

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Prof. Dr. med. Dr. h. c.
Jakob R. Izbicki

Tenascin-C-Serum Levels and its Prognostic Power in Non-Small Cell Lung Cancer

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Suyin Sonja Gelis
aus Dortmund

Hamburg 2017

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.02.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Michael Tachezy

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Till Orla Klatte

Inhaltsverzeichnis

1. Publikation in gedruckter Originalversion	4
2. Darstellung der Publikation.....	12
2.1. Einleitung	12
2.2. Material und Methoden	16
2.2.1 Charakteristika der Patienten und gesunden Kontrollen.....	16
2.2.2 Enzym-linkedimmunosorbentassay (ELISA) für humanes Tenascin-C	17
2.2.3 Statistik.....	18
2.3 Ergebnisse	19
2.3.1 Tenascin-C Konzentration im Serum von NSCLC-Patienten und gesunden Kontrollen ..	19
2.3.2 Assoziation von Tenascin-C Konzentrationen und klinischen und pathologischen Parametern.....	20
2.3.3 Kaplan-Meyer Überlebenskurven für rezidivfreies Überleben in NSCLC-Patienten	22
2.3.4 Multivariate Analyse	23
2.4 Diskussion.....	25
2.5 Literaturverzeichnis	29
3. Zusammenfassung.....	32
3.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache	32
3.2 Zusammenfassung in englischer Sprache	33
4. Erklärung des Eigenanteils	35
5. Danksagung.....	36
6. Lebenslauf	37
7. Eidesstattliche Versicherung	38

Tenascin-C serum levels and its prognostic power in non-small cell lung cancer

Florian Gebauer^{1,*}, Suyin Gelis^{1,*}, Hilke Zander¹, Karl-Frederick Meyer¹, Gerrit Wolters-Eisfeld¹, Jakob R. Izbicki¹, Maximilian Bockhorn¹, Michael Tachezy¹

¹Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Michael Tachezy, e-mail: mtachezy@uke.de

Keywords: lung cancer, NSCLC, prognostic marker, biomarker, serum

Received: August 11, 2015 Accepted: January 17, 2016 Published: March 8, 2016

ABSTRACT

Background: Tenascin-C is overexpressed in the stroma of most solid malignancies and may function as a diagnostic tumor marker. This study was conducted to evaluate the potential significance of Tenascin-C as a predictive marker for tumor progression in the sera of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients.

Results: Serum concentration of Tenascin-C is significantly elevated in NSCLC patients compared to healthy controls ($p=0.013$). The sensitivity of Tenascin-C in detecting NSCLC was 74% at a specificity of 57%. Elevated Tenascin-C serum values are associated with larger tumor size and lymph node involvement ($p=0.022$ and $p=0.036$, respectively). The Kaplan-Meier-curves showed a significant association of Tenascin-C with the patient's overall survival ($p=0.004$), but not with the recurrence-free survival ($p=0.328$).

Methods: We quantified Tenascin-C in the sera of 103 NSCLC patients and 76 healthy blood donors by enzyme-linked immune-absorbance assay tests. Prognostic significance was determined by area under the curve analysis and Youden-index. The results were correlated with clinical, histopathological, and patient survival data (Chi-square test, Kaplan-Meier analysis, log-rank test, multivariate Cox-regression analysis).

Conclusion: Although significantly elevated in patients with NSCLC, the sensitivity and specificity of the Tenascin-C serum quantification test was low. However, although failing to be an independent prognosticator in multivariate analysis, the results implicate Tenascin-C as a predictive prognostic marker for NSCLC patients. The data must be further validated in future prospective trials with larger patient cohorts.

INTRODUCTION

Due to its aggressive biology, lung cancer causes the most cancer-related deaths worldwide [1]. Non-small-cell-lung cancer (NSCLC) accounts for 85% of all lung cancers with a high metastatic potential and a high rate of tumor recurrence, even after curative intended tumor resection. The prognosis for patients with NSCLC depends mainly on classical clinical aspects such as tumor size, grading and the existence of metastases; clinical decision-making is still based on the classical UICC staging system [2]. Although significant improvements of the individualized therapy for NSCLC patients have been made during the

last few years with introduction of several molecular markers (such as EGFR and EML4-Alk) in the clinical routine, the search for a clinically relevant serum marker as diagnostic and prognostic markers is still ongoing [3]. Tumor biomarkers with prognostic power regarding treatment success or prognostic impact on survival might significantly help to stratify the therapy of patients and improve the diagnosis and therapy.

In the case of NSCLC, known biomarkers such as SCCA, CYFRA and CEA show low sensitivities, bounded diagnostics and low aftercare value [4]. Extracellular matrix proteins play a significant role in the survival and metastasis of cancer cells. Thus,

a group of extracellular matrix proteins, the Tenascins, recently came into the focus of cancer research [5–7]. Tenascins are a group of extracellular matrix glycoproteins that are expressed during the development of multicellular organisms and in pathological processes such as inflammation and tissue injury as well as tumor angiogenesis and metastasis [8]. Tenascin-C is a multi-domain disulfide-linked homohexamer consisting of 15 EGF-like domains followed by 15 fibronectin-type-III domains and a C-terminal fibrinogen domain [9]. The Tenascin protein family consists of four members (-X, -R, -C, -W), of which Tenascin-X and -R are also present in differentiated, healthy tissues. However, in adults Tenascin-C and -W are expressed only in pathophysiological conditions such as cancer development [5]. A significant expression of Tenascin-C can be measured in embryogenesis, at sites with a high cell turnover, such as stem cell niches and wound healing and inflammatory diseases, i.e. rheumatoid arthritis [6]. Several isoforms of Tenascin-C are formed by alternative splicing and it was reported that especially its large isoform plays a decisive role in the regulation of angiogenesis and in tumorigenesis of cancer [9–11]. The prognostic significance of Tenascin-C expression was investigated in several malignant diseases, such as squamous cell carcinoma of the head and neck, breast, colorectal and prostatic cancer [12–16]. Little is known regarding the expression and functional role of the large isoform of Tenascin-C in NSCLC, it is overexpressed in specimens of NSCLC and Parekh and colleagues described increased expression in patients with an early recurrence of disease [17–20]. In an analysis of endobronchial epithelial-lining fluid of NSCLC patients,

Tenascin-C was significantly elevated and the authors suggested that it might be a potential diagnostic tool for early cancer detection [21]. Ishiwata and colleagues described a significant correlation of overall survival and elevated Tenascin-C serum values in a cohort of 63 NSCLC patients, but there was no association of clinical and pathological data and the molecule [22]. Moreover, Tenascin-C expression was investigated in COPD lung specimen and patients' serum with divergent results [23, 24].

We conducted the present study to determine the association between preoperatively sampled serum values of the large isoform of Tenascin-C and clinical and histopathological data and to evaluate its significance as a diagnostic and prognostic marker of resectable NSCLC patients.

RESULTS

Serum Tenascin-C levels in NSCLC patients and healthy controls

Tenascin-C concentration in NSCLC-patients was significantly elevated ($n=103$, mean 5.5 ng/ml, standard deviation (SD) ± 3.8 ng/ml) compared to healthy blood donors ($n=76$, mean 6.3/ml, SD ± 6.6 ng/ml, $p=0.013$; Figure 1A). Receiver operating characteristic curves were used to establish the sensitivity-specificity relationship for Tenascin-C (1B). The AUC was 0.690. The cut-off level determined by the Youden index was 35.6 ng/ml. The sensitivity of Tenascin-C in detecting NSCLC was 74.4% at a specificity of 57.4% compared to the control group.

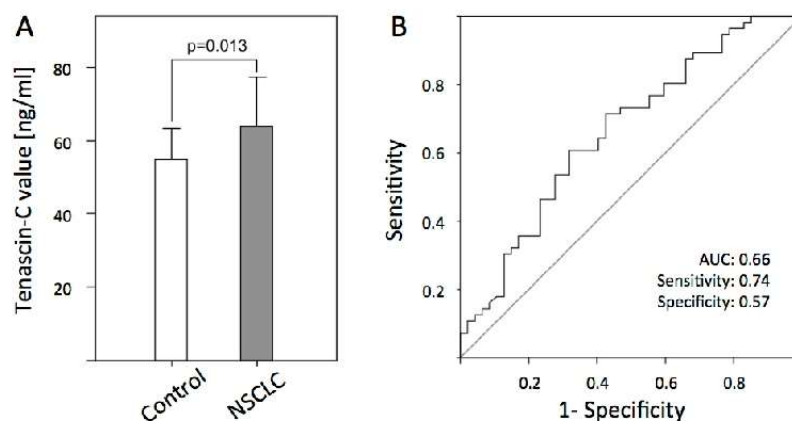


Figure 1: Serum concentration of Tenascin-C in healthy controls and non-small-cell bronchogenic carcinoma (NSCLC) patients. A. Bars represent the mean of $n=76$ healthy controls and $n=116$ NSCLC patients as determined by ELISA ($p<0.013$). B. Receiver operating characteristic (ROC) curves of Tenascin-C for the diagnosis of NSCLC patients versus healthy control samples.

Table 1: Association of clinicopathological characteristics of NSCLC patients and Tenascin serum levels

		All (n)	Tenascin-C high (n and %)	Tenascin-C low (n and %)	Significance (p)
Age (cut65)	<65	43	18 (42%)	25 (58%)	1.000
	≥ 65	60	25 (42%)	35 (58%)	
Sex	Male	70	31 (44%)	39 (58%)	0.523
	Female	33	12 (36%)	21 (64%)	
Asbestos exposition[†]	Yes	5	2 (40%)	3 (60%)	1.000
	No	85	35 (41%)	50 (59%)	
Nicotine abuse[†]	Yes	15	5 (33 %)	10 (67%)	0.579
	No	76	32 (42%)	44 (58%)	
Neoadjuvant Therapy[†]	Yes	82	32 (39%)	50 (61%)	0.347
	No	11	6 (55%)	5 (45%)	
Tumor size[†]	pT1+2	74	26 (35%)	48 (65%)	0.022
	pT3+4	20	13 (65%)	7 (35%)	
Lymph nodes[†]	pN0+N1	45	13 (29%)	32 (71%)	0.036
	pN2+N3	50	26 (52%)	24 (48%)	
Distant metastases[†]	M0	94	38 (40%)	56 (60%)	1.000
	M1	8	4 (50%)	4 (50%)	
Grading[†]	G1 and G2	41	16 (39%)	25 (61%)	1.000
	G3	51	21 (41%)	30 (59%)	
Cell type	Adeno	39	13	26	0.115
	Squamous Cell	37	21	16	
	Large Cell	12	6	6	
Resection[†]	R0	68	25 (37%)	43 (63%)	0.419
	R1	7	4 (57%)	3 (43%)	
30-day Mortality[†]	Yes	10	3 (30%)	7 (70%)	0.516
	No	91	39 (43%)	52 (57%)	
Adjuvant Therapy[†]	Yes	42	17 (41%)	25 (59%)	1.000
	No	51	21 (41%)	30 (59%)	

[†]Due to the retrospective character of the study, numbers do not always add up to 103 patients.

Association of Tenascin-C serum concentrations and clinical and pathological parameter

Patients were divided into low level (<8.33 ng/ml) and high-level Tenascin-C groups (≥8.33 ng/ml). The correlation of clinico-pathological data with Tenascin-C using cross tabulation showed a significant association of increased Tenascin-C and tumor sizes (pT3 and pT4 compared to pT1 and pT2 p = 0.022) and the status of the lymph nodes (pN2 and pN3 versus pN1; p = 0.036), respectively. Clinical parameters such as age, sex, perioperative mortality (30 days), resection, nicotine

abuse, asbestos exposure, neoadjuvant therapy and adjuvant therapy did not show any significant differences compared to controls. We found no significant correlation of Tenascin-C with the development of distant metastases; however, we only assessed a very small number (n=3) of metastasized patients (Table 1).

Kaplan-Meyer survival curve for recurrence-free survival in NSCLC patients

Survival curves plotted by the Kaplan-Meier analysis (log-rank test) did not show a significant

correlation of Tenascin-C-level and RFS (median calculated RFS 41.3 months and 24 months, respectively; $p=0.328$, Figure 2A). In contrast, prolonged OS was significantly associated with a lower Tenascin-C serum value ($p=0.004$, Figure 2B). Patients with concentrations under 8.33 ng/ml showed a median OS of 48.1 months, whereas those with concentrations over 8.33 ng/ml only survived for 15.4 months as a median.

Multivariate analysis

In univariate survival analysis performed by cox-regression, a significant impact of clinic-pathological data such as tumor size, lymph node status, resection, grading and distant metastasis was shown (Table 2). While a significant factor in univariate analysis, Tenascin-C failed to be an independent prognosticator for survival in multivariate analysis. The analysis identified the resection status (R) and the tumor cell grading (G) as independent characteristics.

DISCUSSION

The aim of the current study was to evaluate the potential of Tenascin-C serum quantification (large isoform) as a diagnostic and prognostic marker in the peripheral blood of NSCLC patients. Until now, only few groups have analyzed the functional role of Tenascin-C in NSCLC. The results showed that Tenascin-C serum levels were significantly elevated compared to the sera of healthy controls ($p<0.001$). The AUC showed an acceptable discriminatory power of Tenascin-C (AUC = 0.66; Figure 1B). The sensitivity (74%) and specificity (57%) of Tenascin-C was clearly inferior to the most frequently used tumor markers for NSCLC, SCCA, NES

or CEA [25]. These data, which are similar to those of Ishiwata and colleagues, who did not find a significant difference between NSCLC patient sera and healthy controls, enabled us to conclude that Tenascin-C might not be a proper screening tool for the diagnosis of NSCLC [22]. Another aspect underlying this hypothesis is the potential overexpression of Tenascin-C in COPD patients and smoking, which are frequent comorbidities of NSCLC patients [23, 24, 26].

We furthermore investigated the correlation of Tenascin-C serum values and histopathological factors, which revealed a significant association of elevated Tenascin-C values with larger tumor sizes and lymph node metastasis ($p=0.022$ and $p=0.036$, respectively), indicating a relatively elevated Tenascin-C expression and release in higher tumor stages with a larger tumor burden. This is contradictory to the results of Ishiwata and colleagues, who revealed no association with tumor stage [22].

According to our findings, patients with higher Tenascin-C serum values have a shortened OS compared to the low Tenascin-C group. These correlations were already indicated by Parekh and colleagues, who had a small cohort of ten patients and found elevated Tenascin-C mRNA and protein expression in patients with early recurrence of the disease and later confirmed by Ishiwata and colleagues, who described a significant correlation in a group of 63 patients [19]. However, as the multivariate Cox regression analysis in the present study failed to reveal Tenascin-C as an independent prognostic parameter for overall survival ($p=0.354$), the role as a potential prognostic tumor marker for NSCLC patients remains inconclusive. However, data on serum levels were published in few studies only. Depending on the tumor type, the findings of Tenascin-C serum levels and linkage to clinical parameter are variable. For example, analysis

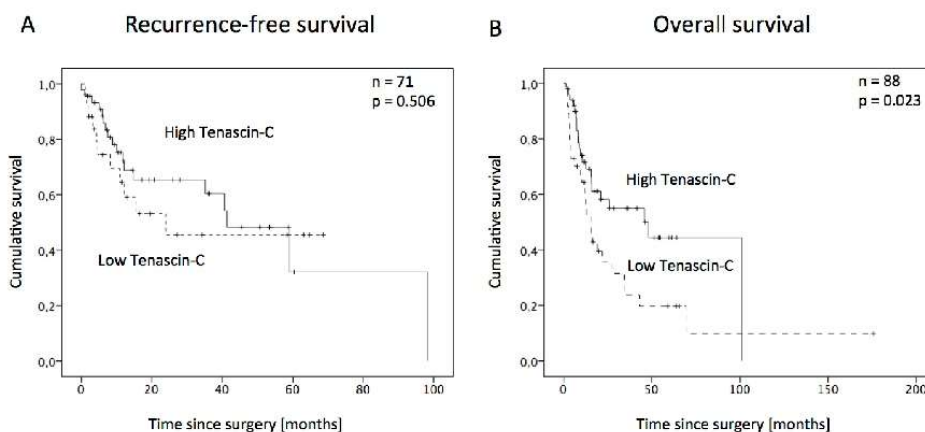


Figure 2: Kaplan-Meier survival curve for recurrence-free survival. A. and overall survival B. in NSCLC patients after surgery for Tenascin-C low- and high-level group.

Table 2: Prognostic value of Tenascin-C expression for overall survival in univariate and multivariate analyses by Cox regression

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95%CI	P-value	HR	95%CI	P-value
Age	1.325	0.940/1.868	0.108	-	-	-
Sex	0.882	0.614/1.268	0.498	-	-	-
Tumor size (pT3/4 vs 1/2)	2.135	1.434/3.233	0.001	1.606	0.706/3.652	0.259
Lymph node metastases (pN2/3 vs 1/2)	1.850	1.301/2.630	0.001	2.098	0.901/4.885	0.086
Resection margin (R1/2 vs 0)	2.360	1.411/3.948	0.001	3.470	1.163/10.355	0.026
Grading (G3 vs 1/2)	1.600	1.129/2.269	0.008	2.853	1.310/6.213	0.008
Distant metastases (M1 vs M0)	2.806	1.220/6.457	0.015	1.105	0.218/5.600	0.904
Tenascin-C (low vs high)	2.374	1.301/4.321	0.005	1.434	0.669/3.074	0.354

(HR- hazard ratio; CI- confidence interval)

of Tenascin-C serum levels in breast and ovarian cancer did not reveal any correlations to the overall-survival or clinical data [27, 28].

Several studies have investigated the expression of Tenascin-C in various solid tumors and tumor microenvironments and supposed a functional role in tumor progression, migration and the formation of metastases [6]. Interestingly, some researchers identified low Tenascin-C as a marker for a better prognosis for some diseases [29–31], but others described a contrary effect, a correlation of high Tenascin-C and a better prognosis [32, 33]. These results are not surprising, as Tenascin-C mediates complex remodeling of the tumor microarchitecture by close interactions between tumor cells and surrounding stromal cells. Expression of Tenascin-C is associated with intra-tumoral angiogenesis i.e. micro-vessel density and a pro-migratory influence on endothelial cell migration [22]. Tenascin-C expression was found in both, stromal and cancer cells and has a direct influence on epithelia-mesenchymal transition.

Another functional role of Tenascin-C is immune-modulatory; it inhibits the proliferation of blood lymphocytes *in vitro* and interferon-gamma production by tumor-infiltrating lymphocytes isolated from NSCLC specimens [19]. The results of these studies might reveal an association between Tenascin-C and a malignant biology, which results in an elevated shedding of

Tenascin-C by matrix metalloproteinases (MMPs) such as MMP-13 [34]. Additionally, the shedding of the molecule might be caused by a transformation of the surrounding tumor environment. Both mechanisms, the regulation of the molecule's shedding, the migration into the tumor environment and even the access into the bloodstream through the endothelial barrier are understood only in part. However, the elevated expression of Tenascin C in tumor tissue and corresponding serum levels is in line with the well-established idea of a relationship between inflammation and cancer. But, as previously shown, the immune response during malignant progression and treatment resistance is a dynamic process and can even initiate pathways that are pro-tumorigenic [35]. The interactions of the immune system with tumor cells are of high complexity since several different types of cells and, in addition, sub-differentiations in dependency of the surrounding cytokine environment, are reported. The effects, how inflammation promotes tumor initiation, progression and treatment resistance are still poorly understood.

In summary, the detected Tenascin-C might be a useful prognostic parameter, which power might be increased by combination with others. It could reveal additional discriminatory or prognostic power additional to innovative staging parameter, such as circulating disseminated tumor cells status or other molecular

markers together and to established systems, such as the TNM staging. The goal is to identify those patients, which might best profit from the available treatments to tailor an individual therapy for each patient.

Further prospective studies with larger patient cohorts are needed to evaluate the predictive potential of Tenascin-C serum levels. Moreover, the functional role of Tenascin-C in NSCLC is poorly understood and needs to be investigated in *in vitro* and *in vivo* analyses; to increase the knowledge of Tenascin-C associated tumor proliferation and metastatic invasion.

MATERIALS AND METHODS

Characteristics of patients and healthy controls

Blood sera of Caucasian 103 patients, aged between 31 and 82 years (median 65.5 years) with the diagnosis of NSCLC and Caucasian 76 healthy blood donors, aged between 31 and 79 (median 51 years), were included in this study. All patients were treated surgically between 1993 and 2010 in the Department of General, Visceral and Thoracic Surgery of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany. All blood samples were obtained directly before surgery. All sera were processed at the latest after four hours [36]. Operation methods were oncological lobectomies, bilobectomies and pneumectomies with hilar and mediastinal lymphadenectomy.

All data including sex, histology, tumor size, lymph node metastasis, disease stage (UICC 7th edition) and follow-up data were obtained from a combination of clinical and pathological record reviews, from outpatient clinic medical records and communication with patients and their attending physicians, and from the cancer registry. Reliable follow-up data were available for 88 patients. Written consent for using the samples for research purposes was obtained from all patients prior to surgery or blood drawing.

The Ethics Committee of the Chamber of Physicians in Hamburg, Germany approved the study. The study was performed in accordance with the principles of the declaration of Helsinki (as revised in Seoul 2008) and REMARK criteria [37].

Disease-free survival (DFS) was calculated from the date of operation to the first detection of tumor recurrence, while overall survival (OS) was accordingly from the date of operation to the date of death or last follow-up. Patients who did not survive the first 30 days after surgery were excluded from the survival analysis. Median follow-up time of the patients included in the survival analysis was 12.2 months (range 0-176 months); median calculated OS was 27.6 months (95% CI 9.7-45.4 months). Four (6.8%) patients died within the first 30 days after surgery.

Enzyme-linked immunosorbent assay for human Tenascin-C

The serum concentration of human Tenascin-C was quantified using a TNC-ELISA (ELISA (Human Tenascin-C Large Assay Kit - Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Japan) according to the manufacturer's instructions.

In brief, a microtiter plate pre-coated with monoclonal mouse anti-human Tenascin-C antibody (4C8MS) was incubated with the serum of NSCLC patients and serum of healthy controls, respectively for 1h at 37°C. After washing, a HRP conjugated anti-Tenascin-C mouse antibody (4F10TT) specific for the EGF-like domain was added and incubated for 30 min at 4°C. Another washing step followed before the addition of Tetra-Methyl-Benzidine as the coloring agent (Chromogen) for 30 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 1N H₂SO₄ solution. The absorbance was measured at 450 nm on an ELISA reader (Dynatech MR5000; Pegasus Scientific, Rockville, MD, USA).

In order to ensure that the immunoassay was suitable for measuring clinical serum samples, reproducibility and linearity were examined. The assay showed excellent linearity with serial dilutions and showed <10% coefficient of variation (CV) for the intra- and inter-assay variability studies.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using SPSS Statistics for Windows (Version 20, SPSS Inc., Chicago Ill, USA). Interdependence between ELISA results and clinical data was calculated using Chi-square and Fisher's exact tests and displayed in cross tables. The cut-off level for Tenascin-C quantification was determined using the Youden-index. Group differences were calculated by the t-test, ANOVA; Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method and analyzed using the log-rank test. All tests were two-sided and p-values less than 0.05 were considered statistically significant. All variables achieving a P value ≤ 0.05 were included in a multivariate Cox regression model for determining independent prognosticators of DFS and OS.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients who willingly and generously provided data and samples for research purposes.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

- Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010; 19:1893-1907.
- Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010; 17:1471-1474.
- Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism*. 2014.
- Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer. *Advances in clinical chemistry*. 2006; 42:1-41.
- Yoshida T, Akatsuka T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C and integrins in cancer. *Cell Adhesion & Migration*. 2015; 9(1-2):96-104.
- Giblin SP, Midwood KS. Tenascin-C: form versus function. *Cell adhesion & migration*. 2015; 9:48-82.
- Spénlé C, Saupe F, Midwood K, Burkel H, Noel G, Orend G. Tenascin-C: exploitation and collateral damage in cancer management. *Cell adhesion & migration*. 2015; 9:141-53.
- Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer letters*. 2006; 244:143-163.
- Pas J, Wyszko E, Rolle K, Rychlewski L, Nowak S, Zukiel R, Barciszewski J. Analysis of structure and function of tenascin-C. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006; 38:1594-1602.
- Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Developmental dynamics*. 2000; 218:235-259.
- Tsunoda T, Inada H, Kalembeiyi I, Imanaka-Yoshida K, Sakakibara M, Okada R, Katsuta K, Sakakura T, Majima Y, Yoshida T. Involvement of large tenascin-C splice variants in breast cancer progression. *The American journal of pathology*. 2003; 162:1857-1867.
- Borsi L, Camemolla B, Nicolò G, Spina B, Tanara G, Zardi L. Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *International journal of cancer*. 1992; 52:688-692.
- Pauli C, Stieber P, Schmitt U, Andratschke M, Hoffmann K, Wollenberg B. The significance of Tenascin-C serum level as tumor marker in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer research*. 2001; 22:3093-3097.
- Atula T, Hedstrom J, Finne P, Leivo I, Markkanen-Leppanen M, Haglund C. Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer research*. 2003; 23(3C):3051-3056.
- Hauptmann S, Zardi L, Siri A, Camemolla B, Borsi L, Castellucci M, Klosterhalfen B, Hartung P, Weis J, Stöcker G. Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas. Expression of tenascin and fibronectin isoforms. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1995; 73:172-182.
- Ibrahim SN, Lightner VA, Ventimiglia JB, Ibrahim GK, Walther PJ, Bigner DD, Humphrey PA. Tenascin expression in prostatic hyperplasia, intraepithelial neoplasia, and carcinoma. *Human pathology*. 1993; 24:982-989.
- Kusagawa H, Onoda K, Namikawa S, Yada I, Okada A, Yoshida T, Sakakura T. Expression and degeneration of tenascin-C in human lung cancers. *British journal of cancer*. 1998; 77:98.
- Oyama F, Hirohashi S, Shimamoto Y, Titani K, Sekiguchi K. Qualitative and quantitative changes of human tenascin expression in transformed lung fibroblast and lung tumor tissues: comparison with fibronectin. *Cancer research*. 1991; 51:4876-4881.
- Parekh K, Ramachandran S, Cooper J, Bigner D, Patterson A, Mohanakumar T. Tenascin-C, over expressed in lung cancer down regulates effector functions of tumor infiltrating lymphocytes. *Lung Cancer*. 2005; 47:17-29.
- Cai M, Onoda K, Takao M, Kyoko I-Y, Shimpō H, Yoshida T and Yada I. Degradation of tenascin-C and activity of matrix metalloproteinase-2 are associated with tumor recurrence in early stage non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research*. 2002; 8:1152-1156.
- Kahn N, Meister M, Eberhardt R, Muley T, Schnabel PA, Bender C, Johannes M, Keitel D, Sülthmann H, Herth FJ. Early detection of lung cancer by molecular markers in endobronchial epithelial-lining fluid. *Journal of Thoracic Oncology*. 2012; 7:1001-1008.
- Ishiwata T, Takahashi K, Shimanuki Y, Ohashi R, Cui R, Takahashi F, Shimizu K, Miura K, Fukuchi Y. Serum tenascin-C as a potential predictive marker of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 2005; 25(1B):489-495.
- Munoz-Esquerre M, Huertas D, Escobar I, Lopez-Sanchez M, Penin R, Peinado V, Barbera JA, Molina-Molina M, Manresa F, Dorca J, Santos S. Gene and Protein Expression of Fibronectin and Tenascin-C in Lung Samples from COPD Patients. *Lung*. 2015; 193:335-343.
- Lofdahl M, Kaarteenaho R, Lappi-Blanco E, Tornling G, Skold MC. Tenascin-C and alpha-smooth muscle actin positive cells are increased in the large airways in patients with COPD. *Respir Res*. 2011; 12:48.
- Wang R, Wang G, Zhang N, Li X, Liu Y. Clinical Evaluation and Cost-Effectiveness Analysis of Serum Tumor Markers in Lung Cancer. *BioMed Research International*. 2013; 2013:7.
- Karvonen HM, Lehtonen ST, Harju T, Sormunen RT, Lappi-Blanco E, Makinen JM, Laitakari K, Johnson S, Kaarteenaho RL. Myofibroblast expression in airways and alveoli is affected by smoking and COPD. *Respir Res*. 2013; 14:84.

27. Didem T, Faruk T, Senem K, Derya D, Murat S, Murat G, Oznur K. Clinical significance of serum tenascin-c levels in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biology*. 2014; 35:6777-6782.
28. Tastekin D, Tas F, Karabulut S, Duranyildiz D, Serilmez M, Guveli M, Vatansever S. Clinical significance of serum tenascin-C levels in breast cancer. *Tumor Biology*. 2014; 35:6619-6625.
29. Juhász A, Bárdos H, Répássy G, Ádány R. Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. *The Laryngoscope*. 2000; 110:84-92.
30. Jähkola T, Toivonen T, Virtanen I, von Smitten K, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C, Nevanlinna H, Blomqvist C. Tenascin-C expression in invasion border of early breast cancer: a predictor of local and distant recurrence. *British journal of cancer*. 1998; 78:1507.
31. Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T. Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clinical cancer research*. 1995; 1:1035-1041.
32. Iskaros BF, Tanaka KE, Hu X, Kadish AS, Steinberg JJ. Morphologic pattern of tenascin as a diagnostic biomarker in colon cancer. *Journal of surgical oncology*. 1997; 64:98-101.
33. Pilch H, Schäffer U, Schlenger K, Lautz A, Tanner B, Höckel M, Knapstein P. Expression of tenascin in human cervical cancer—association of tenascin expression with clinicopathological parameters. *Gynecologic oncology*. 1999; 73:415-421.
34. Hancox RA, Allen MD, Holliday DL, Edwards DR, Pennington CJ, Guttery DS, Shaw JA, Walker RA, Pringle JH, Jones JL. Tumour-associated tenascin-C isoforms promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase-dependent and independent mechanisms. *Breast Cancer Res*. 2009; 11:R24.
35. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*. 2008; 358:2704-2715.
36. Tuck MK, Chan DW, Chia D, Godwin AK, Grizzle WE, Krueger KE, Rom W, Sanda M, Sorbara L, Stass S. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *Journal of proteome research*. 2008; 8:113-117.
37. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *British journal of cancer*. 2005; 93:387-391.

2. Darstellung der Publikation

2.1. Einleitung

Lungenkarzinome verursachen weltweit die häufigsten durch Krebs herbeigeführten Todesfälle und sind im Allgemeinen durch ein aggressives Wachstum charakterisiert (Jemal 2010). Die Hauptursache für die Entwicklung aller Formen des Bronchialkarzinoms ist Nikotinabusus, mehr als 85% der Patienten mit Bronchialkarzinomen sind Raucher. Bronchialkarzinome können anhand histologischer Merkmale u.a. in kleinzellige und nicht kleinzellige Bronchialkarzinome eingeteilt werden. 85% der Lungenkarzinome gehören zur Gruppe der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC), welche die histologischen Typen des Plattenepithelkarzinoms (30-40%), Adenokarzinoms (25-30%) und großzelligem Bronchialkarzinoms (>10%) umfasst. Sie sind charakterisiert durch eine frühe lymphogene Metastasierung und eine hohe Rezidivrate, auch nach kurativer Tumoresektion. Eingeteilt werden NSCLC nach dem TNM-System in verschiedene Stadien. Die Prognose ist abhängig vom Stadium, Entscheidungen zum weiteren klinischen Vorgehen basieren immer noch auf dem UICC-Staging (Edge 2010). Obwohl die Therapie in den letzten Jahren deutlich verbessert und individualisiert wurde, konnte noch kein valider Biomarker zur Diagnose oder Prognoseabschätzung identifiziert werden (Kalia 2014). Die Identifikation eines geeigneten Biomarkers mit prognostischer Relevanz bezüglich des Erfolges einer Therapiemaßnahme oder des Überlebens des Patienten kann für die Therapie- und Diagnostikentwicklung einen signifikanten Beitrag leisten. Bisher untersuchte Biomarker für NSCLC, wie SCCA, CYFRA und CEA haben eine niedrige Sensitivität sowie geringe diagnostische und therapeutische Relevanz

(Schneider 2006).

Die extrazelluläre Matrix der Lunge besteht hauptsächlich aus Kollagenen, elastischen Fasern, Proteoglycanen, Fibronectin und Tenascinen (Jones und Jones 2000).

Extrazelluläre Matrixproteine scheinen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und Tumorprogression zu spielen. So gelangte eine Gruppe extrazellulärer Matrixproteine, die Tenascine, seit ihrer Entdeckung in den Fokus der onkologischen Forschung (Yoshida et al. 2015, Spenlé et al. 2015, Orend und Chiquet-Ehrismann 2006). Die Gruppe umfasst vier in höheren Vertebraten gencodierte Proteine: Tenascin-C, -W, -X und -R. Die einzelnen Vertreter der Gruppe ähneln sich in Ihrer oligomeren Struktur. Jedes Monomer enthält eine N-terminale Domäne, gefolgt von EGF-like repeats und einer durch alternatives Splicen variable Anzahl von Fibronectin-TyplII-repeats abgeschlossen von einem großen C-Terminus (Pas et al. 2006). An der N-terminalen Domäne formen sich die Tenascine disulfid-verknüpft zu trimeren (Tenascin-X, -R) oder hexameren (Tenascin-C, -W) Molekülen. Alle Tenascine spielen allgemein eine Rolle in der Modulation der Zelladhäsion ebenso wie in der zellulären Antwort auf Wachstumsfaktoren und sind bei Inflammation, Gewebsschädigung und Tumorgenese hoch-bzw. herunterreguliert (Orend und Chiquet-Ehrismann 2006). Jede Form folgt ihrem eigenen spezifischen Expressionsmuster (Chiquet-Ehrismann et al. 2014).

So wird Tenascin-R fast ausschließlich in Neuronen des ZNS gefunden und die Expression bei Verletzungen oder Tumoren in diesem Bereich hochreguliert (Chiovaro et al. 2015). Tenascin-X kommt in kollagenreichem Gewebe wie der Dermis und Blutgefäßen vor (Tucker und Chiquet-Ehrismann 2009). In der Tumorbilogie scheint es den Effekten von Tenascin-C gegenläufig zu sein und ist

beispielsweise in Melanomen herunterreguliert und scheint ein Marker für die Prognoseabschätzung des malignen Mesothelioms zu sein. Tenascin-W ist das dem Tenascin-C am meisten verwandte Mitglied der Proteinfamilie, strukturell ebenso wie bezüglich des Expressionsmusters (Chiovaro et al. 2015). Beide haben eine Bedeutung in der Tumorgenese und möglicherweise prognostische Bedeutung bei einigen Entitäten.

Tenascin-C ist ein onkofetales Protein und wird transient in verschiedenen Geweben während der Embryogenese physiologischer Weise exprimiert. Im adulten Gewebe ist das Vorkommen normalerweise auf wenige Gewebe beschränkt. So findet es sich in Geweben, die hoher Zugkraft ausgesetzt sind, wie Sehnen, Bändern und der glatten Muskulatur der Arterienwände und Hypertension scheint mit einer erhöhten Expression verbunden zu sein (Chiquet-Ehrismann et al. 2014). Im Rahmen pathologischer Prozesse wie Inflammation, mechanischer oder chemischer Gewebeschädigung und Wundheilung kann die Expression, induziert von Zytokinen, von allen Geweben ausgehen. Weiterhin wurde gezeigt, dass Tenascin-C im Stroma verschiedener solider maligner Tumoren, wie z.B. die des Colon, der Mama und der Lunge, überexprimiert wird (Yoshida und Akatsuka 2015). Die prognostische Relevanz der Tenascin-C Expression wurde in verschiedenen malignen Erkrankungen beschrieben, zum Beispiel beim Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses, dem Mamma-, kolorektalen- und Prostatakarzinom (Borsi et al. 1992, Pauli et al. 2001, Atula et al. 2003, Hauptmann et al. 1995, Ibrahim et al. 1993). Durch alternatives Splicing werden verschiedene Isoformen von Tenascin-C generiert, wobei insbesondere die hochmolekulare Isoform mit der Angiogenese und Tumorgenese von Karzinomen assoziiert ist (Pas et al. 2006, Jones und Jones 2000, Tsunoda et al. 2003). Im Hinblick auf die Rolle von Tenascin-C bei der Progression von Lungenkarzinomen konnte eine erhöhte

Expression auch speziell beim NSCLC gefunden werden. Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurde Tenascin-C das Ziel verschiedener therapeutischer Ansätze mit vielversprechenden Ergebnissen (Giblin und Midwood 2015).

Bezüglich der Expression und der funktionellen Rolle von Tenscin-C in NSCLC ist jedoch bisher wenig bekannt. Neben der erhöhten Expression in NSCLC beschrieben Parekh und Kollegen eine Korrelation der Höhe mit dem Auftreten früher Rezidive bei Patienten mit NSCLC (Parekh et al. 2005, Kusagawa et al. 1998, Oyama et al. 1991, Cai et al. 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Tenascin-C Konzentration im Bronchialsekret bei NSCLC-Patienten signifikant erhöht ist, was zu der Annahme führte, dass mit diesem Protein möglicherweise ein Marker für die frühe Detektion von Karzinomen gefunden wurde (Kahn et al. 2012). Ishiwata und Kollegen fanden außerdem bei der Untersuchung einer Kohorte von 63 NSCLC-Patienten eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Tenascin-C Werten im Serum und deren Gesamtüberleben, konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem Protein und klinisch-pathologischen Daten finden (Ishiwata et al. 2005).

Ziel unserer Studie war zum einen die Erfassung eines Zusammenhags zwischen den präoperativen Tenascin-C Konzentration im Serum von NSCLC-Patienten und klinischen und histopathologischen Daten. Zum anderen haben wir die potentielle Signifikanz von Tenascin-C als prädiktiver Marker der Tumorprogression im Serum von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom evaluiert.

2.2. Material und Methoden

2.2.1 Charakteristika der Patienten und gesunden Kontrollen

Das Blutserum von 103 kaukasischen Patienten mit einem Alter zwischen 31 und 82 Patienten (Median 65,5 Jahre) mit histologisch gesichertem NSCLC und 76 kaukasischen gesunden Blutspendern mit einem Alter zwischen 31 und 79 (Median 51 Jahre), wurden in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten wurden chirurgisch zwischen 1993 und 2010 in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, Deutschland behandelt. Alle Blutproben wurden direkt vor dem chirurgischen Eingriff gewonnen. Alle Seren wurden innerhalb von vier Stunden analysiert (Tuck et al. 2008). Die Operationsmethoden beinhalten die onkologische Lobektomie, Bilobektomie und Pneumektomie mit hilärer und medialstinaler Lymphadenektomie.

Die erhobenen Daten beinhalten Geschlecht, Alter, Histologie, Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Krankheitsstadium (UICC, siebte Edition) sowie Follow-up-Daten. Verlässliche Follow-up Daten waren für 88 Patienten verfügbar. Die schriftliche Einwilligung der Patienten für die Verwendung der Proben zu Forschungszwecken wurde vor dem chirurgischen Eingriff bzw. der Probeentnahme eingeholt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt. Die Studie wurde in Übereinkunft mit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki (Seol 2008) und den REMARK Kriterien durchgeführt (McShane et al. 2005).

Das krankheitsfreie Überleben wurde ab dem Zeitpunkt der OP bis zur ersten Detektion eines Tumorrezidivs kalkuliert, während das Gesamtüberleben vom Zeitpunkt der OP bis zum Todeszeitpunkt oder dem letzten Follow-up erhoben

wurde. Patienten, die innerhalb der ersten 30 Tage nach OP starben, wurden aus der Überlebensanalyse ausgeschlossen. Der mediane Follow-up-Zeitraum der eingeschlossenen Patienten betrug 12.2 Monate (0-176 Monate). Das kalkulierte mediane Gesamtüberleben betrug 27.6 Monate (95% Konfidenzintervall 9.7-45.4 Monate). Vier (6.8%) Patienten starben innerhalb der ersten 30 Tage nach der OP.

2.2.2 Enzym-linkedimmunosorbentassay (ELISA) für humanes Tenascin-C

Die Serum-Konzentration von Tenascin-C wurde mittels TNC-ELISA (ELISA (Human Tenascin-C Large Assay Kit – Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Japan) nach Angaben des Herstellers quantifiziert.

Eine mit monoklonalen Maus anti-humanem Tenascin-C Antikörper (4C8MS) vorbeschichtete Mikrotiterplatte wurde mit Serum von NSCLC Patienten und Serum von gesunden Kontrollen für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend gewaschen. Ein HRP- gekoppelter anti-Tenascin-C Maus Antikörper (4F10TT), der spezifisch für die EGF-like Domäne ist, wurde hinzugefügt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Tetra-Methyl-Benzidin als Chromogen hinzugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1N H₂SO₄ –Lösung gestoppt und die Absorption bei 450nm mit einem ELISA-reader (Dynatech MR5000, Pegasus Scientific, Rockville, MD, USA) gemessen.

Zur Testvalidierung für die Messung klinischer Proben wurde die Reproduzierbarkeit und Linearität der Ergebnisse ermittelt. Der Test zeigte hervorragende Ergebnisse bei der Linearitätsmessung der seriellen Verdünnung und einen Variationskoeffizient von <10% für die intra- und interassay Variabilität.

2.2.3 Statistik

Die statistische Analyse wurde mittels SPSS für Windows (Version 20, SPSS Inc., Chicago Ill, USA) durchgeführt. Abhängigkeiten zwischen den ELISA-Ergebnissen und den klinischen Daten wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests und Fisher's Tests ermittelt und mit Kreuztabellen angezeigt. Die Grenzwerte für die Tenascin-C Quantifizierung wurden mit dem Youden-Index ermittelt. Gruppendifferenzen wurden mit dem t-test, ANOVA, Mann-Whitney oder Kruskal-Wallis-Test berechnet. Die Überlebenskurven wurden mit der Kaplan-Meyer-Methode erstellt und mit dem Log-Rank-Test analysiert. Statistisch signifikant waren die p-Werte <0.05 . Alle Variablen mit einem p-Wert <0.05 wurden in die multivariaten Cox-Regressionsanalyse zur Ermittlung unabhängiger Faktoren für die Bestimmung des Gesamt-bzw. rezidivfreie Überleben eingeschlossen.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Tenascin-C Konzentration im Serum von NSCLC-Patienten und gesunden Kontrollen

Die Serum-Konzentration von Tenascin-C ist bei Patienten mit NSCLC (n=103, Mittelwert 6.3ng/mL, Standardabweichung (SD) 6.6ng/mL) im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht (n=76, Mittelwert 5.5ng/mL, SD 3.8, $p=0.013$; Abbildung 1A). Durch die Erstellung einer Receiver-Operating-Characteristic-Kurve konnte das Sensitivitäts-Spezifitäts-Verhältnis etabliert werden. (Abbildung 1B). Der Flächeninhalt unter der Kurve (area under the curve = AUC) betrug 0.690. Der mit dem Youden-Index ermittelte Cut-Off-Wert lag bei 35.6ng/mL. Es zeigte sich eine Sensitivität von Tenascin-C hinsichtlich der Erkennung von NSCLC von 74% mit einer Spezifität von 57% im Vergleich zur Kontrollgruppe.

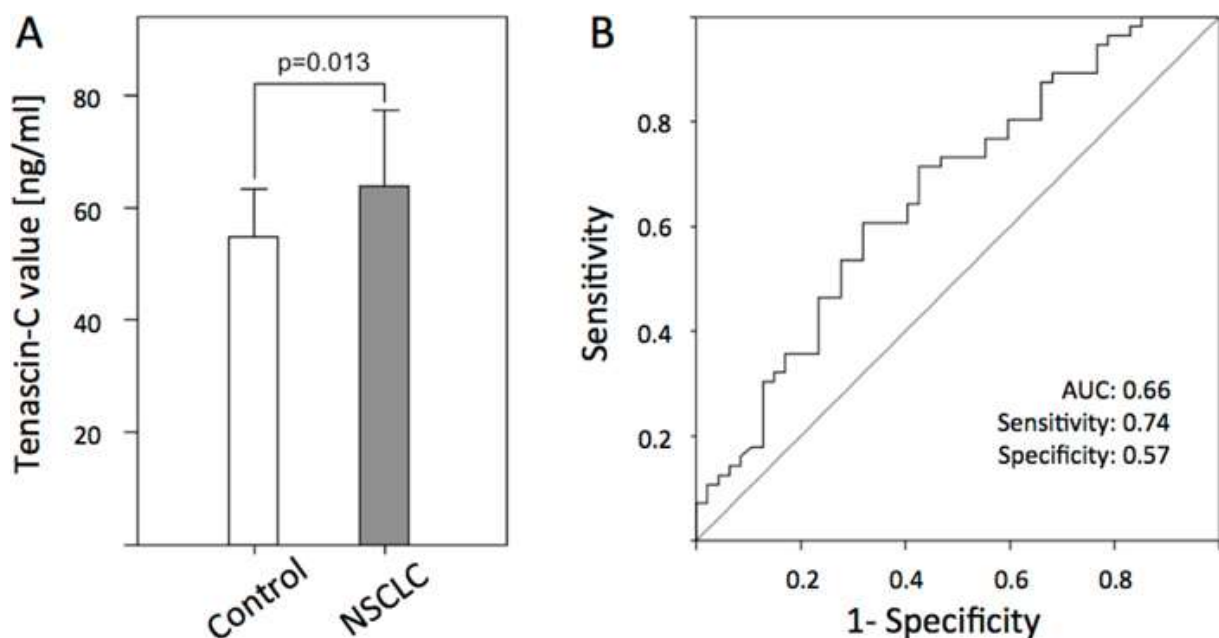


Abbildung 1: Serum Konzentration von Tenascin-C in gesunden Kontrollen und Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC). A. Balken repräsentieren das durch ELISA ermittelte Mittel von n=76 Kontrollen und n=116 NSCLC Patienten ($p>0.013$). B. Receiver Operating Characteristics (ROC) Kurven von Tenascin-C für die Diagnose bei NSCLC Patienten und gesunden Kontrollen

2.3.2 Assoziation von Tenascin-C Konzentrationen und klinischen und pathologischen Parametern

Zur Beurteilung des Zusammenhangs der Tenascin-C Konzentration und klinisch-pathologischen Daten wurden die Patienten in eine low-level- ($< 8.33\text{ng/mL}$) und eine high-level-Tenascin-C Gruppe ($> 8.33\text{ng/mL}$) eingeteilt. Die Korrelation klinisch-pathologischer Daten mit der Tenascin-C Konzentration im Serum der Patienten mittels der Erstellung von Kreutztabeln zeigten eine signifikante Assoziation von erhöhtem Tenascin-C mit der Tumorgroße (pT3 und pT4 verglichen pT1 und pT2; $p=0.022$) und dem Lymphknotenstatus (pN2 und pN3 versus pN1; $p= 0.036$). Klinische Parameter wie Alter, Geschlecht, perioperative Mortalität (30 Tage), Resektion, Nikotinabusus, Asbestexposition, neoadjuvante Therapie und adjuvante Therapie zeigten keine signifikante Differenz zur Kontrolle. Auch wurde keine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der Tenascin-C Konzentration und der Entwicklung von Fernmetastasen gefunden. Hierbei muss das kleine Patientenkollektiv ($n=3$) mit berücksichtigt werden, welches die Aussagekraft dieses Ergebnisses abschwächt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Assoziation von Tenascin-C Konzentrationen und klinischen und pathologischen Parametern bei NSCLC Patienten

		Gesamt (n)	Tenascin-C hoch (n and %)	Tenascin-C niedrig (n and %)	Signifikanz (p)
Age (cut65)	<65	43	18 (42%)	25 (58%)	
	≥ 65	60	25 (42%)	35 (58%)	1.000
Sex	Male	70	31 44%)	39 (58%)	
	Female	33	12 (36%)	21 (64%)	0.523
Asbestosexposition[†]	Ja	5	2 (40%)	3 (60%)	

		Gesamt (n)	Tenascin-C hoch (n and %)	Tenascin-C niedrig (n and %)	Signifikanz (p)
	Nein	85	35 (41%)	50 (59%)	1.000
Nicotineabuse[†]	Ja	15	5 (33 %)	10 (67%)	
	Nein	76	32 (42%)	44 (58%)	0.579
NeoadjuvantTherapy[†]	Ja	82	32 (39%)	50 (61%)	
	Nein	11	6 (55%)	5 (45%)	0.347
Tumor size[†]	pT1+2	74	26 (35%)	48 (65%)	
	pT3+4	20	13 (65%)	7 (35%)	0.022
Lymphnodes[†]	pN0+N1	45	13 (29%)	32 (71%)	
	pN2+N3	50	26 (52%)	24 (48%)	0.036
Distantmetastases[†]	M0	94	38 (40%)	56 (60%)	
	M1	8	4 (50%)	4 (50%)	1.000
Grading[†]	G1 und G2	41	16 (39%)	25 (61%)	
	G3	51	21 (41%)	30 (59%)	1.000
Cell type	Adeno	39	13	26	
	SqamousCell	37	21	16	
	Large Cell	12	6	6	0.115
Resection[†]	R0	68	25 (37%)	43 (63%)	
	R1	7	4 (57%)	3 (43%)	0.419
30-day Mortality[†]	Ja	10	3 (30%)	7 (70%)	
	Nein	91	39 (43%)	52 (57%)	0.516
AdjuvantTherapy[†]	Ja	42	17 (41%)	25 (59%)	
	Nein	51	21 (41%)	30 (59%)	1.000

[†]Aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie addieren sich die Zahlen nicht immer zu 103

Patienten.

2.3.3 Kaplan-Meyer Überlebenskurven für rezidivfreies Überleben in NSCLC-Patienten

Die mit Kaplan-Meier Analyse (log-rank Test) geplotteten Überlebenskurven zeigten keine signifikante Korrelation des Tenascin-C Spiegels und dem rezidivfreiem Überleben (kalkuliertes medianes rezidivfreies Überleben 41.3 Monate bzw. 24 Monate; $p=0.328$, Abbildung 2A). Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Assoziation eines verlängerten Gesamtüberlebens mit einem niedrigen Tenascin-C Serumwert gefunden werden. ($p=0.004$, Abbildung 2B). Patienten mit Konzentrationen unter 8.33 ng/mL zeigten ein mittleres Gesamtüberleben von 48.1 Monaten, wogegen diejenigen mit Konzentrationen über 8.33 ng/mL nur im Mittel 15.4 Monate überlebten.

AA

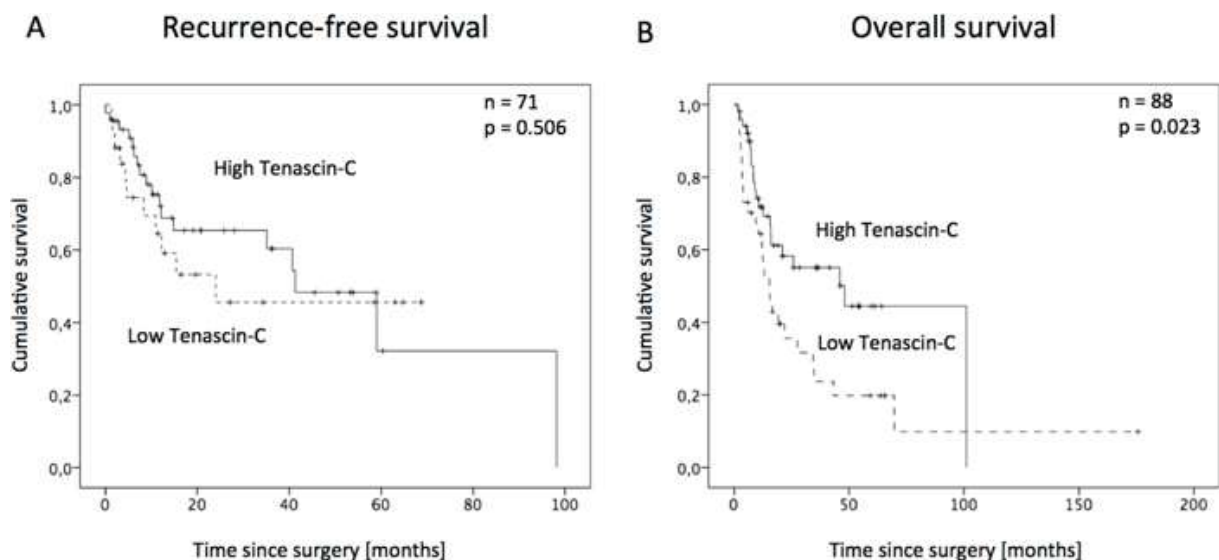


Abbildung 2: Kaplan-Meyer Überlebenskurven für das rezidivfreie Überleben. A. und das Gesamtüberleben. **B.** in NSCLC Patienten nach chirurgischer Intervention bei Gruppen mit hohen und niedrigen Tenascin-C Serumkonzentrationen

2.3.4 Multivariate Analyse

In der mittels Cox-Regression erstellten univariaten Überlebensanalyse wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen Daten wie Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Resektion, Grading und Fernmetastasen gezeigt (Tabelle 2). Während in der univariaten Analyse ein signifikanter Faktor, konnte Tenascin-C in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger Prognosemarker für das Überleben identifiziert werden. Die Analyse identifizierte den Resektionsstatus (R) und das Tumorzell-Grading(G) als unabhängige Charakteristika.

Tabelle 2: Prognostischer Wert der Tenascin-C Expression für das Gesamtüberleben in der univariaten und multivariaten Analyse mittels Cox-Regression

	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%CI	P-Wert	HR	95%CI	P-Wert
Alter	1.325	0.940/1.868	0.108	-	-	-
Geschlecht	0.882	0.614/1.268	0.498	-	-	-
Tumorgröße (pT3/4 vs 1/2)	2.135	1.434/3.233	0.001	1.606	0.706/3.652	0.259
Lymphknotenmetastasen (pN2/3 vs 1/2)	1.850	1.301/2.630	0.001	2.098	0.901/4.885	0.086
Resektion (R1/2 vs 0)	2.360	1.411/3.948	0.001	3.470	1.163/10.355	0.026
Grading (G3 vs 1/2)	1.600	1.129/2.269	0.008	2.853	1.310/6.213	0.008
Fernmetastasen (M1 vs M0)	2.806	1.220/6.457	0.015	1.105	0.218/5.600	0.904

	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%CI	P-Wert	HR	95%CI	P-Wert
Tenascin-C(niedrig vs hoch)	2.374	1.301/4.321	0.005	1.434	0.669/3.074	0.354

(HR- hazard ratio; CI-Konfidenzintervall)

2.4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Evaluation des Potenzials der Tenascin-C Konzentration im peripheren Blut von NSCLC-Patienten als diagnostischer und prognostischer Marker. Tenascin-C war das erste beschriebene Protein der Gruppe und ist daher im Vergleich am meisten erforscht, bisher haben jedoch nur wenige Gruppen die Funktion von Tenascin-C bei NSCLC untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Serumkonzentrationen von Tenascin-C signifikant bei NSCLC Patienten im Vergleich zu denen gesunder Spender erhöht war ($p < 0.001$). Der Flächeninhalt unter der Kurve zeigte eine eher schwache Trennschärfe von Tenascin-C (area under the curve = 0.66; Abbildung 1B). Die Sensitivität (74%) und Spezifität (57%) waren im Vergleich zu den üblicherweise verwendeten Tumormarkern für NSCLC (SCCA, NES, CEA) gering (Wang et al. 2013). Diese Daten sind kongruent zu den von Ishiwata und Kollegen erhobenen Ergebnissen, obwohl diese keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tenascin-C Serumkonzentrationen von NSCLC-Patienten und Gesunden gefunden haben (Ishiwata et al. 2005). Dies führte uns zu der Schlussfolgerung, dass Tenascin-C keinen geeigneten Marker für das diagnostische Screening eines NSCLC darstellt. Zu dieser Hypothese passt die potentielle Überexpression von Tenascin-C bei COPD-Patienten und Rauchen, den häufigsten Komorbiditäten bei NSCLC-Patienten (Monzos-Esquerre et al. 2015, Lofdahl et al. 2011, Karvonen et al. 2013). Weiterhin haben wir die Korrelation der Tenascin-C Konzentration im Serum von NSCLC-Patienten mit histopathologischen Daten untersucht und die Assoziation eines erhöhten Spiegels mit der Tumorgroße und dem Lymphknotenstatus bestätigt ($p = 0.022$ und $p = 0.036$), der eine höhere Tumorlast anzeigt. Dieses Ergebnis ist entgegen denen Ishiwatas und Kollegen, die keinen Zusammenhang zwischen der

Höhe der Tenascin-C Konzentration und histopathologischen Daten fanden (Ishiwata et al. 2005). Übereinstimmend mit unseren Erkenntnissen haben Patienten mit einem hohen Tenascin-C Spiegel ein verkürztes Gesamtüberleben im Vergleich zur Gruppe mit niedrigen Tenascin-C Werten. Diese Korrelation wurde schon von Parekh und Kollegen angedeutet, die eine kleine Gruppe von 10 Patienten untersuchten und eine Erhöhung der mRNA für Tenascin-C und verstärkte Proteinexpression bei Patienten mit frühen Rezidiven fanden. Dies wurde später von Ishiwata und Kollegen in einer Kohorte von 63 Patienten bestätigt (Parekh et al. 2005). Die multivariate Analyse zeigte jedoch bei unserer Studie, dass Tenascin-C kein unabhängiger Marker der Prognose und des Gesamtüberlebens darstellt ($p=0.354$). Die Rolle dieses Proteins als potentieller unabhängiger Prognosemarker ist daher nicht eindeutig, außerdem wurden nur wenige Daten bezüglich der Serumwerte von Tenascin-C in anderen Studien erhoben. Dazu kommen die, abhängig von der Tumorart, variablen Erkenntnisse bezüglich der Korrelation der Tenascin-C Konzentration im Serum mit klinisch-pathologischen Daten. So zeigte sich im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bei NSCLC keine Korrelation der Serumkonzentration von Tenascin-C mit dem Gesamtüberleben und klinische Daten bei Brust- und Ovarialkarzinomen (Didem et al. 2014, Tastetik et al. 2014). Verschiedene Studien haben die Expression von Tenascin-C im Stroma von soliden Tumoren und der Tumorumgebung untersucht und die funktionelle Rolle in der Tumورprogression, Migration und der Entstehung von Metastasen untersucht (Giblin und Midwood 2015). Interessanterweise wurden bei einigen Studien niedrige Tenascin-C Werte mit einem besseren Überleben assoziiert (Juhasz et al. 2000, Jahkola et al. 1998, Ishihara et al. 1995), andere beschrieben konträre Effekte und fanden eine Korrelation von hohen Tenascin-C Werten und einem besseren Überleben (Iskaros et al. 1997, Pilch et al. 1999). Angesichts der Wirkung von

Tenascin-C auf komplexe Vorgänge beim Umbau der Tumorzellen durch Interaktion zwischen Tumorzellen und umgebenden Stromazellen sind diese Differenzen jedoch nicht verwunderlich. Die Expression von Tenascin-C ist mit intra-tumoraler Angiogenese assoziiert, so z.B. mit der Dichte der Mikrogefäße und einem promigratorischem Einfluss auf die Migration der Endothelzellen (Ishiwata et al. 2005). Tenascin-C wurde im Stroma und in den Tumorzellen detektiert und hat Einfluss auf die epitheliale-mesenchymale Transition.

Eine weitere funktionelle Rolle nimmt Tenascin-C bei der Immunmodulation. Es inhibiert die Proliferation der Lymphozyten in vitro und die Interferon-gamma Produktion durch Tumor-infiltrierende Lymphozyten, die aus NSCLC Gewebeproben isoliert wurden (Parekh et al. 2005). Dies passt zu der Hypothese einer malignen Biologie von Tenascin-C, was mit einer vermehrten Spaltung von Tenascin-C durch Metalloproteinasen wie MMP-13 verbunden wird (Hancox et al. 2009). Dies wird möglicherweise zusätzlich durch Transformation der Tumorumgebung hervorgerufen. Beide Mechanismen, die Regulation der Molekülspaltung, die Migration in die Tumorumgebung und der Weg in das periphere Blut durch die endotheliale Barriere wurden bislang nur teilweise verstanden. Die erhöhten Tenascin-C Werte im Tumorgewebe und der korrespondierende Wert im Serum unterstützen dennoch die etablierte Theorie eines Zusammenhangs zwischen Inflammation und Krebserkrankungen. Wie zuvor erwähnt ist die Immunantwort im Rahmen einer malignen Progression und Therapieresistenz ein dynamischer Prozess und kann auch tumorigene Signalwege initiieren (Finn 2008). Die Interaktion des Immunsystems mit den Tumorzellen ist hochkomplex, zumal verschiedene Zelltypen und Differenzierungen in Abhängigkeit der umgebenden Zytokine beschrieben wurden. Der Mechanismus, durch den eine

Inflammation die Tumorentstehung, Progression und Therapieresistenz fördert, ist noch immer schlecht verstanden.

2.5 Literaturverzeichnis

- Atula T, Hedstrom J, Finne P, Leivo I, Markkanen-Leppanen M, Haglund C. Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer research*. 2003; 23(3C):3051-3056.
- Borsi L, Carnemolla B, Nicolò G, Spina B, Tanara G, Zardi L. Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *International journal of cancer*. 1992; 52:688-692.
- Cai M, Onoda K, Takao M, Kyoko I-Y, Shimpo H, Yoshida T and Yada I. Degradation of tenascin-C and activity of matrix metalloproteinase-2 are associated with tumor recurrence in early stage non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research*. 2002; 8:1152-1156.
- Chiovaro F, Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Transcriptional regulation of tenascin genes. *Cell Adh Migr*. 2015;9(1-2):34-47.
- Didem T, Faruk T, Senem K, Derya D, Murat S, Murat G, Oznur K. Clinical significance of serum tenascin-c levels in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biology*. 2014; 35:6777-6782.
- Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010; 17:1471-1474.
- Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*. 2008; 358:2704-2715.
- Giblin SP, Midwood KS. Tenascin-C: form versus function. *Cell adhesion & migration*. 2015; 9:48-82.
- Hancox RA, Allen MD, Holliday DL, Edwards DR, Pennington CJ, Guttery DS, Shaw JA, Walker RA, Pringle JH, Jones JL. Tumour-associated tenascin-C isoforms promote breast cancer cell invasion and growth by matrix metalloproteinase-dependent and independent mechanisms. *Breast Cancer Res*. 2009; 11:R24.
- Hauptmann S, Zardi L, Siri A, Carnemolla B, Borsi L, Castellucci M, Klosterhalfen B, Hartung P, Weis J, Stöcker G. Extracellular matrix proteins in colorectal carcinomas. Expression of tenascin and fibronectin isoforms. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1995; 73:172-182.
- Ibrahim SN, Lightner VA, Ventimiglia JB, Ibrahim GK, Walther PJ, Bigner DD, Humphrey PA. Tenascin expression in prostatic hyperplasia, intraepithelial neoplasia, and carcinoma. *Human pathology*. 1993; 24:982-989.
- Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T. Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clinical cancer research*. 1995; 1:1035-1041.
- Ishiwata T, Takahashi K, Shimanuki Y, Ohashi R, Cui R, Takahashi F, Shimizu K, Miura K, Fukuchi Y. Serum tenascin-C as a potential predictive marker of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 2005; 25(1B):489-495.
- Iskaros BF, Tanaka KE, Hu X, Kadish AS, Steinberg JJ. Morphologic pattern of tenascin as a diagnostic biomarker in colon cancer. *Journal of surgical oncology*. 1997; 64:98-101.
- Jahkola T, Toivonen T, Virtanen I, von Smitten K, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C, Nevanlinna H, Blomqvist C. Tenascin-C expression in invasion border of early breast cancer: a predictor of local and distant recurrence. *British journal of cancer*. 1998; 78:1507.

Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010; 19:1893-1907.

Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Developmental dynamics*. 2000; 218:235-259.

Juhász A, Bárdos H, Répássy G, ádány R. Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. *The Laryngoscope*. 2000; 110:84-92.

Kahn N, Meister M, Eberhardt R, Muley T, Schnabel PA, Bender C, Johannes M, Keitel D, Sültmann H, Herth FJ. Early detection of lung cancer by molecular markers in endobronchial epithelial-lining fluid. *Journal of Thoracic Oncology*. 2012; 7:1001-1008.

Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism*. 2015 Mar;64(3 Suppl 1):S16-21..

Karvonen HM, Lehtonen ST, Harju T, Sormunen RT, Lappi-Blanco E, Makinen JM, Laitakari K, Johnson S, Kaarteenaho RL. Myofibroblast expression in airways and alveoli is affected by smoking and COPD. *Respir Res*. 2013; 14:84.

Kusagawa H, Onoda K, Namikawa S, Yada I, Okada A, Yoshida T, Sakakura T. Expression and degeneration of tenascin-C in human lung cancers. *British journal of cancer*. 1998; 77:98.

Lofdahl M, Kaarteenaho R, Lappi-Blanco E, Tornling G, Skold MC. Tenascin-C and alpha-smooth muscle actin positive cells are increased in the large airways in patients with COPD. *Respir Res*. 2011; 12:48.

McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumourMARKer prognostic studies (REMARK). *British journal of cancer*. 2005; 93:387-391.

Munoz-Esquerre M, Huertas D, Escobar I, Lopez-Sanchez M, Penin R, Peinado V, Barbera JA, Molina-Molina M, Manresa F, Dorca J, Santos S. Gene and Protein Expression of Fibronectin and Tenascin-C in Lung Samples from COPD Patients. *Lung*. 2015; 193:335-343.

Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer letters*. 2006; 244:143-163.

Oyama F, Hirohashi S, Shimosato Y, Titani K, Sekiguchi K. Qualitative and quantitative changes of human tenascin expression in transformed lung fibroblast and lung tumor tissues: comparison with fibronectin. *Cancer research*. 1991; 51:4876-4881.

Parekh K, Ramachandran S, Cooper J, Bigner D, Patterson A, Mohanakumar T. Tenascin-C, over expressed in lung cancer down regulates effector functions of tumor infiltrating lymphocytes. *Lung Cancer*. 2005; 47:17-29.

Pas J, Wyszko E, Rolle K, Rychlewski L, Nowak S, Zukiel R, Barciszewski J. Analysis of structure and function of tenascin-C. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006; 38:1594-1602.

Pauli C, Stieber P, Schmitt U, Andratschke M, Hoffmann K, Wollenberg B. The significance of Tenascin-C serum level as tumor marker in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer research*. 2001; 22:3093-3097.

Pilch H, Schäffer U, Schlenger K, Lautz A, Tanner B, Höckel M, Knapstein P. Expression of tenascin in human cervical cancer—association of tenascin expression with clinicopathological parameters. *Gynecologic oncology*. 1999; 73:415-421.

RuthChiquet-Ehrismann· GertraudOrend· MatthiasChiquet· Richard P.Tucker· Kim S.Midwood· Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biol.* 2014 Jul;37:112-23.

Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer. *Advances in clinical chemistry.* 2006; 42:1-41.

Spénlé C, Saupe F, Midwood K, Burkel H, Noel G, Orend G. Tenascin-C: exploitation and collateral damage in cancer management. *Cell adhesion & migration.* 2015; 9:141-53.

Tastekin D, Tas F, Karabulut S, Duranyildiz D, Serilmez M, Guveli M, Vatansever S. Clinical significance of serum tenascin-C levels in breast cancer. *Tumor Biology.* 2014; 35:6619-6625.

Tsunoda T, Inada H, Kalembeiyi I, Imanaka-Yoshida K, Sakakibara M, Okada R, Katsuta K, Sakakura T, Majima Y, Yoshida T. Involvement of large tenascin-C splice variants in breast cancer progression. *The American journal of pathology.* 2003; 162:1857-1867.

Tuck MK, Chan DW, Chia D, Godwin AK, Grizzle WE, Krueger KE, Rom W, Sanda M, Sorbara L, Stass S. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *Journal of proteome research.* 2008; 8:113-117.

Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R. The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments.*Biochim Biophys Acta.* 2009 May;1793(5):888-92.

Wang R, Wang G, Zhang N, Li X, Liu Y. Clinical Evaluation and Cost-Effectiveness Analysis of Serum Tumor Markers in Lung Cancer. *BioMed Research International.* 2013; 2013:7.

Yoshida T, Akatsuka T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C and integrins in cancer. *Cell Adhesion & Migration.* 2015; 9(1-2):96-104.

3. Zusammenfassung

3.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Hintergrund: Tenascin-C wird im Stroma der meisten soliden Tumoren überexprimiert und findet möglicherweise Verwendung als diagnostischer Tumormarker. Diese Studie wurde zur Evaluation der potentiellen Signifikanz von Tenascin-C als prädiktiver Marker für die Tumorprogression im Serum von NSCLC-Patienten durchgeführt.

Ergebnisse: Die Serumkonzentration von Tenascin-C ist signifikant bei NSCLC-Patienten erhöht im Vergleich zu gesundem Kontrollserum ($p=0.013$). Die Sensitivität von Teascin-C bei der Detektion von NSCLC betrug 74% bei einer Spezifität von 57%. Erhöhte Tenascin-C Konzentrationen im Serum sind mit einer ausgedehnteren Tumorgroße und Lymphkoteninvasion assoziiert ($p=0.022$ bzw. $p=0.036$). Die Kaplan-Meyer Kurven zeigten eine signifikante Assoziation der Tenascin-C Konzentration mit dem Gesamtüberleben ($p=0.004$) der Patienten, nicht aber mit deren rezidivfreiem Überleben ($p=0.32$).

Methoden: Wir haben Tenascin-C im Serum von 103 NSCLC-Patienten und 76 gesunden Kontrollen mittels enzyme-linked immune-absorbanceassay (ELISA) Test quantifiziert. Die prognostische Signifikanz wurde mit dem Flächeninhaltsanalyse und Youden-Index ermittelt. Die Resultate wurden mit klinischen, histopathologischen und Patientendaten korreliert (Chi-Quadrat-Test, Kaplan-Meyer Analyse, log-rank-test, multivariate Cox-Regressionsanalyse).

Schlussfolgerung: Obwohl die Tenascin-C Konzentration im Serum von NSCLC-Patienten erhöht ist, sind Sensitivität und Spezifität gering. Trotzdem die multivariate Analyse Tenascin-C nicht als unabhängiger Faktor identifiziert werden konnte, deuten die Ergebnisse doch auf die potentielle Funktion von Tenascin-C als

Prognosemarker bei NSCLC-Patienten hin. Zur weiteren Validierung sind weitere Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv notwendig.

3.2 Zusammenfassung in englischer Sprache

Background: Tenascin C is overexpressed in the stroma of most solid tumors and might function as a diagnostic tumor marker. This study was performed to evaluate the potential significance of Tenascin C as a predictive marker for tumorprogression in the serum of NSCLC patients.

Results: The serum concentration of Tenascin C is significantly elevated in NSCLC patients in comparison to healthy controls ($p < 0.013$). The sensitivity of Tenascin C regarding the detection of NSCLC was 74% at a specificity of 57%. Elevated Tenascin C concentrations in the serum are associated with the tumor size and the invasion of the lymphnodes ($p=0.004$ or $p=0.036$). The Kaplan-Meyer curves show a significant association of the Tenascin C concentration with the overall survival ($p=0.004$) of the NSCLC patients, but not with the recurrence free survival.

Methods: We quantified the Tenascin C concentration in the serum of 103 NSCLC patients and in the serum of 76 healthy controls by enzyme-linked immune-absorbanceassay (ELISA) test. The prognostic significance was calculated by area under the curve analyses via Youden-Index. The results were correlated with clinical, histopathological and patient survival datas (Chi-square-test, Kaplan-Meyer analysis, log-rank-test, multivariate Cox-regression analysis).

Conclusion: The Tenascin C concentration in the serum of NSCLC patients was significantly elevated in comparison to those of the healthy controls, but sensitivity and specificity are low. Although the Tenascin C concentration could not be identified

as an independent factor in the multivariate analysis, the results indicate a potential function of Tenascin C as a prognostic marker in NSCLC patients. The validation needs further studies with a larger number of patients.

4. Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des UKE unter Betreuung von PD Dr.med.Michael Tachezy und Dr.rer.nat.Hilke Zander durchgeführt.

Die Planung der Studie erfolgte durch PD Dr.med.Michael Tachezy.

Die in der Studie analysierten Serumproben wurden in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie gesammelt.

Der experimentelle Teil der Studie wurde von mir mit Unterstützung von Dr.rer.nat.Hilke Zander durchgeführt.

Die statistische Auswertung wurde von mir mit Unterstützung von PD Dr.med.Michael Tachezy durchgeführt.

5. Danksagung

Ich danke Hilke Zander, Michael Tachezy und Gerrit Wolters für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertationsschrift.

Danken möchte ich außerdem den technischen Assistenten für die konstante Hilfsbereitschaft bei der Arbeit im Labor.

Weiterhin danke ich meiner Familie für ihre Geduld und mentale Unterstützung.

6. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	25. April 1983
Geburtsort	Dortmund
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Wohnort	Wielandstr.13 22089 Hamburg

Studium und Schulbildung

Herbst 2014	Abschluss des Medizinstudiums
Aug. 2013 - Jul. 2014	Praktisches Jahr
Seit April 2012	Medizinische Doktorarbeit in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des UKE
März 2010	Abschluss des Physikums (schriftl. Teil); Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums ab Okt. 2010
Okt. 2009 - März 2010	Masterstudiengang Molecular Life Sciences
Okt. 2007 - Okt. 2009	Bachelor-Studienganges „Molecular Life Sciences“ an der Universität-Hamburg; Quereinstieg in das 3. Semester Abschluss B.Sc; Durchschnittsnote. 2,6
April 2009 - Sep. 2009	Bachelorarbeit in der Abteilung Molekularbiologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UKE; Note 1,3
Okt. 2003 - Okt. 2007	Studium der Medizin an der Universität-Hamburg
Okt. 2002 - Okt. 2003	Bachelor-Studiengang „Chemie“ an der Ruhr-Universität-Bochum

Schule

1993 - Jun. 2002	Theodor-Heuss-Gymnasium Hagen Abitur; Durchschnittsnote 2,3
1989 - 1993	Karl-Ernst-Osthaus- Grundschule Hagen

Berufserfahrung

Seit April 2015	Assistenzärztin im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
-----------------	---

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.

Unterschrift: