Oral brush biopsy analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry for early cancer diagnosis

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. dent.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Katja Maurer

geb. am 13.08.1984 in Dessau

angefertigt am / in:

17.12.2012 / Universitätsklinikum Leipzig, Sektion für Klinische und
Experimentelle Orale Medizin an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie

Betreuer:

Univ.-Professor Dr. med. dent. habil. Torsten W. Remmerbach

Univ.-Professor Dr. rer. nat. habil. Klaus Eschrich

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 18.06.2013

Bibliographische Beschreibung

Katja Maurer

Oral brush biopsy analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry for early cancer diagnosis

Universität Leipzig, Dissertation

33 Seiten, 33 Literaturquellen, 2 Tabellen, 2 Publikationen

Referat:

Das Plattenepithelkarzinom (PEC) der Mundhöhle stellt mit über 90 % den häufigsten bösartigen oralen Tumor dar. Global betrachtet gehören diese epithelialen Tumore zu den zehn häufigsten malignen Neubildungen des Menschen. Trotz intensiver Forschung und stetiger Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten, ist es in den letzten 30 Jahren nicht gelungen, die Überlebensraten signifikant zu verbessern. Eine frühzeitige Diagnosestellung des oralen Plattenepithelkarzinoms ist die Basis für eine erfolgreiche kurative Therapie, die sowohl die Überlebenschancen als auch die künftige Lebensqualität der betroffenen Patienten verbessert.

Die non-invasive Bürstenbiopsie stellt einen entscheidenden Fortschritt auf dem Weg der Früherkennung des oralen PECs dar. Dieses leicht durchführbare Verfahren dient Zahnärzten jeglicher Fachrichtung zur Abklärung unklarer Schleimhautveränderungen der Mundhöhle. Die Validität der zytopathologischen Auswertung hängt jedoch entscheidend von der Erfahrung des untersuchenden Pathologen ab.

Ziel unserer Studien war es, eine objektive Methode zur Auswertung von Bürstenbiopsaten zu entwickeln, die reproduzierbare und valide Aussagen hinsichtlich der Dignität der Proben ermöglicht.

Mit Hilfe von „Intact cell peptidome profiling“ (ICPP) mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie wurden Proben von oralen Bürstenbiopsien untersucht. In der Pilotstudie lag der Fokus auf der Differenzierung zwischen Tumorproben und gesunden Kontrollproben. Es wurde dabei eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 93 % erreicht.

In einer zweiten Studie „Oral brush biopsy analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry for early cancer diagnosis“ wurde die Methode weiter vereinfacht und um die objektive Untersuchung von potentiell malignen Veränderungen der Mundschleimhaut erweitert sowie im Rahmen einer Blindstudie validiert. Die Zuordnung der Proben der Blindstudie erfolgte in „Tumor“ und „Nicht-Tumor“. Alle malignen Veränderungen wurden mittels MALDI-ToF Verfahren als Tumor erkannt. Lediglich eine potentiell maligne Veränderung wurde fälschlicherweise als Tumor identifiziert. Somit erreichte die Blindstudie eine Sensitivität von 100 %, die Spezifität lag bei 93 %, was einer Korrekturklassifikationsrate von 96,5 % entsprach. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass „Intact cell peptidome profiling“ mittels MALDI-ToF MS eine Differenzierung zwischen Bürstenbiopsieproben hinsichtlich ihrer Dignität ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

1. Hintergrund	1
<i>Primärprävention</i>	2
<i>Sekundärprävention</i>	3
2. Materialien und Methoden	6
<i>Patienten</i>	6
<i>Probenaufbereitung und MALDI-ToF Massenspektrometer</i>	7
3. Statistische Auswertung und Ergebnisse	9
4. Diskussion	12
5. Publikationen	15
6. Zusammenfassung der Arbeit	25
7. Literaturverzeichnis	28
8. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	31
9. Danksagung	32

1. Hintergrund

Plattenepithelkarzinome (PECs) der Mundhöhle stellen mit über 90 % die häufigsten bösartigen Tumore der Mundschleimhaut dar (Neville & Day, 2002). Somit zählt das orale Plattenepithelkarzinom zu den häufigsten Tumoren des Menschen und liegt bei Männern in globalen Tumorstatistiken an der 6. Stelle und bei Frauen an der 18. Stelle (Carvalho et al., 2005). Im Jahr 2000 lag die Prävalenz des oralen Plattenepithelkarzinoms weltweit bei ca. 267 000 Patienten, wobei ein Drittel dieser Fälle auf dem indischen Subkontinent zu finden ist (IARC, 2012). Trotz stetiger Weiterentwicklung der Behandlungsmöglichkeiten, sowohl im chirurgischen als auch im strahlentherapeutischen Bereich, ist es in den letzten 30 Jahren nicht gelungen, signifikante Verbesserungen der Überlebensraten zu erzielen (Gourin et al., 2006). Somit ist dieser epitheliale Tumor immer noch für den Tod von ungefähr 128 000 Menschen jährlich verantwortlich (IARC, 2012). In Deutschland sterben etwa 42 % aller betroffenen Patienten innerhalb der ersten fünf Jahre nach Beginn der Erkrankung (Boring et al., 1991). Die Hauptursache für dieses Dilemma stellt der verzögerte Therapiebeginn dar. Die Möglichkeit der Heilung besteht vor allem dann, wenn die Erkrankung in einem sehr frühen Stadium diagnostiziert und therapiert wird. So sinkt die Fünf-Jahres-Überlebensrate der betroffenen Patienten von etwa 82 % bei kleinen Tumoren, auf etwa 46 % bei Tumoren, die bereits in lokoregionären Lymphknoten Metastasen aufweisen oder bei Invasion in Nachbarstrukturen, z.B. in Knochen, Muskeln oder Gefäße. Auf ca. 21 % sinkt die Überlebensrate bei vorliegender Fernmetastasierung (Neville & Day, 2002). Die Lebensqualität der Patienten spielt in diesem Zusammenhang ebenfalls eine entscheidende Rolle, wobei es vor allem bei fortgeschrittenen Tumoren zur erheblichen Beeinträchtigung hinsichtlich der Sprache, Atmung und der Nahrungsaufnahme kommt (Wadsworth et al., 2004, Dorr et al., 2010). Somit stellt die frühzeitige Diagnose des oralen Plattenepithelkarzinoms die Grundlage für eine erfolgreiche Therapie dar und

verbessert signifikant die Überlebenschancen der betroffenen Patienten (Mehrotra & Gupta, 2011).

Primärprävention

Es gilt als gesichert, dass lebensstilassoziierte Verhaltensmuster der Patienten maßgeblich an der Entstehung des Plattenepithelkarzinoms beteiligt sind.

Tabak

Bei der Pyrolyse der getrockneten Tabakblätter entstehen mehr als 3000 verschiedene chemische Verbindungen, die sowohl toxische als auch karzinogene Eigenschaften aufweisen (Reichart, 2000b). Zu den bedeutsamsten Karzinogenen im Tabakrauch gehören die Nitrosamine, aromatische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Davidson et al., 1993, Bartsch et al., 2000). Spitz et al., (1999) konnten zeigen, dass bestimmte Genotypen eine Prädisposition zu tabakinduzierten Mundhöhlenerkrankungen aufweisen. Dabei handelt es sich vor allem um Gene, die am Tabakmetabolismus beteiligt sind, wie z.B. N-Acetyl-Transferase, Glutathiontransferase und die P450-Enzyme.

Somit führt langfristig der chronische Tabakabusus zu einer Dedifferenzierung der Zellen, was letztendlich dazu führt, dass Raucher zwei- bis viermal häufiger an Mundkrebs erkranken als Nichtraucher (Wynder & Hoffmann, 1979, Johnson & Bain, 2000, McCoy & Wynder, 1979). Die Neckar-Larynx-Studie konnte unter anderem zeigen, dass auch die Inhalationstiefe des Zigarettenrauchs einen entscheidenden Einfluss auf das Entartungsrisiko der Kehlkopfschleimhäute hat (Ramroth et al., 2011).

Alkohol

Ethanol wirkt selbst nicht karzinogen, sondern es ist ein Stoffwechselprodukt des Alkohols, das Acetaldehyd, das mutagenen Einfluss auf die Epithelzellen hat (Obe & Ristow, 1979, Warnakulasuriya & Johnson, 1993). Dabei spielen vor allem

ADH-Enzyme einiger Bakterien, wie z.B. *Streptococcus salivarius*, die Ethanol zu Acetaldehyd verstoffwechseln, die entscheidende Rolle (Kurkivuori et al., 2007). Homann et al., (2000) haben nachgewiesen, dass der Acetaldehydgehalt im Speichel kurz nach dem Alkoholkonsum von der Quantität der ADH-produzierenden Bakterien abhängt.

Synergistischer Effekt von Tabak und Alkohol

Man kann davon ausgehen, dass der Tabak- und Alkoholkonsum einen synergistischen Effekt auf die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms aufweist. Dies wird u.a. durch die erhöhte Permeabilität der Mundhöhlenschleimhaut durch den chronischen Alkoholkontakt erklärt, wodurch die tabakassoziierten Karzinogene leichter in tiefere Gewebeschichten eindringen können. Diese Tatsache erklärt wiederum das gehäufte Auftreten dieser Tumore im Mundboden, da hier die Epithelschicht am dünnsten ist (Squier et al., 2003). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Synergismus von Alkohol und Tabak nicht nur additiv, sondern sogar multiplikativ bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen zu werten ist (Franceschi et al., 1990).

Diese tumorauslösenden Faktoren sind durch den Patienten beeinflussbar, sodass durch eine frühzeitige Aufklärung und somit Minderung des Alkohol- und Tabakkonsums ein großer Teil der Krebserkrankungen der Mundhöhle vermeidbar wäre (Reichart, 2000a).

Sekundärprävention

Die Sekundärprävention dient dazu, sogenannte potentiell maligne Veränderungen (pmV) bzw. Carcinoma in situ zu erkennen oder Frühformen des Plattenepithelkarzinoms zu diagnostizieren.

Da, wie bereits oben erwähnt, die Prognose des Patienten in hohem Maße von der Größe des Tumors bei Diagnosestellung abhängig ist, besteht hier eine wesentliche Einflussmöglichkeit für den behandelnden Zahnarzt. So hatten bereits Reichart und

Pape mehrfach darauf hingewiesen, dass eine allumfassende und lückenlose klinische Inspektion und Palpation aller relevanten Strukturen der Mundhöhle des Patienten bei jeder zahnärztlichen Untersuchung zu fordern sind (Reichart, 2001, Reichart, 2000a, Pape, 1992). Nur so ist gewährleistet, dass auch minimale Veränderungen frühzeitig erfasst und weitere diagnostische Maßnahmen eingeleitet werden können. Hierbei stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, diese Veränderungen hinsichtlich ihrer Dignität abzuklären:

- chirurgische Probeentnahme
- Fluoreszenzdiagnostik
- Bürstenbiopsie

Die chirurgische Probeentnahme (PE) stellt den Goldstandard zur Abklärung unklarer Veränderungen in der Mundhöhle dar. Die damit gewonnenen Präparate werden gemäß der WHO-Definition von 2005 histologisch begutachtet und entsprechend bewertet. Dennoch wird vor allem der nicht chirurgisch tätige Zahnarzt eine solche Probebiopsie nicht routinemäßig in seiner Praxis vornehmen, sondern die Patienten zu einem chirurgisch versierten Kollegen überweisen. Diese Überweisungshürde hat sich in den letzten Jahrzehnten als beachtenswertes Problem dargestellt, da eine nicht unbedenkliche Zahl von Patienten der Überweisung nicht Folge leistet. Des Weiteren konnten Abbey et al., (1995) zeigen, dass die Reproduzierbarkeit von histologischen Begutachtungen oraler epithelialer Dysplasien im Schnitt interindividuell nur bei 50,5 % und intraindividuell bei 50,8 % liegt, was fraglos ein unbefriedigendes Ergebnis darstellt.

Bei der Fluoreszenzmethode handelt es sich um eine lichtbasierte Diagnostik. Hierbei können Gewebe mit gesteigertem Metabolismus sowie strukturellen Veränderungen und damit verbundener unterschiedlicher Absorption und Reflektion des Lichtes visualisiert werden. Studien ergaben jedoch, dass lichtbasierte Methoden zum jetzigen Zeitpunkt nur zur eindeutigeren Identifizierung von Mundschleimhautveränderungen, nicht aber zur

Differenzierung unterschiedlicher Dignitäten, genutzt werden sollten (Mehrotra & Gupta, 2011).

Als einfache, nicht invasive Methode steht dem Zahnarzt die Bürstenbiopsie zur Verfügung, die es ermöglicht, von verdächtigen Schleimhautbereichen zytologisches Material zu gewinnen, was anschließend zytopathologisch begutachtet wird. Seit 2004 besteht für Kassenzahnärzte die Möglichkeit, diese non-invasive Biopsie im Rahmen des Bewertungsmaßstabes für Zahnärzte (Position 05) zu liquidieren (Remmerbach et al., 2004, Remmerbach et al., 2003, Remmerbach et al., 2001). In einer Vielzahl von Studien erreicht die Bürstenbiopsie eine hohe Treffsicherheit, wobei die Sensitivität bei 96,6 % und die Spezifität bei 91,4 % liegt (Remmerbach et al., 2007). Es muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass auch hier die diagnostische Zuverlässigkeit maßgeblich von der Erfahrung des untersuchenden Pathologen abhängt (Godge & Poonja, 2011). So war es unser Ziel ein Verfahren zu entwickeln, das reproduzierbare und valide Aussagen hinsichtlich der Dignität ermöglicht. Daher beschäftigten wir uns mit der Entwicklung einer objektiven Methode, die eine klare Aussage hinsichtlich des biologischen Verhaltens der Zellen erlaubt. Mit Hilfe von „Intact cell peptidome profiling“ (ICPP) mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie untersuchten wir Proben von oralen Bürstenbiopsien.

In unserer Pilotstudie lag der Fokus vorerst auf der Differenzierung zwischen Tumorproben und gesunden Kontrollproben. Hierbei erzielten wir eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 93 %. Diese Ergebnisse nahmen wir als Grundlage, die Studie weiter zu entwickeln und die Methode im Rahmen einer Blindstudie zu validieren. Zusätzlich wurde die objektive Untersuchung von potentiell malignen Veränderungen der Mundschleimhaut in die zweite Studie mit dem Titel „Oral brush biopsy analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry for early cancer diagnosis“ einbezogen, die im Folgenden erläutert wird.

2. Materialien und Methoden

Patienten

Zur Erstellung der Datenbank wurde ein Patientenkollektiv aus 26 Tumorpatienten der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie herangezogen, wobei diese Gruppe aus 19 Männern und sieben Frauen mit einem Durchschnittsalter von 61,6 Jahren (44 – 96 Jahre, SD $\pm$ 11,2) bestand. Bei diesen Patienten wurde eine Bürstenbiopsie im Bereich der erkrankten Schleimhaut entnommen, sowie eine entsprechende Probe an klinisch gesunder Mundschleimhaut auf der kontralateralen Seite. Dazu wurde ein spezieller Zellkollektor Orcabrush (DGOD, Leipzig) oder Gynobrush (Herenz, Hamburg) verwendet. Dieser wurde unter Druck mindestens zehnmal um die eigene Achse rotiert, sodass ausreichend repräsentatives Zellmaterial entnommen werden konnte. Anschließend wurde die Bürste in einem Eppendorf-Gefäß mit 1 ml 70%igem Ethanol vollständig ausgewaschen. Danach wurde die Probe bis zur weiteren Verarbeitung bei 2 – 7 °C im Kühlschrank gelagert. Innerhalb weniger Stunden erfolgte die Aufbereitung der entsprechenden Zellsuspension im Institut für Biochemie der Universität Leipzig. Diese Proben dienten zur Erstellung einer Datenbank, welche die Grundlage für die Durchführung der anschließenden Blindstudie bildete.

In die Blindstudie wurden ebenfalls 26 Patienten eingeschlossen, die sich aus elf Tumorpatienten, elf Patienten mit potenziell malignen Veränderungen der Mundschleimhaut sowie vier gesunden Probanden zusammensetzte. Das Durchschnittsalter bei der Blindstudie betrug 56,3 Jahre (26 – 81 Jahre, SD $\pm$ 17,38).

Alle 37 Tumorpatienten aus der Datenbank und aus der Blindstudie wurden mit Hilfe der histopathologischen Untersuchung der PE bzw. des Tumorsektates histologisch verifiziert. Das entsprechende histologische Staging der Tumorproben ist der Tabelle 1 zu entnehmen. Bei acht Patienten erfolgte kein operativer

Eingriff, sodass keine histologischen Stagingparameter erhoben werden konnten. Die potenziell malignen Veränderungen setzten sich aus zwei Hyperkeratosen, acht oralen Lichen und einem oralen Ulkus zusammen. Beide Studien wurden von der Ethikkommission der Universität Leipzig (Nr. 123-2003) überprüft.

TABELLE 1. KLINISCHE CHARAKTERISTIKA DER PATIENTEN MIT PLATTENEPITHELKARZINOMEN DER MUNDHÖHLE (PEC), POTENTIELL MALIGNEN VERÄNDERUNGEN (PMV) UND GESUNDER SCHLEIMHAUT

		ANZAHL ALLER PROBEN [n]	DATENBANK [n]	BLINDSTUDIE [n]
PEC	T _{CIS}	1	-	1
	T1/T2	16	10	6
	T3/T4	12	10	2
	N0	14	7	7
	N1	4	3	1
	N2	11	9	2
	MÄNNLICH	27	19	8
	WEIBLICH	10	7	3
PMV	ORALER LICHEN	8	-	8
	HYPERKERATOSE	2	-	2
	ULKUS	1	-	1
	MÄNNLICH	5	-	5
	WEIBLICH	6	-	6
GESUNDE SCHLEIMHAUT	MÄNNLICH	21	19	2
	WEIBLICH	9	7	2

Probenaufbereitung und MALDI-ToF Massenspektrometer

Die Zell-Ethanol-Suspension wurde bei 2,000 x g für 2 Min. zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff des Zellpellets mit 1 ml Ethanol (70%ig). Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet

luftgetrocknet und anschließend mit 20 µl Matrix (20 mg/ml in 0,1%iger Trifluoressigsäure (TFA)/Acetonitril 1:2) in Lösung gebracht. 1 µl dieser Zell-Matrix-Suspension wurde auf ein Edelmetalltarget (scout 384) auf fünf bis zehn Spots pipettiert und unter Lufttrocknung kokristallisiert. Diese Proben wurden mittels Autoflex II MALDI-ToF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) untersucht.

Bei diesem Verfahren verdampft mittels Laserbeschuss (Stickstofflaser 337 nm) die Matrix, wobei die Matrix-Protonen auf den Analyten übertragen werden. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und trennen sich entsprechend ihres unterschiedlichen Masse(m)/Ladungsverhältnisses(z) und der daraus resultierenden unterschiedlichen Geschwindigkeit auf. Ein Ionendetektor wandelt die ankommenden Ionen in ein elektrisches Signal um (Hillenkamp et al., 1991), wobei die Visualisierung in einem Diagramm als m/z-Verhältnis, aufgetragen gegen die Intensität, erfolgt.

Zuerst wurde die Kalibrierung des Gerätes mit einem *Escherichia coli* GM2163 Extrakt durchgeführt. Die automatische Messung zur Erstellung eines Spektrums erfolgte mittels 500 Laserschüssen an verschiedenen Orten des Spots. Spektren wurden von 2 000-13 000 m/z aufgenommen. Die Messung erfolgte im linearen Positiv-Modus mit einer verzögerten Extraktion der Ionen (Delay von 350 ns). Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV. Die im MALDI-ToF Massenspektrometer ermittelten Rohdaten wurden in das Programm Flexanalysis Version 2.4 (Bruker Daltonics) zur weiteren Bearbeitung übertragen und jedem Spektrum automatisch 60 Peakmassen zugeordnet. Anschließend wurden die Daten als ASCII Dateien in Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corp. Redmond, USA) importiert und die Peakmassenlisten weiter mit Hilfe von Software auf der Basis von MatLab 6.5 (The MathWorks Inc., Natick, USA) ausgewertet.

3. Statistische Auswertung und Ergebnisse

Für die Auswertung der Spektren wurde die Support-Vektor-Machine Software LIBSVM verwendet. Diese LIB-Support-Vektor-Machine ermöglicht nicht nur die Klassifizierung der Spektren in Tumorprobe oder Nicht-Tumorprobe, sondern errechnet zusätzlich die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Probe zur jeweiligen Gruppe zugeordnet wird. Als Basis für die Auswertung der Blindstudie diente die Datenbank bestehend aus 26 Tumorproben und 26 gesunden Proben. Diese Proben konnten mittels SVM-Algorithmus mit einer Sensitivität von 92 % und einer Spezifität von 95 % und einer Korrektklassifizierungsrate von 93 % unterschieden werden. Der Vergleich der Massenspektren der Datenbank wurde als Grundlage für alle weiteren Auswertungsroutinen der Blindstudie herangezogen. Die Blindstudie bestand aus elf Tumorpatienten, elf Patienten mit Vorläuferläsionen der Mundschleimhaut und vier gesunden Probanden, welche alle anonymisiert wurden. Die Proben der Blindstudie wurden mittels SVM-Algorithmus wie folgt ausgewertet: Sie wurden als „böartig“ eingeordnet, wenn die Wahrscheinlichkeit für Böartigkeit über 50 % betrug. Als „nicht böartig“ wurden die Proben mit einer Wahrscheinlichkeit unter 50 % angenommen. Neben der binären Auswertung erfolgte die Berechnung der Wahrscheinlichkeit mit der die Probe einer bestimmten Dignität zugeordnet wird. Als „eindeutig böartig“ wurde klassifiziert, wenn die Wahrscheinlichkeit für Böartigkeit über 60 % betrug. Lag die Wahrscheinlichkeit böartig zu sein unter 40 %, wurden die Daten als „eindeutig nicht böartig“ interpretiert. Ergab die errechnete Wahrscheinlichkeit eine Prozentzahl zwischen 40 % und 60 %, wurden die Proben als „nicht eindeutig klassifizierbar“ eingeordnet. Die Auswertung der Proben der Blindstudie erfolgte in zwei Klassifizierungsmodi, im linearen Modus und im RBF-Modus (radiale Basisfunktion). Sollte die Auswertung der Probe in beiden Modi „nicht eindeutig klassifizierbar“ ergeben, würde diese Probe als „nicht identifizierbar“ gelten. Wir definierten die Probe als „Tumor“, wenn sowohl im linearen als auch im RBF-

Modus die Proben als bösartig identifiziert wurden und als „Nicht-Tumor“ (d.h. Gesund + pmV), sobald einer der Modi als „nicht bösartig“ klassifiziert wurde. In keinem Fall ergaben beide Modi „nicht eindeutig klassifizierbar“, sodass alle Proben eindeutig zugeordnet werden konnten (Tabelle 2).

TABELLE 2. PATIENTENNR. 1-11 $\triangleq$ PEC, 12-22 $\triangleq$ PMV, 23-26 $\triangleq$ GESUNDE
PATIENTEN;
1 ENTSpricht BÖSARTIG, 0 ENTSpricht NICHT-BÖSARTIG
PATIENT NR. 12 WURDE FALSCH POSITIV KLASSIFIZIERT
PATIENTEN NR. 2, 11, 19, 23, 25 WAREN IN EINEM MODUS NICHT EINDEUTIG
KLASSIFIZIERBAR

PATIENT NUMBER	LIN	RBF	LIN	RBF
1	1	1	0,92	0,90
2	1	1	0,59	0,66
3	1	1	0,94	0,87
4	1	1	0,88	0,79
5	1	1	0,94	0,93
6	1	1	0,95	0,83
7	1	1	0,98	0,95
8	1	1	0,68	0,70
9	1	1	0,97	0,88
10	1	1	0,89	0,89
11	1	1	0,66	0,53
12	1	1	0,65	0,64
13	0	0	0,34	0,29
14	0	0	0,19	0,11
15	0	0	0,06	0,02
16	0	0	0,29	0,29
17	0	0	0,20	0,01
18	0	0	0,21	0,16
19	0	1	0,22	0,55
20	0	0	0,05	0,18
21	0	0	0,13	0,02
22	0	0	0,33	0,22
23	1	0	0,58	0,17
24	0	0	0,30	0,10
25	1	0	0,60	0,17
26	0	0	0,39	0,30

Alle Tumorproben wurden korrekt bestimmt, wobei es sich bei einer Probe um ein Carcinoma in situ (Tcis) handelte. Eine potentiell maligne Veränderung wurde fälschlicherweise als Tumor identifiziert. Somit erreichte die Blindstudie eine

Sensitivität von 100 %, die Spezifität lag bei 93 %, was einer Korrekturklassifizierungsrate von 96,5 % entsprach.

4. Diskussion

Es ist unumstritten, dass eine frühzeitige Diagnosestellung und Therapie des oralen Plattenepithelkarzinoms maßgeblich zu einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit beiträgt und die Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Patienten vermindert. Die rechtzeitige und zügige Abklärung unklarer Mundschleimhautveränderungen scheint die einzige Möglichkeit zu sein, die hohe Mortalitätsrate des Plattenepithelkarzinoms zu senken.

Viele Zahnärzte fühlen sich bei der klinischen Beurteilung von potenziell malignen Veränderungen der Mundschleimhaut überfordert einzuschätzen, inwieweit ein Befund entzündlicher Genese ist oder ob es sich bereits um eine maligne Veränderung handelt (de Jong et al., 2010). Mit der Einführung der Leipziger minimalinvasiven Bürstenbiopsie im Jahre 1998 steht eine weitere Methode zur Abklärung der Dignität unklarer Veränderungen zur Verfügung. Dabei werden die Präparate oraler Bürstenbiopsien durch Zytopathologen untersucht. Da die diagnostische Treffsicherheit in hohem Maße von der Erfahrung des untersuchenden Pathologen abhängt, zielen unsere Forschungsaktivitäten auf die Entwicklung von objektivierbaren Techniken zur Untersuchung der gewonnenen Bürstenbiopsate. Einen interessanten Ansatz sehen wir in der Möglichkeit mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie, ein sogenanntes „Peptidome-Profiling“ durchzuführen. In unserer Pilotstudie war es das Ziel, alle Untersuchungs- und Aufbereitungsschritte auf ein notwendiges Minimum zu beschränken, um die Methode robust gegen verfahrensabhängige Fehler zu machen. Diese Studie diene vorerst dazu, objektiv zwischen gesunder und tumorös erkrankter Schleimhaut zu unterscheiden.

Ein Grundproblem der pathologischen Diagnostik stellt nach wie vor die eindeutige zytologische und histologische Kategorisierung unterschiedlicher Dysplasiegrade bzw. der verschiedenen Ausmaße der squamösen intraepithelialen Neoplasie dar. Aus diesem Grund haben wir in unsere zweite Studie zusätzlich zur

Differenzierung von gesunden und malignen Proben die objektive Untersuchung von verdächtigen Läsionen der Mundschleimhaut mit eingeschlossen. Die genaue Unterscheidung dieser Mundschleimhautveränderungen ist von entscheidender Bedeutung für die notwendige Behandlungsstrategie. Bei malignen Veränderungen im Mundschleimhautbereich ist eine sofortige invasive Therapie unumgänglich. Demgegenüber steht eine weniger radikale Behandlung der Vorläuferläsionen, bei der engmaschige und non-invasive Kontrollen im Vordergrund stehen. Wir gehen davon aus, dass häufige invasive Gewebebiopsien einer verdächtigen Läsion lokale chronische Entzündungsprozesse stimulieren, die unter Umständen das Fortschreiten der malignen Transformation des Gewebes begünstigen oder initiieren. Es ist denkbar, dass ICPP mittels MALDI-ToF MS dazu beiträgt, den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem sich eine potentiell maligne Veränderung zu einer zweifelsfrei malignen Läsion entwickelt hat. Dies wird durch die Tatsache bekräftigt, dass wir ein Carcinoma in situ (SIN III) mittels ICPP diagnostiziert haben, während bei diesem Patienten zwei Gewebebiopsien falsch negative Ergebnisse zeigten. Erst die dritte Probeexzision konnte die Malignität zweifelsfrei bestätigen.

Unser Ziel war es weiterhin, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, effektiv und schnell eine sichere und klare Beurteilung der oralen Veränderung zu erzielen. Deshalb haben wir das Verfahren und die Probenaufbereitung deutlich vereinfacht und zusätzlich die Messung des Autoflex II MALDI-ToF Massenspektrometer durch eine automatische Messung standardisiert. Hiermit sind jegliche Formen der Datenmanipulation durch individuelle Handhabungen des Messgerätes ausgeschlossen, und es ist eine kürzere Messdauer zu erzielen.

Wir verifizierten die Ergebnisse der Pilotstudie mit einer Blindstudie, welche zusätzlich die massenspektrometrische Untersuchung von Tumorproben, Patienten mit potentiell malignen Veränderungen und gesunden Probanden beinhaltet. Nach bioinformatischer Auswertung wurden die Proben entweder der Tumorgruppe oder der Nicht-Tumorgruppe (PMVs und gesunde Proben) zugeordnet. Alle

Tumorpatienten wurden mit einer Sensitivität von 100 % korrekt erkannt. Die Spezifität ergab 93 %, da eine Vorläuferläsion (oralen Lichen) als Tumor identifiziert wurde. Diese Schleimhautläsion ist in regelmäßigen Verlaufskontrollen weiter zu untersuchen, um eine eventuelle Entartung dieser potentiell malignen Veränderung frühzeitig zu erkennen.

Zurzeit ist es dieser Untersuchungsmethode noch nicht möglich, zwischen gesunder Schleimhaut und potentiell malignen Veränderungen zu unterscheiden. Ebenso ist eine genaue Bestimmung des Zeitpunktes, ab wann sich eine fakultativ potentiell maligne Veränderung zu einer obligat potentiell malignen Veränderung transformiert, zum jetzigen Stand der Untersuchung aufgrund zu geringer Fallzahlen noch nicht eindeutig belegbar. Diese Differenzierung sollte Gegenstand weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen sein, um die Tumorfrüherkennung zu verbessern. Ungeachtet dessen gehen wir davon aus, dass diese Methode zur Tumorfrüherkennung die frühzeitige Diagnosestellung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ermöglicht und somit die Überlebenschance der Patienten maßgeblich erhöhen wird.

5. Publikationen

Titel

Oral brush biopsy analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry profiling – A pilot study

Autoren

Torsten W. Remmerbach, Katja Maurer, Sebastian Jahnke, Wolfgang Schellenberger, Klaus Eschrich, Julia Bertolini, Herbert Hofmann und Stefan Rupf

Journal Impact Factor: 3.123

Titel

Oral brush biopsy analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry for early cancer diagnosis

Autoren

Katja Maurer, Klaus Eschrich, Wolfgang Schellenberger, Julia Bertolini, Stefan Rupf und Torsten W. Remmerbach

Journal Impact Factor: 2.928

Contents lists available at ScienceDirect

Oral Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/oraloncology

Oral brush biopsy analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry profiling – A pilot study

Torsten W. Remmerbach^{a,b,*}, Katja Maurer^a, Sebastian Janke^a, Wolfgang Schellenberger^c, Klaus Eschrich^c, Julia Bertolini^d, Herbert Hofmann^e, Stefan Rupf^f

^a Department of Oral & Maxillofacial and Facial Plastic Surgery, University of Leipzig, Leipzig, Germany

^b Griffith Health Institute, Gold Coast campus, Griffith University, QLD 4222, Australia

^c Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Germany

^d Institute of Pathology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

^e Department of Oral Maxillofacial and Facial Plastic Surgery, SRH Zentralklinikum Suhl GmbH, Suhl, Germany

^f Clinic of Operative Dentistry, Periodontology and Preventive Dentistry, Saarland University, Homburg/Saar, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2010

Received in revised form 28 January 2011

Accepted 2 February 2011

Available online 26 February 2011

Keywords:

HNSCC

OSCC

Brush biopsy

MALDI-TOF mass spectrometry

Peptide profiling

Support vector machine classification

SUMMARY

Oral squamous cell carcinomas (OSCCs) often present as advanced tumours requiring aggressive local and regional therapy and result in significant functional impairment. The objective is to develop pre-symptomatic screening detection of OSCC by a brush biopsy method which is less invasive than the conventional biopsy for histology. Given the molecular heterogeneity of oral cancer, it is unlikely that even a panel of tumour markers would provide accurate diagnosis. Therefore, approaches such as the matrix-assisted-laser-desorption/ionisation-time-of-flight-mass-spectrometry (MALDI-TOF-MS) allow several biomarkers or peptide profile patterns to be simultaneously assessed.

Brush biopsies from 27 patients with histology-proven OSCCs plus 40 biopsies from 10 healthy controls were collected. MALDI-TOF-MS profiling was performed and additional statistical analysis of the data was used to classify the disease status according to the biological behaviour of the lesion. For classification a support vector machine algorithm was trained using spectra of brush biopsy samples to distinguish healthy control patients from patients with histology-proven OSCC.

MALDI-TOF-MS was able to distinguish between healthy patients and OSCC patients with a sensitivity of 100% and specificity of 93%.

In summary, MALDI-TOF-MS in combination with sophisticated bioinformatic methods can distinguish OSCC patients from non-cancer controls with excellent sensitivity and specificity. Further improvement and validation of this approach is necessary to determine its feasibility to assist the pre-symptomatic detection of head and neck cancer screening in routine daily practice.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Oral squamous cell carcinomas (OSCC) are among the ten most common cancers in the world, accounting for approximately 3–5% of all malignancies registered.¹ Despite great strides in managing oral cancer, the overall prognosis for many of these patients is devastating with an average 50% 5 years survival.² There is an urgent need to promote early diagnosis and therapy of oral cancers in order to reduce the current high morbidity and mortality rate. One seminal step was the comprehensive introduction of the minimally invasive brush biopsy technique for all dentists in Germany

in 2004, for the purpose of cancer screening. This innovative tool can help dentists and physicians to decide, whether a given oral lesion is (pre-)malignant.³ The cytologic results of brush based cancer diagnoses depends strongly on both the dentist's and pathologist's experience as well as adequately applied methods such as DNA-Cytometry,⁴ AgNOR-Analysis⁵ or immunocytochemistry.⁶ Thus simpler, faster, and more accurate diagnostic methods are desirable.

The analysis of the proteome, the complete range of proteins that determine a cell's physiological phenotype, might be a very promising approach which uses whole cell specimens of brush biopsies to determine grade and behaviour of neoplasms. The rapid development and improvement of mass spectrometry during the last decade^{7–9} has brought these methods into focus with particular interest on direct and rapid analysis of the proteome of cancer cells.

* Corresponding author at: Department of Oral & Maxillofacial and Facial Plastic Surgery, University of Leipzig, Nürnberger Straße 57, 04103 Leipzig, Germany. Tel.: +49 (0) 341 9721105, fax: +49 (0) 341 9721119.

E-mail address: torsten.remmerbach@medizin.uni-leipzig.de (T.W. Remmerbach).

Previous literature indicates that matrix-assisted-laser-desorption/ionisation-time-of-flight-mass-spectrometry (MALDI-TOF-MS) has been applied for protein profiling and identification using two basic approaches: (I) identification of specific proteins,¹⁰ and (II) analysis of complete proteomes. The latter can be based either on the detection of specific peaks¹¹ or on the analysis of complete spectral patterns.¹² The present study focuses on the capability of MALDI-TOF-MS to assign clinical samples directly to the correct biological behaviour. For the analysis of the spectra a support vector machine algorithm was applied to detect oral cancer using brush biopsies. This procedure may be clinically useful to support a rapid classification of tumour samples and healthy samples objectively.

Material and methods

Patients

From January 2003 to December 2006, brush biopsies were collected from 27 consenting patients, who had histologically proven OSCC. Additionally, 40 brush biopsies, from 10 healthy controls (all non-smokers) were obtained sampling both sides of the buccal mucosa, tongue, and floor of the mouth. Classification of OSCC biopsies included clinical history and physical examination of patients and the tumours staged according to the UICC.¹³ Non-cancer controls were recruited from staff at the Department of Oral Maxillofacial and Facial Plastic Surgery, University of Leipzig, and were free of cancer based on clinical follow-up of the respective persons.

Informed consent was obtained from each participant enrolled in the study in accordance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association 2006), and the research was approved by the Ethic Committee of the University of Leipzig (No. 123-2003). At least four brush biopsies were taken from each suspicious lesion and from healthy buccal aspects by turning the brush ten times to obtain a representative amount of epithelial cells. The collected cells were then washed thoroughly in 70% ethanol and stored at 2–7 °C for immediate transportation and sample preparation in the laboratory.

Sample preparation and MALDI-TOF mass spectrometry

Within 2 h of collection, cells were centrifuged and pellets containing approximately 10^5 epithelial cells were washed twice with 200 µl HPLC grade H₂O and centrifuged again at 1800 rpm at 4 °C for 10 min. The cells were resuspended in 10 µl matrix solution (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid, 20 mg/ml in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/acetonitrile 1:2) and 1 µl of this mixture was applied onto a stainless steel target (scout 384) in quintuplicate at room temperature and 20–80% humidity. Samples were allowed to dry and crystallize in air, washed twice with 0.1% TFA and recrystallized in 0.1% TFA/acetonitrile 1:2. An Autoflex II mass spectrometer (Bruker Daltonic, Bremen, Germany) supplied with an N₂-laser (337 nm, maximum frequency 50 Hz) was used. The measurements were carried out in linear positive ion detection mode (delay 400 ns, acceleration voltage 20 kV). The mass range of spectra was from 2 000 to 20 000 *m/z*. The final resolution in the mass range of 5 000 to 10 000 *m/z* was optimised to be higher than 600 and absolute signal intensities were about 10^3 . For calibration, a peptide mixture containing somatostatine 28 (synthetic, $M + H^+ = 3148.0$ Da), insulin (bovine pancreas, $M + H^+ = 5733.5$ Da), cytochrome c (horse heart, $M + H^+ = 12360.0$ Da), myoglobin (horse heart, $M + H^+ = 16951.0$ Da, Sigma, Taufkirchen, Germany) was used. A total of 200 laser shots (four cycles of 50 shots) were applied per spot to obtain a sum spectrum. Each sample was analysed within 3 h post collection.

Pre-processing of MALDI-TOF MS data: mass-drift adjustment and cluster formation

Using the software flexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) the baseline was subtracted from each sum spectrum and 40 mass peaks were labelled automatically according to their appearance above the background (threshold ratio 1.5). Correct labelling was controlled manually. Peak lists containing masses and intensities were exported as ASCII files. In order to refine the mass accuracy of the spectra all peak lists were aligned for mass drift adjustment. For this a windowing procedure as described in Rupf et al.⁷ was applied. Briefly, a mass dependent size of the mass window was used according to mass window size = $\text{size}_{\text{abs}} + (\text{size}_{\text{rel}} * \text{peak mass})$ with $\text{size}_{\text{abs}} = 0.8$ Da and $\text{size}_{\text{rel}} = 0.001$. A master spectrum containing such aligned peaks, which occurred with high frequency in the samples, was constructed. In the next step, all spectra were aligned individually to this master spectrum by linear mass adjustment to peaks of the master spectrum. From the aligned spectra peak clusters were derived. Each cluster contained all peaks within a mass window around the cluster mass. Peaks originating from different spectra and occurring in the same window were assigned to one cluster and are represented by the cluster mass. In a few cases neighbouring clusters overlap forming “superclusters” which were omitted from further calculations.

Statistical analysis

For classification of spectra, the support vector machine (SVM) tool implemented in the Bioinformatic toolbox of MatLab 7.6.0 (The MathWorks, Natick, USA) and the Spider package from Department of Empirical Inference for Machine Learning and Perception (Max Planck Institute for Biological Cybernetics, Tübingen, Germany) were used. The SVM algorithm^{14,15} was trained using a set of spectra of brush biopsy samples ($n = 30$) of healthy persons (Fig. 1A) as well as from patients with biopsy-proven OSCC ($n = 12$). Classification quality was checked by a 10-fold cross validation of the training set of spectra. For validation of the classification procedure a test group of spectra from the remaining 15 cancer samples (Fig. 1B) and 10 healthy controls was classified by the SVM procedure using the parameters which were derived from the optimisation of the classification of the spectra of the training group.

Results

The study population consisted of 27 patients presenting with OSCC composed of 18 men and nine women with a median age of 62 years (range 28–86 years), who had been referred for examination and treatment. The “gold standard” for the establishment of diagnostic accuracy for all 27 cancer lesions was set by scalpel biopsy based histology. Staging revealed nine patients with pT1-, six patients with pT2-, four patients with pT3- and four patients with pT4-stage of oral cancer. Eighteen patients showed pN0-, two patients pN1- and three patients pN2b-stage of their disease and one patient showed pM1. At four cases only scalpel biopsies were performed therefore no staging could be specified (Table 1). The 40 brush biopsies from healthy controls included seven men and three women with a median age of 28 years (range: 25–30 years).

The investigated samples of cancerous or healthy mucosa yielded characteristic mass spectra with reproducible peaks found up to 16 000 *m/z*. Peaks with high intensities were found in the range of 3 000–15 000 *m/z*. A classification solely by visual inspection of the spectra was impossible (Fig. 1).

Figure 1 MALDI-TOF mass spectra from a healthy sample (A) and a cancer sample (B).

Table 1

Synopsis of patients' clinical palpation status and histopathological parameters according to UICC.²⁰

OSCC	Age	Palpation status	T class. (pT)	Nodal status (pN)	Grade	Type (ICD-O)	Location (ICD-O)
1	62	+	4	0	2	8070-3	C04.0
2	59	+	3	2	2	8070-3	C02.1
3	86	+	2	0	2	8070-3	C02.1
4	50	+	*		2	8071-3	C41.1
5	63	+	1	0	2	8070-3	C05.1
6	28	+	1	0	2	8070-2	C04
7	57	+	2	0	2	8070-3	C04.1
8	63	+	3	0	2	8070-3	C05.1
9	43	+	1	0	2	8070-3	C02.1
10	91	+	*		2	8070-3	C03.1
11	69	+	1	0	2	8071-3	C00.1
12	60	+	1	0	2	8070-3	C04
13	47	+	3	0	2	8070-3	Li C04.1
14	66	+	1	0	2	8070-3	C00.1
15	52	+	4	2	2	8070-3	C02.9
16	50	+	*		2	8071-3	C05.0
17	52	+	*		2	8071-3	C04
18	66	+	2	0	2	8070-3	C05.1
19	72	+	1	0	2	8070-3	C03.1
20	74	+	4	0	2	8070-3	C05.0
21	74	+	1	0	3	8071-3	C02.2 04.0
22	70	+	2	0	2	8070-3	C03.0
23	51	+	2	1	2	8070-3	C03.1
24	62	+	3	2	2	8070-3	C01
25	62	+	4	0	2	8070-3	C04.0
26	50	+	2	1	2	8070-3	C04.1
27	47	+	1	0	2	8070-3	C04.1

*, No surgery training group: 1–11 test group sample 12–26.

For further bio-statistical analysis the cohort was divided into a training and a test group consecutively. Forty-two randomly assigned samples representing the training group, after cross-validation, reached a sensitivity of 91% and a specificity of 92%.

Table 2

Diagnostic accuracy of training and test group.

	Training group including peak intensities (%)	Training group excluding peak intensities (%)	Test group including peak intensities (%)	Test group excluding peak intensities (%)
Sensitivity	90	91	97	100
Specificity	95	92	92	93
Correct rate	94	91	93	96

Twenty-five brush biopsies representing the test group, and using the support vector machine, achieved a sensitivity of 100% and a specificity of 93% (Table 2).

Discussion

Detection of head and neck cancer at early disease stages enables early, minimally invasive therapy as well as improved prognosis and quality of life for affected patients. The focus of oral cancer detection has expanded from histological or cytological interpretation, to more detailed genetic information, and recently to protein expression analysis. Many studies have shown limited success in identifying oral cancer related single DNA, RNA or protein biomarkers or panels of markers that potentially could aid the early diagnosis and prognosis of OSCCs.¹⁶ Given the molecular heterogeneity of oral cancer, it seems unlikely that a single marker molecule could enable accurate and reliable diagnosis. Since proteome/peptidome analysis reflects the physiological state of cells better than genomics does, clinicians may expect proteomics will provide more reliable data for diagnosing or monitoring these diseases. Plasma protein expression using matrix assisted or surfaces enhanced laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI- or SELDI-TOF-MS) had been described as a useful tool

which provided moderate to good sensitivity and specificity in discriminating OSCC from healthy controls.¹⁷ One approach was to use expression-profiling strategies applied to clinically derived serum and plasma cohorts associated with OSCC detection and prognostics using SELDI-TOF.^{9,18} However, a major disadvantage using serum samples is the presence of highly abundant low molecular weight proteins known to be associated with the blood clotting process like fibrinopeptides α and β . We believe that most of these peptides are derived from the sequential cleavage from fibrinogen during clot formation by thrombin. Due to the low concentration of biomarkers in body fluids it is a prerequisite to enrich these proteins by time-consuming and costly processes.

Others indicate these molecules as surrogate biomarkers indicative of the presence of tumour in the body.

Therefore we prefer a totally different sample collection procedure by simple brush biopsies directly from cancer tissue of the oral cavity. Unlike serum samples and other body fluids samples, no individual tumour marker identification is necessary because the tumour cells are collected directly from the affected mucosal area. This leads to a fast and practical tumour diagnostics. Peptide separation, e.g. peptidome fractionation with magnetic beads can be disregarded, and we avoid procedure-dependent errors. In other studies for peptidome separation all serum samples of the discovery set had to be processed once and analysed simultaneously to avoid procedure-dependent errors.¹⁹ Approaches concerned with discovering biomarkers of OSCC by analyzing biopsies (OSCC and healthy) had to “analyse all samples within the shortest possible period of time, using the same bath of reagents, ProteinChip arrays and using the same instrument setting throughout”.¹⁸ This extensive procedure cannot easily be integrated into a daily routine set-up. We prefer a faster, simpler way of diagnosis, able to be accomplished routinely by medical staff and pathologists. It also reduces the potential for errors when using fewer steps in the procedure. We consider this fact being one of the reasons for the high sensitivity of 100% and specificity of 93% accomplished in this study. While it was not our aim to find specific tumour marking proteins, we were able to identify whether a sample was neoplastic or not, by “fingerprint” protein patterns.

We have proven that cell peptidome profiling with MALDI-TOF-MS is potentially useful for OSCC detection. In future, this diagnostic tool may enable medical staff to perform more reliable and early diagnoses of OSCC possibly leading to a decrease of advanced-stage diseases. To our knowledge, this is the first pilot study using MALDI-TOF-MS for intact cell peptide profiling that successfully classifies the biological nature of oral samples.

Conflict of interest statement

Dr. Torsten W. Remmerbach is CEO of the DGOD mbH, Leipzig, Germany (Dental healthcare supplier). All other authors: none declared.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Christian Bergmeier for technical assistance and Ms. Anja Niemeyer-Rupf, Dr. Christoph Huppa and Heike Börnert for critical reading of the manuscript. We thank Pro-

fessor Stephen Weinstein and Dr. Lis Weinstein for their critical remarks and linguistic contributions. This research was supported by an R&D grant (NBL-3, formel.1-27; 01 ZZ 0106) from the German Federal Ministry of Education and Research, Fund for Regional Development 2003 and the Medical Faculty of the University of Leipzig, Germany, to TWR.

References

- Schön D, Bertz J, Gorsch B, Haberland J, Kurth BM. Federal Cancer Reporting Unit. Surveillance program for cancer registration in Germany. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2004;**47**(5): 429–36.
- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000;**50**(1):7–33.
- Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A. Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2004;**8**(4):229–36.
- Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, et al. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 2001;**22**(4):211–21.
- Remmerbach TW, Weidenbach H, MÄller, Hemprich A, Pomjanski N, Buckstegge B. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol* 2003;**25**(3):139–46.
- Driemel O, Dahse R, Hakim SG, Tsioutsias T, Pistner H, Reichert TE, et al. Laminin-5 immunocytochemistry: a new tool for identifying dysplastic cells in oral brush biopsies. *Cytopathology* 2007;**18**(6):348–55.
- Rupf S, Hannig M, Breitung K, Schellenberger W, Eschrich K, Remmerbach T, et al. Phenotypic heterogeneity of *Streptococcus mutans* in dentin. *J Dent Res* 2008;**87**(12):1172–6.
- Sickmann A, Mreyen M, Meyer HE. Mass spectrometry – a key technology in proteome research. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003;**83**:141–76.
- Soltys SG, Le QT, Shi G, Tibshirani R, Giaccia AJ, Koong AC. The use of plasma surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry proteomic patterns for detection of head and neck squamous cell cancers. *Clin Cancer Res* 2004;**10**(14):4806–12.
- Madonna AJ, Voorhees KJ, Taranenko NI, Laiko VV, Doroshenko VM. Detection of cyclic lipopeptide biomarkers from *Bacillus* species using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2003;**75**(7):1628–37.
- Yao ZP, Afonso C, Fenselau C. Rapid microorganism identification with on-slide proteolytic digestion followed by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry and database searching. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;**16**(20):1953–6.
- Bright JJ, Claydon MA, Soufian M, Gordon DB. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J Microbiol Methods* 2002;**48**(2–3):127–38.
- Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F. *TNM Klassifikation Maligner Tumoren*. Berlin: Springer; 2005.
- Wieten G, Haverkamp J, Engel HW, Berwald LG. Application of pyrolysis mass spectrometry to the classification and identification of mycobacteria. *Rev Infect Dis* 1981;**3**(5):871–7.
- Wieten G, Haverkamp J, Meuzelaar HL, Engel HW, Berwald LG. Pyrolysis mass spectrometry: a new method to differentiate between the mycobacteria of the ‘tuberculosis complex’ and other mycobacteria. *J Gen Microbiol* 1981;**122**(1): 109–18.
- Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2009;**45**(4–5):335–9.
- Wadsworth JT, Somers KD, Stack Jr BC, Cazares L, Malik G, Adam BL, et al. Identification of patients with head and neck cancer using serum protein profiles. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;**130**(1):98–104.
- Roesch-Ely M, Nees M, Karsai S, Ruess A, Bogumil R, Warnken U, et al. Proteomic analysis reveals successive aberrations in protein expression from healthy mucosa to invasive head and neck cancer. *Oncogene* 2007;**26**(1):54–64.
- Fiedler GM, Leichtle AB, Kase J, Baumann S, Ceglarek U, Felix K, et al. Serum peptidome profiling revealed platelet factor 4 as a potential discriminating peptide associated with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2009;**15**(11):3812–9.
- Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Berlin: Springer; 2002.

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Oral Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/oraloncology

Oral brush biopsy analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry for early cancer diagnosis

Katja Maurer^a, Klaus Eschrich^c, Wolfgang Schellenberger^c, Julia Bertolini^d, Stefan Rupf^e,
Torsten W. Remmerbach^{a,b,*}^a Oral Medicine Unit, Department of Oral and Maxillofacial and Facial Plastic Surgery, University of Leipzig, Leipzig, Germany^b Griffith Institute of Health and Medical Research, Gold Coast Campus, Griffith University, QLD 4222, Australia^c Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Leipzig, Germany^d Institute of Pathology, University of Leipzig, Leipzig, Germany^e Clinic of Operative Dentistry, Periodontology and Preventive Dentistry, Saarland University, Homburg/Saar, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2012

Received in revised form 22 August 2012

Accepted 23 August 2012

Available online xxxx

Keywords:

Oral cancer

Brush biopsy

MALDI-ToF MS

Early cancer detection

SUMMARY

Objectives: Intact cell peptidome profiling (ICPP) with MALDI-ToF Mass Spectrometry holds promise as a non-invasive method to detect head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) objectively, which may significantly improve the early diagnosis of oral cancer. The present study was designed to discriminate between tumour samples and non-cancer controls (healthy mucosa and oral lesions) by analysing complete spectral patterns of intact cells using MALDI-ToF MS.

Materials and methods: In the first step, a database consisting of 26 patients suffering from HNSCC was established by taking brush biopsy samples of the diseased area and of the healthy buccal mucosa of the respective contralateral area. After performing MALDI-ToF MS on these samples, classification analysis was used as the basis for further classification of an additional 26 blinded samples including HNSCC, oral lesions and healthy mucosa.

Results: By analysing spectral patterns of the blinded samples, all cancerous lesions were defined accurately. One incorrect evaluation (false positive) occurred in the lesion cohort, leading to a sensitivity of 100%, a specificity of 93% and an overall accuracy of 96.5%.

Conclusion: ICPP using MALDI-ToF MS is able to distinguish between healthy and cancerous mucosa and between oral lesions and oral cancer with excellent sensitivity and specificity, which may lead to more accurate early diagnosis of HNSCC.

© 2012 Published by Elsevier Ltd.

Introduction

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) are by far the most common malignant neoplasms of the oral cavity.¹ Survival rates of patients suffering from HNSCC have remained unchanged over the past 30 years.² Since the survival rate depends highly on the stage of the lesion, it is essential to improve the early detection of this type of cancer.⁴ Moreover, requisite treatment often leads to significant functional morbidity that may adversely affect quality of life.³ Most HNSCCs develop from oral lesions, which are called oral potentially malignant disorders (OPMDs). When malignant mucosal lesions are detected directly after transitioning from OPMD to manifest cancer, therapy is more effective,

recovery more likely and consequently the survival rate increases significantly.⁴

During the past decade, a particular focus has been placed on the investigation of valid biomarkers such as p53 and CD44 in biological fluids for use as diagnostic tools. One potential biomarker for the diagnosis of HNSCC may be the detection of aberrant promoter hypermethylation of cancer-associated genes in salivary rinses.⁵ Other workers have investigated the correlation of high expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral cancer. Dysfunction of this receptor and its associated pathways often occurs in HNSCC (80–90%) and also correlates with poor prognosis in patients suffering from oral cancer.⁶ At present, however, no effective clinical screening test exists for HNSCC beyond physical examination.²

Unfortunately, it is quite difficult for clinicians to distinguish OPMDs from those already transitioned to malignancy by visual inspection. Consequently, it is necessary to employ histological analysis of invasive tissue biopsies in order to discriminate healthy from pathologic mucosa.⁷ For this reason, the implementation of

* Corresponding author. Address: Department of Oral and Maxillofacial and Facial Plastic Surgery, University of Leipzig, Nürnberger Straße 57, 04103 Leipzig, Germany. Tel.: +49 (0) 341 9721105; fax: +49 (0) 341 9721119.

E-mail address: torsten.remmerbach@medizin.uni-leipzig.de (T.W. Remmerbach).

the minimal invasive brush biopsy technique in 2004 was a milestone in cancer detection.^{8–10}

Brush biopsy is an approved early detection tool, but its success is highly dependent on the subjective opinions and the accuracy of pathologists. Thus we sought to develop an objective method to distinguish between malignant and non-cancerous samples by intact cell peptidome profiling using matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS). When maturing from a healthy cell into a tumour cell, a series of genetic alterations occur. Consequently, specific changes between proteomic patterns of different cell types (healthy and tumour cells) can be verified by comparing their complete mass spectra.^{11–12} In a pilot study, we demonstrated that MALDI-ToF MS is able to distinguish between patients suffering from HNSCC and healthy controls with a sensitivity of 100% and a specificity of 93%.¹²

Materials and methods

Patients

A reference group of 26 patients with histologically proven HNSCCs composed of 19 men and 7 women with a mean age of 61.6 years (range 44–96, SD $\pm$ 11.2) was enrolled in this study. This study was approved by the Ethics Committee of the University of Leipzig (No. 123-2003). Subjects were recruited from the Department of Maxillofacial and Facial Plastic Surgery, University of Leipzig. From each subject one brush biopsy sample was collected of the diseased area and one from healthy buccal mucosa of the corresponding contralateral area. To obtain brush biopsies, the brush was turned 10 times on the mucosal surface. Subsequently, the collected cells were washed thoroughly in an Eppendorf tube containing 1 ml 70% ethanol and stored at 2–7 °C until further preparation. On the basis of these samples a database of MALDI-ToF mass spectra was established and analysed from December 2009 until November 2010.

Afterwards, a blinded study was undertaken by collecting one brush biopsy sample of an oral tumour, OPMD lesion and another from healthy mucosa from a group of 26 additional subjects, comprised of 15 men and 11 women with a mean age of 56.3 years (range 26–81, SD $\pm$ 17.38) completely blinded to the assessor. Informed consent was obtained from each subject, according to the declaration of Helsinki (World Medical Association 2008).¹²

Sample preparation and MALDI-ToF Mass Spectrometry

The cell suspension (1 ml) was centrifuged at 2000g for 2 min. After washing the cell pellets once with 70% ethanol, the suspension was centrifuged again followed by removal of the supernatant. After air drying, the pellets were resuspended in 20 μ l matrix solution (alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (20 mg/ml in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/acetonitrile 1:2). 1 μ l of this mixture was pipetted onto a stainless steel target (Scout 384) on 5–10 spots. After crystallizing by air drying, the samples were analysed with an Autoflex II MALDI-ToF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) supplied with a nitrogen laser (337 nm) and operating in linear positive ion detection mode (delay 350 ns, acceleration voltage 20 kV). Spectra were obtained in a range from 2000 to 13,000 mass over charge ratio (m/z). Spectral resolution was optimised to be higher than 300. An extract from *Escherichia coli* GM2163 was used for mass calibration. 500 laser shots were accumulated per mass spectrum using the automatic acquisition mode.

The raw data were transferred to Flexanalysis version 2.4 (Bruker Daltonics) for baseline subtraction and slight smoothing followed by automated peak extraction (Fig. 1). 60 peaks were

automatically labelled in each spectrum according to their appearance above the background (threshold ratio 1.5). Correct labelling was controlled manually. Peak lists containing masses and intensities were exported as ASCII files.

Cluster formation of the mass peaks

To refine the mass accuracy of the spectra, all peak lists were aligned for mass drift adjustment.^{13,14} In short, a mass-dependent size of the mass window was calculated according to: window size = size_{abs} + (size_{rel} $\times$ peak mass) with size_{abs} = 0.8 m/z and size_{rel} = 0.001. A mean spectrum containing common m/z values was thereby obtained. All spectra were aligned individually to the peaks of the mean spectrum by linear mass adjustment of the peaks.¹⁵ Subsequently, peak clusters were formed which contained all peaks originating from different individual spectra, but occurring in the same window. All peaks assigned to one cluster are represented by the respective mean cluster mass.

Statistical analysis

For classification of spectra, the freely available SVM (support vector machine) software tool LIBSVM¹⁶ was used in a MATLAB environment¹⁷ to generate SVM models. For feature selection, a recursive feature elimination procedure (SVM-RFE)¹⁸ and the shrunken centroid algorithm^{19,20} were applied. The LIBSVM tool includes a method to not only obtain a classification, but to generate probability estimates instead of the binary output for classification problems.²¹ The SVM algorithm was trained with the set of spectra of brush biopsy samples from the reference group. Classification quality was checked by a 10-fold cross-validation. For validation of the classification procedure, the spectra obtained from the patients of the blinded study were classified by the SVM procedure using both a linear and a radial basis function (rbf)-kernel. With respect to the rbf-kernel, kernel parameters derived from the optimisation of the classification of the spectra of the reference group were applied. Samples were classified as “cancer” if their probability to be malignant was >60%, “healthy” if their probability to be malignant was <40%, and “not classifiable” if their probability to be malignant was between 40% and 60%. We interpreted the data as “cancer” if both linear and rbf-kernel assigned the tissue to be malignant and “healthy” when at least one of the kernels was classified as healthy. Samples assigned as “not classifiable” by both kernels were deemed to be indeterminate (Table 1).

Results

An initial database consisting of mass spectra of tumour samples (n = 26) and unaffected control tissue (n = 26) obtained from the same mouth was established as the basis for further classification of unknown samples.

Although the mass spectra of tumour samples and healthy control tissue were rather similar, after optimisation of the parameters, the support vector machine (SVM) algorithm could successfully classify them. After a tenfold cross-validation, an accuracy of 93%, a sensitivity of 92% and a specificity of 95% were achieved (Table 2).

A blinded study was then undertaken by collecting a single brush biopsy sample from each of 26 subjects. Identity of tissue samples was known only to the medical staff members who obtained them and consisted of cancer tissue (n = 11), OPMD lesions (n = 11) and healthy samples (n = 4). The “gold standard” for the establishment of diagnostic accuracy of all 37 malignant lesions was scalpel biopsy-based histology. Staging revealed one patient with Tcis, ten patients with pT1-, six patients with pT2-, five

Fig. 1 MALDI-ToF mass spectra of lesion (A), SIN III (B) and tumour (C).

Table 1
Classification of spectra.

Patient number	LIN	RBF	LIN	RBF
1	1	1	0.92	0.90
2	1	1	0.59	0.66
3	1	1	0.94	0.87
4	1	1	0.88	0.79
5	1	1	0.94	0.93
6	1	1	0.95	0.83
7	1	1	0.98	0.95
8	1	1	0.68	0.70
9	1	1	0.97	0.88
10	1	1	0.89	0.89
11	1	1	0.66	0.53
12	1	1	0.65	0.64
13	0	0	0.34	0.29
14	0	0	0.19	0.11
15	0	0	0.06	0.02
16	0	0	0.29	0.29
17	0	0	0.20	0.01
18	0	0	0.21	0.16
19	0	1	0.22	0.55
20	0	0	0.05	0.18
21	0	0	0.13	0.02
22	0	0	0.33	0.22
23	1	0	0.58	0.17
24	0	0	0.30	0.10
25	1	0	0.60	0.17
26	0	0	0.39	0.30

Subjects No. 1–11 HNSCC, 12–22 oral lesions, 23–26 healthy controls, 1 is equivalent to cancer, 0 is equivalent to non-cancerous, Subject No. 12 was misclassified (false positive), Subjects Nos. 2, 11, 19, 23, 25 were not classifiable in one kernel.

patients with pT3- and seven patients with pT4-stage of oral cancer. Nodal pathology disclosed fourteen patients to be pN0-, four patients pN1- and 11 patients at pN2b-stage of their disease. None of the patients were at pM1.¹² In eight cases scalpel biopsies were performed without any further surgical intervention; therefore no staging parameter could be obtained. All lesions including hyperkeratosis, oral lichen and ulcer were biopsy proven by conventional cytopathology (Table 3).

Using the mass spectra obtained from the reference group as a basis, the SVM algorithm was applied to classify the unknown samples of the blind study as either cancerous or non-cancerous. In five cases either linear or rbf detection mode was “not classifiable”. However, in none of the samples did both classifying procedures (linear and rbf) reveal indeterminate results, hence we were able to categorise every sample clearly. All cancer samples were diagnosed correctly. One OPMD lesion was misclassified as cancerous (false positive) (Table 1). Accordingly, the blinded study reached a sensitivity of 100%, a specificity of 93% and an accuracy of 96.5% (see Table 2).

Discussion

Due to the lack of progress in survival of patients suffering from HNSCC, early detection is of particular importance for improved outcome of this serious disease. Our study demonstrated that peptide fingerprints may be obtained from intact cells by using MALDI-ToF MS, which can be used as a discriminant tool to distin-

Table 2

Diagnostic performance of database and blind study.

Diagnostic performance	Database		Blind study		Interpretation (%)
	Linear kernel mode (%)	RBF kernel mode (%)	Linear kernel mode (%)	RBF kernel mode (%)	
Accuracy	93	96	90	95	96.50
Sensitivity	96	96	100	100	100
Specificity	90	95	80	87	93

Table 3

Clinical characteristics of patients with HNSCC, oral lesions and healthy mucosa.

Details of datasets		Number all cases [n]	Database [n]	Blind study [n]
HNSCC	Tcis	1	–	1
	T1/T2	16	10	6
	T3/T4	12	10	2
	N0	14	7	7
	N1	4	3	1
	N2	11	9	2
	Male	27	19	8
	Female	10	7	3
Oral lesion	Oral lichen	8	–	8
	Hyperkeratos	2	–	2
	Ulcer	1	–	1
	Male	5	–	5
	Female	6	–	6
Healthy mucosa	Male	21	19	2
	Female	9	7	2

guish the biological nature of samples based on the analysis of complete spectral patterns.¹² This approach showed excellent sensitivity and specificity in determining the distinction between tumour cells and healthy tissue. We therefore decided to further develop the technique of intact cell peptidome profiling (ICPP) by undertaking a blind study to attempt to differentiate between mucosal lesions and neoplastic mucosal tissue.

Potentially malignant disorders of the oral mucosa is a clinical term representing mucosal alterations that carry the risk of converting into cancer.²² The transformation rate is approximately 1%. Unfortunately, correctly identifying these mucosal lesions remains an unsolved problem. Traditional methods employed by pathologists, such as scoring atypia or dysplasia, are both subjective and lack sensitivity to predict accurately which lesion may progress with time.²³ For this reason, the objective distinction not only between healthy tissue and tumour samples, but between oral lesions and cancerous tissue was brought into our focus. One of the main challenges for the practicing dentist is the consideration of whether or not a suspicious mucosal lesion has already evolved into malignancy, resulting in totally different treatment strategies. The consequences of overlooking a cancerous lesion may be significant, since curative treatment can generally be achieved in early tumour stages and depends highly on the tumour size. Five year survival rate of patients suffering from oral cancer with a tumour size smaller than 2 cm approaches 90%.⁴ Inasmuch as oral lesions require non-invasive monitoring at frequent intervals, periodic inspection and cytological analysis by employing non-invasive brush biopsies are very effective methods for secondary cancer prevention. We believe that invasive scalpel biopsies may lead to chronic inflammation in the suspicious mucosal area, which in turn may possibly promote progression to cancer. ICPP with MALDI-ToF MS may help to detect the point of transition to

malignancy or the earliest stages of cancer, enabling the likelihood that the cancer can be cured without the need for invasive therapy of non-cancerous oral lesions. Unfortunately, at this point in time, we have not been able to investigate the nature of precursor lesions that will definitively progress into cancer, due to small numbers of affected patients. Nevertheless, we were able to detect a carcinoma in situ (SIN III, patient No. 11) by using ICPP with MALDI-ToF MS, in which scalpel biopsy had resulted in misdiagnosis on two previous occasions. Only the third invasive biopsy confirmed the strong suspicion of the malignant behaviour of the corresponding mucosal area. Potentially malignant disorders are still a major challenge in head and neck oncology, but even T1 or T2 cancers remain misdiagnosed or even undetected in routine daily dental care.

Current approaches demonstrate the relevant use of MALDI imaging mass spectrometry for the diagnosis of other neoplastic disease, including pancreatic ductal adenocarcinoma. Statistical analysis of spectra was able to differentiate between normal pancreatic tissue and pre-neoplastic pancreatic lesions in genetically engineered mouse models. Intraepithelial neoplasia and intra-ductal papillary mucinous neoplasm could be distinguished from normal pancreatic tissue and pancreatic ductal adenocarcinoma.²⁴

Other groups, including Jarai and colleagues, have examined the potential clinical application of MALDI analysis by using saliva of patients with oral cancer for detection of tumour markers, such as annexin A1, beta- and gamma-actin, and p53 pathway proteins.²⁵ Additionally, Szanto and co-workers demonstrated the huge potential for further development of MALDI-ToF after electrophoretic separation and in-gel tryptic digestion of saliva samples as a high-throughput and cost-effective screening tool for early detection of oral cancer.²⁶

As previously described in our pilot study, it is desirable to have a fast and simple method of diagnosis, able to be performed by dentists, medical staff and pathologists. We assume that fewer procedural steps result in fewer procedure-dependent errors, leading to good sensitivity and specificity.¹² As a consequence, we also endeavored to simplify the procedure of sample preparation remarkably. Additionally, measurement with the Autoflex II MALDI-ToF mass spectrometer was arranged automatically for each spot. Consequently, no individual handling may diversify the data and a much faster accomplishment of the measuring process is assured. These advances may lead to a shorter period of time to diagnosis, lessening the possibility of potential error and resulting in a more cost-effective procedure. In order to reinforce our findings and to improve the accuracy of the pilot study, our blinded study included patients with oral cancer, those with OPMD lesions and healthy controls. Intact cell peptidome profiling with MALDI-ToF MS was applied to all samples. When classifying the spectra bioinformatically, the healthy samples and oral lesions were assigned as either being cancerous or non-cancerous, resulting in a sensitivity of 100% and a specificity of 93%.

As a consequence of the routine clinical application of this technique in the future, broad screening of suspicious lesions may lead to earlier diagnosis (and thus early therapy), which may have a significantly positive impact on the quality of life of affected patients. Prospectively, we feel strongly confident that this new diagnostic tool might be able to decrease advanced-stage HNSCC by ensuring a more secure and early diagnosis of oral cancer, leading to an improvement in the current low survival rate.¹²

Conflict of interest statement

Dr. Torsten W. Remmerbach is CEO of the DGOD mbH, Leipzig, Germany (Dental healthcare supplier). All other authors: None declared.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Andrew Eichenfield (NY) for his critical remarks and linguistic contributions. This research was supported by an R&D Grant (NBL-3, formel.1-27; 01 ZZ 0106) from the German Federal Ministry of Education and Research, Fund for Regional Development 2003 and the Medical Faculty of the University of Leipzig, Germany, to T.W.R.

References

- Sarkis SA, Abdullah BH, Abdul Majeed BA, Talabani NG. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis. *Head Neck Oncol* 2010;**2**:13.
- Gourin CG, Xia ZS, Han Y, French AM, O'Rourke AK, Terris DJ, et al. Serum protein profile analysis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;**132**(4):390–7.
- Wadsworth JT, Somers KD, Cazares LH, Malik G, Adam BL, Stack Jr BC. Serum protein profiles to identify head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2004;**10**(5):1625–32.
- Remmerbach TW, Hemprich A, Böcking A. Minimally invasive brush-biopsy: innovative method for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2007;**117**(9):926–40.
- Sun W, Zaboli D, Liu Y, Arnaoutakis D, Khan T, Wang H, et al. Comparison of promoter hypermethylation pattern in salivary rinses collected with and without an exfoliating brush from patients with HNSCC. *PLoS One* 2012;**7**(3):e33642.
- Glazer CA, Chang SS, Ha PK, Califano JA. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. *Oral Oncol* 2009;**45**(4–5):440–6.
- de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen XB, Kooren JA, et al. Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. *PLoS One* 2010;**5**(6):e11148.
- Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A. Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2004;**8**(4):229–36.
- Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A. Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Anal Cell Pathol* 2003;**25**(4):159–66.
- Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, et al. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 2001;**22**(4):211–21.
- Driemel O, Murzik U, Escher N, Melle C, Bleul A, Dahse R, et al. Protein profiling of oral brush biopsies: S100A8 and S100A9 can differentiate between normal, premalignant, and tumour cells. *Proteomics Clin Appl* 2007;**1**(5):486–93.
- Remmerbach TW, Maurer K, Janke S, Schellenberger W, Eschrich K, Bertolini J, et al. Oral brush biopsy analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry profiling – a pilot study. *Oral Oncol* 2011;**47**(4):278–81.
- Rupf S, Breitung K, Schellenberger W, Merte K, Kneist S, Eschrich K. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol Immunol* 2005;**20**(5):267–73.
- Stingu CS, Eschrich K, Rodloff AC, Schaumann R, Jentsch H. Periodontitis is associated with a loss of colonisation by *Streptococcus sanguinis*. *J Med Microbiol* 2008;**57**(Pt 4):495–9.
- Morris JS, Coombes KR, Koomen J, Baggerly KA, Kobayashi R. Feature extraction and quantification for mass spectrometry in biomedical applications using the mean spectrum. *Bioinformatics* 2005;**21**(9):1764–75.
- C-CaC-J Lin. LIBSVM: a library for support vector machines. *ACM Trans Intell Syst Technol* 2011;**2**(3):27.
- Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008;**37**(3):127–33.
- Zhang X, Lu X, Shi Q, Xu XQ, Leung HC, Harris LN, et al. Recursive SVM feature selection and sample classification for mass-spectrometry and microarray data. *BMC Bioinform* 2006;**7**:197.
- Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**(10):6567–72.
- Wang S, Zhu J. Improved centroids estimation for the nearest shrunken centroid classifier. *Bioinformatics* 2007;**23**(8):972–9.
- Lin C-JL, H-T, Lin C-J, Weng RC. A note on Platt's probabilistic outputs for support vector machines. *Mach Learn* 2007;**68**(3):267–76.
- Li L, Psoter WJ, Buxo CJ, Elias A, Cuadrado L, Morse DE. Smoking and drinking in relation to oral potentially malignant disorders in Puerto Rico: a case-control study. *BMC Cancer* 2011;**11**:324.
- Godge PY, Poonja LS. Quantitative assessment of expression of cell adhesion molecule (CD44) splice variants: CD44 standard (CD44s) and v5, v6 isoforms in oral leukoplakias: an immunohistochemical study. *Ind J Dent Res* 2011;**22**(3):493–4.
- Gruner BM, Hahne H, Mazur PK, Trajkovic-Arsic M, Maier S, Esposito I, et al. MALDI imaging mass spectrometry for in situ proteomic analysis of preneoplastic lesions in pancreatic cancer. *PLoS One* 2012;**7**(6):e39424.
- Jarai T, Maasz G, Burian A, Bona A, Jambor E, Gerlinger I, et al. Mass spectrometry-based salivary proteomics for the discovery of head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2012;**18**(3):623–8.
- Szanto I, Mark L, Bona A, Maasz G, Sandor B, Gelencser G, et al. High-throughput screening of saliva for early detection of oral cancer: a pilot study. *Technol Cancer Res Treat* 2012;**11**(2):181–8.

6. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. dent.

Oral brush biopsy analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry for early cancer diagnosis

eingereicht von:

Katja Maurer

angefertigt an dem:

Universitätsklinikum Leipzig, Sektion für Klinische und Experimentelle Orale Medizin an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie

betreut von:

Univ.-Professor Dr. med. dent. habil. Torsten W. Remmerbach

Univ.-Professor Dr. rer. nat. habil. Klaus Eschrich

Dezember 2012

Das orale Plattenepithelkarzinom stellt mit etwa 90 % die häufigste maligne Neubildung der Mundhöhle dar. Die Überlebenswahrscheinlichkeit und das Ausmaß der funktionellen Schädigung des Patienten werden maßgeblich von der Tumorgöße und dem Vorhandensein von lokoregionalen Metastasen oder Fernmetastasen bestimmt. Somit ist eine frühzeitige Diagnosestellung durch den Zahnarzt essentiell, die zu einer deutlich verbesserten Prognose des Krankheitsverlaufes des Patienten führt. Die klinische Inspektion und Palpation

stellt die Basis für die Erkennung oraler Tumoren dar. Hierbei steht der Zahnarzt vor der schwierigen Aufgabe, zwischen entzündlicher und neoplastischer Veränderung bzw. zwischen potentiell maligner Veränderung und bereits bösartig transformierter Läsion der Mundschleimhaut zu unterscheiden. Zur Abklärung unklarer Mundschleimhautveränderungen steht dem Zahnarzt seit 1998 die minimalinvasive Bürstenbiopsie zur Verfügung. Da die anschließende zytopathologische Auswertung der Proben maßgeblich von der Erfahrung des Pathologen abhängt, haben wir uns mit der Entwicklung einer objektivierbaren, quantitativen Methode zur Untersuchung von oralen Bürstenbiopsieproben hinsichtlich ihrer Dignität beschäftigt.

Mit Hilfe des „Intact cell peptidome profiling“ (ICPP) mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie erfolgte in unserer ersten Arbeit „Oral brush biopsy analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry profiling – A pilot study“ die Differenzierung zwischen Tumorproben und gesunden Kontrollproben mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 93 %. In unserer zweiten Studie „Oral brush biopsy analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry for early cancer diagnosis“ standen die Vereinfachung und Standardisierung des Verfahrens, die Durchführung einer Blindstudie sowie die Differenzierung zwischen potentiell malignen Veränderungen und Plattenepithelkarzinomen der Mundschleimhaut im Vordergrund. Zur Durchführung der zweiten Studie erstellten wir als Grundlage für weitere Auswertungen eine Datenbank bestehend aus 26 Tumorpatienten. Hierbei wurde von jedem Patienten eine Bürstenbiopsie des bösartig entarteten Schleimhautbereichs und eine Probe der entsprechenden gesunden Schleimhaut der kontralateralen Seite entnommen und mittels MALDI-ToF MS untersucht. Diese Proben konnten mit einer Sensitivität von 92 % und Spezifität von 95 % hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens unterschieden werden. Anschließend erfolgte die Durchführung der Blindstudie, die aus elf Tumorpatienten, elf Patienten mit potentiell malignen Veränderungen der Mundschleimhaut und vier

gesunden Probanden bestand. Bei der Auswertung erfolgte die Einteilung in „Tumorgruppe“ und „Nicht-Tumorgruppe“, die Zellabstriche gesunder Patienten und von Patienten mit Mundschleimhautläsionen enthielt. Alle Tumorproben wurden mittels „Intact cell peptidome profiling“ (ICPP) korrekt klassifiziert, wobei es sich bei einer Probe um ein Carcinoma in situ handelte. Eine Vorläuferläsion wurde fälschlicherweise als Tumor identifiziert. Somit erreichte die Blindstudie eine Sensitivität von 100 %, die Spezifität lag bei 93 %, was einer Korrekturklassifizierungsrate von 96,5 % entsprach.

Unser Ziel war es, eine verlässliche und technisch einfach durchzuführende Methode zur Tumorfrüherkennung zu entwickeln. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass „Intact cell peptidome profiling“ mittels MALDI-ToF MS eine valide Differenzierung zwischen Bürstenbiopsieproben hinsichtlich ihrer Dignität erzielt. Wir sind zuversichtlich, dass diese Methode zur Tumorfrüherkennung eine schnelle und treffsichere Diagnosestellung ermöglicht und somit zu einer Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten führt.

7. Literaturverzeichnis

Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, Eisenberg E, Krutchkoff DJ & Cushing M (1995). Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* **80**: 188-191.

Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H & Alexandrov K (2000). Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**: 3-28.

Boring CC, Squires TS & Tong T (1991). Cancer statistics, 1991. *Bol Asoc Med P R* **83**: 225-42.

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA & Kowalski LP (2005). Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer* **114**: 806-16.

Davidson BJ, Hsu TC & Schantz SP (1993). The genetics of tobacco-induced malignancy. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg* **119**: 1198-1205.

de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen XB, Kooren JA, Refsland EW, Griffin RJ, Ondrey FG, Wu B, Le CT, Rhodus NL, Carlis JV & Griffin TJ (2010). Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. *PLoS One* **5**: e11148.

Dorr W, Dorr E, Haagen J, Hartmann JT, Riesenbeck D, Schmidt M & Grotz KA (2010). [Side effects of radiotherapy in the oral cavity]. *MMW Fortschr Med* **152**: 37-9.

Franceschi S, Talamini R, Barra S, Baron AE, Negri E, Bidoli E, Serraino D & La Vecchia C (1990). Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res* **50**: 6502-6507.

Godge PY & Poonja LS (2011). Quantitative assessment of expression of cell adhesion molecule (CD44) splice variants: CD44 standard (CD44s) and v5, v6 isoforms in oral leukoplakias: An immunohistochemical study. *Indian J Dent Res* **22**: 493-4.

Gourin CG, Xia ZS, Han Y, French AM, O'Rourke AK, Terris DJ & Adam BL (2006). Serum protein profile analysis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **132**: 390-7.

Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC & Chait BT (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* **63**: 1193A-1203A.

Homann N, Tillonen J, Meurman JH, Rintamaki H, Lindqvist C, Rautio M, Jousimies-Somer H & Salaspuro M (2000). Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis* **21**: 663-668.

IARC (2012). Oral Cancer. Lyon.

- Johnson NW & Bain CA** (2000). Tobacco and oral disease. EU-Working Group on Tobacco and Oral Health. *Br Dent J* **189**: 200-6.
- Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Gronroos L, Meurman JH & Salaspuro M** (2007). Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol* **43**: 181-6.
- McCoy GD & Wynder EL** (1979). Etiological and preventive implications in alcohol carcinogenesis. *Cancer Res* **39**: 2844-50.
- Mehrotra R & Gupta DK** (2011). Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. *Head Neck Oncol* **3**: 33.
- Neville BW & Day TA** (2002). Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* **52**: 195-215.
- Obe G & Ristow H** (1979). Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol. *Mutat Res* **65**: 229-59.
- Pape HD** (1992). Früherkennung und Diagnostik der Mundschleimhaut- und Oropharynxkarzinome. *Chirurgische Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen*. Springer: Wien.
- Ramroth H, Dietz A & Becher H** (2011). Intensity and inhalation of smoking in the aetiology of laryngeal cancer. *Int J Environ Res Public Health* **8**: 976-84.
- Reichart PA** (2000a). [Primary prevention of mouth carcinoma and oral precancerous conditions]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **4**: 357-64.
- Reichart PA** (2000b). Tabak und Mundgesundheit. *Dtsch Zahnarztl.Z*: 223-229.
- Reichart PA** (2001). Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin.Oral Investig.* **5**: 207-213.
- Remmerbach TW, Hemprich A & Böcking A** (2007). [Minimally invasive brush-biopsy: innovative method for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma]. *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.* **117**: 926-940.
- Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A & Böcking A** (2004). [Noninvasive brush biopsy as an innovative tool for early detection of oral carcinomas]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* **8**: 229-236.
- Remmerbach TW, Weidenbach H, Hemprich A & Böcking A** (2003). Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. *Anal.Cell Pathol.* **25**: 159-166.
- Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A & Böcking A** (2001). Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal.Cell Pathol.* **22**: 211-221.
- Spitz MR, de Andrade M & Di Giovanni J** (1999). Molecular dosimeters of smoking damage in the lung. *J Natl Cancer Inst* **91**: 578-9.

Squier CA, Kremer MJ & Wertz PW (2003). Effect of ethanol on lipid metabolism and epithelial permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat. *J Oral Pathol Med* **32**: 595-599.

Wadsworth JT, Somers KD, Cazares LH, Malik G, Adam BL, Stack BC, Jr., Wright GL, Jr. & Semmes OJ (2004). Serum protein profiles to identify head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 1625-32.

Warnakulasuriya KA & Johnson NW (1993). Nucleolar organiser region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J.Oral Pathol.Med.* **22**: 77-81.

Wynder EL & Hoffmann D (1979). Smoking and health: pathogenic and preventive considerations. *Bull Schweiz Akad Med Wiss* **35**: 83-98.

8. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Torsten W. Remmerbach für die hervorragende Betreuung. Er hat mir diese Promotionsarbeit durch sein persönliches Engagement überhaupt erst ermöglicht und stand mir immer mit Rat und Tat sowohl bei den Vorbereitungen als auch während der Durchführung meiner Arbeit hilfreich zur Seite.

Mein weiterer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Professor Klaus Eschrich für die freundliche und weitreichende Betreuung bei der Durchführung des experimentellen Teils meiner Arbeit und für die Mitarbeit bei der Auswertung der Messergebnisse. Er hatte stets Zeit und Geduld, Fragestellungen mit mir intensiv zu diskutieren.

Für das sorgfältige Korrekturlesen möchte ich mich bei meinen Eltern sowie meinem Freund Markus bedanken.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern, die mich bei meinem Zahnmedizinstudium stets unterstützt und auf meinem Lebensweg bis zum Tage meiner Dissertation liebevoll begleitet haben.