

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*DIE UNTERSUCHUNG SYSTEMISCHER KOMPLEMENTFAKTOREN
IM SERUM VON PATIENTEN MIT ORALEM PLATTENEPITHELKARZINOM MITTELS
EINES NEUARTIGEN MULTIPLEX DETEKTIONSARRAYS*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Juliane Gallenkamp

2018

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*DIE UNTERSUCHUNG SYSTEMISCHER KOMPLEMENTFAKTOREN
IM SERUM VON PATIENTEN MIT ORALEM PLATTENEPITHELKARZINOM MITTELS
EINES NEUARTIGEN MULTIPLEX DETEKTIONSARRAYS*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Juliane Gallenkamp

2018

Dekan: *Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert*

1. Berichterstatter: *PD Dr. Richard Bauer*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Denitsa Docheva*

Tag der mündlichen Prüfung: *09.11.2018*

Deutschsprachige Zusammenfassung der wissenschaftlichen Originalarbeit

“A novel multiplex detection array revealed systemic complement activation in oral squamous cell carcinoma“

von

Juliane Gallenkamp et al.

publiziert in

Oncotarget (Impact Faktor: 5,17)

2018

vorgelegt von

Juliane Gallenkamp

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung in die Thematik und Aufgabenstellung	5
2. Material und Methoden	7
2.1. Patienten und klinische Daten	7
2.2. Proteine und Antikörper	7
2.3. Western Blot Analyse	8
2.4. Etablierung des Multiplexassays	8
2.4.1. Konjugierung der <i>beads</i> (Mikropartikel).....	8
2.4.2. Biotinylierung der Antikörper	8
2.4.3. Multiplexassay	9
2.4.4. Validierung des Assays	9
3. Darstellung der eigenen Ergebnisse.....	11
3.1. Validierter Multiplexassay zum Nachweis von C3a, C5a und sC5b–C9	11
3.2. Systemische Aktivierung des Komplementsystems bei PEKA.....	13
4. Diskussion der Ergebnisse	16
4.1. Die Rolle von C3a bei der Tumorentwicklung.....	16
4.2. Die Rolle von C5a bei der Tumorentwicklung.....	17
4.3. Die Rolle von C5b–C9 bei der Tumorentwicklung.....	18
4.4. Komplementfaktoren und C-reaktives Protein.....	19
4.5. Komplementüberwachung bei der Tumorthherapie – ein Ausblick.....	20
5. Zusammenfassung.....	22
6. Literaturverzeichnis.....	23
7. Originalpublikation.....	26
8. Danksagung.....	41

1. Einführung in die Thematik und Aufgabenstellung

Die Verweise zu Abbildungen und Tabellen aus der Originalpublikation (**Gallenkamp et al. 2017**) sind in der folgenden Zusammenfassung **fett** gedruckt.

Das orale Plattenepithelkarzinom (PEKA) stellt mit 90 % den häufigsten Tumor im Bereich der Kopf-Halstumoren dar [1, 2]. Es gehört mit 300.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu den zehn weltweit am häufigsten vorkommenden Tumoren, wobei Männer doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen [3, 4]. Die drei Hauptrisikofaktoren für ein PEKA sind Rauchen, Alkoholkonsum und das humane Papillomavirus [3, 5]. Abhängig von Lokalisation und Tumorstadium besteht die Therapie in der chirurgischen Entfernung, Radiotherapie oder Chemotherapie. In den letzten Jahren haben sich die therapeutischen Möglichkeiten ausgeweitet hin zur gezielten Antikörpertherapie mit monoklonalen Antikörpern, wie Cetuximab, das sich gegen den EGF-Rezeptor richtet oder Nivolumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den „programmed cell death protein 1“-Rezeptor, der lebensverlängernd bei rezidivierenden und metastasierenden PEKA wirkt [6–8]. Trotz dieser zahlreichen therapeutischen Möglichkeiten und Neuerungen, liegt die 5-Jahres-Mortalität nach Diagnosestellung immer noch bei 50 %. Ein Grund hierfür ist, dass es keine verlässlichen diagnostischen Mittel zur Feststellung von Hochrisikoläsionen in einem frühen Krankheitsstadium gibt und auch keine Möglichkeit diese von harmlosen Präkanzerosen zu unterscheiden.

Jüngste Veröffentlichungen zeigen, dass die Aktivierung des Komplementsystems über drei unterschiedliche Wege bei der Entstehung des PEKA eine Rolle spielt (**Figure 1A**) [9]. Des Weiteren wurden Komplementfaktoren auch schon als Biomarker beim Fortschreiten des PEKA diskutiert [10]. Großer Überfluss an Komplementfaktor C3, Komplementfaktor B (CFB) und Komplementfaktor C4B konnte im Speichel von PEKA-Patienten nachgewiesen werden [11]. Dies ist insbesondere bei invasivem kutanen PEKA und kutanem PEKA, das mit rezessiver dystrophischer Epidermolysis bullosa assoziiert ist, der Fall [12]. Überdies ist der aktivierte Komplementfaktor C5a an der Entstehung des Nasopharynxkarzinoms beteiligt [13]. Weitere Studien zeigen außerdem, dass Proteine des Komplementsystems beim Fortschreiten von Ovarial- und Lungenkarzinomen involviert sind [14]. Die genaue Rolle der Komplementfaktoren bei der Tumorprogression ist allerdings noch unklar.

Aus diagnostischer Sicht stellt die Proteingruppe der Komplementfaktoren eine Herausforderung dar. Die Komplementkaskade umfasst mehr als 40 Proteine, die gemeinsam aktivierte Proteinstrukturen und Komplexe bilden um ihre spezifischen Funktionen auszuführen

(**Figure 1A**) [15]. Charakteristisch für die Aktivierung des Komplementsystems ist die Bildung der Anaphylatoxine C3a und C5a, die über ihre C5a- und C3a-Rezeptoren (C3aR und C5aR) Immunzellen modulieren und anlocken. Die größeren Spaltprodukte der Komplementfaktoren, z. B. C3b, binden entweder an die Zelloberfläche und initiieren die Aktivierung des Komplementsystems oder formen den terminalen Membrankomplex (C5b–C9), der sich in die Zellmembran integriert und so die Lyse der Zelle herbeiführt. Wenn Vitronektin in flüssiger Phase an diesen Komplex bindet, bildet sich der lösliche terminale Membrankomplex (sC5b–C9), der sich nicht in die Zellmembran integrieren kann und der im Blutplasma/-serum zurückbleibt (**Figure 1A**) [16]. Die Diagnostik im Bereich der Aktivierungsprodukte des Komplementsystems wird weitestgehend als Einzelnachweis gemacht, entweder durch eine funktionelle Analyse mittels eines hämolytischen Assays oder mittels Enzymimmunoassays (ELISA= *enzyme linked immunosorbent assay*). Jedoch wäre es vorteilhaft die Aktivierung des Komplementsystems an unterschiedlichen Stufen der Kaskade (C3a, C5a, sC5b–C9) simultan überwachen zu können um den Aktivierungsstatus besser bestimmen zu können, aber auch um Material und Kosten einzusparen. In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Plattformen zum Nachweis mittels Multiplex beschrieben, darunter auch die *suspension bead array* Technologie. Sie basiert auf durch Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlich kodierte *beads* und wird für ein weites Spektrum an simultanen Enzymimmunoassays verwendet (**Figure 1B, 1C**). Das Prinzip des Assays gleicht dem des kombinierten Sandwich-ELISAs: Spezifische Antikörper, die gegen die Neoepitope der Aktivierungsprodukte gerichtet sind, werden als Fängerantikörper an farbkodierte *beads* gekoppelt. Die Analyten binden an die jeweilig gekoppelten *beads* in einer *bead*-Suspension. Die *bead*-gebundenen Analyten werden mittels biotinylierter Antikörper und eines Fluoreszenz-Signalsystems detektiert. Ein Durchflusszytometer misst zunächst die Fluoreszenzsignatur jedes einzelnen *beads*, auch Region genannt, und dann die Stärke des zugehörigen Reportersignals. Die vorgelegte Arbeit beschreibt erstmals die Implementierung und Validierung eines Multiplexassays zur simultanen Analyse der Aktivierungsmuster der Komplementfaktoren C3a, C5a und sC5b–C9 aus minimalen Probenvolumina von humanem Blutserum, Tränenflüssigkeit und Kammerwasser. Ich nutzte diesen Assay zur Analyse der systemischen Konzentration von C3a, C5a und sC5b–C9 als Biomarker für die Ausdehnung und den Zelldifferenzierungsgrad bei oralem PEKA.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und klinische Daten

Die Blutproben wurden durch Venenpunktion bei nüchternen Studienteilnehmern gewonnen. An der Studie nahmen 57 erwachsene Patienten teil, die zwischen 2013 und 2016 in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Uniklinik Regensburg erstmals untersucht und wegen eines neu diagnostizierten PEKAs behandelt wurden. Die erstmalige chirurgische Tumorsektion und Ausräumung der Halslymphknoten wurde aufgrund klinischer und radiologischer Befunde durchgeführt. Bei den untersuchten Patienten waren keine Erkrankungen bekannt, von denen eine relevant erhöhte Aktivierung des Komplementsystems (z.B. akute Infektionen, Asthma, Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen) ausgeht, mit Ausnahme von Diabetes mellitus, Nikotin- und Alkoholkonsum. Die Patientendaten wurden prospektiv durch Patientenbefragung oder durch Sichtung der Krankenakten erhoben. Das Tumorstaging der PEKAs erfolgte nach den Richtlinien, die in der siebten Auflage des American Joint Committee on Cancer (AJCC) beschrieben sind. Als Kontrolle dienten 46 Patienten der Uniklinik Regensburg, die nicht an einer Tumorerkrankung litten. Sie waren bezüglich Geschlecht (80 % vs. 70 % männlich für Kontrollen vs. PEKA; Reihenfolge für weitere Parameter analog), durchschnittlichem Alter (67 vs. 65 a), Nikotinabusus (78 % vs. 72 %), Ethanolabusus (76 % vs. 65 %) und weiteren Kriterien auf die PEKA-Kohorte abgestimmt. Der Ethikantrag wurde durch das Ethikkomitee der Universität Regensburg genehmigt (GeschZ 12-101-0070, 13-101-0207, 15-101-0064, 11-101-0071, 16-299-101) und die schriftliche Einverständniserklärung aller Studienteilnehmer liegen vor.

2.2. Proteine und Antikörper

Die monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanes C3a/C3a-desArg (mAb clone 2991, cat. HM2074-IA) und biotinylierte monoklonale Maus-Antikörper gegen humanes C3/C3a (mAb 474-biotin, cat. HM2073-BT) bezogen wir von Hycult Biotech (Beutelsbach, DE). Die Antikörper gegen humanes C5a/C5a-desArg (C17/5, cat. 518202; G25/2-biotin, cat. 518306) waren von Biozol Diagnostica (Eching, DE). Der polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen humanes sC5b-C9 (cat. Ab55811) wurde bei Abcam (Cambridge, GB) bestellt. Der Ziegen-Antikörper gegen humanes C6 (cat. A223) wurde bei Complement Technology (Tyler, TX, USA) eingekauft. Ziege-anti-Maus IgG Meerrettichperoxidase (HRP= horseradish peroxidase) (cat. 115035164), Ziege-anti-Kaninchen IgG HRP (111035003), Kaninchen-anti-Ziege HRP

(cat. 305035003), sowie Streptavidin HRP (cat. 016030084) wurden von Dianova (Hamburg, DE) erworben.

2.3. Western Blot Analyse

Aufgereinigtes, rekombinant hergestelltes humanes C3a-desArg (1 µg, HC2127), C5a-desArg (1 µg, HC2102, Hycult Biotech, Beutelsbach, DE), sC5b-C9 (1 µg u. 0,1 µg, A127, Complement Technology, Tyler, TX, USA) oder normales Humanserum (20 µg, NHS) wurden unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen entweder in 10 %iger oder in 15 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran übertragen. Die Membranen wurden geblockt (5 % BSA/PBST, 1 h) und dann mit den jeweiligen Primärantikörpern gelöst im Blockier-Puffer inkubiert (2 h, Raumtemperatur). Überschüssiger Primär-Antikörper wurde durch Waschen der Membranen mit PBST entfernt. Als nächstes wurde mit Peroxidase konjugiertes anti-Maus, anti-Ziegen, anti-Kaninchen IgG oder Streptavidin HRP, gelöst in PBST mit 2 % Magermilchpulver, hinzugegeben. Das HRP-Signal wurde mit Lumi-Light Blot-Substrat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE) entwickelt.

2.4. Etablierung des Multiplexassays

2.4.1. Konjugierung der *beads* (Mikropartikel)

Fängerantikörper wurden gemäß eines Zwei-Schritt Carbodiimid Kopplungsprotokolls des Herstellers (Luminex Corp., Austin, TX, USA) an MagPlex®Microspheres gekoppelt. Anti-C3a-desArg (1,7 µg, mAb clone 2991, *bead*-Region 18), anti-C5a-desArg (25 µg, C17/5, *bead*-Region 26) und anti-sC5b-C9 (75 µg, ab55811, *bead*-Region 33) wurden jeweils an 1,25 Millionen *beads*/Region gekoppelt (**Supplementary Table 1**). Unspezifische Spezieskontrollantikörper gegen Maus IgG (Antikörper gegen botulinum toxin B, 25 µg, *bead*-Region 55 [17]) und Kaninchen IgG (cat. B11-034, 75 µg, *bead*-Region 78, Gentaur, Kampenhout, BE) wurden zur Kontrolle der Spezifität des Assays hinzugefügt.

2.4.2. Biotinylierung der Antikörper

Der Ziegen-Antikörper gegen humanes C6 wurde entsprechend eines Standard-Biotinylierungsprotokolls unter Verwendung von Biotin-NHS (Sigma Aldrich, St.Luis, MO, USA) biotinyliert.

2.4.3. Multiplexassay

Der Multiplexassay wurde, wie bereits zuvor beschrieben, durchgeführt [18]. Alle Assays wurden bei Raumtemperatur in schwarzen 96-well Mikrotiterplatten aus Polystyrol mit flachem Boden (cat. 3603, Corning Incorporated, NY, USA) durchgeführt. Sie wurden bei 800 rpm auf einer Schüttelplatte inkubiert und vor Licht geschützt. 2000 Antikörper-gekoppelte MagPlex®Microspheres pro *bead*-Region wurden für 2 h mit 50 µL der Probe in Reaktions-Puffer (human anti-mouse antibody diluent [cat. Ab19396, Abcam, Cambridge, GB] mit 0,1 mg/mL Nafamostat Mesilate, 0,01 M EDTA) inkubiert, der die *in vitro* Aktivierung des Komplementsystems und anti-Spezies Wechselwirkungen verhindern soll. 1:3-Verdünnungsreihen aus einer Mischung von nativem humanen C3a-desArg (197,5–0,001 ng/mL, cat. HC2127, Hycult Biotech, Beutelsbach, DE), rekombinantem humanen C5a-desArg (28,1–0,004 ng/mL, cat. HC2102, Hycult Biotech, Beutelsbach, DE) und nativem humanen sC5b–C9 (66,6–0,0004 µg/mL, cat. A127, Complement Technology, Tyler, TX, USA) wurden als Standardkurve verwendet. Humanes Serum in Verdünnungen zwischen 1:50 und 1:350 wurde als Probenmaterial hinzugefügt. Die gereinigte *bead*-Mischung wurde mit einer Mischung aus biotinylierten Detektionsantikörpern inkubiert (1 h, **Supplementary Table 1**). Streptavidin-R-Phycoerythrin (SA-PE) PJRS14 (1 µg/mL in 1 % BSA/PBS, Hayward, California, USA) wurde zur Detektion hinzugefügt und der Vorgang nach 30 min durch dreimaliges Waschen abgestoppt. Die *bead*-Mischung wurde in 125 µL 1 % BSA/PBS resuspendiert und die Fluoreszenzsignatur und das korrespondierende Signal des PE-Reporters wurden mithilfe des Luminex Magpix Systems kombiniert mit der Software Bio-Plex Manager (Bio-Rad Laboratories, München, DE) gemessen.

2.4.4. Validierung des Assays

Die Nachweisgrenze (LOD= *limit of detection*) berechnete sich aus der Summe dreier Standardabweichungen und dem Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von 16 Leer-Messungen an 16 verschiedenen Messtagen. Das untere und obere Plateau, sowie die halbmaximalen Konzentrationen (IC50) wurden aus sigmoidalen, gemittelten Standardkurven mit variabler Steigung (GraphpadPrism) bestimmt. Zur Bestimmung der Intra- und Inter-Assayvarianz wurde die Qualitätskontrolle (standardisiertes humanes Normalserum 1:50) im linearen Bereich der Standardkurve jeweils sechsmal auf derselben Mikrotiterplatte und am selben Messtag (Intra-Assayvarianz) oder auf unterschiedlichen Mikrotiterplatten und an unterschiedlichen Messtagen (Inter-Assayvarianz) analysiert. Der Variationskoeffizient wurde berechnet als (Standardabweichung / Mittelwert) * 100. Die Spezifität wurde durch Messung

der Kreuzreaktivität in Komplementfaktor-depletierten humanen Seren (1:50, Complement Technology, Tyler, TX, USA) bestimmt. Der Cut-off-Wert für die einzelnen Analyten des Multiplexassays wurde als diejenige Komplement-Konzentration im jeweiligen Komplementfaktor-depletierten Serum festgelegt.

3. Darstellung der eigenen Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt möchte ich näher auf die Ergebnisse eingehen, die ich im Rahmen meiner Promotion generieren konnte.

3.1. Validierter Multiplexassay zum Nachweis von C3a, C5a und sC5b–C9

Mit der zunehmenden Bedeutung des Komplementsystems beim Fortschreiten von Krankheiten, sowie neuartigen Komplement-Therapeutika in der klinischen Anwendung (z.B. Eculizumab) und in Studien (z.B. Lampalizumab) gewinnt die Überwachung der Komplementfaktoren zunehmend an Bedeutung [19]. Nichtsdestotrotz, gestaltet sich die Diagnostik des Komplementsystems schwierig, weil es viele verschiedene Komplementfaktoren gibt, die interagieren und Spaltprodukte bilden.

Uns ist es gelungen einen Assay zur Aktivierung des Komplementsystems zu etablieren und zu validieren, der simultan C3a, C5a und sC5b–C9 mittels der Luminex xMAP Technology und spezifischer Antikörper nachweist. Die Reaktivität der Fänger- und Detektionsantikörper für den Multiplexassay wurde in Western Blots gegen aufgereinigte, aktivierte Komplementfaktoren und humanes Serum getestet (**Supplementary Figure 1**). Der anti-C3a Fängerantikörper zeigte bevorzugte Bindung an isoliertes humanes C3a (**Supplementary Figure 1A**), der Detektionsantikörper für C3a zeigte in humanem Serum bevorzugte Bindung an C3, in dem die C3 α -Kette enthalten ist (**Supplementary Figure 1B**). Beide anti-C5a Antikörper detektierten im Western Blot aufgereinigtes humanes C5a (**Supplementary Figure 1C, 1D**). Die Konzentration von C5a in humanem Serum war circa um den Faktor 10 niedriger als diejenige von C3a (**Figure 2B, Figure 6**). Daher reichte die Nachweisgrenze der Immunoblots nicht aus um C5a in humanem Serum festzustellen (**Supplementary Figure 1C, 1D**). Der Fängerantikörper für sC5b–C9 detektierte C5, C6, C7, C8, C9 und Vitronektin in humanem Serum und dem aufgereinigtem Komplex von sC5b–C9 (**Supplementary Figure 1E**). Der Detektionsantikörper für sC5b–C9 zeigte im Western Blot bevorzugte Bindung an C6 (**Supplementary Figure 1F**).

Nach abgeschlossener Charakterisierung wurden Fänger- und Detektionsantikörper (**Supplementary Figure 1**) zusammen mit Spezies-spezifischen Antikörpern als Negativkontrolle (**Figure 1B, 1C, Supplementary Table 1**) in den neuen Multiplexassay implementiert. Die Konzentration der drei aktivierten Komplementfaktoren konnte anschließend mittels des Multiplexassays zeitgleich und hochsensibel bestimmt werden (**Figure 2A**). Die Nachweisgrenze (LOD) lag für die Detektion von C3a bei 0,04 ng/mL, für C5a bei 0,03 ng/mL und für sC5b–C9 bei 18,96 ng/mL (**Figure 2A, Supplementary Table 1**). Durchschnittlich

wurden im Serum der gesunden Kontrollkohorte 0,68 µg/mL C3a, 0,07 µg/mL C5a und 22,47 µg/mL sC5b–C9 festgestellt (**Figure 2B, Supplementary Table 2**). Die Qualität des neuen Multiplexassays wurde überprüft, indem ich Probenmaterial eines internationalen Laborvergleichstests quantifizierte (*complement EQA5*, 2015) [19]. Die gemessenen Konzentrationen an C3a lagen innerhalb des Nachweisbereichs der Referenzwerte, die gemessenen Konzentrationen an sC5b–C9 jedoch waren um den Faktor 100 höher als die Referenzwerte, die durch Einzel-ELISA bestimmt worden waren. Die Referenzwerte für die Konzentrationen an C5a wurden in dem Ringversuch nicht angegeben [19]. Zusammenfassend erlaubt unser neuer Assay eine reproduzierbare Messung der C3a- und C5a-Konzentrationen in humanem Serum, die vergleichbar mit dem Konzentrationsbereich zuvor publizierter Studien (**Figure 2B**) ist.

Multiplexassays zeichnen sich durch den simultanen Nachweis mehrerer Analyte in einem einzelnen Probengefäß aus. Hierzu müssen die Spezifität und Durchführbarkeit der Einzelassays und der kombinierten Assays einzeln validiert und sichergestellt werden, dass unabhängig von der Probenzusammensetzung verlässliche Messergebnisse resultieren. Die *bead*-spezifische Detektierbarkeit der aufgereinigten Antigene wurde in Singleplex- und Multiplexassays getestet (**Figure 3**). Die hohe Bindungskapazität der anti-C3a-, anti-C5a- und anti-sC5b–C9-*beads* wurde in Assays mit jeweils nur einer *bead*-Sorte mit Verdünnungsreihen jeweils eines aufgereinigten Antigens gezeigt (**Figure 3A, 3C, 3E**). Alle drei aktivierten Komplementfaktoren konnten in konzentrationsabhängigen logarithmischen Standardkurven, die vier Dekaden der Log-Skala umfassten, detektiert werden. Diese reichten jeweils für C3a von 0,2 bis 0,00004 µg/mL (**Figure 3A**), für C5a von 0,03 bis 0,00003 µg/mL (**Figure 3C**) und für sC5b–C9 von 67 bis 0,019 µg/mL (**Figure 3E**). Die Detektion im Singleplexassay eines jeden Antigens war vergleichbar mit den Standardkurven im Multiplexassay und weist somit auf eine *bead*-spezifische Detektion hin (**Figure 2A, 3A, 3C, 3E**). Des Weiteren wurden unspezifische Kreuzreaktionen unter Einbeziehung aller fünf *bead*-Regionen (**Figure 1B, 1C, Supplementary Table 1**), davon drei *bead*-Regionen zur Detektion der Komplementfaktoren und zwei *bead*-Regionen mit Negativkontrollen, mit jeweils einzelnen Antigenverdünnungsreihen getestet (**Figures 3B, 3D, 3F**). Unsere Messungen ergaben jeweils spezifische Signale für die einzelnen Antigene mit den zugehörigen *beads* und zeigten weder mit unspezifischen *bead*-Regionen noch mit den *beads* zur Negativkontrolle Kreuzreaktionen (**Figure 3B, 3D, 3F**).

Ferner bestimmten wir die Spezifität und den *Cut-off* unseres Multiplexassays, indem wir von spezifischen Komplementfaktoren (C2–C9, Properdin und CFH) depletierten humanen Seren

die jeweiligen Konzentrationen an C3a, C5a und sC5b–C9 bestimmten (**Figure 4**). Die drei Aktivierungsprodukte des Komplementsystems konnten hochspezifisch in humanem Serum aber nicht in den entsprechenden Faktor-depletierten Seren nachgewiesen werden (**Figure 4**). Die niedrigste C3a-Konzentration, nämlich 0,09 µg/mL, wurde in C3a-depletiertem Serum gemessen und wurde von uns auch als *Cut-off* des Assays zur Detektion von C3a festgelegt (**Supplementary Table 1**). Die übrigen Faktor-depletierten Seren übertrafen diese *Cut-off*-Konzentration um den Faktor 1,5 (C4 depletiertes Serum) bis zum Faktor 6 (C5-depletiertes Serum) (**Figure 4A**). Die physiologische Konzentration von C3a in unserer gesunden Kontrollkohorte lag bei 0,68 µg/mL, was den C3a *Cut-off* um den Faktor 7 übertraf (**Figure 5C, Supplementary Table 2**). Die Analyse der C5a-Konzentration in C5a-depletiertem Serum resultierte in der Festlegung des *Cut-offs* bei 0,01 µg/mL (**Supplementary Table 1**), was um den Faktor 7 geringer war als die durchschnittliche C5a-Konzentration, die in der gesunden Kontrollkohorte festgestellt wurde und um den Faktor 64 geringer war als die höchste gemessene C5a-Konzentration in C8-depletiertem Serum (**Supplementary Table 2, Figure B, Figure 5D**). Die niedrigste sC5b–C9-Konzentration konnte mit 2,47 µg/mL für C5-depletiertes Serum beobachtet werden. Die übrigen Faktor-depletierten Seren zeigten mindestens die 12,5-fache sC5b–C9-Konzentration (C2-depletiertes Serum) des *Cut-off* (**Figure 4C**). Die physiologische Serumkonzentration von sC5b–C9 lag in unserer gesunden Kontrollkohorte bei 22,47 µg/mL, was die in C5-depletiertem Serum gemessene sC5b–C9-Konzentration um den Faktor 9 übersteigt (**Supplementary Table 2, Figure 5E**).

Die Variabilität des Fünfplexassays wurde in einer Verdünnung von 1:50 mit einem Standardserum zur Qualitätssicherung bestimmt. Für alle drei Komplementfaktoren lag die durchschnittliche Intra-Assayvarianz zwischen 2,9 und 6,4 % (**Supplementary Table 1**). Die durchschnittliche Inter-Assayvarianz lag für alle Analyte zwischen 9,2 und 18,2 % (**Supplementary Table 1**). Für unterschiedliche kommerzielle Zytokin-Multiplexassays wurden ähnliche Intra- und Inter-Assayvarianzen angegeben [20, 21].

3.2. Systemische Aktivierung des Komplementsystems bei PEKA

Die C3a-, C5a- und sC5b–C9-Konzentrationen wurden in 103 Serumproben mit unserem validierten Fiveplexassay (**Supplementary Table 2**) quantifiziert. Die Kontrollkohorte mit gesunden Patienten wies systemische Konzentrationen an Aktivierungsfaktoren von 0,2–2,25 µg/mL an C3a (**Figure 5C**), 0,02–0,12 µg/mL an C5a (**Figure 5D**) und 16,3–29,9 µg/mL an sC5b–C9 (**Figure 5E**) auf.

Die C3a-, C5a- und sC5b–C9-Konzentrationen in den Blutseren der PEKA-Patienten (n=57) wurden mit denjenigen einer abgestimmten Kontrollkohorte gesunder Patienten (n=46) verglichen (**Supplementary Table 2**). Unsere Daten zeigten bei den PEKA-Patienten eine signifikant gesteigerte C5a-Serumkonzentration (Durchschnittskonzentration: 0,11 µg/mL) um 60 % und sC5b–C9-Serumkonzentration (Durchschnittskonzentration: 25,22 µg/mL) um 12 %, verglichen mit der Kontrollgruppe (Durchschnittskonzentrationen: 0,07 µg/mL für C5a und 22,47 µg/mL für sC5b–C9) (**Figure 5D, 5E**). Ein signifikanter Unterschied der C3a-Serumkonzentrationen konnte zwischen PEKA-Patienten und Kontrollgruppe nicht festgestellt werden (**Figure 5C**).

Weiterhin untersuchten wir wie die einzelnen Komplementkonzentrationen mit klinischen Parametern assoziiert sind. Die Konzentrationen aller drei aktivierten Komplementfaktoren waren bei Patienten mit mäßig differenziertem Tumorgewebe (*Grading*: G2) signifikant erhöht (C3a: p<0,05, C5a: p<0,0001, sC5b–C9: p<0,05), wobei bei gut differenziertem Gewebe (*Grading*: G1), niedrig differenziertem Gewebe (*Grading*: G3) und undifferenziertem Gewebe (*Grading*: G4) kein Anstieg beobachtet werden konnte (**Figure 6A–6C**). Zusätzlich konnte ein deutlicher Anstieg der sC5b–C9-Serumkonzentrationen einhergehend mit der Ausdehnung des Primärtumors beobachtet werden (**Figure 6F**). Bei PEKA-Patienten mit Tumoren der Stadien T1-T4 (**Figure 6: tumor extension**) ergaben sich signifikant erhöhte C5a-Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (T1: p<0,01, T2: p<0,001, T3: p<0,05, T4: p<0,0001) (**Figure 6E**). Bemerkenswerterweise, zeigten nur die Seren der Patienten mit infiltrativ wachsenden Tumoren (T4) signifikant gesteigerte sC5b–C9-Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Des Weiteren war es interessant zu erfahren, ob Änderungen der C3a-, C5a- und sC5b–C9-Serumkonzentrationen mit dem Befall der Lymphknoten mit Tumorzellen oder dem Patientenalter assoziiert werden konnten (**Figure 6G–6J**). Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der C3a-Serumkonzentration bei PEKA-Patienten und dem Befall regionärer Lymphknoten mit Tumorzellen (**Figure 6G**). Bei Patienten mit Metastasen in mehreren ipsilateralen oder kontralateralen Lymphknoten bis 6 cm (Lymphknotenstatus: N2) war die C3a-Serumkonzentration signifikant und deutlich erhöht (1,0±0,26 µg/mL) im Vergleich zu Patienten mit bis zu 3 cm großen, ausschließlich ipsilateralen Metastasen in den regionären Lymphknoten (Lymphknotenstatus: N1) (0,7±0,54 µg/mL, p<0,001) oder keinen regionären Lymphknotenmetastasen (Lymphknotenstatus: N0) (0,9±0,81 µg/mL, p<0,01). Der Lymphknotenstatus N3 kam bei keinem der untersuchten PEKA-Patienten vor. Bemerkenswert ist außerdem, dass die statistische Auswertung einen starken Zusammenhang zwischen dem Alter der PEKA-

Patienten und dem Befall der Lymphknoten ergab (**Figure 6J**). Patienten mit schwerwiegendem Lymphknotenbefall (N2) waren im Durchschnitt jünger (54 ± 6 a) als Patienten mit Lymphknotenstatus N1 (67 ± 9 a, $p < 0,05$) oder ohne Lymphknotenbefall (N0, 67 ± 9 a, $p < 0,01$). Ein Zusammenhang zwischen dem Alter und C3a-, C5a- und sC5b-C9-Serumkonzentrationen konnte nicht beobachtet werden (**Figure 6K–6M**).

4. Diskussion der Ergebnisse

In welcher Weise das Komplementsystem mit der Tumorentwicklung im Wechselspiel steht, geht weit über seine traditionell bekannte Rolle als Exekutive der körpereigenen Immunantwort hinaus und wird vielfach in der Literatur diskutiert [22–24]. Dabei wird der Aktivierung des Komplementsystems bei der Tumorentwicklung in aktuelleren Veröffentlichungen vermehrt auch eine tumorfördernde Rolle zugeschrieben. In der vorliegenden Publikation konnte ich mit Hilfe eines eigens entwickelten Multiplexassays zeigen, dass es bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom (PEKA) zu einer gesteigerten Bildung des Komplementfaktors C5a, sowie des terminalen Membrankomplexes (C5b–C9) kommt. Im folgenden Abschnitt möchte ich unsere Ergebnisse in Zusammenschau mit dem aktuellen Wissensstand genauer diskutieren.

4.1. Die Rolle von C3a bei der Tumorentwicklung

C3a als Biomarker beim Tumorscreening einzusetzen ist keine vollkommen neue Idee. Habermann et al. schlagen C3a als zusätzlichen Marker bei Screening-Untersuchungen beim Kolonkarzinom vor, da sie in Serumproben von Patienten mit Kolonkarzinom ebenfalls erhöhte C3a-Serumkonzentrationen feststellten [25]. Besonders interessant ist hier, dass bei der Karzinomvorstufe, dem kolorektalen Adenom („Darmpolypen“), die durchschnittliche C3a-Serumkonzentration im Vergleich zur gesunden Kontrollkohorte erhöht war. Dieser Effekt war bei Patienten mit invasiven Karzinomen ganz besonders deutlich [25]. Unsere Analysen der PEKA-Patienten ergaben keine systemisch erhöhten C3a-Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch zeigten sich innerhalb der Patientenkohorte signifikant erhöhte C3a-Serumwerte bei Patienten mit größeren Metastasen der lokoregionären Lymphknoten (N2) im Vergleich zu solchen mit kleineren oder keinen Metastasen der lokoregionären Lymphknoten (N0 und N1). Zum Lymphknotenstatus der Patienten gab die Studie von Habermann et al. keine Auskunft. Allerdings treten sowohl beim kolorektalen Karzinom [26] als auch beim PEKA [27] lokoregionäre Lymphknotenmetastasen häufiger bei invasivem Primärtumor auf. Neben diesen systemischen Beobachtungen ist auch die Aktivierung des Komplementsystems in der Mikroumgebung des Tumors Gegenstand verschiedener Studien. Nabizadeh et al. untersuchten im Mausmodell den C3a/C3a-Rezeptor (C3aR)-Signalweg beim Tumorwachstum im Melanom und stellten fest, dass C3aR zur Tumorentstehung des Melanoms beiträgt, indem die Immunantwort durch Neutrophile und CD4⁺ T-Zellen verhindert wird [28]. Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass C3 durch eine Entzündungsreaktion das Tumorwachstum fördert. Bonavita et al. konnten zeigen, dass C3-defiziente Mäuse gegen

Tumorentstehung in mesenchyalem und epithelalem Gewebe durch chemische Noxen geschützt waren, vor allem durch den Effekt einer abgeschwächten Entzündungsreaktion [29]. Hier wurde das lange Pentraxin PTX3, ein humoraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems, als wichtiger Inhibitor der Entzündungsreaktion und Komplementaktivierung identifiziert [29]. Bei PTX3-defizienten Mäusen gab es komplementabhängig eine tumorfördernde Entzündungsreaktion. Bei gleichzeitig PTX3- und C3-defizienten Mäusen war die Anfälligkeit zur Karzinogenese durch chemische Noxen wieder reduziert [29].

C3a steht also systemisch mit vermehrt lokoregionären Lymphknotenmetasten und invasivem Tumorwachstum in Zusammenhang und scheint Bestandteil der Karzinogenese zu sein.

4.2. Die Rolle von C5a bei der Tumorentwicklung

Unsere Analysen zeigen erstmals, dass bei PEKA-Patienten die C5a- Serumwerte unabhängig von der Tumorausdehnung oder dem Lymphknotenstatus erhöht waren. Wir sind nicht die einzigen, die systemisch erhöhte C5a-Blutwerte mit einer Tumorerkrankung in Zusammenhang bringen. Corrales et al. stellten erhöhte C5a-Werte im Blutplasma von Patienten mit Lungenkrebs fest und vermuten, dass lokal durch den Tumor produziertes C5a im Blutkreislauf verteilt wird und so den systemischen Anstieg verursacht [30]. Doch welcher Signalmechanismus erklärt den Zusammenhang zwischen dem C5a-Anstieg und einer Tumorentstehung? Beim Kolon- und Cholangiokarzinom wurde beobachtet, dass C5 durch eine an der Tumorzellmembran befindlichen Serinprotease zu C5a gespalten werden kann. Die Tumorzellen, die gleichzeitig C5a-Rezeptoren (C5aR) in der Zellmembran tragen, können dadurch selbst ihre Invasivität steigern, myeloide Suppressorzellen (MDSCs) rekrutieren und so eine tumorbegünstigende Mikroumgebung schaffen [31]. Ovarial- und Lungentumorzellen fördern ebenfalls autokrin durch die Bindung von C3a und C5a an die beiden G-Proteingekoppelten Rezeptoren C3aR und C5aR die eigene Zellproliferation, höchstwahrscheinlich über den PI3K/AKT-Mechanismus [14]. Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert AKT, ein Protoonkogen das Apoptose, Proteintranslation und Proliferation beeinflusst [32]. Interessanterweise ist das PI3KA-Gen beim PEKA im Hals- und Kopfbereich häufig mutiert, was diesen Mechanismus als Ansatzpunkt zur therapeutischen Inhibierung attraktiv macht [33]. C5a fördert zudem die Tumorprogression und schützt den Tumor vor dem Immunsystem [30, 34]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass C5a das Überleben des Tumors fördert, indem mehr myeloide Suppressorzellen in die Tumorumgebung einwandern und gleichzeitig weniger CD8⁺ zytotoxische T-Zellen vorhanden sind [35], was eine reduzierte Erkennung und Lyse körpereigener entarteter Zellen bedingen kann [36]. So ist ebenfalls für das orale PEKA ein

gesteigerter Untergang an CD8⁺ Zellen bekannt [37]. Zudem scheinen myeloide Supressorzellen (MDSCs), eine Untergruppe myeloischer Vorläuferzellen, eine Rolle in der Karzinogenese zu spielen, indem sie eine immunsuppressive Umgebung schaffen [35]. Interessanterweise, ist die Migration von CD11b⁺ Zellen und MDSCs in den Tumor und periphere Lymphorgane abhängig von der C5a-Aktivität [35]. Der C5aR-Signalweg führt *in vivo* zu einer gesteigerten MDSC-vermittelten Bildung von radikalen Sauerstoff- und Stickstoffspezies, was die Aktivität von CD8⁺ T-Zellen hemmt und Tumorwachstum begünstigt [35]. Ein ähnlicher Effekt, nämlich vermehrte Proliferation über die C5a-C5aR-Achse, wurde nach *in vitro* Stimulation mit C5a ebenfalls für Zellen des Nasopharynxkarzinoms festgestellt, welches auch ein PEKA des Kopf-Hals-Bereichs ist [13].

Eine noch weitreichendere Rolle von C5a bei der Tumorentstehung wurde von Nitta et al. beobachtet. C5a lockt die MDSCs nicht nur zum Tumor, sondern C5aR⁺ Tumorzellen durchlaufen eine Umwandlung des Zytoskeletts mit Ausbildung von Filopodien und Aufrauhung ihrer Membran bei Stimulation mit C5a, was die Beweglichkeit der Tumorzellen erhöht und ihre Invasivität *in vitro* und *in vivo* steigert [38]. Als weiteres Malignitätsmerkmal setzen CD5aR⁺ Tumorzellen Matrixmetalloproteinasen (MMPS) frei, die die extrazelluläre Matrix auflösen und so ebenfalls das Tumorwachstum erleichtern [38]. C5a führt außerdem zur Aktivierung von CD31⁺ Endothelzellen und bildet *in vitro* röhrenartige Strukturen aus, was auf eine mögliche Rolle von C5a bei der Angiogenese schließen lässt [39]. So war in einem Mausmodell des epithelialen Ovarialkarzinoms, in dem der C5aR-Signalweg fehlt, das Tumorwachstum reduziert und die Angiogenese verringert [39].

Zusammenfassend ist C5a also in einer Vielzahl prokarzinogenen Mechanismen involviert und so war es naheliegend, dass C5a auch beim oralen PEKA eine Rolle spielt. In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen stellt sich C5a als möglicher diagnostischer Biomarker beim oralen PEKA dar.

4.3. Die Rolle von C5b–C9 bei der Tumorentwicklung

Ich untersuchte mit unserem neu etablierten Multiplexassay ebenfalls die sC5b–C9-Serumwerte unserer Studienteilnehmer. Interessanterweise, waren diese bei Patienten mit invasivem oralem PEKA signifikant erhöht.

C5b–C9 bzw. der terminale Membrankomplex (MAC) greift einerseits Tumorzellen an, kann andererseits aber auch Tumorwachstum und Metastasierung fördern, wenn die Komplementaktivierung nur sublytisch ist [40]. Komplement in sublytischen Konzentrationen schützt beispielsweise Zellen des Prostata-Karzinoms vor TNF- α -induziertem Zelltod [40]. Ein

weiterer onkogener Mechanismus ist, dass MAC den Zellzyklus aktivieren und so die Tumorentstehung begünstigen kann [41]. Onkogene Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie z. B. TGF- β und PDGF, können durch MAC hochreguliert werden und so die Tumorentstehung und Angiogenese unterstützen [42]. MAC fördert weiterhin das Tumorwachstum durch Verhinderung der Apoptose, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass eine unsterbliche Zelle entsteht [42]. Zwar keine systemisch erhöhten Werte, jedoch Ablagerungen von C5b–C9 im Tumorgewebe finden sich ebenfalls bei Brusttumoren, Schilddrüsentumoren und Ovarialtumoren [22]. Ob Ablagerungen von C5b–C9 nun auch in der Mikroumgebung des Plattenepithelkarzinoms zu finden sind ist noch nicht geklärt. Ebenso bleibt es unklar, ob sich systemisch erhöhtes sC5b–C9 im Serum positiv oder negativ auf den langfristigen Krankheitsverlauf auswirkt, jedoch könnte sC5b–C9 in Zukunft eine Rolle als prognostischer Faktor spielen.

Bislang kann erst mit dem histopathologischen Befund nach der Resektion die Invasivität eines Karzinoms mit Sicherheit festgestellt werden, wonach sich die Entscheidung zu einer chirurgischen-, Radio- oder Chemotherapie richtet. Somit wäre es für die Patienten von großem Vorteil, wenn man mit Hilfe eines Bluttests die Invasivität eines Tumors abschätzen könnte und so den Patienten mitunter eine schwere Operation ersparen kann. Um sC5b–C9 als Biomarker in den klinischen Alltag zu etablieren, sind allerdings noch weitere (auch klinische) Studien nötig, zumal die absolut gemessenen Konzentrationen in unserem Assay um den Faktor 100 höher waren als die Referenzwerte.

4.4. Komplementfaktoren und C-reaktives Protein

Mithilfe des von uns entwickelten und validierten Multiplexassays konnten aus minimalen Probenvolumina parallel die Konzentration mehrerer Komplementfaktoren quantifiziert werden. In den Serumproben der PEKA-Patienten konnten generell erhöhte Serumwerte für C5a und sC5b–C9 festgestellt werden. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie von Acharya et al. stellte ebenfalls vermehrt C-reaktives Protein (CRP) in präoperativ entnommenen Blutseren von PEKA-Patienten fest [43]. Bei Patienten, bei denen im histopathologischen *grading* nach Tumorresektion mäßig differenzierte Zellen (G2) festgestellt wurden, beobachteten wir sowohl für C3a, als auch C5a und sC5b–C9 signifikant erhöhte Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nur bei fünf Patienten der PEKA-Kohorte wurden schlecht differenzierte Zellen im *grading* (G3) gefunden, in keinem der Tumorresektate waren die Zellen undifferenziert (G4). Acharya et al. bezogen ebenfalls Daten aus den zugehörigen histopathologischen Befunden nach Tumorresektion ein. Sie fanden bei gut und mäßig

differenzierten Tumorzellen jedoch kein erhöhtes Serum-CRP – es war nur bei undifferenzierten Zellen stark erhöht [43]. Sie stellten außerdem bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen (N1, N2, N3) erhöhte CRP-Werte im Vergleich zu denjenigen ohne Lymphknotenmetastasen fest [43]. Die C3a-Serumkonzentration unserer Patienten war nur in Assoziation mit dem Lymphknotenstatus N2 (solitäre oder multipler Lymphknotenbefall zwischen 3 und 6 cm) signifikant erhöht. Die Patienten mit größeren lymphoregionären Metastasen (N2: 3–6 cm) waren in unserem Kollektiv auch signifikant jünger ($54 \pm 6,4$ a) als die übrigen untersuchten PEKA-Patienten (67 ± 9 a). In der Patientenkohorte von Acharya et al. waren die CRP-Serumwerte bei jüngeren PEKA-Patienten unter 45 Jahren grundsätzlich deutlich erhöht [43].

CRP ist ein Akute-Phase-Protein, das, vor allem nach Ausschüttung von IL-6 durch Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten, in den Hepatozyten gebildet wird [44]. Dabei werden durch CRP sogenannte PAMPS (pathogen associated molecular patterns) erkannt [44]. CRP opsoniert, ähnlich den Antikörpern, Pathogene und aktiviert somit den klassischen Weg des Komplementsystems, wobei C3a, C5a und sC5b–C9 entstehen [44]. Berücksichtigt man diesen Zusammenhang sind die Ergebnisse von Acharya et al. mit unseren in vielen Punkten kohärent. Sie werfen allerdings auch einige Fragen auf. Ist die Immunantwort auf den Tumor bei jüngeren Tumorpatienten grundsätzlich ausgeprägter als bei älteren? Treten bei jüngeren Patienten Tumoren mit aggressiverem Charakter auf? Oder liegt es nur am herunterregulierten Immunsystem im Alter?

4.5. Komplementüberwachung bei der Tumorthherapie – ein Ausblick

Inwiefern die Überwachung der Komplementfaktoren beim oralen PEKA in Zukunft relevant sein könnte, kann man am Beispiel von Eculizumab zeigen. Eculizumab wird als Therapeutikum bei paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie und atypischem hämolytisch-urämischem Syndrom eingesetzt, daher sind die Nebenwirkungen dieses Therapeutikums bereits bekannt [22, 45]. Eculizumab verhindert die Bildung von C5a und MAC im Blutplasma; die Wirkung und Halbwertszeit im interstitiellen Gewebe sind jedoch unbekannt [46]. Derzeit wird es noch nicht zur Krebstherapie eingesetzt, jedoch wäre es als Ergänzung zu anderen Chemotherapeutika denkbar [22].

Afshar Khargan fasst den Zusammenhang zwischen Komplementfaktoren und Tumorentstehung in einer Hypothese zusammen, nach der Anaphylatoxine und geringe MAC-Konzentrationen das Tumorwachstum fördern und erst hohe MAC-Konzentrationen Tumorzellen abtöten [22]. Tumorzellen senken die MAC-Konzentration, indem sie vermehrt

CD59 exprimieren, wodurch MAC durch Vesikelbildung von der Zelloberfläche entfernt und so die Zellyse abgewendet wird. Bei humanen Zelllinien aus Lungentumoren konnten Antikörper gegen CD59 die komplementabhängige Zellyse durch monoklonale anti-EGFR Antikörper, wie Cetuximab, verbessern [22]. Dieser Mechanismus wäre beim oralen PEKA, bei dem Cetuximab eine Therapieoption ist, ebenfalls denkbar.

Sollte eine dieser Behandlungsstrategien in Zukunft beim PEKA Anwendung finden, wäre die Bestimmung der Komplementfaktoren C3a, C5a und sC5b–C9 eine gute und sinnvolle Möglichkeit zum Therapie-Monitoring und dies wäre mit Hilfe des von uns entwickelten Multiplexassays möglich.

5. Zusammenfassung

Das orale Plattenepithelkarzinom (PEKA) ist einer der häufigsten Tumore der Mundhöhle. Eine frühe Diagnose und Indikatoren zur Verlaufsprognose sind essentiell. Diese Studie hat sich als Ziel gesetzt, die Komplementaktivierung bei PEKA als potentiellen Krankheitsmarker zu überprüfen. Hierzu wurde ein innovativer Komplement-Aktivierungs-Assay entwickelt.

Zuvor genau charakterisierte Antikörper, die spezifische Epitope der Komplement-Aktivierungsprodukte C3a, C5a und sC5b–C9 detektieren, wurden zusammen mit Kontrollantikörpern an MagPlex®Microspheres unterschiedlicher Regionen gekoppelt und zu einem Assay zusammengefügt. Humanes Blutserum einer gesunden Kohorte (n=46) und von Patienten mit oralem PEKA (n=57) wurden hinsichtlich der Komplementaktivierung bei oraler Tumorausbreitung untersucht. Mittels des neuen Multiplexassays konnten C3a, C5a und sC5b–C9 unter anderem in humanem Blutserum aus minimalen Probenvolumina von Patienten mit oralem PEKA nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Nachweisgrenze lag für C3a bei 0,04 ng/mL, für C5a bei 0,03 ng/mL und für sC5b–C9 bei 18,9 ng/mL. Biologische *Cut-off*-Levels stellten den ausschließlichen spezifischen Nachweis aus den Serumproben sicher. In der gesunden Kontrollkohorte betrug die durchschnittliche Serumkonzentration von C3a 680 ng/mL, von C5a 70 ng/mL und von sC5b–C9 2247 ng/mL. Der Assay zeigte eine Intra-Assayvarianz von 2,9–6,4 % und eine Inter-Assayvarianz von 9,2–18,2 %.

Innerhalb der Patientenkohorte ergaben sich signifikant erhöhte C3a-Serumwerte bei PEKA-Patienten mit größeren Metastasen in lokoregionären Lymphknoten (N2) im Vergleich zu solchen mit kleineren oder keinen Metastasen in lokoregionären Lymphknoten (N0 und N1). Unsere Analysen der PEKA-Patienten ergaben keine systemisch erhöhten C3a-Serumkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die C5a-Serumwerte waren unabhängig von der Tumorausdehnung oder dem Lymphknotenstatus bei Patienten mit PEKA signifikant erhöht. Signifikant gesteigerte sC5b–C9-Serumwerte beobachteten wir bei oralem PEKA mit infiltrierendem Wachstum.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Saba NF, Goodman M, Ward K, Flowers C, Ramalingam S, Owonikoko T, *et al.* Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the oral tongue, base of tongue, and tonsils: A surveillance, epidemiology and end results program-based analysis. *Oncology* 2011; 81(1): 12–20.
- [2] Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update. *CA Cancer J. Clin.* 2015; 65(5): 401–21.
- [3] Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology* 2016; 91(1): 13–23.
- [4] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45(4-5): 309–16.
- [5] Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, *et al.* Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2007; 99(10): 777–89.
- [6] Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, *et al.* Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(16): 2164–70.
- [7] Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJW, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 2005; 7(4): 301–11.
- [8] Ferris RL, Blumenschein G, JR, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, *et al.* Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* 2016; 375(19): 1856–67.
- [9] Ajona D, Pajares MJ, Chiara MD, Rodrigo JP, Jantus-Lewintre E, Camps C, *et al.* Complement activation product C4d in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2015; 21(7): 899–904.
- [10] Riihilä PM, Nissinen LM, Ala-aho R, Kallajoki M, Grénman R, Meri S, *et al.* Complement factor H: A biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2014; 134(2): 498–506.
- [11] Sivadasan P, Kumar Gupta M, Sathe GJ, Balakrishnan L, Palit P, Gowda H, *et al.* Data from human salivary proteome - A resource of potential biomarkers for oral cancer. *Data Brief* 2015; 4: 374–8.
- [12] Riihilä P, Nissinen L, Farshchian M, Kallajoki M, Kivisaari A, Meri S, *et al.* Complement Component C3 and Complement Factor B Promote Growth of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol* 2017; 187(5): 1186–97.
- [13] Cai K, Wan Y, Wang Z, Wang Y, Zhao X, Bao X. C5a promotes the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells through PCAF-mediated STAT3 acetylation. *Oncol. Rep.* 2014; 32(5): 2260–6.
- [14] Cho MS, Vasquez HG, Rupaimoole R, Pradeep S, Wu S, Zand B, *et al.* Autocrine effects of tumor-derived complement. *Cell Rep* 2014; 6(6): 1085–95.
- [15] Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* 2015; 6: 262.
- [16] Morgan BP, Paul Morgan B. The Complement System: An Overview. In: *Complement Methods and Protocols*; 1–13.
- [17] Pauly D, Dorner M, Zhang X, Hlinak A, Dorner B, Schade R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens

- immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poult. Sci.* 2009; 88(2): 281–90.
- [18] Pauly D, Kirchner S, Stoermann B, Schreiber T, Kaulfuss S, Schade R, *et al.* Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. *Analyst* 2009; 134(10): 2028–39.
- [19] Prohászka Z, Nilsson B, Frazer-Abel A, Kirschfink M. Complement analysis 2016: Clinical indications, laboratory diagnostics and quality control. *Immunobiology* 2016; 221(11): 1247–58.
- [20] Bomert M, Köllisch G, Roponen M, Lauener R, Renz H, Pfefferle PI, *et al.* Analytical performance of a multiplexed, bead-based cytokine detection system in small volume samples. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011; 49(10): 1691–3.
- [21] Le Guezennec X, Quah J, Tong L, Kim N. Human tear analysis with miniaturized multiplex cytokine assay on "wall-less" 96-well plate. *Mol. Vis.* 2015; 21: 1151–61.
- [22] Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J. Clin. Invest.* 2017; 127(3): 780–9.
- [23] Olcina MM, Kim RK, Melemenidis S, Graves EE, Giaccia AJ. The tumour microenvironment links complement system dysregulation and hypoxic signalling. *Br J Radiol* 2018: 20180069.
- [24] Ajona D, Ortiz-Espinosa S, Pio R. Complement anaphylatoxins C3a and C5a: Emerging roles in cancer progression and treatment. *Semin Cell Dev Biol* 2017.
- [25] Habermann JK, Roblick UJ, Luke BT, Prieto DA, Finlay WJJ, Podust VN, *et al.* Increased serum levels of complement C3a anaphylatoxin indicate the presence of colorectal tumors. *Gastroenterology* 2006; 131(4): 1020-9; quiz 1284.
- [26] Kim D-W, Kim DY, Kim TH, Jung KH, Chang HJ, Sohn DK, *et al.* Is T classification still correlated with lymph node status after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer? *Cancer* 2006; 106(8): 1694–700.
- [27] Kim RY, Ward BB, Brockhoff HC, Helman JI, Braun TM, Skouteris CA. Correlation of Lymph Node Density With Negative Outcome Predictors in Oral and Maxillofacial Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2016; 74(10): 2081–4.
- [28] Nabizadeh JA, Manthey HD, Steyn FJ, Chen W, Widiapradja A, Md Akhir FN, *et al.* The Complement C3a Receptor Contributes to Melanoma Tumorigenesis by Inhibiting Neutrophil and CD4+ T Cell Responses. *J Immunol* 2016; 196(11): 4783–92.
- [29] Bonavita E, Gentile S, Rubino M, Maina V, Papait R, Kunderfranco P, *et al.* PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer. *Cell* 2015; 160(4): 700–14.
- [30] Corrales L, Ajona D, Rafail S, Lasarte JJ, Riezu-Boj JI, Lambris JD, *et al.* Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. *J Immunol* 2012; 189(9): 4674–83.
- [31] Nitta H, Murakami Y, Wada Y, Eto M, Baba H, Imamura T. Cancer cells release anaphylatoxin C5a from C5 by serine protease to enhance invasiveness. *Oncol. Rep.* 2014; 32(4): 1715–9.
- [32] Cho DC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in malignancy: Rationale and clinical outlook. *BioDrugs* 2014; 28(4): 373–81.
- [33] Blaszcak W, Barczak W, Wegner A, Golusinski W, Suchorska WM. Clinical value of monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 2017; 34(4): 60.
- [34] Strainic MG, Liu J, Huang D, An F, Lalli PN, Muqim N, *et al.* Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity* 2008; 28(3): 425–35.

- [35] Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, *et al.* Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat. Immunol.* 2008; 9(11): 1225–35.
- [36] Refaeli Y, Abbas AK. Role of cytokines in autoimmunity. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9(3 Suppl): 81–2.
- [37] Whiteside TL. Immunobiology of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24(1): 95–105.
- [38] Nitta H, Wada Y, Kawano Y, Murakami Y, Irie A, Taniguchi K, *et al.* Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a receptor (CD88). *Clin Cancer Res* 2013; 19(8): 2004–13.
- [39] Nunez-Cruz S, Gimotty PA, Guerra MW, Connolly DC, Wu Y-Q, DeAngelis RA, *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of complement impairs endothelial cell function and ablates ovarian cancer neovascularization. *Neoplasia* 2012; 14(11): 994–1004.
- [40] Liu L, Li W, Li Z, Kirschfink M. Sublytic complement protects prostate cancer cells from tumour necrosis factor- α -induced cell death. *Clin Exp Immunol* 2012; 169(2): 100–8.
- [41] Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Parsa AT. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res* 2010; 8(11): 1453–65.
- [42] Liu X-Y, Wang X-Y, Li R-Y, Jia S-C, Sun P, Zhao M, *et al.* Recent progress in the understanding of complement activation and its role in tumor growth and anti-tumor therapy. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 91: 446–56.
- [43] Acharya S, Kale J, Hallikeri K, Anehosur V, Arnold D. Clinical significance of preoperative serum C-reactive protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2018; 47(1): 16–23.
- [44] Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med* 2000; 32(4): 274–8.
- [45] Zuber J, Fakhouri F, Roumenina LT, Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8(11): 643–57.
- [46] Cugno M, Gualtierotti R, Possenti I, Testa S, Tel F, Griffini S, *et al.* Complement functional tests for monitoring eculizumab treatment in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Thromb Haemost* 2014; 12(9): 1440–8.

A novel multiplex detection array revealed systemic complement activation in oral squamous cell carcinoma

Juliane Gallenkamp^{1,*}, Gerrit Spanier^{1,*}, Elisabeth Wörle², Markus Englbrecht², Michael Kirschfink³, Roman Greslechner², Regine Braun², Nicole Schäfer², Richard J. Bauer^{1,4,*} and Diana Pauly^{2,*}

¹University Hospital Regensburg, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Regensburg, Germany

²University Hospital Regensburg, Department of Ophthalmology, Regensburg, Germany

³Institute of Immunology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

⁴Center for Medical Biotechnology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Richard J. Bauer, **email:** richard.bauer@ukr.de

Keywords: multiplex assay; oral squamous cell carcinoma; complement proteins; C3a; C5a

Received: August 18, 2017

Accepted: November 11, 2017

Published: December 06, 2017

Copyright: Gallenkamp et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common tumors within the oral cavity. Early diagnosis and prognosis tools are urgently needed. This study aimed to investigate the activation of the complement system in OSCC patients as potential biomarker. Therefore, an innovative complement activation array was developed.

Characterized antibodies detecting the complement activation specific epitopes C3a, C5a and sC5b-9 along with control antibodies were implemented into a suspension bead array. Human serum from a healthy ($n = 46$) and OSCC patient ($n = 57$) cohort were used to investigate the role of complement activation in oral tumor progression. The novel multiplex assay detected C3a, C5a and sC5b-9 from a minimal sample volume of human tears, aqueous humor and blood samples. Limits of detection were 0.04 ng/mL for C3a, 0.03 ng/mL for C5a and 18.9 ng/mL for sC5b-9, respectively. Biological cut-off levels guaranteed specific detections from serum. The mean serum concentration of a healthy control cohort was 680 ng/mL C3a, 70 ng/mL C5a and 2247 ng/mL sC5b-9, respectively. The assay showed an intra-assay precision of 2.9–6.4% and an inter-assay precision of 9.2–18.2%.

Increased systemic C5a ($p < 0.0001$) and sC5b-9 ($p = 0.01$) concentrations in OSCC patients were determined using the validated multiplex complement assay. Higher C5a concentrations correlated with tumor differentiation and OSCC extension state. Systemic sC5b-9 determination provided a novel biomarker for infiltrating tumor growth and C3a levels were associated with local tumor spreading.

Our study suggests that systemic complement activation levels in OSCC patients may be useful to assess disease progression.

INTRODUCTION

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is with 90% the most prevalent tumor in the head and neck area [1, 2]. It belongs to the ten most common tumors worldwide with about 300.000 cases every year and with men affected twice as often as women [3, 4]. The three most

common risk factors for developing OSCC are smoking, alcohol consumption and human papillomavirus infection [3, 5]. Depending on the localization and tumor stage the therapy consists of surgical removal, irradiation and chemotherapy. In recent years, the therapeutic possibilities have been extended via targeted therapies with monoclonal antibodies like Cetuximab directed against EGF receptor

or Nivolumab, a monoclonal antibody against the receptor PD-1 (programmed death) which was shown to prolong patient survival with recurring and metastasizing OSCC [6–8]. Despite these numerous therapeutic approaches and advancements, the mortality rate within the first five years is still 50%. One reason for this is missing diagnostic tools to detect high-risk lesions in early stages and differentiate between harmless and high-risk precursor lesions.

Several recent publications show complement activation via three different pathways to be involved during the development of OSCC (Figure 1A) [9]. Moreover, complement factors have been discussed as biomarkers for progression of squamous cell carcinoma [10]. High abundance of complement C3, complement factor B (CFB) and complement C4B has been demonstrated in the saliva of OSCC patients [11], especially in invasive cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-associated cSCCs [12]. Furthermore, the complement activation product, C5a, is involved in the development of nasopharyngeal carcinoma [13]. Other reports also reveal a role for complement proteins during ovarian and lung cancer tumor progression [14]. The precise role which complement factors play and the mechanisms by which they modulate cancer progression is still elusive.

From a diagnostic point of view, the complement system is a challenging group of proteins as the cascade is composed of more than 40 proteins, which are concerted to activated molecules and form complexes to exert their specific functions (Figure 1A) [15]. Complement activation is characterized by the generation of anaphylatoxins, C3a and C5a, which modulate and attract immune cells via their receptors C3aR and C5aR. The larger complement cleavage products, e.g. C3b, either bind to the cell surface and initiate complement activation or form the terminal complement complex (C5b-9), which integrates into the cell membrane resulting in cell lysis. If vitronectin binds to this complex in fluid-phase, the soluble terminal complement complex (sC5b-9) will be formed which is unable to integrate into the membrane remaining in plasma (Figure 1A) [16]. Most of the complement activation diagnostic is mainly performed in a single test format either by functional analysis using hemolytic assays or by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) detecting C3a, C5a and other activation products [17]. However, it is desirable to monitor complement activation at various levels of the cascade reaction (C3a, C5a, sC5b-9) simultaneously to verify more specifically the activation status, but also to reduce materials used and costs. Different multiplex detection platforms had been described in the past, among them the suspension bead array technology based on differentially fluorescently coded beads is of interest for a broad range of use for simultaneous immunoassays (Figure 1B, 1C) [18]. The assay principle is similar with combined sandwich ELISA: Complement activation product detecting neo-epitope specific antibodies are immobilized as capture antibodies to the color-coded beads. The bead-bound

analytes are detected via biotinylated antibodies and a fluorescent reporter system. The readout is performed by a cytometer firstly addressing the fluorescent signature of the beads and secondly the intensity of the reporter signal. The current work, describes for the first time the implementation and validation of the suspension multiplex technology for a simultaneous analysis of the complement activation pattern of C3a, C5a and C5b-C9 from minimal sample volumes of human blood, aqueous humor and tear samples. Using the assay we analyzed systemic C3a, C5a and C5b-C9 concentrations as a biomarker for OSCC tumor extension and differentiation state.

RESULTS

Detection of complement activation using a novel multiplex suspension assay

With the growing role of the complement system in disease progression and novel complement therapeutics in clinical use (e.g. Eculizumab) and trials (e.g. Lampalizumab) complement monitoring becomes increasingly significant [19]. However, complement diagnostic is challenging because of multiple complement proteins, their interactions and cleavage products.

We established and validated a complement activation immunoassay by simultaneous analysis of C3a, C5a and sC5b-9 using the Luminex xMap technology and specific antibodies. The reactivity of capture and detection antibodies for the multiplex complement activation assay were evaluated in Western blots against purified complement activation products and human serum (Supplementary Figure 1). The anti-C3a capture antibody showed a binding preference for isolated C3a-fragment (Supplementary Figure 1A) and the detection antibody for the C3a containing C3 α -chain in human serum (Supplementary Figure 1B). Both anti-C5a antibodies detected purified C5a in Western blots (Supplementary Figure 1C, 1D). C5a was approximately 10-times lower concentrated in human serum than C3a (Figure 2B, Figure 6). Therefore, the detection limit of the immunoblots were not sufficient for C5a analysis from human serum (Supplementary Figure 1C, 1D). The capture antibody for the sC5b-9 detected C5, C6, C7, C8, C9 and vitronectin in purified sC5b-9 complex and from human serum (Supplementary Figure 1E). The detection antibody showed a binding preference for C6 in Western blot (Supplementary Figure 1F).

The characterized capture and detection antibodies (Supplementary Figure 1) were implemented into the novel multiplex complement activation assay in combination with the species-specific negative control antibodies (Figure 1B, 1C, Supplementary Table 1). Complement activation markers were simultaneously and sensitively quantified in the multiplex system (Figure 2A). The LOD (limit of detection) was 0.04 ng/mL for C3a detection, 0.03 ng/mL for C5a detection and 18.96 ng/mL for detection of sC5b-9

(Figure 2A, Supplementary Table 1). On average 0.68 $\mu\text{g/mL}$ C3a, 0.07 $\mu\text{g/mL}$ C5a and 22.47 $\mu\text{g/mL}$ sC5b-9 were detected in the serum of the healthy control cohort (Figure 2B, Supplementary Table 2). The quality of the novel multiplex assay was assessed using sample material of an international inter-laboratory comparison test (complement EQA5, 2015) [19]. We determined C3a within the detection range of the reference values, however the concentrations for sC5b-9 were at factor 100 higher than the values determined by single ELISA and C5a reference levels were not provided in the round-robin test [19]. In summary, our novel assay allows a reproducible detection of C3a and C5a levels in human serum comparable to previously published studies (for references see Figure 2B), which determined complement activation markers in a comparable range using single immunoassays (Figure 2B).

Multiplex detection assays are characterized by simultaneous analysis of multiple ligands in a single tube format. Therefore, the specificity and the performance of the single and combined assays need to be validated separately to assure reliable results independently of the sample composition. Bead-specific detection of purified antigens was tested in singleplex and multiplex assays (Figure 3). The high binding capacities of the anti-C3a, anti-C5a- and anti-sC5b-9 beads were shown in a one-

bead assay with a single purified antigen dilution series (Figure 3A, 3C, 3E). All three complement activation products were detected in dose-dependent logarithmic standard curves comprising four decades on a log-scale and either ranging from 0.2 to 0.00004 $\mu\text{g/mL}$ for C3a (Figure 3A), 0.03–0.00003 $\mu\text{g/mL}$ for C5a (Figure 3C) or 67–0.019 $\mu\text{g/mL}$ for sC5b-9 (Figure 3E), respectively. The singleplex detection of each antigen was comparable with the standard curve performance in the multiplex assays, indicating a bead-specific detection (Figure 2A, Figure 3A, 3C, 3E). Moreover, unspecific cross-reactivity was tested using all five bead regions (Figure 1B, 1C, Supplementary Table 1), the three complement detecting bead regions and the two negative control bead regions, by means of singular antigen dilution series (Figure 3B, 3D, 3F). Our data showed a specific signal for the antigens with all the corresponding beads and did not reveal any cross-reactivity with unspecific bead regions or the negative control beads (Figure 3B, 3D, 3F).

Further, we determined the specificity and the cut-off levels of our multiplex assay in a more complex experimental setting using human sera depleted from specific complement factors (C2–C9, properdin and CFH) and measured the respective concentrations of C3a, C5a and sC5b-9 (Figure 4). The three complement activation

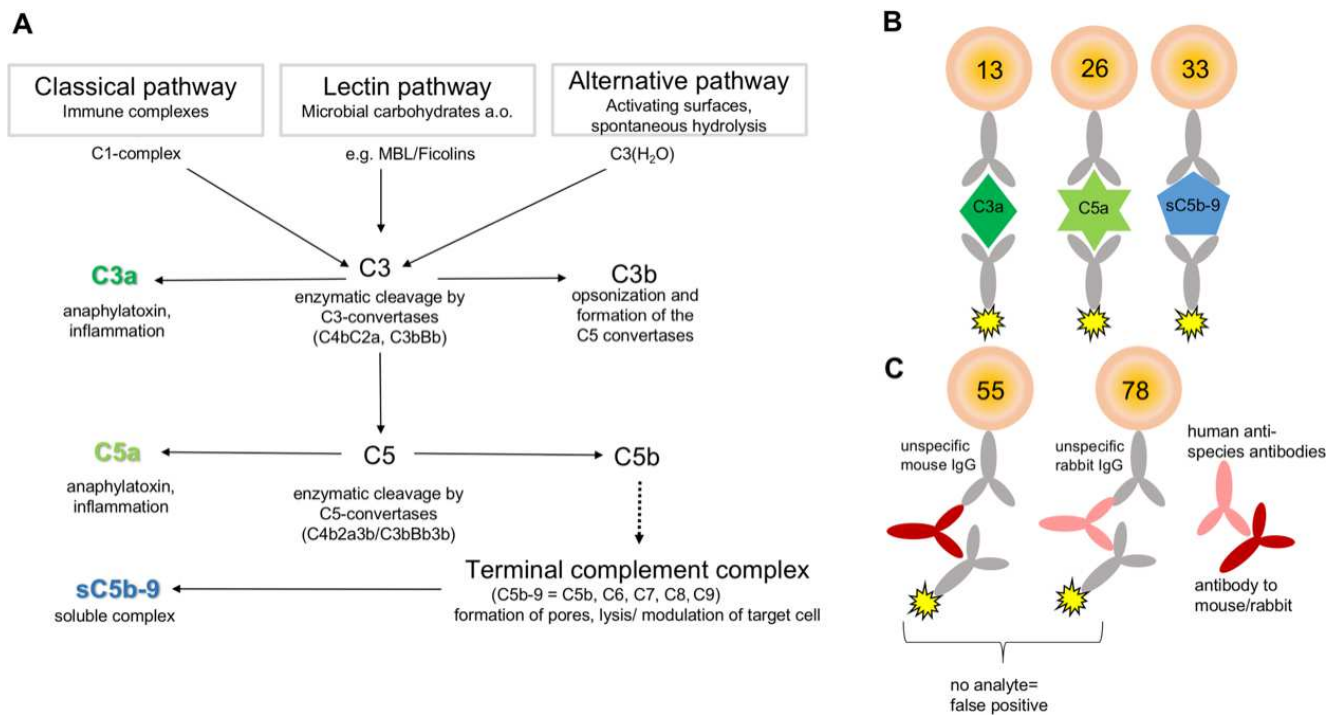


Figure 1: Principle for multiplex-complement activation assay. (A) The complement system is a part of the innate immunity and activated by three different pathways: the classical, the lectin, and the alternative pathway. Activation results in enzymatic cleavage of C3 to C3a and C3b. The latter triggers the terminal complement pathway by cleavage of C5 and the formation of the terminal complement complex sC5b-C9. The formation of sC5b-C9 and the anaphylatoxins C3a and C5a determines complement activation. (B, C) The detection of the complement activation products was performed in multiplex suspension bead array based on the x-MAP technology (Luminex®). (B) Activation product specific antibodies were immobilized to distinct fluorescent, magnetic beads to capture either C3a, C5a or sC5b-C9 from solution, respectively. Antigen specific biotinylated antibodies and phycoerythrin conjugated to streptavidin detected the captured activation products simultaneously. (C) False positive signals by cross-reacting human anti-species antibodies and *in vitro* complement activation were excluded by utilizing an appropriate reaction buffer.

products were highly specifically detected in human serum but not in the respective depleted sera (Figure 4). C3a detection was at its lowest level in the C3-depleted serum with a concentration of 0.09 $\mu\text{g/mL}$, which determined our cut-off level for the C3a detection assay (Supplementary Table 1). The remaining complement depleted sera exceeded this cut-off concentration by a factor of 1.5 (C4-depleted serum) to a factor of 6 (C5-depleted serum) (Figure 4A). The physiological serum C3a concentration in our healthy probands was at 0.68 $\mu\text{g/mL}$ rising above the C3a cut off level by a factor of 7 (Figure 5C, Supplementary Table 2). C5a analysis in C5-depleted serum resulted in a cut-off determination at 0.01 $\mu\text{g/mL}$ (Supplementary Table 1), which was 7-times below the physiological C5a concentration in our healthy probands and 64 times below the highest C5a concentration in C8-depleted serum (Supplementary Table 2, Figure 4B, Figure 5D). The lowest detection signal of sC5b-9 was observed in C5-depleted serum with 2.47 $\mu\text{g/mL}$. The remaining complement depleted sera showed at least 12.5 times the concentration above the cut-off (C2-depleted serum) (Figure 4C). The mean physiological sC5b-9 serum concentration in our healthy control group was at 22.47 $\mu\text{g/mL}$, which exceeds the concentration measured in C5-depleted serum by a factor of 9 (Supplementary Table 2, Figure 5E).

One major advantage of the novel complement multiplex assay is the simultaneous quantification of three activation markers from a minimal sample volume.

Therefore, in a proof-of-principle, we analyzed the C3a and C5a concentrations in minimal sample volumes of human aqueous humor from glaucoma and cataract patients ($<100 \mu\text{L}$) (Figure 5A) as well as in human tears ($<50 \mu\text{L}$) (Figure 5B). The C3a concentrations in aqueous humor ranged from 1.4 to 64 ng/mL and overlapped with previously described C3a levels in the same sample matrix of healthy patients by means of single immunoassays [20]. We describe, however, for the first time very low C5a concentrations in aqueous humor samples below the cut-off levels for serum samples (10 ng/mL) using our multiplex assay (Figure 5A). C3a concentrations in tears were determined between 4.3–26.5 ng/mL , which was in accordance to previous publications (Figure 5B) [21]. A simultaneous analysis of C3a with C5a from tears has not been described before. We showed for the first time, that C5a is a component in tears at a concentration range of 1.4 ng/mL , which was below the cut-off level for serum samples but above the limit of detection (Figure 5B, Supplementary Table 1).

The variability of the 5-plex assay was determined at a dilution of 1:50 with a standard quality control serum. For each of the activation markers analyzed, the mean intra-assay precision was between 2.9%–6.4% (Supplementary Table 1). The mean inter-assay precision values for all analytes were between 9.2% and 18.2% (Supplementary Table 1). Similarly, intra- and inter-assay precision values for different cytokines in commercial multiplex cytokine xMAP-assays were reported [22, 23].

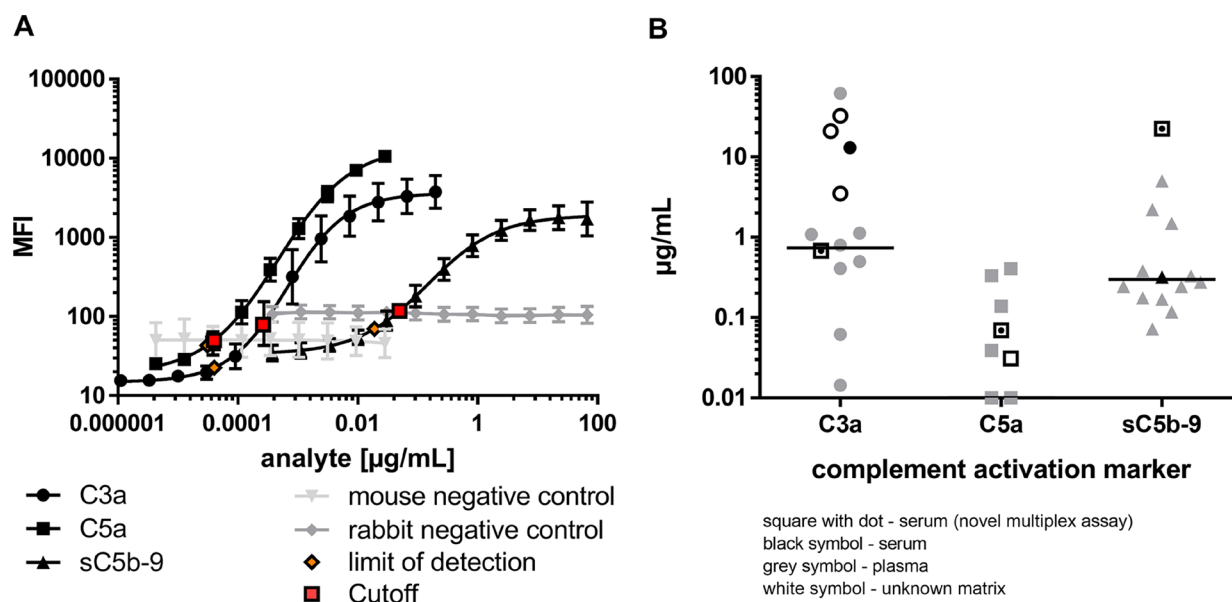


Figure 2: Complement activation markers were simultaneously and sensitively quantified in the multiplex system. (A) Serial dilutions of native, human C3a-desArg (black circle), recombinant, human C5a-desArg (black square) and native human sC5b-C9 (black triangle) depicted different assay performances for the simultaneous analysis of complement activation markers. The target antigens were only detected by respective coupled magnetic beads and not by control beads (grey). Limit of detection (orange) and assay cutoffs (red square) for each analyte are shown. (B) The concentration range of complement activation markers determined with the novel multiplex assay from a human serum pool (black square with dot) corresponded to previously reported ranges for C3a, C5a and sC5b-C9 single detection either from plasma (grey), serum (black) or unknown sample matrix (white), respectively [42–62].

Systemic complement activation in OSCC patients assay

C3a, C5a and sC5b-9 concentrations were quantified in 103 serum probes using the validated 5-plex assay (Supplementary Table 2). Our healthy control cohort showed a systemic complement activation concentration within a range of 0.2–2.5 $\mu\text{g/mL}$ for C3a (Figure 5C), 0.02–0.12 $\mu\text{g/mL}$ for C5a (Figure 5D) and 16.3–29.9 $\mu\text{g/mL}$ for sC5b-9 (Figure 5E), respectively (Supplementary Table 2).

We compared the levels of C3a, C5a and sC5b-9 in serum from OSCC patient cohort ($n = 57$) to a matched healthy control group ($n = 46$) (Supplementary Table 2).

Our data clearly showed a significant 60% increase of C5a (mean 0.11 $\mu\text{g/mL}$) and a 12% increase of C5b-9 (mean 25.22 $\mu\text{g/mL}$) serum concentrations in OSCC patients in contrast to the healthy control group (C5a: mean 0.07 $\mu\text{g/mL}$ and sC5b-9 mean 22.47 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 5D, 5E). However, we did not observe a significant difference in C3a concentration in serum from OSCC patients compared to healthy controls (Figure 5C).

Furthermore, correlation of our diagnostic analyses with retrospective clinical data revealed an association between the concentration of specific complement markers C3a, C5a and tumor differentiation (Figure 6A–6C) and extension (Figure 6D–6F) in serum from OSCC patients

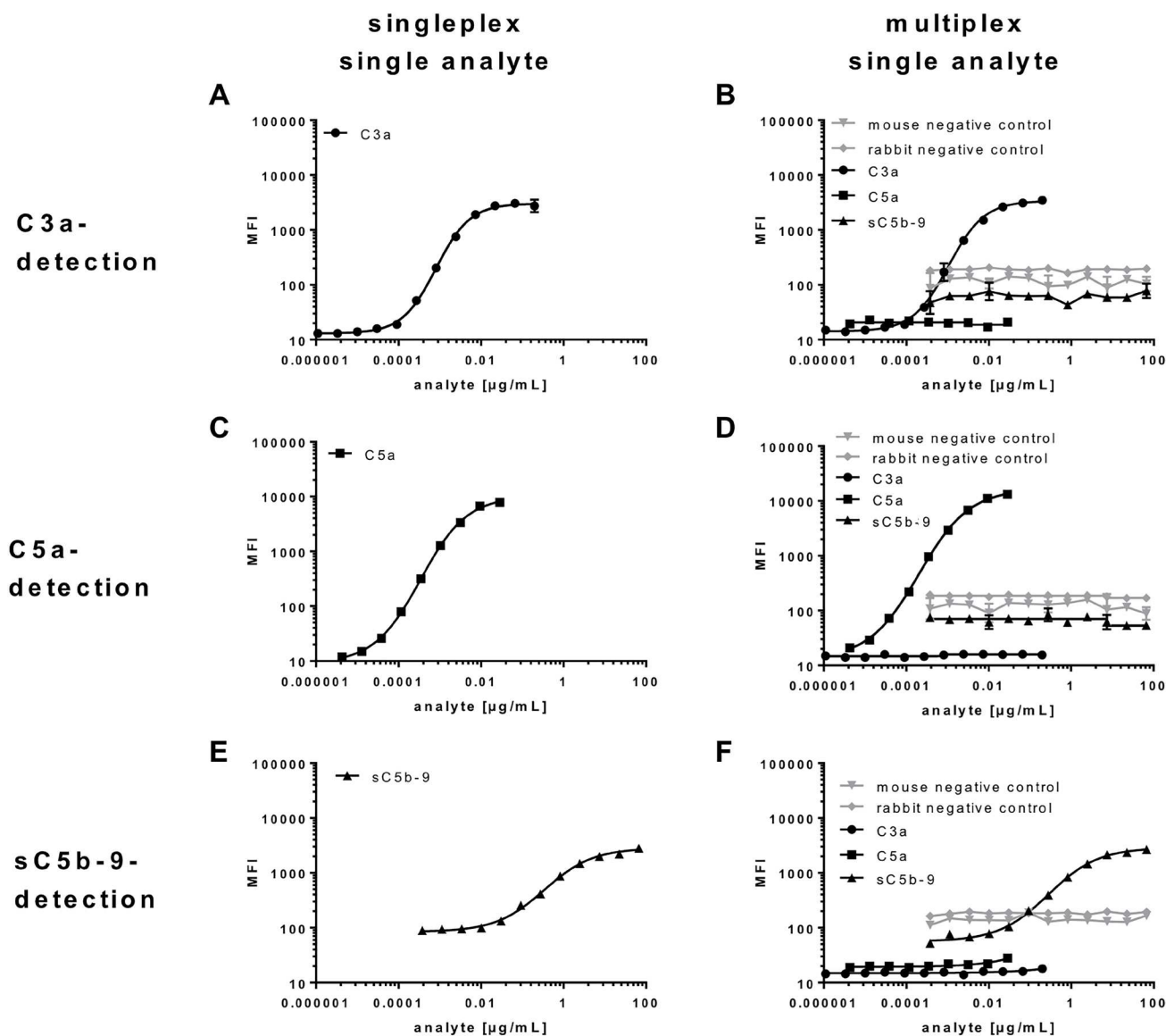


Figure 3: Bead-specific detection of purified antigens in singleplex and multiplex assays. (A, B, D, F) Specificity of C3a-beads, (C, B, D, F) C5a-beads and (E, B, D, F) sC5b-C9-beads were either analysed in a (A, C, E) one-bead assay with a single antigen dilution series or (B, D, F) all five bead regions and a singular antigen dilution series. (B, D, F) All beads showed a specific signal for the respective antigen and no cross reactivities. The detection of (A, B) C3a, (C, D) C5a and (E, F) sC5b-C9 was comparable in the (A, C, E) single and (B, D, F) multiplex assays, indicating a bead-specific detection.

compared to healthy controls. The concentrations of all three complement activation products were significantly elevated in patients with moderately differentiated cells (G2-grade tumors) (C3a: $p < 0.05$, C5a: $p < 0.0001$, sC5b-9: $p < 0.05$), whereas there was no increase in G1 (well differentiated), G3 (poorly differentiated) and G4

(undifferentiated) tumors (Figure 6A–6C). Additionally, C5a and sC5b-9 concentrations markedly increased dependent on tumor growth comparing serum from OSCC patients and healthy controls (Figure 6E, 6F). OSCC patients with tumors sizes ranging from <2 cm to >4 cm (T1-T3) all harbored significantly higher

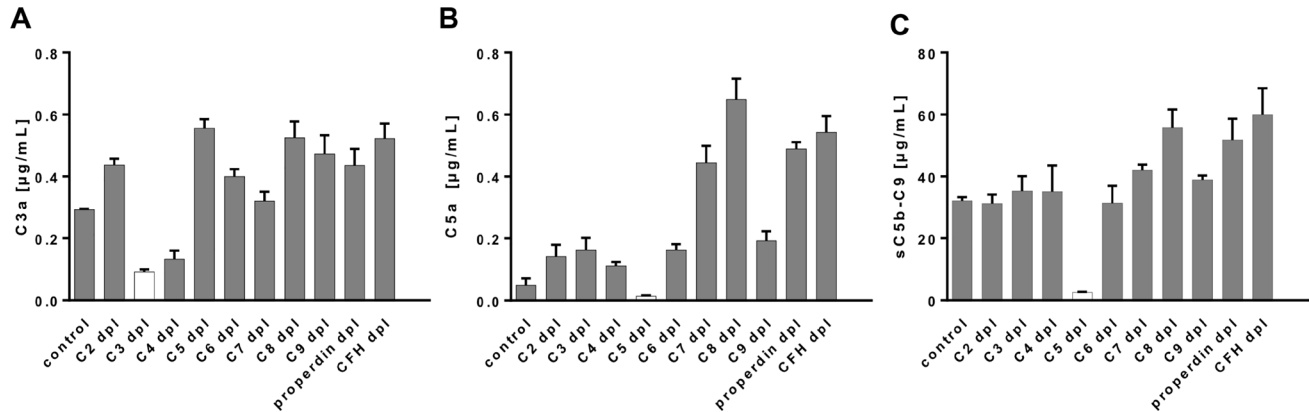


Figure 4: The multiplex assay detected complement activation products specifically from complement component-depleted human sera. (A–C) C3a, C5a and sC5b-C9 were quantified either in normal human control serum (control) or C2-, C3-, C4-, C5-, C6-, C7-, C8-, C9-, properdin-, complement factor H-depleted serum. The lowest concentrations for (A) C3a and (B) C5a were observed in C3-depleted or C5-depleted serum, respectively. (C) The terminal complement complex was detected at a reduced level in C5-depleted serum. We did not observe a detection signal for any of the tested sera on the control beads (data not shown).

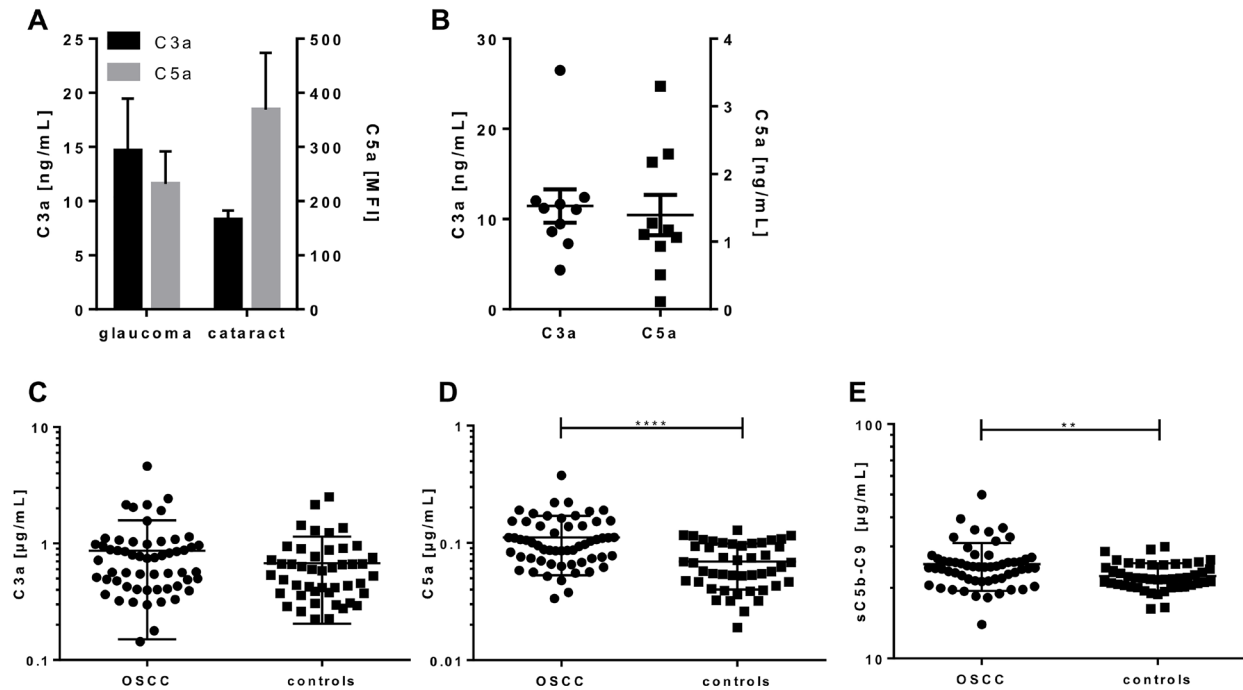


Figure 5: Simultaneous quantification of complement activation markers from aqueous humor, tears and sera of OSCC patients and controls. C3a and C5a were either measured in (A) aqueous humor of glaucoma and cataract patients, (B) in tears of healthy controls or (C–E) in sera of OSCC-patients ($n = 57$) and matched controls ($n = 46$) using the validated 5-plex immunoassay based on luminex technology. (A) The C3a levels of glaucoma and cataract patients did not show any significant difference, but a tendency for higher C3a levels in glaucoma patients. C5a concentrations in aqueous humor were below the lower detection limit. (B) Quantification of C3a and C5a in tears ranged between 4.4–26 ng/mL for C3a and 0.11–3.3 ng/mL for C5a, respectively. (D, E) C5a and sC5b-C9 concentrations were significantly increased in OSCC patients compared to the control group. Mean with standard deviations are depicted. (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ two-tailed, unpaired t -test).

C5a concentrations compared to healthy controls (T1: $p < 0.005$, T2: $p < 0.0001$, T3: $p < 0.05$). Moreover, patients with infiltrating tumors, regardless of the tumor size, also showed markedly higher concentrations of C5a (T4: $p < 0.0001$) (Figure 6E). Interestingly, only serum from patients with infiltrating tumors (T4) showed a significant difference in sC5b-9 concentration compared to the healthy control cohort (Figure 6F).

Furthermore, we were interested as to whether the spread of tumor cells to regional lymph nodes was associated with changes in C3a, C5a, sC5b-9 concentrations and age (Figure 6G–6J). C3a concentration clearly correlated with tumor cell spread to local metastases (Figure 6G). Metastases in ipsilateral or contralateral lymph nodes (<6 cm, N2) revealed increased systemic concentration of C3a ($1.0 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$) compared to smaller metastases in ipsilateral lymph nodes (<3 cm, N1) ($0.7 \pm 0.54 \mu\text{g/mL}$) and no metastasis (N0) ($0.9 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$) (Figure 6G). We did not find any correlation between C5a or sC5b-9 and lymph node infiltration in serum samples from OSCC patients (Figure 6H, 6I). Notably, statistical analysis revealed a strong association between the age of OSCC patients and the lymph node spread (Figure 6J). Patients with more severe metastasis <6 cm in ipsi- and contralateral lymph nodes were on average younger (54 ± 6.4 years), compared to patients with less severe lymph node spread <3 cm and only ipsilateral and/or to patients exposing no regional lymph nodes (67 ± 9 years, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively). However, age did not correlate with C3a, C5a or sC5b-9 concentration in serum (Figure 6K–6M).

DISCUSSION

The role of the complement system in cancer development and progression is a two-sided sword, which has been discussed in detail in recent reviews [24–27]. On the one hand, there is the anti-tumor activity of the complement system mediated by its ability to distinguish self from non-self and removing neo-antigen exposing cells or killing cells by the membrane-attack complex. On the other hand, C5a promotes tumor survival e.g. by increasing the infiltration of myeloid-derived suppressor cells and reducing the number of CD8⁺ cytotoxic T cells in the microenvironment of the tumor [28]. For further evaluation of the dual role of complement and identification of novel biomarker in tumor development and progression an improvement of complement diagnostic tools was needed to cover the multiple functions of the complement system.

We developed a bead array, which is for the first time capable of simultaneous detection of three complement activation products not only from a minimal buffer volume, but also from human serum, aqueous humor and tear fluid. While a variety of complement assays work well for single component analysis, many diagnostic tests fail when small sample volumes are tested for multiple complement proteins. Using the

multiplex complement assay, we detected C3a and C5a in a comparable range as previously described single assays (for references see Figure 2B) with a high reproducibility. The use of the novel detection method provides a step towards standardized array based economized complement diagnostic as a tool for disease diagnosis and monitoring of complement-targeted therapy [29].

Using our well-validated complement activation assay we found a clear evidence of systemic complement activation in OSCC patients, as the C5a concentration was significantly elevated in OSCC sera compared to controls. Furthermore, C3a as well as C5a serum concentrations were associated with tumor differentiation, growth and extension.

It has not yet been fully elucidated, whether complement plays a disease promoting role in OSCC. However, our results indicate, that the complement system appears to be dysregulated in this cancer. The data imply, that a new therapeutic option for OSCC patients could be complement-targeting therapeutics, which modulate activation or deposition of complement factors and influence the tumor microenvironment as well as tumorigenic potential [24].

It has been discussed before that the chronicity of the inflammation affects the role of complement in the tumorigenesis, apoptosis, tumor cellular invasion and exerts a dual role on tumor growth depending on the character of immune response [25, 30]. To evade antibody mediated complement dependent cytotoxicity tumor cells can adopt diverse strategies. One strategy for OSCC cells and other solid tumors like breast and pancreatic tumors is to overexpress complement restriction factors (CD46, CD55, CD59) in different densities [31]. Gelderman *et al.* reported the deposition of C3 and C5b-9 on cervical carcinoma cells and the surrounding stroma. They demonstrated that CD55 and CD46 were the most potent inhibitors of C3 deposition. Moreover, they increased complement activation applying specific antibodies against these restriction factors and the antibodies could be immunotherapeutic agents to enhance the inflammatory reaction at the tumor site [32]. Maehara *et al.* described a mechanism for preventing hepatocellular tumor development where AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) accumulate on the HCC (hepatocellular carcinoma) cell surface and activate the complement cascade thus inducing necrotic cell death in AIM bound HCC cells [33].

However, there is increasing evidence demonstrating that several complement factors are produced by tumor cells themselves exerting diverse tumor promoting autocrine effects. In cSCC (cutaneous squamous cell carcinoma) complement factor H and factor H-like protein-1 have been identified as potential progression markers as their gene expression was upregulated in cSCC cell lines and primary cSCC tumors [34]. In patients with ovarian and lung cancer autocrine effects of C5aR and C3aR facilitate cell proliferation via PI3K/Akt [14]. Silencing PI3K/

Akt in cancer cells eliminated C5aR and C3aR effects in cancer cells. Furthermore, in ovarian and lung cancer higher tumoral C3 and/or C5aR mRNA expression were associated with decreased overall survival. Cho *et al.* demonstrated complement activation in ovarian cancer cells due to an autocrine effect which produces complement C3 protein. This process leads to alterations in the tumor microenvironment by increasing the number of myeloid-derived suppressor cells and reducing the number of cytotoxic T cells that infiltrate into the tumor, which promotes tumor growth [14]. These results are

supported by data from Abbritti *et al.* who analyzed data of the current literature of potential meningioma biomarkers applying bioinformatic methods [35]. Their approach revealed complement factor C3, among 8 other proteins, to be particularly related to tumorigenesis of meningioma. In addition to that Chen *et al.* identified among other factors complement C3c (C3) to be differentially expressed in serum blood samples from 25 OSCC patients compared to 25 healthy controls via MALDI-TOF mass spectrometry [36]. Chemically induced mouse cSCC and 8 cSCC cell lines showed significant upregulation of C3 and CFB

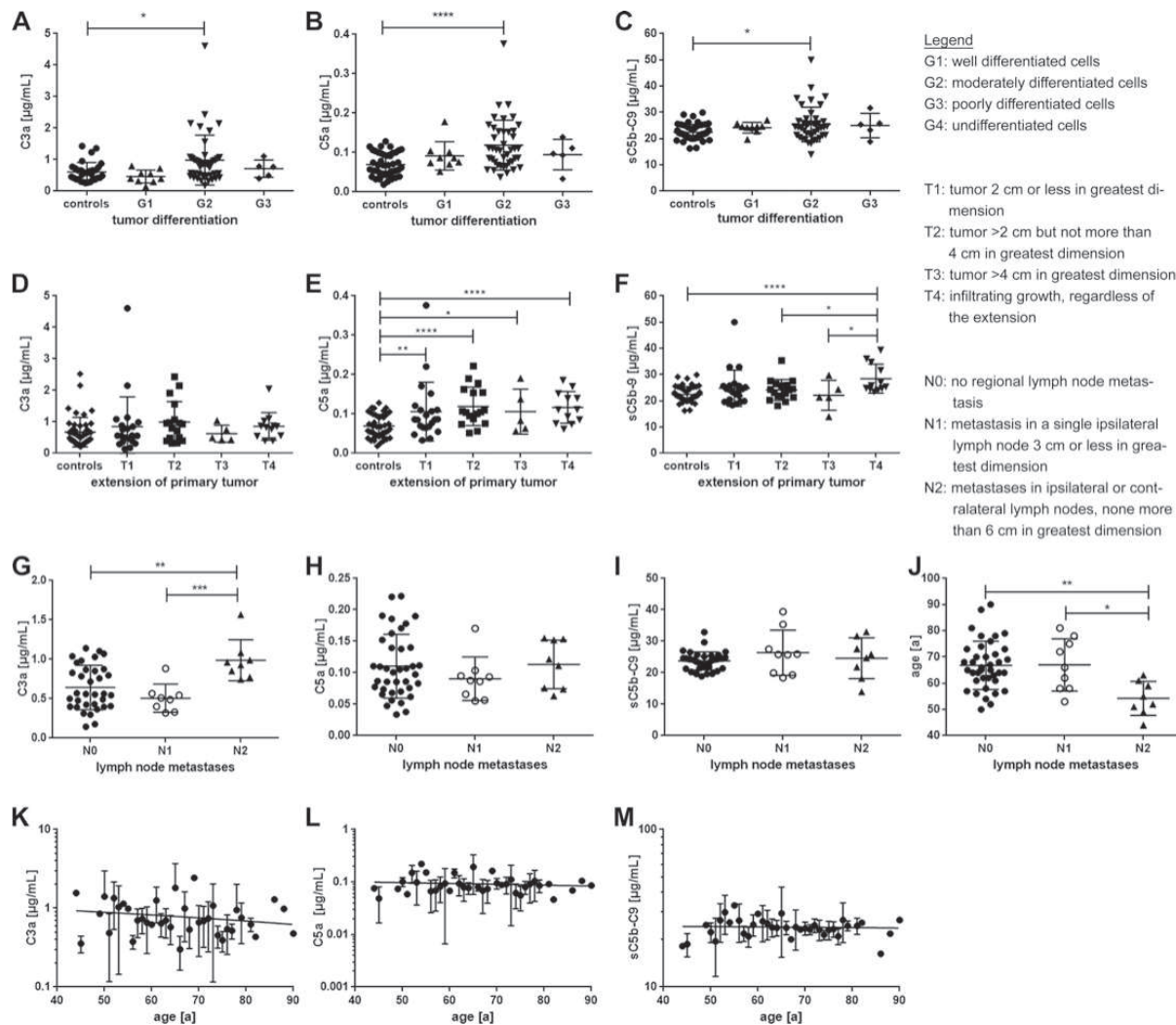


Figure 6: Complement activation markers were associated with tumor differentiation (G), tumor extension (T) and lymph node metastases (N). (A–C) The histologic grade (G) describes the cell differentiation in the patients’ tumors/ neoplasms. Patients with G2 tumor grading had significantly elevated (A) C3a, as well as (B) C5a and (C) sC5b-9 serum levels compared to the control group. (D–F) The T-classification system categorizes the extension of the patients’ primary tumors. (D) There was no relation between C3a serum levels and T-classification. (E) All tumor extension classifications (T-classifications) showed a significant increase in systemic C5a levels compared to the control group. (F) Invasive growth (T4) is associated with increased sC5b-9 serum levels compared to the control, T2 and T3 group. (G–J) The N-classification describes the degree of spread of tumor cells to regional lymph nodes. (G) C3a concentration was significantly correlated with tumor spread to lymph nodes. C3a concentration was highest in N2 classified lymph node metastases. (H, I) There was no significant correlation between complement markers C5a, sC5b-C9 and lymph node metastases. (J) Patients, that presented a N2-tumor, were significantly younger than patients with a N0 or N1 tumor. (K–M) Age was not associated with T-classification or correlated with complement activation marker concentration in serum. ($p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$ two-tailed, unpaired *t*-test).

(complement factor B) gene and protein expression compared to benign papilloma and normal human epidermal keratinocytes. A knockdown of C3 and CFB expression inhibited migration and proliferation of cSCC cells and resulted in inhibition of ERK 1/2. Moreover, knockdown of C3 and CFB markedly inhibited growth of human cSCC xenograft tumors *in vivo* [12]. Jiang *et al.* found significantly higher serum levels of complement C3 and C4 in patients suffering from myeloma bone disease with more than three osteolytic lesions compared to patients with less lesions. Moreover, C4a serum levels were significantly associated with the number of osteolytic lesions. The group demonstrated that the levels of C3, C4 and C4a were highly related to the severity of bone disease. C3 and C4 serum levels could also be significantly correlated with the percentage of osteoclast precursors and the level of bone resorption metabolites (CTX and TRACP-5b) [37]. Moreover, complement C3 has also been suggested to contribute to the secretion of prostaglandin E2 (PGE2) in aberrant immune responses during induced inflammation in mammals [38]. Furthermore, C5a has been reported to be generated in the cancer microenvironment. Cai *et al.* demonstrated the influence of the C5a-C5aR axis on the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma (NPC) *in vitro*. Here, C5a promoted proliferation of tNPC cells via PCAF-mediated STAT3 acetylation [13]. Nitta *et al.* suggest a C5a release from C5 by a cancer cell membrane-bound serine protease and thus an autocrine activation of C5aR-expressing cancer cells (bile duct, colon and cholangiocarcinoma cell lines). They showed that this activation, besides invasiveness, enhances recruitment and induction of myeloid-derived suppressor cells and neovascularization [39, 40].

The current work describes for the first time the implementation and validation of the suspension multiplex technology for a simultaneous analysis of the complement activation pattern of C3a, C5a and sC5b-9 from minimal sample volumes of human blood, aqueous humor and tear samples. Using this highly specific and reproducible assay, we identified an increased concentration of systemic C5a concentrations as a potential biomarker for OSCC tumor extension and differentiation state. We propose multiplex complement diagnostic as a feasible tool for biomarker analysis in OSCC.

MATERIALS AND METHODS

Patients and clinical data

Blood samples were obtained by venipuncture from fasting participants. The study involved adult patients examined and treated for a newly diagnosed OSCC ($n = 57$) at the Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital of Regensburg, between 2013 and 2016. All included patients had no previous treatment and underwent primary surgical resection of the oral lesion

and neck dissection based on clinical and radiologic findings. The patients had no conditions, which are known to be associated with a relevant activation of the complement system (e.g. acute infections, asthma, arthritis, inflammatory bowel disease) except diabetes or due to their history of smoking or alcohol consumption. The patient data were obtained prospectively from interview of patients or review of medical records. OSCC were staged according to the 7th Edition of American Joint Committee on Cancer (AJCC) guidelines. Corresponding to the tumor patients a matched healthy control cohort ($n = 46$) was defined. Aqueous humor was obtained during eye surgery either of open-angle glaucoma ($n = 13$) or cataract ($n = 10$) patients. Tear fluid was collected from healthy controls using Schirmer strips. For protein extraction Schirmer strips were incubated in 100 mM NH_4HCO_3 (1 h, room temperature). Subsequently, acetone was added (1 h, -20°C). The strips were removed and the tubes centrifuged (10 min, 11000 rpm). The supernatant was discarded and the remaining protein pellet was air-dried, before being dissolved in assay buffer for quantification. The protocols were approved by the University of Regensburg Ethics Committee (GeschZ 12-101-0070, 13-101-0207, 15-101-0064, 11-101-0071, 16-299-101) and written informed consent was obtained from all participants.

Proteins and antibodies

The monoclonal mouse antibody against human C3a/C3a-desArg (mAb clone 2991, cat. HM2074-IA) and the biotinylated monoclonal mouse antibody against human C3/C3a (mAb 474-biotin, cat. HM2073-BT) were obtained from Hycult Biotech (Beutelsbach, Germany). The anti-human C5a/C5a-desArg antibodies (C17/5, cat. 518202; G25/2-biotin, cat. 518306) were purchased from Biozol Diagnostica (Eching, Germany). The polyclonal rabbit anti-human sC5b-9 antibody (cat. Ab55811) was ordered from Abcam (Cambridge, United Kingdom). The goat anti-human C6 antibody (cat. A223) was obtained from Complement Technology (Tyler, TX, USA). Goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) (cat. 115035164), goat anti-rabbit IgG HRP (cat. 111035003), rabbit anti-goat IgG HRP (cat. 305035003) as well as Streptavidin-HRP (cat. 016030084) were acquired from Dianova (Hamburg, Germany).

Western blot analysis

Purified recombinant human C3a-desArg (1 μg , HC2127), C5a-desArg (1 μg , HC2102, Hycult Biotech, Beutelsbach, Germany), sC5b-9 (1 $\mu\text{g}/0.1 \mu\text{g}$, A127, Complement Technology, Tyler, TX, USA) or normal human serum (20 μg , NHS) were separated under reducing and non-reducing conditions in either 10% or 15% SDS-PAGE and subsequently transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were blocked (5%

BSA/PBST, 1 h) und then incubated with respective primary antibodies in blocking buffer (2 h, room temperature). Excess primary antibody was removed by washing the membranes with PBST. Secondary peroxidase-conjugated anti-mouse, anti-goat, anti-rabbit IgG or Streptavidin-HRP were applied in PBST with 2% skim milk. HRP-signal was developed with Lumi-Light blotting substrate (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Multiplex suspension assay

Bead-conjugation

Capture antibodies were coupled to MagPlex[®] microspheres according to the two-step carbodiimide protein coupling protocol of the manufacturer (Luminex Corp., Austin, TX, USA). Anti-C3a-desArg (1.7 µg, mAb clone 2991, bead region 18), anti-C5a-desArg (25 µg, C17/5, bead region 26) and anti-sC5b-9 (75 µg, ab55811, bead region 33) were conjugated to 1.25 million beads/region (Supplementary Table 1). Unspecific species control antibodies for mouse IgG (anti-botulinum toxin B antibody, 25 µg, bead region 55 [41]) and rabbit IgG (cat. B11-034, 75 µg, bead region 78, Gentaur, Kampenhout, Belgium) were integrated as specificity controls.

Antibody biotinylation

The goat antibody to human C6 was biotinylated according to standard procedures using Biotin-NHS (Sigma Aldrich).

Multiplex-assay

The multiplex suspension assay was performed as previously described [18]. Briefly, all assays were carried out in 96-well black clear flat bottom polystyrene microtiter plates (cat.: 3603, Corning Incorporated, New York, USA) at room temperature, protected from light and shaken at 800 rpm. 2000 antibody-labelled magnetic fluorescent microspheres per bead region were incubated with 50 µl sample in reaction buffer (human anti-mouse antibody diluent [cat. ab19396, Abcam, Cambridge, United Kingdom], 0.1 mg/mL Nafamostat Mesilate, 0.01 M EDTA) to inhibit *in vitro* complement activation and avoid anti-species interactions (2 h). A mixture of serial 1:3 diluted human native C3a-desArg (197.5–0.001 ng/mL, cat. HC2127, Hycult Biotech, Beutelsbach, Germany), human recombinant C5a-desArg (28.1–0.004 ng/mL, Hycult Biotech, Beutelsbach, Germany) and human native sC5b-9 (66.6–0.0004 µg/mL, cat. A127, Complement Technology, Tyler, TX, USA) were used as standard curve. Human serum (1:50–1:350), aqueous humor (concentrated) and tear proteins (0.5–8 mg/mL) were added as sample material. A cocktail of titrated biotinylated detection antibodies was incubated with the washed bead mixtures (1 h, Supplementary Table 1). Streptavidin-R-phycoerythrin

(SA-PE) PJRS14 (1 µg/mL in 1% BSA/PBS, Hayward, California, USA) was added for detection (30 min). Following washing, the beads were resuspended in 125 µL 1% BSA/PBS and the fluorescent signature of the beads as well as the corresponding PE-reporter signal was recorded using the Luminex Magpix system, in combination with the Bio-Plex Manager software (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany).

Assay validation

Limit of detection (LOD) was calculated by adding three standard deviations to the mean of the mean fluorescence intensities (MFI) of sixteen blanks. The lower and the upper plateaus as well as the half maximal concentrations (IC₅₀) were determined from sigmoidal fitted standard curves with a variable slope (Graphpad prism). To assess within- (intra) and between- (inter) run precision, we analysed the quality control (standardized NHS 1:50) in the linear concentration range 6-times on the same plate and same day (intra) or on different plates and different days (inter). We calculated the coefficient of variation = [(standard deviation/mean) * 100]. Specificity was determined by measuring cross-reactivity to complement factor depleted human sera (1:50, Complement technology, Tyler, TX, USA). The multiplex assay cutoffs were determined as complement concentration in the respective complement depleted sera.

Author contributions

DP, NS, RiB, MK developed concept and designed the study. DP, RiB, JG, NS, EW, ME designed experiments. JG, EW, ME, DP, ReB, RG performed experiments. JG, DP, NS, RiB, MK, analyzed and discussed data. DP, JG, RiB wrote the manuscript. GS collected the patient analyzed clinical data and collected patient sera.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to all patients who participated in this research. We thank R. Föckler, E. Eckert and A. Dannullis for technical assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

FUNDING

This study was supported by the Verein der ehemaligen Zahnmedizinstudenten Regensburg e.V. (EZR) to JG.

REFERENCES

1. Saba NF, Goodman M, Ward K, Flowers C, Ramalingam S, Owonikoko T, Chen A, Grist W, Wadsworth T, Beitler JJ, Khuri

- FR, Shin DM. Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the oral tongue, base of tongue, and tonsils: a surveillance, epidemiology and end results program-based analysis. *Oncology*. 2011; 81:12–20.
2. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65:401–21.
 3. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology*. 2016; 91:13–23.
 4. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009; 45:309–16.
 5. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Maso LD, Daudt AW, Fabianova E, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, et al. Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *JNCI*. 2007; 99:777–89.
 6. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ, Mao L. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25:2164–70.
 7. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJW, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*. 2005; 7:301–11.
 8. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016; 375:1856–67.
 9. Ajona D, Pajares MJ, Chiara MD, Rodrigo JP, Jantus-Lewintre E, Camps C, Suarez C, Bagán JV, Montuenga LM, Pio R. Complement activation product C4d in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2015; 21:899–904.
 10. Riihilä PM, Nissinen LM, Ala-aho R, Kallajoki M, Grénman R, Meri S, Peltonen S, Peltonen J, Kähäri VM. Complement factor H: a biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2014; 134:498–506.
 11. Sivadasan P, Kumar Gupta M, Sathe GJ, Balakrishnan L, Palit P, Gowda H, Suresh A, Abraham Kuriakose M, Sirdeshmukh R. Data from human salivary proteome - A resource of potential biomarkers for oral cancer. *Data Brief*. 2015; 4:374–8.
 12. Riihilä P, Nissinen L, Farshchian M, Kallajoki M, Kivisaari A, Meri S, Grénman R, Peltonen S, Peltonen J, Pihlajaniemi T, Heljasvaara R, Kähäri VM. Complement Component C3 and Complement Factor B Promote Growth of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol*. 2017; 187:1186–97.
 13. Cai K, Wan Y, Wang Z, Wang Y, Zhao X, Bao X. C5a promotes the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells through PCAF-mediated STAT3 acetylation. *Oncol Rep*. 2014; 32:2260–6.
 14. Cho MS, Vasquez HG, Rupaimoole R, Pradeep S, Wu S, Zand B, Han HD, Rodriguez-Aguayo C, Bottsford-Miller J, Huang J, Miyake T, Choi HJ, Dalton HJ, et al. Autocrine effects of tumor-derived complement. *Cell Rep*. 2014; 6:1085–95.
 15. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*. 2015; 6: 262.
 16. Morgan BP, Walters D, Serna M, Bubeck D. Terminal complexes of the complement system: new structural insights and their relevance to function. *Immunol Rev*. 2016; 274:141–51.
 17. Tudoran R, Kirschfink M. Modern complement analysis: indications, methods and outlook. *Laboratoriumsmedizin*. 2012; 36. <https://doi.org/10.1515/labmed-2012-0009>.
 18. Pauly D, Kirchner S, Stoermann B, Schreiber T, Kaulfuss S, Schade R, Zbinden R, Avondet MA, Dorner MB, Dorner BG. Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay. *Analyst*. 2009; 134:2028–39.
 19. Prohászka Z, Nilsson B, Frazer-Abel A, Kirschfink M. Complement analysis 2016: Clinical indications, laboratory diagnostics and quality control. *Immunobiology*. 2016; 221:1247–58.
 20. Schick T, Steinhauer M, Aslanidis A, Altay L, Karlstetter M, Langmann T, Kirschfink M, Fauser S. Local complement activation in aqueous humor in patients with age-related macular degeneration. *Eye*. 2017; 31:810–3.
 21. Ballow M, Donshik PC, Mendelson L. Complement proteins and C3 anaphylatoxin in the tears of patients with conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1985; 76:473–6.
 22. Bomert M, Köllisch G, Roponen M, Lauener R, Renz H, Pfefferle PI, Al-Fakhri N. Analytical performance of a multiplexed, bead-based cytokine detection system in small volume samples. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 49:1691–3.
 23. Le Guezennec X, Quah J, Tong L, Kim N. Human tear analysis with miniaturized multiplex cytokine assay on “wall-less” 96-well plate. *Mol Vis*. 2015; 21:1151–61.
 24. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest*. 2017; 127:780–9.
 25. Liu XY, Wang XY, Li RY, Jia SC, Sun P, Zhao M, Fang C. Recent progress in the understanding of complement activation and its role in tumor growth and anti-tumor therapy. *Biomed Pharmacother*. 2017; 91:446–56.
 26. Kourtzelis I, Rafail S. The dual role of complement in cancer and its implication in anti-tumor therapy. *Ann Transl Med*. 2016; 4:265–265.

27. Markiewski MM, Lambris JD. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. *Trends Immunol.* 2009; 30:286–92.
28. Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, Coukos G, Lambris JD. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol.* 2008; 9:1225–35.
29. Hakobyan S, Luppe S, Evans DR, Harding K, Loveless S, Robertson NP, Morgan BP. Plasma complement biomarkers distinguish multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler.* 2017; 23:946–55.
30. Towner LD, Wheat RA, Hughes TR, Paul Morgan B. Complement Membrane Attack and Tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2016; 291:14927–38.
31. Ravindranath NM, Shuler C. Cell-surface density of complement restriction factors (CD46, CD55, and CD59): oral squamous cell carcinoma versus other solid tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103:231–9.
32. Gelderman KA, Blok VT, Fleuren GJ, Gorter A. The inhibitory effect of CD46, CD55, and CD59 on complement activation after immunotherapeutic treatment of cervical carcinoma cells with monoclonal antibodies or bispecific monoclonal antibodies. *Lab Invest.* 2002; 82:483–93.
33. Maehara N, Arai S, Mori M, Iwamura Y, Kurokawa J, Kai T, Kusunoki S, Taniguchi K, Ikeda K, Ohara O, Yamamura KI, Miyazaki T. Circulating AIM prevents hepatocellular carcinoma through complement activation. *Cell Rep.* 2014; 9:61–74.
34. Riihilä PM, Nissinen LM, Ala-aho R, Kallajoki M, Grénman R, Meri S, Peltonen S, Peltonen J, Kähäri VM. Complement factor H: a biomarker for progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2014; 134:498–506.
35. Abbritti RV, Polito F, Cucinotta M, Lo Giudice C, Caffo M, Tomasello C, Germanò A, Aguenouz M. Meningiomas and Proteomics: Focus on New Potential Biomarkers and Molecular Pathways. *Cancer Genomics Proteomics.* 2016; 13:369–79.
36. Chen Y, Azman SN, Kerishnan JP, Zain RB, Chen YN, Wong YL, Gopinath SC. Identification of host-immune response protein candidates in the sera of human oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS One.* 2014; 9:e109012.
37. Jiang F, Liu H, Liu Z, Song J, Li L, Ding K, Ren Y, Peng F, Shao Z, Fu R. High serum levels of complements C3 and C4 as novel markers for myeloma bone disease. *Ann Hematol.* 2017; 96:331–3.
38. Lim J, Iyer A, Suen JY, Seow V, Reid RC, Brown L, Fairlie DP. C5aR and C3aR antagonists each inhibit diet-induced obesity, metabolic dysfunction, and adipocyte and macrophage signaling. *FASEB J.* 2013; 27:822–31.
39. Nitta H, Murakami Y, Wada Y, Eto M, Baba H, Imamura T. Cancer cells release anaphylatoxin C5a from C5 by serine protease to enhance invasiveness. *Oncol Rep.* 2014; 32:1715–9.
40. Piao C, Cai L, Qiu S, Jia L, Song W, Du J. Complement 5a Enhances Hepatic Metastases of Colon Cancer via Monocyte Chemoattractant Protein-1-mediated Inflammatory Cell Infiltration. *J Biol Chem.* 2015; 290:10667–76.
41. Pauly D, Dorner M, Zhang X, Hlinak A, Dorner B, Schade R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poult Sci.* 2009; 88:281–90.
42. Tao S, Haug U, Kuhn K, Brenner H. Comparison and combination of blood-based inflammatory markers with faecal occult blood tests for non-invasive colorectal cancer screening. *Br J Cancer.* 2012; 106:1424–30.
43. Nyakoe NK, Taylor RP, Makumi JN, Waitumbi JN. Complement consumption in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J.* 2009; 8:7.
44. Gu H, Mickler EA, Cummings OW, Sandusky GE, Weber DJ, Gracon A, Woodruff T, Wilkes DS, Vittal R. Crosstalk between TGF- β 1 and complement activation augments epithelial injury in pulmonary fibrosis. *FASEB J.* 2014; 28:4223–34.
45. Khan F, Pharo A, Lindstad JK, Mollnes TE, Tønnessen TI, Pischke SE. Effect of Perfusion Fluids on Recovery of Inflammatory Mediators in Microdialysis. *Scand J Immunol.* 2015; 82:467–75.
46. Dobrovolskaia MA, Patri AK, Zheng J, Clogston JD, Ayub N, Aggarwal P, Neun BW, Hall JB, McNeil SE. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine.* 2009; 5:106–17.
47. Zhang C, Li Y, Wang C, Wu Y, Cui W, Miwa T, Sato S, Li H, Song WC, Du J. Complement 5a receptor mediates angiotensin II-induced cardiac inflammation and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34:1240–8.
48. Scholl HP, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, Fritsche LG, Chong NV, Fimmers R, Wienker T, Holz FG, Weber BH, Oppermann M. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2008; 3:e2593.
49. Van Zele T, Coppieters F, Gevaert P, Holtappels G, Van Cauwenberge P, Bachert C. Local complement activation in nasal polyposis. *Laryngoscope.* 2009; 119:1753–8.
50. Soto E, Romero R, Richani K, Espinoza J, Nien JK, Chaiworapongsa T, Santolaya-Forgas J, Edwin SS, Mazor M. Anaphylatoxins in preterm and term labor. *J Perinat Med.* 2005; 33:306–13.
51. Cole L, Bellomo R, Hart G, Journois D, Davenport P, Tipping P, Ronco C. A phase II randomized, controlled trial of continuous hemofiltration in sepsis. *Crit Care Med.* 2002; 30:100–6.

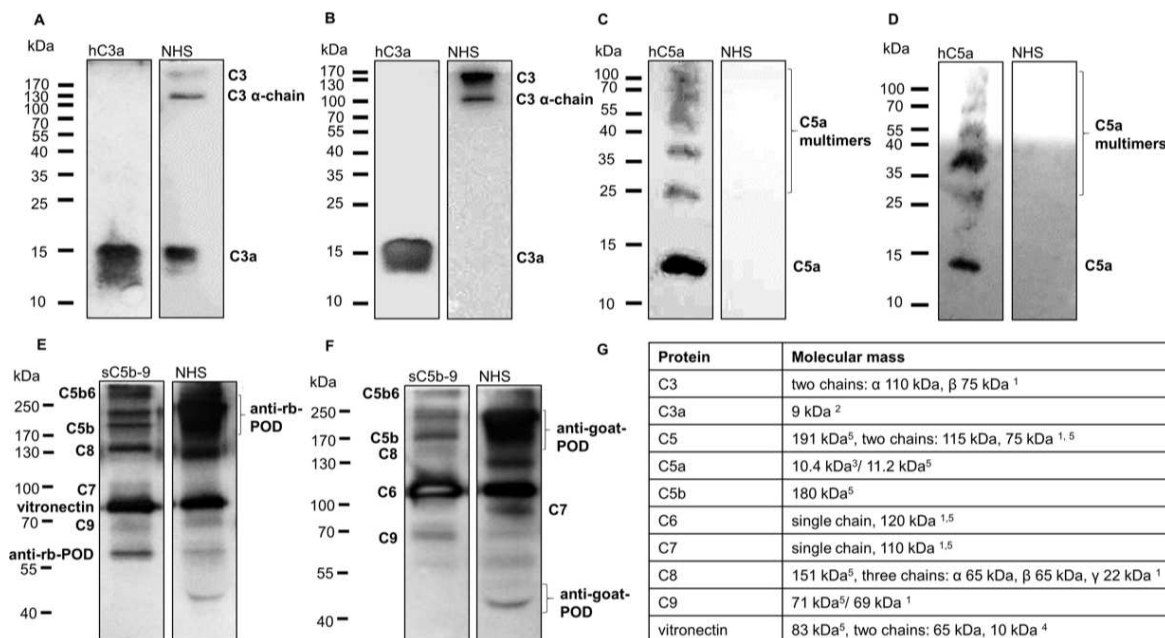
52. Sonntag J, Emeis M, Vornwald A, Strauss E, Maier RF. Complement activation during plasma production depends on the apheresis technique. *Transfus Med.* 1998; 8:205–8.
53. Sonntag J, Stiller B, Walka MM, Maier RF. Anaphylatoxins in fresh-frozen plasma. *Transfusion.* 1997; 37:798–803.
54. Rønholm E, Tomasdottir H, Runeborg J, Bengtsson A, Bengtson JP, Stenqvist O, Friman S. Complement system activation during orthotopic liver transplantation in man. Indications of perioperative complement system activation in the gut. *Transplantation.* 1994; 57:1594–7.
55. Takakuwa T, Endo S, Nakae H, Suzuki T, Inada K, Yoshida M, Ogawa M, Uchida K. Relationships between plasma levels of type-II phospholipase A2, PAF-acetylhydrolase, leukotriene B4, complements, endothelin-1, and thrombomodulin in patients with sepsis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1994; 84:271–81.
56. Haque R, Hwang BY, Appelboom G, Piazza MA, Guo K, Connolly ES. Alterations in systemic complement component 3a and 5a levels in patients with cerebral arteriovenous malformations. *J Clin Neurosci.* 2011; 18:1235–9.
57. Hecker LA, Edwards AO, Ryu E, Tosakulwong N, Baratz KH, Brown WL, Charbel Issa P, Scholl HP, Pollok-Kopp B, Schmid-Kubista KE, Bailey KR, Oppermann M. Genetic control of the alternative pathway of complement in humans and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2010; 19:209–15.
58. Mocco J, Wilson DA, Komotar RJ, Sughrue ME, Coates K, Sacco RL, Elkind MS, Connolly ES Jr. Alterations in plasma complement levels after human ischemic stroke. *Neurosurgery.* 2006; 59:28–33; discussion 28–33.
59. UniversitätsKlinikum Heidelberg: Referenzbereiche. Available 2017 Mar 22, from <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Referenzbereiche.3150.0.html>.
60. Jodele S, Fukuda T, Mizuno K, Vinks AA, Laskin BL, Goebel J, Dixon BP, Chima RS, Hirsch R, Teusink A, Lazear D, Lane A, Myers KC, et al. Variable Eculizumab Clearance Requires Pharmacodynamic Monitoring to Optimize Therapy for Thrombotic Microangiopathy after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016; 22:307–15.
61. Jodele S, Davies SM, Lane A, Houry J, Dandoy C, Goebel J, Myers K, Grimley M, Bleesing J, El-Bietar J, Wallace G, Chima RS, Paff Z, et al. Diagnostic and risk criteria for HSCT-associated thrombotic microangiopathy: a study in children and young adults. *Blood.* 2014; 124:645–53.
62. Prüfer F, Scheiring J, Sautter S, Jensen DB, Treichl R, Würzner R, Zimmerhackl LB. Terminal complement complex (C5b-9) in children with recurrent hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32:121–7.

A novel multiplex detection array revealed systemic complement activation in oral squamous cell carcinoma

SUPPLEMENTARY MATERIALS

REFERENCES

- Morgan BP. The Complement System: An Overview. In Complement Methods and Protocols edited by P. B. Morgan, Method in molecular Biology, Humana Press. 2000; 150:1–13.
- Bokisch VA, Dierich MP, Muller-Eberhard HJ. Third component of complement (C3): structural properties in relation to functions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975; 72:1989–93.
- Turner N, Nolasco L, Nolasco J, Sartain S, Moake J. Thrombotic Microangiopathies and the Linkage between von Willebrand Factor and the Alternative Complement Pathway. Semin Thromb Hemost. 2014; 40:544–50.
- Preissner KT, Seiffert D. Role of Vitronectin and Its Receptors in Haemostasis and Vascular Remodeling. Thromb Res. 1998; 89:1–21.
- Muller-Eberhard HJ. The Membrane Attack Complex of Complement. Annu Rev Immunol. 1986; 4:503.



Supplementary Figure 1: Capture and detection antibodies for the multiplex assay detected human complement proteins. (A–F) Normal human serum (NHS), (A, B) purified human C3a-desArg, (C, D) human C5a-desArg or (E, F) sC5b-9 were separated under non-reducing conditions either in a (A, B, C, D) 15% or (E, F) 10% SDS-PAGE. Western blot detection was performed using the corresponding antibodies for the multiplex assay (A) capturing C3a/C3a-desArg (mAb 2991), (B) detecting C3/C3a (mAb 474-biotin), (C) capturing C5a/C5a-desArg (C17/5), (D) detecting C5a/C5a-desArg/C5 (G25/2-biotin), (E) capturing sC5b-9 (Ab55811) and (F) detecting C6 (A223-biotin). (G) Corresponding molecular weights for complement proteins are listed [¹Morgan PB 2000; ²Bokisch VA *et al.* 1975; ³Turner N *et al.* 2014; ⁴Preissner KT *et al.* 1998; ⁵Müller-Eberhard HJ 1986].

Supplementary Table 1: Main characteristics of finalized multiplex complement activation marker assay

	Detection of C3a	Detection of C5a	Detection of sC5b-9
Bead region	13	26	33
Capture antibody	mouse anti-C3a mAb clone 2991 3.4 µg/mL	mouse anti-C5a C17/5 50 µg/mL	rabbit anti-C5b-9 Ab55811 150 µg/mL
Detection antibody	mouse anti-C3a mAb 474-biotin 2 µg/mL	mouse anti-C5a G25/2-biotin 2 µg/mL	goat anti-C6 A223-biotin 1 µg/mL
LOD	0.04 ng/mL	0.03 ng/mL	18.96 ng/mL
Lower plateau of the standard curve	<1.2 pg/mL (15 MFI)	<0.2 pg/mL (19 MFI)	<40 pg/mL (34 MFI)
Upper plateau of the standard curve	>325 ng/mL (3600 MFI)	>524 ng/mL (14000 MFI)	>136 µg/mL (1900 MFI)
IC ₅₀	0.7 ng/mL	0.5 ng/mL	0.15 µg/mL
Intraassay variance	5.4%	2.9%	6.4%
Interassay variance	11.3%	9.2%	18.2%
Cut-off	0.09 µg/mL	0.01 µg/mL	2.47 µg/mL

Characteristic numbers for multiplex setup:

¹Limit of detection (LOD) is three standard deviations above the mean fluorescence intensity of sixteen replicates of the zero standard in the assay; ²For intraassay variance six duplicated samples were measured on the same plate in one single run. Coefficient of variation = [(standard deviation/mean)*100]; ³For interassay variance six runs on duplicate samples were performed on different days and plates. Coefficient of variation = [(standard deviation/mean)*100]; ⁴Cutoff was determined as complement concentration in the respective complement depleted serum.

Supplementary Table 2: OSCC and control cohort

	OSCC	controls
Total	57	46
Mean age [a]	65	67
Age range [a]	44–90	45–86
Male	40 (70%)	37 (80%)
Female	17 (30%)	9 (20%)
Diabetes*	11 (20%)	15 (33%)
Positive anamnesis smoking	41 (72%)	36 (78%)
Positive anamnesis alcohol consumption	37(65%)	35 (76%)
Mean BMI [kg/m ²]	25.93	27.79
Mean C3a [µg/mL]	0.87	0.68
Mean C5a [µg/mL]	0.11	0.07
Mean sC5b-9 [µg/mL]	25.22	22.47

*Type I and II.

8. Danksagung

Danken möchte ich PD Dr. Richard Bauer für seine tatkräftige Unterstützung und vor allem für die bemerkenswerte Betreuung als Doktorvater, als auch für die Finalisierung der Publikation. Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Dr. Diana Pauly für ihre hervorragende und intensive Betreuung, sowohl bei experimentellen, als auch bei theoretischen Aspekten. Ohne ihre investierte Zeit und Energie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dank gilt auch Nicole Schäfer, die mir stets mit Rat zur Seite stand. Außerdem möchte ich mich bei den technischen Assistentinnen Andrea Dannulis, Elfriede Eckert und Regine Föckler für das geduldige Einlernen und die sehr harmonische Zusammenarbeit bedanken. Danke an Dr. Gerrit Spanier, der die Blutproben sammelte und die klinischen Daten erhob.

Großer Dank richtet sich auch an meine drei Schwestern Charlotte, Alexandra und Caroline, sowie an meine Eltern Ruth und Dr. Uwe Gallenkamp. Vielen Dank für eure Unterstützung und familiären Rückhalt.

Schließlich möchte ich noch meinem lieben Partner Simon Lebek für die Ermutigung und Motivation in allen Phasen dieser Arbeit und weit darüber hinaus danken. Du bist stets für mich da und ein sehr wichtiger Teil meines Lebens.

Juliane Gallenkamp