

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

Prof. Dr. Dr. Martin Gosau

***PIK3CA* Hotspot Mutationen im Speichel
als diagnostischer Marker beim oralem Plattenepithelkarzinom**

Dissertation

Zu Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Konstantin Krüger
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2025

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14.02.2025

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Klaus Pantel

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets

Herrn Dr. Dr. Tobias Torsiglieri

für einen Traum

Inhaltsverzeichnis

1. Publikation.....	5
1.1. Artikel	6
1.2. Kongressbeiträge.....	14
2. Hintergrund der Studie.....	15
2.1. Einleitung.....	15
2.1.1. Das orale Plattenepithelkarzinom	15
2.1.2. Liquid Biopsies	16
2.1.3. Zielsetzung	18
2.2. Material und Methoden.....	18
2.3. Ergebnisse	20
2.4. Diskussion	21
2.4.1. Ausblick	23
2.5. Zusammenfassung.....	25
2.5.1. Abstract der Publikation.....	26
3. Literaturverzeichnis.....	27
4. Erklärung des Eigenanteils an der Studie.....	29
5. Lebenslauf.....	31
6. Danksagung.....	33
7. Eidesstattliche Versicherung.....	34

1. Publikation

Die Publikation der Studie erschien im Juni 2024 in dem Peer-Review-Journal Anticancer Research:

Krüger K, Grust A, Muallah D, Patenge A, Wikman H, Mesa MM, Knust ES, Sartori A, Smeets R, Kluwe L, Friedrich RE, Burg S. PIK3CA Hotspot Mutations in Saliva as a Diagnostic Marker in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. Anticancer Res. 2024 Jun;44(6):2369-2376. doi: 10.21873/anticancerres.17044. PMID: 38821622.

PIK3CA Hotspot Mutations in Saliva as a Diagnostic Marker in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients

KONSTANTIN KRÜGER^{1*}, AUDREY GRUST^{1,2*}, DAVID MUALLAH^{1,2}, ADRIAN PATENGE¹,
HARRIET WIKMAN³, MARIA MEDINA MESA⁴, EIKE SÖREN KNUST⁴, ALEXANDER SARTORI⁴,
RALF SMEETS^{1,2}, LAN KLUWE^{1,5}, REINHARD E. FRIEDRICH¹ and SIMON BURG¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany;

²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Regenerative Orofacial Medicine,
University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany;

³Institute of Tumour Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany;

⁴Agena Bioscience GmbH, Hamburg, Germany;

⁵Laboratory for Tumour Genetics and Regenerative Medicine,
Department of Neurology, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Abstract. *Background/Aim:* This study aimed at the analogous detection of PIK3CA mutations, common in oral squamous cell carcinoma (OSCC), in matched tumor and saliva samples. *Patients and Methods:* Tissue and saliva samples were obtained from 29 patients diagnosed with primary OSCC. Saliva samples were obtained preoperatively; tissue specimens were acquired during tumor resection. Tumor DNA was extracted from both tissue and saliva samples. All samples were controlled for DNA quantity and quality and genetic matching of sample pairs was confirmed using the iPlex Pro Exome QC Panel. Variant detection was performed using the MassARRAY[®] System, a mass-spectrometry based detection system. Mutational analysis in tissue tumor DNA was made using the multiplexed ClearSEEK[™] PIK3CA v1.0 Panel covering 20 hotspot mutations in PIK3CA. In saliva samples, variants were analyzed using both the ClearSEEK[™] and the UltraSEEK[®] Lung v1.1 Panel, with a higher limit of detection but covering less PIK3CA variants. *Results:* Overall,

a PIK3CA variant was found in seven of the 29 tumor tissue samples (24%) by ClearSEEK[™]; UltraSEEK[®] additionally confirmed the variant in four of these seven positive samples. Of the three variants not detected by UltraSEEK[®], two were not included in the panel and one was included but not detected. Of the seven variants found in tissue, five could also be detected in the matching saliva samples (71%), either by utilizing ClearSEEK[™] or UltraSEEK[®]. *Conclusion:* The detection of PIK3CA hotspot mutations in OSCC and their simultaneous occurrence in saliva underline the potential benefit of liquid biopsies for non-invasive cancer detection and follow-up care of OSCC patients.

Around 450,000 carcinomas of the oral cavity are diagnosed worldwide annually (1). In this context, the oral squamous cell carcinoma (OSCC) represents the most frequent entity accounting for more than 90% of all oral cavity cancers (1-3). Besides the main risk factors for oropharynx cancer, which are extensive tobacco and alcohol consumption, a chronic infection with human papillomavirus (HPV) 16 and 18 further increases the risk for this life-threatening disease. The diagnosis of OSCC is often delayed due to the long symptom-free period as well as the misdiagnosis of mucosal lesions (e.g., leukoplakia) in early cancer stages. Unfortunately, cervical lymph node metastasis is present in 40% of OSCC cases at the time of first diagnosis. Thus, the 5-year-survival rate remains poor with a percentage of only 70% (4). Another reason for the poor survival is the high risk of recurrence (3). Recurrent disease is difficult to detect because of the altered anatomy after ablative surgery and reconstruction, radiotherapy, oedema, and scar tissue formation. Consequently, therapy is often delayed, predisposing to a poorer outcome. Hence, it is of high clinical relevance to detect

*These Authors contributed equally to this study.

Correspondence to: Dr. med. Konstantin Krüger, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20251 Hamburg, Germany. Tel: +49 15229064363, e-mail: konkruger@gmail.com

Key Words: Oral cancer, OSCC, liquid biopsies, saliva, ctDNA, PIK3CA, hotspot mutations, mass spectrometry.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC-ND) 4.0 international license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>).

primary OSCC as well as its recurrence as early as possible. Whilst effective and early screening methods exist for other prominent carcinomas (e.g., prostatic cancer), no such method is available in the case of initial or recurrent OSCC. Through extension into the oral cavity, carcinomas are constantly in contact with saliva thus already indicating a potential use for early detection and follow-up diagnostics of oral cancer (3, 5).

Coined by Pantel and Alix-Panabières in 2010, the term liquid biopsy (LB) refers to the yield of genetic information from tumors only through the analysis of patients' bodily fluids (6). This non-invasive diagnostic method avoids the risks of typical complications associated with a traditional tumor biopsy, such as bleeding, infection, seeding of tumor cells and sampling errors depending on tumor tissue heterogeneity. Exemplary target biomarkers for tumor diagnostics using LB are cell free DNA (cfDNA), circulating tumor cells or exosomes (6). A small fraction of cfDNA is tumor associated DNA (ctDNA) that originates from the tumor itself and is released during apoptosis, necrosis or by active secretion, thus carrying the same (epi-) genetic alterations as the tumor itself. The most frequent mutations of any given tumor entity are so-called hotspot mutations. Their detection in body fluids serves as a strong indicator for the presence of the respective tumor (5, 7).

Wang *et al.* performed a proof of principle study searching for hotspot mutations in the plasma and saliva of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), emphasizing the superiority of detecting genetic markers over conventional biomarkers such as CD44 because of their specificity for neoplastic cells (5, 8). It was postulated that ctDNA detection of HNSCC has a higher accuracy in plasma, whereas the ctDNA detection of OSCC is notably more indicative in saliva because of the constant contact between tumor and fluid. This seems plausible given the mere anatomical proximity as well as Wang's statistical observation that saliva samples presented the highest measurable fraction of associated mutant DNA (5). Overall, saliva ctDNA proved more sensitive and specific for the detection of early OSCC stages than plasma ctDNA. In the case of HNSCC, detection of the associated hotspot mutations *TP53*, *PIK3CA*, *NOTCH1*, and *CDKN2A* was possible in 95% of cases. *PIK3CA* mutations are highly common to OSCC, as shown by Starzynska *et al.*, with their focus on *PTEN* loss and *PIK3CA* amplification (9).

The MassARRAY® system (Agena Bioscience, Hamburg, Germany), based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, was used to detect genetic DNA targets such as somatic mutations based on their molecular mass. This method has recently been applied to LB of melanoma and lung cancer and showed additional information beyond currently detected biomarkers (10-14). However, whilst blood presented the principal focus of aforementioned studies, the MassARRAY® system equally allows for a quick and cost-effective analysis of saliva.

This study aimed to representatively detect *PIK3CA* mutation profiles of OSCC tissue, as well as in the corresponding preoperatively obtained saliva samples. The discovery of *PIK3CA* hotspot mutations in OSCC and their simultaneous occurrence in saliva could reveal the benefit of liquid biopsies as a useful tool for non-invasive early detection and follow-up care of OSCC patients. This would be in line with contemporary research, that already justifying *PIK3CA* mutations to be potent diagnostic markers of other carcinoma recurrences such in the case of rectal cancer residues (15).

Patients and Methods

Written informed consent was obtained prospectively from all participants. The Ethics Review Board of the University of Hamburg, Germany, approved the study (approval number: PV7012, Ärztekammer Hamburg).

Tissue as well as saliva samples were collected from 29 OSCC patients at the Department of Oral and Maxillofacial Surgery of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany between October 2020 and August 2021 (Figure 1). The inclusion criteria were a minimal age of 18 years, a histologically confirmed OSCC that was clinically exposed to the oral cavity and sufficiently vast for biopsy without affecting routine pathological investigations. Sample pairs of tumor and saliva from each patient were pseudonymized.

Preoperative collection of saliva samples was conducted as described by Goode *et al.* and Min *et al.* (16, 17). Patients spat into a tube with 5 ml buffer solution for stabilizing the DNA after rinsing the mouth with 5 ml isotonic sodium chloride solution. Tissue samples were obtained with a biopsy punch during surgical tumor resection by an experienced maxillofacial surgeon and stored in tubes with isotonic sodium chloride solution. All samples were blinded to the clinical data and stored at 4°C before being processed in the laboratory within 24 h. The isolation of cfDNA from saliva samples was conducted as described by Goode *et al.* (16). Cell lysis was performed using the MasterPure DNA Purification Kit (Lucigen, Middleton, WI, USA), DNA was separated from proteins by a proteinase K (Macherey-Nagel, Düren, Germany), dried, and rehydrated. The tumor tissue was first lysed using the MasterPure DNA Purification Kit (Lucigen) and subsequently, the DNA was extracted using a Master Pure DNA-kit (Lucigen). The DNA was stored at -20°C until further mutational analysis was performed.

Prior to mutational analysis, all DNA samples were controlled for quality, quantity, and genetic identity (sample QC) with the Exome QC Panel (Agena Bioscience, Hamburg, Germany). All expected sexes were confirmed, and sample pairs matched according to a 21-SNP profile (18). For somatic mutation detection in DNA from tumor tissue and saliva, genetic analyses were performed using the ClearSEEK™ *PIK3CA* v1.0 Panel (Agena Bioscience) with a limit of detection of >1%. The Panel covers 20 hotspot mutations in *PIK3CA* (Table I). First, a single multiplex PCR was performed using ~15 ng of tissue DNA and ~30 ng of saliva DNA according to the manufacturer's instructions (Agena Bioscience). Thermocycling was performed using a Labcycler Basic 96 (SensoQuest, Göttingen, Germany). Amplicons were treated with shrimp alkaline phosphatase (SAP). For variant assessment by single-base extension (SBE) with the terminator nucleotides being

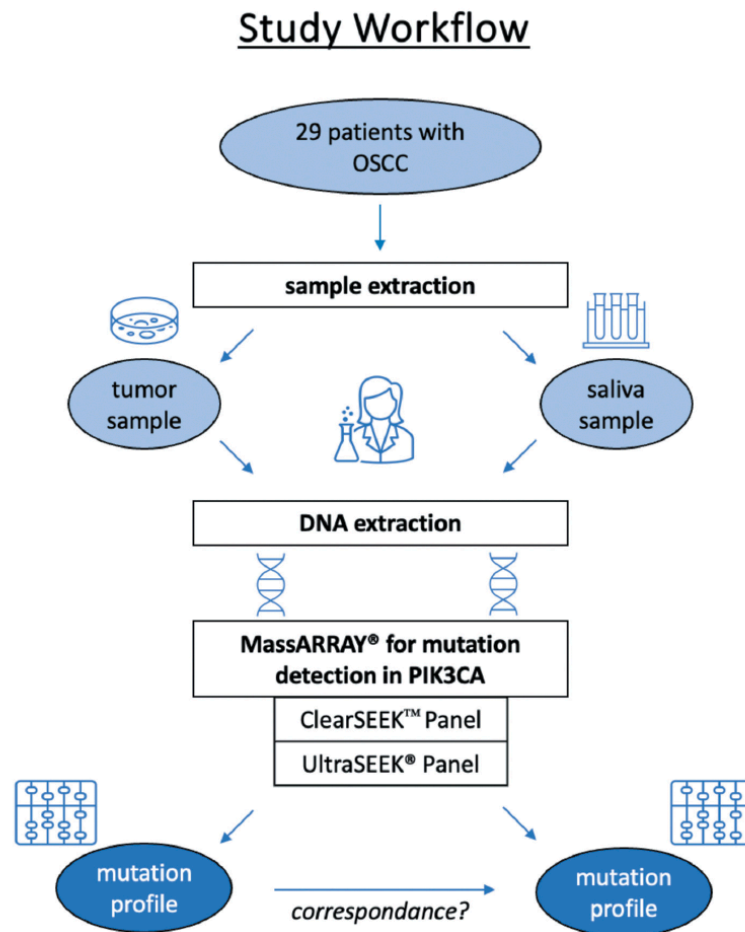


Figure 1. Study workflow. Twenty-nine patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) were included, from whom saliva samples were obtained preoperatively and tumor samples intraoperatively via excision. DNA was extracted from the matching samples and investigated via MassARRAY® to detect *PIK3CA* mutations and their correspondence.

specific to the mutant allele, PCR/SAP products were divided into three multiplex reactions spanning the 20 *PIK3CA* variants.

Transfer of the SBE products, liquid handling and target detection was performed in automated fashion using the MassARRAY® System with ChipPrep Module (Agena Bioscience). The turnaround-time of the workflow described was approximately 8 h excluding DNA extraction and sample QC.

Confirmational analysis of *PIK3CA* variants was performed using the UltraSEEK® Lung v1.1 Panel (Agena Bioscience) with a limit of detection of >0.1%. The panel detects 74 clinically relevant variants across *BRAF* [4], *EGFR* [46], *ERBB2* [4], *KRAS* [16], and *PIK3CA* [4], the latter being p.E542K, p.E545K, p.H1047L, and p.H1047R and thus a subset of the variants listed in Table I. Again, a single

multiplex PCR was performed using ~15 ng of tissue DNA and ~30 ng of saliva DNA according to the manufacturer's instructions and amplicons were SAP treated. PCR/SAP products were divided into 12 aliquots for single-base extension, which was performed with biotinylated chain terminator nucleotides specific to the mutant allele. Streptavidin-coated magnetic beads were used to capture the single-base extended oligonucleotides. Beads with captured products were pelleted using a magnet, suspended with 13 µl of biotin competition solution, and finally incubated at 95°C for 5 min. Eluted products were automatically transferred to the MassARRAY® System for variant detection as described above.

In both the ClearSEEK™ and the UltraSEEK® workflow, no wild type products are being generated. Therefore, amplicon

Table I. Variant list of the ClearSEEK™ PIK3CA v1.0 Panel.

Gene	Nucleotide change	Amino acid change	COSMIC ID	Genomic mutation ID
PIK3CA	c.1258T>C	p.C420R	757	COSV55874020
PIK3CA	c.1624G>A	p.E542K	760	COSV55873227
PIK3CA	c.1624G>C	p.E542Q	17442	COSV55894248
PIK3CA	c.1633G>A	p.E545K	763	COSV55873239
PIK3CA	c.1633G>C	p.E545Q	27133	COSV55878227
PIK3CA	c.1634A>C	p.E545A	12458	COSV55873209
PIK3CA	c.1634A>G	p.E545G	764	COSV55873220
PIK3CA	c.1634A>T	p.E545V	27155	COSV55892885
PIK3CA	c.1635G>C	p.E545D	27374	COSV55875881
PIK3CA	c.1635G>T	p.E545D	765	COSV55874040
PIK3CA	c.1636C>A	p.Q546K	766	COSV55873527
PIK3CA	c.1636C>G	p.Q546E	6147	COSV55882350
PIK3CA	c.1637A>C	p.Q546P	767	COSV55875400
PIK3CA	c.1637A>G	p.Q546R	12459	COSV55876869
PIK3CA	c.1637A>T	p.Q546L	25041	COSV55877455
PIK3CA	c.3139C>A	p.H1047N	5029128	COSV55912376
PIK3CA	c.3139C>T	p.H1047Y	774	COSV55876499
PIK3CA	c.3140A>C	p.H1047P	249874	COSV55888015
PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	775	COSV55873195
PIK3CA	c.3140A>T	p.H1047L	776	COSV55873401

The four variants for PIK3CA that are also covered by the UltraSEEK® Lung v1.1 Panel are written in bold.

controls were added to the reactions to ensure, in the absence of a variant signal, that only the target region was amplified. Data analysis was performed using the automated Somatic Variant Report v1.0.5 (Agena Bioscience).

Results

In total, 29 OSCC patients from the Department of Oral and Maxillofacial Surgery of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf in Germany were investigated between October 2020 and August 2021. The cohort comprised 11 males and 19 females, out of which 14 were smokers and 16 non-smokers (Table II). The lowest UICC stage was I (3 patients), the highest IVb (4 patients). No UICC stage IVc was included. The lowest T classification was pT1 (4 patients) and the highest pT4a (13 patients). No pT4b tumor was included. The lowest N classification was pN0 (17 patients) and the highest pN3b (4 patients). As the presence of metastasis would have been a contraindication for operative therapy, no patients with metastatic disease were included in the study.

The mean age was 63.9 years (± 13.8), mean tumor depth 14.6 mm (± 11.8), tumor diameter 39.3 mm (± 18.0), and the mean number of positive lymph nodes 4.4 (± 16.2) within a mean number of resected lymph nodes of 48.1 (± 29.8) (Table III).

As previously described, tissue and saliva were initially analyzed using the ClearSEEK™ PIK3CA Panel. The UltraSEEK® Lung Panel was used for variant confirmation. Overall, in seven out of 29 patients (24%) a PIK3CA variant

Table II. Demographic data: oncological classification.

Parameter	Number of cases	Percentage (%)
Sex		
Male	11	27
Female	19	63
Smoker		
Yes	14	47
No	16	53
UICC stadium		
0	0	0
I	3	10
II	7	23
III	3	10
IVa	11	37
IVb	4	13
IVc	0	0
T classification		
pT1	4	13
pT2	5	17
pT3	7	23
pT4a	13	43
pT4b	0	0
N classification		
pN0	17	57
pN1	2	7
pN2a	1	3
pN2b	2	7
pN2c	2	7
pN3a	1	3
pN3b	4	13

Table III. Demographic data: mean values of patient and tumor characteristics.

	Age (years)	Tumor depth (mm)	Largest tumor diameter (mm)	Positive lymph nodes	Resected lymph nodes
Mean (standard deviation)	63.9 (13.8)	14.6 (11.8)	39.3 (18.0)	4.4 (16.2)	48.1 (29.8)

Table IV. Mutation detection in corresponding tumor and saliva samples.

Tissue sample	ClearSEEK™ Panel	UltraSEEK® Panel	Saliva sample	ClearSEEK™ Panel	UltraSEEK® Panel
T0019	WT	WT	S0019	WT	WT
T0020	WT	WT	S0020	WT	WT
T0021	WT	WT	S0021	WT	WT
T0023	WT	WT	S0023	WT	WT
T0026	WT	WT	S0026	WT	WT
T0028	WT	WT	S0028	WT	WT
T0029	WT	WT	S0029	WT	WT
T0030	WT	WT	S0030	WT	WT
T0031	E545Q*	-NA-	S0031	E545Q*	-NA-
T0032	WT	WT	S0032	WT	WT
T0038	WT	WT	S0038	WT	WT
T0040	H1047R	H1047R	S0040	H1047R	H1047R
T0037	WT	WT	S0037	WT	WT
T0054	H1047R	H1047R	S0054	WT	H1047R
T0055	WT	WT	S0055	WT	WT
T0057	H1047R	H1047R	S0057	H1047R	H1047R
T0178	WT	WT	S0178	WT	WT
T0179	WT	WT	S0179	WT	WT
T0182	WT	WT	S0182	WT	WT
T0185	E542K	WT	S0185	WT	E542K
T0192	WT	WT	S0192	WT	WT
T0200	WT	WT	S0200	WT	WT
T0218	WT	WT	S0218	WT	WT
T0219	WT	WT	S0219	WT	WT
<i>T0221</i>	<i>E545A*</i>	<i>-NA-</i>	<i>S0221</i>	<i>WT</i>	<i>-NA-</i>
<i>T0226</i>	<i>H1047R</i>	<i>H1047R</i>	<i>S0226</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>
T0248	WT	WT	S0248	WT	WT
T0249	WT	WT	S0249	WT	WT
T0266	WT	WT	S0266	WT	WT

Bold: Variant detected in tissue and saliva. Italics: Variant detected in tissue only. WT: Wild type; NA: not available. *Variant not covered by UltraSEEK® Lung Panel.

was detected in the respective tumor tissue. In five of these cases (71%) the same variant could also be detected in the matching saliva sample (Table IV). In two out of these five cases the variants (namely E542K and H1047R,) were only detectable by the UltraSEEK® Lung Panel with its significantly higher analytical sensitivity.

In two tumor samples, p.E545A and p.E545Q *PIK3CA* variants were detected with the ClearSEEK™ Panel. These two variants are not covered by the UltraSEEK® Lung Panel and could therefore not be confirmed. However, the *PIK3CA* p.E545Q variant was also detected in the matching saliva sample.

Discussion

Early detection of primary tumors and recurrences of OSCC remains a significant challenge. In addition to clinical examination of patients and radiological imaging, another modality of diagnostics is required to allow for significantly earlier detection. This improvement is essential to improve currently unsatisfactory treatment prospects. Detection of mutation-associated ctDNA in saliva could mean simple, painless, and accurate tumor detection, especially for repeated follow-up analyses aimed at the mitigation and prevention of tumor recurrence. This study aimed at the detection of *PIK3CA*

mutations, being particularly expressed in OSCC, both in the tumor and saliva obtained preoperatively. It was clearly demonstrated that this detection is possible and therefore, prevalent hot-spot mutations such as those in *PIK3CA* can serve as pertinent diagnostic markers for the onset of OSCC. Whilst certainly never considered in the context of OSCC, other studies have already shown *PIK3CA* mutations to be relevant as diagnostic markers in other cancer recurrences such as rectal carcinomas (15).

We investigated ctDNA in saliva due to its prime suitability for LB, given its relative anatomical proximity to the tumor tissue and comparably high levels of associated mutant DNA. Detection of ctDNA has been significantly easier in saliva, as shown by Nonaka and Wong (19). Indeed, Wang *et al.* convincingly synopsized how sensitivity for OSCC-associated ctDNA detection peaks with the focus lying on the oral cavity (20). Equally, saliva ctDNA does not undergo organic decomposition, unlike blood, which is subject to degradation by the kidney, liver, spleen, nucleases, and phagocytes (21-23). A dual approach with both saliva and plasma as biomarkers might therefore be most suitable for a comprehensive assessment of therapeutic benefits (19).

Saliva presents a potent, multicomponent bodily fluid that is easily accessible whilst offering a wide-ranging potential for targeted analysis. The chosen method of saliva collection is crucial for ctDNA detection as well as differentiation from otherwise present cfDNA. Unnecessary contamination with further fragment cfDNA through cell lysis occurring after sampling must be avoided. This would allow for already known disadvantages associated with saliva as a diagnostic tool to be minimized and mitigated. Disadvantages include a generally low concentration of biomarkers, challenges regarding measurement sensitivity, as well as standardization of initial sample collection (24).

As ctDNA concentration is very low, especially in early cancer stages, ultrasensitive ctDNA assays have been developed (23). Instead of approaching the OSCC ctDNA in an untargeted manner, *i.e.*, by searching for any copy number aberrations, we searched for *PIK3CA* mutations specifically, as those are known to be particularly prevalent in OSCC tumors (9). Overall, a *PIK3CA* variant was found in 7 out of 29 patients (24%), for whom the same variant could be detected in five saliva samples (71%). The *PIK3CA* mutation detection rate in tumor tissue is in line with previous reports (9, 25). *PIK3CA* mutation detection thus presents a suitable target for saliva LB approaches for a subset of patients. LB could thus be implemented in follow-up diagnostics besides clinical investigation and radiological imaging to detect recurrent disease as early as possible. However, more studies with larger cohorts are needed to corroborate these results.

Outlook. After surgical resection, possibly combined with radiotherapy or chemoradiotherapy, about one fifth of patients

experience a local tumor recurrence – usually within the first six months (26). These relapses do not always lead to symptoms and can only be detected above a certain tumor size using radiological imaging techniques, such as CT and MRI, which are already routinely used in tumor follow-up. CtDNA quantity and volume of the tumor in radiological imaging both relate to tumor burden. Early detection of rebound ctDNA could thus trigger even more targeted diagnostics, for example in the form of PET/CT, untargeted follow-ups at random intervals or even only when recurrence symptoms manifest (27). Considering breast cancer, studies have successfully detected minimal residual disease by the increase in ctDNA concentration several months after primary tumor removal. It therefore seems to be a suitable instrument for recurrence monitoring (23, 28, 29).

Besides the early detection of recurrent tumors by measuring the ctDNA concentration, LB could further decode potentially altered molecular profiles. Therefore, it would be possible to investigate both the heterogeneity of oral cavity carcinomas and the clonal development of the tumor over time in a non-invasive way. Tumor heterogeneity and therefore the existence of a whole array of dissimilar populations of cancerous cells within a single tumor may facilitate therapy resistance. Whilst combined therapy approaches already mitigate associated risks to some extent, the use of a combination of diagnostic means, *i.e.*, ctDNA and CTCs, could further enhance therapeutic outcomes overall. Epigenetic alterations, such as methylation patterns and histone modification, could also be included in this context. Patients can thus be offered an early, individualized, repeatable, and more effective non-invasive diagnostic method, which would allow for a more targeted and potent therapy, therefore improving quality of life as well as therapy adherence.

Further standardization of sample collection, ctDNA investigation and bioinformatic or statistical analysis is currently needed (23, 30). Cut-off values must be developed and other components of LB, such as CTCs or extracellular vesicles, should be further investigated to strengthen clinical application and improve predictive accuracy (31, 32). Salivary cytokines, such as TNF-alpha, may also be elevated in tumor patient samples. Thus, considering their predictive and diagnostic potential alongside clinical investigations is equally important (33). Whilst standardized tubes and fixatives would be desirable for all biomarkers, their heterogeneity might render this impossible.

Study limitations. This study evaluated the combined detection of *PIK3CA* mutations in OSCC tissue and their corresponding ctDNA in saliva samples *via* mass spectrometry. A clear congruity could be verified. Yet, pertinent limitations must also be considered such as the small cohort size of 29 patients and the restriction towards the detection of *PIK3CA* variants. The resulting sensitivity of 24% falls within the expected range for *PIK3CA* alone. However, expanding the targets to include more mutant genes associated with OSCC may

counter this trend, thereby increasing detection rates further and improving the actual diagnostic utility.

It should also be noted that no metastatic status was included. In this regard, the reason was that tumor recurrence in metastatic OSCC is normally not treated *via* operation but by (radio-) chemotherapy, which in turn prevents the resection of tissue samples.

In addition to its primary goal of avoiding conventional tumor biopsies, LB aims to mitigate sampling errors caused by intratumoral heterogeneity. Furthermore, this study only investigated a small portion of the resected tumor and not the tumor in its entirety. Lastly, it is worth noting that OSCCs primarily come into contact with saliva due to their superficial growth. However, for tumors growing more deeply, ctDNA concentration in saliva may be lower or even undetectable.

Conclusion

The detection of *PIK3CA* hotspot mutations in OSCC, alongside their simultaneous occurrence in saliva, underlines the potential benefit of LB for non-invasive early cancer detection and follow-up care in OSCC patients.

Conflicts of Interest

Agena Bioscience GmbH, Hamburg, Germany, performed the genetic investigation of the tumor and saliva samples using the MassARRAY® System, a mass-spectrometry based detection system, for free. The Authors have no further competing interests to declare.

Authors' Contributions

Konstantin Krüger: Conceptualization, Investigation, Methodology, Project administration, Visualization, Roles/Writing – original draft. Audrey Grust: Conceptualization, Roles/Writing – original draft, Methodology, Validation. David Muallah: Data curation, Formal analysis, Writing – review & editing, Validation. Adrian Patenge: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. Harriet Wikman: Validation, Methodology, Supervision, Project administration Writing – review & editing. Maria Medina Mesa: Data curation, Software, Formal analysis. Eike Sören Knust: Data curation, Software, Formal analysis. Alexander Sartori: Supervision, Project administration, Data curation, Validation, Software, Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. Ralf Smeets: Supervision, Resources, Writing – review & editing. Lan Kluwe: Supervision, Data curation, Formal analysis, Validation, Writing – review & editing. Martin Gosau: Supervision, Resources. Reinhard E. Friedrich: Writing – review & editing. Simon Burg: Supervision, Resources, Methodology, Project administration, Writing – review & editing.

Acknowledgements

The Authors thank Ina Alster, Sophia Sommerbeck, and Catharina Czepluch for their help in sample processing. Furthermore, the Authors would like to thank Agena Bioscience GmbH, Hamburg, Germany, and Dr. Alexander Sartori for the genetic investigation of

the corresponding tumor and saliva samples via mass spectrometry. The Authors would also like to thank Dr. Levi Matthies and Adrian Patenge for their detailed linguistic corrections.

Funding

There was no funding for this study.

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6): 394-424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492
- Wang W, Adeoye J, Thomson P, Choi SW: Statistical profiling of oral cancer and the prediction of outcome. *J Oral Pathol Med* 50(1): 39-46, 2021. DOI: 10.1111/jop.13110
- Cristaldi M, Mauceri R, Di Fede O, Giuliana G, Campisi G, Panzarella V: Salivary biomarkers for oral squamous cell carcinoma diagnosis and follow-up: current status and perspectives. *Front Physiol* 10: 1476, 2019. DOI: 10.3389/fphys.2019.01476
- Bschorer M, Schneider D, Goppold K, Sperling J, Schön G, Bschorer R: Quality of life and survival rate after primary surgical treatment of oral squamous cell carcinoma: A retrospective study with 18 years of follow-up. *J Craniomaxillofac Surg* 50(2): 170-177, 2022. DOI: 10.1016/j.jcms.2021.09.016
- Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, James N, Rettig EM, Guo T, Pickering CR, Bishop JA, Chung CH, Califano JA, Eisele DW, Fakhry C, Gourin CG, Ha PK, Kang H, Kiess A, Koch WM, Myers JN, Quon H, Richmon JD, Sidransky D, Tufano RP, Westra WH, Bettegowda C, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Agrawal N: Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med* 7(293): 293ra104, 2015. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa8507
- Pantel K, Alix-Panabières C: Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 16(9): 398-406, 2010. DOI: 10.1016/j.molmed.2010.07.001
- Soini HA, Klouckova I, Wiesler D, Oberzaucher E, Grammer K, Dixon SJ, Xu Y, Brereton RG, Penn DJ, Novotny MV: Analysis of volatile organic compounds in human saliva by a static sorptive extraction method and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chem Ecol* 36(9): 1035-1042, 2010. DOI: 10.1007/s10886-010-9846-7
- Franzmann EJ, Donovan MJ: Effective early detection of oral cancer using a simple and inexpensive point of care device in oral rinses. *Expert Rev Mol Diagn* 18(10): 837-844, 2018. DOI: 10.1080/14737159.2018.1523008
- Starzyńska A, Adamska P, Sejda A, Sakowicz-Burkiewicz M, Adamski ŁJ, Marvaso G, Wychowañski P, Jereczek-Fossa BA: Any role of PIK3CA and PTEN biomarkers in the prognosis in oral squamous cell carcinoma? *Life (Basel)* 10(12): 325, 2020. DOI: 10.3390/life10120325
- Belloum Y, Janning M, Mohme M, Simon R, Kropidlowski J, Sartori A, Irwin D, Westphal M, Lamszus K, Loges S, Riethdorf S, Pantel K, Wikman H: Discovery of targetable genetic alterations in NSCLC patients with different metastatic patterns using a MassARRAY-based circulating tumor DNA assay. *Cells* 9(11): 2337, 2020. DOI: 10.3390/cells9112337

- 11 Gorges K, Wiltfang L, Gorges TM, Sartori A, Hildebrandt L, Keller L, Volkmer B, Peine S, Babayan A, Moll I, Schneider SW, Twarock S, Mohr P, Fischer JW, Pantel K: Intra-patient heterogeneity of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in blood of melanoma patients. *Cancers (Basel)* 11(11): 1685, 2019. DOI: 10.3390/cancers11111685
- 12 Gray ES, Witkowski T, Pereira M, Calapre L, Herron K, Irwin D, Chapman B, Khattak MA, Raleigh J, Hatzimihailis A, Cebon J, Sandhu S, McArthur GA, Millward M, Ziman M, Dobrovic A, Wong SQ: Genomic analysis of circulating tumor DNA using a melanoma-specific UltraSEEK oncogene panel. *J Mol Diagn* 21(3): 418-426, 2019. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2018.12.001
- 13 Lamy PJ, van der Leest P, Lozano N, Becht C, Duboeuf F, Groen HJM, Hilgers W, Pourel N, Rifaella N, Schuurin E, Alix-Panabières C: Mass spectrometry as a highly sensitive method for specific circulating tumor DNA analysis in NSCLC: a comparison study. *Cancers (Basel)* 12(10): 3002, 2020. DOI: 10.3390/cancers12103002
- 14 Weber S, Spiegl B, Perakis SO, Ulz CM, Abuja PM, Kashofer K, Leest PV, Azpurua MA, Tamminga M, Brudzewsky D, Rothwell DG, Mohan S, Sartori A, Lampignano R, Konigshofer Y, Sprenger-Haussels M, Wikman H, Bergheim IR, Kloten V, Schuurin E, Speicher MR, Heitzer E: Technical evaluation of commercial mutation analysis platforms and reference materials for liquid biopsy profiling. *Cancers (Basel)* 12(6): 1588, 2020. DOI: 10.3390/cancers12061588
- 15 Byun J, Park NJ, Yoon G, Kang MK, Kim HJ, Park SY, Park JS, Choi GS, Baek JH, Kim JG, Seo AN: *PIK3CA* mutations as a prognostic factor in patients with residual rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Anticancer Res* 43(4): 1513-1520, 2023. DOI: 10.21873/anticanres.16300
- 16 Goode MR, Cheong SY, Li N, Ray WC, Bartlett CW: Collection and extraction of saliva DNA for next generation sequencing. *J Vis Exp* (90): 51697, 2014. DOI: 10.3791/51697
- 17 Min JL, Lakenberg N, Bakker-Verweij M, Suchiman E, Boomsma DI, Slagboom PE, Meulenbelt I: High microsatellite and SNP genotyping success rates established in a large number of genomic DNA samples extracted from mouth swabs and genotypes. *Twin Res Hum Genet* 9(4): 501-506, 2006. DOI: 10.1375/183242706778024973
- 18 Dixon LA, Murray CM, Archer EJ, Dobbins AE, Koumi P, Gill P: Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Sci Int* 154(1): 62-77, 2005. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.12.011
- 19 Nonaka T, Wong DTW: Liquid biopsy in head and neck cancer: promises and challenges. *J Dent Res* 97(6): 701-708, 2018. DOI: 10.1177/0022034518762071
- 20 Wang X, Kaczor-Urbancowicz KE, Wong DT: Salivary biomarkers in cancer detection. *Med Oncol* 34(1): 7, 2017. DOI: 10.1007/s12032-016-0863-4
- 21 Yu SC, Lee SW, Jiang P, Leung TY, Chan KC, Chiu RW, Lo YM: High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin Chem* 59(8): 1228-1237, 2013. DOI: 10.1373/clinchem.2013.203679
- 22 Velders M, Treff G, Machus K, Bosnyák E, Steinacker J, Schumann U: Exercise is a potent stimulus for enhancing circulating DNase activity. *Clin Biochem* 47(6): 471-474, 2014. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.12.017
- 23 Elazezy M, Joosse SA: Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J* 16: 370-378, 2018. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.10.002
- 24 Birknerova N, Mancikova V, Paul ED, Matyasovsky J, Cekan P, Palicka V, Parova H: Circulating cell-free DNA-based methylation pattern in saliva for early diagnosis of head and neck cancer. *Cancers (Basel)* 14(19): 4882, 2022. DOI: 10.3390/cancers14194882
- 25 Jayaprakash C, Varghese VK, Jayaram P, Chakrabarty S, Kudva A, Ray S, Satyamoorthy K: Relevance and actionable mutational spectrum in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 49(5): 427-434, 2020. DOI: 10.1111/jop.12985
- 26 Blatt S, Krüger M, Sagheb K, Barth M, Kämmerer PW, Al-Nawas B, Sagheb K: Tumor recurrence and follow-up intervals in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Med* 11(23): 7061, 2022. DOI: 10.3390/jcm11237061
- 27 Carrió I, Flotats A: Liquid biopsies and molecular imaging: friends or foes? *Clin Transl Imaging* 8(1): 47-50, 2020. DOI: 10.1007/s40336-019-00350-3
- 28 Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, Cheang M, Osin P, Nerurkar A, Kozarewa I, Garrido JA, Dowsett M, Reis-Filho JS, Smith IE, Turner NC: Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* 7(302): 302ra133, 2015. DOI: 10.1126/scitranslmed.aab0021
- 29 Fitzpatrick A, Iravani M, Mills A, Childs L, Alaguthurai T, Clifford A, Garcia-Murillas I, Van Laere S, Dirix L, Harries M, Okines A, Turner NC, Haider S, Tutt ANJ, Isacke CM: Assessing CSF ctDNA to improve diagnostic accuracy and therapeutic monitoring in breast cancer leptomeningeal metastasis. *Clin Cancer Res* 28(6): 1180-1191, 2022. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-3017
- 30 Heidrich I, Aćkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K: Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int J Cancer* 148(3): 528-545, 2021. DOI: 10.1002/ijc.33217
- 31 Wuerdemann N, Jain R, Adams A, Speel EM, Wagner S, Joosse SA, Klusmann JP: Cell-free HPV-DNA as a biomarker for oropharyngeal squamous cell carcinoma-a step towards personalized medicine? *Cancers (Basel)* 12(10): 2997, 2020. DOI: 10.3390/cancers12102997
- 32 Hofmann L, Ludwig S, Vahl JM, Brunner C, Hoffmann TK, Theodoraki MN: The emerging role of exosomes in diagnosis, prognosis, and therapy in head and neck cancer. *Int J Mol Sci* 21(11): 4072, 2020. DOI: 10.3390/ijms21114072
- 33 Ferrari E, Pezzi ME, Cassi D, Pertinhez TA, Spisni A, Meleti M: Salivary cytokines as biomarkers for oral squamous cell carcinoma: a systematic review. *Int J Mol Sci* 22(13): 6795, 2021. DOI: 10.3390/ijms22136795

Received March 27, 2024

Revised April 19, 2024

Accepted April 22, 2024

1.2. Kongressbeiträge

Die Studie wurde im Rahmen folgender Kongressbeiträge vorgestellt:

- 26th Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery; Madrid, Spain; 27.-30.09.2022
 - Posterbeitrag: *Hotspot DNA mutations in saliva as a diagnostic marker in patients with oral squamous cell carcinoma*

- 53. Jahrestagung des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises für Kopf-Hals-Tumoren; Münster, Deutschland; 9.-12.11.2022
 - Kurzvortrag: *PIK3CA* Hotspot Mutationen im Speichel als diagnostischer Marker beim oralen Plattenepithelkarzinom

- 73. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie; Hamburg, Deutschland; 14.-17.06.2023
 - Kurzvortrag: *PIK3CA* Hotspot Mutationen im Speichel als diagnostischer Marker beim oralen Plattenepithelkarzinom

2. Hintergrund der Studie

2.1. Einleitung

2.1.1. Das orale Plattenepithelkarzinom

Das orale Plattenepithelkarzinom ist die häufigste Tumorentität der Mundhöhle und steht an 6. Stelle der weltweit häufigsten Krebsdiagnosen (Bray et al., 2018, Wang et al., 2020). Die Therapie umfasst die chirurgische Resektion des Tumors mit ggf. Rekonstruktion des Resektionsdefektes, die Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich und/oder die onkologische Systemtherapie (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Separate oder kombinierte Therapieansätze werden entsprechend der Tumorboard-Beschlüsse festgelegt und haben für die Patienten oft mutilierende Auswirkungen auf Ästhetik, Sprachbildung und die Nahrungsaufnahme (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019)). Das 5-Jahres-Überleben ist dennoch mit ca. 70% eher limitiert, die Gründe hierfür sind vielfältig (Bschorer et al., 2022).

Bei 40% der Erstdiagnosen liegt bereits eine Metastasierung in die zervikalen Lymphknoten vor (Bschorer et al., 2022). Viele Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom besuchen unregelmäßig den Zahnarzt und die Untersuchung umfasst zunächst die klinische Untersuchung, die von Untersuchungszeit, Erfahrung des Untersuchers und Compliance des Patienten abhängig ist, sodass die Früherkennung einigen Herausforderungen unterliegt. Prognostisch schlecht ist das Auftreten eines Tumorrezidivs, wobei die meisten Rezidive innerhalb des ersten Jahres nach operativer Resektion auftreten (Cristaldi et al., 2019). Somit kommt neben der Frühdiagnostik auch der Rezidiverkennung ein hoher Stellenwert bei der Behandlung des oralen Plattenepithelkarzinoms zu. Auch diese umfasst aber vorrangig die klinische Untersuchung gepaart mit regelmäßig angewendeten Bildgebungsverfahren wie der Sonographie oder Computertomographie. Bei postoperativ meist verändertem Situs ist es anspruchsvoll, bei der klinischen Nachsorge zwischen Narbengewebe, Ödem, Transplantat, (Schleim-)Hautirritation durch Einbisse oder adjuvante Radiatio und erneuter Tumorbildung zu unterscheiden.

Neben der klinischen Untersuchung und den etablierten Bildgebungsverfahren ist eine histologische Untersuchung des Tumors vor Einleitung der Therapie unabdingbar (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019)). Die Gewinnung von Probebiopsien im Mundraum ist für die Patienten jedoch unangenehm und birgt die Gefahr von Blutungen und Entzündungen. Die Biopsien erfassen außerdem nur einen Teil des Tumors, der durch Nekrosebildung und Gewebheterogenität charakterisiert ist. Es besteht also die Möglichkeit eines sog. *sampling error*. Liegt ein Residualtumor (R1 Status) nach der Resektion oder ein inoperables und stattdessen systemisch zu behandelndes Tumorstadium vor, wäre es vorteilhaft, den Tumor im Verlauf bioptisch untersuchen zu können, um Therapieansprechen und das etwaige Auftreten neuer Mutationen untersuchen zu können. Dies ist in der praktischen Durchführung kaum darstellbar. Die bei anderen Tumorentitäten häufig untersuchten Tumormarker sind beim oralen Plattenepithelkarzinom zu unspezifisch. Eine systemische Diagnostik für Therapiemonitoring und Rezidiverkennung ist aktuell nicht möglich und wäre wünschenswert (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019)).

2.1.2. Liquid Biopsies

Eines der Kerncharakteristika maligner Tumoren ist deren Invasivität mit Anschoppung von Lymph- und Blutgefäßen. Über diese findet die Aussendung von Tumorinformationen in die Umgebung und die Metastasierung statt (Pantel and Alix-Panabières, 2010). Sobald der Tumor also vom Stadium des *Carcinoma in situ* in das eines Karzinoms übergeht, ist eine systemische Komponente der Erkrankung gegeben. Genetisches Material des Tumors wird passiv durch Apoptose oder Nekrose und aktiv durch Vesikelabschnürung verteilt (Cristaldi et al., 2019). Der Begriff *Liquid Biopsies* (LB) beschreibt die genetische Untersuchung von Malignomen anhand von Körperflüssigkeiten und funktioniert ähnlich der Untersuchung fetaler DNA im mütterlichen Blut bei der nicht-invasiven Pränataldiagnostik (Pantel and Alix-Panabières, 2010). LB-Marker sind frei zirkulierende DNA-Fragmente (cfDNA), wovon einige neben der physiologischen DNA vom Tumor entstammen (ctDNA), zirkulierende Tumorzellen (CTCs), die sich als disseminierte Tumorzellen (DTCs) in anderen Organen zu Fernmetastasen vermehren können und sekretierte Vesikel wie Exosomen (Pantel and Alix-Panabières, 2010, Cristaldi et al., 2019).

Anders als bei der regelhaften Untersuchung von Tumormarkern repräsentieren LB-Marker die unmittelbare genetische Konfiguration des Tumors (Cristaldi et al., 2019). Die systemische Untersuchung ist ortsunabhängig und kann schlecht zu erreichende Tumoren genauso untersuchen, wie Malignome ohne bekannten Primarius (sog. *cancer of unknown primary*). Da die Gesamtheit der durch den Tumor abgesonderten genetischen Informationen untersucht wird, wird ein *sampling error* vermieden. Außerdem ist eine nicht-invasive Untersuchung des Tumors im zeitlichen Verlauf möglich und kann das Therapieansprechen bzw. die Bildung von Resistenzen oder neuen Mutationen bewerten.

LB nutzen meist Blut als zu untersuchendes Medium, aber auch Urin, Pleuraflüssigkeit und Drüsensekrete können je nach Tumorlokalisation zu untersuchende Tumorbestandteile enthalten. Beim oralen Plattenepithelkarzinom besteht ein unmittelbarer Kontakt des Tumors zum Speichel der Mundhöhle. Zur Extraktion genetischer Informationen dieser Entität erscheint somit Speichel als geeignetes Medium und ist schnell, einfach, schmerz- und risikolos zu gewinnen (Cristaldi et al., 2019).

Anders als bei Tumoren mit starker genetischer Prädisposition (z.B. das Mammakarzinom) entsteht das orale Plattenepithelkarzinom vorrangig durch Mutationen auf dem Boden lokaler DNA-Schädigung durch Konsum von Noxen. So erhöht der regelmäßige Tabakkonsum die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines oralen Plattenepithelkarzinoms genauso wie der regelmäßige Konsum hochprozentiger Alkoholika (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Auch eine Assoziation mit chronischen HPV-Infektionen ist nachgewiesen, wobei HPV-assoziierte Plattenepithelkarzinome häufiger im Bereich des Pharynx vorkommen. Die beim oralen Plattenepithelkarzinom am meisten nachgewiesenen Mutationen betreffen die Gene *TP53*, *NOTCH1*, *CDKN2A*, *HRAS* und *PIK3CA* (Starzyńska et al., 2020). Die häufigsten für eine Tumorentität typischen Mutationen nennt man Hotspot Mutationen (Pantel and Alix-Panabières, 2010, Cristaldi et al., 2019).

Bei der genetischen Untersuchung in Körperflüssigkeiten durch LB kommen sog. ungezielte und gezielte Herangehensweisen zum Einsatz. Ungezielte Ansätze, wie z.B. das *whole genome sequencing* oder bestimmte Verfahren des *next generation sequencing* können Punktmutationen, Deletionen, Insertionen etc. erkennen. Sie erfassen also eine große Bandbreite an genetischen Veränderungen, sind jedoch aufwändig in der Durchführung und teuer. Gezielte Ansätze, wie z.B. die *digital-droplet-PCR* oder die Massenspektrometrie, können fokussiert nach bekannten Mutationen suchen. Sie sind

somit eingeschränkt im Untersuchungsspektrum aber schnell und günstig in der Anwendung. Könnten Hotspot Mutationen für das orale Plattenepithelkarzinom bestimmt werden, würde eine gezielte Suche nach diesen einen diagnostischen Vorteil darstellen.

2.1.3. Zielsetzung

Ein beim oralen Plattenepithel häufig von Mutationen betroffenes Gen ist *PIK3CA* (Starzyńska et al., 2020). Ziel dieser Studie war der repräsentative Nachweis von *PIK3CA* Mutationsprofilen in Tumorproben des oralen Plattenepithelkarzinoms und in den korrespondierenden präoperativ gewonnenen Speichelproben. Die Entdeckung von *PIK3CA* Hotspot Mutationen in oralen Plattenepithelkarzinomen und deren gleichzeitiges Auftreten im Speichel könnte den Nutzen von LB als geeignetes Instrument für die nicht-invasive Früherkennung und insbesondere Nachsorge von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom aufzeigen. Dies stünde im Einklang mit aktuellen Forschungsergebnissen, die bereits belegen, dass *PIK3CA* Mutationen potente diagnostische Marker für andere Karzinomrezidive sind, wie z. B. beim Rektumkarzinom (Byun et al., 2023).

2.2. Material und Methoden

Um eine analoge Detektion von *PIK3CA* Mutationen in Tumorsektaten des oralen Plattenepithelkarzinoms und dazugehörigen präoperativ gewonnenen Speichelproben zu ermöglichen, wurden 29 entsprechende Patienten der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf im Zeitraum von August 2020 bis Oktober 2021 in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten waren mindestens 18 Jahre alt und hatten ein histologisch gesichertes orales Plattenepithelkarzinom im operablen Stadium. Die Patienten gaben ihr Einverständnis zu der Probengewinnung und genetischen Untersuchung und alle Proben wurden pseudonymisiert. Das Ethikvotum Nr. PV7012 wurde vorab vom Ethikrat der Ärztekammer Hamburg eingeholt.

Die Probengewinnung erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Der Speichel wurde präoperativ am Vortag oder Tag der Operation nach Spülung der Mundhöhle mit 5ml Natriumchlorid-Lösung aufgefangen (Goode et al., 2014, Min et al., 2006). Die Tumorresektion erfolgte im Rahmen der durch den Tumorboardbeschluss festgelegten Therapie. Die Gewebeproben wurden an den Resektaten entnommen und ebenfalls in Natriumchlorid-Lösung gelagert. Die DNA-Extraktion aus den Speichel- und Gewebeproben wurde durch wissenschaftliches Personal in den Laboratorien der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf nach standardisiertem Verfahren durchgeführt (Goode et al., 2014).

Die genetische Untersuchung der DNA-Proben erfolgte durch die im Rahmen dieser Studie kooperierenden Firma Agena Bioscience, Hamburg, Deutschland. Hierzu wurde das MassARRAY® System (Agena Bioscience, Hamburg, Deutschland), das auf der *matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight* (MALDI-TOF) Massenspektrometrie basiert, verwendet. Das MassARRAY® System ist in der Lage, genetische DNA-Ziele wie somatische Mutationen anhand ihrer Molekülmasse nachzuweisen. Die Methode erbrachte bereits in der Anwendung bei Melanomen und dem Bronchialkarzinom zusätzliche Informationen, die über die derzeit nachgewiesenen Biomarker hinausgingen (Gorges et al., 2019, Belloum et al., 2020, Gray et al., 2019, Lamy et al., 2020, Weber et al., 2020). Während in den genannten Studien hauptsächlich Blut untersucht wurde, ist eine schnelle und kostengünstige Analyse von Speichel ebenso möglich.

Vor der Mutationsanalyse wurden alle Proben auf Qualität, Quantität und genetische Identität durch das Exome QC Panel (Agena Bioscience, Hamburg, Deutschland) kontrolliert. Alle Geschlechtszuordnungen konnten bestätigt und die Zugehörigkeit der jeweiligen Speichel- und Tumorproben anhand des 21-SNP-Profiles kontrolliert werden (Goode et al., 2014). Um genetische Mutationen in den DNA-Proben aus Speichel und Gewebe zu detektieren, wurde das ClearSEEK™ *PIK3CA* Panel (Agena Bioscience, Hamburg, Deutschland) angewendet. Das Mutationspanel erfasst 20 Varianten auf dem *PIK3CA* Gen. Die genetische Bestätigung der nachgewiesenen Mutationen erfolgte mit dem UltraSEEK® Lung Panel (Agena Bioscience, Hamburg, Deutschland). Dieses umfasst 74 klinisch relevante Varianten auf den Genen *BRAF* (4), *EGFR* (46), *ERBB2* (4), *KRAS* (16) und *PIK3CA* (4) und somit einige der durch das ClearSEEK™ *PIK3CA* Panel nachgewiesenen Mutationen.

2.3. Ergebnisse

Insgesamt wurden zwischen Oktober 2020 und August 2021 29 Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom im operablen Stadium aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in Deutschland untersucht. Die Kohorte umfasste 11 Männer und 18 Frauen, von denen 14 Raucher und 15 Nichtraucher waren. Das niedrigste UICC-Stadium war I (3 Patienten), das höchste IVb (4 Patienten). Es lag kein UICC-Stadium IVc vor. Die niedrigste T-Klassifikation war pT1 (4 Patienten) und die höchste pT4a (13 Patienten). Es wurde kein pT4b-Tumor eingeschlossen. Die niedrigste N-Klassifikation war pN0 (17 Patienten) und die höchste pN3b (4 Patienten). Da das Vorhandensein von Metastasen eine Kontraindikation für eine operative Therapie gewesen wäre, wurden keine Patienten mit einer metastasierten Erkrankung in die Studie aufgenommen. Das Durchschnittsalter lag bei 63,9 Jahren (± 13.8), die mittlere Tumortiefe bei 14,6 mm (± 1.8), der Tumordurchmesser bei 39,3 mm (± 18.0) und die mittlere Anzahl positiver Lymphknoten bei 4,4 (± 16.2) bei einer mittleren Anzahl resezierter Lymphknoten von 48,1 (± 29.8).

Wie bereits beschrieben, wurden Gewebe und Speichel zunächst mit dem ClearSEEK™ *PIK3CA* Panel analysiert. Zur Bestätigung der detektierten Mutationen wurde das UltraSEEK® Lung Panel verwendet. Insgesamt wurde bei sieben von 29 Patienten (24 %) eine *PIK3CA*-Variante im jeweiligen Tumorgewebe nachgewiesen. In fünf dieser Fälle (71 %) konnte die gleiche Variante auch in der passenden Speichelprobe nachgewiesen werden. Zwei dieser fünf Fälle, die Varianten *E542K* und *H1047R* betreffend, waren nur mit dem UltraSEEK® Lung Panel mit seiner deutlich höheren analytischen Sensitivität nachweisbar.

In zwei Tumorproben wurden die *PIK3CA*-Varianten *p.E545A* und *p.E545Q* mit dem ClearSEEK™ *PIK3CA* Panel nachgewiesen. Diese beiden Varianten werden durch das UltraSEEK® Lung Panel nicht abgedeckt und konnten daher nicht bestätigt werden. Allerdings wurde die *PIK3CA p.E545Q*-Variante auch in der passenden Speichelprobe nachgewiesen.

2.4. Diskussion

Die Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms hängt nach wie vor wesentlich von der klinischen Untersuchung bzw. der Bildgebung mittels Sonographie und Computertomographie ab. Diese Methoden sind integraler Bestandteil der initialen Diagnosestellung, können jedoch auch mit erheblichen Verzögerungen einhergehen. Verzögerungen entstehen, wenn Effloreszenzen fehlinterpretiert werden oder die Tumoren z.B. bei Lokalisation am dorsalen Zungenrand übersehen werden. Die Rezidiverkennung stellt bei postoperativ verändertem Situs eine noch größere Herausforderung dar. Viele Patienten weisen nach der Operation bzw. der Bestrahlung eine verkleinerte Mundöffnung auf (Mikrostomie). Die Kopf- und Zungenbeweglichkeit ist meist ebenso eingeschränkt, sodass eine Diagnostik nachteilig beeinträchtigt wird. Bei Zustand nach mikrochirurgischer Rekonstruktion erschweren die zunächst oft überdimensionierten Transplantate die Einsicht in die Mundhöhle ebenfalls beträchtlich. Ebenso können Narbengewebe und transplantiertes oder ödematöses Gewebe von einem etwaigen Rezidiv schwer zu unterscheiden sein. Es besteht daher ein Bedarf nach zusätzlichen diagnostischen Methoden, die standardisiert und Untersucher-unabhängig angewendet werden können.

Die Bestimmung von Tumormarkern, die bei anderen Tumorentitäten häufig Anwendung findet, ist beim oralen Plattenepithelkarzinom nachweislich zu unspezifisch (Cristaldi et al., 2019). Eine direkte genetische Untersuchung des jeweiligen Tumors wäre wünschenswert, ist jedoch in der aktuellen klinischen Routine nur durch eine Biopsie oder die Tumorresektion mit entsprechend assoziierten Risiken darstellbar. Zudem muss auch für eine biopsische Gewebeentnahme das zu untersuchende Areal identifiziert und repräsentatives Gewebe gesichert werden. LB ermöglichen die Untersuchung tumoröser DNA direkt aus den Körperflüssigkeiten wie Blut und Speichel. Die vom Tumor entstammende ctDNA kann hierbei eindeutig von der körpereigenen cfDNA unterschieden werden, sodass eine direkte Zuordnung zum Tumor möglich ist. Die Gewinnung des Materials im Rahmen einer LB Probenentnahme ist schmerzlos, risikoarm, einfach, günstig, Untersucher-unabhängig und beliebig wiederholbar (Cristaldi et al., 2019). Sie birgt klare Vorteile für den klinischen Alltag, besonders in der Patientennachsorge nach der Tumorthherapie.

Dies ist auch im spezifischen Kontext des oralen Plattenepithelkarzinoms zutreffend, das vorrangig auf dem Boden lokaler genetischer Schädigung v.a. durch Noxen entsteht und eine große Bandbreite an ursächlichen Mutationen aufweist. Eine Krebsfrüherkennung durch Suche nach in den Körperflüssigkeiten vorkommenden Hotspot Mutationen erscheint deshalb aktuell nicht opportun. Können bei einem histologisch gesicherten Tumor jedoch Mutationen durch LB detektiert werden, die nach Tumorresektion nicht mehr nachzuweisen sind, können in der Nachsorge regelmäßig LB-Proben entnommen werden, um ein Wiederauftreten der Mutation festzustellen. Dies würde mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv des Tumors sprechen und eine gezieltere klinische Untersuchung bzw. Bildgebung – z.B. eine PET-CT – auslösen. Ebenso würde ein persistierender Nachweis der Mutationen für verbliebenes Tumorgewebe (R-Status) bzw. eine sog. *minimal residual disease* oder bisher unentdeckte Metastasen sprechen (Cristaldi et al., 2019).

Das bisherig am meisten untersuchte LB-Medium ist Blutplasma. Das wesentliche Malignitätskriterium eines Tumors ist die Durchbrechung der Basalmembran des jeweiligen Gewebes und eine folgende Anschoppung von Lymph- und Blutgefäßen. Für die meisten Tumoren ist daher Blutplasma das zu untersuchende Medium der Wahl und wird in der klinischen Routine ohnehin abgenommen. Aufgrund der Lokalisation in der Mundhöhle, erscheint Speichel im Kontext des oralen Plattenepithelkarzinoms jedoch als noch aussagekräftiger. Das orale Plattenepithelkarzinom wird konstant von Speichel umspült, sodass die Präsenz von spezifischer ctDNA in einer LB-Speichelprobe früher und in höherer Konzentration als im Blut zu erwarten ist. Vorstudien bestätigten die Annahme, dass bei dieser Entität v.a. eine ctDNA Untersuchung im Speichel diagnostisch vorteilhaft erscheint (Wang et al., 2015). Im Gegensatz zu Blut unterliegt Speichel zudem nicht den Filterungsprozessen der Milz und ist noch schmerz- und komplikationsloser zu gewinnen.

Ein in der Tumorgenese generell und beim oralen Plattenepithelkarzinom insbesondere betroffenes Gen ist *PIK3CA*. Eine vorherige Studie zum Mammakarzinom konnte bereits nachdrücklich zeigen, dass das Vorhandensein von *PIK3CA*-Mutationen mit einer schlechteren Überlebensprognose einhergeht (Oshiro et al., 2015). Eine weitere Studie zum Kolonkarzinom identifizierte Mutationen von *PIK3CA* als prognostisch relevanten Faktor für das Auftreten eines Rezidivs. Die vorliegende Studie schloss 29 Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom im operablem Stadium in die Studie ein. Ziel war der analoge Nachweis von vorab definierten *PIK3CA*-Varianten per Massenspektrometrie

an aus Tumorresektaten und korrespondierenden präoperativ gewonnenen Speichelproben extrahierter DNA. Von den 29 Patienten konnten bei sieben (24 %) eine *PIK3CA*-Variante im jeweiligen Tumorgewebe nachgewiesen werden. In fünf dieser Fälle (71 %) konnte die gleiche Variante auch in der passenden Speichelprobe nachgewiesen werden. Die Zielsetzung der Studie konnte somit erfüllt werden. LB stellen einen potenten Ansatz zur effizienten und nicht-invasiven genetischen Untersuchung des oralen Plattenepithelkarzinoms dar.

Der Nachweis von mit dem Tumorgewebe korrespondierenden *PIK3CA*-Varianten in Speichelproben könnte ein Therapiemonitoring unterstützen. Persistiert der Nachweis nach erfolgter Tumorresektion, ist dies ein starker Hinweis auf einen Residualtumor bzw. ein lokales Zweitkarzinom. Wären entsprechende Varianten nach der Operation nicht mehr nachzuweisen und würden im Rahmen der Tumornachsorge erneut auftreten, wäre dies ein diagnostischer Marker für eine frühzeitige Remission der Tumorentität. Perioperativ durchgeführte LB an Speichelproben könnten mit Tumorpersistenz und Tumorrezidiven verbundene Risiken vermindern und einer insgesamt besseren Patientenversorgung dienen.

2.4.1. Ausblick

Um weitere Mutationen sowohl von *PIK3CA* als auch anderer beim oralen Plattenepithelkarzinom häufig betroffener Gene, wie *TP53* oder *NOTCH1*, zu identifizieren, sollten breitere Mutationspanel bei der Massenspektrometrie und ggf. auch andere Detektionsmethoden angewendet werden. Die Massenspektrometrie zeigt jedoch den entscheidenden Vorteil der Kosteneffizienz für die klinische Anwendung. Ungezielte Ansätze der Mutationsdetektion, wie das *whole genome sequencing* würden die breitere Detektion jeglicher Mutationen auf vielen Genen ermöglichen. Somit könnte die initiale Mutationsuntersuchung des Tumors mit ungezielten Ansätzen erfolgen und die Rezidiverkennung durch die Detektion des Wiederauftretens vorab festgestellter Mutationen im Speichel mit gezielten Ansätzen wie der Massenspektrometrie.

Neben Speichel kommt auch der Untersuchung von genetischen Informationen im Blut eine wichtige Rolle zu, v.a. bei der Suche nach Zweitmalignomen, durch die Bildgebung unentdeckter Metastasierung oder einer *minimal residual disease*. Eine kombinierte

Untersuchung von ctDNA in Speichel und Blut wurde bereits durch Wang et al. in mehreren Studien als vorteilhaft beschrieben (Wang et al., 2015, Wang et al., 2017, Wang et al., 2020). Zukünftige Ansätze, sollten daher neben Blut auch Speichel untersuchen und den Nachweis der Mutationen im Therapieverlauf – also nach Resektion und etwaiger Adjuvant – und der Nachsorge untersuchen. Auch bei nicht-operablen Stadien des oralen Plattenepithelkarzinoms könnten LB einen Informationsgewinn bezüglich Therapieansprechen oder -resistenz bedeuten und das Therapiemonitoring verbessern. Neben dem Nachweis von ctDNA stehen hierfür auch weitere LB-Marker wie CTCs, Exosomen, microRNA und die Untersuchung von Methylierungsmustern zur Verfügung.

2.5. Zusammenfassung

Zielsetzung: Ziel der vorliegenden Studie war der repräsentative Nachweis von *PIK3CA* Mutationsprofilen in Tumorproben des oralen Plattenepithelkarzinoms und in den dazugehörigen präoperativ gewonnenen Speichelproben. Die Entdeckung von *PIK3CA* Hotspot Mutationen in oralen Plattenepithelkarzinomen und deren gleichzeitiges Auftreten im Speichel könnte den Nutzen von LB als geeignetes Instrument für die nicht-invasive Früherkennung und Nachsorge von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom aufzeigen.

Material und Methoden: Von 29 Patienten, bei denen ein primäres orales Plattenepithelkarzinom im operablen Stadium diagnostiziert wurde, wurden Speichelproben präoperativ gewonnen und Gewebeproben während der Tumorresektion entnommen. Die Tumor-DNA wurde sowohl aus Gewebe- als auch aus Speichelproben nach Standardprozedere extrahiert. Alle Proben wurden auf DNA-Quantität und -Qualität kontrolliert, und die genetische Übereinstimmung der Probenpaare bestätigt. Der Variantennachweis erfolgte mit dem MassARRAY® System, einer Massenspektrometrie zur Analyse genetischer Basenfolgen. Die Mutationsanalyse in der DNA aus dem Tumorgewebe und aus den Speichelproben wurde mit dem ClearSEEK™ *PIK3CA* Panel durchgeführt, das 20 Hotspot Mutationen in *PIK3CA* erfasst. Zur Bestätigung der erfassten Mutationen wurden die Proben ebenso mit dem UltraSEEK® Lung Panel analysiert, das eine sensitivere Nachweisgrenze aufweist, aber weniger *PIK3CA* Varianten erfasst.

Ergebnisse: Insgesamt wurde in sieben der 29 Tumorgewebeproben (24 %) durch ClearSEEK™ eine *PIK3CA* Variante gefunden. UltraSEEK® bestätigte diese Varianten zusätzlich in vier dieser sieben positiven Gewebeproben. Von den drei Varianten, die von UltraSEEK® nicht erkannt wurden, waren zwei nicht im Panel enthalten und eine war zwar enthalten, wurde aber nicht erkannt. Von den sieben im Gewebe gefundenen Varianten konnten fünf auch in den passenden Speichelproben (71 %) nachgewiesen werden, entweder mit ClearSEEK™ oder mit UltraSEEK®.

Schlussfolgerung: Der Nachweis von *PIK3CA* Hotspot Mutationen beim oralen Plattenepithelkarzinom und korrespondierenden Speichelproben unterstreicht den potenziellen Nutzen von LB für die Diagnostik des oralen Plattenepithelkarzinoms insbesondere im Hinblick auf die Tumornachsorge und Rezidiverkennung.

2.5.1. Abstract der Publikation

Background/Aim: This study aimed at the analogous detection of *PIK3CA* mutations, common in oral squamous cell carcinoma (OSCC), in matched tumor and saliva samples.

Patients and Methods: Tissue and saliva samples were obtained from 29 patients diagnosed with primary OSCC. Saliva samples were obtained preoperatively; tissue specimens were acquired during tumor resection. Tumor DNA was extracted from both tissue and saliva samples. All samples were controlled for DNA quantity and quality and genetic matching of sample pairs was confirmed using the iPlex Pro Exome QC Panel. Variant detection was performed using the MassARRAY® System, a mass-spectrometry based detection system. Mutational analysis in saliva and tissue tumor DNA was made using the multiplexed ClearSEEK™ *PIK3CA* Panel covering 20 hotspot mutations in *PIK3CA* and the UltraSEEK® Lung Panel, with a more sensitive limit of detection but covering less *PIK3CA* variants.

Results: Overall, a *PIK3CA* variant was found in seven of the 29 tumor tissue samples (24%) by ClearSEEK™; UltraSEEK® additionally confirmed the variant in four of these seven positive tissue samples. Of the three variants not detected by UltraSEEK®, two were not included in the panel and one was included but not detected. Of the seven variants found in tissue, five could also be detected in the matching saliva samples (71%), either by utilizing ClearSEEK™ or UltraSEEK®.

Conclusion: The detection of *PIK3CA* hotspot mutations in OSCC and their simultaneous occurrence in saliva underline the potential benefit of liquid biopsies for non-invasive cancer detection and follow-up care of OSCC patients.

3. Literaturverzeichnis

- BELLOUM, Y., JANNING, M., MOHME, M., SIMON, R., KROPIDLOWSKI, J., SARTORI, A., IRWIN, D., WESTPHAL, M., LAMSZUS, K., LOGES, S., RIETHDORF, S., PANTEL, K. & WIKMAN, H. 2020. Discovery of Targetable Genetic Alterations in NSCLC Patients with Different Metastatic Patterns Using a MassARRAY-Based Circulating Tumor DNA Assay. *Cells*, 9.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- BSCHORER, M., SCHNEIDER, D., GOPPOLD, K., SPERLING, J., SCHÖN, G. & BSCHORER, R. 2022. Quality of life and survival rate after primary surgical treatment of oral squamous cell carcinoma: A retrospective study with 18 years of follow-up. *J Craniomaxillofac Surg*, 50, 170-177.
- BYUN, J., PARK, N. J., YOON, G., KANG, M. K., KIM, H. J., PARK, S. Y., PARK, J. S., CHOI, G. S., BAEK, J. H., KIM, J. G. & SEO, A. N. 2023. PIK3CA Mutations as a Prognostic Factor in Patients With Residual Rectal Cancer After Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Anticancer Res*, 43, 1513-1520.
- CRISTALDI, M., MAUCERI, R., DI FEDE, O., GIULIANA, G., CAMPISI, G. & PANZARELLA, V. 2019. Salivary Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis and Follow-Up: Current Status and Perspectives. *Front Physiol*, 10, 1476.
- GOODE, M. R., CHEONG, S. Y., LI, N., RAY, W. C. & BARTLETT, C. W. 2014. Collection and extraction of saliva DNA for next generation sequencing. *J Vis Exp*.
- GORGES, K., WILTFANG, L., GORGES, T. M., SARTORI, A., HILDEBRANDT, L., KELLER, L., VOLKMER, B., PEINE, S., BABAYAN, A., MOLL, I., SCHNEIDER, S. W., TWAROCK, S., MOHR, P., FISCHER, J. W. & PANTEL, K. 2019. Intra-Patient Heterogeneity of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Blood of Melanoma Patients. *Cancers (Basel)*, 11.
- GRAY, E. S., WITKOWSKI, T., PEREIRA, M., CALAPRE, L., HERRON, K., IRWIN, D., CHAPMAN, B., KHATTAK, M. A., RALEIGH, J., HATZIMIHALIS, A., CEBON, J., SANDHU, S., MCARTHUR, G. A., MILLWARD, M., ZIMAN, M., DOBROVIC, A. & WONG, S. Q. 2019. Genomic Analysis of Circulating Tumor DNA Using a Melanoma-Specific UltraSEEK Oncogene Panel. *J Mol Diagn*, 21, 418-426.
- LAMY, P. J., VAN DER LEEST, P., LOZANO, N., BECHT, C., DUBOEUF, F., GROEN, H. J. M., HILGERS, W., POUREL, N., RIFAELA, N., SCHUURING, E. & ALIX-PANABIÈRES, C. 2020. Mass Spectrometry as a Highly Sensitive Method for Specific Circulating Tumor DNA Analysis in NSCLC: A Comparison Study. *Cancers (Basel)*, 12.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF) 2019. S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.01 (Konsultationsfassung), 2019, AWMF Registernummer: 007/100OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/>.
- MIN, J. L., LAKENBERG, N., BAKKER-VERWEIJ, M., SUCHIMAN, E., BOOMSMA, D. I., SLAGBOOM, P. E. & MEULENBELT, I. 2006. High microsatellite and SNP genotyping success rates established in a large number of

- genomic DNA samples extracted from mouth swabs and genotypes. *Twin Res Hum Genet*, 9, 501-6.
- OSHIRO, C., KAGARA, N., NAOI, Y., SHIMODA, M., SHIMOMURA, A., MARUYAMA, N., SHIMAZU, K., KIM, S. J. & NOGUCHI, S. 2015. PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 150, 299-307.
- PANTEL, K. & ALIX-PANABIÈRES, C. 2010. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*, 16, 398-406.
- STARZYŃSKA, A., ADAMSKA, P., SEJDA, A., SAKOWICZ-BURKIEWICZ, M., ADAMSKI Ł, J., MARVASO, G., WYCHOWAŃSKI, P. & JERECZEK-FOSSA, B. A. 2020. Any Role of PIK3CA and PTEN Biomarkers in the Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma? *Life (Basel)*, 10.
- WANG, W., ADEOYE, J., THOMSON, P. & CHOI, S. W. 2020. Statistical profiling of oral cancer and the prediction of outcome. *J Oral Pathol Med*.
- WANG, X., KACZOR-URBANOWICZ, K. E. & WONG, D. T. 2017. Salivary biomarkers in cancer detection. *Med Oncol*, 34, 7.
- WANG, Y., SPRINGER, S., MULVEY, C. L., SILLIMAN, N., SCHAEFER, J., SAUSEN, M., JAMES, N., RETTIG, E. M., GUO, T., PICKERING, C. R., BISHOP, J. A., CHUNG, C. H., CALIFANO, J. A., EISELE, D. W., FAKHRY, C., GOURIN, C. G., HA, P. K., KANG, H., KIESS, A., KOCH, W. M., MYERS, J. N., QUON, H., RICHMON, J. D., SIDRANSKY, D., TUFANO, R. P., WESTRA, W. H., BETTEGOWDA, C., DIAZ, L. A., JR., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & AGRAWAL, N. 2015. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*, 7, 293ra104.
- WEBER, S., SPIEGL, B., PERAKIS, S. O., ULZ, C. M., ABUJA, P. M., KASHOFER, K., LEEST, P. V., AZPURUA, M. A., TAMMINGA, M., BRUDZEWSKY, D., ROTHWELL, D. G., MOHAN, S., SARTORI, A., LAMPIGNANO, R., KONIGSHOFER, Y., SPRENGER-HAUSSELS, M., WIKMAN, H., BERGHEIM, I. R., KLOTEN, V., SCHUURING, E., SPEICHER, M. R. & HEITZER, E. 2020. Technical Evaluation of Commercial Mutation Analysis Platforms and Reference Materials for Liquid Biopsy Profiling. *Cancers (Basel)*, 12.

4. Erklärung des Eigenanteils an der Studie

Die Studie erfolgte im Rahmen der Probengewinnung und Prozessierung der Biobank der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Der Ethikantrag hierfür wurde im Wesentlichen durch Dr. Simon erstellt (Ethikvotum PV7012, Ärztekammer Hamburg).

Der Doktorand betrieb die Literaturrecherche zur Eruierung der Zielsetzung der Studie und formulierte diese im Rahmen eines Exposés. Ebenso eruierte er gemeinsam mit Dr. David Muallah die passende Speichelprobengewinnung sowie die DNA-Extraktion aus Speichel- und Tumorproben und deren Lagerung. Der Doktorand organisierte die Abläufe der Probengewinnung und Prozessierung und erstellte gemeinsam mit PD Dr. Lan Kluwe und Dr. David Muallah Arbeits- und Laborprotokolle hierzu.

Die Probenakquise erfolgte im Wesentlichen durch Dr. Simon Burg, Dr. David Muallah, Audrey Grust und den Doktoranden, die Probenprozessierung erfolgte im Labor der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie durch das Laborpersonal bestehend aus PD Dr. Lan Kluwe, Dr. David Muallah, Ina Alster, Sophia Sommerbek und Catharina Czepluch.

Um das Projekt im Konzept der *Liquid Biopsies* durchzuführen, wurde eine Kooperation zwischen der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und dem Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vereinbart, dessen Direktor, Prof. Dr. Klaus Pantel, den Begriff der *Liquid Biopsies* etablierte. Kooperationspartner und Projektverantwortliche waren hierbei Prof. Dr. Harriet Wikman sowie Dr. Simon Burg und der Doktorand.

Um den technischen Ansatz der Massenspektrometrie zur genetischen Untersuchung der extrahierten DNA zu untersuchen, wurde zusammen mit dem Institut für Tumorbiologie durch Vermittlung von Prof. Dr. Harriet Wikman eine Kooperation mit der Firma Agena Bioscience, Hamburg, vertreten durch Dr. Alexander Sartori vereinbart. Dr. Simon Burg, Audrey Grust und der Doktorand verhandelten diese Kooperation wesentlich und legten das Procedere und das Gen PIK3CA als zu untersuchende Struktur fest. Die genetische Untersuchung mit der Massenspektrometrie wurde von Dr. Alexander Sartori, Maria Mesa und Eike Knust durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch PD Dr. Lan Kluwe, Dr. Alexander Sartori, Dr. David Muallah, Adrian Patenge und den Doktoranden. Der Doktorand interpretierte die Ergebnisse und führte die Literaturrecherche zur Einordnung dieser durch. Er schrieb die wissenschaftliche Veröffentlichung gemeinsam mit Audrey Grust. Wesentliche Korrekturen wurden hierbei durch Prof. Dr. Dr. Reinhard E. Friedrich, Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets, Dr. Simon Burg, Dr. David Muallah und Adrian Patenge vorgenommen.

5. Lebenslauf

Dr. med. Konstantin Krüger

geb. am 28.01.1993 in Frankfurt am Main
Eppendorfer Weg 205c, 20253 Hamburg
+49 152 29064363, konkruger@gmail.com



Stand: Juni 2024

Beruf

08/23 – heute	Selbstständigkeit als Berater im Bereich Medizindigitalisierung
09/22 – 04/24	Assistenzarzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg
02/21 – 02/22	Assistenzarzt für Anästhesie MVZ Perioperative Medizin München GmbH, München

Forschung

08/20 – heute	Zahnmedizinische Promotion Fachbereich Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie am UKE Hamburg - Betreuung durch Dr. Simon Burg und Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets Thema: PIK3CA Hotspot Mutationen im Speichel als diagnostischer Marker beim oralen Plattenepithelkarzinom
06/24	Publikation: International Institute of Anticancer Research <i>Krüger K, Grust A, Muallah D, Patenge A, Wikman H, Mesa MM, Knust ES, Sartori A, Smeets R, Kluwe L, Friedrich RE, Burg S. PIK3CA Hotspot Mutations in Saliva as a Diagnostic Marker in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. Anticancer Res. 2024 Jun;44(6):2369-2376. doi: 10.21873/anticancerres.17044. PMID: 38821622.</i>
04/17 – 03/21	Medizinische Promotion Fachbereich Radiologie am Klinikum der LMU München - Betreuung durch Prof. Dr. Clemens Cyran - Abschlussnote: magna cum laude / 1,0 Thema: Nicht-invasive Bestimmung des Differenzierungsgrades hepatisch metastasierter neuroendokriner Tumoren anhand der Radiomics basierten Bildanalyse von 68Ga DOTATATE PET/CT Daten

Ausbildung

04/17 – 04/22	Studium der Zahnmedizin, LMU München Abschlussnote: sehr gut / 1,4
04/13 – 11/19	Studium der Medizin Abschlussnote: gut / 2,3
04/15 – 11/19	Klinischer Abschnitt, LMU München
09/16 – 12/16	Auslandssemester, Università degli Studi di Milano, Mailand, Italien
04/13 – 03/15	Vorklinischer Abschnitt, WWU Münster
04/03 – 06/12	Besuch des Gymnasiums, Ratsgymnasium Bielefeld Abiturnote: 1,3
09/08 – 05/09	Auslandsjahr, Lycée Jean Macé, Rennes, Frankreich

Engagements und Praktika

10/21 – heute	Gründung der Initiative HowToDr. zur Förderung medizinischer Promotionen
07/22 – 08/22	Hilfseinsatz mit „Dentists Without Limits“ für ukrainische Geflüchtete in der Republik Moldau
11/18 – 11/19	Praktisches Jahr des Medizinstudiums
07/19 – 11/19	Tertial der Inneren Medizin, CHU Rangueil, Université Paul Sabatier, Toulouse, Frankreich
03/19 – 06/19	Tertial der Chirurgie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
01/19 – 03/19	Tertial der Anästhesie, Chulalongkorn Memorial University Hospital, Bangkok, Thailand
11/18 – 01/19	Tertial der Anästhesie, Policlinico Umberto I, Sapienza – Università di Roma, Rom, Italien
04/15 – 06/15	Praktikumssemester, SYNMICRO – Zentrum für Synthetische Mikrobiologie, Marburg Fokus: Oberflächenaufbau und räumliche Organisation bei <i>Bacillus subtilis</i>

Sprachkenntnisse

Deutsch	Englisch	Französisch	Italienisch	Russisch
Muttersprache	Niveau C1	Niveau B2	Niveau B1	Niveau A1

6. Danksagung

Ich danke dem Direktor des der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Prof. Dr. Dr. Martin Gosau sowie Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets und Prof. Dr. Dr. Reinhard E. Friedrich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, auf dem Feld der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie wissenschaftlich tätig sein zu dürfen sowie für die Unterstützung bei der Publikation der Studie.

Mein größter Dank und tiefe Verbundenheit gelten meinem Betreuer und Mentor Dr. Simon Burg, der mir die ersten Schritte des Operierens beibrachte und durch den ich erstmalig Wissenschaft mit Faszination und Freude verbinden durfte. Ich danke ihm für seine vorbildhafte Professionalität, seine Geradlinigkeit, seine Tapferkeit, seine Nähe und seine Führung – fachlich wie menschlich.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Harriet Wikman und dem Institut für Tumorbilogie, PD Dr. Lan Kluwe, Audrey Grust, Sophia Sommerbek, Catharina Czepluch und Ina Alster für die große Unterstützung bei der Durchführung der Studie, genauso wie Dr. Alexander Sartori, Maria Mesa, Eike Knust und der Firma Agena Bioscience. Mein Dank gilt zudem meinen Freunden und Kollegen Dr. David Muallah und Adrian Patenge für ihre wissenschaftliche Expertise und ihre aufopfernde Hilfe, ohne die die Erstellung der Publikation nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Anna Marie Eilerts und Nils Stockmann für die wegweisende Unterstützung bei der Umsetzung des im Rahmen meiner zweiten Promotion entstandenen Projekts HowToDr., das jungen Mediziner die Hand beim Einstieg in die Wissenschaft reichen und einen Beitrag zur Zukunft der Medizin leisten soll. Mein Dank gilt zudem meinen Freunden Jan Willenbacher und Maximilian Zauner, ohne die ich die Doktorarbeit neben dem Zahnmedizinstudium nicht hätte absolvieren können.

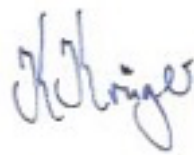
Ich danke meinen Eltern und meinen Geschwistern, meinen Corps und meinen Freunden, die mich zu dem Menschen haben werden lassen, der ich bin und die mir Anker und Peilung zugleich sind. Abschließend gilt mein Dank meinem Freund und langjährigem Berater Dr. Dr. Tobias Torsiglieri für den Traum der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.

7. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Krüger', is centered on the page.

Hamburg, den 12.06.2024

Dr. med. Konstantin Krüger