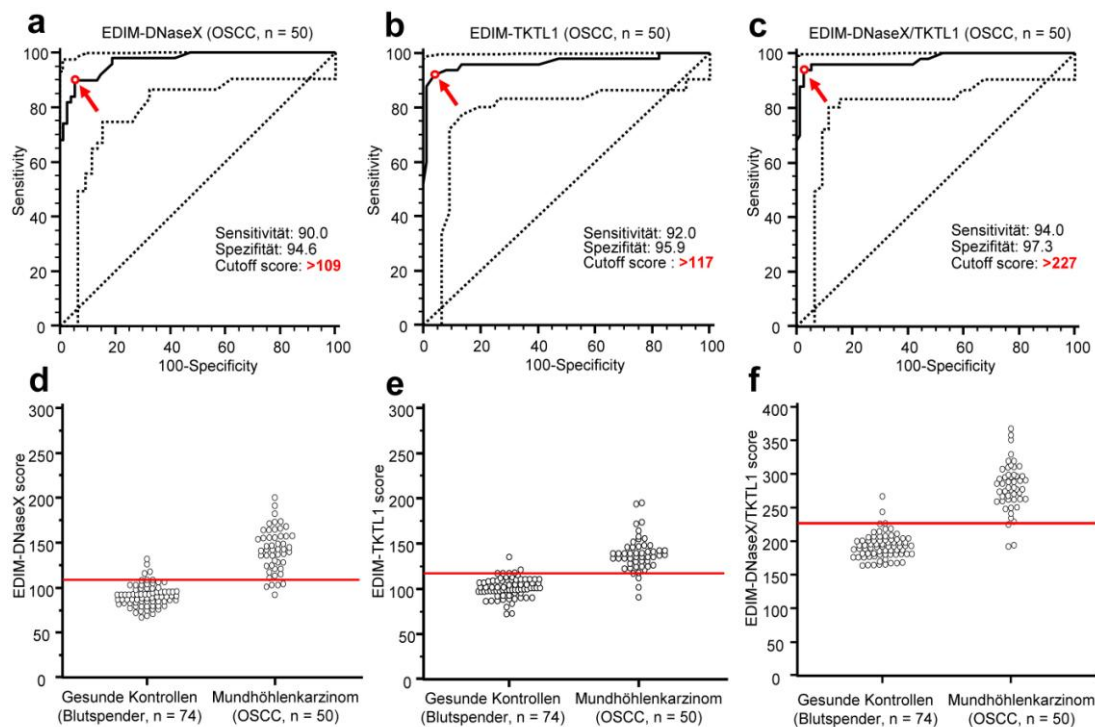
#### 4.11 Sensitivität und Spezifität der EDIM-DNaseX (Apo10) und EDIM-TKTL1- Bluttests bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinom verglichen mit gesunden Blutspendern

Im Rahmen einer prospektiven Untersuchung wurden 50 Bluttests bei Patienten mit primärem und/oder rezidiertem Mundhöhlenkarzinom durchgeführt und mithilfe der Epitop Detektion in Monozyten (EDIM)-Methode beurteilt. Die Ergebnisse des EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1-Tests zeigten eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität, Patienten mit Mundhöhlenkarzinom von gesunden Blutspendern zu unterscheiden. Die **Abbildung 12** (S.38) zeigt die ROC-Analyse (Area under Curve) und die Interaktiv-Dot-Diagramme der Einzelwerte beider Gruppen: der Cut-off Wert der EDIM-DNaseX Expression wurde bei  $>109$  der Cut-off Wert der EDIM-TKTL1 Expression bei  $>117$  und der kombinierten Cut-off Wert beider Biomarker bei  $>227$  festgelegt. Die Summe beider

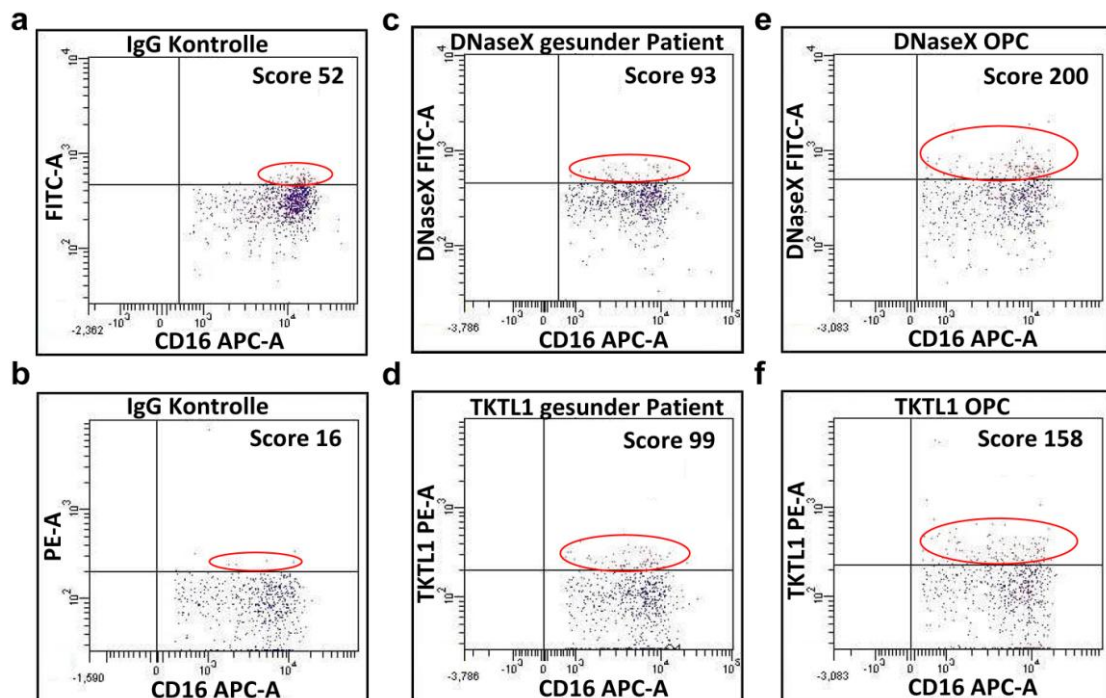
Scores durch den EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Score erhöht zusätzlich die Trennschärfe (Sensitivität und Spezifität), Tumorpatienten von Gesunden zu unterscheiden (**Abbildung 12**, S.38).

45 von 50 Tumorpatienten zeigten positive EDIM-DNaseX Werte (90%) und 46 Patienten wiesen erhöhte EDIM-TKTL1 Scores (92%) auf. Nur zwei Patienten (n=2/50, 4%) waren negativ für beide Werte. Durch Kombination der EDIM-DNaseX/EDIM-TKTL1 Werte (>227) wurden 47 Tumorpatienten (n=47/50, 94%) positiv getestet.

Bei 4 von 74 gesunden Personen (gesunde Kontrollen, Blutspender) ließen sich erhöhte EDIM-DNaseX Werte nachweisen (n=4/74, 5%), 3 von 74 Personen waren positiv für EDIM-TKTL1 (n=3/74, 4%) und bei 3 Personen waren beide Werte positiv (n=3/74, 4%). Durch Kombination der EDIM-DNaseX/EDIM-TKTL1 Werte (>227) wurden 71 gesunde Personen (n=71/74, 96%) negativ getestet (**Abbildung 12**, S.38). **Abbildung 13** (S.39) zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse (Rohdaten) eines gesunden Blutspenders, verglichen mit positiven DNaseX- und TKTL1-Werten eines Patienten mit Mundhöhlenkarzinom.



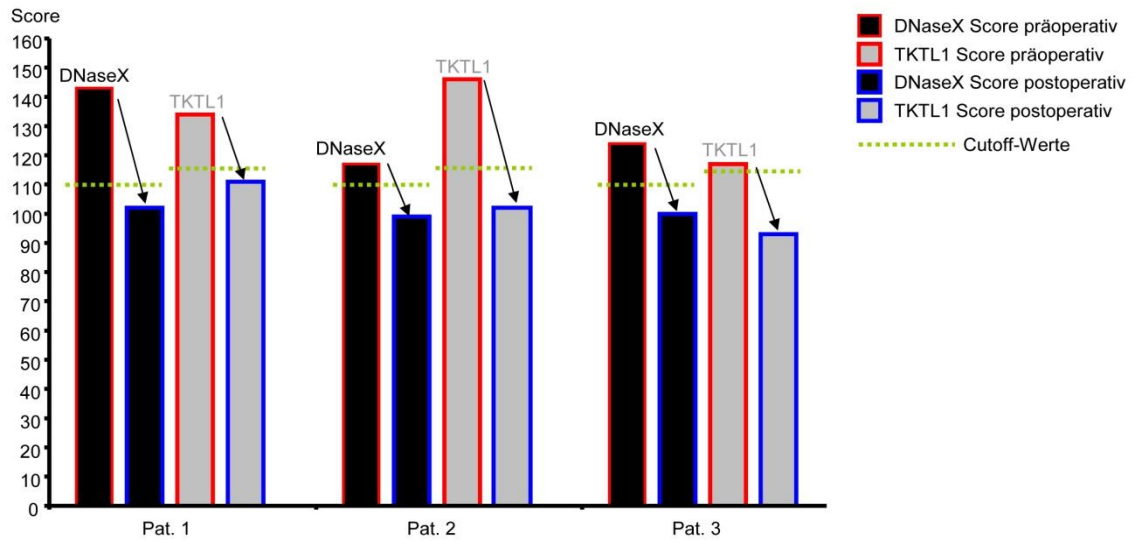
**Abb. 12:** Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Analysen von DNaseX (a), TKTL1 (b) und die Summe beider Scores (DNaseX plus TKTL1, c) zeigen die Signifikanz des EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1-Bluttests, Tumorpatienten mit Mundhöhlenkarzinom von gesunden Patienten (Blutspender, gesunde Kontrolle) zu unterscheiden. Darstellung der Cutoff-Werte (Cutoff score) in roter Schrift (sowie durch den roten Pfeil in der Abbildung). Die Summe beider Werte (c) durch den EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Werte erhöht zusätzlich die Trennschärfe (Sensitivität und Spezifität), Tumorpatienten von Gesunden zu unterscheiden.



**Abb. 13:** Durchflusszytometrische Analysen des EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1-Bluttests: die IgG-Kontrollen beider Antikörper sind in (a, FITC-A und b, PE-A) aufgeführt. Die Werte gesunder Blutspender/Kontrollen (c, DNaseX und d, OPC) sind geringer verglichen mit Werten von Patienten mit Mundhöhlenkarzinom (e, DNaseX und f, OPC). OPC, orales Plattenepithelkarzinom; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; APC, Allophycocyanin.

Bei 32 von 50 Studienteilnehmer ( $n=32/50$ ) wurde zum Nachweis der DNaseX und TKTL1 Expression eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. In 18 Fällen ( $n=18/50$ ) war eine Biopsie aufgrund einer palliativen Behandlungsindikation oder einer extern durchgeführten Probeentnahme nicht möglich. 29 von 32 Tumorgewebeproben wiesen eine positive DNaseX Expression ( $n=29/32$ , 91%) auf. 30 von 32 Tumorgewebeproben waren positiv für TKTL1 ( $n=30/32$ , 94%).

Der Vergleich der prä- und postoperativen EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Werte aus diesem Patientengut zeigte exemplarisch an  $n=3$  Patienten einen Rückgang der EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Werte in den Normalbereich gemessen an Werten gesunder Kontrollen (Blutspendern) 6 Wochen nach R0-Resektion ( $n=3$ ) (**Abbildung 14**, S.40).



**Abb. 14:** Darstellung der EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 präoperativ (rote Umrandung) und 6 Wochen postoperativ (blaue Umrandung). Die postoperative Kontrolle zeigt nach R0-Resektion einen Rückgang der EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Werte in den Normalbereich (gemessen an Werten gesunder Blutspender).



## 5 Diskussion

Die Entwicklung von Tumoren ist ein komplexer mehrstufiger Prozess. Damit ein Tumor überhaupt entsteht, muss notwendigerweise eine Reihe zufälliger Ereignisse eintreten. Eine gesteigerte Resistenz gegenüber Apoptose gehört zu den wichtigsten zellphysiologischen Veränderungen im Tumorgewebe, den sogenannten „Hallmarks of Cancer“ [34]. Der programmierte Zelltod spielt eine wichtige Rolle bei der Elimination von mutierten und geschädigten Zellen, die ständig durch äußere und innere Noxen entstehen. Durch eine ineffektive Apoptoseleistung wird das empfindliche Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelluntergang gestört. Dies kann für die einzelne Zelle einen entscheidenden Selektionsvorteil bedeuten.

DNaseX wird in normalen Gewebezellen durch physikalische oder chemische Reize (z.B. UV-Strahlung, Zellgifte) aktiviert und führt zum programmierten Zelltod. In humanen Tumorzellen besteht infolge einer insuffizienten DNaseX Wirkung eine Apoptoseresistenz [49]. DNaseX akkumuliert demnach im Zellkern und Zytoplasma der entarteten Zellen und ist somit diagnostisch nutzbar.

Ein wichtiger Gegenstand dieser Arbeit war zunächst eine retrospektive Untersuchung der DNaseX Expression im Tumorgewebe sowie die Ermittlung der prognostischen Wertigkeit als Biomarker bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom. In unserer Untersuchung wurde neben Apo10 auch ein anderer Anti-DNaseX monoklonaler Antikörper eingesetzt, der eine zytoplasmatische Überexpression des Proteins in Tumorgewebeproben zeigte. Dieser Antikörper erwies sich jedoch durch positiven Nachweis im Normalgewebe als gering tumorspezifisch verglichen mit dem Apo10 Antikörper. Der Unterschied im Expressionsmuster beider Antikörper kann durch verschiedene Kreuzreaktivitäten zu anderen DNaseI- oder verwandten Proteinen verursacht werden, könnte aber auch die Folge der Epitopverdeckung bei der Proteinbindung sein. Solche selektive Epitoperkennung durch monoklonale Antikörper wurden bereits für DNase-gamma (DNaseI-like 3) beschrieben [83]. Während der eine Antikörper eine konstitutiv exprimierte DNase-gamma-Protein-Variante markierte, erkannten die anderen monoklonalen Antikörper eine nukleare DNase-gamma-Protein-Variante als Folge der Apoptoseinduktion durch Röntgenstrahlung. Dies deutet

daraufrin, dass einige molekulare Änderungen, die die Aktivierung von DNase-gamma in Gang setzten, als Reaktion auf apoptotische Stimuli in der erfassten Proteindomäne vorkommen [83].

Das Apo10-Epitop konnte bereits in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden, bei Karzinomen, Sarkomen, Glioblastomen, Lymphomen, Leukämien, usw., während nur wenige benigne Zellen mit und ohne Induktion der Apoptose dieses Epitop besitzen [46]. Wir konnten in Normalgewebe (normale Mundschleimhaut) keine Expression der DNaseX durch Apo10 nachweisen. Dagegen wiesen 82% der untersuchten Tumorproben eine erhöhte DNaseX (Apo10) Expression auf, die signifikant mit der Tumorgröße und fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert wurde. Dies zeigt, dass die gesteigerte DNaseX Expression im Gewebe auf eine Proliferationsstörung hinweisen kann.

Die Tumorzellen des oralen Plattenepithelkarzinoms zeigen demzufolge in ihrer überwiegenden Anzahl eine Apoptoseresistenz durch Apo10 auf und sind aus diesem Grund möglicherweise auch resistent gegenüber apoptoseinduzierenden Therapien (z.B. Bestrahlung und/oder Chemotherapie). Die Ergebnisse unserer Studie zeigten in diesem Zusammenhang ein signifikant schlechteres Überleben von Patienten mit positivem DNaseX (Apo10) Nachweis im Tumorgewebe. Therapieresistenz ist daher der entscheidende Faktor, der den Erfolg eines kurativen Therapieansatzes bestimmt. Aufgrund unserer Ergebnisse kann die Bestimmung der DNaseX Expression im Tumorgewebe dazu beitragen, Therapiemaßnahmen bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinom, die die Apoptoseauslösung in Tumorzellen fördern, z.B. durch Gabe von Vitamin C oder Vitamin K3 effizienter zu gestalten [48].

Im Jahre 2011 beschrieben Hanahan und Weinberg den veränderten Tumorzellmetabolismus als ein weiteres Krebsmerkmal bösartiger Tumoren [35]. Zahlreiche entartete Zellen entwickeln die Fähigkeit, ihren biochemischen Stoffwechsel zugunsten einer erhöhten Proliferation anzupassen. Bereits im Jahre 1924 postulierte Otto Warburg, dass die Tumorzellen auch unter Anwesenheit von Sauerstoff Glukose anaerob zu Laktat abbauen können, was ihnen einen entscheidenden Überlebensvorteil verleiht. Dabei nehmen die Tumorzellen vermehrt Glukose auf und produzieren große Mengen an Laktat. Erhöhte Ab-

gabe von Milchsäure in das den Tumor umgebende Gewebe verursacht eine Matrixdegeneration und ermöglicht den Tumorzellen, besonders invasiv zu wachsen und zu metastasieren [84, 85].

In dieser Studie wurde festgestellt, dass eine positive TKTL1 Expression im Tumorgewebe von Patienten mit Mundhöhlenkarzinom signifikant mit der Tumorgroße, Lymphknotenmetastasierung, fortgeschrittenen Tumorstadien sowie reduziertem tumorbedingtem Überleben assoziiert ist. Die Überexpression von TKTL1 konnte in einer Vielzahl vorangegangener klinischer Untersuchungen zu verschiedenen Tumorentitäten festgestellt werden, z.B. in Karzinomen, Sarkomen, Glioblastomen, Lymphomen und Leukämien [51-53, 56, 57, 60, 62-64, 67-70, 86, 87]. In einer Studie von Sun et al. [69] konnte eine positive TKTL1 Expression auch für Kopf-Hals-Tumoren beschrieben werden. Diese korrelierten deutlich mit schlechtem Outcome von Tumorpatienten. Unsere Analyse bestätigte die Überexpression der TKTL1 in Mundhöhlenkarzinomen. Insgesamt zeigten 42% Mundhöhlenkarzinome eine positive TKTL1 Expression. Verglichen mit der DNaseX (Apo10) Expression ist der Anteil TKTL1 positiver Tumoren in dieser Untersuchung geringer. Fast alle TKTL1 positiven Tumoren waren DNaseX positiv, wohingegen nur 4% der Mundhöhlenkarzinome bei positiver TKTL1 Expression keine positive DNaseX Expression aufwiesen. Dies lässt vermuten, dass die Apoptoseresistenz durch die DNaseX (Apo10) im mehrstufigen Verlauf der malignen Transformation der TKTL1 Aktivierung vorangeht. Zahlreiche andere Untersuchungen verdeutlichen die klinische Bedeutung einer erhöhten TKTL1 Expression, die mit Metastasierung in vielen soliden Tumoren und einem schlechten Outcome der Patienten korreliert ist [51-53, 56, 57, 60, 62-64, 68-70, 86, 87].

Die Folgen einer Hemmung der TKTL1-mRNA-Translation wurden in einigen Studien untersucht. Diese führte zu einer Hemmung der Tumorzellproliferation sowie der Laktatproduktion [57, 64]. Insbesondere in Oropharynxkarzinom wird TKTL1 durch Promoterhypomethylierung aktiviert und begünstigt die Tumorentstehung durch eine erhöhte aerobe Glykolyse und Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren-Faktors 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) [69]. In einer neueren Untersuchung wurde TKTL1 als ein essentieller Faktor für die Funktion des p53-abhängigen

glykolyseinduzierenden Effektor Tp53 Apoptoseregulatorproteins (TIGAR) beim Hypoxie-induzierten Zelltod beschrieben. Nach dieser Untersuchung stellt TKTL1 neben seiner diagnostischen Funktion für die Krebsfrüherkennung ein neues wichtiges Zielmolekül für die Tumorbehandlung dar, dessen Hemmung ermöglicht, das Überleben von Tumorzellen zu reduzieren und die Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie-, Apoptose-, und Radikal-induzierten Therapien zu erhöhen [88].

Die Präsenz von DNaseX (Apo10) und TKTL1 im Tumorgewebe deutet auf zwei unabhängige biophysikalische Prozesse hin, die mit Therapieresistenz, fortgeschrittenen Tumorstadien und reduziertem tumorspezifischen Überleben beim Mundhöhlenkarzinom assoziiert sind. Der kombinierte Nachweis beider Parameter ermöglicht eine bessere Charakterisierung der Mundhöhlenkarzinome hinsichtlich ihrer Malignität und der Prognose von Tumorpatienten. Orale Plattenepithelkarzinome mit negativer DNaseX und TKTL1 Expression hatten in unserer Untersuchung die günstigste Prognose. DNaseX Nachweis kann auf ein benignes und malignes Geschehen hinweisen, wobei die positive Expression beider Biomarker sehr wegweisend auf ein malignes Geschehen mit invasivem und metastasierendem Phänotyp sein kann. Die univariate Überlebensanalyse der Patienten mit Apo10+/TKTL1+ Coexpression zeigte die Subgruppe mit dem schlechtesten tumor-bedingten Überleben. Die Identifizierung der beiden Biomarker im Tumorgewebe stellt somit den direktesten Nachweis der Proteine dar, da sie im Tumorgewebe in den höchsten Konzentrationen vorliegen. Im klinischen Alltag erscheint eine zuverlässige routinemäßige Analyse allerdings aus unterschiedlichen Gründen kaum realisierbar. Das entnommene Tumorgewebe steht nicht immer zur Verfügung oder die Resektion liegt länger zurück, sodass der aktuelle Tumormarker-Status nicht ermittelt werden kann. Mehrmalige Biopsien zu Analysezwecken sind aufgrund der Invasivität der Methode den Tumorpatienten nicht zumutbar.

Die Detektion neuer tumorspezifischer Parameter, die sich im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten analysieren lassen, ist daher ein weiterer wertvoller Ansatz der modernen Tumorthherapie. Eine Blutuntersuchung ist minimal-invasiv und zeitsparend. Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit der Suche nach

potentiellen Tumormarkern für das Mundhöhlenkarzinom, die serologisch nachweisbar sind. Die meisten bisher untersuchten Zielmoleküle konnten sich jedoch aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität im Therapiemonitoring nicht durchsetzen.

Wir führten prospektiv EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Bluttests bei 50 Patienten mit primärem oder rezidiviertem Mundhöhlenkarzinom durch, um die Detektion von Mundhöhlenkarzinomen durch einen Bluttest zu validieren. Hierbei wurden die Sensitivität und die Spezifität beider Biomarker ermittelt. Unsere Ergebnisse zeigen eine beeindruckende Signifikanz des EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Testes, Patienten mit Mundhöhlenkarzinom von gesunden Patienten (Blutspendern) zu unterscheiden. Die Sensitivität des EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Tests lag jeweils bei 90% und 92%, die Spezifität jeweils bei 94,6% und 95,9%. Die Kombination von EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Scores erhöhte die Sensitivität auf 95,8% und die Spezifität auf 97,3%.

Um die klinische Relevanz des EDIM Bluttests für das Therapiemonitoring zu analysieren, wurden von drei Patienten die EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Scores vor und nach der chirurgischen Therapie (R0-Resektion) verglichen, wobei ein Rückgang der Werte in den Normalbereich (gemessen an gesunden Blutspendern) registriert wurde. Der Rückgang beider EDIM Werte deutet darauf hin, dass der erhöhte prätherapeutische Nachweis beider Biomarker durch das Mundhöhlenkarzinom verursacht sein kann. Die immunhistochemische Analyse bestätigte die Expression beider Biomarker im Tumorgewebe der prospektiv untersuchten Patienten. Der Rückgang präoperativ erhöhter Werte nach chirurgischer Therapie kann daher als Therapieerfolg interpretiert werden. Ein Anstieg der beiden Werte könnte wiederum hinweisend auf ein Tumorrezidiv sein, wodurch sich der Test zum Monitoring für Patienten mit Mundhöhlenkarzinom eignen könnte. Dies muss jedoch in weiterführenden Studien an einem größeren Patientenkollektiv noch hinreichend analysiert werden.

Zusammenfassend könnten wichtige potentielle Anwendungsgebiete des EDIM-Bluttests bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen in Zukunft die Sekundär-, und Tertiärprävention beinhalten. Darüber hinaus kann durch seinen diagnostischen Einsatz die bildgebende Diagnostik optimiert und modifiziert werden. Die

Positronen Emissions Tomographie (PET) nutzt ebenso wie der Nachweis von TKTL1 im Tumorgewebe oder Blut der erkrankten Patienten den veränderten Glukosestoffwechsel in Malignomen und kann mit EDIM-Bluttest effektiv kombiniert werden [4]. Desweiteren kann der Erfolg der therapeutischen Maßnahmen in regelmäßigen Abständen überprüft und die Behandlungsstrategie im Falle einer Therapieresistenz frühzeitig optimiert werden.

Als zielgerichtete therapeutische Interventionen der gewonnenen basiswissenschaftlichen Erkenntnisse könnten diese Grundkenntnisse die Option einer ketogenen Diät [66, 89-103] bei der Behandlung des oralen Plattenepithelkarzinoms eröffnen, um eine Eradikation metabolisch aktiver (z.B. TKTL1+) und apoptoseresistenter (z.B. DNaseX+) Tumorzellen anzustreben. Die Reaktivierung eines physiologischen Metabolismus in den Tumorzellen stellt einen weiteren potentiellen therapeutischen Ansatz dar. Dies soll in weiterführenden Studien untersucht werden.

## 6 Beantwortung der Fragestellung

### 1. Ist der Nachweis von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Tumorgewebe- proben mit der Prognose (klinisch-pathologische Verlaufsparame- ter, tumorspezifisches Überleben) von Tumorpatienten assoziiert?

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation geben den Hinweis, dass eine positive DNaseX und TKTL1 Expression mit Prognose des Mundhöhlenkarzinoms in Verbindung steht. Die Anwesenheit der jeweiligen Parameter in Tumorproben war in unserer Untersuchung signifikant mit der TumorgroÙe, fortgeschrittenen Tumorstadien und Lymphknotenmetastasierung assoziiert. Das tumorspezifische Überleben war in den Subgruppen der jeweils positiven DNaseX und TKTL1 Expressoren signifikant schlechter verglichen mit Patienten, bei denen keine Expression nachgewiesen wurde. Multivariate Analysen demonstrieren die Präsenz beider Biomarker in den entarteten Zellen des Mundhöhlenkarzinoms als unabhängigen prognostischen Faktor für schlechtes tumorbedingtes Überleben. Die günstigste Prognose wurde in der Subgruppenanalyse für die Subgruppe der Patienten demonstriert, die weder DNaseX- noch TKTL1 Expression in Tumorproben aufwies; die schlechteste Überlebensrate zeigte sich in der Untergruppe mit positiver Expression beider Tumormarker. Die Präsenz von DNaseX (Apo10) und TKTL1 im Tumorgewebe deutet demnach auf zwei unabhängige biophysikalische Prozesse hin, die mit fortgeschrittenen Tumorstadien und reduziertem tumorspezifischen Überleben von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom assoziiert sind.

### 2. Ist der Nachweis von DNaseX (Apo10) und TKTL1 in Makrophagen (EDIM Test) als ergänzender diagnostischer Test für Tumorpatienten geeignet?

Die Ergebnisse des EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Tests zeigten eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität, Patienten mit Mundhöhlenkarzinom von gesunden Blutspendern zu unterscheiden. 90% aller Tumorpatienten zeigten positive

EDIM-DNaseX Werte und 92% der Patienten wiesen erhöhte EDIM-TKTL1 Scores auf. Nur zwei Patienten (4%) waren negativ für beide Werte. Durch Kombination der EDIM-DNaseX/EDIM-TKTL1 Werte wurden 94% der Tumorpatienten positiv getestet.

Bei 5% der gesunden Personen in der Kontrollgruppe ließen sich erhöhte EDIM-DNaseX Werte nachweisen, 4% waren positiv für EDIM-TKTL1 und bei 4% waren beide Werte positiv. Durch Kombination der EDIM-DNaseX/EDIM-TKTL1 Werte wurden 96% der gesunden Blutspender negativ getestet.

Die Expression von Apo10- und TKTL1 konnte durch immunhistochemische Analyse des Tumorgewebes aus diesem Patientengut eindrucksvoll bestätigt werden. 91% der untersuchten Tumorgewebeproben wiesen erhöhte Apo10 Werte auf, 94% waren positiv für TKTL1.

Zusammenfassend erreichte der EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL Bluttest in der vorliegenden Studie eine überzeugend hohe Signifikanz, Tumorpatienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen von gesunden Personen zu unterscheiden. Die kombinierte Ermittlung der beiden Biomarker bei der Blutuntersuchung führte zu einer Sensitivität von 95,8% und einer Spezifität von 97,3%. Somit stellt die Analyse von DNaseX und TKTL1 mithilfe des neuen EDIM-Verfahrens einen sensitiven und spezifischen Nachweis von Neoplasien dar und kann hiermit derzeitige diagnostische Verfahren sinnvoll ergänzen.

### **3. Kann der DNaseX (Apo10) und TKTL1-EDIM Test als diagnostisches Tool die postoperative Qualitätskontrolle im Sinne einer R0-Resektion die bisherige Tumorthherapie ergänzen?**

Der exemplarische Vergleich der prä- und postoperativen EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Werte von drei Patienten demonstrierte einen Rückgang der EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 Werte in den Normalbereich gemessen an Werten gesunder Kontrollen (Blutspendern) 6 Wochen nach R0-Resektion. Der Rückgang präoperativ erhöhter Werte nach chirurgischer Therapie kann als Therapieerfolg interpretiert werden. Ein Anstieg der beiden Werte könnte hinweisend auf ein Tumorrezidiv sein, wodurch sich der Test als Monitoringoption



für das Mundhöhlenkarzinom etablieren könnte. Die frühzeitige Ermittlung solcher Veränderungen kann zu einer Therapieoptimierung im Behandlungsverlauf genutzt werden – auch vor dem Auftreten von klinisch manifesten Rezidiven und Symptomen.

## 7 Zusammenfassung

Die Etablierung nicht-invasiver, labordiagnostischer Tests zum Nachweis und zur Charakterisierung von Tumorerkrankungen mittels Biomarker für Neoplasien, Malignität und Therapieresistenzen stellt einen der entscheidenden Schritte auf dem Weg zur Krebsfrüherkennung und einer personalisierten Krebstherapie dar.

Das Apo10-Epitop der Endonuklease DNaseX markiert gutartige oder bösartige Tumorzellen mit Proliferations- und Apoptosestörung und wird als hochspezifischer Biomarker verschiedenster solider und nichtsolider Tumorentitäten verwendet, der gleichzeitig mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert. Das Transketolase-like 1 (TKTL1) Enzym markiert hingegen Tumorzellen, die einen metabolischen Wechsel von einer Mitochondrien-basierten Energiefreisetzung (Oxidative Phosphorylierung) hin zu einer Glukosevergärung durchgeführt haben, wodurch ein Wachstum ohne Sauerstoff möglich ist, die umgebende Gewebematrix aufgelöst wird (invasives Wachstum und Metastasierung), der Angriff des körpereigenen Immunsystems supprimiert wird (Blockade der NK-Zellen) als auch eine Radikal- und Apoptoseauslösung unterdrückt werden kann (Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapien). Aufgrund dessen nimmt der Malignitätsgrad der Tumorzellen zu, wodurch das Versterben von Patienten mit solchen TKTL1 positiven Tumoren massiv zunimmt. Diese klinische Bedeutung beider Biomarker wurde auch in der vorliegenden Studie mit einer retrospektiven Untersuchung an Tumorgewebeschnitten erneut untermauert – sowohl DNaseX/Apo10 als auch TKTL1 stellen unabhängige Marker für schlechtes tumorbedingtes Überleben von Patienten mit Mundhöhlenkarzinom (n=161) dar.

In der vorliegenden Studie wurde darüber hinaus prospektiv die Realisierbarkeit eines personalisierten Diagnose- und Therapiekonzeptes als Proof of Concept durch den Nachweis der beiden Marker DNaseX/Apo10 und TKTL1 mittels der „**E**pitop-**D**etektion **I**n **M**akrophagen“-Bluttest (EDIM-Technologie) demonstriert. Hierbei wurden Immunzellen (aktivierte Monozyten/Makrophagen) in Blutproben von Tumorpatienten (Mundhöhlenkarzinom, n=50) und gesunden Kontrollen (Blutspendern, n=74) mit Hilfe eines Laser-basierten, durchflusszytometrischen

Verfahrens durch den Nachweis von Oberflächenmarkern (CD 14 und CD16) identifiziert und gleichzeitig intrazellulär die Präsenz prognoserelevanter Epitope der beiden Biomarker DNaseX/Apo10 und TKTL1 bestimmt.

Die Sensitivität des EDIM-DNaseX- als auch des EDIM-TKTL1-Bluttests, Tumorpatienten von gesunden Kontrollen zu unterscheiden, lag jeweils zwischen 90% und 92%, die Spezifität betrug dabei zwischen 94% und 95%. Die Kombination von EDIM-Apo10- und EDIM-TKTL1-Scores erhöhte die Sensitivität auf 95% und die Spezifität auf 97%, Tumorpatienten von gesunden Kontrollen zu unterscheiden.

Postoperativ gemessene EDIM-Apo10- und EDIM-TKTL1-Blutwerte von Tumorpatienten (n=3) zeigten einen Rückgang präoperativ erhöhter Werte in den Normalbereich nach vollständiger (R0) Tumoresektion. Diese Vorergebnisse liefern den Hinweis auf eine chirurgische Qualitätskontrolle im Sinne einer vollständigen Tumorentfernung durch den EDIM-Bluttest.

Die vorliegenden Daten zeigen erstmalig die Möglichkeit eines personalisierten Monitorings von Tumorpatienten durch eine Blutanalyse zweier standardisierter Biomarker (DNaseX/Apo10-TKTL1). Der Nachweis der beiden Biomarker in Tumorgewebe als auch der nichtinvasive Nachweis in Blutproben vor, während und nach der Therapie mittels der EDIM-Technologie eröffnet neue Optionen für eine individualisierte Prognose- und Therapiestratifikation. Der EDIM-Bluttest erlaubt damit auch eine effiziente Therapieüberwachung in der klinischen Routine bei Verlaufskontrolle (z.B. bei Verdacht auf ein Tumorrezidiv). Zukünftig kann hierdurch Patienten eine zusätzliche und kosteneffiziente Diagnostik (im Sinne einer nicht-invasiven Biopsie / „liquid biopsy“) sowie Therapieüberwachung nach chirurgischer Tumorentfernung durch den EDIM-Bluttest angeboten werden.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Howard, J.D., B. Lu, and C.H. Chung, *Therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma: identification, evaluation, and clinical translation*. Oral Oncol, 2012. **48**(1): p. 10-7.
2. Oliveira, L.R. and A. Ribeiro-Silva, *Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2011. **40**(3): p. 298-307.
3. Cummings, J., et al., *Fit-for-purpose biomarker method validation for application in clinical trials of anticancer drugs*. Brit J Cancer, 2010. **103**(9): p. 1313-7.
4. Feyen, O., et al., *EDIM-TKTL1 blood test: a noninvasive method to detect upregulated glucose metabolism in patients with malignancies*. Future oncol, 2012. **8**(10): p. 1349-59.
5. Mishra, R., *Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application*. Oral Oncol, 2012. **48**(7): p. 578-84.
6. Parkin, D.M., P. Pisani, and J. Ferlay, *Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990*. Int J Cancer, 1999. **80**(6): p. 827-41.
7. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
8. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(1): p. 10-30.
9. Kaatsch P, Spix C, and K. A, *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Vol. 8. 2012, Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
10. Dahlstrom, K.R., et al., *Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2620-6.
11. Cruz, G.D., et al., *Oral cancer knowledge, risk factors and characteristics of subjects in a large oral cancer screening program*. J Am Dent Assoc, 2002. **133**(8): p. 1064-71; quiz 1094.
12. Hart, A.K., et al., *Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a report on 13 cases and review of the literature*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1999. **120**(6): p. 828-33.
13. Jayaprakash, V., et al., *Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010*. Oral Oncol, 2011. **47**(11): p. 1048-54.
14. Muller, S., et al., *Changing trends in oral squamous cell carcinoma with particular reference to young patients: 1971-2006. The Emory University experience*. Head Neck Pathol, 2008. **2**(2): p. 60-6.
15. Salem, A., *Dismissing links between HPV and aggressive tongue cancer in young patients*. Ann Oncol, 2010. **21**(1): p. 13-7.
16. Liang, X.H., et al., *Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: the Mayo Clinic experience*. J Oral Maxillofac Surg, 2008. **66**(9): p. 1875-80.
17. Gebara, E.C., et al., *Persistence of Helicobacter pylori in the oral cavity after systemic eradication therapy*. J C Period, 2006. **33**(5): p. 329-33.

18. Umeda, M., et al., *High prevalence of Helicobacter pylori detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients*. J Periodont, 2003. **74**(1): p. 129-34.
19. Song, Q., et al., *Characteristic distribution pattern of Helicobacter pylori in dental plaque and saliva detected with nested PCR*. J Med Microbiol, 2000. **49**(4): p. 349-53.
20. Momtaz, H., et al., *Study of Helicobacter pylori genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(17): p. 2105-11.
21. Tas, D.A., et al., *Impact of Helicobacter pylori on the clinical course of recurrent aphthous stomatitis*. J Oral Pathol Med, 2013. **42**(1): p. 89-94.
22. Dayama, A., et al., *Helicobacter pylori and oral cancer: possible association in a preliminary case control study*. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 2011. **12**(5): p. 1333-6.
23. Grimm, M., et al., *Immunohistochemical detection of Helicobacter pylori without association of TLR5 expression in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2013.
24. Warnakulasuriya, S., *Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer*. Oral Oncol, 2009. **45**(4-5): p. 309-16.
25. Hunter, K.D., E.K. Parkinson, and P.R. Harrison, *Profiling early head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(2): p. 127-35.
26. Wittekind, C. and H. Meyer, *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Aufl. ed. 2010: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
27. Sobin LH and W. Ch., *UICC. TNM Classification of Malignant Tumors* Berlin, Springer Verlag 2010. **7th edition**.
28. Grimm, M., *Prognostic value of clinicopathological parameters and outcome in 484 patients with oral squamous cell carcinoma: microvascular invasion (V+) is an independent prognostic factor for OSCC*. Clin Transl Oncol, 2012. **14**(11): p. 870-80.
29. Rodgers, L.W., Jr., et al., *Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth*. Head Neck, 1993. **15**(1): p. 16-9.
30. Levendag, P.C., et al., *Local tumor control in radiation therapy of cancers in the head and neck*. Am J Clin Oncol, 1996. **19**(5): p. 469-77.
31. Wolff K.-D., B.F., Beck J., Bikowski K., Böhme P., Budach W., Burkhardt A., Danker H., Eberhardt W., Engers K., Fietkau R., Frerich B., Gauler T., Germann G., Gittler-Hebestreit N., Grötz K., Horch R., Ihrler S., Keilholz U., Lell M., Lübke A., Mantey W., Nusser-Müller-Busch R., Pistner H., Paradies K., Reichert T., Reinert S., Schliephake H., Schmitter M., Singer S., Westhofen M., Wirz S., Wittlinger M., *S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“ 2012*, Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie AWMF-Register-Nummer 007-100OL: Berlin.
32. Robbins, K.T., et al., *Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002. **128**(7): p. 751-8.
33. Royal College of Pathologists, *Standards and Datasets for Reporting Cancers: Datasets for histopathology reports on head and neck*

- carcinomas and salivary neoplasms*. 2nd Edition ed. 2005 Available from url: <http://www.rcpath.org/resources/pdf/HeadNeckDatasetJun05.pdf>, London: The Royal College of Pathologists; 2005. [cited 11 August 2006].
34. Grandi, C., et al., *Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas: therapeutic implications*. *Head Neck Surg*, 1985. **8**(2): p. 67-73.
  35. Bagan, J.V. and C. Scully, *Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication*. *Oral Oncol*, 2008. **44**(2): p. 103-8.
  36. Udeabor, S.E., et al., *Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis*. *Head Neck Oncol*, 2012. **4**: p. 28.
  37. Lothaire, P., et al., *Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation*. *Head & neck*, 2006. **28**(3): p. 256-69.
  38. Kuropkat, C., B.M. Lippert, and J.A. Werner, *Follow-up with serum Cyfra 21-1 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Oncology*, 2002. **63**(3): p. 280-5.
  39. Hammarstrom, S., *The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues*. *Sem Cancer Biol*, 1999. **9**(2): p. 67-81.
  40. Wollenberg, B., et al., *CYFRA 21-1 is not superior to SCC antigen and CEA in head and neck squamous cell cancer*. *Anticancer Res*, 1996. **16**(5B): p. 3117-24.
  41. Krimmel, M., et al., *Relevance of SCC-Ag, CEA, CA 19.9 and CA 125 for diagnosis and follow-up in oral cancer*. *J Craniomaxillofac Surg*, 1998. **26**(4): p. 243-8.
  42. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 137-148.
  43. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
  44. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
  45. Los, M., et al., *Functional characterization of DNase X, a novel endonuclease expressed in muscle cells*. *Biochemistry*, 2000. **39**(25): p. 7365-73.
  46. Jansen, N. and J.F. Coy, *Diagnostic use of epitope detection in monocytes blood test for early detection of colon cancer metastasis*. *Future Oncol*, 2013. **9**(4): p. 605-9.
  47. Grimm, M., et al., *A biomarker based detection and characterization of carcinomas exploiting two fundamental biophysical mechanisms in mammalian cells*. *BMC Cancer* 2013, **13**(1):569
  48. Taper, H.S., *Altered deoxyribonuclease activity in cancer cells and its role in non toxic adjuvant cancer therapy with mixed vitamins C and K3*. *Anticancer Res*, 2008. **28**(5A): p. 2727-32.
  49. Martelli, A.M., et al., *The emerging multiple roles of nuclear Akt*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1823**(12): p. 2168-78.

50. Warburg, Posener K, and N. E, *Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle*. Biochem Z 1924(152): p. 309–344.
51. Langbein, S., et al., *Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted*. Br J Cancer, 2006. **94**(4): p. 578-85.
52. Volker, H.U., et al., *Expression of transketolase-like 1 and activation of Akt in grade IV glioblastomas compared with grades II and III astrocytic gliomas*. Am J Clin Pathol, 2008. **130**(1): p. 50-7.
53. Zerilli, M., et al., *Increased expression of transketolase-like-1 in papillary thyroid carcinomas smaller than 1.5 cm in diameter is associated with lymph-node metastases*. Cancer, 2008. **113**(5): p. 936-44.
54. Kayser, G., et al., *Lactate-dehydrogenase 5 is overexpressed in non-small cell lung cancer and correlates with the expression of the transketolase-like protein 1*. Diagn Pathol, 2010. **5**: p. 22.
55. Krockenberger, M., et al., *Expression of transketolase-like 1 protein (TKTL1) in human endometrial cancer*. Anticancer Res, 2010. **30**(5): p. 1653-9.
56. Hartmannsberger, D., et al., *Transketolase-like protein 1 confers resistance to serum withdrawal in vitro*. Cancer Lett, 2010. **300**(1): p. 20-9.
57. Xu, X., et al., *Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells*. Int J Cancer, 2009. **124**(6): p. 1330-7.
58. Zhang, S., J.H. Yang, and P.C. Cai, *[Effects of transketolase-like gene TKTL1 on occurrence and metastasis of human nasopharyngeal carcinoma]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2008. **88**(44): p. 3131-4.
59. Staiger, W.I., et al., *Expression of the mutated transketolase TKTL1, a molecular marker in gastric cancer*. Oncol Rep, 2006. **16**(4): p. 657-61.
60. Zhang, S., et al., *Gene silencing of TKTL1 by RNAi inhibits cell proliferation in human hepatoma cells*. Cancer Lett, 2007. **253**(1): p. 108-14.
61. Schmidt, M., et al., *Glucose metabolism and angiogenesis in granulosa cell tumors of the ovary: activation of Akt, expression of M2PK, TKTL1 and VEGF*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008. **139**(1): p. 72-8.
62. Schmidt, M., et al., *Glycolytic phenotype in breast cancer: activation of Akt, up-regulation of GLUT1, TKTL1 and down-regulation of M2PK*. J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **136**(2): p. 219-25.
63. Yuan, W., et al., *Silencing of TKTL1 by siRNA inhibits proliferation of human gastric cancer cells in vitro and in vivo*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(9): p. 710-6.
64. Hu, L.H., et al., *The TKTL1 gene influences total transketolase activity and cell proliferation in human colon cancer LoVo cells*. Anticancer Drugs, 2007. **18**(4): p. 427-33.
65. Schultz, H., et al., *TKTL1 is overexpressed in a large portion of non-small cell lung cancer specimens*. Diagn Pathol, 2008. **3**: p. 35.
66. Meijer, T.W., et al., *Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5585-94.

67. Wanka, C., J.P. Steinbach, and J. Rieger, *Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) protects glioma cells from starvation-induced cell death by up-regulating respiration and improving cellular redox homeostasis*. J Biol Chem, 2012. **287**(40): p. 33436-46.
68. Schwaab, J., et al., *Expression of Transketolase like gene 1 (TKTL1) predicts disease-free survival in patients with locally advanced rectal cancer receiving neoadjuvant chemoradiotherapy*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 363.
69. Sun, W., et al., *TKTL1 is activated by promoter hypomethylation and contributes to head and neck squamous cell carcinoma carcinogenesis through increased aerobic glycolysis and HIF1alpha stabilization*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(3): p. 857-66.
70. Kayser, G., et al., *Poor outcome in primary non-small cell lung cancers is predicted by transketolase TKTL1 expression*. Pathology, 2011.
71. Japink, D., et al., *CEA in activated macrophages. New diagnostic possibilities for tumor markers in early colorectal cancer*. Anticancer Res, 2009. **29**(8): p. 3245-51.
72. Leers, M.P., et al., *Circulating PSA-containing macrophages as a possible target for the detection of prostate cancer: a three-color/five-parameter flow cytometric study on peripheral blood samples*. Am J Clin Pathol, 2008. **129**(4): p. 649-56.
73. Coy, J.F., et al., *Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer*. Clin Lab, 2005. **51**(5-6): p. 257-73.
74. Walker, R.A., *Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I*. Histopathology, 2006. **49**(4): p. 406-10.
75. Tuominen, V.J., T.T. Tolonen, and J. Isola, *ImmunoMembrane: a publicly available web application for digital image analysis of HER2 immunohistochemistry*. Histopathology, 2012. **60**(5): p. 758-67.
76. Tuominen, V.J., et al., *ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(4): p. R56.
77. Edington, K.G., et al., *Cellular immortality: a late event in the progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck associated with p53 alteration and a high frequency of allele loss*. Molecular carcinogenesis, 1995. **13**(4): p. 254-65.
78. Grimm, M., et al., *ABCB5 expression and cancer stem cell hypothesis in oral squamous cell carcinoma*. Eur J Cancer, 2012. **48**(17): p. 3186-97.
79. Kaplan, E.L. and P. Meier, *Nonparametric estimation from incomplete observations*. J Am Stat Assoc, 1958. **75**: p. 457-487.
80. Mantel, N., *Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration*. Cancer Chemother Rep, 1966. **50**(3): p. 163-70.
81. Cox, D.R., *Regression models and life tables*. J R Stat Soc, 1972(34): p. 1987-2001.



82. Zweig, M.H. and G. Campbell, *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine*. Clin Chem, 1993. **39**(4): p. 561-77.
83. Shiokawa, D., et al., *Characterization of two DNase gamma-specific monoclonal antibodies and the in situ detection of DNase gamma in the nuclei of apoptotic rat thymocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(2): p. 343-9.
84. Locasale, J.W. and L.C. Cantley, *Altered metabolism in cancer*. BMC Biol, 2010. **8**: p. 88.
85. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell metabolism, 2008. **7**(1): p. 11-20.
86. Diaz-Moralli, S., et al., *Transketolase-like 1 expression is modulated during colorectal cancer progression and metastasis formation*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25323.
87. Lange, C.A., et al., *Enhanced TKTL1 expression in malignant tumors of the ocular adnexa predicts clinical outcome*. Ophthalmology, 2012. **119**(9): p. 1924-9.
88. Wanka, C., J.P. Steinbach, and J. Rieger, *Tp53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) Protects Glioma Cells from Starvation-induced Cell Death by Up-regulating Respiration and Improving Cellular Redox Homeostasis*. J Biol Chem, 2012. **287**(40): p. 33436-46.
89. Nebeling, L.C., et al., *Effects of a ketogenic diet on tumor metabolism and nutritional status in pediatric oncology patients: two case reports*. J Am Coll Nutr, 1995. **14**(2): p. 202-8.
90. Otto, C., et al., *Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 122.
91. Seyfried, T.N., et al., *Targeting energy metabolism in brain cancer with calorically restricted ketogenic diets*. Epilepsia, 2008. **49 Suppl 8**: p. 114-6.
92. Seyfried, B.T., et al., *Targeting energy metabolism in brain cancer through calorie restriction and the ketogenic diet*. J Cancer Res Ther, 2009. **5 Suppl 1**: p. S7-15.
93. Zhou, W., et al., *The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer*. Nutr Metab (Lond), 2007. **4**: p. 5.
94. Schmidt, M., et al., *Effects of a ketogenic diet on the quality of life in 16 patients with advanced cancer: A pilot trial*. Nutr & Metab, 2011. **8**(1): p. 54.
95. Fine, E.J., et al., *Targeting insulin inhibition as a metabolic therapy in advanced cancer: a pilot safety and feasibility dietary trial in 10 patients*. Nutrition, 2012. **28**(10): p. 1028-35.
96. Poff, A.M., et al., *The ketogenic diet and hyperbaric oxygen therapy prolong survival in mice with systemic metastatic cancer*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65522.
97. Allen, B.G., et al., *Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(14): p. 3905-13.

98. Paoli, A., et al., *Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets*. Eur J Clin Nutr, 2013.
99. Simone, B.A., et al., *Selectively starving cancer cells through dietary manipulation: methods and clinical implications*. Future Oncol, 2013. **9**(7): p. 959-76.
100. Husain, Z., et al., *Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells*. J Immunol, 2013. **191**(3): p. 1486-95.
101. Abdelwahab, M.G., et al., *The ketogenic diet is an effective adjuvant to radiation therapy for the treatment of malignant glioma*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36197.
102. Dorr, J.R., et al., *Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy*. Nature, 2013.
103. Chang, H.T., L.K. Olson, and K.A. Schwartz, *Ketolytic and glycolytic enzymatic expression profiles in malignant gliomas: implication for ketogenic diet therapy*. Nutr Metab (Lond), 2013. **10**(1): p. 47.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

|              |   |
|--------------|---|
| Abb.         | Abbildung                                       |
| AK           | Antikörper                                      |
| AP           | Alkalische Phosphatase                          |
| BSA          | Rinderserumalbumin                              |
| CD           | Cluster of Differentiation                      |
| CEA          | Karzinoembryonales Antigen                      |
| CYFRA        | Cytokeratin – Fragment                          |
| DAB          | Diaminobenzidin                                 |
| DNA          | Desoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure |
| DKFZ         | Deutsches Krebsforschungszentrum                |
| ECACC        | European Collection of Cell Cultures            |
| EDIM         | Epitop-Detektion in Monozyten                   |
| EDTA         | Ethylendiamintetraacetat                        |
| FFPP         | formalin-fixed, paraffin-embedded               |
| FITC         | Fluoresceinisothiocyanat                        |
| Fruktose-6-P | Fruktose-6-Phosphat                             |
| GAP          | Glycerinaldehyd-3-Phosphat                      |
| Gy           | Gray  |
| HE           | Hämatoxylin-Eosin                               |
| HIER         | Heat induced epitope retrieval                  |
| HPF          | high-power fields, Vergrößerungsfelder          |
| HR           | Hazard Ratio, Risikoverhältnis                  |
| HRP          | horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase   |
| ICC          | Immunzytochemie                                 |
| IHC          | Immunohistochemie                               |
| HPV          | humanes Papillomavirus                          |
| IgG          | Immunglobulin G                                 |
| KI           | Konfidenzintervall                              |
| NADPH        | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat         |
| OxPhos       | Oxydative Phosphorylierung                      |

|              |   |
|--------------|---|
| PPP          | Pentosephosphatweg                              |
| Ribose-5-P   | Ribose-5-Phosphat                               |
| Ribulose-5-P | Ribulose-5-Phosphat                             |
| RNA          | Ribonukleinsäure                                |
| ROC          | Receiver-Operating-Characteristic               |
| RT-PCR       | Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion |
| SCC          | Squamous cell carcinoma                         |
| Tab.         | Tabelle   |
| TIGAR        | Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator |
| TKT          | Transketolase                                   |
| TKTL1        | Transketolase-like1                             |
| UICC         | Union International Contre le Cancer            |
| WHO          | World Health Organisation                       |

## 10 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Darstellung der funktionellen Rolle der DNaseX in Normalgewebe und in humanem Tumorgewebe .....   | 14 |
| <b>Abbildung 2:</b> Darstellung der TKTL1 Funktion .....  | 16 |
| <b>Abbildung 3:</b> Epitop Detektion in Monozyten (EDIM)Testverfahren für DNaseX und TKTL1.....   | 17 |
| <b>Abbildung 4:</b> Die immunhistochemische DNaseX-Analyse der ab54750 Färbung im Vergleich zur Apo10 Färbung .....   | 29 |
| <b>Abbildung 5:</b> Darstellung der DNaseX beim oralen Plattenepithelkarzinom durch Immunhistochemie .....  | 30 |
| <b>Abbildung 6:</b> Univariate und multivariate Überlebensanalyse von Patienten mit positivem DNaseX Nachweis im Tumorgewebe .....  | 32 |
| <b>Abbildung 7:</b> Darstellung der TKTL1 Expression beim oralen Plattenepithelkarzinom durch Immunhistochemie .....  | 33 |
| <b>Abbildung 8:</b> Univariate und multivariate Überlebensanalyse bei Patienten mit positivem TKTL1 Nachweis im Tumorgewebe .....   | 34 |
| <b>Abbildung 9:</b> Subgruppenanalyse der DNaseX und TKTL1 Expression beim oralen Plattenepithelkarzinom durch Immunhistochemie .....   | 35 |
| <b>Abbildung 10:</b> Darstellung der DNaseX (Apo10) und TKTL1 Expression an einer Tumor-Zelllinie (BICR56) durch Immunzytochemie.....   | 36 |
| <b>Abbildung 11:</b> Darstellung der DNaseX (Apo10) und TKTL1 mittels Durchflusszytometrie und Immunzytochemie an der Tumorzelllinie BICR56 (Zungengrundkarzinom) sowie im Gewebeschnitt eines Patienten mit orale Plattenepithelkarzinom ..... | 37 |
| <b>Abbildung 12:</b> Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Analysen von DNaseX, TKTL1 und die Summe beider Scores.....  | 38 |
| <b>Abbildung 13:</b> Durchflusszytometrische Analysen des EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1-Bluttests.....   | 39 |
| <b>Abbildung 14:</b> Darstellung der EDIM-DNaseX und EDIM-TKTL1 präoperativ und 6 Wochen postoperativ.....  | 40 |

## 11 Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Zusammenfassende Darstellung der TNM-Klassifikation des Mundhöhlenkarzinoms .....   | 8  |
| <b>Tabelle 2:</b> Zusammenfassende Darstellung der UICC-Stadien des Mundhöhlenkarzinoms .....   | 8  |
| <b>Tabelle 3:</b> Zusammenfassende Darstellung der Halslymphknoten (Level I-VI)..   | 10 |
| <b>Tabelle 4:</b> Klinisch-pathologische Verlaufsparemeter sowie Apo10 und TKTL1 Expression von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom .....   | 31 |
| <b>Tabelle 5:</b> Zusammenfassende Darstellung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie, sowie Angaben über Verdünnung, Herkunft und Hersteller der Antikörper ..... | 23 |
| <b>Tabelle 6:</b> APO10 und TKTL1 Subgruppenanalyse von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom.....  | 35 |

## 12 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Dr. Martin Grimm sowie dem Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen, Herrn Professor Dr. Dr. S. Reinert danke ich besonders für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Anleitung zur selbständigen wissenschaftlichen Tätigkeit. Ganz herzlich möchte ich mich bei ihnen zudem für die stetig intensive Betreuung während meiner experimentellen Tätigkeiten im Versuchslabor, sowie den vielen guten Anregungen bei der schriftlichen Ausfertigung danken. Die außerordentlich gute Unterstützung sowohl bei der Versuchskonzeption, als auch deren unermüdlige Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ohne sie wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Im Übrigen gilt mein Dank ebenso der Medizinisch-technischen Assistentin (MTA) des Labors, Frau Adelheid Munz, für die Hilfe und Betreuung beim experimentellen Arbeiten im Labor und ihrem regen Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Meinem Mann Serge danke ich für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit und für viele kompetente und liebevolle Ratschläge.

## 13 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Tatjana Nadtotschi, geb. Melnitschenko  
 Geburtsdatum/Ort: 04.04.1984, Nowokusnezsk (Rus. Föd.)  
 Nationalität: Deutsch  
 Familienstand: verheiratet mit Serge Nadtotschi, Tochter Sophia  
 Eltern: Dr. med. Stanislav Melnitschenko  
 Elvira Melnitschenko  
 Geschwister: Max Melnitschenko

### Bildungsweg

1991 – 2001 linguistisches Gymnasium, Nowokusnezsk  
 2001 – 2003 Studium der Deutschen Sprache und Literatur, Universität der Deutsch-Russischen Beziehungen, Novosibirsk  
 15. Juli 2005 Abitur, Eichendorff-Kolleg, Geilenkirchen  
 11. Oktober 2005 Studium der Zahnmedizin, Universität Hamburg  
 01. April 2009 Zahnärztliche Vorprüfung  
 04. Juli 2012 Zahnärztliche Prüfung  
 Januar 2013 – Januar 2014 Promotionsarbeit, Universitätsklinikum Tübingen, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Prof. Dr. Dr. S. Reinert  
 02. März 2014 bis heute Assistenz Zahnärztin in der Gemeinschaftspraxis Dr. Marc Schultz und Thomas Pflüger