

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Die prognostische Bedeutung der Carboanhydrase IX im Tumorgewebe und Blut
von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dana Susanne Horter

Betreuer: Prof. Dr. med. Dirk Vordermark

Gutachterin/Gutachter:

Prof. Dr. med. Oliver Thews, Halle (Saale)

PD Dr. med. Matthias Hautmann, Traunstein

Datum der Verteidigung: 06.09.2023

Referat

Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle sind eine häufige Tumorentität. Trotz medizinischen Fortschritts hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert. Um das aggressive Potential dieser Tumore besser charakterisieren zu können, sind zusätzliche molekulare Parameter notwendig. In der Literatur werden verschiedene Marker diskutiert, u.a. die Carboanhydrase IX (CAIX). Die CAIX trägt indirekt zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes bei und ermöglicht der (Tumor-)Zelle das Überleben im hypoxischen, azidotischen Mikromilieu. Zudem ist eine gelöste Variante des Enzyms im Blut nachweisbar.

Um die prognostische Bedeutung von CAIX bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle weiter zu charakterisieren, wurden Tumor- und Normalgewebeproben mittels Western Blot (n = 78), ELISA (n = 38) und Immunhistochemie (n = 158) auf ihren CAIX-Gehalt untersucht. Zusätzlich wurden 89 Serumproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle hinsichtlich der gelösten Variante von CAIX mittels ELISA getestet. Bei weiteren 28 Patienten wurden zudem Serumproben im Laufe der Radiatio zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

In der statistischen Auswertung bestätigte sich, dass CAIX im Tumorgewebe häufig überexprimiert wird, im Normalgewebe dagegen fast gar nicht nachweisbar ist. Allerdings zeigte sich in den Überlebenszeitanalysen nur in der Kohorte, welche mittels Immunhistochemie untersucht wurde, eine schlechtere Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei Patienten mit hohem CAIX-Gehalt.

Im Serum konnte anhand des CAIX-Gehaltes nicht zwischen gesunden Blutspendern und Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle unterschieden werden. In der multivariablen Cox-Analyse zeigt sich jedoch, dass Patienten mit sehr hohem CAIX-Gehalt ein geringeres Gesamtüberleben aufwiesen. Änderungen des CAIX-Gehaltes im Blut während bzw. nach einer Radiatio waren nicht nachweisbar.

Das im Serum nachweisbare CAIX scheint weder ein geeigneter Tumormarker für Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen noch ein verlässlicher Verlaufsparemeter während einer Radiatio zu sein. Patienten mit sehr hohem CAIX-Gehalt im Serum hatten jedoch eine schlechtere Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens als Patienten mit einem geringeren CAIX-Gehalt. Ob diese Patienten von einer aggressiveren Therapie profitieren würden, sollte Gegenstand weiterer Studien sein.

Horter, Dana Susanne: Die prognostische Bedeutung der Carboanhydrase IX im Tumorgewebe und Serum von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 59 Seiten, 2022

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
BEREITS VERÖFFENTLICHTE TEILE DER ARBEIT	V
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. EPIDEMIOLOGIE	1
1.2. PROGNOSEFAKTOREN UND TUMORMARKER.....	2
1.3. TUMORHYPOXIE	2
1.4. HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1	4
1.5. CARBOANHYDRASE IX	5
1.6. IM BLUT GELÖSTES CAIX	8
2. ZIELSTELLUNG	10
3. MATERIAL UND METHODIK.....	11
3.1. MATERIAL.....	11
3.1.1. <i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	11
3.1.2. <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	12
3.1.3. <i>Puffer und Lösungen</i>	13
3.1.4. <i>Primär- und Sekundärantikörper</i>	13
3.1.5. <i>Patientenmaterial</i>	13
3.2. METHODEN.....	15
3.2.1. <i>Gewinnung der Gewebeproben</i>	15
3.2.2. <i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und histologische Einstufung der Gewebeproben</i>	15
3.2.3. <i>Proteinisolation</i>	16
3.2.4. <i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	16
3.2.5. <i>Western Blot</i>	17
3.2.5.1 <i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	17
3.2.5.2 <i>Blotting</i>	17
3.2.5.3 <i>Immundetektion</i>	18
3.2.6. <i>Immunhistochemie</i>	18
3.2.7. <i>Gewinnung der Blutserumproben</i>	20
3.2.8. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	20
3.2.9. <i>Statistische Auswertung</i>	20
4. ERGEBNISSE	22
4.1. CAIX-PROTEINGEHALT IM TUMOR- UND IM NORMALGEWEBE	22
4.2. PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DES CAIX PROTEINGEHALTES IM TUMORGEWEBE BESTIMMT MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE	23
4.3. PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DES CAIX-PROTEINGEHALTES IM TUMORGEWEBE GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT-ANALYSE	26
4.3.1. <i>T-Stadium</i>	28
4.3.2. <i>N-Stadium</i>	29
4.4. PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DES CAIX-PROTEINGEHALTES IM TUMORGEWEBE GEMESSEN MITTELS ELISA... 30	
4.5. CAIX-PROTEINGEHALT IM SERUM VON PATIENTEN MIT MUNDKÖHLENKARZINOM UND IM SERUM VON BLUTSPENDERN.....	32
4.6. PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DES CAIX-PROTEINGEHALTES IM SERUM VON PATIENTEN MIT MUNDHÖHLENKARZINOM	34
4.7. SERUM-CAIX IM VERLAUF DER STRAHLENTHERAPIE	37
4.8. KORRELATION VON CA9 MRNA, CAIX PROTEIN UND CAIX IM SERUM.....	39

5. DISKUSSION	40
5.1. PATIENTENKOLLEKTIV	40
5.2. CAIX IM TUMORGEWEBE.....	41
5.2.1. <i>Prognostische Bedeutung von CAIX im Tumorgewebe</i>	<i>42</i>
5.3. HOUSEKEEPING PROTEIN FÜR WESTERN BLOT	43
5.4. GELÖSTES CAIX	44
5.4.1. <i>Serum-CAIX-Gehalt bei Gesunden und bei Tumorpatienten.....</i>	<i>44</i>
5.4.2. <i>Prognostische Relevanz des im Serum gelösten CAIX.....</i>	<i>47</i>
5.4.3. <i>Einflussfaktoren auf den Gehalt von gelöstem CAIX.....</i>	<i>48</i>
5.4.4. <i>Gelöstes CAIX als potentieller Marker für das Therapieansprechen.....</i>	<i>49</i>
6. ZUSAMMENFASSUNG	51
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	52
8. THESEN	59
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	VI
ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE.....	VII
DANKSAGUNG.....	VIII

Abkürzungsverzeichnis

bzw.	<i>beziehungsweise</i>
Ca9	<i>Carboanhydrase IX mRNA</i>
CAIX	<i>Carboanhydrase IX</i>
ca.	<i>circa</i>
DAB	<i>3,3`-Diaminobenzidin, 3,3`-Diaminobenzidin</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
ECD	<i>Ektodomäne, Ektodomäne</i>
EEF2	<i>Eukaryotischer Elongationsfaktor 2, Eukaryotischer Elongationsfaktor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
etc.	<i>et cetera, Siehe</i>
HE-Färbung	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible Factor 1</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
IRS	<i>Immunreaktive Score</i>
LDHA	<i>Laktatdehydrogenase A</i>
MCT	<i>Monocarboxylat-Transporter</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure, messenger Ribonukleinsäure</i>
Oct-4	<i>Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
RPL 15	<i>Ribosomales Protein L15</i>
RPL4	<i>Ribosomales Protein L4</i>
u.a.	<i>unter anderem</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>

Bereits veröffentlichte Teile der Arbeit

Publikationen

Eckert, Alexander W.; Horter, Susanne; Bethmann, Daniel; Kotrba, Johanna; Kaune, Tom; Rot, Svetlana et al. (2019): Investigation of the Prognostic Role of Carbonic Anhydrase 9 (CAIX) of the Cellular mRNA/ Protein Level or Soluble CAIX Protein in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2). DOI: 10.3390/ijms20020375

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Mundhöhlen- und Rachenkarzinome gehören zu den zehn häufigsten Tumoren des Menschen. 2014 betrug der Anteil der Mundhöhlenkarzinome an allen Krebsneuerkrankungen des Mannes in Deutschland 3,7 % (Kaatsch et al. 2017). Histologisch handelt es sich in etwa 90 % der Fälle um Plattenepithelkarzinome (Kaatsch et al. 2015). Der überwiegende Anteil der Betroffenen, ungefähr 70 %, sind Männer (Becker et al. 2009). Im Mittel erkranken diese im Alter von 63 Jahren und damit im Schnitt 5 Jahre früher als Frauen (Kaatsch et al. 2017). Hauptrisikofaktoren sind übermäßiger Alkohol- bzw. Tabakgenuss, wobei das Erkrankungsrisiko bei gleichzeitigem Alkohol- und Nikotinkonsum um das 24-fache ansteigt (Znaor et al. 2003). Als weitere Risikofaktoren werden schlechte Mundhygiene, das Kauen von Betelnüssen, Infektionen mit humanen Papillomaviren sowie einseitige, vitaminarme Ernährung diskutiert (Kaatsch et al. 2015; Benson et al. 2014; Yen et al. 2007). Da die meisten Mundhöhlenkarzinome anfänglich kaum Beschwerden verursachen, wird nur jeder vierte Tumor beim Mann im T1-Stadium diagnostiziert (Kaatsch et al. 2015). Erst in fortgeschrittenen Tumorstadien treten Ulzerationen, Kau- und Schluckstörungen sowie Sialorrhoe in den Vordergrund. Zu einer okkulten Metastasierung in die Halslymphknoten kommt es in ungefähr 40 % der Fälle (O-charoenrat et al. 2003). Die 5-Jahres-Überlebensrate ist bei Frauen mit 59 % günstiger als bei Männern mit 48 % (Kaatsch et al. 2017). Eine regelmäßige und engmaschige Nachsorge ist aufgrund der hohen Rezidiv- und Sekundärkarzinomwahrscheinlichkeit notwendig. Lokalrezidive werden bei ca. einem Fünftel der Patienten mit Mundhöhlenkarzinom beobachtet (Boysen et al. 1992). Bei ungefähr 25 % der Kopf-Hals-Tumore muss mit einem Zweitkarzinom gerechnet werden (Haremza et al. 2019), insbesondere im oberen Aerodigestivtrakt und der Lunge (Haughey et al. 1992).

Klassifiziert werden Mundhöhlenkarzinome nach dem TNM-System bzw. nach den Richtlinien der Union internationale contre le cancer. Bei den Klassifikationen werden Tumorgröße, die Infiltration von Nachbarstrukturen, die Lymphknoten- und Fernmetastasierung berücksichtigt.

Die Therapieempfehlungen richten sich in Abhängigkeit des Tumorstadiums und des allgemeinen Gesundheitszustandes des Patienten nach der im Dezember 2019 erschienenen S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“ (Leitlinienprogramm Onkologie). In der Regel erfolgt eine operative Tumorexzision mit Neck-Dissection, ab Tumorstadium T3 mit anschließender Radiatio bzw. Radiochemotherapie. Bei metastasiertem Tumorleiden kann eine palliative platinhaltige

Chemotherapie in Kombination mit Cetuximab bei PDL1-negativen Tumoren bzw. in Kombination mit Pembrolizumab bei PDL1-positiven Tumoren angeboten werden. Prinzipiell sollte jeder Fall zur Abstimmung der Behandlung prätherapeutisch in einem interdisziplinären Tumorboard vorgestellt werden.

1.2. Prognosefaktoren und Tumormarker

Anhand von Prognosefaktoren kann die Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs bzw. des Gesamtüberlebens abgeschätzt werden. Wie in der 2019 erschienenen Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom dargestellt, zählen zu den bekannten prognosebestimmenden Faktoren das TNM-Stadium, das Grading (die histologische Klassifizierung des Differenzierungsgrades des Tumorgewebes), das kontinuierliche bzw. diskontinuierliche Wachstum eines Tumors sowie die Beschaffenheit der Resektionsränder des Primärtumors nach chirurgischer Intervention (Leitlinienprogramm Onkologie).

Tumormarker sind biologische Substanzen, meist Proteine, die beispielsweise im Blut oder Urin bestimmt werden können. Sie werden vom Tumor selbst bzw. vom Organismus als Reaktion auf den Tumor gebildet. Erhöhte Konzentrationen können ein Hinweis auf eine Tumorerkrankung oder deren Rezidiv sein. Zum Beispiel sind das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA19-9) etablierte Tumormarker für das Kolonkarzinom. Beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist ein derartiger Tumormarker im klinischen Alltag noch nicht gebräuchlich.

1.3. Tumorhypoxie

Eine Mangelversorgung von Zellen mit Sauerstoff wird als Hypoxie bezeichnet. Eine ausreichende Versorgung der Zellen aerober Lebewesen mit Sauerstoff ist notwendig, da Sauerstoff als Substrat der oxidativen Phosphorylierung dient. Zur Energiegewinnung wird dabei durch die Metabolisierung von Glucose in der aeroben Glykolyse, welche im Zytosol stattfindet, sowie den nachfolgenden mitochondrialen Prozessen des Citratzyklus und der oxydativen Phosphorylierung Adenosintriphosphat synthetisiert. Die Endprodukte dieser Prozesskette sind die energiearmen Verbindungen Wasser und Kohlenstoffdioxid. Pro Molekül Glucose werden dabei etwa 32 Moleküle Adenosintriphosphat generiert. Adenosintriphosphat kann als Energieäquivalent angesehen werden.

Unter anaeroben Bedingungen, also bei unzureichender Sauerstoffzufuhr, wird Glucose zu Pyruvat abgebaut, welches weiter zu Laktat reduziert wird. Dabei entstehen pro Molekül Glucose lediglich zwei Moleküle Adenosintriphosphat. Die Energiegewinnung ist unter anaeroben Bedingungen also vergleichsweise gering. Aus diesem Grund steigt

die Glucoseaufnahme und Laktatproduktion vieler Gewebe unter hypoxischen Bedingungen stark an. Die vermehrte Generierung von Laktat im Gewebe führt zur metabolischen Azidose.

Hypoxie und metabolische Azidose sind kennzeichnend für das Mikromilieu eines Tumors (Hanahan und Weinberg 2011). Deshalb hat sich der Begriff Tumorphypoxie etabliert.

Fast alle humanen soliden Tumore sind schlechter oxygeniert als das dazugehörige Ursprungsgewebe. Der durchschnittliche Sauerstoffpartialdruck im Normalgewebe liegt zwischen 40 und 60 mmHg. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches weisen hingegen einen wesentlich niedrigeren durchschnittlichen Sauerstoffpartialdruck von 14,7 mmHg auf (Becker et al. 1998).

Folgende Mechanismen tragen wesentlich zur Entstehung der Tumorphypoxie bei:

Die deregulierte Zellteilung bei Tumorzellen führt zu hohen Proliferationsraten. Da die Angiogenese im Tumor mit der Proliferation der Tumorzellen nicht standhält, vergrößern sich die Abstände zwischen den einzelnen Tumorzellen und den versorgenden Blutgefäßen und damit die Diffusionstrecke für Sauerstoff. Zellen, welche mehr als 70 µm vom nächsten versorgenden Blutgefäß entfernt sind, sind dauerhaft mit Sauerstoff unterversorgt. Man spricht von chronischer Hypoxie.

Um eine Sauerstoffmangelversorgung auszugleichen, werden Angiogenesefaktoren, wie zum Beispiel VEGF, von den Tumorzellen ausgeschüttet. Das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren in einem Tumor ist zugunsten kontinuierlich hoher Level an Pro-Angiogenesefaktoren verschoben. Die normale Blutgefäßentwicklung ist somit empfindlich gestört, weshalb die entstehenden Gefäße insuffizient ausgebildet sind. Es kommt zu temporären Obstruktionen und variablem Blutfluss innerhalb dieser neugebildeten Gefäße, wodurch nachfolgende (Tumor-) Gewebeabschnitte kurzzeitig nur unzureichend mit Sauerstoff versorgt werden (Chaplin et al. 1987). Diese Hypoxieform wird daher auch als akute Hypoxie bezeichnet.

Im Verlauf einer (malignen) Tumorerkrankung kommt es zudem häufig zur Ausbildung einer sogenannten Tumoranämie. Die fallende Hämoglobinkonzentration kann bedingt sein durch Blutverluste aus dem Tumorgewebe oder durch tumorinduzierte pathophysiologische Begleitprozesse, wie Störungen des Eisenstoffwechsels und Hemmung der Hämatopoese. Auch therapeutische Maßnahmen, wie beispielsweise Chemotherapie, Strahlentherapie sowie chirurgische Maßnahmen, tragen zur Tumoranämie bei. Die resultierende anämische Hypoxie führt zu einer weiteren Verschlechterung der Oxygenierung des Tumorgewebes (Becker et al. 2000).

Hypoxie und das hypoxische Mikromilieu eines Tumors spielen eine große Rolle bei der Tumorphathogenese. Unter anderem führt ein niedriger extrazellulärer pH-Wert, welcher oftmals unter Hypoxie feststellbar ist, zu einer Degradierung der extrazellulären Matrix durch Säure-induzierte Matrix-Metalloproteinasen (Bose et al. 2013). Dieses Mikromilieu trägt so zur Entwicklung eines invasiv wachsenden und frühzeitig metastasierenden Phänotyps bei (Estrella et al. 2013).

Tumorhypoxie wurde als unabhängiger prognostischer Marker bei verschiedenen Tumorentitäten, wie zum Beispiel Kopf-Hals-Tumoren und Zervixkarzinomen, identifiziert (Höckel et al. 1996; Brizel et al. 1997).

Von besonderer klinischer Relevanz ist, dass hypoxische Tumore oder Tumorareale schlechter auf eine Chemo- und/ oder Strahlentherapie ansprechen.

In Anwesenheit von Sauerstoff erhöht sich die Strahlenwirkung durch die entstehenden Peroxidradikale, welche in der Lage sind die durch ionisierende Strahlung entstandenen DNA-Schäden zu fixieren. Um unter hypoxischen Bedingungen die gleichen Strahleneffekte wie unter Normoxie zu erzielen, sind zwei- bis dreifach höhere Strahlendosen notwendig (Gray et al. 1953).

Die Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika beruht auf verschiedenen Mechanismen, unter anderem resultieren die relativ langen Diffusionsstrecken und missgebildete Gefäße innerhalb des Tumorgewebes in einer geringen Chemotherapeutikakonzentration am Zielort (Baish et al. 1996; Primeau et al. 2005).

1.4. Hypoxia-inducible Factor 1

Im Zentrum der Anpassungsvorgänge der Zelle an Sauerstoffmangel steht der Transkriptionsfaktor HIF-1. Dieser besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit (Wang et al. 1995). Eine Heterodimerisierung von HIF-1 α und HIF-1 β ist für den Wirkmechanismus unabdingbar.

Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 α durch die Prolyl-4-Hydroxylase hydroxyliert. Das Von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) bindet an das hydroxylierte HIF-1 α und führt es dem Abbau durch das Ubiquitin-Protein-System zu (Ke und Costa 2006; Semenza 2007; Supuran 2008) (siehe Abbildung 1).

Unter hypoxischen Bedingungen entfallen diese sauerstoffabhängigen Degradierungsprozesse von HIF-1 α , welches akkumuliert und in den Zellkern transloziert, wo es zur Heterodimerisierung mit dem kontinuierlich exprimierten HIF-1 β kommt. Das Dimer, welches vor allem unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert wird, bindet an das Hypoxia response element (HRE), ein DNA-Motiv in der Promotorregion der Zielgene von HIF-1, und induziert deren Transkription. Zu den über 100 Zielgenen

gehören unter anderem der Vascular Endothelial Growth Factor, die Carboanhydrase IX, Survivin und die Glucosetransporter 1 und 3 sowie alle Gene der Glykolyse. Der Metabolismus der Zelle wird somit modifiziert und die Glykolyse als dominanter Stoffwechselweg forciert. Ferner beeinflusst die Wirkung von HIF-1 den intrazellulären sowie extrazellulären pH-Wert, die Angiogenese, die Struktur der Extrazellulärmatrix und die Apoptose (Ke und Costa 2006; Semenza 2007; Supuran 2008) (siehe Abbildung 1). HIF-1 α ist in vielen soliden Tumoren nachweisbar, jedoch im Allgemeinen nicht im Normalgewebe (Talks et al. 2000; Zhong et al. 1999). Die kurze Halbwertszeit von circa 5 Minuten in reoxygenierten Zellen (Wang et al. 1995) erschwert den exakten Nachweis des HIF-1 α -Gehaltes im Gewebe erheblich.

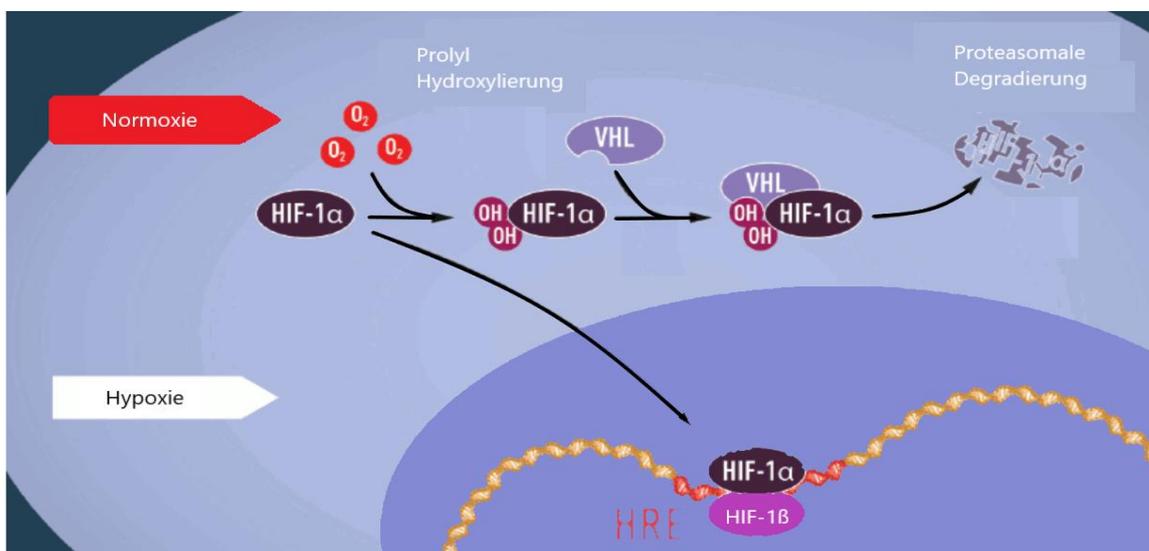


Abbildung 1: HIF-1 unter Normoxie und Hypoxie (modifiziert nach Johnson 2019)

1.5. Carboanhydrase IX

Die Carboanhydrasen sind Zink-Metalloenzyme, welche die reversible Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$) katalysieren. Bei Säugetieren sind bisher 13 aktive und 3 inaktive Isoformen bekannt, eine davon ist die membrangebundene CAIX (Neri und Supuran 2011). CAIX, ein 58/54 kDa großes Protein, besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, der sogenannten Ektodomäne (ECD), einer transmembranären Region und einem kurzen, intrazellulären Anteil. Die CAIX hat unter den Carboanhydrasen eine hohe enzymatische Aktivität mit $1,5 \times 10^8 \text{ M/sec}$ (Simone und Supuran 2010).

Die Transkription der CAIX wird durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 gesteuert (Dayan et al. 2006; Supuran 2008), wobei die CAIX-Expression die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α reflektiert (Kaluz et al. 2009). CAIX ist jedoch in reoxygenierten Zellen länger nachweisbar als HIF-1 α . Die Halbwertszeit von CAIX beträgt in reoxygenierten Zellen 38

Stunden (Rafajová et al. 2004). Aus diesem Grund wird CAIX häufig als Surrogatparameter für Hypoxie genutzt.

CAIX gilt als sensitiver, zellulärer Hypoxiemarker. Sørensen et al. konnten zeigen, dass humane, zervikale Plattenepithelzellen bereits bei 1 % Sauerstoff die maximale Konzentrationen von Ca9 mRNA exprimierten, wohingegen andere potentielle Hypoxiemarker, wie GLUT1, OPN und LDHA, erst bei anoxischen Konditionen (0-0,01 % Sauerstoff) ihr maximales Expressionslevel erreichten (Sorensen et al. 2005).

Mit nur wenigen Ausnahmen ist CAIX in den meisten Tumorentitäten im perinekrotischen bzw. hypoxischen Gewebe zu finden (Olive et al. 2001; Wykoff et al. 2000).

Hypoxische Zellen müssen, wie zuvor beschrieben, ihren Stoffwechsel auf die anaerobe Glykolyse umstellen, wodurch vermehrt Laktat, eine schwache Säure, in der Zelle erzeugt wird. Um einen Abfall des intrazellulären pH-Wertes zu vermeiden, muss das entstandene Laktat durch den Laktat-/H⁺-Cotransporter (MCT 1 und 4) aus der Zelle ausgeschleust werden. Der extrazelluläre pH-Wert fällt dadurch unter den physiologischen extrazellulären pH-Wert von 7,4. CAIX setzt extrazellulär das anfallende Kohlenstoffdioxid zu Bikarbonationen um, welche über einen membranassoziierten Bikarbonattransporter aktiv in die Zelle transportiert werden können. Dort reagiert das Bikarbonat mit Protonen zu Kohlenstoffdioxid, welches aus der Zelle diffundiert. Somit trägt CAIX indirekt zur Alkalisierung und Pufferung des intrazellulären pH-Wert bei (siehe Abbildung 2). Eine Stabilisierung des intrazellulären pH-Wertes zwischen 7,2 und 7,5 ist für die Zelle essentiell, da die zentralen Enzyme der Glykolyse pH-sensitiv sind. Auch für die Proteinsynthese ist ein stabiler intrazellulärer pH-Wert wichtig. Gleichzeitig wird durch die enzymatische Aktivität von CAIX die extrazelluläre Tumorzidose verstärkt, wodurch die Invasivität des Tumors gefördert wird. Neben CAIX gibt es noch zahlreiche andere Mechanismen zur Stabilisierung des intrazellulären pH-Wertes (Neri und Supuran 2011).

CAIX wird in nur wenigen Normalgeweben, wie den Epithelien des Magens, des Dünndarms und der Gallenwege, exprimiert (Ivanov et al. 2001). Viele Tumore exprimieren hingegen vermehrt CAIX, unter anderem Mammakarzinome, Nierenzellkarzinome und Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (Bartosova et al. 2002; Ivanov et al. 2001).

Eine CAIX-Überexpression in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ist assoziiert mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium, einer schlechten Überlebensprognose und einer erhöhten Rezidivbildung (Choi et al. 2008; Perez-Sayans et al. 2012; Yang et al. 2015).

Eine Überexpression von CAIX geht zudem mit einer gesteigerten Zellmigration einher (Yang et al. 2017), wohingegen eine Suppression der katalytischen Aktivität zu einer reduzierten Invasivität führte (Radvak et al. 2013). Dementsprechend konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibierung von CAIX zu einem reduzierten Wachstum von Xenograft-Tumoren führt (Chiche et al. 2009; Lou et al. 2011).

Ebenso konnte experimentell gezeigt werden, dass Tumore mit hohem CAIX-Level weniger gut auf Therapien ansprechen (Koukourakis et al. 2001), die Inhibierung von CAIX aber zu einer erhöhten Chemo- und Strahlensensibilität führte (Dubois et al. 2011; Dubois et al. 2013; Faes et al. 2016; Doyen et al. 2012; Bryant et al. 2018). Aus diesem Grund gilt CAIX als erfolgsversprechende Zielstruktur zur Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung von Tumoren.

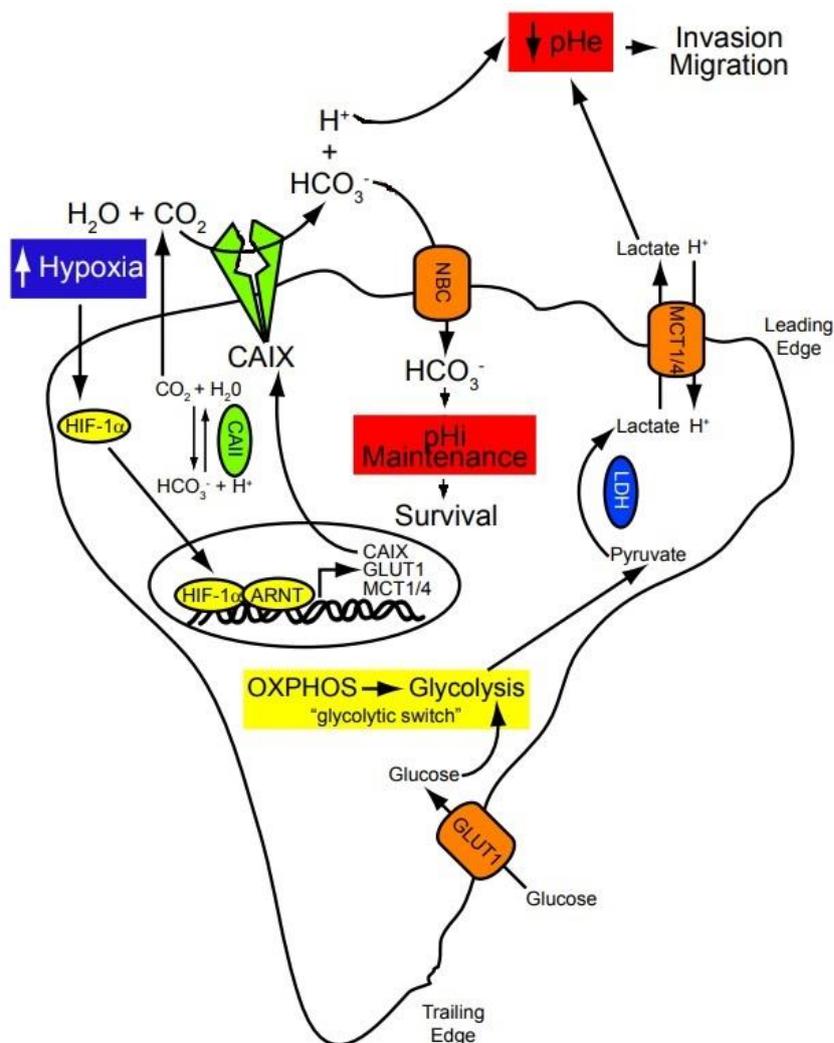


Abbildung 2: Stabilisierung des pH-Wertes durch CAIX (modifiziert nach McDonald et al. 2012)

1.6. Im Blut gelöstes CAIX

Eine gelöste Variante von CAIX ist im Blut nachweisbar. Bisher sind zwei Entstehungsmechanismen bekannt.

Mit Hilfe von Metalloproteasen erfolgt die proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne von CAIX, welche anschließend als gelöstes CAIX (50/54 kDa) im Blut nachweisbar ist. Dieser Vorgang wird als „Ectodomain shedding“ bezeichnet (Zatovičová und Pastoreková 2013). Die proteolytische Spaltung erfolgt kontinuierlich, wobei durch bestimmte Stimuli, wie beispielsweise die Behandlung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat, der Vorgang verstärkt werden kann. Auch konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Apoptose, beispielsweise durch das Chemotherapeutikum Doxorubicin, mit einem verstärkten „ectodomain shedding“ von CAIX einhergeht (Vidlickova et al. 2016).

CAIX wird zudem in Form von Exosomen, welche von Tumorzellen freigesetzt werden, an das Blut abgegeben. Je saurer das Mikromilieu, desto mehr Exosomen mit CAIX werden abgegeben (Logozzi et al. 2019).

Ob die gelöste Ektodomäne autokrine oder parakrine Funktionen ausübt, ist bislang noch nicht geklärt.

Ebenfalls noch nicht abschließend geklärt ist die prognostische Rolle von CAIX im Serum bzw. Plasma.

Kalavska et al. testete 83 Serumproben von Patienten mit Keimzelltumoren des Hodens, wobei die mittels ELISA gemessene Konzentration des gelösten CAIX keine Aussage über das progressionsfreie Überleben bzw. das Gesamtüberleben ermöglichte. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede der Serum-CAIX-Konzentrationen bei verschiedenen Patientengruppen (nicht-metastasiert, metastasiert und Chemotherapie naiv, mit Chemotherapie behandelt) nachgewiesen werden (Kalavska et al. 2016). In der Arbeit von Papworth et al. konnte für Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom ebenfalls keine prognostische Relevanz von Serum-CAIX im Hinblick auf das Überleben nachgewiesen werden (Papworth et al. 2010).

Hingegen wurde bei Patienten mit Vulvakarzinom ein reduziertes krankheitsfreies Überleben bei präoperativ erhöhtem Serum-CAIX nachwiesen (Kock et al. 2011). In einer Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe wurden 55 Patienten mit NSCLC untersucht, wobei hohe CAIX-Plasmaspiegel signifikant mit einem kürzeren Gesamtüberleben einhergingen (Ostheimer et al. 2014). Bei Nierenzellkarzinomen waren erhöhte Serum-CAIX-Werte mit einer erhöhten Rezidivrate assoziiert (Li et al. 2008). In einer kleinen Studie über 48 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich gingen

höhere CAIX-Serumwerte mit einem geringeren Überleben einher, jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen dem vortherapeutischen CAIX-Serumgehalt und dem T- bzw. N-Stadium festgestellt werden (Rosenberg et al. 2016).

Insgesamt ist die Beziehung zwischen der intratumoralen CAIX-Expression, der Tumorgröße und dem im Serum nachweisbarem CAIX umstritten.

Eine deutsche Arbeitsgruppe untersuchte 221 Tumorproben primärer Zervixkarzinome und 46 präoperativ entnommene Serumproben hinsichtlich ihres CAIX-Gehaltes. Hier konnte kein Zusammenhang zwischen der Menge an gelöstem CAIX und dem Tumor-CAIX-Gehalt festgestellt werden (Woelber et al. 2011). In einer Arbeit über das klarzellige Nierenzellkarzinom konnte hingegen ein Zusammenhang zwischen Tumorgröße und gelöstem CAIX-Gehalt im Serum gezeigt werden (Zhou et al. 2010).

Da die chemotherapieinduzierte Apoptose zu einem verstärkten „ectodomain shedding“ führt, stellt sich die Frage, ob CAIX als Marker für ein Therapieansprechen genutzt werden kann. Entsprechende Studien gibt es bisher kaum.

Bei 20 Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom wurde der CAIX-Serumgehalt vor und nach Gabe von Docetaxel, einem Chemotherapeutikum, bestimmt. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung der Werte nach erfolgter Chemotherapie (Smith et al. 2016). Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte die CAIX-Serum-Level im Verlauf der 1st-line-Therapie bei Patienten mit Ovarialkarzinom. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Woelber et al. 2010).

Einen definierten Cutoff für den CAIX-Serumgehalt von Gesunden gibt es bisher nicht. Die bisher publizierten Daten sind uneinheitlich. In einer Studie von Li et al. zur Rolle von Serum-CAIX in metastasiertem Nierenzellkarzinom lag der CAIX-Serumgehalt der gesunden Probanden bei $14,59 \pm 6,22$ pg/ml (Li et al. 2008). Hingegen wurde in einer Studie zur Rolle von gelöstem CAIX im Serum bei Patienten mit testikulärem Keimzelltumoren in der gesunden Vergleichsgruppe, welche 35 Proben umfasste, eine deutlich höhere CAIX-Serumkonzentration von $249,6 \pm 100,0$ pg/ml gemessen (Kalavska et al. 2016).

2. Zielstellung

Es ergeben sich folgende Zielstellungen dieser Arbeit:

1. Welche prognostische Bedeutung hat das tumorale bzw. im Serum gelöste CAIX im Hinblick auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinom?
2. In welchem Zusammenhang stehen klinopathologische Merkmale, wie beispielsweise die Tumorgröße, das intratumorale und das im Blut gelöste CAIX?
3. Kann das gelöste CAIX als Marker für ein Therapieansprechen im Rahmen einer Radiatio genutzt werden?

3. Material und Methodik

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bechergläser	Merck (Darmstadt)
Einweg-Handschuhe	Hardmann (Heidenheim)
Greiner-Röhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Human Carbonic Anhydrase IX Assay	R&D systems (Minneapolis, USA)
Magnetrührer	IKA-Labortechnik (Staufen)
Messzylinder	Merck (Darmstadt)
Mettler AM 100 (Analysenwaage)	Mettler (Giessen)
Mini Gel Tank	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Nitrocellulose-Membran (Amersham Hybond ECL)	GE Healthcare Life Science (München)
NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris-Gele	Invitrogen (Karlsruhe)
Odyssey CLx Western Blot Detection System	Li-Cor Biosciences GmbH (Bad Homburg)
Ofen, Typ 3216	Braun (Kornberg)
Parafilm	Merck (Darmstadt)
pH-Meter CG 840	Schott (Hofsheim)
Pipetboy	Bioscience (Fernwald)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (low-binding)	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf) und Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Rollenmischgerät RM 5	Karl Hecht KKG (Sondheim)
Serum S-Monovette Sarstedt Z-Gel, 9 ml	Sarstedt AG &Co AG (Nümbrecht)
VortexGenie 2	Roth (Karlsruhe)
Whatman-Filterpapier	Biorad (München)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)

3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Bolt®/NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Bolt®/NuPAGE® Sample Reducing Agent 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
3,3`-Diaminobenzidin, DAB Substrate Kit	Zytomed Systems (Berlin)
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Boehringer Ingelheim/Serva
ECL™ Prime Western Blotting System	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethanol (96 %)	Merck (Darmstadt)
Eukitt®	ORSAtec (Bobingen)
Eukitt® quick-hardening mounting medium for microscopy	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Giemsa-Lösung	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hämalaun	Dr. K. Hollborn & Söhne (Leipzig)
HRP, Zytochem Plus HRP	Zytomed Systems (Berlin)
Human Carbonic Anhydrase IX Assay	R&D systems (Minneapolis, USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Boehringer Ingelheim/Serva
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
Methanol (100 % p.a.)	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
NuPAGE® MES Puffer 20x	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE® Transferpuffer	Invitrogen (Karlsruhe)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Plattenreader	TECAN GENios (Männedorf, Schweiz)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)

3.1.3. Puffer und Lösungen

1x MES Bolt®/ Elektrophoresepuffer	Von Invitrogen, gemäß Herstellerangaben
10x PBS	4 M NaCl 26mM KCl 15mM KH ₂ PO ₄ 80mM Na ₂ HPO ₄
1x PBST	1x PBS 0,1 % Tween 20
1x Transferpuffer	50 ml 20x Transferpuffer 100ml Methanol 850ml Aqua bidest
Antikörperlösung	1xPBST 5 % (w/v) Milchpulver Gehalt an entsprechenden Antikörpern gemäß Herstellerangaben
Blockierungsreagenz	1xPBST 10 % (w/v) Milchpulver
Cell Lysis Buffer	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
Washing buffer ZUC202-2500, Zytochem Plus HRP it/Plus Polymer System	Zytomed Systems (Berlin)
T-EDTA buffer ZUC029-500	Zytomed Systems (Berlin)

3.1.4. Primär- und Sekundärantikörper

Anti-Human Carbonic Anhydrase IX M75	BioScience (Slowakei)
Broad Spectrum, Zytochem Plus HRP Kit	Zytomed Systems (Berlin)

3.1.5. Patientenmaterial

Für diese explorative Studie wurden Gewebeproben von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und Blutserumproben dieser Patienten untersucht. Die Proben wurden im Zeitraum von Februar 2009 bis Dezember 2014 gesammelt.

Die Durchführung der Studie erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethik-Kommission der Martin-Luther-Universität Halle-

Wittenberg genehmigt. Von allen an der Studie teilnehmenden Patienten liegt eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

Insgesamt wurden 56 Tumorgewebebeurproben und 22 Normalgewebebeurproben mittels Western Blot, 38 Tumorproben mittels ELISA und 158 Tumorgewebebeurproben mittels Immunhistochemie auf ihren CAIX-Gehalt untersucht. Die Tumorgewebebeurproben wurde zum Zeitpunkt der Probeexzision oder der Tumoroperation entnommen (siehe Abbildung 3). Die einzelnen Arbeitsschritte zur Aufarbeitung der Proben sind in 3.2.1. bis 3.2.6. detailliert dargestellt.

Zusätzlich wurden 89 Blutproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und 43 Blutproben von gesunden Probanden mittels ELISA im Hinblick auf ihren CAIX-Gehalt getestet (siehe Abbildung 3). Bei weiteren 28 Patienten wurden zudem Serumproben im Laufe der Radiatio zu 5 unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt (siehe Abbildung 4, siehe 3.2.7.). Die untersuchten Patientenkollektive sind dabei nicht identisch, es gibt allerdings Überschneidungen.

Diagnosedaten, Alter bei Erstdiagnose, TNM-Stadium bei Erstdiagnose, Tumorhistologie, Grading, Therapiedaten und Überlebensdaten wurden hauptsächlich aus der klinischen Dokumentation und durch regelmäßiges Abfragen der Daten des Klinischen Krebsregisters Sachsen-Anhalt erfasst. Die letzte Abfrage erfolgte im Juli 2020.

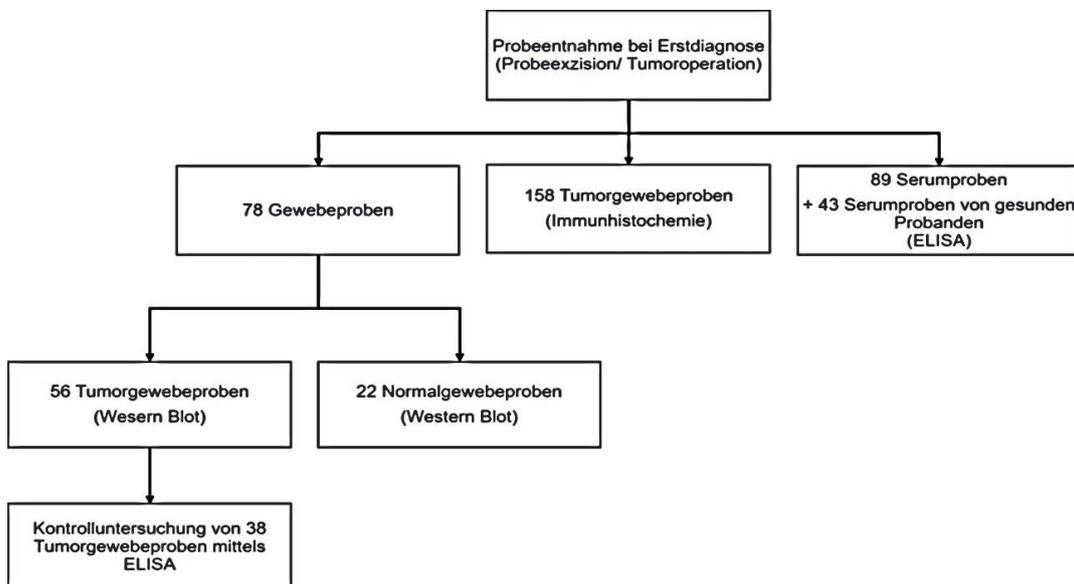


Abbildung 3: Untersuchte Proben bei Erstdiagnose

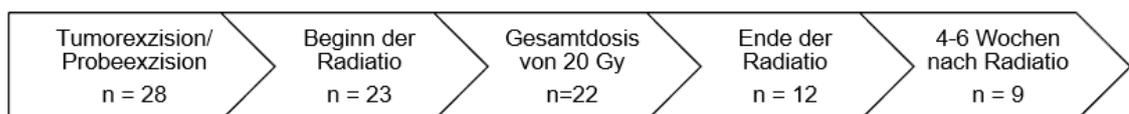


Abbildung 4: Untersuchte Proben während Radiatio

3.2. Methoden

3.2.1. Gewinnung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden während der operativen Tumorexzision gewonnen und direkt nach Entnahme in Flüssigstickstoff schockgefroren und gelagert.

Die Gewebeproben wurden anschließend im Cryocut geschnitten. Jeweils die ersten beiden sowie die letzten beiden Schnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm wurden auf einem Objektträger aufgebracht, beschriftet und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt (siehe 3.2.2).

Die dazwischenliegenden 10 bis 15 Gewebeschnitte mit einer Schnittdicke von 20 µm wurden in einem gekühlten low-binding Eppendorfgefäß aufgefangen und anschließend auf Trockeneis gelagert. Es wurde darauf geachtet, dass die Gewebeschnitte während des gesamten Vorganges nicht auftauen.

Die weiteren Arbeitsschritte zur Aufarbeitung der Proben sind in Abbildung 5 zusammengefasst und werden im Folgenden detailliert beschrieben.

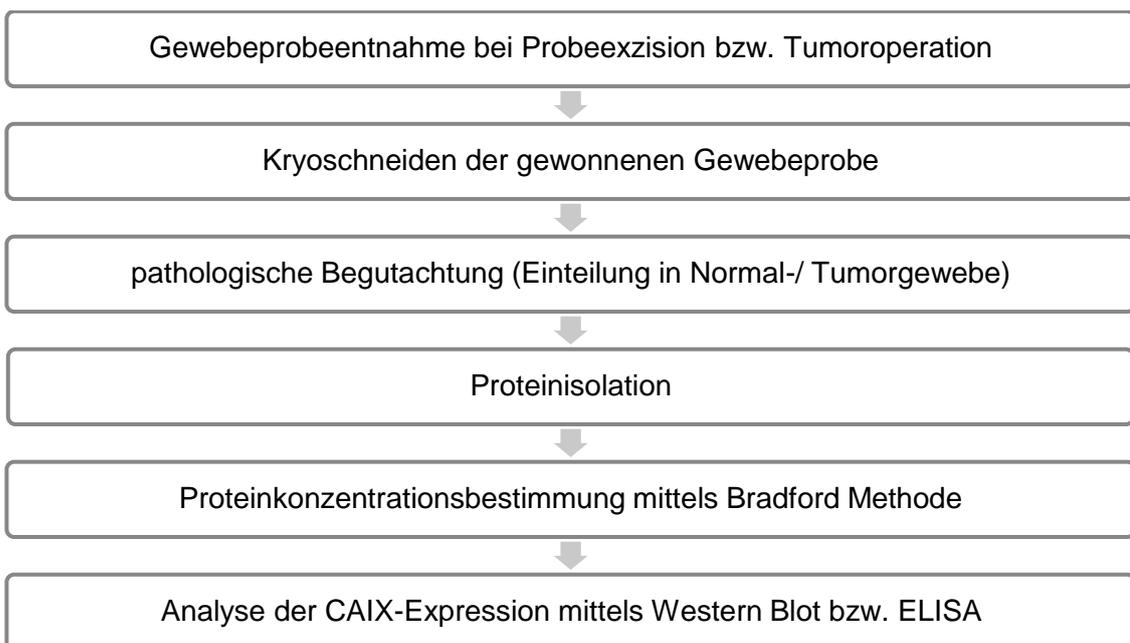


Abbildung 5: Arbeitsschritte zur Aufbereitung der entnommenen Gewebeproben

3.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und histologische Einstufung der Gewebeproben

Die HE-Färbung gehört zu den Standardfärbungen in der Histologie. Das Hämatoxylin färbt die Zellkerne dunkelviolett, wohingegen das Zytoplasma vom Eosin rot angefärbt wird. Die Färbung ermöglicht die histologische Begutachtung des Gewebes.

Positivkontrolle

Die Objektträger wurden hierzu mit 4,5%iger Formalinlösung fixiert und anschließend durch viermaliges Eintauchen in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte in Mayers Hämalaunlösung für drei Minuten gefärbt. Das überschüssige Färbemittel wurde mit 0,1%iger HCl-Lösung entfernt und die Objektträger für drei Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült. Die Färbung des Zytoplasmas mit 0,5%iger Eosinlösung erfolgte für weitere zwei Minuten. Im Anschluss wurden die Objektträger für 30 Sekunden unter fließendem Leitungswasser abgespült. Die gefärbten Schnitte wurden nachfolgend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 % Ethanollösung) jeweils viermal eingetaucht und abschließend zweimal in Xylol inkubiert. Das Eindecken der feuchten Präparate erfolgte mit Eukitt® quick-hardening mounting medium for microscopy.

Die Präparate wurden durch Herrn Dr. med. Bilkenroth (Institut für Pathologie, Eisleben) begutachtet. Die Einteilung der gewonnenen Gewebeproben erfolgte in Normal-, Misch- und Tumorgewebe

Präparate, welche kein transformiertes Gewebe enthielten, wurden als Normalgewebe eingestuft. Enthielten die Gewebeschnitte mehr als 75 % maligne entartete Zellen wurden diese Proben als Tumorgewebe gewertet. Schnitte mit weniger als 75 % Tumorzellen wurden als Mischgewebe klassifiziert, die dazugehörigen Proben entfielen für die weiteren Untersuchungen.

3.2.3. Proteinisolation

Die Gewebeschnitte wurden in 300 µl Cell Lysis Buffer aufgenommen, wobei der Puffer zuvor mit einer 1:100 Proteininhibitorlösung vermischt wurde. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit auf Eis wurde der Zellverband zusätzlich mittels Ultraschall aufgeschlossen (9 Zyklen: 45 % für 9 Sekunden). Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 14,000xg bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in low-binding Eppendorfgefäße überführt.

Es wurde während des gesamten Arbeitsvorganges auf die Einhaltung der Kühlkette geachtet.

3.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Quantifizierung des Proteingehaltes der Proben wurde der Bradford-Test durchgeführt. Diese auf Photometrie beruhende Methode nutzt den Umstand, dass der Farbstoff Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in seiner ungebundenen Form ein Absorptionsmaximum bei 465 nm aufweist. In saurem Milieu in

Anwesenheit von basischen Aminosäuren bindet der Farbstoff an diese und das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu 595 nm.

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. 998 µl dieser Lösung wurden mit 2 µl der zu untersuchenden Probe vermischt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer vorher bestimmten Eichkurve und der gewonnenen Messwerte wurde der Proteingehalt der Probe ermittelt.

Um ein Ausfallen der Proteine über einen längeren Zeitraum zu verhindern, wurden die Proben mit Cell Lysis Buffer auf eine Zielkonzentration von 3 µg/µl verdünnt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration erneut mit der Bradford-Methode mittels Photometer bestimmt.

3.2.5. Western Blot

3.2.5.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse wurde das NuPage®-System von Invitrogen mit den dazugehörigen 4 - 12 % Bis-Tris Gelen und dem MES-Laufpuffer gewählt. Je Probe wurden 30 µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle für die untersuchten Proteine diente eine bereits von Frau Ulrike Pabst isolierte Proteinprobe, welche aus unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Zellen einer Kopf-Hals-Tumorzelllinie gewonnen wurde. Nach Zugabe von jeweils 6 µl 4x LDS-Ladepuffer und 2 µl Reduktionsmittel zu den Proteinproben wurden diese für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Je Gel wurde dieselbe Menge der Positivkontrolle aufgetragen. Zur Abschätzung der Proteingröße wurde zusätzlich ein Proteinstandard (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 135 V und einer Stromstärke von 200 mA für 70 Minuten bei etwa 4 °C im Kühlschrank.

3.2.5.2 Blotting

Mittels Tank-Blot-Verfahren wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 260 mA für 150 Minuten bei circa 4 °C im Kühlschrank in einer mit 1x Transferpuffer gefüllten Elektrophoresekammer.

3.2.5.3 Immundetektion

Im Anschluss an den Transfer wurden die Membranen in 10 % Milchpulver/PBST-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Danach wurde die Membran bei ca. 25 kDa und ca. 70 kDa in drei Teilstücke geteilt. Die Inkubation mit dem entsprechenden spezifischen primären Antikörper in geeigneter Verdünnung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen des Membranteilstückes mit PBST wurde dieses mit sekundärem Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranstücke dreimal mit PBST für fünf Minuten gewaschen.

Für die Detektion von CAIX wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Membran wurde mit ECL Prime inkubiert, welches das Substrat der Peroxidase enthält. Dieses wird von der Peroxidase unter Lichtemission reduziert. Mit Hilfe eines Röntgenfilms kann das entstandene Licht quantifiziert werden. Ein Beispiel für einen Röntgenfilm mit der für CAIX-typischen Doppelbande ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Röntgenfilme wurden eingescannt und mit dem Programm Image Studio Lite Version 4.0 analysiert. Die erhaltenen Daten wurden anhand der Positivkontrolle des jeweiligen Durchgangs normalisiert.

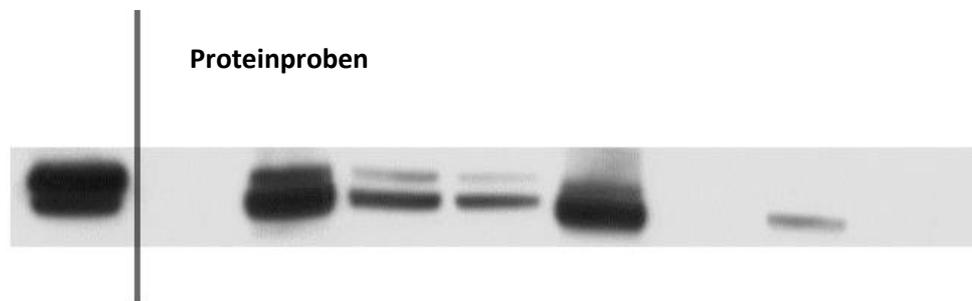


Abbildung 6: Western Blot CAIX-Doppelbande (54/58 kDa)

3.2.6. Immunhistochemie

Gewebeproben, welche während der Probeexzision oder radikalen Tumoroperation gewonnen wurden, wurden deparaffiniert. Die Proben wurden mittels vorgewärmtem T-EDTA Buffer bei einem pH von 6,0 und 98 °C im Ofen für 30 Minuten gedämpft. Anschließend wurden die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen und für sieben bis zehn Minuten in einer 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung geblockt. Nach erneutem Waschen und Applikation von Waschpuffer wurde der CAIX-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 auf das Gewebe aufgetragen. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit Wasch-Puffer gewaschen und für 15 Minuten mit

Meerrettichperoxidase inkubiert. Anschließend erfolgte die Oxidation des Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin), welches für zehn Minuten inkubiert wurde. Nach Waschen mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit Hämalaun für 30 Sekunden. Nach erneutem zehnmütigem Waschen in Wasser wurden die gefärbten Schnitte in Alkohol und nachfolgend in Xylol inkubiert. Anschließend wurden die feuchten Präparate mit Eukitt® eingedeckt.

Die Präparate wurden durch Dr. med. Daniel Bethmann vom Institut der Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mikroskopisch begutachtet. Die Färbung wurde anhand des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele klassifiziert (Zygogianni et al. 2011; Remmele und Stegner 1987). Der IRS berechnet sich aus der Produkt der Färbeintensität und dem prozentualen Anteil positiver Zellen und kann Werte zwischen 0 bis 12 einnehmen. Der Score wird wie folgt interpretiert: IRS 0- 2 steht für keine Färbung, IRS 3-4 für eine schwache Expression, IRS 6-8 für eine mäßig starke Expression, IRS 9-12 für eine starke Expression. In Abbildung 7 sind exemplarisch die mikroskopischen Bilder für die immunhistochemischen Färbungen von CAIX für die Scores 0, 2, 6 und 12 abgebildet.

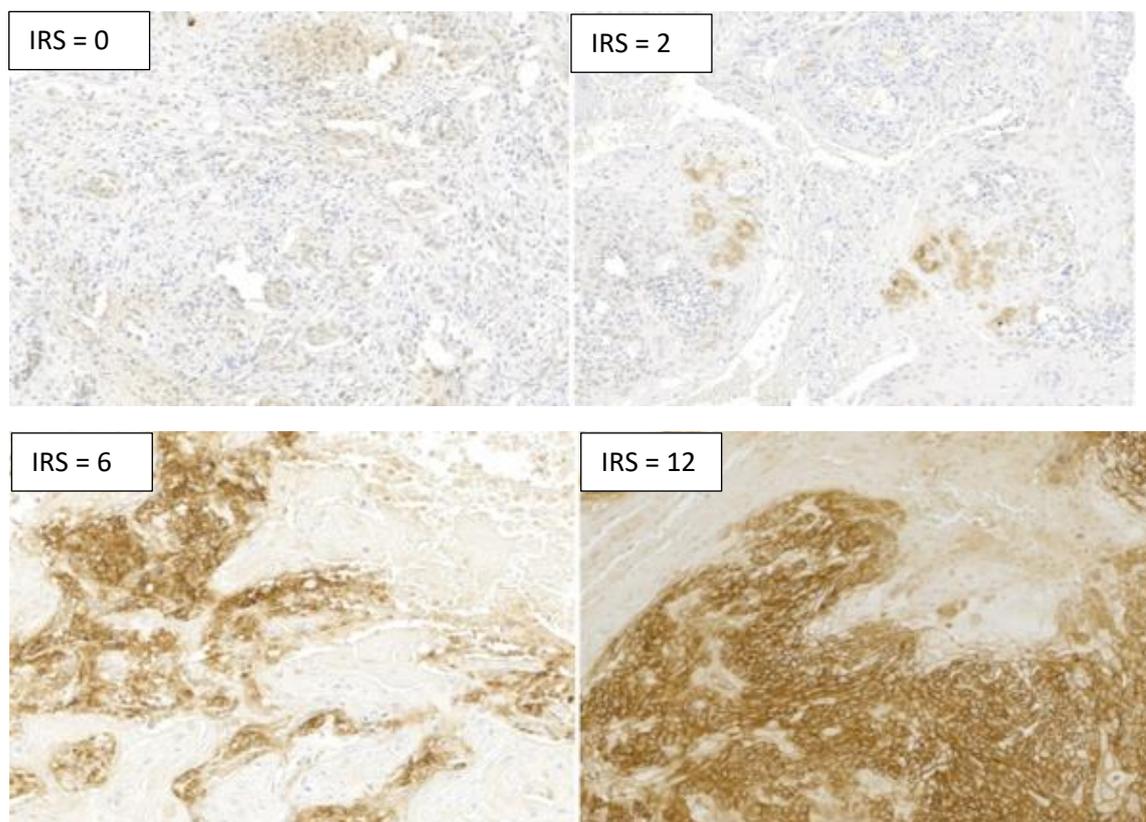


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbungen von CAIX (modifiziert nach Eckert et al. 2019)

3.2.7. Gewinnung der Blutserumproben

Von den an der Studie teilnehmenden Patienten wurden nicht nur Tumorteilstücke gesammelt und untersucht, sondern auch Blutserumproben. Diese wurden zeitgleich mit den Gewebeproben während der operativen Tumorexzision gewonnen (t_0).

Erhielten die Patienten nach der Operation noch eine Radiotherapie wurde im Verlauf noch zu vier weiteren Zeitpunkten Blut abgenommen, einmal vor Beginn der Strahlentherapie (t_1), nach der Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 20 Gy (t_2), unmittelbar nach Beendigung der Therapie (t_3) und vier bis sechs Wochen nach Ende der Radiatio (t_4).

Nach einer Inkubationszeit von ca. 30 - 60 Minuten nach Blutentnahme wurden die EDTA-Blutröhrchen bei 2000xg und 20 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in Kryoröhrchen überführt und bei - 80 °C gelagert.

3.2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein Teil der Gewebeproteinproben und die Blutserumproben wurden mittels eines spezifischen CAIX-ELISA-Kits (Human Carbonic Anhydrase IX Assay) nach Herstellerangaben untersucht. Die CAIX-Serum-Konzentration wurde mit Hilfe der Standardkurve ermittelt. 100 µl der zu untersuchenden Probe wurde mit 50 µl Assay Puffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer 96-Well-Platte inkubiert. Anschließend wurde die Platte vier Mal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur mit 200 µl Konjugat-Puffer. Nach der Inkubation wurde erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit 200 µl Substratpuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem Waschen wurden 50 µl Stopplösung hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Vermessung mittels Plattenreader bei 450 nm. Die Konzentration von CAIX in jeder Probe wurde mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt.

3.2.9. Statistische Auswertung

Ob anhand des CAIX-Gehaltes zwischen Normal- und Tumorgewebe bzw. zwischen Serum von Blutspendern und Serum von Tumorpatienten unterschieden werden kann, wurde mittels ROC-Kurven analysiert.

Zur Überlebenszeitanalyse wurden Kaplan-Meier-Kurven und Cox-Regressionen genutzt, um die prognostische Bedeutung von CAIX im Hinblick auf das Gesamtüberleben der Tumorpatienten zu charakterisieren. Dafür wurden die Proben anhand ihres Expressionslevels an CAIX in Gruppen mit niedriger bzw. hoher Expression eingeteilt. Die Einteilung der Kohorten erfolgte bei der Immunhistochemie

und bei den Serumproben willkürlich. Bei den Kohorten, untersucht mittels ELISA und Western Blot, wurde bei der Gruppeneinteilung darauf geachtet, dass die Gruppe mit dem höheren CAIX-Gehalt ca. 15 % der untersuchten Probanden enthielt, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Immunhistochemiedaten zu ermöglichen. Zur Testung auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte bei der Kaplan-Meier-Methode ein Log-Rank-Test.

Ob der intratumorale CAIX-Gehalt und der Serum-CAIX-Gehalt miteinander korreliert, wurde mit der Korrelation nach Spearman analysiert. Ob es Unterschiede hinsichtlich des intratumoralen bzw. Serum-CAIX im Hinblick auf die einzelnen T-, N-, M-Stadien bzw. Grading gibt, wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt.

Mit Hilfe des T-Test für abhängige Variablen wurden die Mittelwerte des CAIX-Gehaltes im Serum zu den verschiedenen Zeitpunkten vor, während und nach der Strahlentherapie miteinander verglichen.

4. Ergebnisse

4.1. CAIX-Proteingehalt im Tumor- und im Normalgewebe

Insgesamt wurde der CAIX-Proteingehalt von 56 Tumorgewebeprobe und 22 Normalgewebeprobe untersucht. Der mediane CAIX-Proteingehalt im Tumorgewebe lag bei 5231,7 (Mittelwert $15313,5 \pm 20506,5$; Wertspanne 0 - 94057,9), wohingegen der mediane CAIX-Proteingehalt im Normalgewebe bei 0 (Mittelwert $2265,4 \pm 10105,3$; Wertspanne 0 – 47503,35) lag. In Abbildung 8 ist die Verteilung des CAIX-Gehaltes für Tumor- und Normalgewebe dargestellt. Ein Extremwert bei den Normalgewebeprobe ist dabei eindeutig sichtbar.

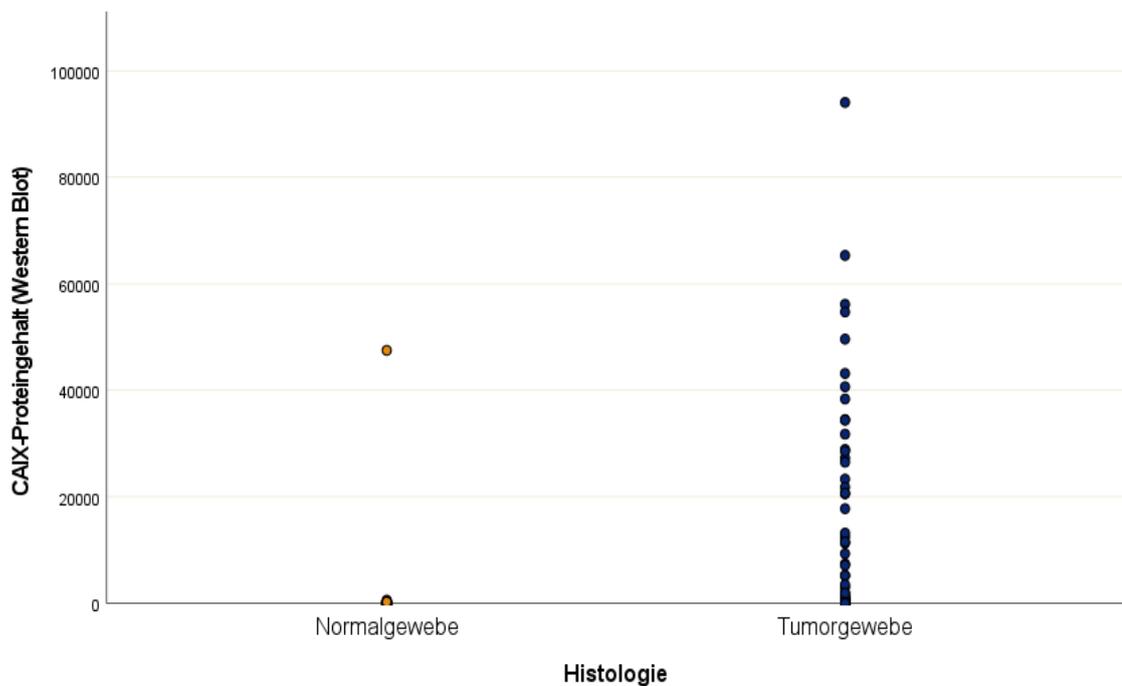


Abbildung 8: CAIX-Gehalt (Western Blot) im Normal- und Tumorgewebe

Um zu testen, ob anhand des CAIX-Wertes zwischen Normal- und Tumorgewebe unterschieden werden kann, wurde eine Analyse mittels ROC-Kurve (siehe Abbildung 9) durchgeführt. Wählt man als Grenzwert für CAIX 36,7, dann liegt die Sensitivität bei 0,79 und die Spezifität 0,55. Die AUC lag bei 0,78 (95%KI: 0,67 - 0,89; $p < 0,001$).

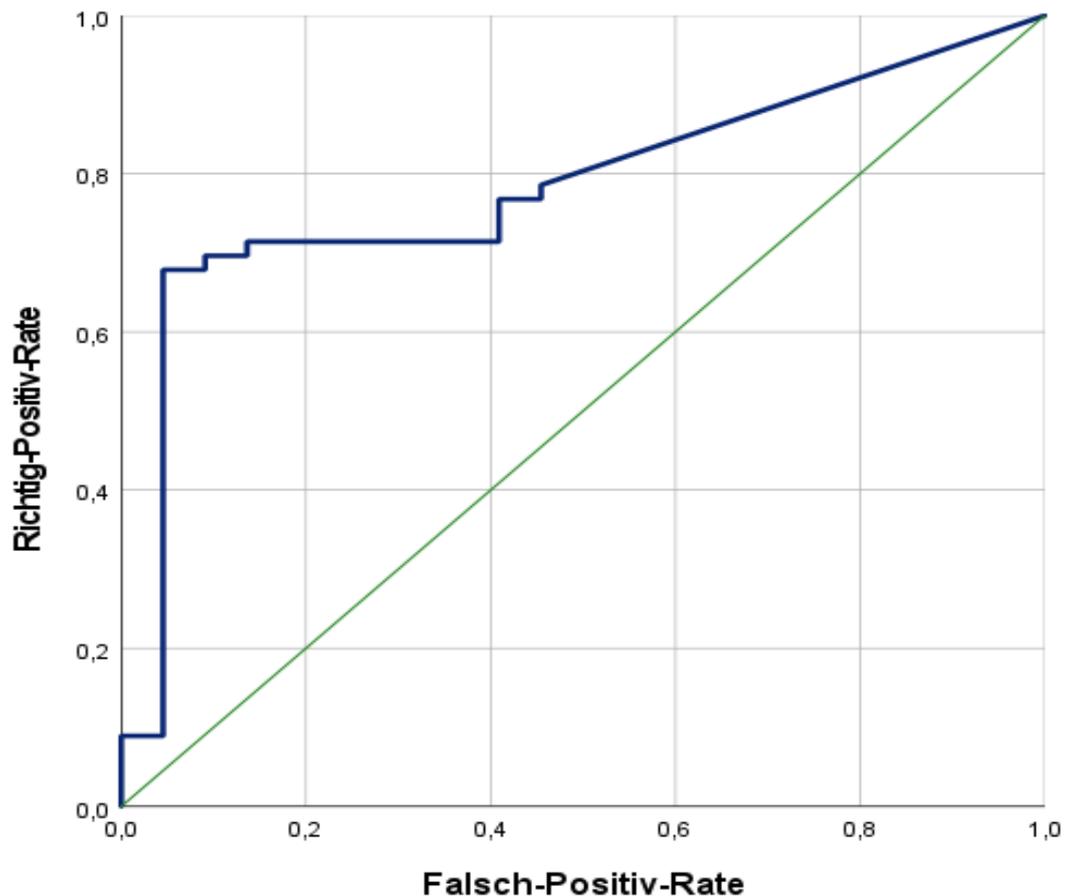


Abbildung 9: ROC-Kurve zur Diskriminierung von Normal- und Tumorgewebe mittels des CAIX-Gehaltes

4.2. Prognostische Bedeutung des CAIX Proteingehaltes im Tumorgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie

Das Tumorgewebe von 158 Patienten mit Mundhöhlenkarzinom wurde immunhistochemisch für CAIX gefärbt. Die klinopathologischen Merkmale sind in Tabelle 1 dargestellt.

Entsprechend ihrer CAIX-Expression wurde das Kollektiv in zwei Gruppen aufgeteilt. In 134 Gewebeproben (85 %) konnte CAIX nicht bzw. nur schwach nachgewiesen werden (IRS 0-6), diese bildeten die erste Gruppe. Nur in 24 Proben (15 %) zeigte sich eine starke CAIX-Expression (IRS 7-12), daher wurden diese zur zweiten Gruppe zusammengefasst.

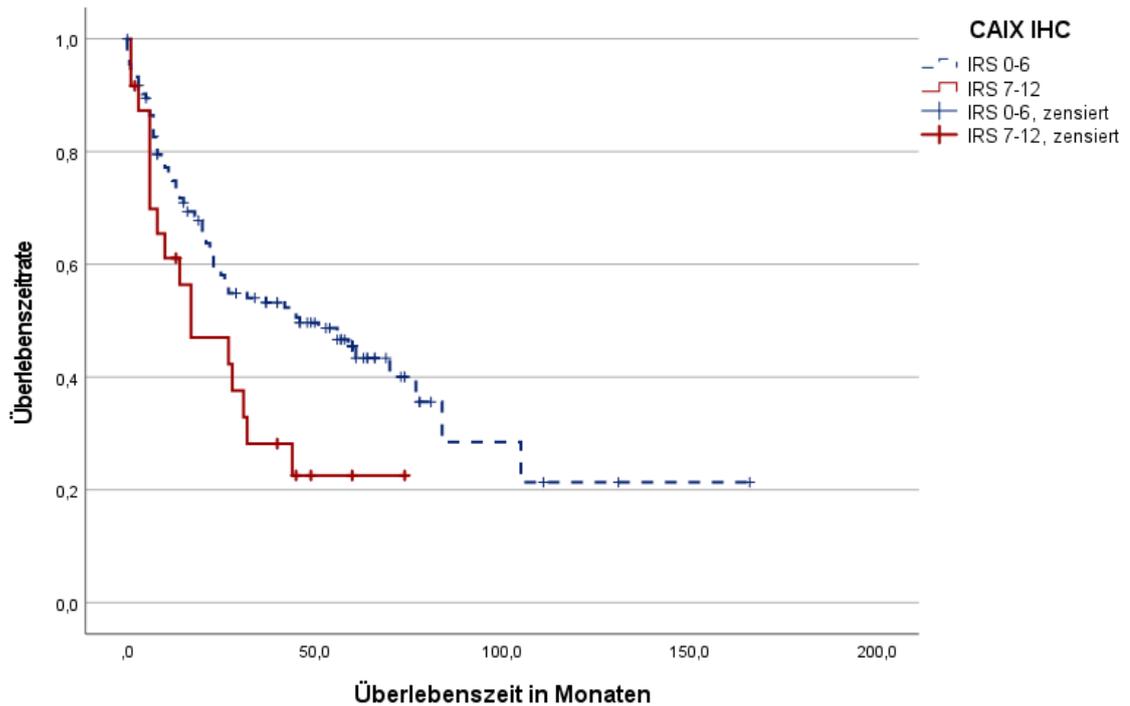
In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich, dass die Gruppe mit schwacher CAIX-Expression im Median 46 Monate (95 %KI: 22,6-69,4 Monate) lebte und damit deutlich länger als die Gruppe mit starker CAIX-Expression, welche im Median 17 Monate (95 %KI: 0-36,1 Monate) ($p=0,027$). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 10 dargestellt.

Tabelle 1: Klinopathologische Merkmale des Patientenkollektivs untersucht mittels IHC (p-Werte kalkuliert mittels Kruskal-Wallis-Test)

	Gesamtproben Immunhistochemie	Niedriger CAIX- Proteingehalt (IRS 0 - 6)	Hoher CAIX- Proteingehalt (IRS 7 - 12)
Gesamtanzahl	158	134	24
Geschlecht			p = 0,29
Männlich	123	102	21
Weiblich	35	32	3
T-Stadium			p = 0,03
T1	37	35	2
T2	43	37	6
T3	19	16	3
T4	59	46	13
N-Stadium			p = 0,16
N0	72	64	8
N1	19	17	2
N2	63	49	14
N3	4	4	0
M-Stadium			p = 0,18
M0	146	125	21
M1	12	9	3
Grading			p = 0,54
1	16	15	1
2	93	78	15
3	49	41	8
Tod			p = 0,45
Nicht verstorben	68	61	7
Verstorben	90	73	17

Aufgrund des deutlichen Unterschiedes zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich des Überlebens wurde zusätzlich eine multivariable Cox-Regression durchgeführt. Das Modell wurde dabei zusätzlich nach dem T- und N-Stadium sowie nach dem Tumorgrading adjustiert. Aufgrund der relativ kleinen Fallzahl wurde dabei das T- und das N- Stadium in jeweils zwei Gruppen zusammengefasst. T1 und T2 bildeten eine Gruppe und T3 und T4 die zweite Gruppe. N0 bildete ebenfalls eine eigenständige Gruppe und N1 bis N3 wurden zu einer weiteren Gruppe zusammengefasst. Bei Durchführung einer multivariablen Cox-Regression zeigt sich, dass Patienten, deren

Tumore CAIX sehr stark exprimieren, ein 1,6-fach erhöhtes Risiko früher zu versterben haben (95 %KI: 0,96 – 2,8; p= 0,066) (siehe Abbildung 11).



Anzahl gefährdeter Personen (zensierte Fälle)

Zeitraum in Monaten	0	25	50	75	100	125	150	175
IRS 0 – 6	134	72 (8)	51 (19)	9 (55)	4 (58)	2 (59)	1 (60)	0 (61)
IRS 7- 12	24	10 (2)	2 (5)	0 (7)	0 (7)	0 (7)	0 (7)	0 (7)

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit des CAIX-Gehaltes (IHC)

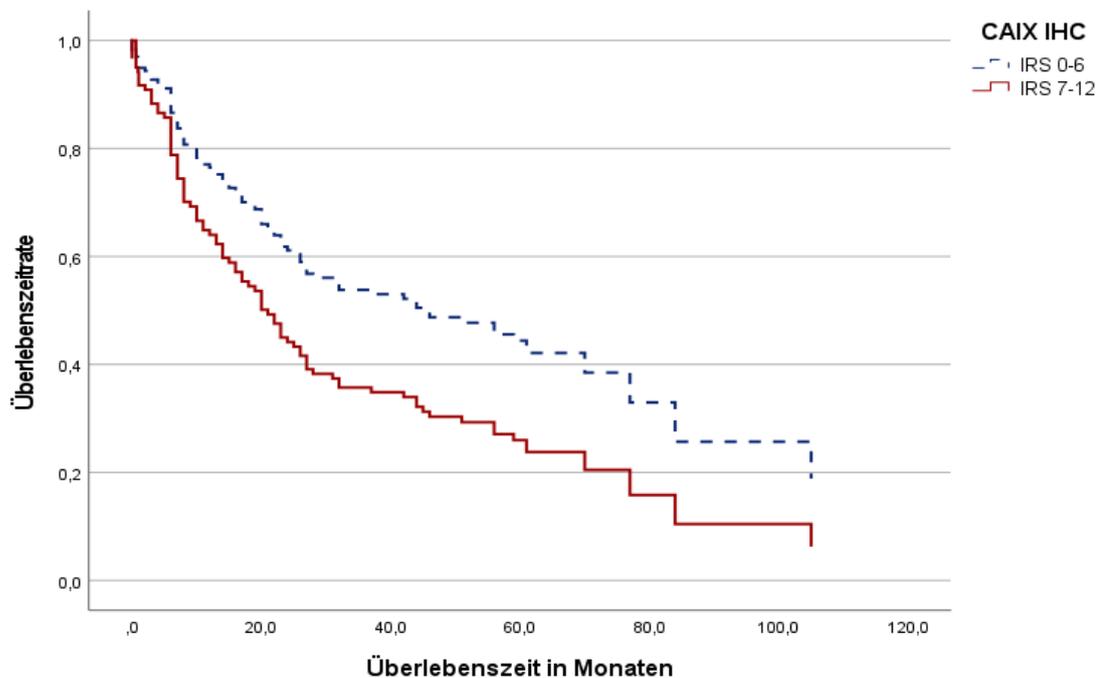
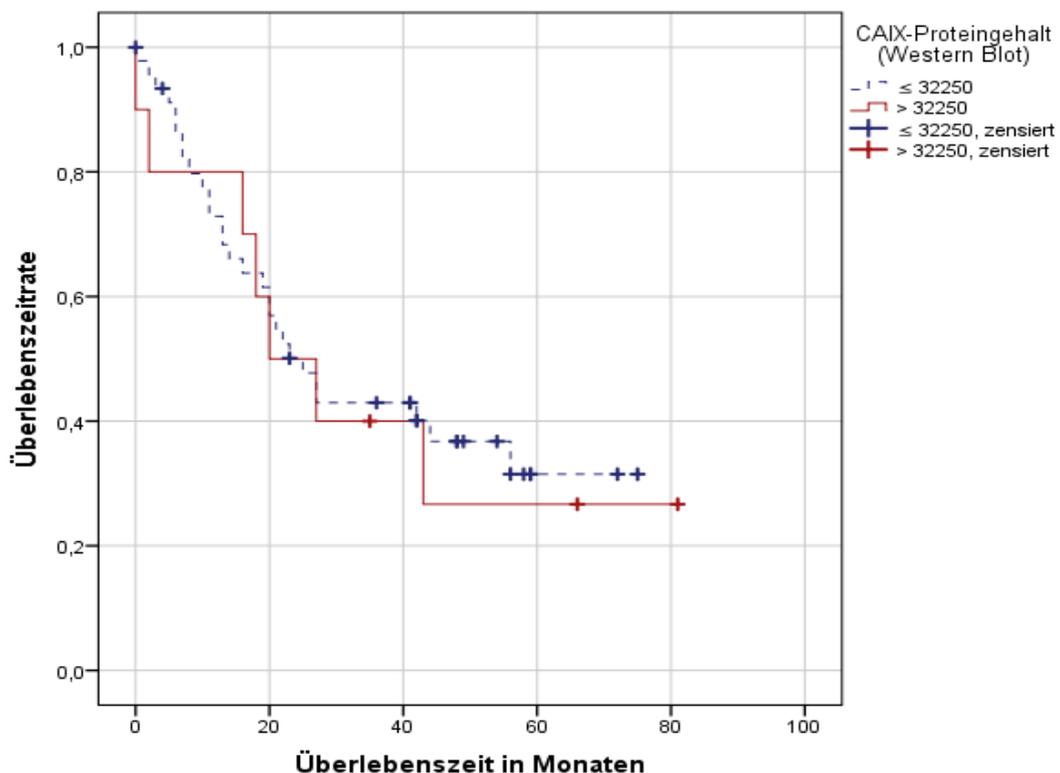


Abbildung 11: Multivariable Cox-Regression in Abhängigkeit vom CAIX-Gehalt (IHC)

4.3. Prognostische Bedeutung des CAIX-Proteingehaltes im Tumorgewebe gemessen mittels Western Blot-Analyse

56 Tumorgewebebeurteilungen wurden anhand ihres CAIX-Proteingehaltes, ermittelt im Western Blot-Verfahren, in 2 Gruppen aufgeteilt. Proben mit niedrigem CAIX-Proteingehalt (n=46, CAIX-Proteingehalt ≤ 32250) bildeten die erste Gruppe. Die verbleibenden Proben mit einem hohen CAIX-Gehalt (Proteingehalt > 32250 ; n= 10) ergaben die zweite Gruppe. Die Wahl des Cut-offs erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit in Anlehnung an die Immunhistochemiedaten in zwei Gruppen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zweite Gruppe in etwa 15 % der Patienten umfasst und somit vergleichbar mit der Gruppengröße der Immunhistochemiedaten und der Serumdaten ist. Die klinopathologischen Parameter des Gesamtkollektivs sind in Tabelle 2 dargestellt.



Anzahl gefährdeter Personen (Anzahl zensierter Fälle)

Zeitraum in Monaten	0	20	40	60	80
CAIX-Proteingehalt ≤ 32250	46	25 (2)	17 (4)	2 (16)	0 (18)
CAIX-Proteingehalt > 32250	10	5 (0)	3 (1)	3 (5)	1 (6)

Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom CAIX-Gehalt (Western Blot)

Patienten mit niedrigerem CAIX-Proteingehalt hatten eine mediane Überlebenszeit von 25 Monaten (95 %: KI: 18 – 32 Monate) und unterschieden sich damit nicht wesentlich von der zweiten Gruppe mit höherem CAIX-Proteingehalt (mediane Überlebenszeit 20 Monate; 95 % KI: 6 – 34 Monate). Die Unterschiede hinsichtlich des medianen Überlebens sind prognostisch nicht relevant ($p = 0,809$) (siehe Abbildung 12).

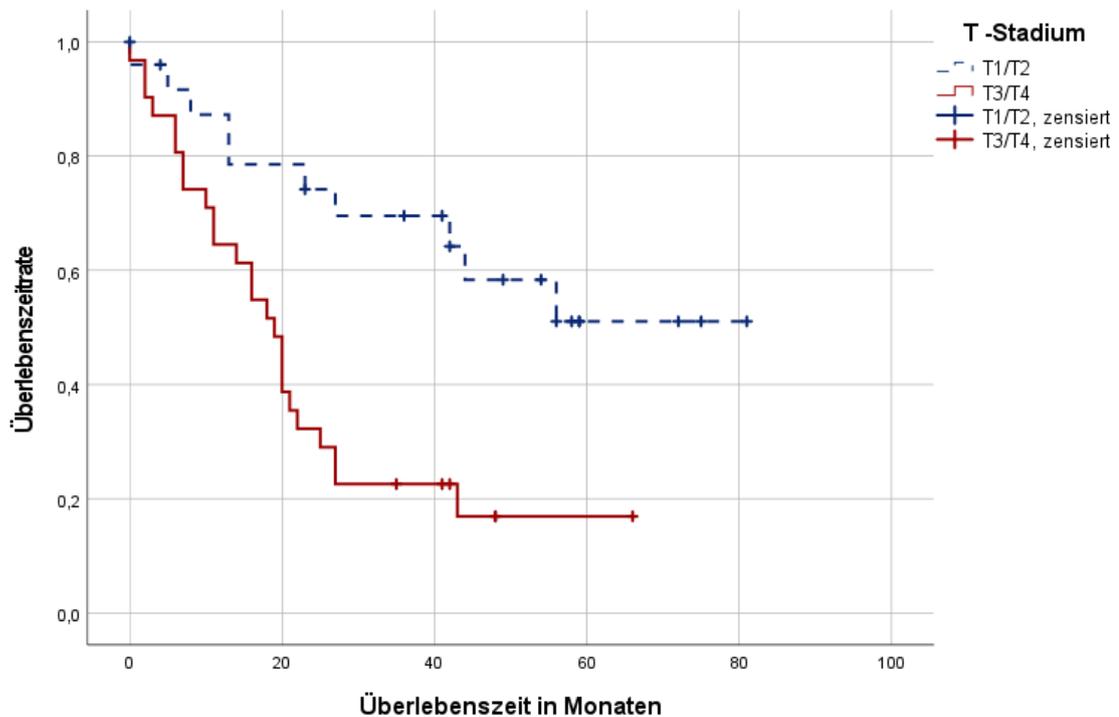
Tabelle 2: Klinopathologische Parameter des Patientenkollektivs untersucht mittels Western Blot (p-Werte kalkuliert mittels Kruskal-Wallis-Test)

	Gesamtproben	CAIX-Proteingehalt ≤ 32250	CAIX Proteingehalt > 32250
Gesamtanzahl	56	46	10
Geschlecht			p = 0,99
Männlich	42	33	9
Weiblich	14	13	1
T-Stadium			p = 0,37
T1	6	6	0
T2	19	18	1
T3	8	6	2
T4	23	16	7
N-Stadium			p = 0,14
N0	21	16	5
N1	13	10	3
N2	20	19	1
N3	2	1	1
M-Stadium			p = 0,31
M0	52	44	8
M1	4	2	2
Grading			p = 0,27
G1	10	9	1
G2	39	31	8
G3	7	6	1
Tod			p = 0,64
nicht verstorben	21	18	3
Verstorben	35	28	7

4.3.1. T-Stadium

Die 56 Tumorproben wurden zudem hinsichtlich ihres T-Stadiums in 2 Gruppen aufgeteilt. Tumorstadium 1 und 2 wurden zu einer Gruppe (n = 25) zusammengefasst und Tumorstadium 3 und 4 wurden ebenfalls zu einer Gruppe (n = 31) zusammengefasst. Die Zusammenlegung erfolgte, da verhältnismäßig wenig Patienten Tumorstadium 1 oder 3 aufwiesen.

Patienten mit Tumorstadium 1 und 2 verstarben im Mittel nach 54 Monaten (95 %KI: 41,423 – 67,017 Monate), wohingegen Patienten im Tumorstadium 3 und 4 im Mittel nach 24 Monaten (95 %KI: 16,63 – 31,87 Monate) verstarben (p = 0,002). Die entsprechende Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 13 dargestellt. Der Median konnte in diesem Fall nicht bestimmt werden, da in der Gruppe, bestehend aus Tumorstadium 1 und 2, in weniger als 50 % der Fälle ein Ereignis (Tod) auftrat.



Anzahl gefährdeter Personen (zensierte Fälle)

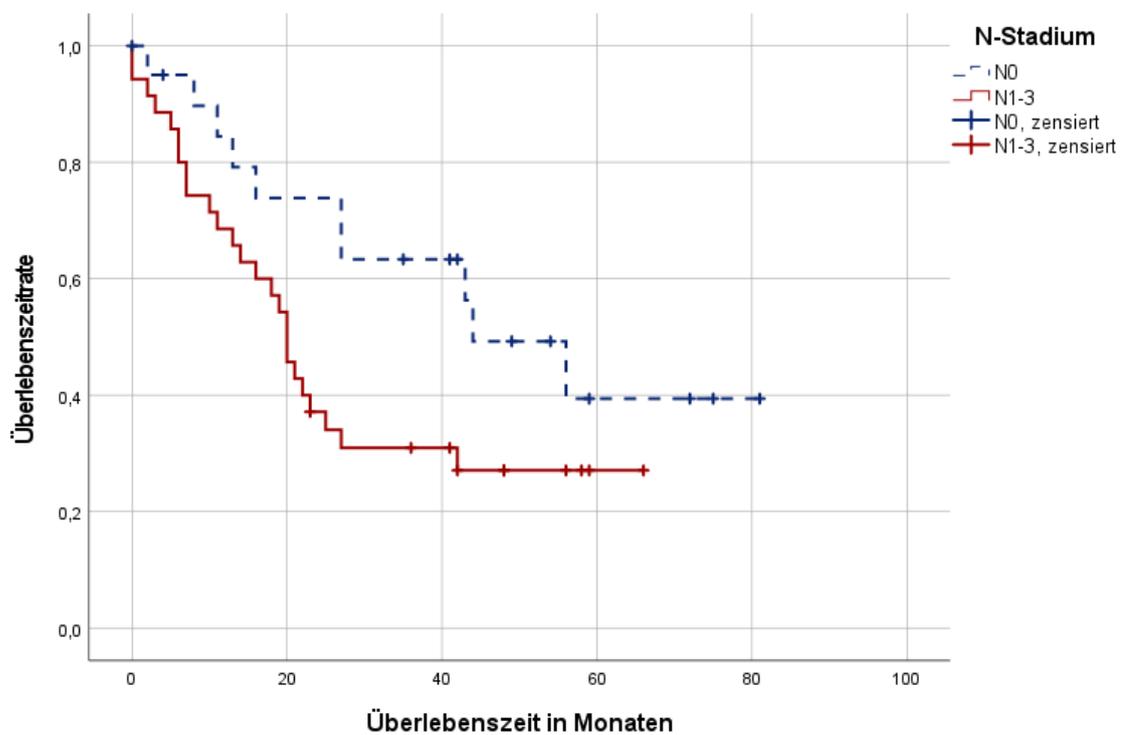
Zeitraum in Monaten	0	20	40	60	80
T 1 und 2	25	18 (2)	14 (4)	3 (14)	1 (14)
T 3 und 4	31	12 (0)	6 (1)	1 (5)	0 (6)

Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom T-Stadium

4.3.2. N-Stadium

Hinsichtlich des N-Stadiums wurden die 56 Tumorproben ebenfalls in zwei Gruppen aufgeteilt. Patienten ohne Lymphknotenmetastasen wurden zu einer Gruppe (n = 21) zusammengefasst, zur anderen Gruppe (n = 35) zählten die Patienten mit Lymphknotenmetastasen unabhängig von Anzahl und Lokalisation.

Waren die Lymphknoten nicht befallen ergab sich eine mediane Überlebenszeit von 44 Monaten (95 %KI: 25,472 – 62,528 Monate), wohingegen Patienten mit Lymphknotenmetastasen nur eine mediane Überlebenszeit von 20 Monaten (95 %KI: 16,534 – 23,466 Monate) aufwiesen (p = 0,056) (siehe Abbildung 14).



Anzahl gefährdeter Personen (zensierte Fälle)

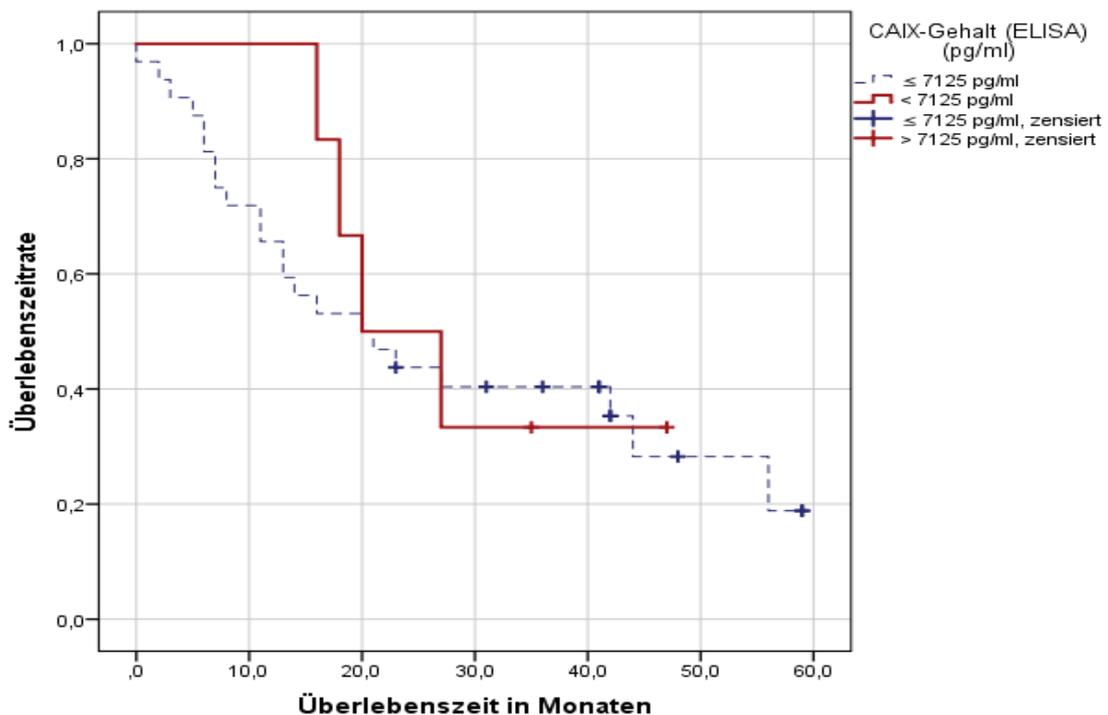
Zeitraum in Monaten	0	20	40	60	80
N 0	21	14 (2)	11 (3)	3 (8)	1 (10)
N 1-3	35	16 (0)	9 (2)	1 (9)	0 (10)

Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom N-Stadium

4.4. Prognostische Bedeutung des CAIX-Proteingehaltes im Tumorgewebe gemessen mittels ELISA

Es wurden zudem 38 Tumorproben, der bereits mittels Western Blot untersuchten Proben, hinsichtlich ihres CAIX-Gehaltes mittels ELISA untersucht. Die klinopathologischen Parameter sind in Tabelle 3 dargestellt.

Anhand des gemessenen CAIX-Proteingehaltes wurden die untersuchten Proben in zwei Gruppen eingeteilt. Auch hier orientierte sich die Gruppeneinteilung an den Immunhistochemiedaten, wobei die erste Gruppe wiederum ca. 85 % der Patienten umfasst. Patienten mit einem CAIX-Gehalt ≤ 7125 pg/ml ($n=32$) bildeten die erste Gruppe. Die verbliebenen 6 Proben mit höherem CAIX-Gehalt bildeten die zweite Gruppe. In der Kaplan-Meier-Analyse (siehe Abbildung 15) zeigte sich, dass Patienten mit niedrigerem CAIX-Proteingehalt eine mediane Überlebenszeit von 20 Monaten (95 %: KI: 7,5 – 32,5 Monate) und unterschieden sich damit nicht von der zweiten Gruppe mit höherem CAIX-Proteingehalt (mediane Überlebenszeit 20 Monate; 95 % KI: 9 – 31 Monate) ($p = 0,691$).



Anzahl gefährdeter Personen (zensierte Fälle)

Zeitraum in Monaten	0	10	20	30	40	50	60
CAIX-Gehalt ≤ 7125 pg/ml	32	23 (0)	16 (0)	12 (1)	10 (3)	3 (8)	0 (10)
CAIX-Gehalt > 7125 pg/ml	6	6 (0)	3 (0)	2 (0)	1 (1)	0 (2)	0 (2)

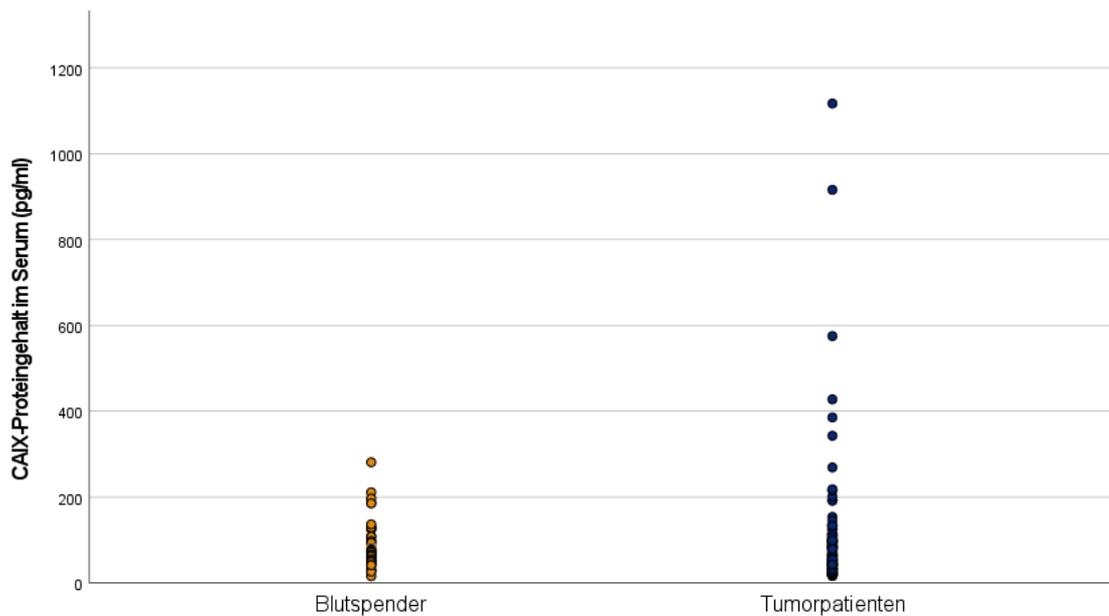
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom CAIX-Gehalt (ELISA)

Tabelle 3: Klinopathologische Parameter des Patientenkollektivs untersucht mittels ELISA (p-Werte kalkuliert mittels Kruskal-Wallis-Test)

	Gesamtproben	CAIX-Gehalt ≤ 7125 pg/ml	CAIX-Gehalt > 7125 pg/ml
Gesamtanzahl	38	32	6
Geschlecht			p = 0,28
Männlich	28	24	4
Weiblich	10	8	2
T-Stadium			p = 0,13
T1	4	4	0
T2	12	12	0
T3	7	6	1
T4	15	10	5
N-Stadium			p = 0,10
N0	13	10	3
N1	8	6	2
N2	15	15	0
N3	2	1	1
M-Stadium			p = 0,79
M0	37	31	6
M1	1	1	0
Grading			p = 0,13
G1	6	6	0
G2	26	21	5
G3	6	5	1
Tod			p = 0,87
nicht verstorben	12	10	2
Verstorben	26	22	4

4.5. CAIX-Proteingehalt im Serum von Patienten mit Mundhöhlenkarzinom und im Serum von Blutspendern

In dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den Tumorgewebeprobe 89 Serumproben von Patienten mit bekanntem Mundhöhlenkarzinom und 43 Serumproben von Blutspendern mit Hilfe eines ELISA bezüglich ihres CAIX-Gehaltes untersucht. Die Einzelmesswerte für die Tumorpatienten und Blutspender sind in Abbildung 16 dargestellt. Der mediane CAIX-Proteingehalt im Serum von Patienten mit Mundhöhlenkarzinom lag bei 69 pg/ml (Mittelwert 112 pg/ml; Minimum 16,5 pg/ml, Maximum 1117 pg/ml), wohingegen der mediane CAIX-Proteinserumgehalt bei gesunden Blutspendern bei 70 pg/ml (Mittelwert 87 pg/ml; Minimum 15,8 pg/ml, Maximum 281,1 pg/ml) lag. Entsprechend zeigt sich in der ROC-Kurve (siehe Abbildung 17) eine AUC von 0,53 (95 %KI: 0,372-0,572; $p=0,603$). Bei einem CAIX-Serum-Gehalt von 74,4 pg/ml liegt die Sensitivität bei 0,442 und die Spezifität bei 0,506.



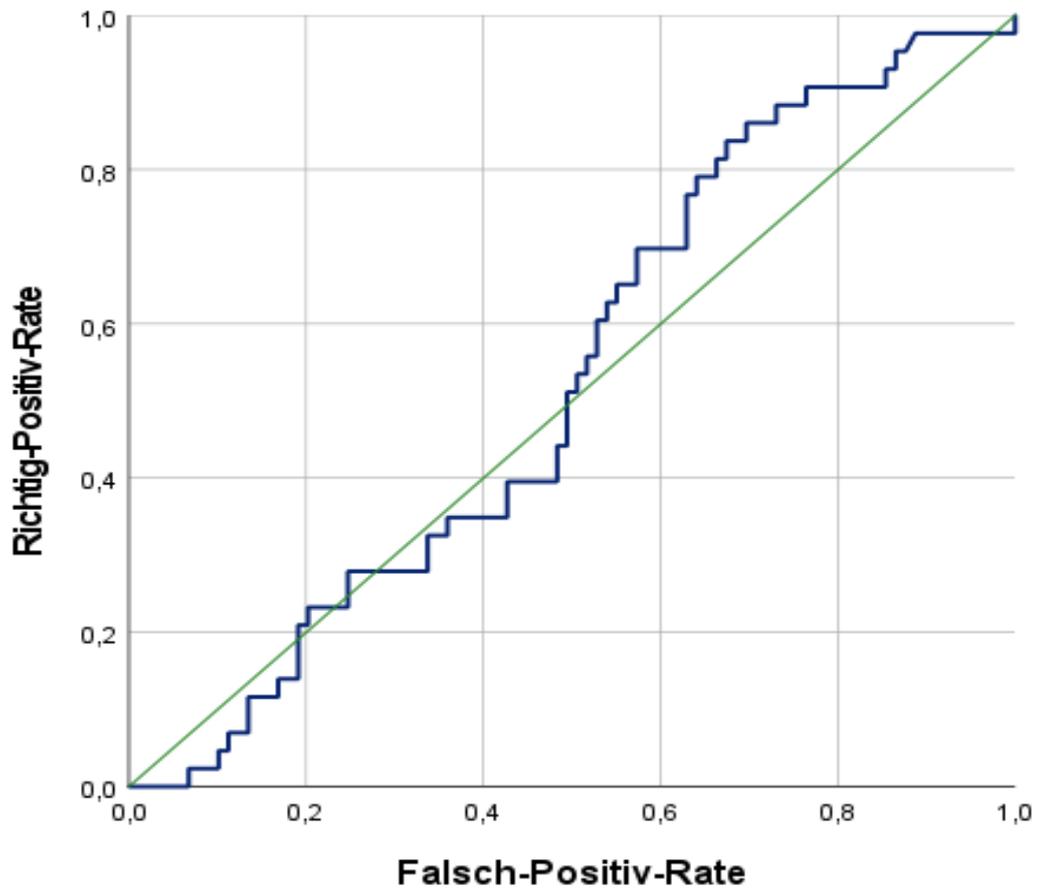


Abbildung 17: ROC-Kurve zur Diskriminierung von Tumorpatient oder Gesunden mittels Serum-CAIX

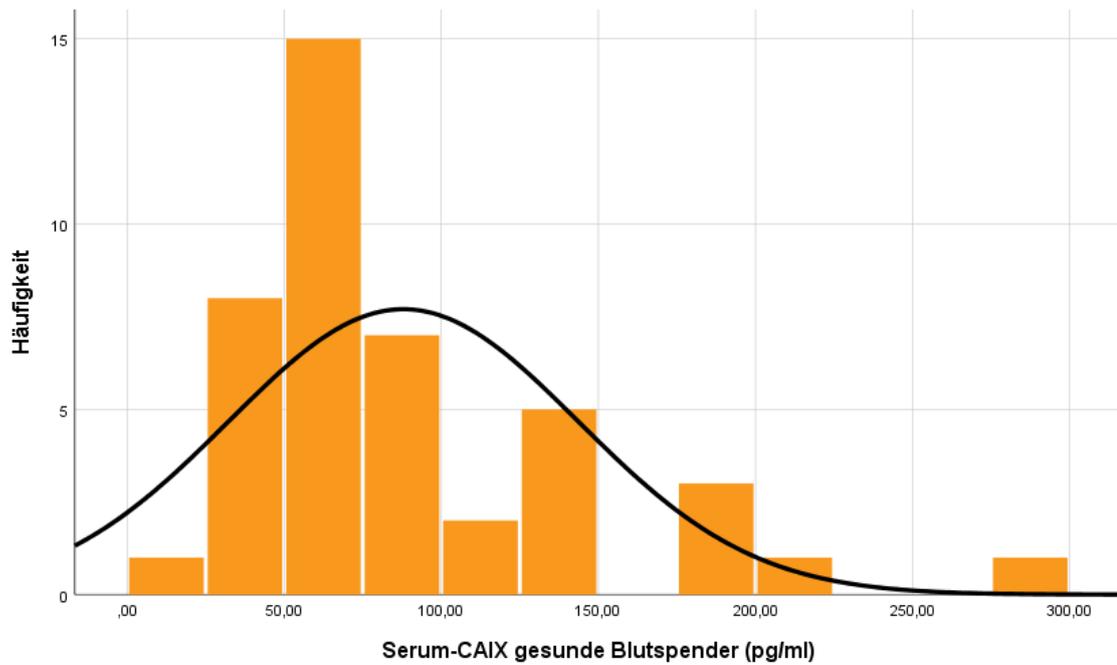


Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung der Serum-CAIX-Werte der gesunden Blutspender

Sieht man sich die Häufigkeitsverteilung des Serum-CAIX bei gesunden Blutspendern an, hat man den Eindruck, dass es sich um zwei Gauß-Kurven handelt (siehe Abbildung 18). Um dies zu verdeutlichen wurden die gesunden Probanden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe beinhaltet Werte bis zu einem Serum-CAIX-Wert von kleiner 108 pg/ml (n=32, Mittelwert 61,4 ± 21,1 pg/ml, Median 62,7 pg/ml). Die zweite Gruppe bildeten die Probanden mit CAIX-Werten größer 108 pg/ml (n =11, Mittelwert 165,2 ± 52 pg/ml, Median 136,7 pg/ml) (siehe Abbildung 19).

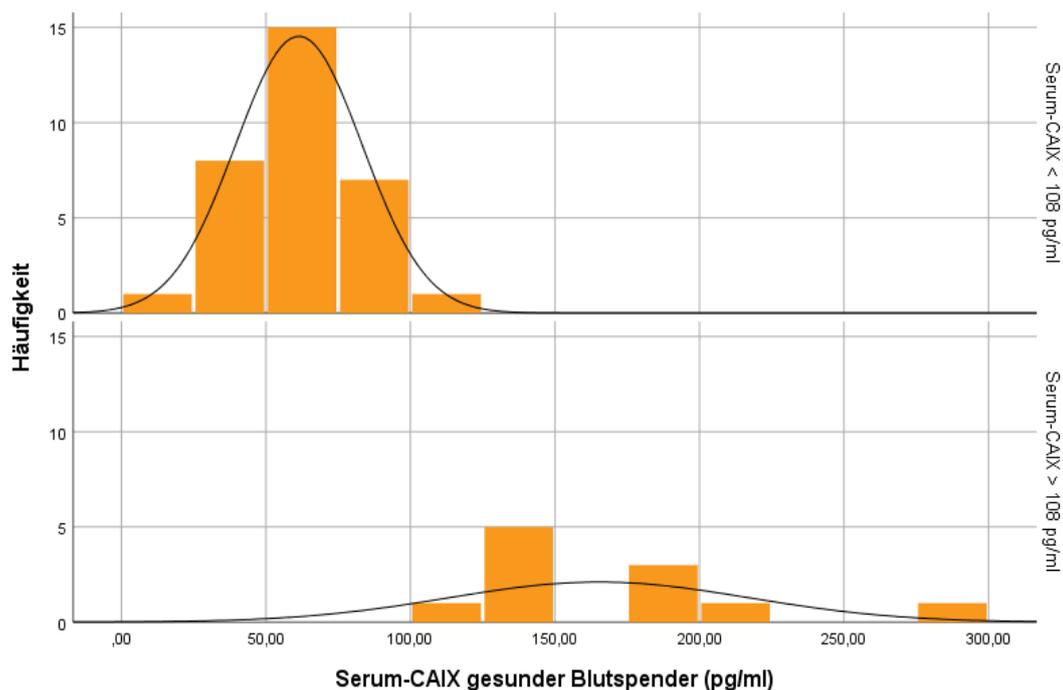


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung der Serum-CAIX-Werte kleiner bzw. größer 108 pg/ml der gesunden Blutspender

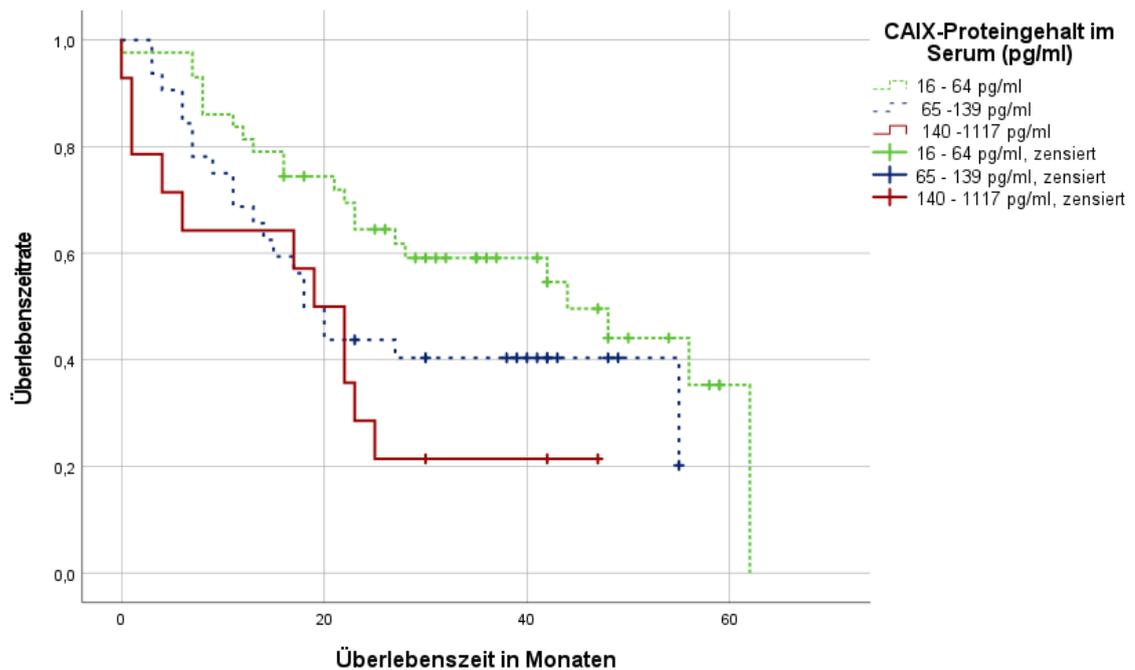
4.6. Prognostische Bedeutung des CAIX-Proteingehaltes im Serum von Patienten mit Mundhöhlenkarzinom

Es wurden 89 Blutproben, welche während der Probeexzision bzw. der Tumorexzision entnommen wurden, auf ihren CAIX-Proteingehalt mittels ELISA untersucht. Diese 89 Proben wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe (n=43) beinhaltet die 48,3 % der Proben mit dem niedrigeren CAIX-Gehalt (16 – 65 pg/ml), die zweite Gruppe (n= 32, 36 %) beinhaltet die Patienten mit mittlerem CAIX-Gehalt (66 – 139 pg/ml), die dritte Gruppe (n=14, 15,7 %) bildeten die Patienten mit dem höchsten CAIX-Gehalt (140 – 1117 pg/ml). Die Gruppeneinteilung erfolgte nach selbst gewählten Cut-off-Kriterien. Die entsprechenden klinopathologischen Parameter sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Klinopathologische Merkmale des Patientenkollektivs untersucht auf den Serum-CAIX-Gehalt (p-Werte kalkuliert mittels Kruskal-Wallis-Test)

	Gesamt proben Serum (Elisa)	Serumgehalt CAIX 16 – 64 pg/ml	Serumgehalt CAIX 65 – 139 pg/ml	Serumgehalt CAIX 140 – 1117 pg/ml
Gesamtanzahl	89	43	32	14
Geschlecht				p = 0,71
Männlich	67	31	26	10
Weiblich	22	12	6	4
T-Stadium				p = 0,10
T1	19	12	6	1
T2	30	15	7	8
T3	13	8	5	0
T4	27	8	14	5
N-Stadium				p = 0,70
N0	39	20	12	6
N1	12	4	6	2
N2	36	17	13	6
N3	3	2	1	0
M-Stadium				p = 0,67
M0	88	43	31	14
M1	1	0	1	0
Grading				p = 1,00
1	12	5	4	3
2	65	33	24	8
3	12	5	4	3
Tod				p = 0,23
Nicht verstorben	37	21	12	3
Verstorben	52	22	20	11

In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich, dass Patienten mit niedrigerem CAIX-Proteingehalt eine mediane Überlebenszeit von 44 Monaten (95 %: KI: 20,7 – 67,3 Monate), dagegen wies die zweite Gruppe mit mittlerem CAIX-Proteingehalt eine mediane Überlebenszeit von 18 Monaten (95 % KI: 13,8 – 22,2 Monate) auf. Die dritte Gruppe hatte eine mediane Überlebenszeit von 19 Monaten (95 % KI: 12,9 – 25,1 Monate) ($p = 0,03$) (siehe Abbildung 20).



Anzahl gefährdeter Personen (zensierte Fälle)

Zeitraum in Monaten	0	10	20	30	40	50	60
CAIX 16 – 64 pg/ml	43	36 (0)	29 (2)	20 (6)	13 (13)	6 (17)	1 (21)
CAIX 65 – 139 pg/ml	32	24 (0)	14 (0)	11 (2)	8 (5)	2 (11)	0 (13)
CAIX 140 – 1117 pg/ml	14	9 (0)	7 (0)	2 (1)	2 (1)	0 (3)	0 (3)

Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit vom Serum-CAIX-Gehalt

Aufgrund des deutlich schlechteren Überlebens der Gruppe mit hohem CAIX-Serumgehalt im Vergleich zur Gruppe mit niedrigstem CAIX-Gehalt im Serum, wurde zusätzlich eine multivariable Cox-Regression durchgeführt. Diese, adjustiert nach T-Stadium, N-Stadium und Grading, zeigt, dass das Risiko zu versterben in der Gruppe mit dem höchsten CAIX-Gehalt im Blut um das 2,2-fache höher ist als in der Gruppe mit den geringsten CAIX-Werten (95 % KI 0,95 - 5,05; $p=0,066$). In der Gruppe mit dem mittleren CAIX-Gehalt ist das Sterberisiko um das 1,4-fache höher als in der Gruppe mit niedrigem Serum-CAIX ($p=0,32$; 95 % KI: 0,73 - 2,63) (siehe Abbildung 21). Für die Auswertung wurden T1 und T2 zu einer Gruppe zusammengefasst und T3 und T4 bildeten die zweite Gruppe. Für das N-Stadium wurden N1-N3 zu einer Gruppe zusammengeführt.

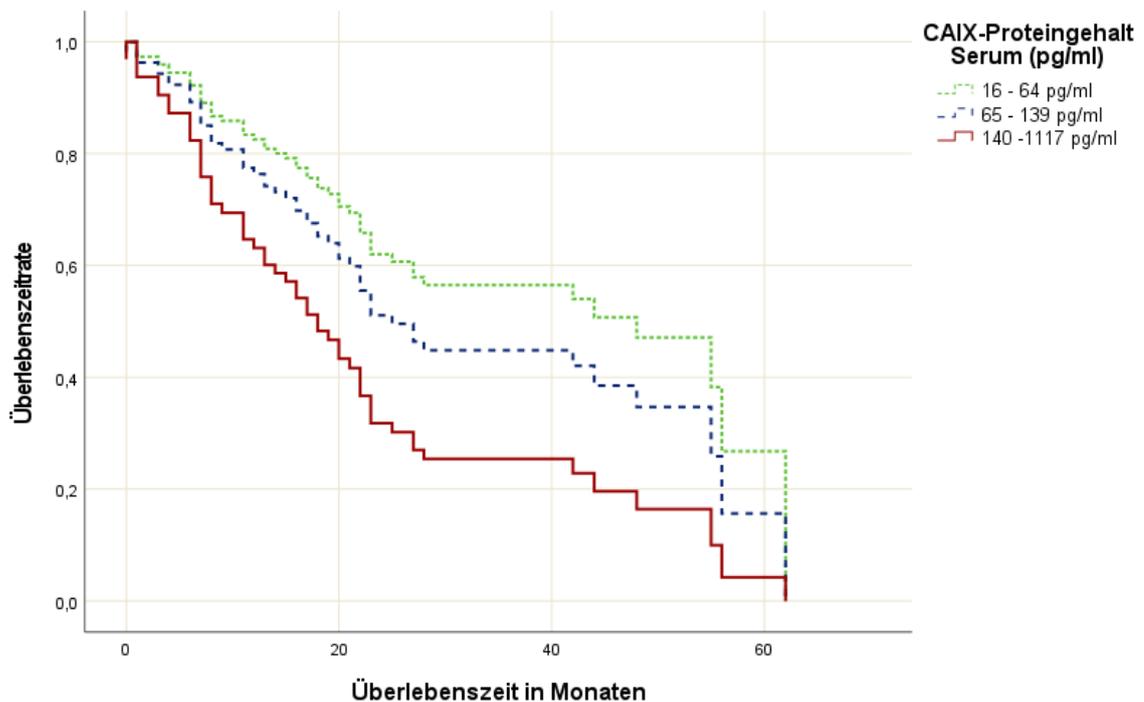


Abbildung 21: multivariable Cox-Regression in Abhängigkeit vom CAIX-Gehalt im Serum

4.7. Serum-CAIX im Verlauf der Strahlentherapie

Es wurden bei 28 Patienten zudem Serumproben im Verlauf der Strahlentherapie gesammelt. Die Proben wurden zum Zeitpunkt der Tumorexzision bzw. Probenexzision (t_0 , $n=28$), vor Beginn der Strahlentherapie (t_1 , $n=23$), bei einer Gesamtdosis von 20 Gy (t_2 , $n=22$), unmittelbar nach Beendigung der Strahlentherapie (t_3 , $n=12$) und vier bis sechs Wochen nach Beendigung der Bestrahlung (t_4 , $n=9$) abgenommen. Ursächlich für fehlende Proben sind vor allem logistische Probleme und Incompliance der Patienten. Insbesondere der Nachsorgetermin vier bis sechs Wochen nach Therapieende wurde häufig nicht wahrgenommen. Von insgesamt vier Probanden lagen alle fünf Blutproben zu den verschiedenen Zeitpunkten vor.

Drei der Patienten erhielten eine alleinige Radiatio. Bei sechs Patienten erfolgte eine Strahlentherapie in Kombination mit einer Chemotherapie. In acht Fällen kam zusätzlich noch eine operative Versorgung hinzu. Bei weiteren acht Patienten erfolgte eine Kombination aus Bestrahlung und operativer Therapie. Bei drei Patienten ist die Therapie retrospektiv nicht mehr zu eruieren (alleinige Bestrahlung oder in Kombination mit einer Operation bzw. Chemotherapie). Die weiteren klinopathologischen Merkmale sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Klinopathologische Merkmale des Patientenkollektivs untersucht auf den Serum-CAIX-Gehalt

Serum-CAIX im Verlauf der Strahlentherapie	
Gesamtanzahl	28
Geschlecht	
Männlich	20
Weiblich	8
T-Stadium	
T1	5
T2	9
T3	2
T4	11
Fehlend	1
N-Stadium	
N0	10
N1	4
N2	12
N3	1
Fehlend	1
Grading	
G1	2
G2	15
G3	6
Fehlend	5

Bei Durchführung eines T-Test für abhängige Variablen, zeigt sich, dass sich die Mittelwerte des CAIX-Gehaltes im Blut zu den einzelnen Zeitpunkten nicht signifikant unterscheiden. Die Mittelwerte bzw. Mediane des CAIX-Gehaltes im Serum zu den einzelnen Zeitpunkten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Mittelwert bzw. Median der Serum-CAIX im Verlauf der Radiatio

Zeitpunkt	Mittelwert \pm Standardabweichung in pg/ml	Median in pg/ml
t0	69,85 \pm 44,87	65,65
t1	85,79 \pm 110,66	55,97
t2	105,15 \pm 84,65	84,58
t3	159,47 \pm 172,25	79,17
t4	158,31 \pm 138,18	79,26

4.8. Korrelation von Ca9 mRNA, CAIX Protein und CAIX im Serum

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman wurde berechnet, wobei der Zusammenhang zwischen dem CAIX im Tumorgewebe, gemessen mittels Western Blot, ELISA, Immunhistochemie, und dem CAIX im Serum und der Ca9 mRNA evaluiert wurde.

In einer Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde der Ca9 mRNA-Gehalt an Proben des gleichen Patientenkollektivs von T. Kaune bestimmt. Diese Daten wurden mir freundlicherweise für diese Auswertung zur Verfügung gestellt.

Nach Berechnung der Korrelation nach Spearman zeigt sich eine starke Korrelation zwischen dem CAIX-Proteingehalt im Tumorgewebe gemessen mittels Western Blot bzw. ELISA ($r_s=0,833$, $p<0,001$, $n=38$). Die Werte korrelierten auch stark mit den Ca9 mRNA-Daten (Western Blot: $r_s=0,663$, $p<0,001$, $n=40$ und ELISA ($r_s=0,758$, $p<0,001$, $n=25$))

Zudem korrelierten die mittels Immunhistochemie gemessenen CAIX-Werte mit dem CAIX-Gehalt gemessen mittels Western Blot ($r_s=0,497$, $p=0,003$, $n=34$) und dem Tumor-CAIX gemessen mittels ELISA ($r_s=0,56$, $p=0,019$, $n=17$) und der Ca9 mRNA im Tumor ($r_s=0,611$, $p<0,001$, $n=37$).

Das im Serum gelöste CAIX korreliert kaum mit dem Ca9 mRNA-Gehalt im Tumorgewebe ($r_s=0,115$, $p=0,487$, $n=39$) bzw. mit dem CAIX-Proteingehalt im Tumorgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie ($r_s=0,432$, $p=0,011$, $n=15$). Das Serum-CAIX korrelierte nicht mit dem intratumoralem CAIX ermittelt via Western Blot-Analyse ($r_s=-0,024$, $p=0,883$, $n=39$) bzw. ELISA ($r_s=-0,065$, $p=0,7$, $n=38$).

Ob es Unterschiede zwischen den einzelnen T-, N-, M-Stadien und Grading hinsichtlich des intratumoralen bzw. gelösten CAIX gibt, wurde mittels Kruskal Wallis Test ermittelt. Insgesamt ergab sich keine Unterschiede hinsichtlich des CAIX-Gehaltes im Tumor und Serum im Hinblick auf die die einzelnen Stadien von Tumorgroße, Lymphknotenbefall, Metastasierung und Grading. Einzig bei der Immunhistochemie ergab sich ein Hinweis auf Unterschiede im CAIX-Gehalt zwischen den einzelnen T-Stadien. Die entsprechenden p-Werte sind in den Tabellen aufgeführt.

5. Diskussion

5.1. Patientenkollektiv

Laut der Auswertung des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts erkrankten im Jahr 2014 in Deutschland Männer im Mittel mit 63 Jahren an Mundhöhlenkarzinomen, Frauen erkrankten dagegen im Mittel drei Jahre eher, mit 66 Jahren (Kaatsch et al. 2017). Circa 70 % der Erkrankten sind Männer (Becker et al. 2009). Sie haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 48 % und damit eine schlechtere Prognose als Frauen, welche eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 59 % aufweisen (Kaatsch et al. 2017). Dies wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass Frauen häufiger im T1-Stadium erstdiagnostiziert werden als Männer (Kaatsch et al. 2017). Bei Männern wurden in den Jahren 2013/2014 bei Erstdiagnose bei 26 % ein T1-Stadium dokumentiert, bei 28 % handelte es sich um ein T2-Stadium, bei 21% um ein T3-Stadium und bei 25 % um ein T4-Stadium (Kaatsch et al. 2017). Bei Frauen wurde das Mundhöhlenkarzinom dagegen bei 36 % im T1-Stadium entdeckt, bei 30 % im T2-Stadium, bei 16 % im T3 Stadium und bei 18 % im T4-Stadium (Kaatsch et al. 2017).

Im Patientenkollektiv, welches mittels Western Blot untersucht wurde, lag der Anteil der Männer bei 75 %. Bei der Analyse des Tumor-CAIX-Gehaltes mittels ELISA lag der Männeranteil dagegen etwas niedriger mit 73,7 %. Auch bei der Analyse mittels Immunhistochemie waren die Männer mit 77,8 % etwas stärker vertreten als in der Literatur beschrieben. Im hinsichtlich des Serum-CAIX-Gehaltes untersuchten Patientenkollektivs war der Männeranteil mit 75,3 % ebenfalls leicht erhöht. Das Kollektiv, dessen Serumproben auf CAIX während der Strahlentherapie getestet wurden, weist einen Männeranteil von 71,4 % auf. Insgesamt ist der Männeranteil in allen untersuchten Patientenkollektiven etwas höher als in der Literatur beschrieben.

Vergleicht man die hier untersuchten Patientenkollektive mit dem deutschlandweiten Schnitt sind T2- und T4-Stadium etwas überrepräsentiert, wohingegen T1- und T3-Stadium im Schnitt etwas unterrepräsentiert sind. In Tabelle 7 sind die prozentualen Anteile der einzelnen T-Stadien an den untersuchten Patientenkollektiven zusammengefasst. Auf eine getrennte Berechnung des T-Stadiums für Männer und Frauen wurde aufgrund der insgesamt kleinen Fallzahlen verzichtet.

Die untersuchten Patienten waren im Mittel jünger bei Erstdiagnose als im deutschlandweiten Schnitt im Jahr 2013/2014. Beim Western Blot-Kollektiv lag der Mittelwert bei 58,8 Jahren ($\pm 14,3$ Jahre). Bei dem Tumorkollektiv, welches mittels ELISA untersucht wurde, lag der Mittelwert bei 60,6 Jahren ($\pm 13,3$ Jahre). Im Mittel erkrankten die Patienten, welche mittels Immunhistochemie untersucht wurden mit 59,5 Jahren

(±12,3 Jahre). Bei den Patienten, deren Serumproben auf CAIX untersucht wurden, lag das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose bei 60,45 Jahre (± 12,5 Jahre). Die Patienten, deren Serumproben im Verlauf der Radiatio untersucht wurden, waren durchschnittlich 60,2 Jahre (± 8,8) alt.

Tabelle 7: prozentuale Anteile der T-Stadien am untersuchten Patientenkollektiv

T- Stadium	Patientenkollektiv untersucht mittels:						
	Männer*	Frauen*	Western Blot	ELISA	Immun- histochemie	Serum- CAIX- Gehalt	Serum CAIX- Gehalt**
T1 (%)	26	36	10,7	10,5	23,4	21,3	17,9
T2 (%)	28	30	33,9	31,6	27,2	33,7	32,1
T3 (%)	21	16	14,3	18,4	12	14,6	7,1
T4 (%)	25	18	41,1	39,5	37,4	30,4	39,3

*in Deutschland 2013/14 (Kaatsch et al. 2017)

** Im Verlauf der Radiatio

5.2. CAIX im Tumorgewebe

Wie eingangs dargestellt, wird CAIX in nur wenigen Normalgeweben exprimiert, wohingegen CAIX in vielen Tumorgeweben, unter anderem auch in Kopf-Hals-Tumoren, überexprimiert wird (Ivanov et al. 2001; Beasley et al. 2001). Bei Gesunden ist CAIX in den Geweben der Mundhöhle nur fokal in den duktaalen Zellen der Speicheldrüsen nachweisbar (Ivanov et al. 2001).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Beobachtung. In den 22 mittels Western Blot untersuchten Normalgewebeproben war kaum bis gar kein CAIX nachweisbar (medianer CAIX-Gehalt 0). Im Tumorgewebe lag der mediane CAIX-Gehalt mit 5231,7 deutlich höher. Sieht man sich die entsprechende ROC-Kurve (Abb. 5) an, wird deutlich, dass anhand des CAIX-Gehaltes im Gewebe zwischen Tumor- und Normalgewebe unterschieden werden kann. Wählt man als Grenzwert für CAIX 36,7, kann mit einer Sensitivität von 79 % und einer Spezifität von 55 % zwischen Normal- und Tumorgewebe unterschieden werden. Die AUC lag bei 0,79 (95 % KI: 0,67 - 0,89; $p < 0,001$).

Eine Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe, welche den Ca9-mRNA-Gehalt in 72 Tumorproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und in 24 Normalgewebeproben untersuchte, konnte ebenfalls eine deutlich erhöhte mRNA-Expression im Tumorgewebe nachweisen. In der entsprechenden ROC-Kurve ergab sich eine AUC von 0,82 ($p < 0,001$) (Eckert et al. 2019).

5.2.1. Prognostische Bedeutung von CAIX im Tumorgewebe

CAIX gilt als einer der vielversprechendsten Prognoseparameter bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinom.

So konnten Peterle et al. beispielsweise zeigen, dass CAIX ein unabhängiger prognostischer Faktor bei Mundhöhlenkarzinom ist. Patienten mit hoher CAIX-Expression hatten ein nahezu dreifach erhöhtes Risiko zu versterben (Peterle et al. 2018). In einer weiteren Studie hatten Patienten mit Mundhöhlenkarzinom, welche eine verstärkte CAIX-Färbung in der Immunhistochemie aufwiesen, ein um fast 20 Monate verkürztes Überleben im Vergleich zu Patienten mit geringer bis keiner tumoralen Expression (Perez-Sayans et al. 2012). Auch Yang et al. zeigten, dass die Expression von CAIX im Tumorgewebe mit einem signifikant geringeren Überleben assoziiert ist. Patienten mit einer Expression von CAIX lebten im Median 4,8 Jahre, die Patienten ohne Nachweis von CAIX dagegen im Median 6,35 Jahre nach Erstdiagnose (Yang et al. 2015). In einer Metaanalyse, bei der über 18 Studien berücksichtigt wurden, welche die CAIX-Expression bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle mittels Immunhistochemie untersuchten, bestätigte sich die Assoziation von hoher CAIX-Expression mit einem signifikant geringen Gesamtüberleben. Eine CAIX-Überexpression erhöhte das Risiko zu versterben um fast 50 % (Lorenzo-Pouso et al. 2020). In allen zitierten Studien wurde die CAIX-Expression via Immunhistochemie bestimmt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der prognostischen Relevanz des intratumoralen CAIX sind uneinheitlich. Mittels Western Blot wurden 56 Tumorproben auf ihren CAIX-Gehalt untersucht. In der Überlebenszeitanalyse mittels Kaplan-Meier-Kurve zeigte sich jedoch kein klinisch relevanter Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei Patienten mit niedrigem versus hohem CAIX-Gehalt ($p = 0,809$). Für die gängigen Prognosemarker T- und N-Stadium konnte in diesem Patientenkollektiv jedoch ein geringeres Überleben bei höherem T- bzw. N-Stadium festgestellt werden. So verstarb die Gruppe mit T1- und T2-Stadium im Median 30 Monate später als die Gruppe mit höherem T-Stadium ($p = 0,002$). Patienten, bei denen die Lymphknoten tumorfrei waren, lebten im Median 24 Monate länger als die Patienten mit befallenen lokoregionalen Lymphknoten ($p = 0,056$).

Mittels ELISA wurden 38 Tumorgewebeproben aus demselben Patientenkollektiv erneut auf ihren CAIX-Gehalt getestet. Dies diente vorrangig zur internen Kontrolle der Western Blot-Daten, da wie beschrieben kein housekeeping protein beim Western Blot ermittelt werden konnte. Entsprechend konnte auch in der Überlebenszeitanalyse der ELISA-Daten kein unterschiedliches Überleben bei verschiedenem intratumoralem CAIX-

Gehalt festgestellt werden. Die mediane Überlebenszeit in beiden Gruppen lag bei 20 Monaten ($p = 0,691$).

Am mittels Immunhistochemie untersuchtem Patientenkollektiv konnte allerdings ein klinisch relevanter Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit festgestellt werden. Patienten mit niedrigem CAIX-Gehalt lebten im Median 29 Monate länger ($p=0,027$). Dies bestätigte sich auch in der multivariablen Cox-Regression, adjustiert nach dem T-, N-Stadium und Grading. Patienten mit starker CAIX-Expression hatten ein 1,6-fach erhöhtes Risiko früher zu versterben ($p= 0,066$). Das mittels Immunhistochemie untersuchte Patientenkollektiv ($n = 158$) war jedoch fast dreimal so groß wie das mittels Western Blot untersuchte Patientenkollektiv ($n =56$), wodurch die unterschiedlichen Ergebnisse erklärt werden können. 34 Proben wurden sowohl mittels Immunhistochemie als auch Western Blot untersucht. In der bivariaten Korrelation nach Spearman korrelierte der CAIX-Gehalt ermittelt mittels Western Blot mit der CAIX-Expression in der Immunhistochemie ($p=0,003$), sodass der Western Blot der Immunhistochemie diesbezüglich nicht unterlegen ist.

5.3. Housekeeping Protein für Western Blot

Da viele Arbeitsschritte während des Western Blottings, z.B. die Auftragungsmenge, die Transfereffizienz, die Menge an primärem und sekundärem Antikörper, etc., die densidometrischen Ergebnisse verändern können, wird zur Normalisierung häufig eine Ladekontrolle herangezogen. Als Ladekontrollen werden in der Regel sogenannte housekeeping proteins genutzt. Ein housekeeping protein wird idealerweise unabhängig vom Zelltyp, dem Zellzyklus und den äußeren Einflüssen, wie beispielsweise Hypoxie, exprimiert.

Wir testeten verschiedene Primärantikörper, unter anderem gegen β -Aktin, Oct-4 (Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor), RPL4 (Ribosomales Protein L4), β -Tubulin, Vinculin, RPL 15 (Ribosomales Protein L15), EEF2 (Eukaryotischer Elongationsfaktor 2) und RNA-Polymerase II, als mögliche housekeeping proteins. Jedoch erwies sich keines als geeignet, da die Expression der einzelnen Enzyme in den einzelnen Tumorproben sehr unterschiedlich war.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Verwendung von housekeeping proteins aus unterschiedlichen Gründen kritisch zu sehen ist.

So wird β -Aktin, ein häufig genutztes housekeeping protein, in den meisten Zellen sehr viel stärker exprimiert als die zu untersuchenden Proteine. In einer Arbeit der Klinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums in Halle konnte gezeigt werden, dass bei Proteinkonzentrationen zwischen 1,88 – 7,5 μg Protein bei Verwendung eines

polyklonalen β -Aktin-Antikörpers keine Veränderung der Bande detektiert werden konnte (Dittmer und Dittmer 2006). Zudem wird β -Aktin in vielen Tumorzellen hochreguliert (Chang et al. 1998), gleiches gilt für das ebenfalls häufig verwendete Oct-4 (Krogh Petersen et al. 2016; Jiang et al. 2016; Reers et al. 2014). Damit ist die Aussagekraft dieser beiden Proteine als housekeeping protein fraglich.

Um die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit quantifizieren zu können, wurde der Proteingehalt jeder Probe bestimmt und jeweils 30 μ g Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Ebenso wurde auf jedem Gel die gleiche Proteinmenge einer Positivkontrolle, welche aus Zellen einer unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Kopf-Hals-Tumorzelllinie isoliert wurde, mitgeführt. Anhand dieser wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Gelen ausgeglichen.

Als interne Kontrolle dienten zudem die 38 Tumorgewebeproben die zusätzlich mittels ELISA untersucht wurden. In der bivariaten Korrelation nach Spearman zeigte sich eine signifikante, starke Korrelation zwischen dem CAIX-Proteingehalt gemessen im Western Blot und dem im ELISA gemessenen CAIX-Gehalt. Somit kann von validen Ergebnissen der Western Blot-Analyse ausgegangen werden.

Alternativ hierzu wäre, wie von verschiedenen Autoren beschrieben, eine Anfärbung des Gesamtproteins mit beispielsweise Coomassie-Farbstoff zum Ausgleich von Beladungsunterschieden gewesen. Anhand der Intensivität der Färbung der einzelnen Banden kann dann eine Normalisierung vorgenommen werden (Eaton et al. 2013; Welinder und Ekblad 2011).

5.4. Gelöstes CAIX

5.4.1. Serum-CAIX-Gehalt bei Gesunden und bei Tumorpatienten

CAIX ist im Serum von Gesunden nachweisbar. Bei einigen Tumorpatienten scheint der CAIX-Gehalt im Serum deutlich höher zu liegen. Einen definierten Cut-off gibt es aktuell jedoch nicht, da die publizierten Daten uneinheitlich sind.

Li et al. untersuchte in einer Studie zu metastasiertem Nierenzellkarzinom eine Vergleichsgruppe von 32 gesunden Probanden auf ihren Serum-CAIX-Gehalt. Dieser lag bei durchschnittlich $14,6 \pm 6,2$ pg/ml (Li et al. 2008). Finkelmeier et al. fanden dagegen bei insgesamt 43 gesunden Probanden einen medianen Serum-CAIX-Gehalt von 41 pg/ml (Finkelmeier et al. 2018). In einer weiteren Publikation zeigte sich in der Kontrollgruppe von 48 weiblichen, gesunden Probanden ein medianer CAIX-Gehalt im Serum von 199 pg/ml (26-1133 pg/ml) (Schütze et al. 2013). In einer anderen Untersuchung wurden Serumproben von 50 gesunden, postmenopausalen Frauen analysiert, wobei der mittlere CAIX-Serumgehalt bei 244 ± 131 pg/ml (87 - 667 pg/ml)

lag (Sivendran et al. 2007). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Kalavska et al., welche Serum-Proben von 35 gesunden Probanden testeten. Die durchschnittliche CAIX-Serum-Konzentration wurde in der Studie mit $249,6 \pm 100,0$ pg/ml angegeben (Kalavska et al. 2016).

Der CAIX-Serumgehalt lag in der eigenen Arbeit im Mittel bei $87,9$ pg/ml $\pm 55,7$ pg/ml, wobei insgesamt 43 Serumproben von gesunden Blutspendern untersucht wurden. Die Werte lagen dabei zwischen $15,76$ pg/ml bis $281,12$ pg/ml. Die erhaltenen Werte sind somit vergleichbar zu den Werten der zitierten Studien. Sieht man sich die Häufigkeitsverteilung der Serum-CAIX-Werte der insgesamt 43 Blutspender an, lassen sich diese in zwei Gauß-Kurven aufteilen. Der Median der ersten Gauß-Kurve lag dabei bei $62,7$ pg/ml, der Median der zweiten Gaußkurve bei $136,7$ pg/ml. Zufälligerweise entsprechen diese Werte in etwa den gewählten Cut-off-Werten zur Einteilung der Serum-CAIX-Werte der Tumorpatienten in drei Gruppen im Rahmen der Überlebenszeitanalyse. Finkelmeier et al. konnten zeigen, dass vermehrt gelöstes CAIX im Serum bei Leberzirrhose nachweisbar ist (Finkelmeier et al. 2018). Da CAIX in nur wenigen Normalgeweben, wie den Epithelien des Magens, des Dünndarms und der Gallenwege, exprimiert wird (Ivanov et al. 2001), könnten pathogene Zustände des Gastrointestinaltraktes den Serum-CAIX-Wert beeinflussen. Dies könnte eine Erklärung für die zweite Gauß-Kurve sein. Ob CAIX von diesen Geweben zur Ausübung autokriner bzw. parokriner Funktionen ins Blut abgegeben wird, ist unklar. Hier sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem 89 Serumproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle untersucht. Die Serumproben wurden entweder zur Probeexzision bzw. vor radikaler Tumorexzision abgenommen. In der Analyse zeigten sich Werte zwischen minimal 16 pg/ml und maximal 1117 pg/ml bei einem medianen CAIX-Gehalt von 69 pg/ml.

Vergleichbare Studien speziell zu Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle sind nicht bekannt. Es gibt jedoch eine kleinere Arbeit, bei der 48 Serumproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich untersucht wurden. Nur 7 der untersuchten 48 Proben stammten dabei von Patienten mit Tumorstadium 1 oder 2. Der mediane Serum-CAIX-Gehalt lag mit $28,6$ pg/ml niedriger als der mediane Serum-CAIX-Wert in der hier vorgestellten Arbeit, obwohl in der Studie ebenfalls ein ELISA-Kit von R&D Systems, Inc., USA genutzt wurde. Der minimale und maximale CAIX-Gehalt wurde in dem Paper nicht veröffentlicht (Rosenberg et al. 2016).

Weitere Studien zum CAIX-Serumgehalt in verschiedenen Tumorentitäten sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Dabei wird ersichtlich, dass der mediane CAIX-

Serumgehalt bei den meisten untersuchten Tumorentitäten über den hier ermittelten Werten liegt. Die angegebenen minimalen und maximalen CAIX-Werte der zitierten Studien und der hier vorliegenden Studie sind jedoch weitestgehend vergleichbar. Die Diskrepanz in den medianen Werten ist mit der Studiengröße erklärbar. Mit 89 untersuchten Serumproben ist die vorliegende Studie vergleichsweise groß.

Tabelle 8: Medianer, minimaler und maximaler Serum-CAIX-Gehalt in Studien

Studie	Tumorentität	Serumprobenanzahl	Medianer CAIX-Gehalt [pg/ml]	Min. CAIX-Gehalt [pg/ml]	Max. CAIX-Gehalt [pg/ml]
Eigene Arbeit	Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle	89	69	16	1117
(Rosenberg et al. 2016)	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich	48	28,62	k.A.	k.A.
(Woelber et al. 2011)	Zervixkarzinom	46	104	23	499
(Kock et al. 2011)	Vulvakarzinom	31	147	56	879
(Schütze et al. 2013)	Mammakarzinom	140	296	56	1500
(Finkelmeier et al. 2018)	HCC	215	370	10	5080
(Ostheimer et al. 2014)	NSCLC	55*	105	22	420
(Papworth et al. 2010)	RCC	361	141	2-4	181

*In diesen Studien wurde Blutplasma und kein Blutserum verwendet.

In der ROC-Kurve (siehe Abbildung 17) zeigt sich, dass anhand des Serum-CAIX-Gehaltes nicht zwischen Gesunden und Probanden mit Mundhöhlenkarzinom unterschieden werden konnte (AUC=0,53; 95 % KI: 0,372-0,572; p=0,603). Auf Basis unserer Daten muss davon ausgegangen werden, dass der Serum-CAIX-Gehalt als Tumormarker beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle nicht geeignet ist.

5.4.2. Prognostische Relevanz des im Serum gelösten CAIX

Die bisher publizierte Datenlage zur prognostischen Relevanz von gelöstem CAIX bei Tumorerkrankungen ist überschaubar und uneinheitlich. Ziel dieser Arbeit war es daher, weitere Daten zu erfassen, um zur aktuellen Diskussion beizutragen und eventuelle Widersprüche aufzulösen.

Einige Publikationen weisen auf eine vorhandene prognostische Relevanz des Serum-CAIX hin. Kock et al. konnten beispielsweise nachweisen, dass im Serum gelöstes CAIX ein unabhängiger prognostischer Marker bei Vulvakarzinomen ist (Kock et al. 2011).

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich waren in einer univariablen Cox-Analyse höhere CAIX-Serumwerte signifikant mit einem geringeren Überleben assoziiert (Rosenberg et al. 2016).

Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom und erhöhten CAIX-Plasma-Werten hatten in der univariable Cox-Regression ein 2-fach erhöhtes Risiko zu versterben (Ostheimer et al. 2014).

Finkelmeier et al. konnten in ihrer Arbeit zu HCC nachweisen, dass erhöhte CAIX-Serumwerte mit einem kürzeren Gesamtüberleben einhergehen. Auch hier fand nur eine univariable Testung statt (Finkelmeier et al. 2018).

Bei Patienten mit Keimzelltumoren war der CAIX-Serumgehalt dagegen ohne prognostischen Wert für das Gesamtüberleben (Kalavska et al. 2016). Auch bei Mammakarzinomen konnten Schütze et al. keinen Einfluss des im Serum gelösten CAIX auf das krankheitsfreie Überleben bzw. auf das Gesamtüberleben feststellen (Schütze et al. 2013).

In unserer Arbeit zeigt sich, dass die Patienten mit dem höchsten CAIX-Gehalt bezüglich des Gesamtüberlebens eine schlechtere Prognose aufweisen. Patienten mit höchsten CAIX-Serumgehalt (> 139 pg/ml) lebten im Median 25 Monate länger als Patienten mit niedrigem CAIX-Gehalt (< 64 pg/ml) ($p = 0,03$). Das Ergebnis bestätigte sich in der multivariablen Cox-Analyse. Adjustiert wurde nach den aus der Literatur bekannten prognostisch relevanten Parametern T-, N-Stadium und Grading (Kaatsch et al. 2017). Da in dem hier untersuchten Patientenkollektiv fast keine Fernmetastasierung auftrat, war eine Adjustierung nach dem M-Stadium nicht notwendig. Das Risiko zu Versterben war in der Gruppe mit dem höchsten CAIX-Gehalt um das 2,2-fache höher als Patienten mit CAIX-Gehalt < 65 pg/ml ($p=0,066$). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das gelöste CAIX bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle eine prognostische Relevanz hinsichtlich des Gesamtüberlebens hat.

Zur weiteren Klärung des Sachverhaltes sind jedoch weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven notwendig, um die Ergebnisse zu verifizieren.

Ob Patienten mit sehr hohem CAIX-Gehalt von einem intensiveren Therapieregime bzw. einer spezifische CAIX-Inhibitor-Therapie profitieren und welche Grenzwerte hierfür zu setzen sind, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.4.3. Einflussfaktoren auf den Gehalt von gelöstem CAIX

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen dem gelösten CAIX im Serum bzw. dem CAIX im Tumorgewebe und den einzelnen T-, N-, M- und Gradingstadien gefunden werden. Auch Rosenberg et al., welche ebenfalls Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich untersuchten, konnten keinen Zusammenhang zwischen dem T- bzw. N-Stadium und dem vortherapeutischen CAIX-Serumgehalt feststellen (Rosenberg et al. 2016). Ebenso konnte die Studie von Woelber et al. den Serum-CAIX-Gehalt bei Patienten mit Zervixkarzinom nicht mit den klinopathologischen Parametern, dem T-Stadium, dem N-Stadium, der Invasionstiefe, dem Tumorgrading bzw. der Tumorphistologie in Verbindung bringen (Woelber et al. 2011).

Auch Finkelmeier et al. fanden beim HCC keine Korrelation zwischen dem immunhistochemisch bestimmten CAIX im Tumorgewebe und dem Serum-CAIX (Finkelmeier et al. 2018). In der Studie zu Mammakarzinomen konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen dem Gehalt an CAIX im Serum und den intratumoralem mRNA-Ca9-Level festgestellt werden (Schütze et al. 2013).

Bei Nierenzellkarzinomen war das Serum-CAIX zwar assoziiert mit der TumorgroÙe (T-Stadium), aber nicht mit der intratumoralen CAIX-Expression (Zhou et al. 2010).

Hingegen stellten Kalavska et al. mittels Spearman Analyse bei Patienten mit Keimzelltumoren eine signifikante Korrelation zwischen dem immunhistochemisch bestimmten CAIX-Gehalt im Tumorgewebe und dem im Serum gelöstem CAIX fest (Kalavska et al. 2016). Auch in einer Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe zum nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom wurden höhere CAIX-Plasma-Level bei Patienten mit fortgeschrittenem T-Stadium (T3/T4) beobachtet (Ostheimer et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit korrelierte das Serum-CAIX nicht bis kaum mit dem intratumoralem CAIX. Der mRNA-Gehalt von CAIX und der CAIX-Proteingehalt im Tumorgewebe, bestimmt mittels unterschiedlicher Methoden, korrelierte dagegen deutlich.

Obwohl die Größe der untersuchten Patientenkollektive in allen genannten Studien relativ gering war, scheint die Tumormasse nicht entscheidend für den Serum-CAIX-Gehalt zu sein.

Bisher sind zwei verschiedene Mechanismen der CAIX-Freisetzung bekannt.

Die proteolytische Spaltung der Ektodomäne des transmembranären CAIX erfolgt durch Metalloproteasen. Ca. 10 - 20 % des gelösten CAIX entsteht über diesen Mechanismus. (Zatovičová et al. 2005; Zatovičová und Pastoreková 2013). Neben diesem sogenannten „Ectodomain shedding“ wird CAIX außerdem in Form von Exosomen abgegeben. Dieser Prozess ist abhängig vom pH-Wert des Mikromilieus (Logozzi et al. 2019).

Welche Prozesse diese Mechanismen beeinflussen ist weitestgehend unbekannt und Gegenstand aktueller Forschung.

Wie bereits erwähnt, scheint der Serum-CAIX-Gehalt aber auch durch andere pathogene Zustände beeinflusst zu werden. So konnte beispielsweise vermehrt gelöstes CAIX im Serum bei Leberzirrhose nachgewiesen werden, wobei insbesondere Patienten mit Ösophagusvarizen erhöhte Werte aufwiesen (Finkelmeier et al. 2018). Da CAIX im Normalgewebe des Gastrointestinaltraktes vorkommt, wird als mögliche Ursache der verstärkten Freisetzung bei Leberzirrhose eine gastrale Hypertension diskutiert.

5.4.4. Gelöstes CAIX als potentieller Marker für das Therapieansprechen

In einer in vitro-Studie konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Apoptose, beispielsweise durch das Chemotherapeutikum Doxorubicin, mit einem verstärkten „Ectodomain shedding“ von CAIX einhergeht (Vidlickova et al. 2016). Ob dieser Umstand genutzt werden kann, um ein Therapieansprechen anhand des CAIX-Gehaltes im Blut zu dokumentieren, ist bisher unklar. Es gibt erheblichen Forschungsbedarf zur weiteren Klärung dieser Frage.

Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom, welche nach neoadjuvanter Chemotherapie vor definitiver Radiochemotherapie und Operation eine Serum-CAIX-Konzentration größer 224 pg/ml aufwiesen, hatten ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben (Hektoen et al. 2015).

Im Gegensatz dazu, gibt es auch einige Publikationen, die keine signifikanten Markereigenschaften des CAIX belegen konnten. Wobler et al. untersuchten die Änderungen des gelösten CAIX im Serum von Patienten mit Ovarialkarzinom während der 1st-line Therapie. Hierfür wurden Blutproben von insgesamt 37 Patienten zu vier verschiedenen Zeitpunkten, vor der radikalen Tumorsektion, nach der Operation und vor der adjuvanten Chemotherapie, während der Chemotherapie, nach Beendigung der

Chemotherapie, gesammelt. Signifikante Änderungen des Serum-CAIX-Gehaltes wurden nicht dokumentiert. Auch eine Assoziation mit dem Gesamtüberleben fand sich nicht (Woelber et al. 2010).

In einer weiteren Studie wurden die CAIX-Serum-Level vor und nach Therapie mit Docetaxel, einem Chemotherapeutikum bei 20 Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom untersucht. Es ergab sich jedoch keine signifikante Änderung der Werte nach Chemotherapie (Smith et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Änderung der CAIX-Serum-Konzentration im Verlauf der Strahlentherapie nachgewiesen werden. Die Studienpopulation ist mit 28 Probanden natürlich sehr gering. Auch sind die Zeitreihen häufig unvollständig, insbesondere Proben zum Zeitpunkt t4 fehlen. Dies ist vorrangig mit logistischen Problemen und Incompliance der Patienten zu erklären.

Insgesamt ist die Studienpopulation sehr klein. Da in der vorliegenden Arbeit nur die Patienten mit dem höchsten CAIX-Serum-Gehalt einen Trend zu einem geringeren Gesamtüberleben aufwiesen, sollte diese Gruppe gegebenenfalls gesondert betrachtet werden.

6. Zusammenfassung

CAIX wird in vielen soliden Tumoren überexprimiert. CAIX katalysiert die reversible Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid und ermöglicht der (Tumor-)Zelle das Überleben im hypoxischen, azidotischen Tumormikromilieu. Zudem lässt sich eine gelöste Variante von CAIX im Blut nachweisen. Dies macht CAIX zu einem interessanten möglichen Tumor- bzw. Prognosemarker bei Mundhöhlenkarzinomen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CAIX im Plattenepithelkarzinomgewebe der Mundhöhle häufig überexprimiert vorliegt, während im Normalgewebe der Mundhöhle CAIX fast gar nicht nachweisbar ist. Anhand der CAIX-Expressionslevel kann zwischen Tumor- und Normalgewebe unterschieden werden. Eine intratumorale Überexpression von CAIX scheint einen prognostisch negativen Faktor für das Überleben darzustellen. Hier sind jedoch weitere Studien mit einer größeren Probandenanzahl notwendig. Ob Patienten mit einer Überexpression an CAIX von einem intensiveren Therapieregime bzw. einer zielgerichteten Therapie profitieren, sollte ebenfalls Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Im Serum ist gelöstes CAIX nachweisbar. Das gelöste CAIX scheint jedoch als Tumormarker ungeeignet zu sein. Eine Unterscheidung zwischen gesunden Probanden und Tumorpatienten anhand des Serum-CAIX-Gehaltes war nicht möglich. Der Serum-CAIX-Gehalt war unabhängig vom TNM-Stadium. Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und sehr hohem CAIX-Serum-Gehalt scheinen jedoch ein geringeres Gesamtüberleben aufzuweisen. Hier sind weitere Studien mit größerer Fallzahl notwendig, um diese Ergebnisse zu überprüfen. Auch sollte geprüft werden, ob diese Patienten von einem intensiven Therapieregime bzw. einer zielgerichteten Therapie gegen CAIX profitieren.

Erste Untersuchungen zeigen, dass zum Monitoring eines Therapieansprechens bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle gelöstes CAIX ungeeignet scheint. Allerdings sind auch hier weitere Studien mit höherer Fallzahl nötig.

Insgesamt bleibt die Rolle von gelösten CAIX bei Gesunden und Tumorpatienten weiterhin unklar und sollte Gegenstand weiterer Forschung werden. Zudem sind Metaanalysen aufgrund teilweise widersprüchlicher Ergebnisse notwendig.

7. Literaturverzeichnis

- Baish, J. W.; Gazit, Y.; Berk, D. A.; Nozue, M.; Baxter, L. T.; Jain, R. K. (1996): Role of tumor vascular architecture in nutrient and drug delivery: an invasion percolation-based network model. In: *Microvascular Research* 51 (3), S. 327–346. DOI: 10.1006/mvre.1996.0031.
- Bartosova, M.; Parkkila, S.; Pohlodek, K.; Karttunen, T. J.; Galbavy, S.; Mucha, V. et al. (2002): Expression of carbonic anhydrase IX in breast is associated with malignant tissues and is related to overexpression of c-erbB2. In: *The Journal of Pathology* 197 (3), S. 314–321. DOI: 10.1002/path.1120.
- Beasley, N. J.; Wykoff, C. C.; Watson, P. H.; Leek, R.; Turley, H.; Gatter, K. et al. (2001): Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density. In: *Cancer Research* 61 (13), S. 5262–5267.
- Becker, A.; Hansgen, G.; Bloching, M.; Weigel, C.; Lautenschlager, C.; Dunst, J. (1998): Oxygenation of squamous cell carcinoma of the head and neck: comparison of primary tumors, neck node metastases, and normal tissue. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 42 (1), S. 35–41.
- Becker, A.; Stadler, P.; Lavey, R. S.; Hänsgen, G.; Kuhnt, T.; Lautenschläger, C. et al. (2000): Severe anemia is associated with poor tumor oxygenation in head and neck squamous cell carcinomas. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 46 (2), S. 459–466. DOI: 10.1016/S0360-3016(99)00384-3.
- Becker, W.; Behrbohm, H.; Naumann, H. H.; Pfaltz, C. R. (2009): Ear, nose, and throat diseases. With head and neck surgery. 3rd ed. Stuttgart, New York: Thieme.
- Benson, E.; Li, R.; Eisele, D.; Fakhry, C. (2014): The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. In: *Oral Oncology* 50 (6), S. 565–574. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.09.008.
- Bose, P.; Dort, J. C.; Brockton, N. T. (2013): Identifying the stromal cell type that contributes to tumor aggressiveness associated with carbonic anhydrase IX. In: *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (16), S. 2535–2536. DOI: 10.4161/cc.25843.
- Boysen, M.; Lövdal, O.; Tausjö, J.; Winther, F. (1992): The value of follow-up in patients treated for squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 28 (2-3), S. 426–430. DOI: 10.1016/s0959-8049(05)80068-1.
- Brizel, D. M.; Sibley, G. S.; Prosnitz, L. R.; Scher, R. L.; Dewhirst, M. W. (1997): Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 38 (2), S. 285–289.
- Bryant, J. L.; Gieling, R. G.; Meredith, S. L.; Allen, T.; Walker, L.; Telfer, Brian A. et al. (2018): Novel carbonic anhydrase IX-targeted therapy enhances the anti-tumour effects of cisplatin in small cell lung cancer. In: *International Journal of Cancer* 142 (1), S. 191–201. DOI: 10.1002/ijc.31042.
- Chang, T. J.; Juan, C. C.; Yin, P. H.; Chi, C. W.; Tsay, H. J. (1998): Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. In: *Oncology reports* 5 (2), S. 469–471. DOI: 10.3892/or.5.2.469.

- Chaplin, D. J.; Olive, P. L.; Durand, R. E. (1987): Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. In: *Cancer Research* 47 (2), S. 597–601.
- Chiche, J.; Ilc, K.; Laferrière, J.; Trottier, E.; Dayan, F.; Mazure, N. M. et al. (2009): Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. In: *Cancer Research* 69 (1), S. 358–368. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2470.
- Choi, S.; Kim, J.; Park, J.; Cha, I.; Kim, J.; Lee, S. (2008): Expression of carbonic anhydrase IX is associated with postoperative recurrence and poor prognosis in surgically treated oral squamous cell carcinoma. In: *Human Pathology* 39 (9), S. 1317–1322. DOI: 10.1016/j.humpath.2007.10.026.
- Dayan, F.; Roux, D.; Brahimi-Horn, M. C.; Pouyssegur, J.; Mazure, N. M. (2006): The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. In: *Cancer Research* 66 (7), S. 3688–3698. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4564.
- Dittmer, A.; Dittmer, J. (2006): Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. In: *Electrophoresis* 27 (14), S. 2844–2845. DOI: 10.1002/elps.200500785.
- Doyen, J.; Parks, S. K.; Marcié, S.; Pouyssegur, J.; Chiche, J. (2012): Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis. In: *Frontiers in Oncology* 2, S. 199. DOI: 10.3389/fonc.2012.00199.
- Dubois, L.; Peeters, S.; Lieuwes, N. G.; Geusens, N.; Thiry, A.; Wigfield, S. et al. (2011): Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. In: *Radiotherapy and Oncology* 99 (3), S. 424–431. DOI: 10.1016/j.radonc.2011.05.045.
- Dubois, L.; Peeters, S. G. J. A.; van Kuijk, S. J. A.; Yaromina, A.; Lieuwes, N. G.; Saraya, R. et al. (2013): Targeting carbonic anhydrase IX by nitroimidazole based sulfamides enhances the therapeutic effect of tumor irradiation: a new concept of dual targeting drugs. In: *Radiotherapy and Oncology* 108 (3), S. 523–528. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.06.018.
- Eaton, S. L.; Roche, S. L.; Llaverro Hurtado, M.; Oldknow, K. J.; Farquharson, C.; Gillingwater, T. H.; Wishart, T. M. (2013): Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. In: *PLOS ONE* 8 (8), e72457. DOI: 10.1371/journal.pone.0072457.
- Eckert, A. W.; Horter, S.; Bethmann, D.; Kotrba, J.; Kaune, T.; Rot, S. et al. (2019): Investigation of the Prognostic Role of Carbonic Anhydrase 9 (CAIX) of the Cellular mRNA/Protein Level or Soluble CAIX Protein in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2). DOI: 10.3390/ijms20020375.
- Estrella, V.; Chen, T.; Lloyd, M.; Wojtkowiak, J.; Cornell, H. H.; Ibrahim-Hashim, A. et al. (2013): Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. In: *Cancer Research* 73 (5), S. 1524–1535. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2796.
- Faes, S.; Planche, A.; Uldry, E.; Santoro, T.; Pythoud, C.; Stehle, J. et al. (2016): Targeting carbonic anhydrase IX improves the anti-cancer efficacy of mTOR inhibitors. In: *Oncotarget* 7 (24), S. 36666–36680. DOI: 10.18632/oncotarget.9134.
- Finkelmeier, F.; Canli, Ö.; Peiffer, K.; Walter, D.; Tal, A.; Koch, C. et al. (2018): Circulating hypoxia marker carbonic anhydrase IX (CA9) in patients with hepatocellular carcinoma and patients with cirrhosis. In: *PLOS ONE* 13 (7), e0200855. DOI: 10.1371/journal.pone.0200855.

- Gray, L. H.; Conger, A. D.; Ebert, M.; Hornsey, S.; Scott, O. C. (1953): The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. In: *The British Journal of Radiology* 26 (312), S. 638–648. DOI: 10.1259/0007-1285-26-312-638.
- Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Haremza, C.; Baert, M.; Pascual, C.; Biet-Hornstein, A.; Page, C. (2019): Head and neck squamous cell carcinoma and metachronous second primaries. In: *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*. DOI: 10.1016/j.anorl.2019.05.006.
- Haughey, B. H.; Gates, G. A.; Arfken, C. L.; Harvey, J. (1992): Meta-analysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol. In: *The Annals of Otology, Rhinology and Laryngology* 101 (2 Pt 1), S. 105–112. DOI: 10.1177/000348949210100201.
- Hektoen, H. H.; Flatmark, K.; Andersson, Y.; Dueland, S.; Redalen, K. R.; Ree, A. H. (2015): Early increase in circulating carbonic anhydrase IX during neoadjuvant treatment predicts favourable outcome in locally advanced rectal cancer. In: *BMC Cancer* 15. DOI: 10.1186/s12885-015-1557-6.
- Höckel, M.; Schlenger, K.; Aral, B.; Mitze, M.; Schäffer, U.; Vaupel, P. (1996): Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. In: *Cancer Research* 56 (19), S. 4509–4515.
- Ivanov, S.; Liao, S. Y.; Ivanova, A.; Danilkovitch-Miagkova, A.; Tarasova, N.; Weirich, G. et al. (2001): Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. In: *The American Journal of Pathology* 158 (3), S. 905–919. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64038-2.
- Jiang, W.; Zhang, P.; Li, G.; Dong, J.; Wang, X.; Wang, Y. (2016): Oct-4 is associated with gastric cancer progression and prognosis. In: *Oncotargets and Therapy* 9, S. 517–522. DOI: 10.2147/OTT.S90031.
- Johnson, R. S. (2019): How cells sense and adapt to oxygen availability. Hg. v. The Nobel Assembly. Karolinska Institutet. Stockholm. Online verfügbar unter <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/advanced-information/>, zuletzt aktualisiert am 02.12.2021.000Z, zuletzt geprüft am 02.12.2021.706Z.
- Kaatsch, P.; Spix, C.; Katalinic, A.; Meisegeier, S.; Franke, M.; Werth, K. et al. (2017): Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Berlin.
- Kaatsch, P.; Spix, C.; Katalinic, A.; Hentschel, S.; Luttmann, S.; Stegmaier, C. et al. (2015): Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2011/2012. 10., Ausgabe. Berlin: Robert Koch-Institut (Gesundheitsberichterstattung für Deutschland).
- Kalavska, K.; Chovanec, M.; Zatovičová, M.; Takacova, M.; Gronosova, P.; Svetlovska, D. et al. (2016): Prognostic value of serum carbonic anhydrase IX in testicular germ cell tumor patients. In: *Oncology Letters* 12 (4), S. 2590–2598. DOI: 10.3892/ol.2016.5010.
- Kaluz, S.; Kaluzová, M.; Liao, S.; Lerman, M.; Stanbridge, E. J. (2009): Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one transcription factor (HIF-1) show? In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1795 (2), S. 162–172. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.01.001.
- Ke, Q.; Costa, M. (2006): Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). In: *Molecular Pharmacology* 70 (5), S. 1469–1480. DOI: 10.1124/mol.106.027029.

- Kock, L.; Mahner, S.; Choschzick, M.; Eulenburg, C.; Milde-Langosch, K.; Schwarz, J. et al. (2011): Serum carbonic anhydrase IX and its prognostic relevance in vulvar cancer. In: *International Journal of Gynecological Cancer* 21 (1), S. 141–148. DOI: 10.1097/IGC.0b013e318204c34f.
- Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Sivridis, E.; Simopoulos, K.; Pastorek, J.; Wykoff, C. C. et al. (2001): Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. In: *Clinical Cancer Research* 7 (11), S. 3399–3403.
- Krogh Petersen, J.; Jensen, P.; Dahl S., M.; Winther Kristensen, B. (2016): Expression and Prognostic Value of Oct-4 in Astrocytic Brain Tumors. In: *PLOS ONE* 11 (12), e0169129. DOI: 10.1371/journal.pone.0169129.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0; 2021, AWMF Registernummer: 007/100OL; Online verfügbar unter <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/> (abgerufen am: 23.01.2022)
- Li, G.; Feng, G.; Gentil-Perret, A.; Genin, C.; Tostain, J. (2008): Serum carbonic anhydrase 9 level is associated with postoperative recurrence of conventional renal cell cancer. In: *The Journal of Urology* 180 (2), 510-3; discussion 513-4. DOI: 10.1016/j.juro.2008.04.024.
- Logozzi, M.; Capasso, C.; Di Raimo, R.; Del Prete, S.; Mizzoni, D.; Falchi, M. et al. (2019): Prostate cancer cells and exosomes in acidic condition show increased carbonic anhydrase IX expression and activity. In: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34 (1), S. 272–278. DOI: 10.1080/14756366.2018.1538980.
- Lorenzo-Pouso, A. I.; Gallas-Torreira, M.; Pérez-Sayáns, M.; Chamorro-Petronacci, C. M.; Alvarez-Calderon, O.; Takkouche, B. et al. (2020): Prognostic value of CAIX expression in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. In: *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35 (1), S. 1258–1266. DOI: 10.1080/14756366.2020.1772250.
- Lou, Y.; McDonald, P. C.; Oloumi, A.; Chia, S.; Ostlund, C.; Ahmadi, A. et al. (2011): Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. In: *Cancer Research* 71 (9), S. 3364–3376. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4261.
- McDonald, P. C.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T.; Dedhar, S. (2012): Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. In: *Oncotarget* 3 (1), S. 84–97. DOI: 10.18632/oncotarget.422.
- Neri, D.; Supuran, C. T. (2011): Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (10), S. 767–777. DOI: 10.1038/nrd3554.
- O-charoenrat, P.; Pillai, G.; Patel, S.; Fisher, C.; Archer, D.; Eccles, S.; Rhys-Evans, P. (2003): Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. In: *Oral Oncology* 39 (4), S. 386–390. DOI: 10.1016/S1368-8375(02)00142-2.
- Olive, P. L.; Aquino-Parsons, C.; MacPhail, S. H.; Liao, S.; Raleigh, J. A.; Lerman, M. I.; Stanbridge, E. J. (2001): Carbonic Anhydrase 9 as an Endogenous Marker for Hypoxic Cells in Cervical Cancer. In: *Cancer Research* 61 (24), S. 8924–8929. Online verfügbar unter <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/61/24/8924.full.pdf>.

- Ostheimer, C.; Bache, M.; Güttler, A.; Kotzsch, M.; Vordermark, D. (2014): A pilot study on potential plasma hypoxia markers in the radiotherapy of non-small cell lung cancer. Osteopontin, carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 190 (3), S. 276–282. DOI: 10.1007/s00066-013-0484-1.
- Papworth, K.; Sandlund, J.; Grankvist, K.; Ljungberg, B.; Rasmuson, T. (2010): Soluble carbonic anhydrase IX is not an independent prognostic factor in human renal cell carcinoma. In: *Anticancer Research* 30 (7), S. 2953–2957.
- Perez-Sayans, M.; Suarez-Penaranda, J. M.; Pilar, G.; Supuran, C. T.; Pastorekova, S.; Barros-Angueira, F. et al. (2012): Expression of CA-IX is associated with advanced stage tumors and poor survival in oral squamous cell carcinoma patients. In: *Journal of Oral Pathology & Medicine* 41 (9), S. 667–674. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2012.01147.x.
- Peterle, G. T.; Maia, L. L.; Trivilin, L. O.; Oliveira, M. M. de; Santos, J. G. Dos Mendes, S. O et al. (2018): PAI-1, CAIX, and VEGFA expressions as prognosis markers in oral squamous cell carcinoma. In: *Journal of Oral Pathology & Medicine* 47 (6), S. 566–574. DOI: 10.1111/jop.12721.
- Primeau, A. J.; Rendon, A.; Hedley, D.; Lilge, L.; Tannock, I. F. (2005): The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. In: *Clinical Cancer Research* 11 (24 Pt 1), S. 8782–8788. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1664.
- Radvak, P.; Repic, M.; Svastova, E.; Takacova, M.; Csaderova, L.; Strnad, H et al. (2013): Suppression of carbonic anhydrase IX leads to aberrant focal adhesion and decreased invasion of tumor cells. In: *Oncology Reports* 29 (3), S. 1147–1153. DOI: 10.3892/or.2013.2226.
- Rafajová, M.; Zatovičová, M.; Kettmann, R.; Pastorek, J.; Pastoreková, S. (2004): Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells. In: *International Journal of Oncology* 24 (4), S. 995–1004.
- Reers, S.; Pfannerstill, A.; Maushagen, R.; Pries, R.; Wollenberg, B. (2014): Stem cell profiling in head and neck cancer reveals an Oct-4 expressing subpopulation with properties of chemoresistance. In: *Oral Oncology* 50 (3), S. 155–162. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.12.006.
- Remmele, W.; Stegner, H. E. (1987): Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. In: *Der Pathologe* 8 (3), S. 138–140.
- Rosenberg, V.; Pastorekova, S.; Zatovičová, M.; Vidlickova, I.; Jelenska, L.; Slezak, P. (2016): High serum carbonic anhydrase IX predicts shorter survival in head and neck cancer. In: *Bratislavske Lekarske Listy* 117 (4), S. 201–204.
- Schütze, D.; Milde-Langosch, K.; Witzel, I.; Rody, A.; Karn, T.; Schmidt, M. et al. (2013): Relevance of cellular and serum carbonic anhydrase IX in primary breast cancer. In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139 (5), S. 747–754. DOI: 10.1007/s00432-013-1378-4.
- Semenza, G. L. (2007): Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. In: *Science's Signal Transduction Knowledge Environment* 2007 (407), cm8. DOI: 10.1126/stke.4072007cm8.
- Simone, G. de; Supuran, C. T. (2010): Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (2), S. 404–409. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.07.027.

- Sivendran, S.; Leitzel, K.; Ali, S.; Evans, D.; Hamer, P.; Pierce, K. et al. (2007): Elevated serum MN (carbonic anhydrase IX) levels in metastatic breast cancer patient serum. In: *Cancer Research* 67 (9 Supplement), S. 2666.
- Smith, A. D.; Truong, M.; Bristow, R. O.B.; Yip, P.; Milosevic, M. F.; Joshua, A. M. (2016): The Utility of Serum CA9 for Prognostication in Prostate Cancer. In: *Anticancer Research* 36 (9), S. 4489–4492. Online verfügbar unter <http://ar.iiarjournals.org/content/36/9/4489.full>.
- Sorensen, B. S.; H.ao, J.; Overgaard, J.; Vorum, H.; Honore, B.; Alsner, J.; Horsman, M. R. (2005): Influence of oxygen concentration and pH on expression of hypoxia induced genes. In: *Radiotherapy and Oncology* 76 (2), S. 187–193. DOI: 10.1016/j.radonc.2005.06.037.
- Supuran, C. T. (2008): Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. In: *Naure Reviews Drug Discovery* 7 (2), S. 168–181. DOI: 10.1038/nrd2467.
- Talks, K. L.; Turley, H.; Gatter, K. C.; Maxwell, P. H.; Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J.; Harris, A. L. (2000): The Expression and Distribution of the Hypoxia-Inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α in Normal Human Tissues, Cancers, and Tumor-Associated Macrophages. In: *The American Journal of Pathology* 157 (2), S. 411–421. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64554-3.
- Vidlickova, I.; Dequiedt, F.; Jelenska, L.; Sedlakova, O.; Pastorek, M.; Stuchlik, S. et al. (2016): Apoptosis-induced ectodomain shedding of hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX from tumor cells: a double-edged response to chemotherapy. In: *BMC Cancer* 16. DOI: 10.1186/s12885-016-2267-4.
- Wang, G. L.; Jiang, B. H.; Rue, E. A.; Semenza, G. L. (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (12), S. 5510–5514.
- Welinder, C.; Ekblad, L. (2011): Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. In: *Journal of Proteome Research* 10 (3), S. 1416–1419. DOI: 10.1021/pr1011476.
- Woelber, L.; Kress, K.; Kersten, J. F.; Choschzick, M.; Kilic, E.; Herwig, U. et al. (2011): Carbonic anhydrase IX in tumor tissue and sera of patients with primary cervical cancer. In: *BMC Cancer* 11, S. 12. DOI: 10.1186/1471-2407-11-12.
- Woelber, L.; Mueller, V.; Eulenburg, C.; Schwarz, J.; Carney, W.; Jaenicke, F. et al. (2010): Serum carbonic anhydrase IX during first-line therapy of ovarian cancer. In: *Gynecologic Oncology* 117 (2), S. 183–188. DOI: 10.1016/j.ygyno.2009.11.029.
- Wykoff, C. C.; Beasley, N. J.; Watson, P. H.; Turner, K. J.; Pastorek, J.; Sibtain, A. et al. (2000): Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. In: *Cancer Research* 60 (24), S. 7075–7083.
- Yang, J.; Lin, C.; Chuang, C.; Su, S.; Lin, S.; Yang, S. (2015): Carbonic anhydrase IX overexpression regulates the migration and progression in oral squamous cell carcinoma. In: *Tumour Biology* 36 (12), S. 9517–9524. DOI: 10.1007/s13277-015-3692-8.
- Yang, J.; Lin, C.; Hsieh, Y.; Chien, M.; Chuang, C.; Yang, S. (2017): Overexpression of carbonic anhydrase IX induces cell motility by activating matrix metalloproteinase-9 in human oral squamous cell carcinoma cells. In: *Oncotarget* 8 (47), S. 83088–83099. DOI: 10.18632/oncotarget.20236.
- Yen, A. M.; Chen, S.; Chen, T. H. (2007): Dose-response relationships of oral habits associated with the risk of oral pre-malignant lesions among men who chew betel quid. In: *Oral Oncology* 43 (7), S. 634–638. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2006.05.001.

- Zatovičová, M.; Sedlakova, O.; Svastova, E.; Ohradanova, A.; Ciampor, F.; Arribas, J. et al. (2005): Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. In: *British Journal of Cancer* 93 (11), S. 1267–1276. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602861.
- Zatovičová, M.; Pastoreková, S. (2013): Modulation of cell surface density of carbonic anhydrase IX by shedding of the ectodomain and endocytosis. In: *Acta Virologica* 57 (2), S. 257–264.
- Zhong, H.; Marzo, A. M. de; Laughner, E.; Lim, M.; Hilton, D. A.; Zagzag, D. et al. (1999): Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. In: *Cancer Research* 59 (22), S. 5830–5835.
- Zhou, G. X.; Ireland, J.; Rayman, P.; Finke, J.; Zhou, M. (2010): Quantification of carbonic anhydrase IX expression in serum and tissue of renal cell carcinoma patients using enzyme-linked immunosorbent assay: prognostic and diagnostic potentials. In: *Urology* 75 (2), S. 257–261. DOI: 10.1016/j.urology.2009.09.052.
- Znaor, A.; Brennan, P.; Gajalakshmi, V.; Mathew, A.; Shanta, V.; Varghese, C.; Boffetta, P. (2003): Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. In: *International Journal of Cancer* 105 (5), S. 681–686. DOI: 10.1002/ijc.11114.
- Zygianni, A. G.; Kyrgias, G.; Karakitsos, P.; Psyrris, A.; Kouvaris, J.; Kelekis, N.; Kouloulis, V. (2011): Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. In: *Head Neck Oncology* 3 (1), S. 2. DOI: 10.1186/1758-3284-3-2.

8. Thesen

1. Die CAIX wird im Normalgewebe fast gar nicht exprimiert, im Tumorgewebe von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle jedoch häufig überexprimiert. Anhand des CAIX-Gehaltes im Gewebe kann daher zwischen Normal- und Tumorgewebe unterschieden werden.
2. Ein erhöhter intratumoraler CAIX-Gehalt geht mit einem geringeren Gesamtüberleben einher. Patienten mit hohem CAIX-Gehalt in der Immunhistochemie ($IRS > 6$) lebten im Median 29 Monate länger als Patienten mit niedrigem CAIX-Gehalt ($IRS \leq 6$) ($p=0,027$).
3. Eine gelöste Variante von CAIX ist im Blut nachweisbar.
4. Auch bei gesunden Probanden ist CAIX im Serum nachweisbar. Eine Unterscheidung zwischen Tumorpatient und gesunden Probanden anhand der CAIX-Serum-Konzentration ist nicht möglich.
5. Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, die einen sehr hohen CAIX-Serum-Gehalt aufweisen, scheinen eine schlechtere Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens als Patienten mit niedrigerem CAIX-Gehalt zu haben. Das Risiko zu Versterben war in der Gruppe mit dem höchsten Serum-CAIX-Gehalt ($CAIX > 139 \text{ pg/ml}$) um das 2,2-fache höher als Patienten mit Serum-CAIX-Gehalt $< 65 \text{ pg/ml}$ ($p=0,066$).
6. CAIX im Serum scheint nicht als Marker für ein Therapieansprechen im Rahmen einer Radiotherapie geeignet zu sein.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dana Susanne Horter

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertationsschrift vorgelegt.

Dana Susanne Horter

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Vordermark und Dr. rer. nat. M. Bache für die Überlassung des Themas zu dieser Dissertation. Bedanken möchte ich mich auch bei den Arbeitsgruppen der Klinik für Strahlentherapie und der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, welche mir bei der Durchführung der einzelnen Experimente mit Rat und Tat zur Seite standen und mich so freundlich in ihr Team aufgenommen haben. Ein sehr großer Dank geht zudem an Dr. rer. nat. M. Kappler für die Unterstützung, Ratschläge und dauerhafte Begleitung dieses Projekts.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. Udo Bilkenroth, der Praxis für Pathologie in Eisleben, für die Begutachtung der HE-Färbungen.

Ebenso gilt mein großer Dank Herrn Dr. med. Daniel Bethmann vom Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Auswertung der Immunhistochemie.

Zudem möchte ich Frau Ulrike Pabst für Zurverfügungstellung der von ihr isolierten Proteinprobe einer Kopf-Hals-Tumor-Zelllinie danken, welche als Positivkontrolle bei den Western Blots diente.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Tom Kaune, der mir seine Ca9-mRNA-Daten für meine Auswertung zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin möchte ich meiner Familie danken für ihre Geduld, Unterstützung und Liebe. Die Tipps meiner Schwester zum Umgang mit verschiedenen Programmen waren eine große Erleichterung.

Zuletzt möchte ich Felix danken für die fortwährende Unterstützung und zahlreichen Motivationsreden.