

**Aus dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der
Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre

Prognostische Relevanz der CMG2-mRNA Expression für das Mundhöhlenkarzinom

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Arne Christian Eitzen

geboren am 27.08.1985 in Bremen

Betreuer: Univ.-Professor Dr. med. Hermann M. Behre

Gutachter/Gutachterin:

1. Prof. Dr. med. Hermann M. Behre
2. Prof. Dr. Dr. Alexander Eckert
3. Prof. Dr. Peter Kessler, Maastricht

26.01.2017

23.10.2017

Referat

CMG2 (capillary morphogenesis gene 2) kodiert für ein Zelloberflächenprotein, das vor allem bei der Entstehung von Kapillaren verstärkt exprimiert wird. In Weichteilsarkomen konnte CMG2 weiterhin als signifikanter prognostischer Faktor identifiziert werden. In anderen Tumorentitäten ist der Einfluss der mRNA-Expression von CMG2 auf die Diagnose und Prognose noch nicht untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit ist die Vermessung der CMG2-mRNA-Expression in Tumorproben von Mundhöhlenkarzinompatienten und korrespondierendem Normalgewebe, sowie die statistische Analyse der CMG2-mRNA-Expression in Assoziation zu klinischen und patientenbezogenen Parametern, um Aussagen zur Prognose dieser Patienten treffen zu können.

Nach RNA-Isolation durch Phenol-Chloroform-Extraktion und cDNA-Synthese in einer Reversen Transkriptase-PCR wurde die CMG2-mRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time-PCR vermessen und mittels $\Delta\Delta CT$ Methode quantifiziert. Die gemessenen CMG2-mRNA-Expressionen wurden mit verschiedenen klinischen Parametern (Tumorstadium, Metastasierung, Überlebenszeit, Tumorgroße) und patientenbezogenen Parametern (Alter, Geschlecht) der Patienten korreliert und in Überlebensanalysen (Kaplan-Meier-Analyse und multivariate Cox-Regressionsanalyse) ausgewertet.

Bei allen 115 Proben der insgesamt 85 Mundhöhlenkarzinompatienten konnte die CMG2-mRNA-Expression mittels quantitativer Real Time PCR nachgewiesen und quantifiziert werden. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CMG2 $\Delta\Delta CT$ -Werten der Proben des Tumorgewebes und den Proben des Normalgewebes ($p=0,339$, Mann-Whitney-U-Test). Die ROC-Analysen ergaben, dass die CMG2-mRNA-Expression kein diskriminanter Biomarker für das Vorliegen von Mundhöhlenkarzinomzellen ist (AUC=0,56; $p=0,339$; 95%-CI:0,445 - 0,677). Es konnten signifikante Korrelationen zwischen der CMG2-mRNA-Expression und der mRNA-Expression des Hypoxie-induzierten Faktor 1α ($r_s=0,38$), Piwi-like 1 ($r_s=-0,53$) und einer CMG2-Spleißvariante ($r_s=0,448$) gezeigt werden. Eine multivariate Cox-Regressionsanalyse ergab, dass Patienten mit erhöhter CMG2-mRNA-Expression im Trend ein 1,96fach erhöhtes relatives Risiko haben, an dem Tumor zu versterben ($p=0,11$). Patienten mit niedriger CMG2-mRNA-Expression haben in den ersten 42 Monaten ein im Trend längeres Überleben ($p=0,07$). Zusammenfassend weist die CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomen im untersuchten Patientenkollektiv keine Assoziation zur Diagnose oder Prognose auf.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Mundhöhlenkarzinom – Ätiologie und Epidemiologie | 1 |
| 1.2 | CMG2 (Capillary Morphogenesis Gen 2) – Funktion und Expression | 2 |
| 1.3 | CMG2-Expression und Tumorgenese/-progression..... | 5 |
| 1.4 | Zielsetzung | 7 |
| 2 | Materialien und Methoden..... | 8 |
| 2.1 | Patientenproben und Kohorte | 8 |
| 2.2 | Chemikalien..... | 9 |
| 2.3 | Kits und Enzyme | 10 |
| 2.4 | Geräte und Verbrauchsmaterialien | 10 |
| 2.5 | RNA-Isolation aus Patientengewebe..... | 11 |
| 2.6 | RNA-Konzentrationsbestimmung | 11 |
| 2.7 | cDNA-Synthese mit Hilfe von Reverser Transkriptase PCR..... | 12 |
| 2.8 | Quantitative Real-Time PCR..... | 13 |
| 2.9 | Statistische Methoden | 15 |
| 3 | Ergebnisse | 16 |
| 3.1 | CMG2 mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomzellen und Normalgewebe..... | 16 |
| 3.2 | ROC-Analysen zur diagnostischen Tauglichkeit | 18 |
| 3.3 | Statistische Analyse der CMG2-mRNA-Expression | 19 |
| 3.4 | Bivariate Korrelationsanalysen mit klinischen und demografischen Parametern..... | 25 |
| 3.5 | Überlebensanalysen..... | 26 |
| 4 | Diskussion..... | 29 |
| 4.1 | CMG2-mRNA-Expression im Mundhöhlenkarzinom..... | 29 |
| 4.2 | Bivariate Korrelationen der CMG2-mRNA-Expression mit klinischen und demografischen Parametern | 31 |
| 4.3 | Überlebenszeitanalyse | 34 |

| | | |
|-----|-----------------------|----|
| 4.4 | ROC-Analyse | 36 |
| 5 | Zusammenfassung | 38 |
| 6 | Thesen | 46 |
| 7 | Anhang | 47 |

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

| | |
|-------|---|
| Abb. | Abbildung |
| °C | Grad Celsius |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CI | confidence interval (Konfidenzintervall) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ECM | Extracellular matrix (Extrazellulärmatrix) |
| fw | forward (vorwärts) |
| HFS | hyalines Fibromatose-Syndrom |
| HGPIN | High-Grade prostatiche intraepitheliale Neoplasie |
| HIF | Hypoxie induzierter Faktor |
| HPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| HUVEC | Human Umbilical Vein Endothelial Cells |
| ISH | infantilen systemischen Hyalinose |
| JHF | juvenilen hyalinen Fibromatose |
| MIDAS | metal ion dependent adhesion site |
| µg | Mikrogramm |
| min | Minute |
| MHK | Mundhöhlenkarzinom |
| mRNA | messenger RNA (Boten-RNA) |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| OD | optische Dichte |
| PA | Protektives Antigen des Anthraxtoxins |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| rw | reverse (rückwärts) |
| sek | Sekunden |

1 Einleitung

1.1 Mundhöhlenkarzinom – Ätiologie und Epidemiologie

Weltweit erkranken schätzungsweise 263.900 Menschen jährlich neu an einem Mundhöhlenkarzinom. 128.000 Patienten starben im Jahre 2008 an dieser Tumorerkrankung (Jemal et al. 2011). Mit 13.000 Neuerkrankungen in Deutschland im Jahre 2008 macht das Mundhöhlenkarzinom etwa 4% aller Krebsneuerkrankungen aus und war damit die fünfthäufigste Tumorlokalisation beim Mann; bei Frauen umfasste es 1,6% aller Krebsneuerkrankungen (Zentrum für Krebsregisterdaten). 90-95% der Mundhöhlenkarzinome sind Plattenepithelkarzinome (Wolff et al. 2012; Zentrum für Krebsregisterdaten). Hauptrisikofaktoren für die Entstehung dieser Tumoren sind Tabak- und Alkoholkonsum, die sich gegenseitig potenzieren, sowie Infektionen mit Humanen Papillomaviren (HPV16) (Wolff et al. 2012; Dahlstrom et al. 2003). Männer erkranken im Mittel mit 61 Jahren, Frauen mit 66 Jahren (Zentrum für Krebsregisterdaten). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Männern beträgt 44% gegenüber Frauen mit 59%. Dieses Ungleichgewicht besteht, da die Ätiologie des Mundhöhlenkarzinoms bei Frauen seltener in Alkohol- und Tabakkonsum begründet liegt, aber Tumoren, die durch diese Noxen induziert werden, eine schlechtere Prognose aufweisen. Zudem wird der Tumor bei Frauen im Durchschnitt in einem frühen Stadium der Erkrankung diagnostiziert als bei Männern (Zentrum für Krebsregisterdaten). Die Mortalität des Mundhöhlenkarzinoms bei Männer und Frauen blieb in den letzten Jahren altersstandardisiert fast unverändert, die Inzidenz nimmt allerdings seit dem Jahr 2000 zu (Zentrum für Krebsregisterdaten). Screening und Präventionsmaßnahmen beschränken sich auf die Inspektion der Mundhöhle bei ärztlicher und zahnärztlicher Untersuchung des Patienten sowie die Aufklärung des Patienten über Anzeichen, Symptome und Risikofaktoren des Mundhöhlenkarzinoms (Humphris et al. 2004; Wolff K.-D. et al. 2012b). Die Therapie des Mundhöhlenkarzinoms erfolgt anhand der S3-Leitlinien des Leitlinienprogramms Onkologie der AWMW, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (Wolff K.-D. et al. 2012b). Die Therapie ist abhängig vom Stadium, Gesundheitszustand und Willen des Patienten und beinhaltet beispielsweise die Resektion oder Verkleinerung des Tumors mit anschließender Rekonstruktion, sowie einer sich anschließenden elektiven Neck-Dissection und gegebenenfalls einer postoperative Radio- oder Radiochemotherapie mit Cisplatin (Wolff et al. 2012). Da sich das 5-Jahres-Überleben mit Werten um die 50% in den letzten Jahren kaum verändert hat, eine Erkrankung an einem Mundhöhlenkarzinom also mit einer schlechten Prognose einhergeht und es sich um eine sehr häufige Tumorart handelt, ist die Identifikation und Evaluierung neuer Prognosefaktoren und Tumormarker mit hoher Spezifität von besonderem Interesse, um

Therapie und Prognose zu verbessern. Potential für einen solchen Tumormarker oder Prognosefaktor könnte das Capillary Morphogenesis Gen 2 (CMG2) aufweisen.

1.2 CMG2 (Capillary Morphogenesis Gen 2) – Funktion und Expression

Das Capillary Morphogenesis Gen 2 (CMG2) wurde zum ersten Mal 2001 in 3D Kollagen-Matrices während der Morphogenese von Kapillaren identifiziert. Eine Hauptfunktion von CMG2 liegt in der Unterstützung der Angiogenese (Bell et al. 2001). CMG2 ist auf dem Chromosom 4q21 lokalisiert und kodiert in seiner Vollängenvariante für ein 45 kDa großes Protein (Bell et al. 2001; Denadai et al. 2012). Es ist darüber hinaus bekannt, dass zelltypspezifisch verschiedene Isoformen exprimiert werden, die durch differentielles Spleißen der mRNA entstehen. Diese CMG2-Isoformen sind 489, 488, 480, 386 und 322 Aminosäuren lange Proteine (Scobie et al. 2003; Vargas et al. 2012). Das CMG2-Protein baut sich aus einem Signalpeptid, einer extrazellulären Von-Willebrand-Typ-1-Domäne, einer Ig-like-Domäne, einer Transmembranregion und einem zytosolischen Ende auf (Deuquet et al. 2011; Scobie et al. 2003). Die extrazelluläre Von-Willebrand-Typ-1-Domäne ist in allen Isoformen des CMG2-Proteins enthalten und weist ein hochkonserviertes MIDAS (metal ion dependent adhesion site)-Motiv auf (Abbildung 1) (Vargas et al. 2012).



Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des CMG2-Proteins mit seinen Domänen, modifiziert nach Deuquet (Deuquet et al. 2011).

CMG2 wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wie beispielsweise Herz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, peripheren Leukozyten aus dem Blut, Plazenta, Dünndarm, Nieren, Kolon, Milz und auch verschiedene Tumoren, aber nicht in Gehirn und Thymus (Scobie et al. 2003). Die genaue Funktion des CMG2 ist aktuell noch wenig erforscht. Allerdings ist beschrieben, dass CMG2 über die Von-Willebrand-Domäne selektiv an Kollagen Typ IV und Laminin bindet, die als seine natürlichen Liganden *in vivo* vermutet werden (Bell et al. 2001).

Im Rahmen der Erforschung der Pathogenese des Milzbrandes, ausgelöst durch das Exotoxin des *Bacillus anthracis*, wurde CMG2 als einer von drei Rezeptoren identifiziert, die die Internalisierung des Anthrax-Toxins vermitteln (Liu et al. 2013; Bradley et al. 2001). Daher wird die Bezeichnung Anthrax Toxin Rezeptor 2 (ANTXR2) synonym für CMG2 verwendet. Das Anthrax-toxin als Ligand bindet mit seinem Protektiven Antigen (PA) an die von-Willebrand-Typ A-Domäne des CMG2-Rezeptors, wodurch es zur Endozytose des PA kommt (Scobie und Young, John A T 2005). Ebenfalls als Zelloberflächenrezeptor des Anthrax-Toxins fungiert der Tumor Endothelial Marker 8 (TEM8). TEM8 ist ebenfalls ein Protein mit von-Willebrand-Typ-A-Domäne und weist eine 60%ige Homologie zur Aminosäurestruktur des CMG2 auf, sowie eine 40%ige Homologie zum gesamten CMG2-Protein (Scobie et al. 2003). Das Anthrax-Toxin hat allerdings eine über 10-fach höhere Affinität zum CMG2-Rezeptor als zu TEM8, damit ist CMG2 der bevorzugte Rezeptor des Anthrax-toxins (Liu et al. 2013; Liu et al. 2009). Mäuse, bei denen sowohl TEM8 als auch CMG2 ausgeschaltet wurden, sind vollständig resistent gegen das Anthrax-Toxin (Liu et al. 2009). Der dritte bekannte Rezeptor des Anthrax-Toxins – dessen Funktion bei der Bindung und Internalisierung des Anthrax-Toxins aktuell allerdings noch unzureichend charakterisiert ist - ist das Integrin $\beta 1$, das durch TEM8- und CMG2-Knock-Out-Mäuse identifiziert werden konnte (Liu et al. 2013).

Der Knock-Out von CMG2 und TEM8 im Mausmodell führte zu einer normalen Entwicklung und Lebenserwartung. CMG2 und TEM8 sind jedoch essentiell für die Reproduktion bei der weiblichen Maus (Liu et al. 2009). Knock-out-Mäuse konnten zwar ihre Nachkommen austragen, aber nicht spontan gebären. Ursächlich hierfür war eine diffuse Kollagenansammlung im Myometrium des murinen Uterus, die zu einem Verlust der glatten Muskulatur führte und damit zu einem Unvermögen des Uterus sich während der Geburt zu kontrahieren. Dies stützt die These von Bell *et al.*, dass CMG2 als ein Kollagenrezeptor fungiert und ist ein Hinweis dafür, dass CMG2 essentiell für die Aufrechterhaltung der Kollagenhomöostase im Uterus ist (Peters et al. 2012). Vink und Kollegen konnten weiterhin zeigen, dass CMG2 auch in humanen glatten Muskelzellen exprimiert wird und dort für die Funktionsfähigkeit, die Migration und Kontraktionsfähigkeit essentiell sind (Vink et al. 2014).

Mutationen im CMG2-Gen sind verantwortlich für zwei seltene autosomal-rezessive Erkrankungen, die juvenile hyaline Fibromatose (JHF) und die früh und mit stärkeren Symptomen einhergehende infantile systemische Hyalinose (ISH). Diese beiden genetischen Erkrankungen werden heute als hyalines Fibromatose-Syndrom (HFS) zusammengefasst (Dowling et al. 2003; Ribeiro et al. 2009; Hanks et al. 2003). Charakterisiert sind beide Erkrankungen durch abnormales Wachstum von hyalinisiertem faserigem Gewebe, das sich vor allem in der Epidermis bildet (El-Maaytah et al. 2010). Bei der ISH sind zusätzlich multiple andere

Organe von den Ablagerungen betroffen, es kommt zu schweren Infektionen und die Betroffenen sterben meist innerhalb der ersten zwei Lebensjahre (Dowling et al. 2003; El-Maaytah et al. 2010). Weitere charakteristische gemeinsame Symptome sind Verdickungen der Haut, Gingivahyperplasie, Gelenkkontrakturen und osteolytische Knochendefekte (Denadai et al. 2012). Mutationen im CMG2-Gen, insbesondere in der Von-Willenbrand-Typ1-Domäne oder Ig-like-Domäne, führen zu einer Fehlfaltung des CMG2-Proteins und damit zum Funktionsverlust und der Retention im endoplasmatischem Retikulum. Klinische Studien konnten zeigen, dass durch die Behandlung mit Proteaseinhibitoren, wie Bortezomib oder MG132, die Retention des CMG2-Proteins verringert und Symptome der HFS gelindert werden konnten (Deuquet et al. 2011).

CMG2 wurde ursprünglich *in vitro* aufgrund seiner verstärkten Expression bei der Morphogenese von Kapillaren in Endothelzellen identifiziert (Bell et al. 2001). Versuche mit CMG2-Knock-Out-Mäusen zeigten eine signifikante Inhibierung der Proliferation von Endothelzellen und eine verringerte Bildung von kapillarähnlichen Netzwerken *in vivo*. Eine Überexpression von CMG2 bewirkte eine verstärkte Proliferation und Formation von kapillarähnlichen Strukturen. Weder Überexpression, noch Knock-Out hatten hingegen signifikante Effekte auf die Migration von Endothelzellen. Daraus kann gefolgert werden, dass CMG2 vor allem über die Endothelproliferation für die Angiogenese notwendig ist (Reeves et al. 2010).

In Maus-Modellen konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität der Membrane-Typ-1-Matrix-Metalloproteinase (MT1-MMP) durch CMG2 reguliert wird. Diese stimulieren die Proliferation, die Extrazellulärmatrix und die Fähigkeit kapillarähnliche Strukturen auszubilden (Reeves et al. 2010). MMPs sind Zink-abhängige Endopeptidasen, deren Hauptaufgabe der Abbau von Extrazellulärmatrix (ECM) ist (Stocker et al. 1995). Dadurch nehmen sie eine wichtige Funktion bei der Wundheilung, Ovulation und Angiogenese ein. Darüber hinaus sind sie an Entzündungsprozessen und an der Invasivität von verschiedenen Tumoren beteiligt. Sie werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) sezerniert und erst durch Spaltung des Peptids aktiviert (Rodriguez et al. 2010; Snoek-van Beurden et al. 2005; Harper et al. 1971). MT1-MMP aktiviert MMP2, das den Turnover der ECM reguliert. CMG2 spielt somit auch eine wichtige Rolle in der Homöostase der ECM (Reeves et al. 2012).

1.3 CMG2-Expression und Tumorgenese/-progression

CMG2 wird ubiquitär exprimiert. Ebenso konnte die Expression in vielen Arten von Tumorzellen detektiert werden (Vargas et al. 2012). Es wurde festgestellt, dass CMG2 eine Rolle bei der Angiogenese spielt. Es ist durchaus denkbar, dass CMG2 auch eine wichtige Rolle bei der Neovaskularisation von Tumoren spielt, da dies ein bedeutender Faktor für das Wachstum des Tumors darstellt. Greither konnte 2005 zeigen, dass die CMG2-mRNA Expression ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben von Patienten mit Weichteilsarkomen ist. Die CMG2-mRNA-Expression in Tumorzellen korrelierte positiv mit dem Überleben der Patienten. Das Risiko an dem Tumor zu versterben war bei einer niedrigeren CMG2-mRNA-Expression in den Zellen um das 3fache erhöht (Greither 2005). Ye *et al.* zeigten 2014 *in vitro*, dass CMG2 die Adhäsion und Invasivität von Prostatakarzinomzellen reguliert. In Prostatakarzinomzellen wurde im Vergleich zu Epithelzellen der Prostata eine erhöhte Expression von CMG2 festgestellt. Der Knock-Down des CMG2 beeinträchtigte die Adhäsion der Tumorzellen und führte zu einer erhöhten Invasivität. Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression zu einer geringeren Invasivität (Ye et al. 2014a). In einer weiteren Untersuchungen konnten Ye *et al.* 2014 zeigen, dass eine verringerte Expression von CMG2 in Mammakarzinomzellen mit Fortschreiten der Erkrankung und einer schlechten Prognose assoziiert ist und das CMG2 einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von Mammakarzinomzellen hat (Ye et al. 2014b). Eine weitere Studie von Ye *et al.* von 2014 untersuchte das CMG2 *in vitro*-, *ex vivo*- und *in vivo*-Methoden als potenzielles therapeutisches Ziel, um eine tumorassoziierte Neovaskularisation zu verhindern. Eine Überexpression des CMG2 und seiner VWA/1- Domäne verstärkte die Adhäsion von Endothelzellen an der ECM und inhibierte die Bildung von Gefäßen und die Migration von Endothelzellen (Ye et al. 2014b; Ye et al. 2014c). Die Studie konnte außerdem zeigen, dass ein kleines Peptid, dessen Struktur auf der Aminosäuresequenz der VWA/1-Domäne des CMG2 basiert, einen inhibierenden Effekt auf das Tumorwachstum *in vivo* hatte und andere Polypeptide einen potenziellen inhibierenden Effekt auf *in* und *ex vivo* Angiogenese. Damit ist CMG2 ein potentielles Ziel der tumorassoziierten Angiogenese (Ye et al. 2014c).

Im Zuge der Anthraxforschung ist es Rogers *et al.* gelungen mutierte Liganden für den CMG2-Rezeptor zu entwickeln, die den Rezeptor blockieren und den normalen Ablauf der Signaltransduktion verhindern. Verschiedene Mutationen des Protektive Antigens (PA) des Anthraxtoxins, das an die von Willebrand-Typ-A-Domäne bindet, inhibieren die Angiogenese und auch das Tumorwachstum von Lungenkarzinomzellen *in vivo*. Die maximale Hemmung der Angiogenese lag bei ca. 60%, das Tumolvolumen wurde um ca. 40% reduziert. Daraus kann

geschlossen werden, dass sich CMG2 als Ziel der Targeted-Therapie der Antiangiogenese eignen könnte (Rogers et al. 2007). Chen *et al.* stellten Anthraxtoxine her, die durch Substitution von Aminosäuren an das Protektive Antigen (PA) selektiv menschliche Tumorzellen zerstörte (Chen et al. 2007). 2008 konnten Rouleau *et al.* in einer Studie zeigen *in vitro* und *in vivo*, dass nach der systemischen Gabe von modifizierten Bestandteilen des Anthrax-Toxin, dem lethal toxin (LeTx), das Wachstum von Melanomen und auch Neuroblastomen verzögert wurde. 2012 wurde durch Reeves *et al.* nachgewiesen, dass CMG2 in die Regulation der Aktivität der Membrane-Typ-1-Matrix-Metalloproteinase (MT1-MMP) eingreift (Reeves et al. 2012). Schon lange vor der Identifikation von CMG2 zeigten mehrere Forschungsarbeiten, dass diverse Zellfunktionen wie der Umsatz der Extrazellulärmatrix und Zellmigration mit dem Wachstum, der Invasion und Metastasierung von Tumoren assoziiert sind (Egeblad und Werb 2002; Seiki et al. 2003; Gong et al. 2014). Die Expression von MT1-MMP und anderen Matrix-Metalloproteasen korreliert gut mit der Progression von malignen Tumoren wie Brustkrebs, Adenokarzinomen des Magens, papilläre Tumoren der Schilddrüse, Plattenepithelkarzinome in der Mundhöhle und Gliomen (Shiomi und Okada 2003). Die Ergebnisse von Zhai und Kollegen zeigen, dass MT1-MMP ein Schlüsselenzym bei der Progression des Zervixkarzinoms ist. Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierungstechnik konnte gezeigt werden, dass die Expression von MT1-MMP in Proben aus Zervixgewebe sich mit der Progression des Zervixkarzinoms erhöht. Besonders hohe Expressionen fand man in fast allen invasiven Karzinomen, in normalem Gewebe bis zur High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions (CIN2-3) nur leichte bis keine Expression (Zhai et al. 2005). Auch im Prostatagewebe wird MT1-MMP exprimiert und erhöhte Konzentrationen wurden in High-grade prostaticen intraepithelialen Neoplasien (HGPIN) gefunden (Upadhyay et al. 1999).

Zusammenfassend besteht bei der Analyse eines potentiellen Zusammenhangs zwischen der deregulierten CMG2-mRNA Expression und der Entstehung und Progression von Tumoren weiter Forschungsbedarf, wobei CMG2 Potential als ein ergänzender molekularer Biomarker für die Diagnose oder Prognose des Mundhöhlenkarzinoms zeigt.

1.4 Zielsetzung

CMG2 (capillary morphogenesis gene 2) kodiert für ein Zelloberflächenprotein, das vor allem bei der Entstehung von Kapillaren verstärkt exprimiert wird. Sein wichtigstes Strukturelement ist eine Von-Willebrand-TypA-Domäne, die eine Bindung zu den Extrazellulärmatrix-Proteinen Laminin und Kollagen IV herstellt (Bell *et al.* 2001). Zudem ist CMG2 ein Rezeptor für das Anthrax-Toxin (Scobie *et al.* 2003). Seine physiologische Funktion ist derzeit noch unbekannt. Mutationen in diesem Gen wurden als Ursache für die Erbkrankheiten juvenile hyaline Fibromatose (JHF) und infantile systemische Hyalinose (ISH) identifiziert (Hanks *et al.* 2003). In Weichteilsarkomen konnte CMG2 als signifikanter prognostischer Faktor im Weichteilsarkom identifiziert werden (die niedrige Expression ist mit einem 3fach erhöhten relativen Risiko verbunden, am Tumor zu versterben).

In anderen Tumorentitäten ist der Einfluss der mRNA-Expression von CMG2 auf die Diagnose und Prognose noch nicht untersucht worden. Daher soll die Expression dieses Gens in Mundhöhlenkarzinomen vermessen und auf ihre diagnostische (Unterscheidung Normalgewebe – Tumorgewebe) und prognostische Tauglichkeit (Überlebensanalysen) überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- 1) Vermessung der CMG2-mRNA-Expression in Patientenproben von Mundhöhlenkarzinompatienten (115 Proben von Tumorgewebe und korrespondierendem Normalgewebe) mittels quantitativer RT-PCR.
- 2) Statistische Analyse der CMG2-mRNA-Expression, wie die bivariate Korrelationsanalyse zu klinischen Parametern (Tumorstadium, Metastasierung, Überlebenszeit, Tumorgröße) und patientenbezogenen Parametern (Alter, Geschlecht), Überlebensanalysen nach Kaplan-Meier und multivariater Cox-Regressionsanalyse sowie ROC-Analysen zur diagnostischen Aussagekraft einer erhöhten CMG2-mRNA-Expression.

2 Materialien und Methoden

2.1 Patientenproben und Kohorte

Die Patientenproben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. Alexander Eckert und Dr. Matthias Kappler aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Proben aus Mundhöhlenkarzinomen und teilweise dem dazu korrespondierenden Normalgewebe. Insgesamt lagen 115 Gewebeproben vor; davon entstammten 88 Proben dem Tumorgewebe und 27 Proben dem Normalgewebe.

Die Kohorte setzte sich aus insgesamt 85 Patienten der Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie zusammen, denen ein Mundhöhlenkarzinom diagnostiziert worden war. Der Zeitraum, in dem die Diagnosen gestellt wurden, lag zwischen dem 28.09.2006 und dem 1.03.2012. Dabei handelte es sich um 67 männliche und 18 weibliche Patienten. Das Alter zum Zeitpunkt der Operation der Patienten bewegte sich zwischen 25 und 91 Jahren mit einem Mittelwert von 59,9 Jahren und einen Median von 59,0 Jahren.

Bei 70 Patienten der Kohorte lagen Daten zum Überlebenszeitraum vor. Das Alter dieser Patienten lag zwischen 25 und 91 Jahren. Das mittlere Alter lag bei 58,8 Jahren und der Median bei 57,5 Jahren. Bis zum Ende des Follow-Up am 19.03.2013 waren 34 dieser Patienten verstorben. Die durchschnittliche Überlebenszeit lag bei 18,5 Monaten mit einem Median von 16,5 Monaten.

Tabelle 1: Anzahl der Patienten in den Tumorstadien des Mundhöhlenkarzinoms nach TNM

| Tumorstadium | Anzahl der Patientenproben |
|---------------------|-----------------------------------|
| T1 | 7 (11%) |
| T2 | 19 (31%) |
| T3 | 4 (7%) |
| T4 | 31 (51%) |
| T unbekannt | 9 |
| N0 | 20 (32%) |
| N1 | 13 (21%) |
| N2 | 28 (45%) |
| N3 | 1 (2%) |
| N unbekannt | 8 |
| M0 | 39 (67%) |
| M1 | 19 (33%) |
| M unbekannt | 12 |

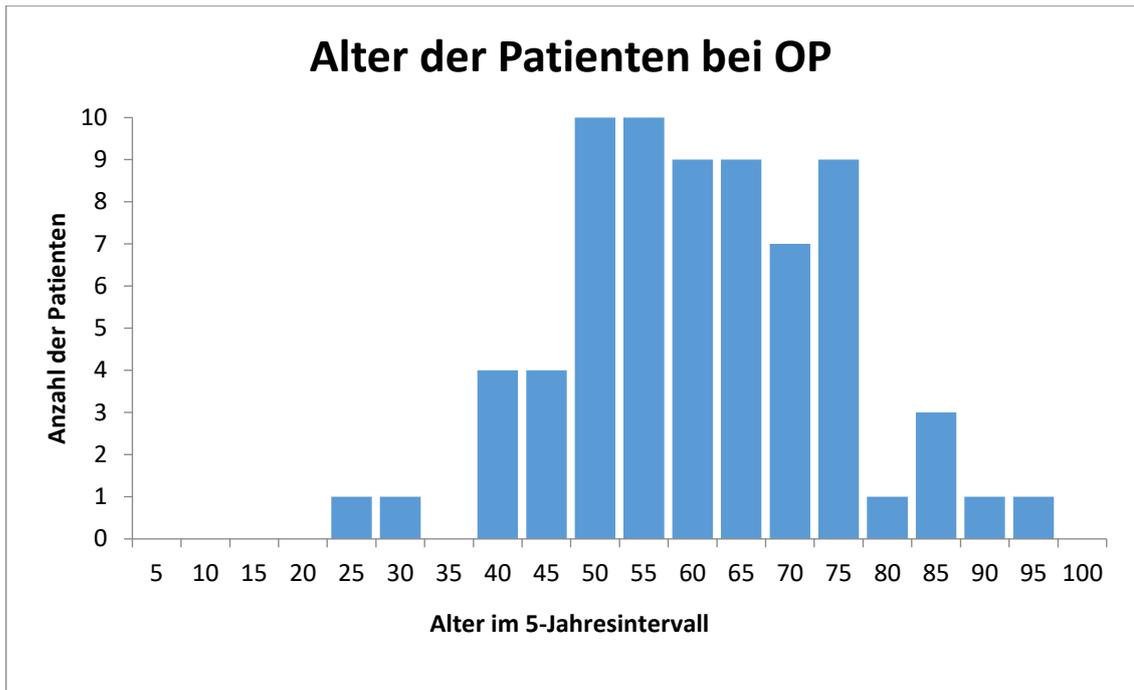


Abbildung 2: Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation

2.2 Chemikalien

| | |
|-----------------------|---------------------------|
| Chloroform | AppliChem (Darmstadt) |
| DEPC-H ₂ O | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Ethanol absolut | Sigma Aldrich (Steinheim) |
| Isopropanol | AppliChem (Darmstadt) |
| Trizol-Reagenz | Invitrogen (Karlsruhe) |

Die verwendeten Primer zum Nachweis und der Quantifizierung der CMG2-mRNA sowie von HPRT als Referenzgen wurden durch die Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) synthetisiert und hatten folgende Sequenz:

| | |
|---------------------|------------------------------------|
| CMG2 full length fw | 5' – TCC TGC AGA AGA GCC TTT-3' |
| CMG2 full length rw | 5' – TGC ATA ATG ATG GCA CCA GA-3' |
| HPRT309 | 5'-TTG CTG ACC TGC TGG ATT AC-3' |
| HPRT570 | 5'-CTT GCG ACC TTG ACC ATC TT-3' |

2.3 Kits und Enzyme

| | |
|---|--|
| DNase, RNase-free | Qiagen (Hilden) |
| RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit | Thermo Scientific/Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Maxima™SYBR Green/ROX qPCR Master Mix | Fermentas (St. Leon-Rot) |

2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|-------------------------------|
| Analysenwaage | Kern (Balingen-Frommern) |
| Bechergläser | Merck (Darmstadt) |
| Bio Photometer | Eppendorf (Hamburg) |
| Greiner/Falconröhrchen | Greiner (Frickenhausen) |
| iCycler™ Thermal Cycler (real-time-cycler) | Bio-Rad (München) |
| Magnetrührer | IKA® Werke (Staufen) |
| Magnetrührstäbchen | Roth (Karlsruhe) |
| Messzylinder | Merck (Darmstadt) |
| NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer | Thermo Scientific (Karlsruhe) |
| Pasteurpipetten | Hirschmann (Eberstadt) |
| Pipetboy (automatische Pipette) IBS | IntegraBiosciences (Fernwald) |
| Pipetten | Eppendorf (Hamburg) |
| Pipettenspitzen | Greiner (Frickenhausen) |
| qPCR-Gefäße/Deckel | Peqlab (Erlangen) |
| Reaktionsgefäße | Biozym (Hessisch Oldendorf) |
| Sprout™ Tischzentrifuge | Kisker (Steinfurt) |
| Thermocycler T3000 | Biometra (Göttingen) |
| UVette® routine pack (Küvetten) | Eppendorf (Hamburg) |
| Vortex Mixer | StarLab (Ahrensburg) |
| Zentrifuge 5415D | Eppendorf (Hamburg) |

2.5 RNA-Isolation aus Patientengewebe

Für die Isolation von RNA aus dem Patientengewebe wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion verwendet. Sie eignet sich zum Entfernen von Gewebekleberresten, die sich möglicherweise in der Probe befinden und zu Problemen bei der Nutzung von RNA-Isolationssäulen in vorangegangenen Versuchen führten. Ein zusätzlicher DNase-Schritt wurde eingefügt, um mögliche Verunreinigungen durch DNA zu minimieren.

Die RNA-Isolation wurde mit der TRIzol®Reagenz (Invitrogen), dem Protokoll folgend, durchgeführt, der Abbau der DNA durch das RNase-Free DNase Set (Qiagen).

Es wurden zunächst 30 µm dicke Gewebeschnitte am Kryocut angefertigt, in 1 ml vorgelegte TRIZOL-Reagenz überführt und mindestens 3 min inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben und gründlich gevortext und anschließend 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen, ohne die proteinhaltige Interphase zu verletzen, und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase (RNase-Free DNase Set (Qiagen)) wurde zugegeben, vorsichtig invertiert und 15 min bei RT inkubiert. Es wurden anschließend 500 µl Isopropanol zugegeben und bei -20°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurde die Probe 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit je 1 ml eiskalten 96%-Ethanol und 70%-Ethanol gewaschen und 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl H₂O resuspendiert.

2.6 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Karlsruhe), das freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Simm (Klinik für Herz-Thorax-Chirurgie) zur Verfügung gestellt wurde.

Als Referenzlösung wurde 1 µl DEPC behandeltes Wasser benutzt. Die Messung der optischen Dichte der jeweiligen Probelösung (1 µl) gegen die Referenzlösung erfolgte bei $\lambda=260$ nm (Absorptionsmaximum von RNA) und $\lambda=280$ nm (Absorptionsmaximum von Proteinen).

Die RNA-Konzentration lässt sich gemäß folgender Formel berechnen:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

OD_{260} von 1 entspricht dabei 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA

Der Quotient aus dem A_{260}/A_{280} -Wert gibt die Reinheit der Präparation an und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.7 cDNA-Synthese mit Hilfe von Reverser Transkriptase PCR

Die komplementäre DNA (cDNA) dient als Ausgangsmaterial für die quantitative Real-time PCR und enthält durch einen random Hexamerprimer bei der Synthese alle mRNA-Bereiche. Zur Synthese der cDNA wurden das Fermentas Kit „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ verwendet.

Für die Anfertigung eines Pre-Annealing-Mix wurden für jede Probe folgende Komponenten eingesetzt:

x μl RNA (2 μg gesamt)
y μl H_2O (DEPC-behandelt, RNase-frei)
2 μl random primer (100 μM)
= 25 μl Pre-Annealing-Ansatz

Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 70°C inkubiert.

Für die Anfertigung eines Reaktions-Mixes wurden für jede Probe folgende Komponenten eingesetzt:

9 μl 5x Reaction Puffer
2 μl RNase-Inhibitor (20 U/ μl)
5 μl dNTP-Mix [10 mM]
2 μl Reverse Transkriptase (20 U/ μl)
7 μl H_2O (DEPC behandelt)
= 25 μl Reaction-Mix -Ansatz

Je 25 µl des Pre-Annealing-Ansatzes und 25 µl Reaction-Mix-Ansatzes wurden zusammengegeben und gemischt. Die Proben wurden in den Thermocycler verbracht und die Synthese der cDNA mit folgendem Programm durchgeführt.

Programm: 1. 25°C 5 min
 2. 42°C 60 min
 3. 70°C 10 min

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C für einige Woche und für einen längeren Zeitraum bei -80°C.

2.8 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Methode zur kontinuierlichen Bestimmung der Produktmenge eines spezifischen Transkriptes während einer PCR-Reaktion. Dies geschieht mit Hilfe eines interkalierenden Farbstoffes, dem SYBRGreen. Seine Fluoreszenz ergibt sich aus der Interkalation in doppelsträngige DNA und kann bei Anregung nach jedem Amplifikationszyklus gemessen werden. Der C_T -Wert ist die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal von dem Fluoreszenzsignals des Hintergrundes signifikant abhebt. Mit dem C_T -Wert (Threshold Cycle) kann auf die ursprüngliche Menge an Template cDNA geschlossen werden, wenn zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung der cDNA-Fragmente noch exponentiell verläuft.

Pro Reaktionsansatz wurden für jede Probe folgende Komponenten eingesetzt:

7,5 µl SyBr-Green qPCR-Mix

5,5 µl H₂O, RNase-freie

0,5 µl Primer fw

0,5 µl Primer rw

=14 µl Ansatz

14 µl des Mastermixs wurden zusammen mit je 1 µl cDNA der Patienten-Proben (1:5 Verdünnung mit RNase-freiem H₂O) in ein entsprechendes Reaktionsgefäß (PCR-Stripes)

gegeben. Die Proben wurden in den qPCR-Cycler verbracht und mittels folgenden Programms amplifiziert und vermessen.

| | | | |
|-----------|---|---|-----------------------------|
| Programm: | 1. | 95°C | 15min |
| | 2. | 95°C | 20 sek |
| | 3. | 58°C | 30 sek |
| | 4. | 72°C | 30 sek (Fluoreszenzmessung) |
| | Schritte 2.-4. werden 45-mal wiederholt | | |
| | 5. | 50°C | 2 min |
| | 6. | Schmelz-Kurve (60 – 95°C, je 10sek/Grad+Fluoreszenzmessung) | |

Mit der Schmelzkurve wurde die Reinheit des Amplifikat überprüft. Dazu wurde die Temperatur in 1-Grad-Schritten erhöht und jeweils die Fluoreszenz gemessen. Lag nur ein Produkt in dem Reaktionsansatz vor, trennte sich die Doppelstränge bei einer spezifischen Temperatur, so dass ein spezifischer, klar umrissener Peak entstand.

Zur relativen Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta C_T$ Methode verwendet. Die Expression des CMG2 wurde dabei mit einem nicht regulierten Referenzgen normalisiert. Als Referenzgen wurde die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) benutzt. Nach der folgenden Formel wird dabei der C_T -Wert des CMG2 in Relation zum C_T -Wert des Referenzgens gesetzt (Livak und Schmittgen 2001):

$$\begin{aligned}\Delta CP &= CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta CP &= \Delta CP \text{ Behandlung} - \Delta CP \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta CP}\end{aligned}$$

2.9 Statistische Methoden

Die gemessenen CMG2-mRNA-Expressionen aus Mundhöhlenkarzinomzellen und korrespondierendem Normalgewebe wurden mit klinischen (Tumorstadium, Metastasierung, Überlebenszeit, Tumorgroße) und patientenbezogenen (Alter, Geschlecht, Nikotin- oder Alkoholabusus) Parametern der Kohorte korreliert und Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier und die multivariate Cox-Regressionsanalyse angefertigt. Dazu wurde die Statistik- und Analyse-Software SPSS 20.0 (IBM, Ehningen, Deutschland) genutzt. Bei einer Signifikanzschwelle kleiner als 0,05 (p -Werte $< 0,05$) zwischen zwei verglichenen Werten wurden dieser Unterschied als statistisch signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 CMG2 mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomzellen und Normalgewebe

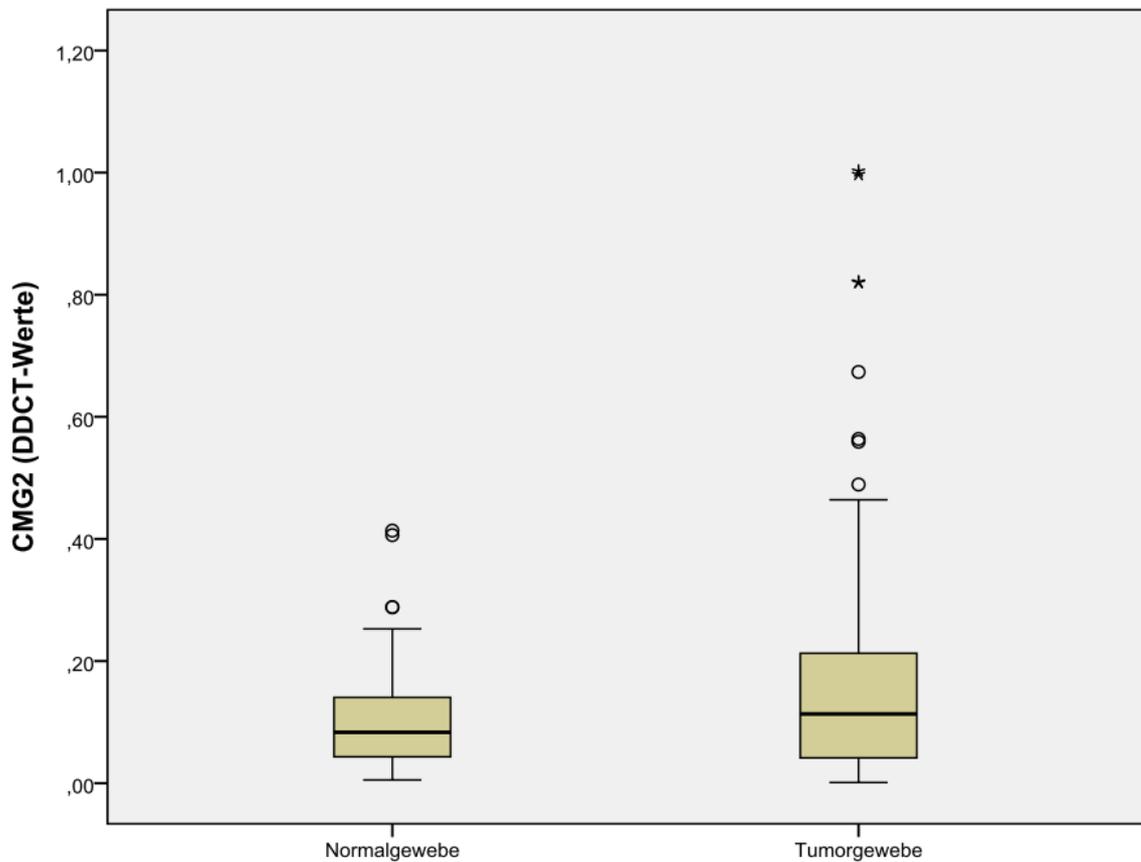
Bei allen 115 Proben der insgesamt 85 Patienten wurde die CMG2-mRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt und mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode quantifiziert. Davon stammten 88 Proben aus Mundhöhlenkarzinomen und 27 Proben aus korrespondierenden Normalgewebe ohne Tumorzellen. In diesen Zellen wurde ebenfalls die CMG2-mRNA-Expression mittels quantitativer Real Time PCR bestimmt und ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert errechnet. Die erhaltenen $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden dann mittels Box-Plot analysiert und optisch visualisiert um die Verteilung der Variablen darzustellen und vergleichen zu können (Abbildung 3).

In den Proben des Tumorgewebes (n=88) konnten CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte von 0,00 bis 1,00 bestimmt werden. Der Mittelwert der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte betrug 0,18 und der Medianwert 0,11 (Abbildung 3).

In den Proben des Normalgewebe (n=27) konnten CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte von 0,01 bis 0,41 bestimmt werden. Der Mittelwert der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte betrug 0,12 und der Medianwert betrug 0,08. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werten der Proben des Tumorgewebes und den Proben des Normalgewebes (p=0,34, Mann-Whitney-U-Test) (Abbildung 3).

Der t-Test der beiden unabhängigen Stichproben CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte in Tumorgewebe und Normalgewebe zeigte eine leichte Tendenz der Variablen nicht gleich verteilt zu sein (p=0,07).

Abbildung 3: Box-Plot-Analyse zur Verteilung der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte aus Proben von Normalgewebe und Tumorgewebe. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe. Die in der Graphik gezeigte Boxen enthält 50% der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte, der Balken in der Box entspricht dem Median der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte. Die durch zwei weitere Balken begrenzten Linien entlang der Ordinate enthalten 75% der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte. Die mit einem Kreis versehenen CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte sind Ausreißer, Sternchen sind Extremwerte.



| Gewebeart | n | Mittelwert CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Median CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Maximaler CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Minimaler CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte |
|--------------|----|--|--|---|---|
| Normalgewebe | 27 | 0,12 | 0,08 | 0,41 | 0,01 |
| Tumorgewebe | 88 | 0,18 | 0,11 | 1,00 | 0,00 |

In der Chi²-Vierfeldertafel wurden die beobachteten Häufigkeiten der CMG2 $\Delta\Delta$ C_T-Median aller 115 Patientenproben mit den CMG2 $\Delta\Delta$ C_T-Median aus den Proben des Normalgewebes und des Tumorgewebes und den zu erwarteten Häufigkeiten verglichen. Sie waren fast gleich verteilt (Tabelle 2) und es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der Häufigkeiten festgestellt werden (p=0,48 Chi²-Test nach Pearson, p=0,52 Fischer's exact test).

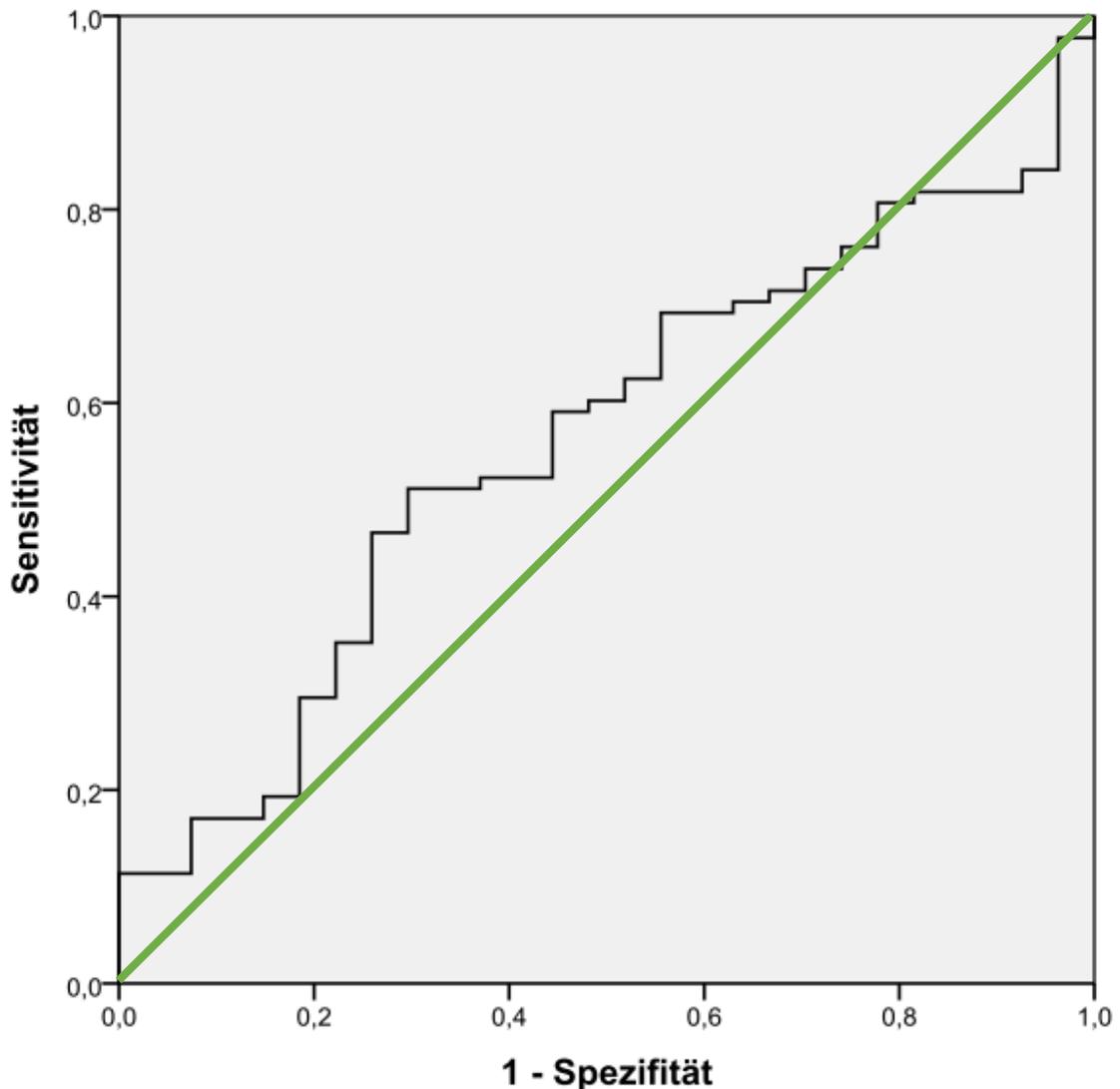
Tabelle 2: Kreuztabelle zum Chi2-Vierfeldertest

| | | Normalgewebe | Tumorgewebe | Gesamt |
|-------------------------------|-------------|--------------|-------------|--------|
| < CMG2 Median aller Proben | n | 15 | 42 | 57 |
| | Erwartete n | 13,4 | 43,6 | 57,0 |
| > CMG2 Median aller Proben | n | 12 | 46 | 58 |
| | Erwartete n | 13,6 | 44,4 | 58,0 |
| Gesamt | Summe | 27 | 88 | 115 |

3.2 ROC-Analysen zur diagnostischen Tauglichkeit

Die ROC-Analyse (receiver operating characteristic) der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ –Werte aus allen Proben (n=115) zeigt, dass der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ –Wert sich nicht eignet um zwischen gesunden Normalgewebe oder Tumorgewebe zu unterscheiden. Die AUC betrug 0,56 ($p=0,34$; 95%-CI: 0,45 - 0,68) (Abbildung 4) und somit ist die CMG2-mRNA-Expression im Gewebe nur unwesentlich besser als der Zufall geeignet, um zwischen gesunden Normalgewebe oder Tumorgewebe zu differenzieren. Die CMG2-mRNA-Expression ist somit kein diskriminanter Biomarker für das Vorliegen von Mundhöhlenkarzinomzellen.

Abbildung 4: ROC-Analyse zur diagnostischen Aussagekraft der CMG2-mRNA-Expression. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ –Werte aller 115 Proben wurden nach ihrer Sensitivität und Spezifität aufgetragen. Der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ –Wert eignet sich nicht, um zwischen Normalgewebe oder Tumorgewebe zu unterscheiden (AUC=0,56, $p=0,34$; 95%-CI:0,45 - 0,68).

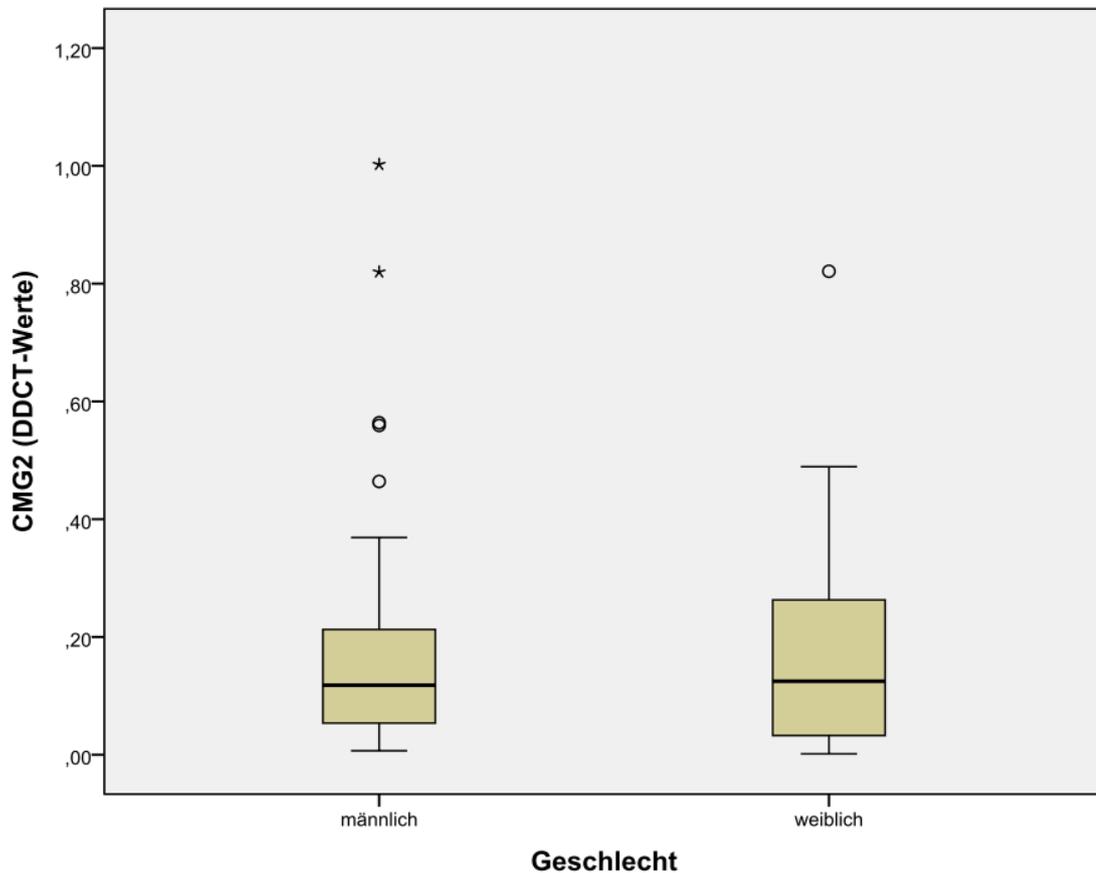


3.3 Statistische Analyse der CMG2-mRNA-Expression

Für die statistischen Analysen wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen alle klinischen und patientenbezogenen Parameter vollständig vorlagen, insbesondere der Überlebenszeitraum. Dies war für 70 der aus 85 Patienten bestehenden Kohorte der Fall.

Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte aus Proben des Tumorgewebe von Männer (n=55) und Frauen (n=15) wurden miteinander verglichen. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte der Männer lagen zwischen 0,01 und 1,00 mit einen Mittelwert von 0,17 und einem Median von 0,12. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte der Frauen lagen zwischen 0,00 und 0,82 mit einen Mittelwert von 0,20 und einem Median von 0,12. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werten in Proben des Tumorgewebes von Männern und den Proben des Tumorgewebes von Frauen ($p=0,89$; Mann-Whitney-U-Test; s. Abbildung 5).

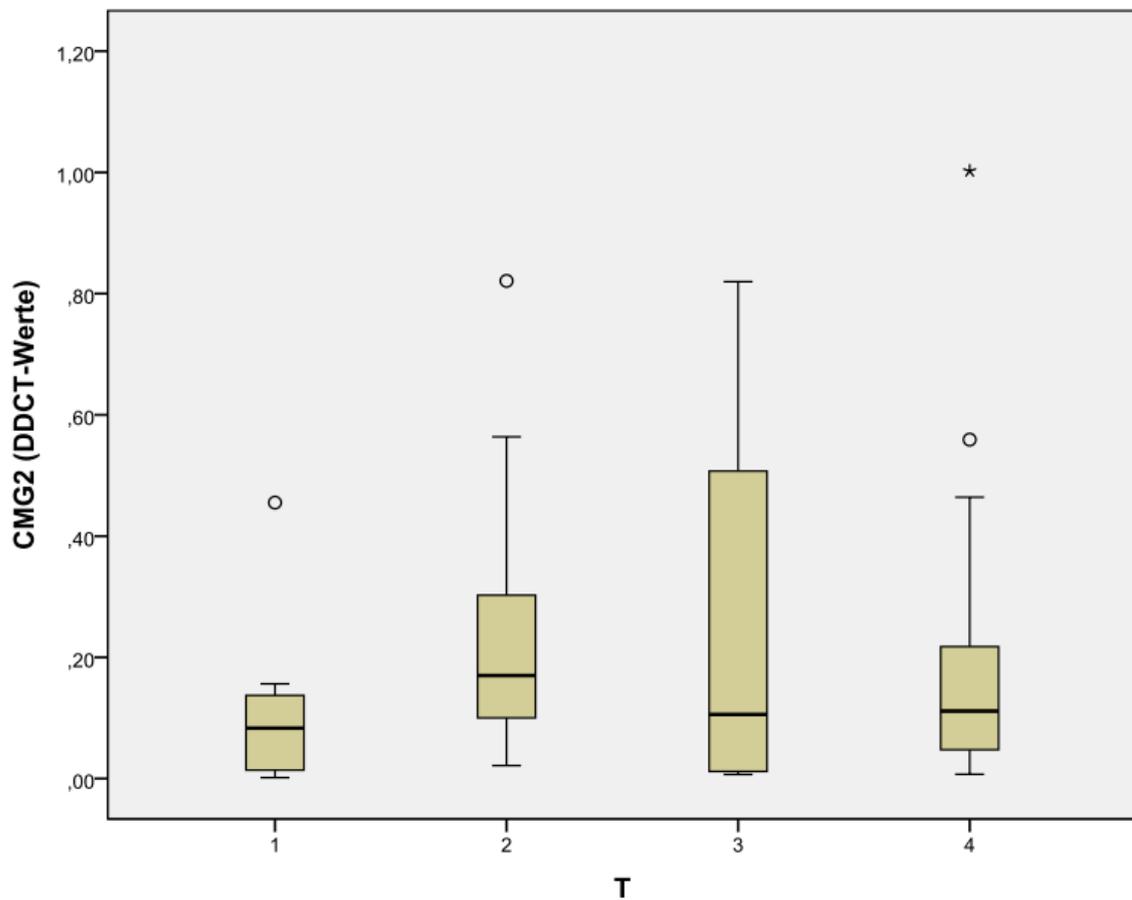
Abbildung 5: Box-Plot-Analyse zur Verteilung der CMG2-mRNA-Expression im Tumorgewebe in Abhängigkeit vom Geschlecht des Patienten. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen.



| Geschlecht | n | Mittelwert CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte | Median CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte | Maximaler CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte | Minimaler CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte |
|------------|----|---|---|--|--|
| Männer | 55 | 0,17 | 0,12 | 1,00 | 0,01 |
| Frauen | 15 | 0,20 | 0,12 | 0,82 | 0,00 |

Von 61 Proben Tumorgewebe wurden die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte in Abhängigkeit des T-Stadiums untersucht. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte lagen zwischen 0,00 und 1,00 mit einem Mittelwert von 0,19 und einem Median von 0,12. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied für die Stadien T1 bis T4 festgestellt werden ($p=0,19$; Kruskal-Wallis-Test). Für die weitere Aufschlüsselung siehe Abbildung 6.

Abbildung 6: Box-Plot-Analyse zur Verteilung der CMG2-mRNA-Expression (n=61) in Abhängigkeit vom T-Stadium. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den T-Stadien.

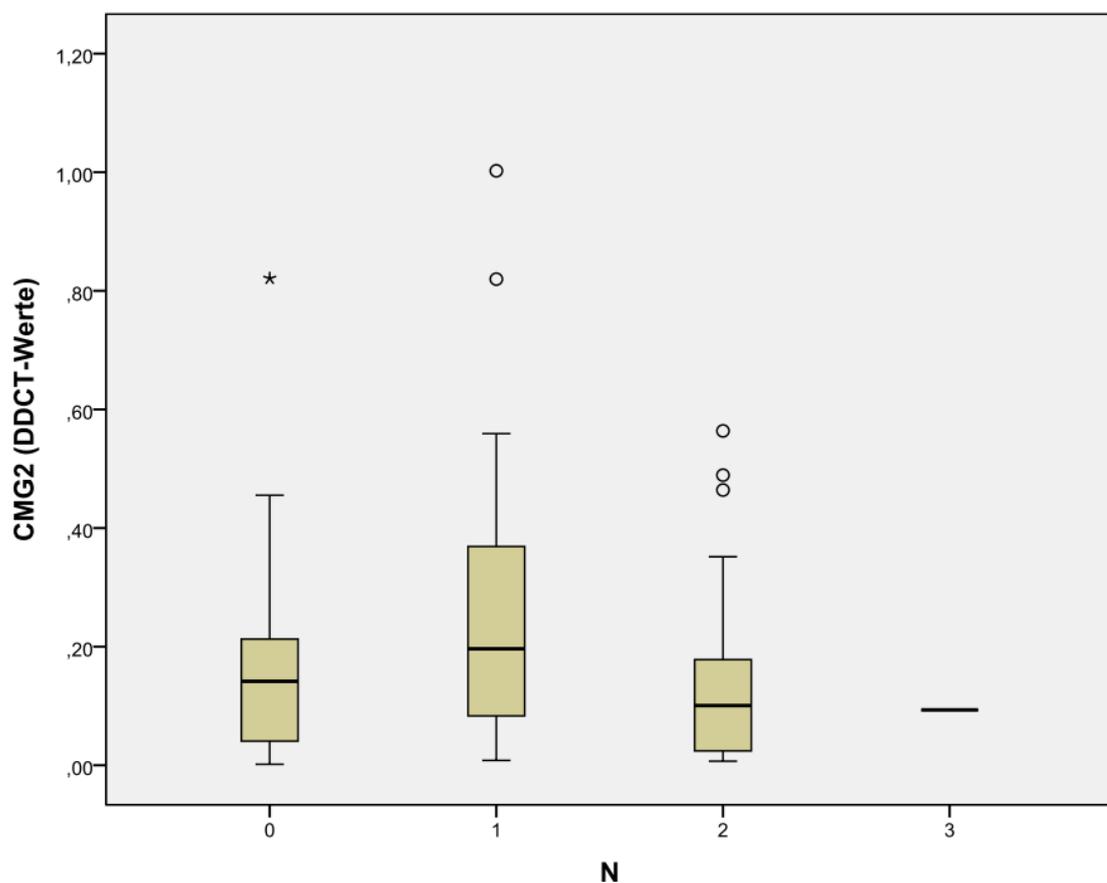


| T-Stadium | n | Mittelwert CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Median CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Maximaler CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Minimaler CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte |
|-----------|----|--|--|---|---|
| T1 | 7 | 0,12 | 0,08 | 0,46 | 0,00 |
| T2 | 19 | 0,23 | 0,17 | 0,82 | 0,02 |
| T3 | 4 | 0,26 | 0,11 | 0,82 | 0,01 |
| T4 | 31 | 0,17 | 0,11 | 1,00 | 0,01 |
| T gesamt | 61 | 0,19 | 0,12 | 1,00 | 0,00 |

Bei 62 Proben wurden die CMG2 $\Delta\Delta$ CT –Werte in Abhängigkeit vom ihrem N-Stadium untersucht. Die CMG2 $\Delta\Delta$ C_T–Werte lagen zwischen 0,00 und 1,00 mit einem Mittelwert von 0,19 und einem Median von 0,12. Für die CMG2 $\Delta\Delta$ C_T–Werte der einzelnen N-Stadien siehe Abbildung 7. Im Stadium N3 befand sich nur ein Patient. Diese eine Probe im Stadium N3 wurde

deshalb von den statistischen Berechnungen ausgeschlossen, um diese nicht zu verzerren. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Stadien N0 bis N2 nachgewiesen werden ($p=0,23$; Kruskal-Wallis-Test). Unter Berücksichtigung der einen Probe im Stadium N3 ist $p=0,38$; Kruskal-Wallis-Test).

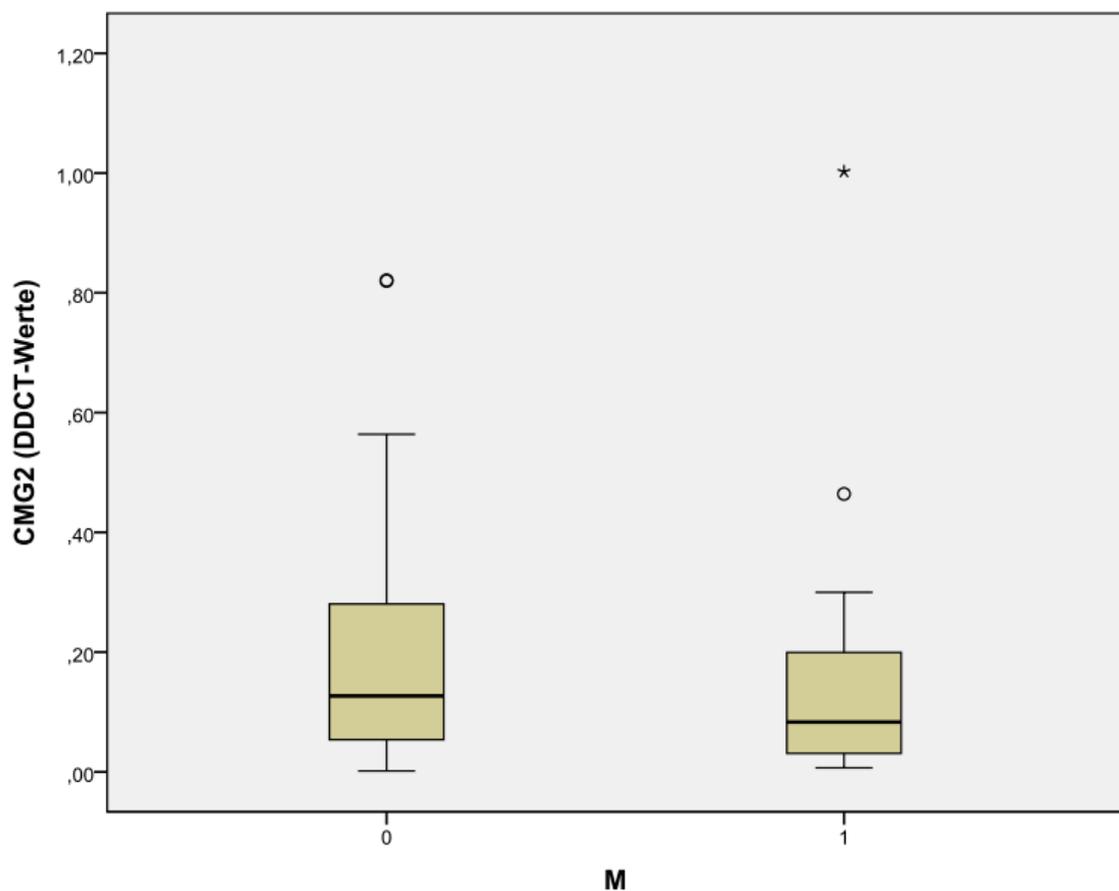
Abbildung 7: Box-Plot-Analyse zur Verteilung der CMG2-mRNA-Expression ($n= 62$) in Abhängigkeit vom N-Stadium. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den N-Stadien ($p=0,23$; Kruskal-Wallis-Test).



| N-Stadium | n | Mittelwert CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Median CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Maximaler CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Minimaler CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte |
|-----------|----|--|--|---|---|
| N0 | 20 | 0,18 | 0,14 | 0,82 | 0,00 |
| N1 | 13 | 0,30 | 0,17 | 1,00 | 0,01 |
| N2 | 28 | 0,14 | 0,10 | 0,56 | 0,01 |
| N3 | 1 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,09 |
| N gesamt | 62 | 0,19 | 0,12 | 1,00 | 0,00 |

Von 58 Proben wurde der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Wert auf die Abhängigkeit vom M-Stadium untersucht. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte lagen zwischen 0,00 und 1,00 mit einem Mittelwert von 0,19 und einem Median von 0,13. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte für das Stadium M0 lagen zwischen 0,00 und 0,82 mit einem Mittelwert von 0,20 und einem Median von 0,13. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte für das Stadium M1 lagen zwischen 0,00 und 1,00 mit einem Mittelwert von 0,18 und einem Median von 0,08. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Stadien M0 und M1 nachgewiesen werden ($p=0,49$; Mann-Whitney-U-Test).

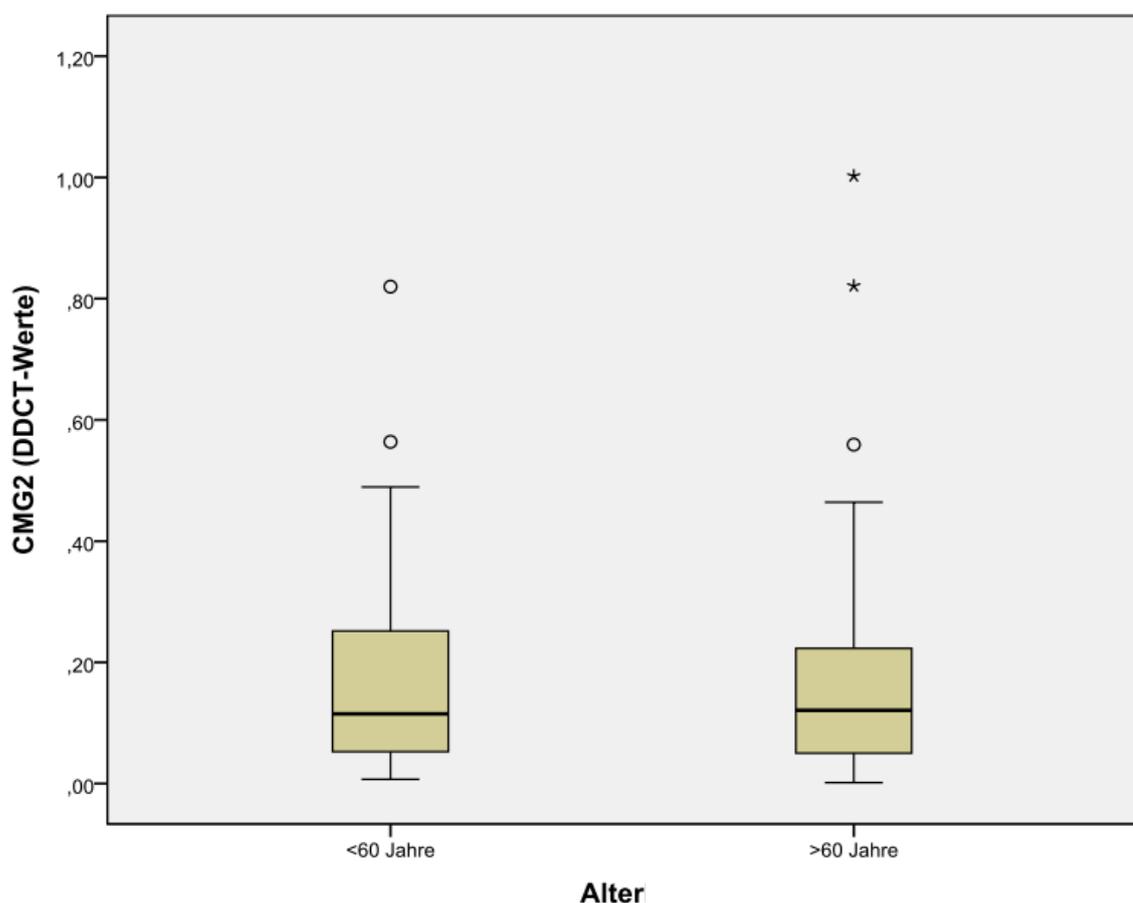
Abbildung 8: Box-Plot-Analyse zur Verteilung der CMG2-mRNA-Expression ($n=58$) in Abhängigkeit vom M-Stadium. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Stadien M0 und M1 ($p=0,49$; Mann-Whitney-U-Test).



| M-Stadium | n | Mittelwert CMG2 $\Delta\Delta C_T$ - Werte | Median CMG2 $\Delta\Delta C_T$ - Werte | Maximaler CMG2 $\Delta\Delta C_T$ - Werte | Minimaler CMG2 $\Delta\Delta C_T$ - Werte |
|-----------|----|--|--|---|---|
| M0 | 39 | 0,20 | 0,13 | 0,82 | 0,00 |
| M1 | 19 | 0,18 | 0,08 | 1,00 | 0,01 |
| M gesamt | 58 | 0,19 | 0,13 | 1,00 | 0,00 |

Von 70 Patienten wurden die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte mit dem Altersmedian bei Operation von allen 115 Proben verglichen. Der Median lag bei 59 Jahren (n=115). Der Mittelwert der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte für die 70 Patienten, bei denen Überlebenszeiten vorlagen, liegt bei 0,18 und der Median bei 0,12, mit einem minimalem $\Delta\Delta C_T$ -Werte von 0,00 und einem Maximum von 1,00. Die Patienten wurden abhängig von ihrem Alter in Gruppen größer als (n=50) oder kleiner/gleich (n=20) Altersmedian aufgeteilt. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte für die Gruppe >60 Jahre lagen zwischen 0,00 und 1,00 mit einem Mittelwert von 0,18 und einem Median von 0,12. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte für die Gruppe <60 Jahre lagen zwischen 0,01 und 0,82 mit einem Mittelwert von 0,19 und einem Median von 0,12. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in den CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werten zwischen den beiden Altersgruppen festgestellt werden (p=0,85; Mann-Whitney-U-Test)

Abbildung 9: Box-Plot-Analyse zur Verteilung der CMG2-mRNA-Expression (n=70) aufgeteilt in zwei Gruppen, größer (n=50) und kleiner (n=20) als der Altersmedian (~60 Jahre). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppe festgestellt werden (p=0,85; Mann-Whitney-U-Test).



| Alter | n | Mittelwert CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Median CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Maximaler CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte | Minimaler CMG2 $\Delta\Delta$ CT -Werte |
|---------------------------|----|--|--|---|---|
| <60 Jahre | 20 | 0,19 | 0,12 | 0,82 | 0,01 |
| >60 Jahre | 50 | 0,18 | 0,12 | 1,00 | 0,00 |
| Patienten jeden Alters | 70 | 0,18 | 0,12 | 1,00 | 0,00 |

3.4 Bivariate Korrelationsanalysen mit klinischen und demografischen Parametern

Die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho oder auch Rangkorrelation bezeichnet, ist eine Maß für den monotonen Zusammenhang zwischen zwei Variablen, bei denen es sich um qualitative Merkmale handeln darf. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den $\Delta\Delta$ C_T-Werten des CMG2 (n=70) und dem Alter der Patienten bei OP (n=70) (Korrelationskoeffizient=-0,08; p=0,50). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte zwischen den $\Delta\Delta$ C_T-Werten des CMG2 (n=70) und der mRNA-Expression von HIF-1 α (n=70) gezeigt werden (Korrelationskoeffizient=0,38; p=0,001). Zwischen den $\Delta\Delta$ C_T-Werten des CMG2 (n=70) und dem PL1 in Kopien/Kopien HPRT-Wert (n=70) konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden (Korrelationskoeffizient=-0,53; p=0,000002). Zwischen den $\Delta\Delta$ C_T-Werten des CMG2 (n=70) und der CMG2-Spleißvariante B (n=59) konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden (Korrelationskoeffizient=0,45, p=0,0004).

Tabelle 3: Die Tabelle zeigt ausgewählte Parameter und Werte aus der bivariaten Korrelation nach Spearman-Rho.

| | | Alter OP | HIF-1 α | Piwi-like 1 mRNA- Expression | CMG2- Spleißvaria nte B |
|---|------------------------------|----------|----------------|------------------------------------|-------------------------------|
| CMG2 ($\Delta\Delta$ C _T -Werte) | Korrelations- koeffizient | -0,08 | 0,38 | -0,53 | 0,45 |
| | Sig. (2-seitig) | 0,50 | 0,001 | 0,000002 | 0,0004 |
| | N | 70 | 70 | 70 | 59 |

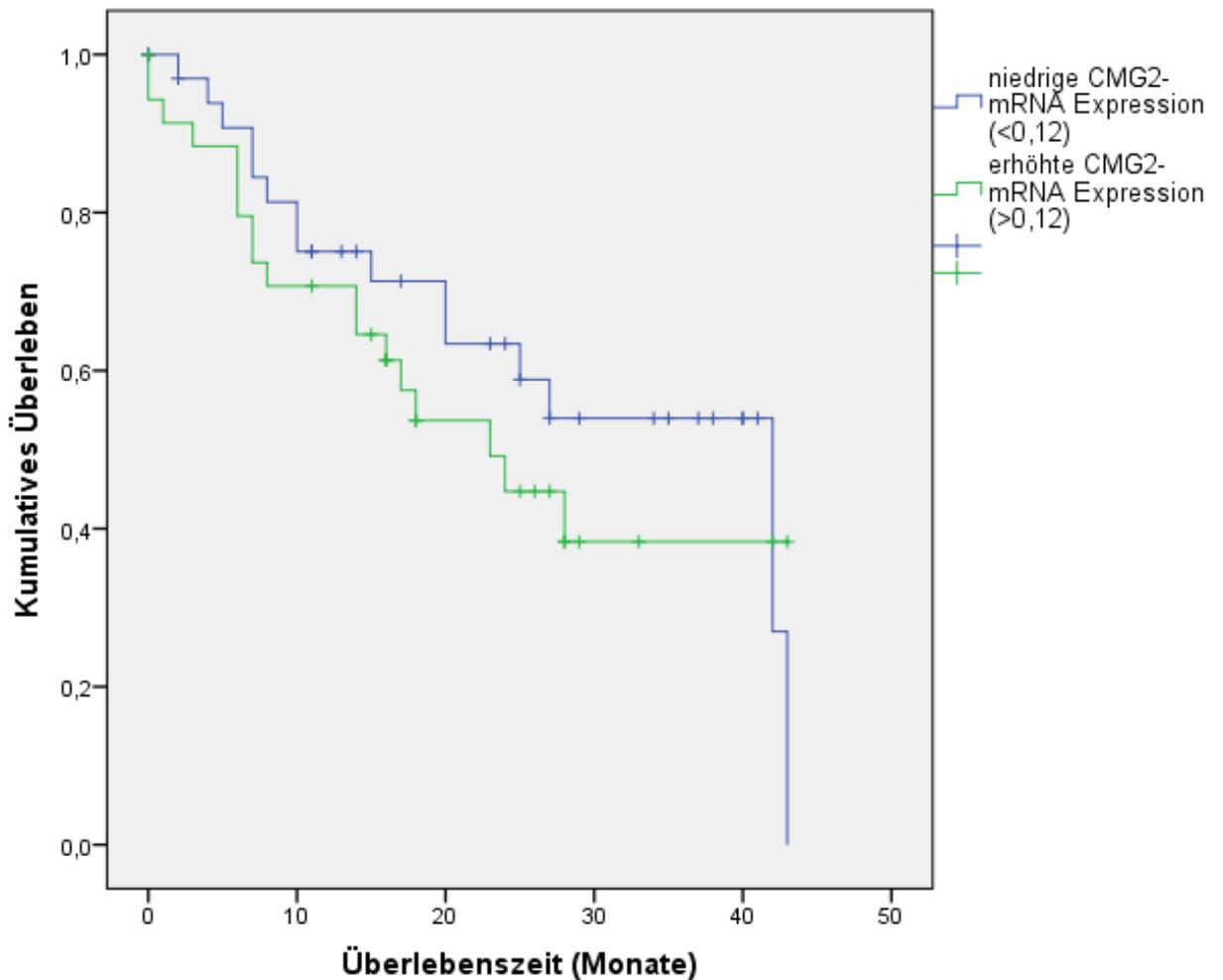
3.5 Überlebensanalysen

In einer Überlebenszeitanalyse sollen die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte aus dem Tumorgewebe der Patienten auf eine Korrelation mit dem Überlebenszeitraum hin untersucht werden. Für Untersuchung der Überlebensfunktion nach der Kaplan-Meier-Methode wurde für die Patienten, bei denen Informationen über den Überlebenszeitraum vorlagen ($n=70$), der Median der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte berechnet (0,12). Dieser diente als Schwellenwert. Der zugrunde gelegte Überlebenszeitraum erstreckt sich vom Tag der Operation bis zum Sterbedatum. Alle Patienten, von denen keine Daten zum Überlebenszeitraum vorlagen oder nicht nachverfolgt wurde, wurden vor der Kaplan-Meier-Analyse zensiert. Die Patienten ($n=70$) wurden nun in zwei Gruppen aufgeteilt, abhängig davon, ob ihre CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte über ($n=35$, Gruppe 1) oder unter ($n=35$, Gruppe 0) den CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Median (Schwellenwert) lagen. Die mittlere Überlebenszeit lag in Gruppe 1 bei 24,4 Monaten mit einem 95%-Konfidenzintervall von 18,6 bis 30,2 Monaten. Die mediane Überlebenszeit für Gruppe 1 lag bei 23,0 Monate mit einem 95%-Konfidenzintervall von 13,1 bis 32,9 Monaten.

Die mittlere Überlebenszeit lag in Gruppe 0 bei 29,2 Monaten mit einem 95%-Konfidenzintervall von 23,4 bis 35,0 Monaten. Die mediane Überlebenszeit für Gruppe 0 lag bei 42,0 Monaten mit einem 95%-Konfidenzintervall von 21,4 bis 62,6 Monaten. Im Log-Rank-Test der Überlebenszeitanalyse zeigte sich keine statistisch signifikante Beziehung zwischen dem CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Wert und der Überlebenszeit ($p=0,42$). In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass sich Patienten mit einer niedrigen CMG2-mRNA-Expression bis zum 42. Monat eine leichte Tendenz für ein längeres Überleben haben.

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse

Die CMG2-mRNA-Expression wurde auf ihre Korrelation zur Überlebenszeit analysiert. Die blaue Linie bezeichnet CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte, die niedriger sind als der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Median, die grüne Linie höhere CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte. Die Abszisse gibt das Überleben der Patienten in Monaten an, die Ordinate entspricht dem kumulativen Überleben der Patientengruppe in Prozent, wobei 1,0 = 100% entspricht.

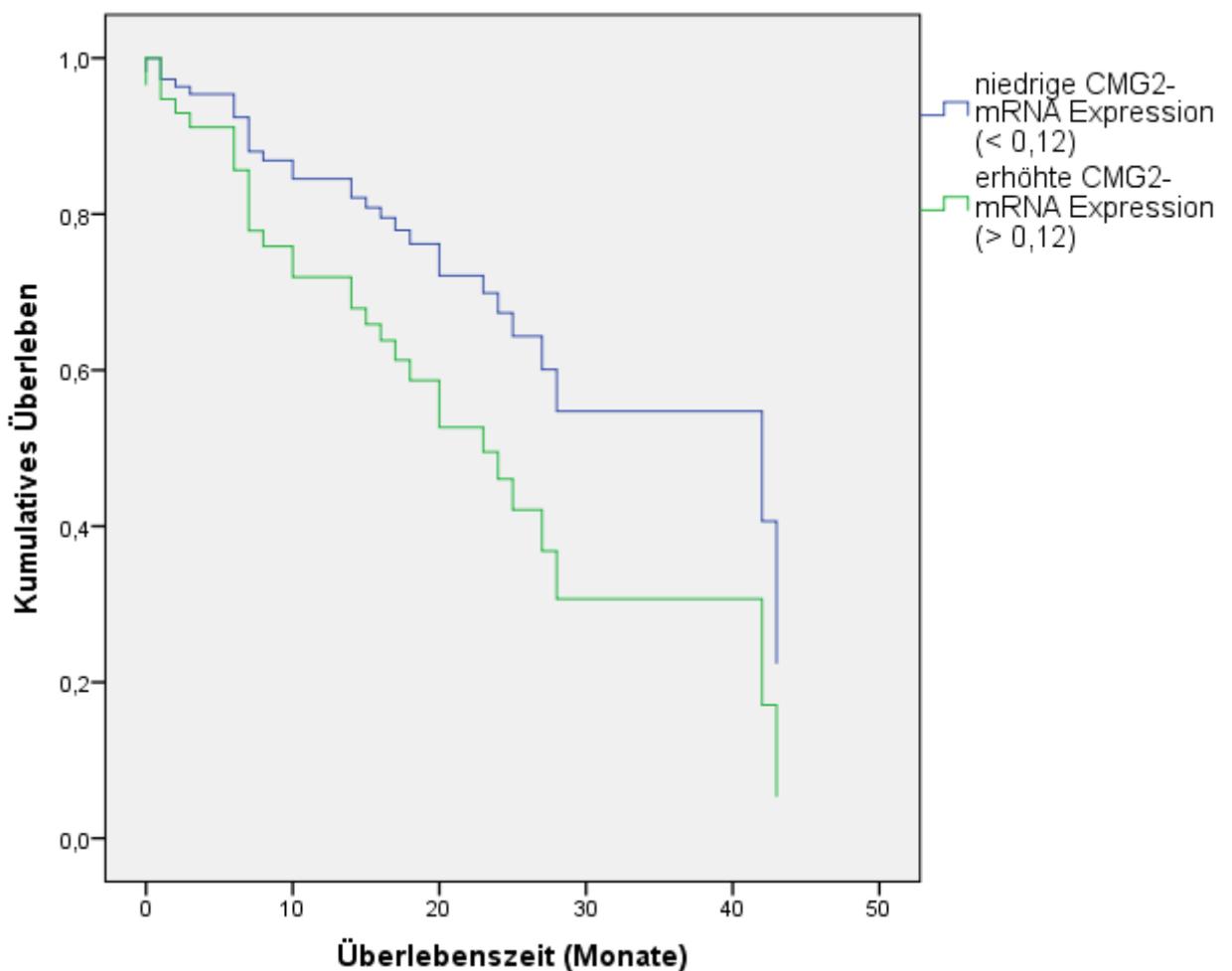


| CMG2 mRNA- Expression | Mittelwert Überlebenszeit | | | Median Überlebenszeit | | |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------|----------------|-----------------------|------------------------|----------------|
| | | 95%-Konfidenzintervall | | | 95%-Konfidenzintervall | |
| | | Untere Grenze | Obere Grenze | | Untere Grenze | Obere Grenze |
| Niedrig (<0,12) | 29,2 Monate | 23,4 Monate | 35,0 Monate | 42,0 Monate | 21,4 Monate | 62,6 Monate |
| Erhöht (>0,12) | 24,4 Monate | 18,6 Monate | 30,2 Monate | 23,0 Monate | 13,1 Monate | 32,9 Monate |

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse ist eine Überlebenszeitanalyse, die verschiedene klinische Parameter, wie TNM-Stadien und auch CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte, adjustiert mit der Überlebenszeit der Patienten korrelieren kann. Es konnten 57 Proben für die Analyse herangezogen werden. Die Patienten (n=57) wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, abhängig

davon, ob ihr CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Wert über (n=32, Gruppe 1) oder unter (n=25, Gruppe 0) den CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Median (Schwellenwert) lag. Die multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde in diesem Fall nach Tumorstadium (T), Lymphknotenstatus (N) und Metastasierung (M) adjustiert. Die Analyse ergab, dass Patienten mit einer erhöhten CMG2-mRNA Expression ($> 0,12$; $\Delta\Delta C_T$ -Wert) ein 1,96fach erhöhtes relatives Risiko aufwiesen, an dem Tumor zu versterben ($p = 0,11$; RR = 1,96). Die Funktion zeigt eine Tendenz zu einem längeren Überlebenszeitraum für Patienten mit niedrigen CMG2-mRNA-Expression bis zum 42. Monat.

Abbildung 11: Überlebensfunktion der multivariaten Cox-Regressionsanalyse adjustiert nach Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Metastasierung. Die blaue Linie bezeichnet niedrige CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte, die grüne höhere CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte als der Schwellenwert.



4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die CMG2-mRNA-Expression in Proben von Mundhöhlenkarzinomen und dem teilweise korrespondierenden Normalgewebe zu vermessen. Anschließend wurden mittels statistischer Analysen, die klinischen und patientenbezogenen Parametern auf einen potenziellen Einfluss der CMG2-mRNA-Expression auf die Diagnose und Prognose hin überprüft. Die Vermessung der CMG2-mRNA-Expression erfolgte durch die quantitative Real-Time-PCR. Für die statistischen Analysen wurden Methoden zur bivariaten Korrelation nach Spearman-Rho, Kruskal-Wallis und Mann-Whitney herangezogen. Zur Analyse der Überlebenszeit wurde die Methode nach Kaplan-Meier und die multivariate Cox-Regressionsanalyse genutzt. Zur Überprüfung der diagnostischen Wertigkeit der CMG2-mRNA-Expression in Bezug auf die Differenzierung zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe wurde die ROC-Analyse genutzt.

4.1 CMG2-mRNA-Expression im Mundhöhlenkarzinom

Ziel dieser Arbeit war es, die CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomzellen auf ihre diagnostische Tauglichkeit und Anwendbarkeit als Biomarker für Mundhöhlenkarzinome zu überprüfen. Es war zu erwarten, dass CMG2 in allen Proben (n=115) zur Expression kommt und gemessen werden konnte, denn CMG2 kommt in einer Vielzahl von Geweben und Tumoren vor, außer im Gehirn und Thymus (Scobie et al. 2003). Zur Analyse der Daten und um einen möglichen Zusammenhang oder Unterschiede zwischen der CMG2-mRNA-Expression und dem gesunden Gewebe und Mundhöhlenkarzinomen darzustellen, wurden verschiedene statistische Methoden verwendet. Die Box-Plot-Analyse zeigt visuell keine deutlichen Unterschiede in der Verteilung der Werte. Der durchgeführte t-test zeigte eine leichte, aber statistisch nicht signifikante, Tendenz ($p=0,07$) der Variablen, nicht gleich verteilt zu sein. Der χ^2 -Test und der Mann-Whitney-U-Test zeigen, dass sich die CMG2-mRNA-Expressionen in Normalgewebe und Tumorgewebe nicht signifikant unterscheiden ($p=0,48$ χ^2 -Test nach Pearson und $p=0,34$; Mann-Whitney-U-Test) (Tabelle 2).

Die Vermessung der CMG2-mRNA-Expression in Normalgewebe und Tumorgewebe von Mundhöhlenkarzinompatienten ergab, dass CMG2 kein signifikanter Biomarker für Mundhöhlenkarzinome ist.

Die Spanne zwischen den Minimal- und Maximalwerten der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte im Normalgewebe ist geringer als beim Tumorgewebe (Abbildung 3), kann aber der geringeren

Anzahl von Normalgewebe (n=27) gegenüber dem Tumorgewebe (n=88) geschuldet sein. Eine weitere Studie mit einer größeren Kohorte mit gleich vielen Normal- und Tumorgewebeproben könnte die Ergebnisse bestätigen.

Eine weitere Frage war, ob es Unterschiede in der Expression von CMG2 in Mundhöhlenkarzinomen zwischen Frauen und Männern gibt. Die graphische Darstellung der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte im Box-Plot getrennt nach Männer und Frauen zeigt eine relativ gleiche Verteilung und Variabilität zwischen den Geschlechtern (siehe Abbildung 5). Der Mann-Whitney-U-Test konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Verteilung der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte zwischen Männern und Frauen feststellen. Damit besteht kein Unterschied in der CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomen zwischen Männern und Frauen. In dieser Arbeit waren die Anzahl der Proben von Frauen (n=15) gegenüber den Proben von Männern (n=55) unterrepräsentiert.

Es wurde außerdem untersucht, ob eine Korrelation zwischen der CMG2-mRNA-Expression und den TNM-Stadien besteht.

Die Visualisierung der Verteilung der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte für die T-Stadien lässt Unterschiede in der Verteilung der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte erkennen. Dies ist aber der unterschiedlichen Anzahl von Proben der einzelnen Stadien geschuldet (Abbildung 6). Der Kruskal-Wallis-Test für die vier T-Stadien ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Verteilung der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte ($p=0,20$). Damit besteht kein Zusammenhang zwischen der Größe von Mundhöhlenkarzinomen und der CMG2-mRNA-Expression.

Die Auswertung des Box-Plot für die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte der N-Stadien des Tumors ergab ein ähnliches Bild. Durch die unterschiedliche Zahl von Proben in den einzelnen N-Stadien, scheinen die Werte nicht gleich verteilt (Abbildung 7). Die Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt keine Korrelation der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte zu den N-Stadien ($p=0,23$). Es gibt also keinen Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenbefall und der CMG2-mRNA-Expression bei Mundhöhlenkarzinomen.

Sehr ähnlich präsentiert sich die Box-Plot-Analyse zu den CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werten in Abhängigkeit vom M-Stadium (Abbildung 8). Die Graphik suggeriert eine leicht weiter gefächerte Verteilung der CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte im Stadium M0 als im Stadium M1, aber der Mann-Whitney-U-Test stellt aber keinen signifikanten Unterschied fest ($p=0,49$). Damit besteht keine Korrelation der CMG2-mRNA-Expression zu den TNM-Stadien.

Da in Weichteilsarkomen und Mammakarzinomen eine verringerte CMG2-mRNA-Expression im Gewebe mit einem verringerten Überleben der Patienten korreliert ist (Greither 2005; Ye et al.

2014b), wäre zu erwarten gewesen, dass Proben aus Mundhöhlenkarzinomen mit höheren TNM-Stadien eine geringere CMG2-mRNA-Expression aufweisen würden. Ein Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse zur Hypothese könnte die Analyse der CMG2-mRNA-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten sein, da diese unterschiedliche phänotypische Merkmale und Regulationswege aufweisen.

Die Analyse der Variabilität der $\Delta\Delta C_T$ -Werte des CMG2 unter und oberhalb des Altersmedians mittels Box-Plot (Abbildung 9) ergab keine Abweichungen. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Verteilung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte des CMG2 in den beiden Altersgruppen. Damit besteht keine Korrelation zwischen dem Alter des Patienten und der CMG2-mRNA-Expression im Tumorgewebe.

4.2 Bivariate Korrelationen der CMG2-mRNA-Expression mit klinischen und demografischen Parametern

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomzellen statistisch analysiert und auf Beziehungen zu verschiedenen klinischen und patientenbezogenen Parametern untersucht werden, die nicht gleich verteilt sind.

Die Analyse nach Spearman-Rho soll eine Korrelation zwischen dem $\Delta\Delta C_T$ -Werte des CMG2 und dem Alter der Patienten bei OP untersuchen. Der Korrelationskoeffizient beträgt -0.082 bei einer Signifikanz von 0,502. Damit besteht keine Beziehung zwischen dem Alter und der CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomen.

Bei der Bestimmung des Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho zeigt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang (Korrelationskoeffizient=0,38, $p=0,001$) zwischen den $\Delta\Delta C_T$ -Werten des CMG2 ($n=70$) und der mRNA-Expression des HIF-1 α ($n=70$).

Hypoxie-induzierte Faktoren (HIF) sind Transkriptionsfaktoren, die auf eine verminderte Sauerstoffversorgung der Zelle reagieren (Smith et al. 2008). Es existieren drei bekannte Isoformen des Hypoxie-induzierten Faktors: HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α mit jeweils einer β -Untereinheit. In festen Tumoren entsteht eine Hypoxie durch ein Ungleichgewicht zwischen Tumorwachstum und Angiogenese. Eine Hypoxie in festen Tumoren ist einer hohen Aggressivität, geringer Sensibilität für Strahlen- und Chemotherapie vergesellschaftet. Diese führt zu einer schlechten Prognose für den Patienten (Patiar und Harris 2006). HIF-1 α reagiert

auch in Tumoren auf Hypoxie und spielt eine Schlüsselrolle in der Anpassung des Tumors an den Sauerstoffmangel. Dabei werden Gene aktiviert, die für Angiogenese, Zellproliferation, Zellüberleben und Migration wichtig sind (Patiar und Harris 2006). 2012 zeigten Eckert *et al.*, dass Patienten, die eine hohe Expression von HIF-1 α in Mundhöhlenkarzinomen aufweisen, eine schlechtere Überlebensprognose haben (Eckert *et al.* 2012). Koukourakis *et al.* zeigten 2006, dass eine Überexpression von HIF-1 α stark mit einer Resistenz von Tumoren in Hals-Kopf-Bereich gegenüber einer Strahlentherapie einhergeht und einer schlechten Prognose von Patienten durch einen aggressiveren Tumortyp vergesellschaftet ist (Koukourakis *et al.* 2006). Das Mundhöhlenkarzinom ist ein bösartiger Tumor mit einer schlechten Prognose. Es ist also plausibel, dass auch in den vorliegenden Proben von Mundhöhlenkarzinomzellen HIF-1 α zur Expression kommt. Die CMG2-mRNA-Expression ist mit der mRNA-Expression von HIF-1 α signifikant korreliert. Allerdings hat die CMG2-mRNA-Expression keinen Einfluss auf das Überleben der Patienten (Abbildung 10). Es wäre nach den vorangegangenen Studien zu erwarten gewesen, dass die CMG2-mRNA-Expression einen negativen Einfluss auf die Prognose hätte, so wie das HIF-1 α . Nur in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigt sich ein eventueller Zusammenhang (Abbildung 11). Patienten mit hoher CMG2-mRNA-Expression in ihren Mundhöhlenkarzinomzellen haben ein fast doppelt so hohes relatives Risiko (RR = 1,96) an dem Tumor früh zu versterben, das allerdings nicht signifikant ($p=0,11$). Eine Erklärung hierfür kann der statistisch signifikante Zusammenhang zwischen mRNA-Expression des CMG2 und der mRNA-Expression des HIF-1 α sein.

Die statistische Auswertung ergab, dass zwischen den $\Delta\Delta C_T$ -Werten des CMG2 ($n=70$) und dem CMG2-Spleißvariante B ($n=59$) ein signifikanter Zusammenhang besteht ($r_s=0,45$, $p=0,0004$). Meyer konnte 2014 in ihrer Bachelorarbeit zeigen, dass neben den bekannten Isoformen des CMG2 zwei weitere Varianten existieren: Spleißvariante A, der ein Teil der VWA/1-Domäne fehlt und Spleißvariante B, die keine Transmembrandomäne enthält. Die Expression der Spleißvariante B konnte in Mundhöhlenkarzinomen nachgewiesen werden, allerdings nur in 26% der Proben. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Überleben von Mundhöhlenkarzinompatienten und der Expression der Spleißvariante B des CMG2 gezeigt werden. Aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne wird vermutet, dass es sich nicht um ein Membranprotein handelt, sondern um eine sekretierte Isoform (Jutta Meyer 2014). Der genaue Zusammenhang der beiden Isoformen bleibt unklar, denn die physiologische Funktion des CMG2 ist noch nicht ausreichend charakterisiert. Der Zusammenhang zwischen der *full-length*-Variante des CMG2 und der Spleißvariante B sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Ein deutlicher statistisch signifikanter Zusammenhang konnte zwischen den $\Delta\Delta C_T$ -Werte des CMG2 (n=70) und dem Piwi-like 1 in Kopien/Kopien HPRT-Wert (n=70) gezeigt werden (Korrelationskoeffizient=-0,53; p=0,000002).

Die Piwi (P-element induced wimpy testis)-Genfamilie ist eine Subgruppe der Argonaute-Proteinfamilie. Für die Argonaute-Familie ist charakteristisch, dass sie eine PAZ (Piwi, Argonaut und Zwille) und eine PIWI-Domäne aufweisen (Cerutti et al. 2000). Zum ersten Mal wurde das Piwi-Gen in der Gattung *Drosophila* identifiziert, wo sie für die asymmetrische Teilung von Keimbahnzellen und Erhaltung der Tochter-Keimbahnzellen benötigt werden (Cox et al. 1998; Lin und Spradling 1997). Das Piwi-1-Gen ist lokalisiert auf dem Chromosom 12 zwischen q24.2 und q24.32 (Sharma et al. 2001). Es sind bisher vier Mitglieder der humanen Piwi-Genfamilie beschrieben worden: PIWIL1/HIWI, PIWIL2/HILI, PIWIL3, und PIWIL4/HIWI2. Alle vier Mitglieder der Piwi-Familie kommen hauptsächlich im Hoden zur Expression (Sasaki et al. 2003). Qiao konnte 2002 zeigen, dass Hiwi zwar im Hoden exprimiert wird, aber ausschließlich in Spermatozyten und nicht in Spermatogonien (Qiao et al. 2002). Darüber hinaus kommen die Vertreter der Piwi-Familie in Keimzellen, adulten somatischen Stammzellen, humanen hämatopoetischen Stammzelle und mesenchymalen Stammzellen zur Expression (Sasaki et al. 2003; Sharma et al. 2001; Wu et al. 2010). Die Piwi-Familie spielt eine Rolle in der Selbsterneuerung von Stammzellen und Teilung der Keimbahnzellen-Stammzellen im RNA silencing und translationaler Regulation und in Transposons in verschiedenen Organismen, darunter Menschen, Mäuse, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* und *Drosophila melanogaster* (Wang et al. 2011; Qiao et al. 2002; Cox et al. 1998; Carmell et al. 2002). Erhöhte Expressionen von Hiwi korrelieren mit der Entstehung von Seminomen, einen malignem Keimzelltumor dessen Ursprung die Spermatogonien sind (Qiao et al. 2002). Erhöhte Proteinexpressionen von Piwi-like in Seminomen, Ösophaguskarzinomen und Gliomen gehen ebenfalls mit einer schlechten Prognose einher (Qiao et al. 2002). Liu *et al.* konnten 2005 erhöhte Piwi-like-1-Proteinexpression in Magenkarzinomen detektieren. Sie fanden außerdem heraus, dass eine erhöhte Piwi-like-1-mRNA-Expression mit einer erhöhten Proliferation von Magenkarzinomzellen im Zusammenhang steht und auch mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert ist (Liu et al. 2006). Ebenfalls hohe Piwi-like-Expressionen in Adenokarzinomen des Pankreas, aber auch niedrige Expressionen, sind mit einer schlechten Prognose für das Überleben der Patienten vergesellschaftet (Grochola et al. 2008). Taubert *et al.* fanden 2007 heraus, dass erhöhte Expressionen des Piwi-like 1 in Weichteilsarkomen signifikant mit einem schlechten Patientenüberleben assoziiert sind (Taubert et al. 2007). Siddiqi *et al.* konnten 2012 zeigen, dass das humane orthologe Gen zum Piwi, das Hiwi (human Piwi) die

Genese von Sarkomen fördert und die Differenzierung der Tumorzellen hemmt. Es konnte festgestellt werden, dass Hiwi-Expression direkt mit der DNA-Methylierung korreliert. Eine induzierte Herunterregulierung von Hiwi in humanen Sarkomzellen führte zu einer verminderten DNA-Methylierung, hemmte das Tumorstadium und führte zu einer verbesserten Differenzierung der Tumorzellen (Siddiqi et al. 2012).

Nach den vorangegangenen Studien sollte man annehmen, da Piwi-like 1 ein schlechter Prognosefaktor für das Überleben von Patienten und einer Tumorstadium ist und mit einer niedrigen CMG2-mRNA-Expression korreliert, dass eine niedrige CMG2-mRNA-Expression in Tumorgewebe mit einem schlechteren Überleben der Patienten assoziiert ist (Greither 2005; Ye et al. 2014b). Dies ist aber nicht der Fall. Weder Patienten mit Expressionen von CMG2 in Mundhöhlenkarzinomen über- noch unterhalb dem Median haben eine statistisch signifikant schlechteres Überleben in der Kaplan-Meier-Analyse (Abbildung 10). Allerdings zeigt sich in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse, dass Patienten mit hoher CMG2-mRNA-Expression ein doppelt so hohes relatives Risiko ($RR=1,96$) aufweisen, an einen Tumor zu versterben, im Vergleich zu Patienten mit niedrigen CMG2-mRNA-Expressionen (Abbildung 11), was allerdings statistisch nicht signifikant ist ($p=0,11$). Der Zusammenhang zwischen der Piwi-like 1-mRNA und CMG2-mRNA-Expression sollte in einer Studie mit größeren Fallzahlen und längerem Beobachtungszeitraum genauer untersucht werden.

4.3 Überlebenszeitanalyse

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die gemessenen CMG2-mRNA-Expressionen in den Tumorzellen einen Einfluss auf die Prognose bzw. das Überleben der Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen haben. Bisher wurde der Einfluss der CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomzellen auf die Prognose und das Überleben von Patienten nicht untersucht. Für die Überlebenszeitanalysen wurden die Kaplan-Meier-Methode und die multivariate Cox-Regressionsanalyse genutzt.

In der Überlebenszeitanalyse nach der Kaplan-Meier-Methode zeigt sich keine Korrelation zwischen den gemessenen CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werten, die für die CMG2-mRNA-Expression stehen, und der Überlebenszeit der Patienten ($p=0,419$, Log-Rank-Test) (siehe Abbildung 10). Zwar zeichnete sich am Beginn des Beobachtungszeitraumes ein besseres Überleben für Patienten mit einer niedrigeren CMG2-mRNA-Expression im Tumor ab, jedoch sind die Werte für das

Überleben der beiden Patientengruppen ab dem 42. Monat des Beobachtungszeitraumes wieder gleich schlecht. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass zum Ende des Beobachtungszeitraumes die Patientengruppe zu klein wurde, sodass das Ausscheiden weniger Patienten in der Gruppe mit einer niedrigen CMG2-mRNA-Expression im Tumor zu einer starken Veränderung in der Überlebensanalyse führte. Eine Untersuchung der erzielten Ergebnisse in einer größeren Patientenkohorte könnte robustere statistische Ergebnisse liefern.

Ein anderes Bild zeigt die multivariate Cox-Regressionsanalyse (siehe Abbildung 11). In ihr wurden die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte, nach klinischen Parametern adjustiert und mit den Überlebenszeiten der Patienten korreliert. Die Analyse ergab, dass Patienten mit hoher CMG2-mRNA-Expression in ihren Mundhöhlenkarzinomzellen ein fast doppelt so hohes relatives Risiko (RR 1,96) haben früh an den Tumor zu versterben, wenn auch nur mit einem Trend zur Signifikanz ($p=0,11$). Damit hätte die CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomzellen einen negativen prognostischen Einfluss auf das Überleben der Patienten. Da dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant ist, sollten Studien hierzu mit größeren Patientenkohorten durchgeführt werden, und mit längeren Beobachtungszeiträumen, um das Ergebnis gegebenenfalls zu verifizieren.

In der Bachelorarbeit von Jutta Meyer aus dem Jahre 2014 konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen der sezernierten CMG2-Isoform 322 im Blutserum mit einem geringeren Überlebenszeitraum korreliert (Jutta Meyer 2014). Marios Marcou konnte 2014 in seiner bisher noch unveröffentlichten Dissertation zeigen, dass eine signifikante positive Korrelation zwischen einer erhöhten Expression der sezernierten CMG2-Isoform 322 im Blutserum mit dem Vorhandensein eines metastasierten Prostatakarzinoms und seiner Progression und damit auch mit der Prognose besteht (Marios Marcou 2014). Greither und Kollegen konnten zeigen, dass das Risiko an einem Weichteilsarkom zu versterben bei niedriger CMG2-mRNA-Expression in den Tumorzellen ca. um das 3fache erhöht ist. Damit ist das CMG2 ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben von Patienten mit Weichteilsarkomen (Greither 2005). Ye *et al.* fanden heraus, dass CMG2 einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von Mammakarzinomzellen hat. Eine niedrigere Expression von CMG2 in Mammakarzinomzellen war mit einer Progression der Erkrankung und einer schlechteren Prognose assoziiert (Ye *et al.* 2014b).

Aus diesen Untersuchungen ergab sich die Hypothese, dass eine Assoziation zwischen einer hohen CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomzellen und einem kürzeren Überleben

besteht. Dies konnte in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse nicht gezeigt werden. Ursächlich hierfür könnten die unterschiedlichen Entitäten der Tumore sein. Gegensätzlich zu vorangegangenen Studien von Greither und Ye *et al.* ist das Ergebnis der multivariaten Cox-Regressionsanalyse. Es ergibt sich ein negativer Einfluss hoher CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomzellen auf das Überleben der Patienten, auch wenn dieser nicht signifikant ist. Eine Erklärung könnte ebenfalls die unterschiedliche Entität des Tumors sein. Durch diesen Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CMG2-mRNA-Expressionen in den Mundhöhlenkarzinomzellen keinen Einfluss auf die Prognose bzw. das Überleben der Patienten mit Mundhöhlenkarzinom hat.

4.4 ROC-Analyse

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die CMG2-mRNA-Expressionen in Mundhöhlenkarzinomzellen auf ihre diagnostische Tauglichkeit zu untersuchen. Die CMG2-mRNA-Expression in Geweben wurde in der Literatur bisher nicht auf ihre diagnostische Tauglichkeit überprüft. Dafür wurde die ROC-Analyse verwendet. Die CMG2 $\Delta\Delta C_T$ -Werte aller 115 Proben wurden nach ihrer Spezifität und 1-Sensitivität in ein Koordinatensystem aufgetragen. Die Kurve verläuft etwa in einer gedachten, durch die Mehrheit der Punkte verlaufenden Geraden. Diese ähnelt einer geraden Funktion vom Nullpunkt zum Ende der Skala bei 100% Spezifität (siehe Abbildung 4). Die CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlentumorzellen ist nach dieser Analyse nicht dazu geeignet, um zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe zu unterscheiden. Die errechnete Fläche unter der Kurve (AUC) beträgt 0,561 mit einer Signifikanz von $p=0,339$ bei einem 95%-Konfidenzintervall von 0,445 - 0,677. Damit ist, wenn man die Signifikanz vernachlässigt, die CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlentumorzellen nur unwesentlich besser dazu geeignet, zwischen Tumor- und Normalgewebe zu unterscheiden, als der Zufall. Damit kommt der CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlentumorzellen keine diagnostische Tauglichkeit zu und eignet sich nicht als diskriminanter Biomarker.

Das Ergebnis war nach Auswertung der vorangegangenen statistischen Untersuchungen zu erwarten und fügt sich in den Zusammenhang ein. Es wäre aber durchaus denkbar, dass Gewebeproben, die histologisch von Pathologen als Normalgewebe eingestuft wurde, Tumorzellen enthalten haben und deshalb ähnliche CMG2-mRNA-Expressionen in beiden Gewebearten gemessen wurden. Außerdem wäre es möglich, dass die

Mundhöhlenkarzinomzellen verschiedenste Mediatoren und Wachstumshormone sezernieren, die im umliegenden gesunden Gewebe zu einer höheren CMG2-mRNA-Expression führen. Zusammenfassend kann man auf Basis dieser Arbeit sagen, dass CMG2-mRNA Expressionen in Mundhöhlenkarzinomen nicht mit der Diagnose oder der Prognose der Patienten korreliert sind.

5 Zusammenfassung

263.900 Menschen erkranken schätzungsweise jährlich neu an einem Mundhöhlenkarzinom. 2008 starben 128.000 Menschen an dieser Tumorerkrankung (Jemal et al. 2011). Im Jahre 2008 machte das Mundhöhlenkarzinom etwa 4% aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus. Das entspricht etwa 13.000 Neuerkrankungen. Es ist die fünfthäufigste Tumorlokalisation beim Mann. Bei Frauen umfasst es 1,6% aller Krebsneuerkrankungen (Zentrum für Krebsregisterdaten). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Männern beträgt 44% und bei Frauen 59%. Das 5-Jahres-Überleben hat sich in den letzten Jahren kaum verändert (Zentrum für Krebsregisterdaten). Die Identifikation und Evaluierung neuer Prognosefaktoren und Tumormarker mit hoher Spezifität ist von großem Interesse, um die Therapie und Prognose zu verbessern. Das Capillary Morphogenesis Gen 2 (CMG2) wurde auf sein Potential als ein solcher Tumormarker oder Prognosefaktor hin untersucht.

CMG2 ist auf dem Chromosom 4q21 lokalisiert (Bell et al. 2001). Die genaue Funktion des CMG2 ist aktuell noch unzureichend charakterisiert. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass eine der Hauptfunktionen von CMG2 in der Unterstützung der Angiogenese liegt (Bell et al. 2001), da es für die Endothelproliferation während der Angiogenese notwendig ist (Reeves et al. 2010). Die Expression von CMG2 konnte in einer Vielzahl von Tumorzellen detektiert werden (Vargas et al. 2012) und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Neovaskularisation, die für das Wachstum von Tumoren ein bedeutender Faktor ist. Greither konnte 2005 zeigen, dass die CMG2-mRNA-Expression positiv mit dem Überleben der Patienten korreliert und ein unabhängiger prognostischer Faktor ist (Greither 2005). Ein Knockdown des CMG2 beeinträchtigte die Adhäsion von Prostatakarzinomzellen und führte zu einer erhöhten Invasivität des Tumors (Ye et al. 2014a). Eine verringerte Expression von CMG2 in Mammakarzinomzellen ist mit Fortschreiten der Erkrankung und einer schlechten Prognose assoziiert (Ye et al. 2014b). Die Blockierung des CMG2-Rezeptors inhibiert die Angiogenese um bis zu 60% und auch das Tumorwachstum um 40% *in vivo* (Rogers et al. 2007).

Ziel dieser Arbeit ist die CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomen zu vermessen und durch statistische Analyse der CMG2-mRNA-Expression zu klinischen (Tumorstadium, Metastasierung, Überlebenszeit, Tumorgröße) und patientenbezogenen Parametern wie Alter, Geschlecht, Überlebensanalysen und ROC-Analysen auf ihre diagnostische Tauglichkeit und prognostische Tauglichkeit zu überprüfen.

Mit der quantitativen RT-PCR und mit Hilfe der $\Delta\Delta$ CT -Methode konnte in allen 115 Proben der insgesamt 85 Patienten die CMG2-mRNA-Expression bestimmt und quantifiziert werden. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CMG2 $\Delta\Delta$ CT –Werten der Proben des Tumorgewebes und den Proben des Normalgewebes ($p=0,339$, Mann-Whitney-U-Test). Die ROC-Analysen zeigten, dass die CMG2-mRNA-Expression sich nicht als diskriminanter Biomarker für das Vorliegen von Mundhöhlenkarzinomzellen eignet. (AUC=0,561; $p=0,339$; 95%-CI:0,445 - 0,677). Die multivariate Cox-Regressionsanalyse ergab, dass Patienten mit erhöhter CMG2-mRNA-Expression ein 1,96fach erhöhtes relatives Risiko haben an dem Tumor früher zu versterben ($p = 0,11$). Patienten mit niedrigen CMG2- Expressionen haben in den ersten 42 Monaten ein leichte Tendenz für ein längeres Überleben. Eine Korrelation von CMG2-mRNA-Expression zu Alter, Geschlecht oder Tumorstadium der Patienten konnte nicht nachgewiesen werden. Es zeigten sich Korrelationen zwischen CMG2-mRNA-Expression und der mRNA-Expression des Hypoxie-induzierten Faktor 1α ($r_s=0,38$; $p < 0,01$), der mRNA-Expression von Piwi-like 1 ($r_s=-0,53$; $p < 0,01$) und der Expression einer CMG2-Spleißvariante B ($r_s=0,45$; $p < 0,01$), deren mechanistischer Zusammenhang bisher nicht beschrieben ist. Zusammenfassend zeigt die CMG2-mRNA-Expression im Tumorgewebe keine signifikante Assoziation zur Diagnose oder Prognose des Mundhöhlenkarzinoms. Der Zusammenhang der CMG2-mRNA-Expression und der HIF1 α -mRNA-Expression, Piwi-like 1-mRNA-Expression und der Spleißvariante B des CMG2 sollten weiter untersucht werden.

Literatur

Bell SE, Mavila A, Salazar R, Bayless KJ, Kanagala S, Maxwell SA, Davis GE (2001) Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling. *J Cell Sci* 114:2755–2773.

Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA (2001) Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414:225–229.

Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16:2733–2742.

Cerutti L, Mian N, Bateman A (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* 25:481–482.

Chen K-H, Liu S, Bankston LA, Liddington RC, Leppla SH (2007) Selection of anthrax toxin protective antigen variants that discriminate between the cellular receptors TEM8 and CMG2 and achieve targeting of tumor cells. *J Biol Chem* 282:9834–9845.

Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* 12:3715–3727.

Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, Spitz MR, Schiller JT, Wei Q, Sturgis EM (2003) Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 9:2620–2626.

Denadai R, Raposo-Amaral CE, Bertola D, Kim C, Alonso N, Hart T, Han S, Stelini RF, Buzzo CL, Raposo-Amaral CA, Hart PS (2012) Identification of 2 novel ANTXR2 mutations in patients with hyaline fibromatosis syndrome and proposal of a modified grading system. *American journal of medical genetics. Part A* 158A:732–742.

Deuquet J, Lausch E, Guex N, Abrami L, Salvi S, Lakkaraju A, Ramirez, Maria Celeste M, Martignetti JA, Rokicki D, Bonafe L, Superti-Furga A, van der Goot, Françoise G (2011) Hyaline fibromatosis syndrome inducing mutations in the ectodomain of anthrax toxin receptor 2 can be rescued by proteasome inhibitors. *EMBO molecular medicine* 3:208–221.

Dowling O, Difeo A, Ramirez MC, Tukul T, Narla G, Bonafe L, Kayserili H, Yuksel-Apak M, Paller AS, Norton K, Teebi AS, Grum-Tokars V, Martin GS, Davis GE, Glucksman MJ, Martignetti JA

- (2003) Mutations in capillary morphogenesis gene-2 result in the allelic disorders juvenile hyaline fibromatosis and infantile systemic hyalinosis. *American journal of human genetics* 73:957–966.
- Eckert AW, Kappler M, Schubert J, Taubert H (2012) Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral and maxillofacial surgery* 16:189–196.
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2:161–174.
- El-Maaytah M, Jerjes W, Shah P, Upile T, Murphy C, Ayliffe P (2010) Gingival hyperplasia associated with juvenile hyaline fibromatosis: a case report and review of the literature. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 68:2604–2608.
- Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK (2014) Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers* 6:1298–1327.
- Greither T (2005) Molekularbiologische Untersuchungen an den vier Tumor-assoziierten Kandidatengenen CMG2, Hiwi, KIAA0409 und CD26 in Weichteilsarkomen; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Med. Fak., Fachbereich Biochemie/Biotechnologie.
- Grochola LF, Greither T, Taubert H, Möller P, Knippschild U, Udelnow A, Henne-Bruns D, Würfl P (2008) The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. *Br J Cancer* 99:1083–1088.
- Hanks S, Adams S, Douglas J, Arbour L, Atherton DJ, Balci S, Bode H, Campbell ME, Feingold M, Keser G, Kleijer W, Mancini G, McGrath JA, Muntoni F, Nanda A, Teare MD, Warman M, Pope FM, Superti-Furga A, Futreal PA, Rahman N (2003) Mutations in the gene encoding capillary morphogenesis protein 2 cause juvenile hyaline fibromatosis and infantile systemic hyalinosis. *American journal of human genetics* 73:791–800.
- Harper E, Bloch KJ, Gross J (1971) Zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry* 10:3035–3041.
- Humphris GM, Freeman R, Clarke, H M M (2004) Risk perception of oral cancer in smokers attending primary care: a randomised controlled trial. *Oral Oncol* 40:916–924.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61:69–90.

Jutta Meyer (2014) Diagnostischer und prädiktiver Nachweis von CMG2; Abschlussarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science (B.Sc.) Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Koukourakis MI, Bentzen SM, Giatromanolaki A, Wilson GD, Daley FM, Saunders MI, Dische S, Sivridis E, Harris AL (2006) Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial. *J Clin Oncol* 24:727–735.

Lin H, Spradling AC (1997) A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* 124:2463–2476.

Liu S, Crown D, Miller-Randolph S, Moayeri M, Wang H, Hu H, Morley T, Leppla SH (2009) Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:12424–12429.

Liu S, Zhang Y, Hoover B, Leppla SH (2013) The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin. *Toxins* 5:1–8.

Liu X, Sun Y, Guo J, Ma H, Li J, Dong B, Jin G, Zhang J, Wu J, Meng L, Shou C (2006) Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 118:1922–1929.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25:402–408.

Marios Marcou (2014) Wechselwirkungen zwischen Kapillar-Morphogenese Gen 2 und Androgenen bei der Genese und Progression des Prostatakarzinoms; Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Patiar S, Harris AL (2006) Role of hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapy target. *Endocrine-related cancer* 13 Suppl 1:75.

Peters DE, Zhang Y, Molinolo AA, Miller-Randolph S, Szabo R, Bugge TH, Leppla SH, Liu S (2012) Capillary morphogenesis protein-2 is required for mouse parturition by maintaining uterine collagen homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications* 422:393–397.

Qiao D, Zeeman A-M, Deng W, Looijenga, Leendert H J, Lin H (2002) Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 21:3988–3999.

Reeves CV, Dufraigne J, Young, J A T, Kitajewski J (2010) Anthrax toxin receptor 2 is expressed in murine and tumor vasculature and functions in endothelial proliferation and morphogenesis. *Oncogene* 29:789–801.

Reeves CV, Wang X, Charles-Horvath PC, Vink JY, Borisenko VY, Young, John A T, Kitajewski JK (2012) Anthrax toxin receptor 2 functions in ECM homeostasis of the murine reproductive tract and promotes MMP activity. *PloS one* 7:e34862.

Ribeiro SL, Guedes EL, Botan V, Barbosa A, Freitas EJ (2009) Juvenile hyaline fibromatosis: a case report and review of literature. *Acta Reumatol Port* 34:128–133.

Rodriguez D, Morrison CJ, Overall CM (2010) Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et biophysica acta* 1803:39–54.

Rogers MS, Christensen KA, Birsner AE, Short SM, Wigelsworth DJ, Collier RJ, D'Amato RJ (2007) Mutant anthrax toxin B moiety (protective antigen) inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer research* 67:9980–9985.

Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N (2003) Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 82:323–330.

Scobie HM, Rainey, G Jonah A, Bradley KA, Young, John A T (2003) Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5170–5174.

Scobie HM, Young, John A T (2005) Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Curr Opin Microbiol* 8:106–112.

Seiki M, Mori H, Kajita M, Uekita T, Itoh Y (2003) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration. *Biochem Soc Symp*:253–262.

Sharma AK, Nelson MC, Brandt JE, Wessman M, Mahmud N, Weller KP, Hoffman R (2001) Human CD34(+) stem cells express the hiwi gene, a human homologue of the Drosophila gene piwi. *Blood* 97:426–434.

Shiomi T, Okada Y (2003) MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 22:145–152.

Siddiqi S, Terry M, Matushansky I (2012) Hiwi mediated tumorigenesis is associated with DNA hypermethylation. *PloS one* 7:e33711.

Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ (2008) The human side of hypoxia-inducible factor. *British journal of haematology* 141:325–334.

Snoek-van Beurden, Patricia AM, Von den Hoff, Johannes W. (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* 38:73–83.

Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W (1995) The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralytins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein science : a publication of the Protein Society* 4:823–840.

Taubert H, Greither T, Kaushal D, Würfl P, Bache M, Bartel F, Kehlen A, Lautenschläger C, Harris L, Kraemer K, Meye A, Kappler M, Schmidt H, Holzhausen H-J, Hauptmann S (2007) Expression of the stem cell self-renewal gene Hiwi and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Oncogene* 26:1098–1100.

Upadhyay J, Shekarriz B, Nemeth JA, Dong Z, Cummings GD, Fridman R, Sakr W, Grignon DJ, Cher ML (1999) Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-2 immunolocalization in human prostate: change in cellular localization associated with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 5:4105–4110.

Vargas M, Karamsetty R, Leppla SH, Chaudry GJ (2012) Broad expression analysis of human ANTXR1/TEM8 transcripts reveals differential expression and novel splice variants. *PloS one* 7:e43174.

Vink JY, Charles-Horvath PC, Kitajewski JK, Reeves CV (2014) Anthrax toxin receptor 2 promotes human uterine smooth muscle cell viability, migration and contractility. *American journal of obstetrics and gynecology* 210:154.

Wang Q-E, Han C, Milum K, Wani AA (2011) Stem cell protein Piwil2 modulates chromatin modifications upon cisplatin treatment. *Mutation research* 708:59–68.

Wolff K-D, Follmann M, Nast A (2012) The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Deutsches Ärzteblatt international* 109:829–835.

Wolff K.-D., Bootz F., Beck J., Bikowski K., Böhme P., Budach W., Burkhardt A., Danker (2012b) Kurzversion S3 Mundhöhlenkarzinom.

http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007_1000Lk_S3_Mundh%C3%B6hlenkarzinom_112012-122015.pdf. Zugegriffen: 21. Januar 2015.

Wu Q, Ma Q, Shehadeh LA, Wilson A, Xia L, Yu H, Webster KA (2010) Expression of the Argonaute protein PiwiL2 and piRNAs in adult mouse mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 396:915–920.

Ye L, Sanders AJ, Sun P-H, Mason MD, Jiang WG (2014a) Capillary morphogenesis gene 2 regulates adhesion and invasiveness of prostate cancer cells. *Oncol Lett* 7:2149–2153.

Ye L, Sun P-H, Malik, Muhammad Faraz Arshad, Mason MD, Jiang WG (2014b) Capillary morphogenesis gene 2 inhibits growth of breast cancer cells and is inversely correlated with the disease progression and prognosis. *Journal of cancer research and clinical oncology* 140:957–967.

Ye L, Sun P-H, Sanders AJ, Martin TA, Lane J, Mason MD, Jiang WG (2014c) Therapeutic potential of capillary morphogenesis gene 2 extracellular vWA domain in tumour-related angiogenesis. *International journal of oncology* 45:1565–1573.

Zentrum für Krebsregisterdaten Krebs in Deutschland 2007/2008.

Zhai Y, Hotary KB, Nan B, Bosch FX, Munoz N, Weiss SJ, Cho KR (2005) Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. *Cancer research* 65:6543–6550.

6 Thesen

- 1) In allen 115 Proben (Normal- und Tumorgewebe) der 85 Patienten konnte CMG2-mRNA-Expression gemessen werden. Die Vermessung der CMG2-mRNA-Expression in Normalgewebe und Tumorgewebe von Mundhöhlenkarzinompatienten ergab, dass CMG2 kein signifikanter Biomarker für Mundhöhlenkarzinome ist ($p=0,34$, Mann-Whitney-U-Test, $AUC=0,56$, $p=0,34$, 95%-CI: 0,45 - 0,68, ROC-Analyse)
- 2) Es besteht kein Unterschied in der CMG2-mRNA-Expression bei Mundhöhlenkarzinomen zwischen Männern und Frauen ($p=0,89$, Mann-Whitney-U-Test).
- 3) Es bestehen keine Zusammenhänge zwischen der CMG2-mRNA-Expression und der Größe des Tumors ($p=0,02$ Kruskal-Wallis-Test), des Lymphknotenbefalls ($p=0,23$ Kruskal-Wallis-Test) und des Metastasenstadiums ($p=0,49$, Mann-Whitney-U-Test).
- 4) Es besteht keine Beziehung zwischen dem Alter der Patienten und der CMG2-mRNA-Expression in Mundhöhlenkarzinomen (Korrelationskoeffizient= $-0,08$ $p=0,50$, Spearman-Rho) und es gibt keinen Unterschied in der Verteilung der CMG2-mRNA-Expression den Patientengruppen älter oder jünger als der Altersmedian (60 Jahre) ($p=0,85$, Mann-Whitney-U-Test).
- 5) Patienten mit erhöhter CMG2-mRNA-Expression haben ein 1,96fach erhöhtes relatives Risiko an dem Tumor früher zu versterben ($p=0,11$, Cox-Regressionsanalyse). Patienten mit niedrigen CMG2-mRNA-Expression haben eine Tendenz zu einem längeren Überlebenszeitraum bis zum 42 Monat.
- 6) Ein statistisch signifikanter Zusammenhang nach Spearman-Rho konnte zwischen der CMG2-mRNA-Expression und der mRNA-Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1α (HIF- 1α /HPRT, $r_s=0,38$ $p=0,001$), der Piwi-like-1-mRNA-Expression ($r_s=-0,53$, $p=0,000002$) und der CMG2 Spleißvariante B ($r_s=0,45$, $p=0,0004$) gezeigt werden.

7 Anhang

CURRICULUM VITAE

Arne Christian Eitzen

Roggemannstr. 13

26122 Oldenburg

Tel.: +49 176 24753802

E-Mail: arneitzen@web.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum 27. August 1985

Geburtsort Bremen

Ausbildung

- | | |
|-----------|--|
| 1992-1996 | Grundschule Brinkum |
| 1996-1998 | Besuch der Orientierungsstufe Brinkum |
| 1998-2002 | Besuch des Gymnasiums der Kooperativen Gesamtschule Stuhr |
| 2002-2003 | Auslandsaufenthalt in Australien - Besuch der Kapunda High School |
| 2003-2005 | Besuch der gymnasialen Oberstufe der Kooperativen Gesamtschule Stuhr mit Erwerb der allgemeinen Hochschulreife |
| 2005-2006 | Sanitätsdienst der Deutschen Bundeswehr in Hamm, Nordrhein-Westfalen und Heeresdienst in Wildeshausen, Niedersachsen |
| 2007-2008 | Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger, Klinikum Bremen Mitte |
| 2008-2014 | Studium der Humanmedizin an der MLU Halle-Wittenberg |
| 07/2010 | 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Universität Halle |
| 11/2014 | Staatsexamen Humanmedizin, Universität Halle |
| 07/2015 | Assistenzarzt am Universitätsklinikum für Urologie in Oldenburg |

Oldenburg, August 2016

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

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.



Oldenburg, den 29.09.2016

Arne Christian Eitzen, geboren am 27.08.1985 in Bremen

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. M. Behre für meine Annahme als Doktorand am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und für die stetige fachliche Unterstützung des Promotionsvorhabens.

Besonderer Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. T. Greither, der mich exzellent betreut hat, immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir bei der Planung der Experimente und klinischen Studien zur Seite stand. Ebenfalls möchte ich Ihm für die Durchsicht meiner Arbeit danken.

Ebenfalls ein großer Dank geht an Herrn Professor Dr. Dr. Alexander Eckert und Herrn Dr. rer. nat. Matthias Kappler aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Überlassung der Patientenproben.

Bedanken möchte ich mich auch beim gesamten Team des Forschungslabors des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, insbesondere bei Maria, Sindy und Matthias, für die Unterstützung und gute Zeit im Labor.

Abschließen geht ein großer Dank an meine Familie, die dich immer in meinen Vorhaben und Bestrebungen unterstützt hat.



Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06097 Halle (Saale)

Herrn Prof. Dr. H. Taubert
Klinik für Mund-, Kiefer- und
Plastische Gesichtschirurgie
Universitätsklinikum Halle (Saale)
Große Steinstraße 19
06097 Halle

Ihre Zeichen

Ihr Schreiben vom

Unsere Zeichen

Datum

hm-bü

30.11.2009

Postanschrift:
06097 Halle (Saale)

Untersuchung der Expression von Hypoxie-, Stammzell- und Tumor-assozierten Genen als endogene Marker für die Diagnose, Prognose und als potentielle Targets für die Therapie von Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen

Hausanschrift:
Magdeburger Straße 8
06112 Halle (Saale)

Sehr geehrter Herr Professor Taubert,

Geschäftsstelle:
Tel. 0345 557-4476
Fax 0345 557-4477
E-Mail ethik-kommission@medizin.uni-halle.de
Internet: www.medizin.uni-halle.de/

mit Schreiben vom 27.11.2009 zur oben genannten Studie haben Sie zu unserem Schreiben vom 28.09.2009 Stellung genommen sowie eine überarbeitete Patienteninformation und Einwilligungserklärung übersandt. Unseren Empfehlungen sind Sie vollständig nachgekommen.

Bankverbindung:
Deutsche Bundesbank,
Filiale Magdeburg
Konto: 80001530
BLZ: 81000000

Ich kann Ihnen bestätigen, dass seitens der Ethik-Kommission keine Bedenken gegen die Durchführung des Forschungsvorhabens bestehen.

Mit freundlichen Grüßen

IBAN:
DE37810000000000001530
BIC:
MARKDEF1810


Prof. Dr. med. Hermann M. Behre
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Steuernummer: 111/144/02550
(Finanzamt Halle-Nord)

Nachrichtlich
Herrn PD Dr. A. W. Eckert
Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg arbeitet auf der Grundlage deutschen Rechts sowie in Anlehnung an die ICH-GCP-Richtlinien.

Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Vorhabens unabhängig vom Beratungsergebnis bei den durchführenden Ärzten und Wissenschaftlern verbleibt.