

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

**Identifikation, Analyse und Bewertung von microRNAs als potentielle
diagnostische Marker im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Dr. med. Julius Peter Moratin
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2017

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Christian Linz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ralf Bargou

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2018

Der Promovend ist Arzt und Zahnarzt

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	1
1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC)	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	2
1.1.3 Präkanzerosen	4
1.1.4 Klassifikation und Staging.....	7
1.1.5 Diagnostik	10
1.1.6 Therapie.....	12
1.2 MicroRNA	15
1.2.1 Definition und Grundlagen	15
1.2.2 Biosynthese und Funktion.....	16
1.2.3 Funktion von miRNAs in Tumoren.....	18
1.3 Gewebequellen und Verfahren zur Analyse von miRNAs	21
1.4 Untersuchte miRNA	22
1.5 Zielsetzung der Studie	25
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Verwendete Tumorproben	26
2.2 Probengewinnung	27
2.3 RNA-Isolation.....	29
2.4 Synthese von cDNA	31
2.5 Semiquantitative Real Time PCR	32
2.6 Auswertung der Daten	34
2.6.1 Delta-Delta-Ct-Methode	34
2.6.2 Statistik.....	35

3	ERGEBNISSE	36
3.1	Patientenkollektiv	36
3.2	Tumorgröße und –lokalisierung	38
3.3	Tumorstadien	39
3.4	Spektralphotometrische Vermessung der gewonnenen RNA	40
3.5	PCR-Daten / miRNAs	42
3.6	Korrelationsanalyse	45
3.6.1	Korrelation der miRNAs mit Alter und Geschlecht	45
3.6.2	Korrelation der miRNAs mit der Tumorlokalisierung	48
3.6.3	Korrelation der miRNAs mit der Tumorgröße	50
3.6.4	Korrelation der miRNAs mit dem TNM-Stadium	52
3.6.5	Korrelation der Primer mit dem Grading der Tumoren	57
4	DISKUSSION	58
4.1	miRNA-Expression in Tumor- und gesundem Gewebe	58
4.1.1	Überexpression im Tumor	58
4.1.2	Unterexpression im Tumor	60
4.2	Korrelation von miRNAs mit klinischen und pathologischen Daten	62
4.3	Studiendesign und –durchführung	66
4.4	Eignung von miRNAs als Tumormarker	68
4.5	Schlussfolgerung	70
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	EIGENE VERÖFFENTLICHUNG	73
7	LITERATURVERZEICHNIS	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
Abb.	Abbildung
bspw.	beispielsweise
cDNA	Copy-DNA
Ca	Karzinom
CI	Konfidenzintervall
Cis	Carcinoma in situ
CUP	Cancer of Unknown Primary
DGMKG	Deutsche Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
dsRBD	Double-stranded RNA-binding domain
EGFR	Epithelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
et al.	Et alii
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs)
HPV	Humanes Papillomvirus
miRNA	microRNA
mi-RNP	micro-Ribonukleoproteinkomplex
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
OSF	orale submuköse Fibrose
pre-miRNA	precursor MicroRNA
pri-miRNA	primary MicroRNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
PECA	Plattenepithelkarzinom

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p_{fy}	p aus dem exakten Test nach Fisher & Yates
p_{kw}	p aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis
p_{mp}	p aus dem exakten Test nach Mehta und Patel
p_U	p aus dem U-Test nach Mann und Whitney
(mi-)RISC	(micro-)RNA-induced silencing complex
s.	siehe
s.o.	siehe oben
ST	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
tau	Korrelationskoeffizient tau
UICC	Union internationale contre le cancer

1 EINLEITUNG

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC)

Das Plattenepithelkarzinom (PECA) stellt mit über 90 % die häufigste Tumorentität im Kopf-Hals-Bereich dar (HNSCC) [1]. Hierbei handelt es sich um maligne Tumoren, die sich von den Epithelien ableiten (ektodermale Tumoren), oder aber durch metaplastische Prozesse aus nicht-epithelialen Geweben hervorgehen können. Sie neigen zu lokal destruierendem Wachstum sowie zur Bildung von Metastasen. Im Kopf-Hals-Bereich lokalisierte Plattenepithelkarzinome neigen häufig zur Entwicklung von sog. lokoregionären Metastasen im Bereich der ableitenden Lymphbahnen und seltener bzw. im späteren Verlauf zur Ausbildung von Fernmetastasen [2, 3].

1.1.1 Epidemiologie

Mit einem Anteil von ca. 6 % ist das HNSCC die weltweit sechsthäufigste Gruppe maligner Tumoren mit einer Neuerkrankungsrate von über 500.000 Patienten pro Jahr [4-6]. Die Zahl der Neuerkrankungen an einem PECA im Bereich der Mundhöhle und des Rachens lag in Deutschland im Jahr 2010 für Männer bei 9340 und für Frauen bei 3490. Das entspricht etwa 3,7 % aller hierzulande neu aufgetretenen Karzinome.

Die 5-Jahres-Überlebensrate lag zu diesem Zeitpunkt trotz moderner multimodaler Therapiekonzepte durchschnittlich zwischen 44 (Männer) und 55 (Frauen) Prozent, wobei ein niedriges Tumorstadium mit einer deutlich erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit vergesellschaftet ist. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen dem 5. und 7. Lebensjahrzehnt [7, 8].

Verantwortlich für die hohe Mortalität sind in vielen Fällen die Entwicklung von lokoregionären oder Fern-Metastasen sowie häufig inoperable Lokalrezidive mit erhöhter Resistenz gegenüber Chemo- oder Strahlentherapie [9].

Neben der bestehenden Gefahr, an der Erkrankung zu versterben, ist insbesondere der gravierende Einschnitt im Bereich der Lebensqualität der Betroffenen und deren sozialen Umfeld zu berücksichtigen. Sowohl die Erkrankung an sich, als auch die Therapie, bringen starke Beeinträchtigungen der Organfunktion und der Ästhetik im Kopf-Hals-Bereich mit sich [10-12].

Dies kann eine dauerhafte Unfähigkeit der peroralen Aufnahme von Nahrung oder Flüssigkeit sowie den völligen Verlust der Sprechfähigkeit mit sich bringen. Krankheitsbedingte sowie postoperative Veränderungen der Atemwege im Bereich der Mundhöhle sowie des Pharynx machen außerdem bei manchen Patienten die Anlage eines dauerhaften Tracheostomas notwendig, was sich wiederum negativ auf die Lebensqualität auswirkt. Zusätzlich zeigen sich eine hohe Co-Inzidenz an Depressionen und eine gegenüber anderen Tumorarten deutlich erhöhte Suizidrate bei Patienten, die an einem Kopf-Hals-Karzinom erkrankt sind [13, 14].

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Theorien zur Entstehung von HNSCC gehen von einer multifaktoriellen Genese aus. Hierbei spielen sowohl genetische Faktoren als auch exogene Noxen eine Rolle [15].

Den größten Einfluss hat der Genuss von Tabakrauch und Alkohol, wobei der gemeinsame Konsum das Risiko für die Entstehung eines Karzinoms um ein Vielfaches (bis zu 30fach) erhöht [16-19]. Insgesamt können ca. 75 % der oralen Plattenepithelkarzinome auf die beiden genannten Risikofaktoren zurückgeführt werden [18, 20].

Da die Ausschaltung besagter exogener Noxen zu einer signifikanten Verringerung des Erkrankungsrisikos führt, kommt der präventiven Aufklärung gefährdeter Patienten eine wichtige Rolle zu [19].

Virale Infektionen, insbesondere mit Humanen Papillomaviren des Serotyps 16 sind ebenfalls potentielle Krankheitsauslöser und werden ursächlich mit ca.

22% der PECAs im Kopf-Hals-Bereich generell und mit bis zu 70% der im Oropharynx lokalisierten Tumoren in Verbindung gebracht [9, 21, 22]. Diese vor allem sexuell übertragbare Infektion führt seit einigen Jahren zu einem Anstieg der Inzidenz oraler PECAs bei jungen Patienten unter dem 50. Lebensjahr, die ansonsten keine klassischen Risikofaktoren aufweisen. Typischerweise wird das Tumorsuppressorgen p53 durch Proteine viraler Onkogene (v.a. HPV-E6 und HPV-E7) inaktiviert und führt so zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Karzinoms [23]. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit Tumoren einer solchen viralen Genese ist hierbei im Vergleich als besser einzuschätzen [21, 24-26].

Auch die Ernährung hat Einfluss auf das Erkrankungsrisiko. So wurde auf der einen Seite eine Erhöhung der Erkrankungswahrscheinlichkeit durch einseitige Ernährung v.a. mit Fleisch und gebratenem Essen nachgewiesen. Andererseits scheint sich eine ausgewogene mediterrane Ernährung mit Augenmerk auf Zitrusfrüchte und frischem Gemüse diesbezüglich günstig auszuwirken [27-29].

Hinsichtlich endogener Faktoren ist in erster Linie das Alter des Patienten ausschlaggebend. Mit zunehmendem Alter steigt durch die Anhäufung von DNS-Schäden generell das Risiko einer Karzinomentwicklung. Zum anderen bedingt das Lebensalter auch eine erhöhte Expositionsdauer gegenüber exogenen Noxen wie bspw. Tabak und Alkohol. Das individuelle Risiko ein Karzinom zu entwickeln ist multifaktoriell und individuell verschieden.

Aufgrund der biologischen und genetischen Heterogenität der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs ist auf molekularer Ebene eine Vielzahl von Faktoren an ihrer Entstehung beteiligt. Vor allem zu erwähnen sind hier die Transkriptionsfaktoren p53 und NF- κ B, die eine Schlüsselrolle bei der Regulation von zellulärer Proliferation, Apoptose, Entzündung und Therapieresistenz von Tumoren einnehmen [30-32].

Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 wurden bei bis zu 50% aller soliden humanen Tumore beobachtet und NF- κ B beeinflusst unter anderem Entzündungsreaktion, Angiogenese sowie die Invasivität von Tumoren [33-35].

Weitere Faktoren wie AP1, STAT3, EGR1, CEBPB, SP1, Retinoblastomgen (Rb) oder epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) tragen ebenfalls zu Entstehung und Verlauf von HNSCC bei und sind teilweise am p53- bzw. NF- κ B-Pathway beteiligt [9, 35-38].

1.1.3 Präkanzerosen

Die Entstehung oraler Plattenepithelkarzinome vollzieht sich häufig in einem zweistufigen Prozess über die Entwicklung sog. Präkanzerosen.

Unter diese Bezeichnung von Haut- und Schleimhautveränderungen fallen insbesondere die orale Leukoplakie, die Erythroplakie und der Lichen ruber planus [39].

Während so genannte fakultative Präkanzerosen nur in einem bestimmten, meist geringen Prozentsatz der Fälle tatsächlich zur Entwicklung eines Karzinoms führen, geht man bei sog. obligaten Präkanzerosen von einer nahezu 100-prozentigen Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung aus.

Die häufigste prä-maligne orale Läsion ist die Leukoplakie. Sie ist definiert als weißlicher, nicht abwischbarer Fleck auf der Schleimhaut, der keiner anderen Pathologie zugeordnet werden kann und stellt eine fakultative Präkanzerose dar [40]. Anhand morphologischer Kriterien können sie in homogene und inhomogene Leukoplakien unterteilt werden. Studien zeigten, dass 16 – 62% der oralen Plattenepithelkarzinome mit dem Auftreten von Leukoplakien vergesellschaftet sind, wobei die jährliche maligne Transformationsrate ca. 1 - 2,6 % beträgt.

Die Läsionsgröße sowie die Morphologie haben für das Transformationsrisiko hierbei den größten prädiktiven Wert [41-44]. Das Auftreten von Leukoplakien ist bei regelmäßigem Konsum von Tabak und Alkohol deutlich erhöht [44-46].



Abbildung 1: Beispiel einer inhomogenen Leukoplakie der Wangenschleimhaut (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg)

Abzugrenzen von der Leukoplakie ist die Erythroplakie, die analog als rote, klinisch oder histopathologisch nicht anders einzuordnende maculäre Läsion definiert ist und ein sehr hohes malignes Transformationspotential aufweist [39]. Eine weitere prä maligne Läsion ist der orale Lichen ruber planus, wobei hier nur in ca. 1% der Fälle mit einer Karzinomentwicklung gerechnet werden muss. Man geht inzwischen von einer autoimmunen Genese aus, wobei kombinierte intra- und extraorale Manifestationen des Lichen ruber planus häufig sind. Es lassen sich verschiedene morphologische Manifestationsformen wie der retikuläre, der atrophische oder der erosive Lichen ruber planus unterscheiden [39, 47].



Abbildung 2: Beispiel eines retikulären Lichen ruber planus (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg)

Die orale submuköse Fibrose (OSF) wird ebenfalls zu den oralen Präkanzerosen gerechnet. Sie zeigt eine geographische Häufung im südostasiatischen Raum und wird ursächlich vor allem mit dem Kauen von Betelnüssen in Verbindung gebracht. Die OSF weist eine jährliche maligne Transformationsrate von ca. 0,8 % auf [39].

Obligate orale Präkanzerosen treten insgesamt seltener auf, sind allerdings häufig zum Diagnosezeitpunkt bereits maligne entartet. Hierunter fällt beispielsweise der Morbus Bowen sowie die Erythroplakie.

Für die klinische Routine gilt, dass jede länger als zwei Wochen bestehende Schleimhautveränderung tumorverdächtig ist und zeitnahe Abklärung mittels Biopsie bedarf.

Generell wird empfohlen, besagte Läsionen regelmäßig zu inspizieren und bei Größenprogredienz sowie bei Zeichen progressiver dysplastischer Entwicklung zu entfernen [39]. Hierfür stehen verschiedene Verfahren wie chirurgische Exzision oder Therapie mittels Laser zur Verfügung [48].

Man unterscheidet anhand des Dysplasiegrades eine niedriggradige, mäßiggradige und hochgradige intraepitheliale Neoplasie. Einer hochgradigen intraepithelialen Neoplasie entspricht hierbei der frühere Begriff des Carcinoma in situ (Cis) [48].

1.1.4 Klassifikation und Staging

Die Einteilung maligner Tumoren im Kopf-Hals-Bereich wird anhand der sog. TNM-Klassifikation nach Denoix durchgeführt. Hierbei werden die Tumorgöße (T), der Befall regionärer Lymphknoten (N) und etwaige Fernmetastasen (M) bewertet. Die TNM-Klassifikation wird seit 1950 von der UICC (Union internationale contre le cancer) weitergeführt und regelmäßig überarbeitet. Mit ihrer Hilfe wird das sog. „Tumorstaging“ durchgeführt, das als Grundlage der Therapieplanung dient [49]. Durch klinische und radiologische Untersuchungen erfolgt somit prätherapeutisch die Festlegung eines klinischen Tumorstadiums, gekennzeichnet durch die Kodierung cTNM. Postoperativ wird nach pathologischer Untersuchung das pathologische Tumorstadium mit der Kodierung „pTNM“ festgelegt.

Aktuelle TNM-Klassifikation für Karzinome der Mundhöhle

Tabelle 1: T-Klassifikation für Karzinome der Mundhöhle [49]

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 2cm in größter Ausdehnung und maximal 5mm Eindringtiefe
T2	<ul style="list-style-type: none"> • ≤ 2cm in größter Ausdehnung und 5 bis 10mm Eindringtiefe • Tumor 2cm bis 4cm in größter Ausdehnung und maximal 10 mm Eindringtiefe
T3	Tumor > 4cm in größter Ausdehnung oder >10mm Eindringtiefe
T4a	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, äußere Zungenmuskulatur (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Proc. pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 2: N-Klassifikation für Karzinome der Mundhöhle [49]

Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für Befall regionärer Lymphknoten
N1	Ipsilateral solitäre Lymphknotenmetastase ≤ 3cm, ohne extranodale Ausbreitung
N2a	Lymphknotenmetastase ipsilateral, solitär 3 bis 6cm, ohne extranodale Ausbreitung
N2b	Lymphknotenmetastasen ipsilateral multipel ≤ 6cm, ohne extranodale Ausbreitung
N2c	Lymphknotenmetastasen bi- bzw. kontralateral ≤ 6cm, ohne extranodale Ausbreitung
N3a	Lymphknotenmetastasen > 6cm, ohne extranodale Ausbreitung
N3b	Metastase(n) in einem einzelnen oder multiplen Lymphknoten mit extranodaler Ausbreitung

Tabelle 3: M-Klassifikation maligner Tumoren [49]

Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 4: R-Klassifikation maligner Tumoren [49]

Rx	Vorhandensein von Residualtumor nicht beurteilbar
R0	Kein Residualtumor vorhanden
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Die sog. R-Klassifikation gibt den Resektionsstatus an und ist relevant für den weiteren Behandlungsverlauf sowie die Prognose. Hierbei erfolgt durch den beurteilenden Pathologen eine Einteilung des Resektionsstatus in R0 (Resektion in sano), R1 (Resektion mikroskopisch non in sano) oder R2 (Resektion makroskopisch non in sano) vorgenommen.

Des Weiteren erfolgt beim sog. „Grading“ eine Unterscheidung des Differenzierungsgrades der Tumorzellen in hoch (G1), mäßig (G2) und niedrig (G3) differenziert, wobei sowohl eine höheres TNM-Stadium als auch ein höheres Grading generell mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sind [50, 51].

Anhand der sog. UICC-Klassifikation lassen sich HNSCC in 4 Stadien gruppieren (s. Tab. 5). Diese dienen der Einteilung der betroffenen Patienten in möglichst homogene Gruppen bezüglich Krankheitsverlauf und Prognose. Die Gruppenzuordnung erfolgt hierbei mithilfe der TNM-Klassifikation.

Tabelle 5: Stadieneinteilung nach UICC [49]

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N1	M0
	T1, T2, T3		M0
Stadium IVa	T4	N0, N1	M0
	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
Stadium IVb	Jedes T	N3	M0
	T4b	Jedes N	M0
Stadium IVc	Jedes T	Jedes N	M1

1.1.5 Diagnostik

Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms orientieren sich an regelmäßig aktualisierten Behandlungsleitlinien. Diese werden durch die beteiligten Fachbereiche und deren Organisationsorgane, so z.B. die Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie (DGMKG) erstellt und verwaltet [48]. In verschiedenen abgestuften Graden werden hier Empfehlungen für die Durchführung von Diagnostik und Therapie gegeben, welche sich auf die jeweils beste aktuell verfügbare wissenschaftliche und klinische Evidenz stützen.

Die Prognose von Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen wird maßgeblich vom Zeitpunkt der Diagnosestellung beeinflusst [52, 53]. Da Tumoren im Anfangsstadium häufig vom Patienten selber unbemerkt bleiben, kommt der regelmäßigen Inspektion der gesamten Mundschleimhaut durch den behandelnden Zahnarzt oder Hausarzt eine wichtige Rolle bei der Früherkennung prämaligener Läsionen zu. Dies gilt insbesondere bei Vorliegen von bekannten Risikofaktoren [48].

Befunde, die eine sofortige Überweisung zu einem Spezialisten nach sich ziehen sollten sind beispielsweise [48]:

- Vorliegen eines Schleimhautdefekts bzw. –ulcus ohne klar erkennbare Ursache sowie bei Persistenz nach Ursachenbeseitigung (z.B. Druckstellen einer Zahnprothese oder Schleimhautverletzungen durch scharfe Zahn- oder Restaurationskanten)
- Weiße oder rote Flecken der oralen Schleimhaut
- Unklare Schwellungen, Fremdkörpergefühl, Schmerzen oder Blutungen
- Schluck- oder Sprechschwierigkeiten sowie verminderte Zungenbeweglichkeit
- Unklare Zahnlockerung oder Veränderung der Okklusion

Ein klinisch suspekter Befund wird mittels Probeexzision und histopathologischer Untersuchung (Mikroskopie, Zytologie, Immunhistochemie) gesichert. Dies dient außerdem der Therapieplanung, da auf diese Weise Informationen über Invasivität, Differenzierungsgrad etc. erhalten werden.

Neben der klinischen Untersuchung kommt der bildgebenden Diagnostik eine große Bedeutung im Rahmen des sog. Tumor-Stagings (Tumorausbreitungsdiagnostik) zu.

Neben der Panorama-Schichtaufnahme dient die Sonographie v.a. zum Screening auf Metastasierung im Bereich der Halslymphknoten. Zur Beurteilung der lokalen Tumorausdehnung, zur Bestimmung des T-Stadiums sowie zur Therapieplanung wird im Allgemeinen eine CT oder MRT des Kopf-Hals-Bereichs durchgeführt [54, 55].

Eine PET-CT (Positronen-Emissions-Tomographie) kann bei der Detektion unerkannter Zweitkarzinome, Rezidive sowie von Lymphknoten- oder Fern-Metastasen hilfreich sein. Sie erbringt allerdings keinen Mehrwert für die Darstellung der Ausdehnung bereits detektierter Tumore [48, 56].

Gemäß aktueller Leitlinie soll zum Ausschluss eines in bis zu 10 - 20% der Fälle vorliegenden synchronen Zweitkarzinoms eine Hals-Nasen-Ohrenärztliche panendoskopische Untersuchung des oberen Aerodigestivtraktes durchgeführt werden [48].

Bei fortgeschrittenen Karzinomen erfolgt zum Ausschluss ausgedehnter Lymphknoten- bzw. Fernmetastasierung eine CT des Oberkörpers einschließlich des Thorax [48, 57].

1.1.6 Therapie

Die Therapie des Mundhöhlenkarzinoms folgt einem interdisziplinären Ansatz sowie den Empfehlungen der aktuellen Leitlinie. Im Rahmen eines Tumorboards unter Einbeziehung verschiedener Fachbereiche wie Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, Hämatonkologie, Radiologie und Strahlentherapie, Pathologie sowie Hals-Nasen-Ohrenheilkunde erfolgt die Therapieplanung. Als prinzipielle Therapieoptionen mit kurativem Ansatz gelten eine primär alleinige chirurgische Therapie oder eine Kombination aus chirurgischer Therapie und adjuvanter oder neoadjuvanter Radio- und/oder Chemotherapie.

Eine alleinige Chemo- bzw. Radio-Chemotherapie dient nur als palliativer Behandlungsansatz.

Die Wahl der Therapieform richtet sich generell nach Lage und Stadium des Primärtumors unter Berücksichtigung des Allgemeinzustands des Patienten. Ziel hierbei ist nach Möglichkeit das Erzielen einer lokalen Tumorfreiheit bzw. –kontrolle bei möglichst geringer funktioneller und ästhetischer Beeinträchtigung des Patienten. Die entstehenden Resektionsdefekte werden daher, wenn möglich und sinnvoll in der gleichen Operation verschlossen bzw. rekonstruiert. Hierfür stehen je nach Defektgröße und –lokalisierung mehrere Verfahren bzw. Techniken zur Verfügung. Während kleine Defekte häufig primär verschlossen oder mittels lokaler Verschiebelappenplastiken sowie autologer Voll- oder Spalthaut-Transplantate gedeckt werden können, stehen für ausgedehnte Rekonstruktionen aufwendigere Verfahren und Techniken zur Verfügung. Hierzu zählen muskelgestielte Lappenplastiken wie z.B. der myokutane Pectoralis Major-Lappen und die Transplantation freier mikrovaskulär reanastomosierter autologer Transplantate, z.B. vom radialen Unterarm, der Skapula sowie dem Ober- oder Unterschenkel [58-62].

Ziel der chirurgischen Therapie ist eine R0-Resektion des Tumors, da sich anderenfalls die Prognose drastisch verschlechtert [63, 64].

Ein weiterer integraler Bestandteil der chirurgischen Therapie ist außerdem die stadiengerechte zervikale Lymphadenektomie. Hierbei werden die

Halslymphknoten im an die Mundhöhle angrenzenden Lymphabstromgebiet operativ entfernt. Studien zeigen, dass auch bei klinisch und in der Bildgebung unauffälligem zervikalem Befund in 20 - 40% okkulte Metastasen nachgewiesen werden können [65, 66]. Dies betrifft je nach Lage des Primärtumors insbesondere die oberen Lymphknotenstationen des submandibulären, submentalen sowie jugulären Bereichs (Level I-III nach Robbins, s. Abb. 3), da diese als oberste Drainagestation häufig als erstes von Metastasen aus dem Bereich der Mundhöhle und des Oropharynx betroffen sind [48]. Aufgrund der erwähnten hohen Rate an okkulten Metastasen wird unabhängig vom T-Stadium eine elektive Neck-Dissection der oberen Lymphabflusswege empfohlen [48]. In Abhängigkeit des Vorliegens oder Fehlens des klinischen Verdachtes einer bereits stattgefundenen Metastasierung im Bereich der zervikalen Lymphknoten, unterscheidet man die elektive (prophylaktische) von der kurativen Neck-Dissection.

Hinsichtlich des Resektions-Ausmaßes wird die selektive von der radikalen Neck-Dissection unterschieden. Während bei der selektiven Neck-Dissection nur die regionären Lymphabflusswege in einem definierten Gebiet entfernt werden, erfolgt bei der radikalen Neck-Dissection zusätzlich die Resektion benachbarter anatomischer Strukturen wie der Vena jugularis interna, des Musculus sternocleidomastoideus sowie des Nervus accessorius [48].

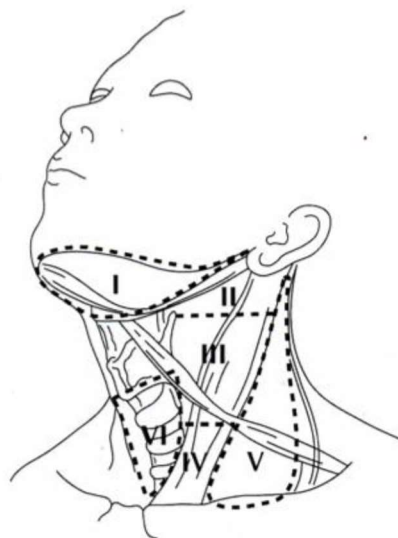


Abbildung 3: Einteilung der zervikalen Lymphknotenlevel nach Robbins [67]

Bei Karzinomen mit höherem Tumorstadium (T3, T4) zeigte sich bei alleiniger chirurgischer Therapie eine erhöhte Rezidivneigung, sodass für diese Tumoren eine kombinierte chirurgische und strahlentherapeutische Behandlung empfohlen wird (in der Regel als adjuvante Strahlentherapie). Hierbei wird meist eine Gesamtstrahlendosis von ca. 70 Gy (Gray) in Einzeldosen á 1,8-2 Gy perkutan verabreicht [48]. Durch den Einsatz der sog. intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) kann eine gute lokale Tumorkontrolle bei vergleichsweise geringer Beeinträchtigung durch strahlenbedingte Schäden des umgebenden Gewebes erreicht werden [68].

Neben chirurgischer Resektion und Bestrahlung bildet die Chemotherapie den dritten Pfeiler des multimodalen Therapiekonzeptes zur Behandlung oraler Plattenepithelkarzinome. Sie wird in der Regel als kombinierte adjuvante oder neoadjuvante Radio-/Chemotherapie mit Platinderivaten wie Cis- oder Carboplatin sowie mit 5-Fluorouracil durchgeführt und bringt gegenüber der alleinigen Strahlentherapie eine deutliche Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) [69-72]. Die für die Tumorthherapie relevante Wirkung besteht in einer Sensibilisierung des Tumorgewebes für die simultan oder in Folge durchgeführte Bestrahlung durch Beeinflussung des Zellzyklus sowie durch Verminderung der Strahlenresistenz in Hypoxiearealen [71, 73-75]. Neben der klassischen zytostatischen Therapie stehen im Rahmen der sog. „targeted therapy“ für verschiedene Tumorentitäten alternative Substanzen zur gezielten Beeinflussung tumorspezifischer Stoffwechselprozesse zur Verfügung und werden auch am HNSCC auf ihre klinische Effektivität überprüft [38, 76, 77]. So wurde für die Therapie durch den EGFR (*Epidermal-Growth-Factor-Receptor*)-Antagonisten *Cetuximab* in Kombination mit einer Strahlentherapie ebenso eine Erhöhung der 5-JÜR nachgewiesen wie für die Stoffklasse der Taxane [72, 78, 79].

1.2 MicroRNA

1.2.1 Definition und Grundlagen

MicroRNAs (miRNAs) sind ca. 19-25 Nukleotide lange, nicht proteincodierende, einzelsträngige RNAs, die eine grundlegende Rolle im Bereich der Genregulation und insbesondere des posttranskriptionalen Gen-Silencing spielen [80, 81].

Erstmals wurde die miRNA *lin-4* im Jahr 1993 aus dem Genom des Nematoden *Caenorhabditis elegans* von Lee et al. isoliert und beschrieben. Die heute aktuelle Nomenklatur und Kodierung stammt aus dem Jahr 2001 [82, 83]. miRNAs existieren in allen bekannten Lebensformen, wobei sich Anzahl, Synthese und Funktion der miRNAs sowie der beteiligten Enzyme stark unterscheiden [84].

Man geht heute davon aus, dass bis zu 70% des humanen Genoms durch miRNAs reguliert werden und beinahe jeder zelluläre Stoffwechselprozess wie Zellwachstum und –differenzierung, Proliferation und Apoptose durch sie beeinflusst wird [9, 80, 81, 85-87].

Jede miRNA kann die Expression von bis zu 500 Genen regulieren und ca. 60% der humanen mRNAs (Messenger RNA) weisen Sequenzen auf, die mit einer oder mehreren miRNA interagieren können [88-90]. Analysen haben gezeigt, dass ein einzelnes Gen häufig Ziel von verschiedenen miRNAs ist und dass diese bei der Genregulation interagieren können [88, 89, 91, 92]. Die Anzahl an bekannten miRNA-Sequenzen im humanen Genom steigt stetig und liegt zum Zeitpunkt dieser Arbeit bei über 3700 [93].

1.2.2 Biosynthese und Funktion

Die Synthese von miRNAs erfolgt über mehrere Vorläufer-Moleküle, sog. pri-miRNAs (Primary MicroRNA) mit einer Länge von ca. 300-5000 Nukleotiden. Diese werden durch die Enzyme RNA-Polymerase II oder III aus dem Genom transkribiert [94]. Die Lage der verantwortlichen Gene innerhalb des Genoms ist variabel. Neben unabhängigen miRNA-Genen wurden auch verschiedenste Intron- und Exon-Regionen als Ursprung diverser miRNAs identifiziert, wobei eine einzelne pri-miRNA häufig Sequenzen unterschiedlicher miRNAs enthält [81, 95].

Die im Zellkern transkribierte pri-miRNA bildet eine charakteristische Haarnadelstruktur. Sie wird zunächst durch die RNase-III-Enzyme „Drosha“ (auch „RN3“) und „Dicer“ zu einer circa 70 Nukleotide langen pre-miRNA (Precursor MicroRNA) prozessiert [96]. Beide Enzyme bilden hierbei funktionelle Komplexe mit Proteinen, die Bindungs-Domänen für doppelsträngige RNA aufweisen (dsRBDs) [97].

Die entstandene doppelsträngige pre-miRNA wird nun durch das Ran-GTP (Ran-Guanosin triphosphat) -abhängige Enzym „Exportin 5“ aus dem Zellkern in das Zytoplasma überführt [98]. Hier erfolgt eine weitere Prozessierung durch „Dicer“ in Verbindung mit einem sog. „TAR RNA binding protein“ (TRBP) zu RNA-Doppelstrang-Molekülen mit einer Länge von circa 20 Nukleotiden. Nach Spaltung der Doppelstrangstruktur durch die „Helikase“ dient meist der Einzelstrang mit dem 5'-Terminus am thermodynamisch instabilen Duplex-Ende als reife miRNA, während der komplementäre Strang degradiert wird.

Nach erfolgter Biosynthese bilden die miRNAs Ribonukleoproteinkomplexe, sog. „micro-RNPs“ (miRNPs) oder „miRNA-induced-silencing-complex“ (miRISC). Essentiell hierfür sind die sog. „Argonauten-Proteine“ (AGO). Bei Säugetieren sind 4 Argonauten-Proteine (AGO1 – AGO4) bekannt [81].

miRISC ist der ausführende Proteinkomplex des miRNA-Pathways und verantwortlich für Erkennung, Bindung und Degradation der Ziel-mRNA [99].

Bislang sind zwei Mechanismen des mRNA-Silencing bekannt:

- Besteht eine vollständige Komplementarität der Basen zwischen mRNA und miRNA, induziert *RISC* den Abbau der mRNA durch endonukleolytische Enzyme.
- Bei unvollständiger Basenpaarung kommt es zu einer Inhibition der Translation oder zu einer Deadenylation der mRNA und somit ebenfalls zur Degradation [81, 100].

Unabhängig davon welcher der beiden Fälle eintritt, ist das Ergebnis eine Verringerung der Menge des Translationsproduktes der betroffenen mRNA [99].

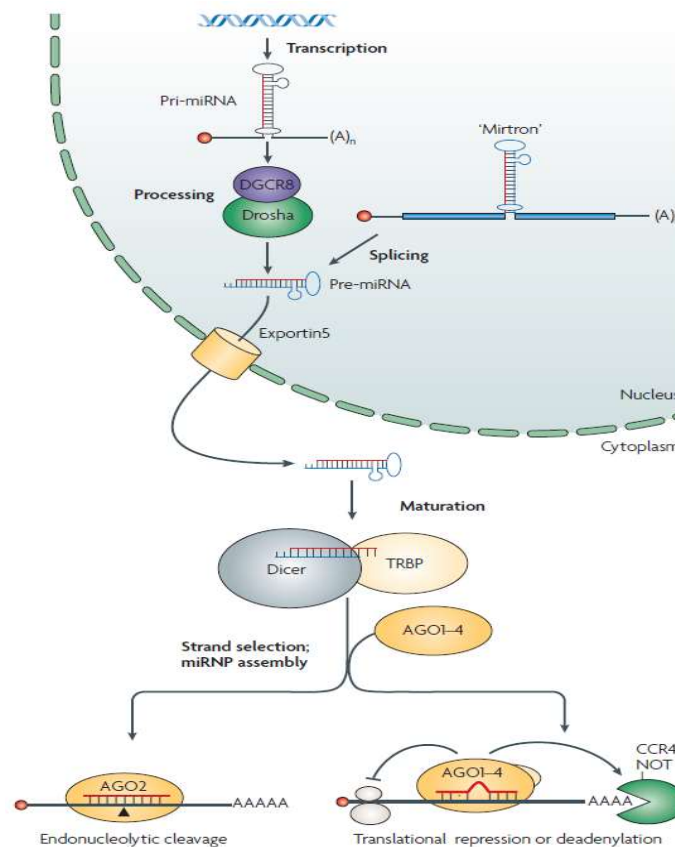


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Biosynthese und Funktion der miRNA [81]

1.2.3 Funktion von miRNAs in Tumoren

Neben den bereits erwähnten „klassischen“ Onkogenen wie z.B. p53 und NF- κ B sind in den letzten Jahren auch miRNAs in den Fokus der Tumorforschung gerückt. So wurde bei der Genese unterschiedlichster Tumoren eine hochgradige gegenseitige Beeinflussung diverser miRNAs und den jeweiligen Onkogenen sowie den zugehörigen Signalwegen nachgewiesen [101-103]. Yan et al. zeigten einen Überlappungsgrad von bis zu 88% der durch p53, NF- κ B und ausgewählte miRNAs beeinflussten Gene bei HNSCC-Zelllinien und somit einen starken Einfluss auf die sog. Zellwächterfunktion von p53 [9, 35].

MiRNAs können hierbei sowohl die Rolle von Onko- (z.B. mir21, mir22, miR-335), als auch die von Tumorsuppressorgenen übernehmen. Ein Beispiel für letzteres ist die mir34ac-Familie, die in der Lage ist Apoptose, Zellzyklus-Arrest bzw. Seneszenz zu induzieren und ein direktes Ziel-Gen von p53 darstellt (s. Abb. 5) [9, 35, 103]. MiRNA-Expressionsprofile zeigen hierbei eine weit höhere Spezifität für den jeweiligen Tumor als beispielsweise mRNAs [104].

In HPV-positiven Läsionen am Gebärmutterhals wurde beispielsweise eine verringerte Expression von miR-34 nachgewiesen, was auf den Einfluss des viralen Proteins HPV-E6 zurückgeführt wird. Selbes wurde für miR-218 gezeigt [105, 106]. Ji et al. zeigten an Pankreas- und Magenkarzinomzellen mit verringerter p53-Aktivität eine Verminderung des Tumor-Zellwachstums sowie eine erhöhte Apoptoserate nach Wiederherstellung der Aktivität von miR-34 [107, 108]. Ähnliche Effekte ließen sich für miR-181a/b am humanen Gliom nachweisen [109].

Auch die für den Verlauf einer Karzinomerkrankung ausschlaggebende Tendenz zur Metastasierung wird durch miRNAs beeinflusst. So zeigten Xu et al. eine positive Korrelation des Expressionsniveaus von mir25 mit dem Grad der Lymphknoten-Metastasierung sowie des TNM-Stadiums bei Ösophagus-Karzinomen. Es wurde des Weiteren nachgewiesen, dass mir25 direkt die Expression des Adhäsionsfaktors E-Cadherin, einem wichtigen Suppressor der Metastasierung inhibiert [110].

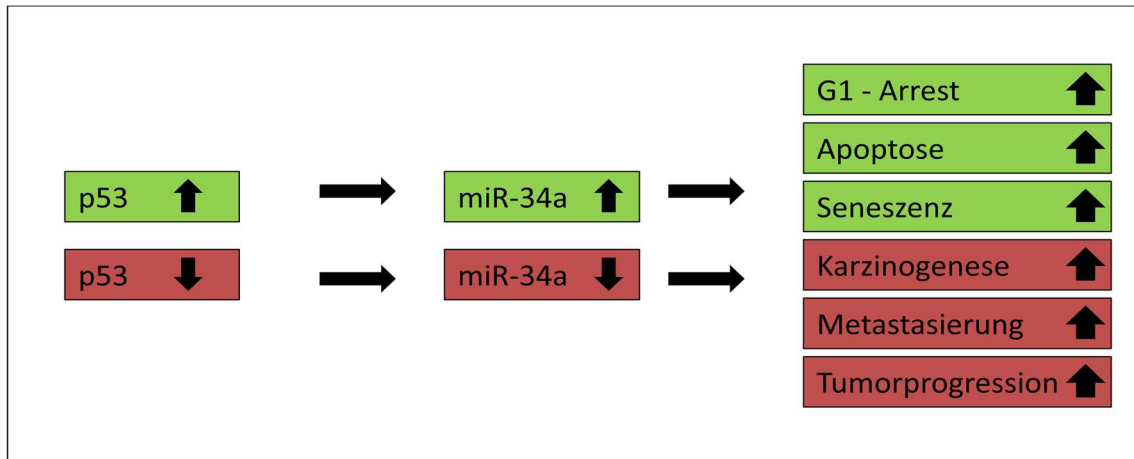


Abbildung 5: Beeinflussung der Zellwächterfunktion durch p53 und miR-34a nach Coordes et al. [9]

MiRNAs, die über eine Förderung der Expression von E-Cadherin die Invasivität und Metastasierungsneigung von Karzinomen bremsen sind im Gegensatz dazu bei vielen Tumoren vermindert [9, 111]. Die mir200-Familie hat über eine Verringerung der sog. Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) eine bremsende Wirkung auf die Entstehung von Metastasen. So konnte im Tierexperiment von Lo et al. eine Hemmung der Metastasierungsneigung von Karzinomen durch Überexpression von mir200c nachgewiesen werden [112].

Auch die für den Verlauf einer Karzinomkrankung relevante Sensibilität bzw. Resistenz gegen Chemotherapeutika und Strahlentherapie wird durch miRNAs beeinflusst. Ji et al. zeigten, dass experimentelle Überexpression von miR-203 zu einer deutlichen Erhöhung des zytotoxischen Effektes von Paclitaxel und einem Anstieg der Apoptoserate bei p53-defizienten Colonkarzinomen führte [113].

Die potentielle Eignung als Tumormarker wurde inzwischen für einige miRNAs bewiesen. So zeigten Eisfeld et al. eine negative Beeinflussung des Krankheitsverlaufes akuter myeloischer Leukämien (AML) durch eine hohe Expression von miR-3151 und damit deren Bedeutung als unabhängiger prognostischer Faktor des klinischen Outcomes der betroffenen Patienten [114].

Auch in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region wurden bereits diverse MiRNAs in ihrer Rolle als Onkogene oder Tumorsuppressoren beschrieben. miR-205 wurde in mehreren Studien genannt, wobei sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Funktionen beschrieben wurden.

Während Mao et al. einen positiven Zusammenhang zwischen miR-205-Expression und Proliferation sowie Invasivität im Nasopharynxkarzinom nachweisen konnten, beschreiben Hezova et al. die tumorsuppressive Funktion der gleichen Sequenz im Ösophaguskarzinom [115, 116]. MiR-1 und miR-133a sind beide häufig im HNSCC supprimiert und unterliegen wahrscheinlich einem gemeinsamen Aktivierungsmechanismus. Während miR-1 die Expression des Genes TAGLN2 beeinflusst und somit Einfluss auf Metastasierung und Invasivität nimmt, interagiert miR-133a mit den Genen CAV1 und GSTP1. Diese sind häufig in diversen Malignomen überexprimiert und gelten als wichtige Onkogene [117-119]. Auffällig ist hierbei die Nennung diverser miRNAs im Zusammenhang mit vielen unterschiedlichen Tumorentitäten und Stoffwechselprozessen, wobei für die gleichen Sequenzen sowohl tumorsuppressive als auch –fördernde Funktionen beschrieben werden.

Yu et al. konnten bei ihrer Studie einen Zusammenhang der Expressionsniveaus von miR-21, miR-23a und miR-214 mit der Chemoresistenz bzw. –sensitivität von Mundhöhlenkarzinomen gegenüber Cisplatin nachweisen und diese auch durch Antagonisierung der entsprechenden miRNAs beeinflussen [120]. Hess et al. zeigten in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der Expression verschiedener miRNAs (u.a. miR-146a, miR-125b, miR-200b) und dem Gesamtüberleben in Patientengruppen mit unterschiedlichen systemischen Therapieregimen bei fortgeschrittenen HNSCC [121].

1.3 Gewebequellen und Verfahren zur Analyse von miRNAs

Aufgrund der bereits erwähnten ubiquitären Verbreitung von miRNAs in nahezu allen Körpergeweben und -flüssigkeiten, wurden bislang verschiedenste Gewebequellen sowie Verfahren zur Extraktion beschrieben. So werden bspw. Tumorgewebe aber auch Blut- oder Speichelproben zur Analyse herangezogen [122, 123]. Die Analysemethoden umfassen u. a. Verfahren der DNA-Sequenzierung auf der Basis von Microarrays sowie den direkten Nachweis durch reverse Transkription und PCR (Polymerase Chain Reaction) [124-128].

Da einige Autoren von einer relativ kurzen Halbwertszeit der vergleichsweise kleinen Moleküle aufgrund der Gefahr der Degradation durch im Blut vorhandene RNasen ausgehen, werden häufig frische oder gefrorene Gewebe zur Expressionsanalyse herangezogen [125, 129]. Dies bedeutet jedoch einen hohen zeitlichen und logistischen Aufwand, da die Untersuchung schnell erfolgen muss, um den erwähnten enzymatischen Abbau zu vermeiden.

Eine Alternative hierzu stellt die Verwendung von formalin-fixierten in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (FFPE) dar [129]. Diese Standard-Konservierungsmethode für histopathologische Gewebepreparate wird seit langer Zeit angewendet und eröffnet somit den Zugang zu großen Mengen von gut konserviertem Probenmaterial. Es konnte bereits eine gute Vergleichbarkeit der Expressionsdaten aus frischen und gefrorenen sowie aus FFPE-Proben demonstriert werden [130, 131].

1.4 Untersuchte miRNA

In einer vorbereitenden Studie wurden mithilfe von Affymetrix Genchip Arrays® (Affymetrix, Inc., Santa Clara, USA) die Expressionslevel von 843 miRNAs in sieben unterschiedlichen Zelllinien untersucht (s. Tab. 6). Hierbei handelte es sich um fünf Plattenepithelkarzinom-Zelllinien (Larynx, Mundhöhle und Hypopharynx) sowie um zwei Proben mit gesunden Keratinozyten und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen).

Die 31 miRNAs, die das höchste Expressionsniveau bzw. die größte Expressionsdifferenz zwischen gesunden und Karzinom-Zelllinien aufwiesen wurden für die hier beschriebene Studie ausgewählt (s. Tab. 7). Abbildung 6 zeigt exemplarisch das Expressionsniveau von 5 miRNAs (x-Achse) in den jeweiligen Zelllinien.

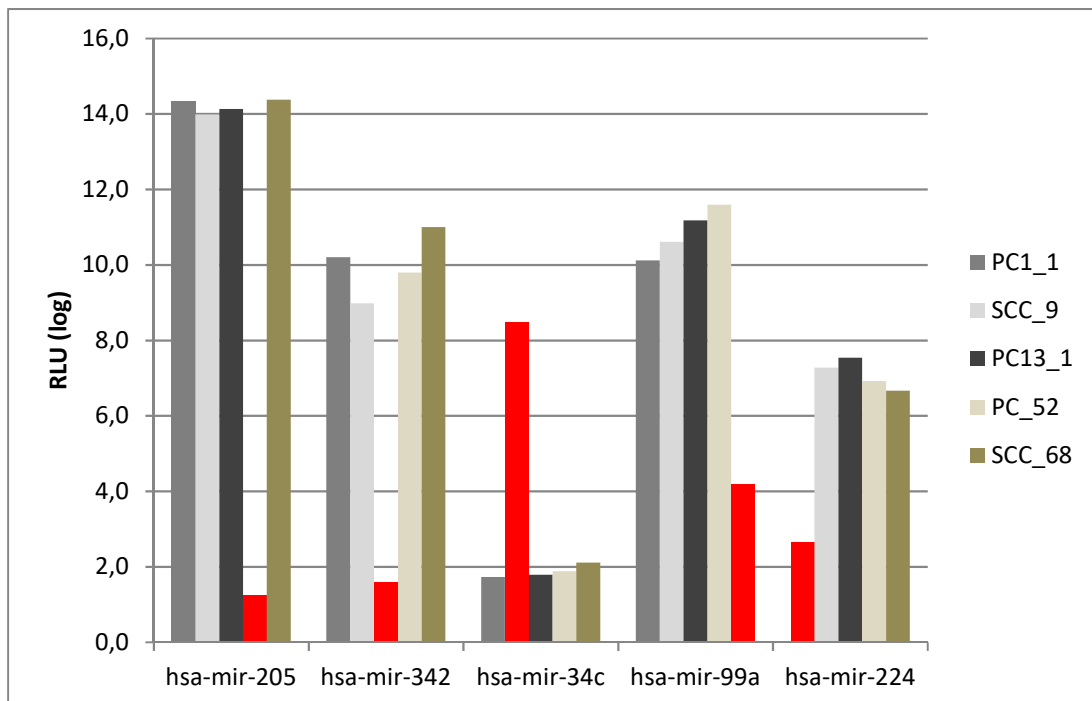


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Expressionsniveaus 5 ausgewählter miRNAs (die hinsichtlich der Expression jeweils am stärksten abweichende Zelllinie wurde rot markiert)

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Nummer	Codierung	Gewebe	Stadium
1	PC1-1	Glottisches Larynxkarzinom, männlicher Patient	pT2N0M0G2
2	SCC9	Zungengrundkarzinom, männlicher Patient	pT4N3M0G2
3	PC13-1	Mundhöhlenkarzinom, retromolar	pT4pN1M0G3
4	PC52	Karzinom der aryepiglottischen Falte, männlicher Patient	pT2N0M0G2
5	SCC68	Karzinom der Zunge, männlicher Patient	pT4N0M0G1
6	HeLa	Keratinocyten-Zelllinie	Gesunde Kontrollprobe
7	HEK	Humane embryonale Nierenzelllinie	Gesunde Kontrollprobe

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien und das jeweilige TNM-Stadium der Tumorzelllinien.

Tabelle 7: Verwendete miRNAs

Primer-Nr.	miRNA	Primer-Nr.	miRNA
1	miR-589_2	16	miR-3654_1
2	miR-194*_2	17	miR-4458_1
3	miR-194-1	18	miR-3156_1
4	miR-184_1	19	miR-4449_1
5	miR-224_1	20	miR-4786-5p_1
6	miR-193a-5p_1	21	miR-663b_2
7	miR-125b-2*_1	22	miR-210_1
8	miR-146a_1	23	miR-3176_1
9	miR-105*_1	24	miR-212_1
10	miR-105_2	25	miR-3687_1
11	miR-767-5p_1	26	miR-342_1
12	miR-141_1	27	miR-99*_1
13	miR-200a_1	28	miR-224*_2
14	miR-200b*_1	29	miR-34c_1
15	miR-200c_1	30	mirR205*_1

Tabelle 7 zeigt eine Auflistung der für die Untersuchung ausgewählten miRNAs.

1.5 Zielsetzung der Studie

Aufgrund des nachgewiesenen Einflusses von miRNAs auf die Entstehung und die Progression von Tumoren unterschiedlichster Art liegt die Vermutung nahe, dass veränderte Expressionsmuster verschiedener miRNAs als Biomarker für Diagnose, Prognose und Therapieüberwachung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich genutzt werden können.

In dieser Studie werden daher 30 miRNAs aus in Paraffin konservierten Excisaten von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx sowie aus gesundem Gewebe isoliert und ihre Expression mittels semiquantitativer Real Time PCR untersucht. Mithilfe der sog. $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode und der Verwendung des Standardgens *Actin β* soll die Vergleichbarkeit der verschiedenen Tumorproben gewährleistet werden.

Parallel erfolgt eine Erhebung erkrankungsrelevanter Patientendaten wie Erkrankungsalter, Geschlecht und Tumorstadium zur statistischen Analyse eventueller Korrelationen mit den Expressionsniveaus der verschiedenen miRNAs.

Des Weiteren soll validiert werden, ob FFPE-Proben auch nach einer mehrjährigen Lagerungszeit als Quelle für die Extraktion von miRNAs genutzt werden können. Als Standardverfahren zur Gewebekonservierung im Rahmen histopathologischer Aufarbeitung gewährleistet die Konservierung in Paraffin eine große Menge an breit verfügbaren Proben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Tumorproben

Für die Studie wurden 43 in Paraffinblöcke eingebettete Resektate von Tumoren verwendet, die im Zeitraum der Jahre 2000 bis 2003 an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie oder der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität Würzburg entnommen worden waren. Einschlusskriterium war das Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle oder des Oropharynx.

Anatomisch zählen zur Mundhöhle hierbei Mundboden, Zunge, Alveolarkamm mit Gingiva, harter Gaumen und die Mucosa vestibularis. Der Oropharynx beinhaltet weichen Gaumen, Tonsillen und Zungengrund.

Kutane Plattenepithelkarzinome wurden ebenso wie Basalzellkarzinome von der Studie ausgeschlossen. Eine Probe wurde nachträglich wegen des Vorliegens eines synchronen Zweitmalignoms ausgeschlossen.

Nach Identifikation geeigneter Proben wurden diese anhand der ihnen zugeordneten Laufnummer aus dem Archiv des Pathologischen Institutes der Universität Würzburg gesammelt und nach Begutachtung durch Mitarbeiter der Pathologie zur weiteren Bearbeitung in das Forschungslabor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg gebracht.

Aufgrund des zeitlichen Intervalls zwischen Tumorentnahme und Studienbeginn war für die Durchführung der Studie kein Votum des Ethikkomitees der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg oder die Einholung des Einverständnisses der betroffenen Patienten erforderlich.

2.2 Probengewinnung

Zunächst wurden die betreffenden Paraffinblöcke sowie die dazugehörigen HE-Schnitte von Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg mikroskopisch untersucht und der Tumor zur genauen Abgrenzung vom umgebenden gesunden Gewebe farblich auf dem HE-Schnitt markiert (s. Abb. 7).



Abbildung 7: Verwendetes FFPE-Präparat mit zugehörigem HE-Schnitt

Durch eine Mikrodissektion erfolgte dann die Trennung des Karzinoms vom gesunden Gewebe innerhalb des Paraffinblocks.

Anschließend wurden mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom CUT 4060, Ralf W. Weinkauf, Medizin und Umwelttechnik, Ahornweg 4a, 91301 Forchheim) zwischen drei und fünf Schnitte mit einer Dicke von je 10 µm angefertigt, welche getrennt nach enthaltenem Gewebe (Tumor bzw. gesundes Gewebe) in Eppendorfgefäßen konserviert wurden.

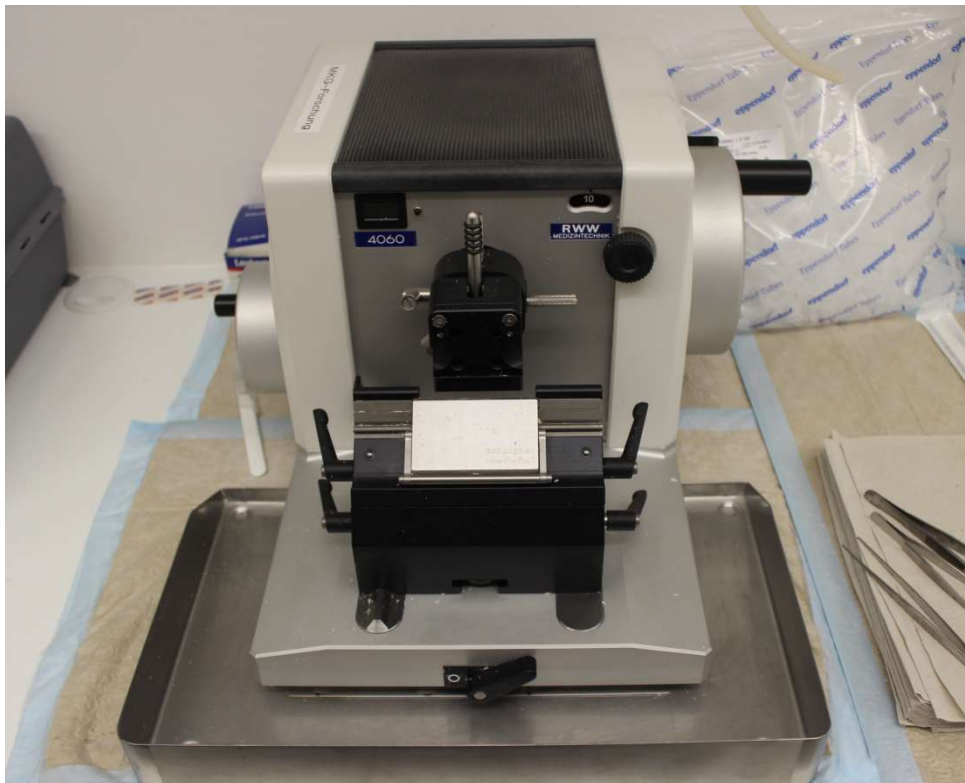


Abbildung 8: Verwendetes Mikrotom

2.3 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde nach der sog. Phenol-Chloroform-Methode durchgeführt, das Protokoll richtete sich zu großen Teilen nach einer Studie von Xi et al. Hierbei wurde die MicroRNA-Expression in Proben kolorektaler Karzinome nach Paraffin-Einbettung untersucht [132].

Zum Herauslösen des Paraffins wurden die angefertigten Schnitte zunächst mit 1ml (Milliliter) *Xylene* (Dimethylbenzen) pro Eppendorfgefäß versetzt. Die Lösung wurde 5 Minuten im Vortex suspendiert und danach 3 Minuten bei 60°C inkubiert. Schließlich folgte eine Zentrifugation bei 14 000 rpm (rounds per minute) für 7 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml Ethanol 96% zur Reinigung hinzugefügt. Nach erneuter Suspension und Zentrifugation erfolgten zwei weitere Waschgänge mit Ethanol nach oben genanntem Prinzip. Zur Entfernung der Ethanol-Spuren wurde das Gewebe-Pellet für 3 Minuten an der Raumluft getrocknet.

Anschließend wurden je Gefäß 360 µl Digestion Buffer (3 ml ImTRiSpH8, 5 ml 20% SDS, 750 mg EDTA) und 40 µl Proteinase K (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend für 3 Stunden bei 56°C gelagert um dem Enzym Zeit für den Verdau der Zellstruktur zu geben.

Nach Ablauf der Wartezeit wurden 800 µl Trizol LS® Reagent (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien) hinzu pipettiert und die Lösung für 5 Minuten im Vortex suspendiert.

Anschließend folgten die Zugabe von 100 µl *BCP* (1-bromo-3-chlorpropane), sowie eine weitere Durchmischung im Vortex für 2 Minuten und Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten. Die folgende Zentrifugation wurde mit 14000 rpm für 7 Minuten bei 4°C durchgeführt. Im Folgenden wurden 600 µl der oberen, wässrigen Phase zur Weiterverwendung abgenommen und der Rest verworfen. Nach der Zugabe von 600 µl Isopropanol erfolgte eine Fällung für 60 Minuten bei - 20°C.

Anschließend wurde die Suspension erneut für 7 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml Ethanol 96 % gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation nach oben genanntem Schema wurde das RNA-Pellet für 5 Minuten an der Raumluft getrocknet und anschließend zur spektralphotometrischen Vermessung mit 30 µl RNase-freiem destilliertem Wasser versetzt.

Die Messung erfolgte mit einem NanoDrop 2000c-Spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington DE, USA).

Nach durchgeführter Vermessung folgte die Lagerung bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung.

2.4 Synthese von cDNA

Zur Durchführung der PCR-Untersuchung war es notwendig, die isolierte RNA in cDNA (Copy-DNA) umzuschreiben. Dies erfolgte mithilfe des „QuantiTect Rev. Transcription Kit®“ von Qiagen® (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande).

Hierzu wurde zunächst für jede Probe anhand der spektralphotometrisch bestimmten RNA-Konzentration diejenige Menge der Lösung errechnet, die genau 1 µg RNA enthält. Die so bestimmte Menge wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Es folgte die Zugabe der für die cDNA-Synthese notwendigen Reagenzien:

- 4 µl HiFlex Puffer®
- 2 µl 10x miScript Nucleics Mix®
- 2 µl miScript RT Mix® (Reverse Transkriptase)
- Ergänzen auf insgesamt 20 µl Probenvolumen mit RNase-freiem Wasser

Die so erstellte Lösung wurde für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die thermische Deaktivierung der beteiligten Enzyme im Wasserbad bei 95°C für 5 Minuten. Den so erstellten 20 µl cDNA wurden schließlich noch 830 µl RNase-freies Wasser zugesetzt.

Die synthetisierte cDNA wurde danach ebenso wie die restliche RNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.5 Semiquantitative Real Time PCR

Die Untersuchung mittels semiquantitativer Real-Time-PCR erfolgte mit sog. 96-Well-Mikrotiterplatten unter Verwendung des „miScript® SYBR® Green PCR Kit“ von Qiagen® (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) und einem Light Cycler (CFX96 Real-Time PCR Detection System, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) unter Verwendung der zugehörigen aktuellen Manager Software.

Pro Probe wurde je eine Mikrotiterplatte verwendet. Pro Well wurde ein Probenvolumen von 25 µl angesetzt (23,5 µl RNA-Master-Mix, 1,5 µl spezifischer miRNA-Primer). Insgesamt wurden pro Probe und Mikrotiterplatte 68 Wells zur Messung der miRNAs und des Standardgens benötigt. Aus Sicherheitsgründen wurde bei jedem Durchgang genug Reaktionslösung („Master-Mix“) für 76 Wells hergestellt.

Das Ansetzen der benötigten Lösung erfolgte in einem frischen Eppendorfgefäß nach folgendem Schema:

- 646 µl cDNA-Lösung
- 950 µl Quantitect SYBR Green Master Mix®
- 190 µl miScript Universal Primer®

Daraufhin wurde ein Volumen von jeweils 23,5 µl der erzeugten Lösung in 76 Wells der entsprechenden Mikrotiterplatte pipettiert.

Anschließend erfolgte nach festem Schema die Zugabe von jeweils 1,5 µl spezifischem Primer in immer zwei benachbarte Wells (s. Tab 8).

Tabelle 8: Pipettierschema der 96 Well Mikrotiterplatten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
B	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
C	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18
D	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
E	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30
F			Act β	Act β								
G												
H												

Nach Vorbereitung der Mikrotiterplatte erfolgte die Durchführung der PCR. Die verwendeten Primer stammten ebenfalls von der Firma Qiagen® (s.o.).

Bei einer PCR werden die zu vervielfältigende Ausgangs-DNS, ein oder mehrere spezifische Primer, Nukleotide zur DNS-Synthese sowie die dazu notwendigen Enzyme in ein Reaktionsgefäß pipettiert.

Die PCR selbst läuft in Zyklen ab, wobei in jedem Zyklus die enthaltene DNS verdoppelt wird. Der Thermocycler in dem die Reaktion abläuft, reguliert die Temperatur während des Replikationsvorganges spezifisch für jeden Reaktionsschritt. Während der DNS-Duplikation erfolgt eine kontinuierliche Fluoreszenz-Messung der Reaktionslösung. Der Zyklus in dem das Fluoreszenzsignal erstmals messbar über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt wird im sog. Ct-Wert (engl. „Cycle Threshold“, dt. Schwellenwert-Zyklus) angegeben.

2.6 Auswertung der Daten

2.6.1 Delta-Delta-Ct-Methode

Ziel der Studie war die Identifizierung von Expressionsunterschieden der genannten miRNAs zwischen Tumor- und gesundem Gewebe. Hierzu mussten die jeweils gemessenen PCR-Daten einer „Relativen Quantifizierung“ unterzogen werden. Dies geschah mithilfe der sog. $\Delta\Delta$ -Ct-Methode (Delta-Delta-Ct-Methode).

Hierbei wird die Expression des untersuchten Zielgens (hier der 30 miRNAs) auf ein nicht reguliertes, stabil exprimiertes Referenzgen („Standard-Gen“, hier Actin β) bezogen und durch Differenzbildung der beiden Ct-Werte der sog. Delta-Ct-Wert berechnet. Die Differenz aus den jeweiligen Delta-Ct-Werten der „Tumor“- und der „Gesund“-Probe ergibt wiederum den Delta-Delta-Ct-Wert. Der Expressionsunterschied des Zielgens zwischen den beiden untersuchten Proben als Faktor (sog. x-Fold oder Fold-Change, FC) lässt sich durch die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnen [133].

Ein Faktor >1 bedeutet hierbei, dass der untersuchte Primer im Tumorgewebe in einer höheren Konzentration vorlag als in der gesunden Vergleichsprobe, im Falle eines Faktors <1 gilt das Gegenteil.

$\Delta Ct:$	$Ct^{\text{Standard}} - Ct^{\text{Probe}}$
$\Delta\Delta Ct:$	$\Delta Ct^{\text{Tumor}} - \Delta Ct^{\text{Gesund}}$
Faktor:	$2^{-\Delta\Delta Ct}$

Abbildung 9: Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode

2.6.2 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Erfassung der Patientendaten wie Alter, Geschlecht, Tumorgröße, -stadium und -lokalisation. Anschließend wurden die Expressionsniveaus der einzelnen Primer bestimmt und einer Korrelationsanalyse mit den genannten Patientenparametern unterzogen. Aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Daten wurden die Korrelationen mithilfe von Kendalls Tau (T) berechnet. Der Parameter kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen und gibt das Vorliegen bzw. die Stärke eines Zusammenhangs (gleich- oder gegensinnig) an.

Ein p-Wert von .05 wurde als Signifikanz-Grenze definiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 43 Tumorproben untersucht. Diese stammten von Patienten, die innerhalb der Jahre 2001 bis 2003 in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie und der Hals-Nasen-Ohren-Klinik operiert wurden. Die 43 in die Auswertung aufgenommenen Patienten zeigten eine Geschlechterverteilung von 30 Männern (70 %) und 13 Frauen (30 %) im Alter zwischen 37 und 77 Jahren, wobei das mittlere Alter bei Diagnosestellung 56.0 Jahre (SD=9.8) betrug. Der Altersmedian war 55.0 Jahre (68%-CI: 46.7 - 67.3). Die beiden Patientengruppen (männlich und weiblich) unterschieden sich hinsichtlich des Alters nicht signifikant voneinander ($p=0.65$).

Geschlechterverteilung

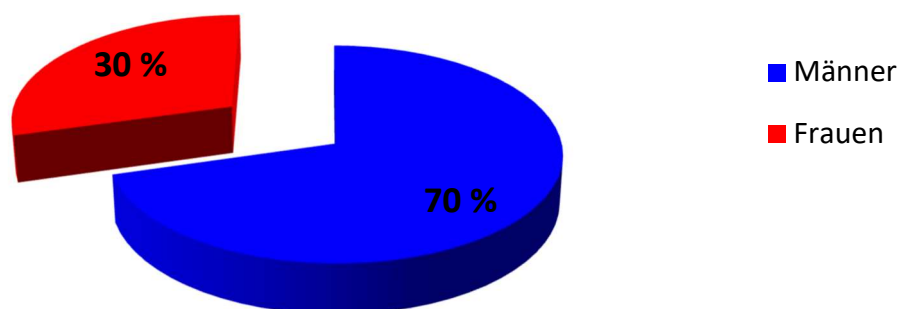


Abbildung 10: Geschlechterverteilung der 43 Patienten

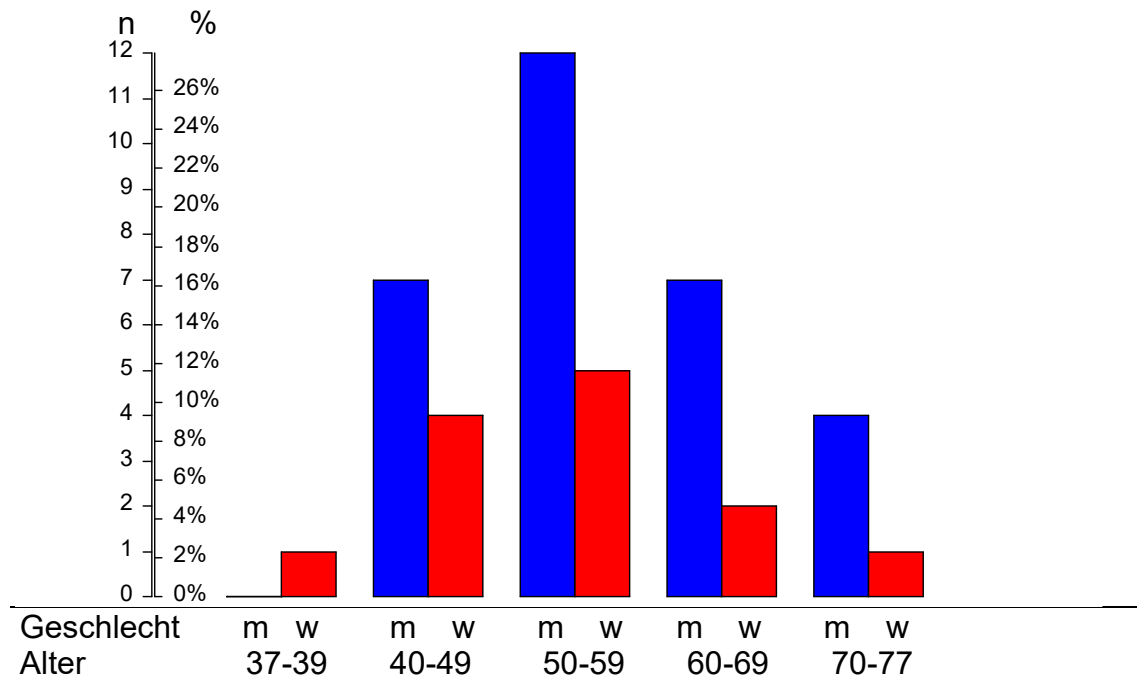


Abbildung 11: Alters- und Geschlechtsverteilung

3.2 Tumorgröße und -lokalisierung

Bei 29 Patienten (67.4%) befand sich der Tumor in der Mundhöhle und bei 7 Patienten im Oropharynx (16.3%). Bei weiteren 7 Tumoren war eine genaue Zuordnung zu einer der beiden Lokalisationen nicht möglich (s. Tab. 9 und Abb. 12). Die Tumorgröße betrug im Mittel 2.5 cm (SD=1.2), bei 10 Patienten fehlten Angaben zur Tumorgröße.

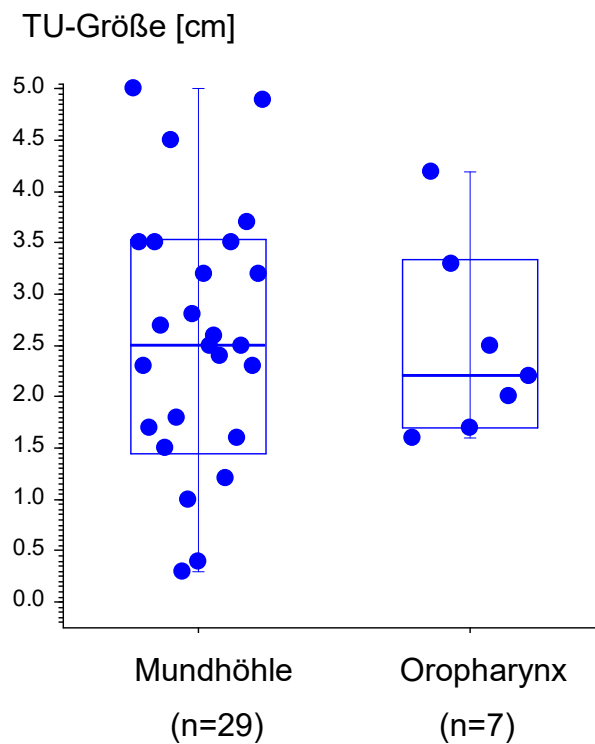


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Tumor-Lokalisation und -größe mit Median (n=33, keine Angaben zu 10 Tumoren), Größenangaben fehlten bei 4 Mundhöhlen-CAs

Tabelle 9: Größe und Lokalisation der untersuchten Tumoren

Lokalisation	n	Tumorgröße [cm]					Min	Max	p _t
		MW	ST	Median	68% CI	3.500			
Mundhöhle	25	2.584	1.252	2.500	1.442	3.538	.3	5	
Oropharynx	7	2.500	0.942	2.200	1.695	3.343	1.6	4.2	.87
Gesamt	33	2.579	1.161	2.500	1.600	3.500	.3	5	

3.3 Tumorstadien

Bei 37 der 43 Patienten waren alle fünf Parameter protokolliert. Bei 4 weiteren Patienten gab es nur Grading und pM, für 2 Patienten lagen Grading, pM und UICC-Stadium vor und bei einem Patienten fehlte das Grading. Tabelle 10 zeigt einen Überblick über die erhobenen pathologischen Tumordaten.

Tabelle 10: pTNM, UICC und Grading der untersuchten Tumoren

		n	%	Summe	%-Summe
pT	1	11	28	11	28
	2	16	41	27	69
	3	3	8	30	77
	4	9	23	39	100
	fehlende Angabe	4	-	-	-
pN	0	15	40	15	40
	1	8	21	23	61
	2a	2	5	25	66
	2b	10	26	35	92
	2c	3	8	38	100
	3	0	0	0	0
	fehlende Angabe	5	-	-	-
pM	0	39	93	39	93
	1	3	7	42	100
	fehlende Angabe	1	-	-	-
UICC	0	6	16	6	16
	IA	2	5.5	8	21.5
	IB	2	5.5	10	27
	IIA	3	8	13	35
	IIB	7	18	20	53
	III	15	39	35	92
	IV	3	8	38	100
	fehlende Angabe	5	-	-	-
Grading	1	2	5	2	5
	2	25	59	27	64
	3	15	36	42	100.00
	fehlende Angabe	1	-	-	-

3.4 Spektralphotometrische Vermessung der gewonnenen RNA

Die gewonnene RNA wurde spektralphotometrisch vermessen um Menge bzw. Konzentration sowie den Reinheitsgrad festzustellen (s. Tab. 11).

Tabelle 11: Daten der spektralphotometrischen Messung der gewonnenen RNA

Proben-ID	Konzentration (ng/µl)	Menge (µg)	260/280
1t	161,4	3,228	1,75
1g	89,9	1,798	1,75
2t	123,9	2,478	1,77
2g	98,5	1,97	1,73
3t	160,7	3,214	1,8
3g	107,2	2,144	1,76
4t	202	4,04	1,67
4g	263,3	5,266	1,59
5t	264,7	5,294	1,69
5g	262,2	5,244	1,55
6t	360,1	7,202	1,84
6g	175,9	3,518	1,72
7t	148,2	2,964	1,64
7g	301,8	6,036	1,6
8t	58,5	1,17	1,64
8g	70,7	1,414	1,56
9t	136,7	2,734	1,65
9g	234,9	4,698	1,66
10t	694,4	13,888	1,79
10g	250,4	5,008	1,77
11t	124,4	2,488	1,56
11g	78,6	1,572	1,5
12t	190,9	3,818	1,74
12g	123,1	2,462	1,67
13t	40,7	0,814	1,55
13g	55,3	1,106	1,55
14t	192,6	3,852	1,74
14g	55,3	1,106	1,57
15t	245,2	4,904	1,81
15g	216,7	4,334	1,81
16t	62,4	1,248	1,49
16g	94,3	1,886	1,49
17t	59,1	1,182	1,54
17g	350,6	7,012	1,79
18t	290,6	5,812	1,74
18g	109,3	2,186	1,62
19t	247,5	4,95	1,81
19g	158,1	3,162	1,68
20t	83,5	1,67	1,58
20g	133,5	2,67	1,49

21t	144,2	2,884	1,58
21g	151,6	3,032	1,63
22t	97,2	1,944	1,55
22g	121,1	2,422	1,59
23t	168,2	3,364	1,6
23g	116,9	2,338	1,54
24t	135,9	2,718	1,67
24g	207,5	4,15	1,58
25t	407,3	8,146	1,82
25g	162,6	3,252	1,62
26t	104,3	2,086	1,54
26g	92,6	1,852	1,57
27t	266,3	5,326	1,72
27g	145,8	2,916	1,67
28t	183,9	3,678	1,54
28g	264,9	5,298	1,69
29t	462,2	9,244	1,81
29g	192,3	3,846	1,49
30t	247	4,94	1,56
30g	89,9	1,798	1,42
31t	127,9	2,558	1,51
31g	171,2	3,424	1,56
32t	262,5	5,25	1,56
32g	148,1	2,962	1,44
33t	268,1	5,362	1,65
33g	135	2,7	1,54
34t	273	5,46	1,71
34g	227,4	4,548	1,62
35t	395,6	7,912	1,79
35g	137,2	2,744	1,58
36t	549,3	10,986	1,83
36g	268,3	5,366	1,7
37t	180,9	3,618	1,57
37g	108,4	2,168	1,55
38t	509,8	10,196	1,82
38g	212,6	4,252	1,68
39t	184,3	3,686	1,55
39g	161,2	3,224	1,55
40t	135,8	2,716	1,68
40g	106,8	2,136	1,68
41t	137,7	2,754	1,76
41g	66,9	1,338	1,71
42t	187,7	3,754	1,64
42g	62	1,24	1,63
43t	128,2	2,564	1,82
43g	82,6	1,652	1,8
44t	344,3	6,886	1,88
44g	384,8	7,696	1,87

3.5 PCR-Daten / miRNAs

Insgesamt wurden 90 PCR-Läufe durchgeführt, da fehlerhafte Messungen in 4 Fällen zur Notwendigkeit einer Wiederholung geführt hatten. Tabelle 12 zeigt einen Überblick über Mittelwerte, Mediane sowie Extremwerte der x-Fold-Werte der einzelnen miRNAs.

Tabelle 12: Mittelwert, Median und Extremwerte der ausgewerteten PCR-Daten

Primer	MW	ST	Median	68-CI	Min	Max
miR-589_2	1.641	1.920	0.910	0.462 2.744	0.2285	9.7197
miR-194*_2	23.793	122.742	0.562	0.063 2.513	0.0003	796.6
miR-194-1	3.220	7.373	0.908	0.182 3.192	0.0942	38.28
miR-184_1	3.444	6.840	0.693	0.131 4.632	0.055	32.256
miR-224_1	11.120	27.757	2.103	0.898 8.279	0.1204	152.13
miR-193a-5p_1	6.271	18.037	0.852	0.360 3.928	0.043	97.401
miR-125b-2*_1	3.864	10.668	0.507	0.131 3.189	0.0477	63.461
miR-146a_1	6.441	21.885	1.010	0.305 5.315	0.0689	141.65
miR-105*_1	5.425	14.583	1.108	0.569 6.105	0.1441	92.109
miR-105_2	2.893	4.518	1.377	0.586 5.107	0.2887	24.901
miR-767-5p_1	3.991	5.743	1.592	0.597 7.493	0.2186	25.111
miR-141_1	8.771	19.671	1.479	0.387 8.037	0.0824	88.559
miR-200a_1	7.862	17.917	1.349	0.328 10.091	0.0674	102.37
miR-200b*_1	7.773	21.435	1.282	0.534 6.060	0.1647	127.69
miR-200c_1	13.687	33.183	2.002	0.640 13.906	0.1017	150.63
miR-3654_1	5.547	12.993	1.007	0.580 3.852	0.165	64.49
miR-4458_1	3.996	9.138	1.061	0.418 6.192	0.007	54.094
miR-3156_1	5.252	14.640	1.010	0.456 3.492	0.1391	72.078
miR-4449_1	3.960	9.009	0.913	0.450 3.314	0.0478	44.903
miR-4786-5p_1	1.791	2.405	0.938	0.457 2.368	0.1214	10.762
miR-663b_2	28.518	123.555	1.534	0.618 6.698	0.1569	790.37
miR-210_1	11.393	26.174	1.687	0.756 11.552	0.16	133.4
miR-3176_1	9.996	27.039	1.129	0.475 8.923	0.0151	147.36
miR-212_1	1.100	0.952	0.894	0.428 1.562	0.1755	5.0043
miR-3687_1	4.351	9.353	1.089	0.651 5.518	0.1411	48.857
miR-342_1	1.384	2.086	0.825	0.392 1.761	0.2064	10.876
miR-99*_1	1.527	5.940	0.448	0.111 1.040	0.0098	39.363
miR-224*_2	2.451	4.373	1.389	0.623 3.195	0.2102	23.415
miR-34c_1	14.815	56.189	1.291	0.350 6.000	0.0029	318.5
miR205*_1	11.053	25.214	2.309	0.669 8.479	0.309	135.99

Der x-Fold gibt an um welchen Faktor die jeweilige miRNA im Tumorgewebe höher oder niedriger exprimiert war als im gesunden Vergleichsgewebe (x-Fold > 1 entspricht höhere Expression im Tumor, x-Fold < 1 entspricht höhere Expression im gesunden Gewebe). Daher erfolgte zunächst eine Untersuchung hinsichtlich der Häufigkeiten eines x-Fold > 1 (s. Tab. 13). Abbildung 13 zeigt eine graphische Darstellung der 9 miRNAs mit den im Median am stärksten abweichenden x-Fold-Werten.

Tabelle 13: Häufigkeit der x-Fold-Werte >1 der einzelnen miRNAs

miRNA	n	%	95%-CI	
miR-589_2	19	44%	29%	60%
miR-194*_2	15	35%	21%	51%
miR-194_1	19	44%	29%	60%
miR-184_1	20	47%	31%	62%
miR-224_1	31	72%	56%	85%
miR-193a-5p_1	19	44%	29%	60%
miR-125b-2*_1	13	30%	17%	46%
miR-146a_1	23	53%	38%	69%
miR-105*_1	25	58%	42%	73%
miR-105_2	27	63%	47%	77%
miR-767-5p_1	27	63%	47%	77%
miR-141_1	27	63%	47%	77%
miR-200a_1	26	60%	44%	75%
miR-200b*_1	29	67%	51%	81%
miR-200c_1	32	74%	59%	86%
miR-3654_1	22	51%	36%	66%
miR-4458_1	22	51%	36%	66%
miR-3156_1	22	51%	36%	66%
miR-4449_1	20	47%	31%	62%
miR-4786-5p_1	20	47%	31%	62%
miR-663b_2	30	70%	54%	83%
miR-210_1	30	70%	54%	83%
miR-3176_1	24	56%	40%	71%
miR-212_1	18	42%	27%	58%
miR-3687_1	24	56%	40%	71%
miR-342_1	17	40%	25%	56%
miR-99*_1	7	16%	7%	31%
miR-224*_2	28	65%	49%	79%
miR-34c_1	25	58%	42%	73%
miR205*_1	30	70%	54%	83%

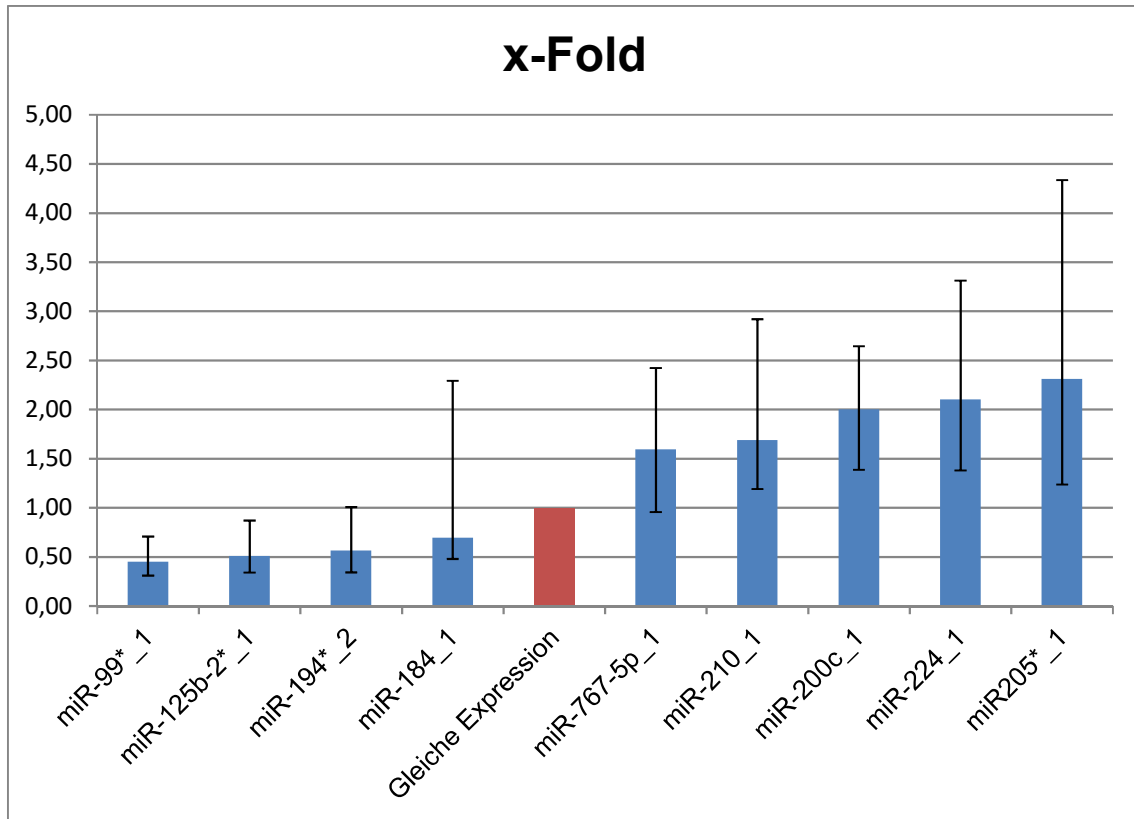


Abbildung 13: x-Fold-Werte und 95%-Konfidenzintervall der 9 miRNAs mit den größten Expressionsunterschieden; Werte <1 zeigen eine höhere Expression im gesunden Gewebe, Werte >1 stehen für erhöhte Spiegel im Tumor

3.6 Korrelationsanalyse

3.6.1 Korrelation der miRNAs mit Alter und Geschlecht

Tabelle 14: Analyse der Korrelation der miRNA-Expression mit dem Alter der Patienten

Korrelation des Alters mit miRNA	n	tau	p
miR-589_2	43	-0.0392	.71
miR-194*_2	43	-0.0235	.82
miR-194-1	43	-0.0056	.96
miR-184_1	43	-0.2609	.014 *
miR-224_1	43	0.0818	.44
miR-193a-5p_1	43	-0.0750	.48
miR-125b-2*_1	43	-0.0616	.56
miR-146a_1	43	-0.0818	.44
miR-105*_1	43	-0.0482	.65
miR-105_2	43	0.2139	.043 *
miR-767-5p_1	43	-0.0011	.99
miR-141_1	43	0.0302	.78
miR-200a_1	43	0.0146	.89
miR-200b*_1	43	-0.0504	.63
miR-200c_1	43	0.0101	.92
miR-3654_1	43	-0.1086	.30
miR-4458_1	43	-0.1176	.27
miR-3156_1	43	-0.0280	.79
miR-4449_1	43	-0.1288	.22
miR-4786-5p_1	43	-0.0683	.52
miR-663b_2	43	-0.0392	.71
miR-210_1	43	0.1019	.34
miR-3176_1	43	-0.0750	.48
miR-212_1	43	-0.0459	.66
miR-3687_1	43	-0.0885	.40
miR-342_1	43	-0.2139	.043 *
miR-99*_1	43	-0.0750	.48
miR-224*_2	43	-0.0437	.68
miR-34c_1	43	-0.0302	.78
miR205*_1	43	0.1221	.25

Tabelle 14 zeigt die Korrelationsanalyse der Expressionsniveaus der einzelnen Primer mit dem Alter der Patienten, Tabelle 15 mit dem Geschlecht. Dies diente zur Erkennung eventueller Störvariablen, da ein Einfluss von krankheitsunabhängigen Faktoren auf das Expressionsniveau der potentiellen Marker unerwünscht ist.

Hierbei zeigte sich, dass miR-194-1, miR-141_1 und miR-34c_1 signifikant mit dem Geschlecht des jeweiligen Patienten korrelierten ($p < .045$).

Tabelle 15: Analyse der Korrelation der miRNA-Expression mit dem Geschlecht der Patienten

	Geschlecht	n	FC-Wert		pU
			MW	ST	
miR-589_2	männlich	30	1.372	1.341	.71
	weiblich	13	2.262	2.821	
miR-194*_2	männlich	30	5.902	26.419	.083
	weiblich	13	65.080	219.991	
miR-194-1	männlich	30	1.732	3.719	.045 *
	weiblich	13	6.652	11.772	
miR-184_1	männlich	30	3.448	7.481	.97
	weiblich	13	3.435	5.337	
miR-224_1	männlich	30	8.357	19.358	.28
	weiblich	13	17.497	41.567	
miR-193a-5p_1	männlich	30	3.011	5.248	.76
	weiblich	13	13.793	31.373	
miR-125b-2*_1	männlich	30	2.617	5.742	.87
	weiblich	13	6.740	17.486	
miR-146a_1	männlich	30	3.022	5.711	.28
	weiblich	13	14.329	38.741	
miR-105*_1	männlich	30	3.320	5.131	.93
	weiblich	13	10.283	25.378	
miR-105_2	männlich	30	2.633	3.399	.82
	männlich	13	3.495	6.554	
miR-767-5p_1	männlich	30	3.631	5.042	.57
	weiblich	13	4.822	7.276	
miR-141_1	männlich	30	4.031	9.478	.039 *
	weiblich	13	19.707	30.845	
miR-200a_1	männlich	30	4.337	8.866	.23
	weiblich	13	15.998	28.825	
miR-200b*_1	männlich	30	3.724	7.138	.29
	männlich	13	17.119	36.733	
miR-200c_1	männlich	30	8.585	19.983	.17
	weiblich	13	29.235	58.262	

miR-3654_1	männlich	30	3.843	7.780	.71
	weiblich	13	9.480	20.507	
miR-4458_1	männlich	30	2.850	4.103	.72
	weiblich	13	6.639	15.515	
miR-3156_1	männlich	30	4.313	13.132	.91
	männlich	13	7.418	18.060	
miR-4449_1	männlich	30	2.696	4.912	.84
	weiblich	13	6.878	14.579	
miR-4786-5p_1	männlich	30	1.714	2.405	.84
	weiblich	13	1.969	2.495	
miR-663b_2	männlich	30	7.083	16.899	.82
	weiblich	13	77.983	221.227	
miR-210_1	männlich	30	9.834	26.603	.22
	männlich	13	14.990	25.833	
miR-3176_1	männlich	30	8.103	19.142	.41
	weiblich	13	14.364	40.543	
miR-212_1	männlich	30	1.039	0.848	.87
	weiblich	13	1.243	1.183	
miR-3687_1	männlich	30	3.242	5.979	.50
	weiblich	13	6.911	14.478	
miR-342_1	männlich	30	0.938	0.700	.30
	männlich	13	2.413	3.521	
miR-99*_1	männlich	30	0.615	0.519	.72
	weiblich	13	3.631	10.769	
miR-224*_2	männlich	30	2.048	4.126	.17
	weiblich	13	3.383	4.945	
miR-34c_1	männlich	30	2.765	5.445	.022 *
	weiblich	13	42.625	98.882	
miR205*_1	männlich	30	5.478	12.910	.093
	männlich	13	23.919	39.563	

3.6.2 Korrelation der miRNAs mit der Tumorlokalisierung

Bei der überwiegenden Mehrheit der verwendeten Tumoren (67.4%) handelte es sich um Mundhöhlenkarzinome (n=29), nur in 7 Fällen (16.3%) lag ein Oropharynxkarzinom vor. Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der Expressionsniveaus der miRNAs mit den beiden Tumorlokalisationen. Der scheinbare Zusammenhang der Lokalisation mit miR-194-1 entsteht durch die Verteilung der Werte und nicht durch deren tatsächliche Höhe, sodass hier ein tatsächlicher Zusammenhang unwahrscheinlich ist.

Tabelle 16: Analyse der Korrelation der miRNA-Expression mit der Tumorlokalisierung

	Lokalisation	n	MW	ST	pu
			FC-Wert		
miR-589_2	Mundhöhle	29	1.662	1.614	.41
	Oropharynx	7	2.056	3.420	
miR-194*_2	Mundhöhle	29	1.108	2.672	.25
	Oropharynx	7	5.814	12.760	
miR-194-1	Mundhöhle	29	3.446	8.248	<.001
	Oropharynx	7	1.907	2.324	
miR-184_1	Mundhöhle	29	3.082	6.246	.76
	Oropharynx	7	3.609	6.513	
miR-224_1	Mundhöhle	29	12.995	32.843	.41
	Oropharynx	7	8.166	12.619	
miR-193a-5p_1	Mundhöhle	29	4.657	12.962	.48
	Oropharynx	7	15.071	36.318	
miR-125b-2*_1	Mundhöhle	29	2.588	5.755	.46
	Oropharynx	7	9.945	23.637	
miR-146a_1	Mundhöhle	29	7.692	26.247	.67
	Oropharynx	7	3.782	6.870	
miR-105*_1	Mundhöhle	29	5.767	17.106	.82
	Oropharynx	7	6.333	9.156	
miR-105_2	Mundhöhle	29	3.172	5.278	.94
	Oropharynx	7	2.747	2.802	
miR-767-5p_1	Mundhöhle	29	4.027	6.294	.35
	Oropharynx	7	5.419	5.630	
miR-141_1	Mundhöhle	29	9.405	21.968	.73
	Oropharynx	7	5.470	10.204	
miR-200a_1	Mundhöhle	29	8.573	20.387	.61
	Oropharynx	7	4.872	8.133	

miR-200b*_1	Mundhöhle	29	5.312	11.429	.64
	Oropharynx	7	19.432	47.757	
miR-200c_1	Mundhöhle	29	14.618	36.845	.88
	Oropharynx	7	21.589	51.746	
miR-3654_1	Mundhöhle	29	5.169	12.926	.64
	Oropharynx	7	7.588	16.554	
miR-4458_1	Mundhöhle	29	3.257	5.339	.85
	Oropharynx	7	8.806	20.001	
miR-3156_1	Mundhöhle	29	6.200	17.394	.94
	Oropharynx	7	3.945	7.111	
miR-4449_1	Mundhöhle	29	3.528	8.610	.44
	Oropharynx	7	5.812	12.305	
miR-4786-5p_1	Mundhöhle	29	1.786	2.264	.51
	Oropharynx	7	1.560	1.241	
miR-663b_2	Mundhöhle	29	12.780	39.937	.59
	Oropharynx	7	114.939	297.846	
miR-210_1	Mundhöhle	29	11.797	27.933	.88
	Oropharynx	7	14.406	30.324	
miR-3176_1	Mundhöhle	29	12.694	32.356	.46
	Oropharynx	7	5.829	8.917	
miR-212_1	Mundhöhle	29	1.146	1.037	.97
	Oropharynx	7	1.183	1.043	
miR-3687_1	Mundhöhle	29	3.810	9.198	.35
	Oropharynx	7	5.827	9.690	
miR-342_1	Mundhöhle	29	1.303	1.743	.97
	Oropharynx	7	2.226	3.839	
miR-99*_1	Mundhöhle	29	0.625	0.718	.64
	Oropharynx	7	6.037	14.700	
miR-224*_2	Mundhöhle	29	1.473	1.029	.24
	Oropharynx	7	4.495	6.668	
miR-34c_1	Mundhöhle	29	9.902	36.598	.67
	Oropharynx	7	46.577	119.913	
miR205*_1	Mundhöhle	29	13.385	29.818	.91
	Oropharynx	7	8.194	13.484	

3.6.3 Korrelation der miRNAs mit der Tumorgröße

Tabelle 17 zeigt den Zusammenhang zwischen Expressionsniveau der einzelnen miRNAs und der Tumorgröße (gemessen in cm laut Pathologie-Befund). Hierbei zeigen miR-125b-2*_1, miR-3156_1, miR-212_1, miR-3687_1 und miR-99*_1 eine signifikante negative Korrelation (tau: [-2,409; -2,601], $p > .049$).

Tabelle 17: Korrelation der miRNA-Expression mit der Tumorgröße

	n	tau	p _r
miR-589_2	33	-0.2180	.075
miR-194*_2	33	-0.0344	.78
miR-194_1	33	-0.1568	.20
miR-184_1	33	-0.1797	.14
miR-224_1	33	-0.0497	.68
miR-193a-5p_1	33	-0.2256	.065
miR-125b-2*_1	33	-0.2486	.042 *
miR-146a_1	33	-0.2333	.056
miR-105*_1	33	-0.1568	.20
miR-105_2	33	-0.1912	.12
miR-767-5p_1	33	-0.1224	.32
miR-141_1	33	-0.1109	.36
miR-200a_1	33	-0.0688	.57
miR-200b*_1	33	-0.1033	.40
miR-200c_1	33	-0.0727	.55
miR-3654_1	33	-0.1989	.10
miR-4458_1	33	-0.1759	.15
miR-3156_1	33	-0.2601	.033 *
miR-4449_1	33	-0.1874	.13
miR-4786-5p_1	33	-0.1989	.10
miR-663b_2	33	-0.2027	.097
miR-210_1	33	-0.0153	.90
miR-3176_1	33	-0.1453	.23
miR-212_1	33	-0.2524	.039 *
miR-3687_1	33	-0.2486	.042 *
miR-342_1	33	-0.2371	.052
miR-99*_1	33	-0.2409	.049 *
miR-224*_2	33	-0.0153	.90
miR-34c_1	33	-0.0918	.45
miR205*_1	33	-0.1338	.27

Die Abbildungen 14 und 15 veranschaulichen beispielhaft die negative Korrelation des Expressionsniveaus von miR-3156 und miR-212 mit der Größe des Primärtumors.

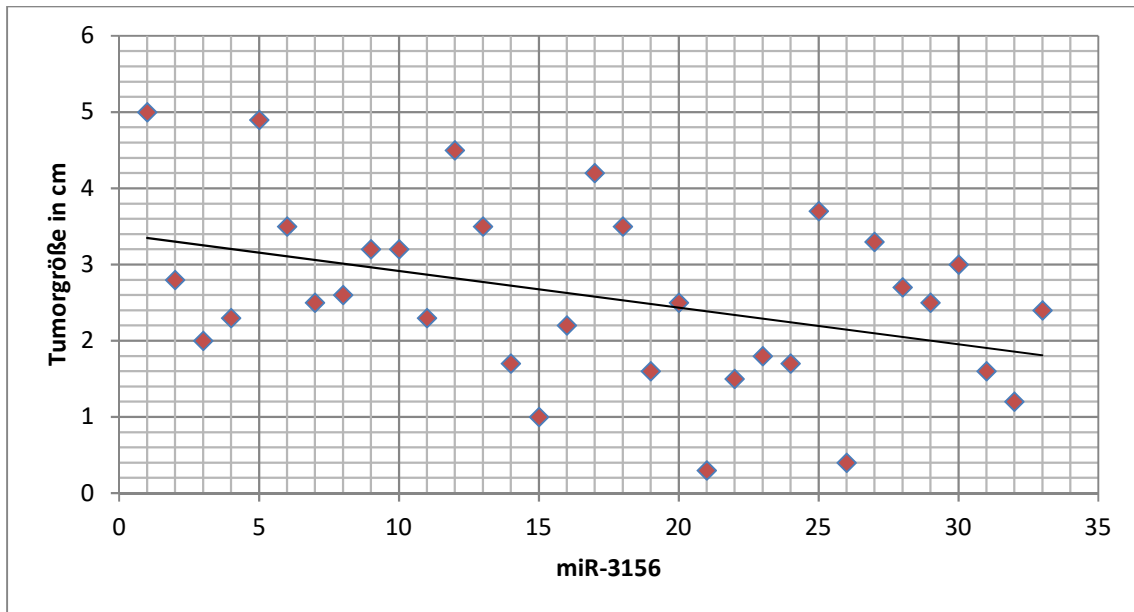


Abbildung 14: Rangbasierte Korrelation (tau: -0,2601; p=.033) der Expression von miR-3156 mit der Größe des Primärtumors

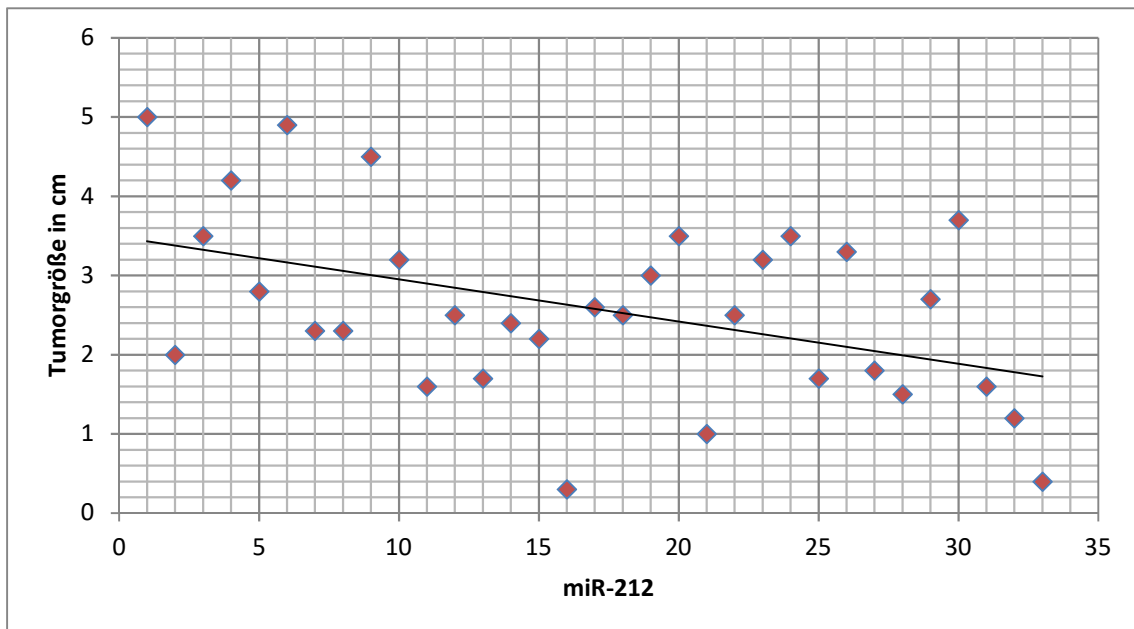


Abbildung 15: Rangbasierte Korrelation (tau: -0,2524; p=.039) der Expression von miR-212 mit der Größe des Primärtumors

3.6.4 Korrelation der miRNAs mit dem TNM-Stadium

Tabelle 18: Korrelation der miRNA-Expression mit T1-T4 und T1-T3

Korrelation	pT1-4			pT 1-3		
	Primer	n	tau p _T	n	tau p _T	p _T
miR-589_2	39	-0.2576	.021*	30	-0.4038	.0017*
miR-194*_2	39	-0.0400	.72	30	-0.1884	.14
miR-194-1	39	-0.2032	.068	30	-0.3858	.0028*
miR-184_1	39	-0.1680	.13	30	-0.1884	.14
miR-224_1	39	-0.0432	.70	30	-0.0449	.73
miR-193a-5p_1	39	-0.1648	.14	30	-0.1585	.22
miR-125b-2*_1	39	-0.1392	.21	30	-0.1705	.19
miR-146a_1	39	-0.2256	.043*	30	-0.3021	.019*
miR-105*_1	39	-0.1968	.078	30	-0.1765	.17
miR-105_2	39	-0.1232	.27	30	-0.0568	.66
miR-767-5p_1	39	-0.1040	.35	30	-0.1765	.17
miR-141_1	39	-0.0624	.58	30	-0.2183	.090
miR-200a_1	39	-0.0368	.74	30	-0.1286	.32
miR-200b*_1	39	-0.0432	.70	30	-0.0748	.56
miR-200c_1	39	-0.0208	.85	30	-0.0508	.69
miR-3654_1	39	-0.1840	.099	30	-0.2542	.049*
miR-4458_1	39	-0.1744	.12	30	-0.2901	.024*
miR-3156_1	39	-0.2736	.014*	30	-0.2781	.031*
miR-4449_1	39	-0.2032	.068	30	-0.2064	.11
miR-4786-5p_1	39	-0.2224	.046*	30	-0.3200	.013*
miR-663b_2	39	-0.1936	.083	30	-0.1525	.24
miR-210_1	39	-0.0400	.72	30	-0.0209	.87
miR-3176_1	39	-0.2000	.073	30	-0.2303	.074
miR-212_1	39	-0.2448	.028*	30	-0.4277	.0009*
miR-3687_1	39	-0.2640	.018*	30	-0.3499	.0066*
miR-342_1	39	-0.2512	.024*	30	-0.3858	.0028*
miR-99*_1	39	-0.1552	.16	30	-0.2004	.12
miR-224*_2	39	-0.0816	.46	30	-0.0987	.44
miR-34c_1	39	-0.0176	.87	30	-0.1585	.22
miR205*_1	39	-0.1584	.16	30	-0.1765	.17

Des Weiteren erfolgte eine Korrelationsanalyse der PCR-Daten mit dem T-Stadium des jeweiligen Tumors. Aufgrund der Tatsache, dass das Stadium T4 unabhängig von der Tumorgroße ist und somit nach anderen Kriterien

(Invasivität) eingeteilt wird, erfolgte neben der Korrelation mit allen T-Stadien noch eine getrennte Betrachtung der Stadien T1-T3 (s. Tab. 18).

Hier konnten bei miR-589_2, miR-194-1, miR-146a_1, miR-3654_1, miR-4458_1, miR-3156f_1, miR-4786-5p_1, miR-212_1, miR-3687_1 und miR-342_1 signifikante negative Zusammenhänge (tau: [-2,5; -4,27], $p < .049$) nachgewiesen werden.

Die Abbildungen 16 und 17 veranschaulichen beispielhaft den negativen Zusammenhang zwischen der Expression von miR-212 mit dem Tumorstadium.

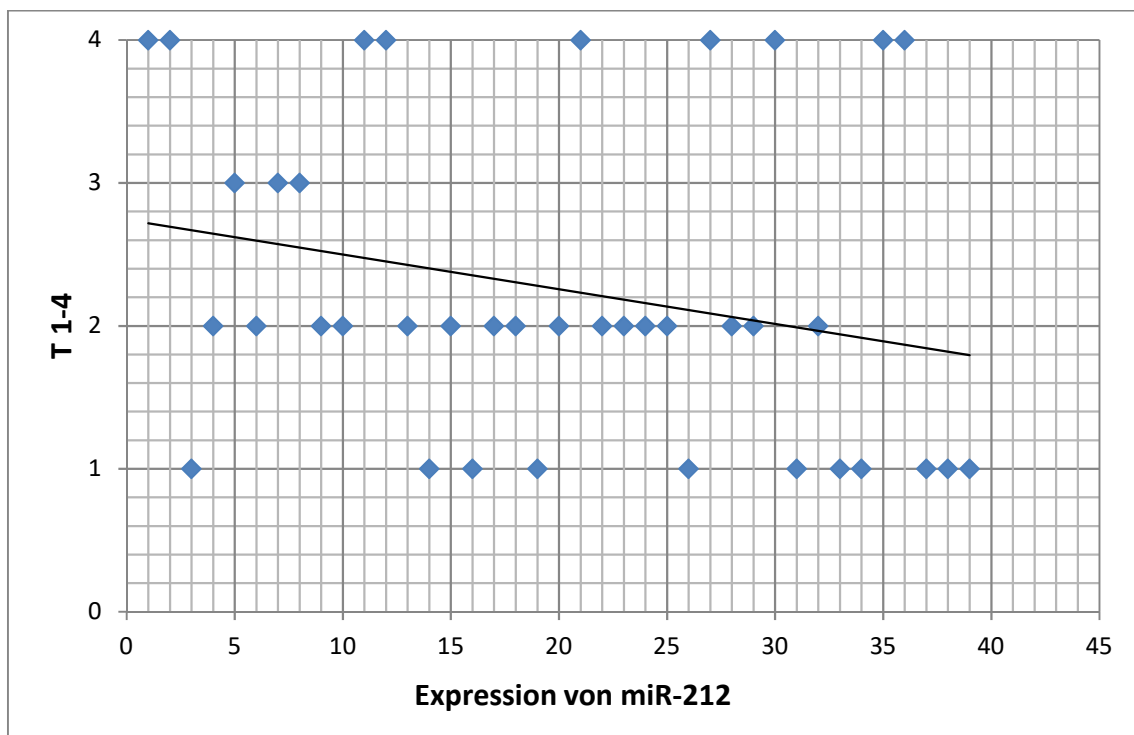


Abbildung 16: Rangbasierte Korrelation (tau: -0,2448; $p=0.028$) der Expression von miR-212 mit dem Tumorstadium (T1-T4); Je höher das T-Stadium, desto geringer die Expression der miRNA

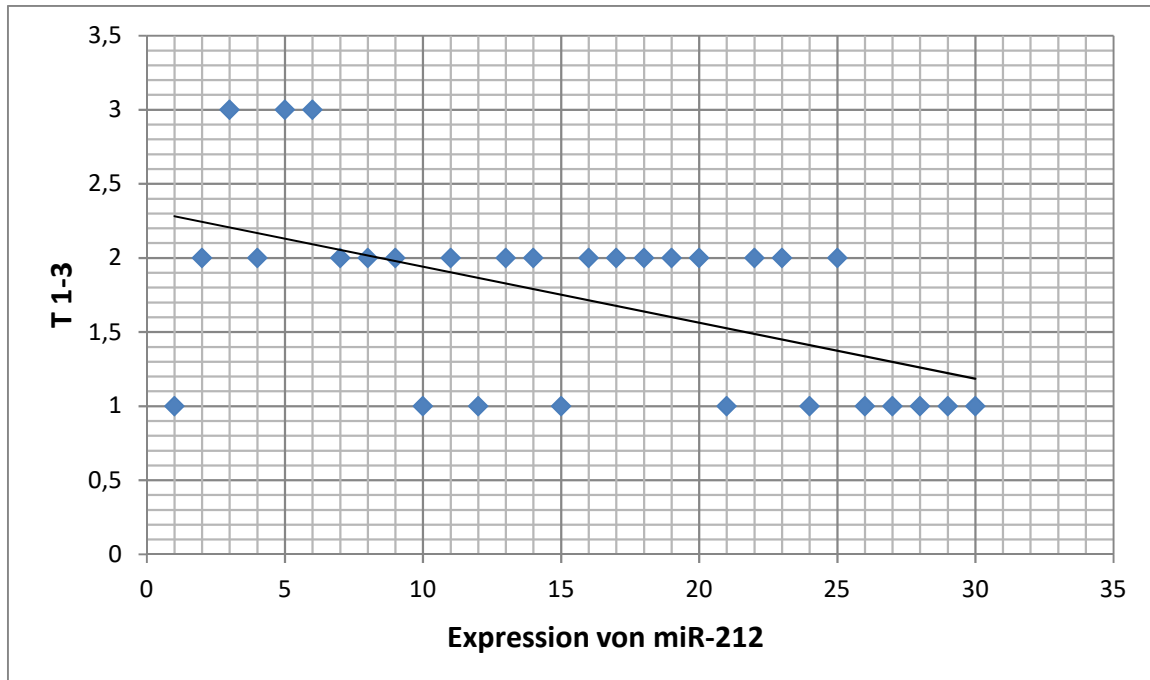


Abbildung 17: Negative Korrelation (τ : -0,4227, $p < .001$) der Expression von miR-212 mit den Tumorstadien T1-3; Je höher das T-Stadium, desto geringer die Expression der miRNA

Eine vergleichende Analyse der jeweiligen PCR-Daten der T4-Tumoren (n=9) mit denen der T1-T3-Tumoren erbrachte keine signifikanten Korrelationen (s. Tab. 19). Eine Power-Analyse zur Abschätzung der notwendigen Anzahl an Tumoren für einen Korrelationsnachweis ergab eine Mindestmenge von 100 zu untersuchenden Proben.

Tabelle 19: Vergleich der miRNA-Expression bei T1-3 und T4

		n	MW	ST	pu
		FC-Wert			
miR-589_2	pT1-pT3	30	1.830	2.159	.68
	pT4	9	1.310	1.361	
miR-194*_2	pT1-pT3	30	2.339	6.654	.55
	pT4	9	89.589	265.133	
miR-194-1	pT1-pT3	30	3.332	7.612	.99
	pT4	9	3.952	8.462	
miR-184_1	pT1-pT3	30	3.422	6.025	.50
	pT4	9	1.335	1.314	
miR-224_1	pT1-pT3	30	14.939	32.624	.86
	pT4	9	2.699	2.247	
miR-193a-5p_1	pT1-pT3	30	8.262	21.319	.42
	pT4	9	1.792	3.203	
miR-125b-2*_1	pT1-pT3	30	5.206	12.588	.64
	pT4	9	0.817	0.766	
miR-146a_1	pT1-pT3	30	8.660	25.996	.52
	pT4	9	1.474	1.785	
miR-105*_1	pT1-pT3	30	7.021	17.247	.30
	pT4	9	2.086	2.456	
miR-105_2	pT1-pT3	30	2.708	3.298	.35
	pT4	9	3.704	7.970	
miR-767-5p_1	pT1-pT3	30	4.681	6.587	.94
	pT4	9	2.851	2.928	
miR-141_1	pT1-pT3	30	8.880	17.895	.59
	pT4	9	11.792	28.829	
miR-200a_1	pT1-pT3	30	9.606	20.654	.76
	pT4	9	5.143	9.733	
miR-200b*_1	pT1-pT3	30	10.224	25.315	.99
	pT4	9	2.634	3.664	
miR-200c_1	pT1-pT3	30	20.025	42.864	.96
	pT4	9	3.536	5.050	
miR-3654_1	pT1-pT3	30	7.218	15.235	.64
	pT4	9	2.053	3.129	

miR-4458_1	pT1-pT3	30	4.614	10.519	.86
	pT4	9	2.575	5.234	
miR-3156_1	pT1-pT3	30	6.911	17.298	.20
	pT4	9	1.698	2.473	
miR-4449_1	pT1-pT3	30	5.057	10.545	.35
	pT4	9	1.695	2.779	
miR-4786-5p_1	pT1-pT3	30	1.836	2.418	.61
	pT4	9	2.086	2.889	
miR-663b_2	pT1-pT3	30	39.756	147.197	.26
	pT4	9	3.090	6.005	
miR-210_1	pT1-pT3	30	14.740	30.719	.78
	pT4	9	4.525	5.814	
miR-3176_1	pT1-pT3	30	11.586	30.928	.44
	pT4	9	7.238	17.861	
miR-212_1	pT1-pT3	30	1.165	1.077	.88
	pT4	9	0.930	0.647	
miR-3687_1	pT1-pT3	30	5.600	10.981	.44
	pT4	9	1.524	1.661	
miR-342_1	pT1-pT3	30	1.606	2.448	.66
	pT4	9	0.928	0.653	
miR-99*_1	pT1-pT3	30	1.920	7.106	.64
	pT4	9	0.569	0.550	
miR-224*_2	pT1-pT3	30	2.895	5.166	.78
	pT4	9	1.503	1.080	
miR-34c_1	pT1-pT3	30	20.148	66.881	.50
	pT4	9	2.353	1.777	
miR205*_1	pT1-pT3	30	10.604	18.593	.52
	pT4	9	16.869	44.700	

Außerdem wurde eine Analyse der Korrelation zwischen den miRNA-Expressionsprofilen und dem Auftreten bzw. dem Stadium eventueller Lymphknotenmetastasen (N-Stadium) durchgeführt. Hierbei ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge ermitteln.

Laut Pathologie-Befunden lagen nur in 3 Fällen gesicherte Fernmetastasen vor, sodass die Anzahl der Positiv-Fälle hier für eine aussagekräftige Analyse zu klein war. Die Analyse zeigte demnach keine signifikante Korrelation zwischen dem miRNA-Expressionsprofil und dem Auftreten von Fernmetastasen.

3.6.5 Korrelation der Primer mit dem Grading der Tumoren

Tabelle 20: Korrelation der miRNA-Expression mit dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen

	n	tau	p _r
miR-589_2	42	0.0655	.54
miR-194*_2	42	0.0240	.82
miR-194_1	42	0.1710	.11
miR-184_1	42	0.0495	.64
miR-224_1	42	-0.0495	.64
miR-193a-5p_1	42	0.1102	.30
miR-125b-2*_1	42	0.0272	.80
miR-146a_1	42	0.2476	.021 *
miR-105*_1	42	0.2444	.023 *
miR-105_2	42	0.1326	.22
miR-767-5p_1	42	0.0431	.69
miR-141_1	42	0.0527	.62
miR-200a_1	42	0.0304	.78
miR-200b*_1	42	-0.0080	.94
miR-200c_1	42	0.0463	.67
miR-3654_1	42	0.0879	.41
miR-4458_1	42	0.0367	.73
miR-3156_1	42	0.1230	.25
miR-4449_1	42	0.1102	.30
miR-4786-5p_1	42	0.1614	.13
miR-663b_2	42	0.1326	.22
miR-210_1	42	0.0591	.58
miR-3176_1	42	0.1837	.086
miR-212_1	42	0.1390	.19
miR-3687_1	42	0.1326	.22
miR-342_1	42	0.1773	.098
miR-99*_1	42	0.0176	.87
miR-224*_2	42	0.0527	.62
miR-34c_1	42	0.0367	.73
miR205*_1	42	0.0751	.48

Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der miRNA-Expressionsdaten mit dem Grading.

Die beiden miRNAs miR-146a_1 und miR-105*_1 korrelierten hierbei signifikant mit dem Entdifferenzierungsgrad der getesteten Karzinome (tau: [0,2444; 0,2476], p=.023).

4 DISKUSSION

4.1 miRNA-Expression in Tumor- und gesundem Gewebe

Die vorliegende Studie soll demonstrieren, dass miRNAs auf effektive Weise aus formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben von Mundhöhlenkarzinomen isoliert werden können und auch nach langer Lagerungszeit stabile Expressionsmuster nachgewiesen werden können. Eine Verwendung von FFPE-Proben als Quelle für die Untersuchung von miRNAs bringt die Vorteile des großen Angebots an verfügbarem Material sowie der logistisch besseren Planbarkeit aufgrund der Langzeitstabilität der untersuchten Moleküle und Expressionsdaten mit sich [129, 134].

Ein weiteres Ziel war es herauszufinden, ob die 30 ausgewählten miRNAs deutliche Expressionsunterschiede zwischen Tumorgewebe und umliegendem gesundem Gewebe aufweisen. Hierzu wurde eine Berechnung der sog. „x-Fold-Werte“ anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode durchgeführt. Ein Wert von >1 zeigt hierbei, dass das Expressionsniveau der betreffenden miRNA im Tumorgewebe höher war als im gesunden, ein Wert von <1 respektive eine Unterexpression im Tumor. Die Analyse erfolgte mithilfe der Medianwerte der PCR-Daten, da aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Mittelwert als unzuverlässig anzusehen ist.

4.1.1 Überexpression im Tumor

Die höchsten Expressionsunterschiede im Sinne einer Überexpression im Tumor verglichen mit dem umliegenden gesunden Gewebe zeigten miR-224, miR-205*, miR-200c, miR-210 und miR-767_5p_1. Diese Beobachtung deckt sich nur teilweise mit der aktuellen Literatur. So ist beispielsweise für die miR-200-Familie an diversen Tumorentitäten eine ausgeprägte Tumor-

Suppressionsfunktion (Aktivator von p53) und eine Herabregulation der Expression in Tumorgewebe beschrieben [112, 135-138]. Andererseits zeigten Zidar et al. in ihrer Studie eine Überexpression von miR-200c in oralen Plattenepithelkarzinomen verglichen mit Spindelzellkarzinomen [139]. Ähnliches gilt für miR-34c. Hier zeigte sich in den vorliegenden Daten ebenfalls eine geringfügig höhere Konzentration im Tumorgewebe (medianer x-Fold: 1.291). Auch diese miRNA gilt im Allgemeinen als Tumorsuppressor und funktioneller Aktivator von p53, sodass eher eine verminderte Expression zu erwarten gewesen wäre [140].

Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene Überexpression von mir-205* wurde in der aktuell verfügbaren Literatur bislang nicht beschrieben. Bei dieser Sequenz handelt es sich um den sog. „passenger-strand“ von miR-205. Dieser entsteht bei der Bildung des reifen „leading-strand“ und wird nach der Spaltung durch „Dicer“ häufig enzymatisch abgebaut. In einigen Fällen interagieren allerdings beide Stränge mit mRNAs und beeinflussen so die Expression verschiedener Gene [141]. Die Tatsache, dass beide Stränge aus demselben Vorläufer-Molekül (pre-miRNA) entstehen lässt die Vermutung zu, dass die Expressionslevel beider Stränge gleich sein müssen.

Zidar et al. beschrieben für miR-205 ähnliche Expressionsniveaus wie sie in der vorliegenden Studie für miR-205* beobachtet wurden, wohingegen bei Childs et al. ein entgegengesetztes Verhältnis zwischen Tumor und gesundem Gewebe auftrat [139, 142]. Eine Veröffentlichung setzt miR-205 in einen Zusammenhang mit erhöhter Metastasierungsneigung und kürzerer Überlebenszeit bei Lymphknotenmetastasen von HNSCC-Patienten [143]. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit für miR-205* allerdings nicht reproduziert werden. Dies erklärt sich möglicherweise durch unterschiedliche Ziel-Gene von miR-205 und des „passenger-strand“ miR-205*.

Zwei miRNAs, die in unserer Untersuchung eine leichte Überexpression aufwiesen, miR-210 (Median x-Fold: 1.687) und miR-767 (Median x-Fold: 1.592) wurden unseres Wissens bisher nicht im Zusammenhang mit Kopf-Hals-Karzinomen erwähnt. Einzig eine Studie von Gee et al. zeigte zwar eine

Korrelation von miR-210 mit locoregionärem Tumorrezidiv und kürzerer Überlebenszeit, erbrachte aber keine relevanten Expressionsunterschiede zwischen Tumor und Vergleichsgewebe [144]. Die nachgewiesenen Expressionsunterschiede waren auch in unserer Untersuchung allenfalls mäßig, sodass eine klinisch-praktische Nutzung fraglich erscheint.

Mit einem Median-x-Fold von 2.1 lag miR-224_1 in einer überdurchschnittlich hohen Konzentration im Tumorgewebe vor. Diese miRNA wurde in verschiedenen Studien als potentieller Tumormarker bewertet. So zeigten bspw. Liu et al. eine signifikante Überexpression von miR-224 im Hepatozellulären Karzinom verglichen mit gesundem Lebergewebe [145]. Andere Studien wiesen nach, dass ein hoher Expressionsgrad von miR-224 direkt mit erhöhter Metastasierungsneigung und folglich mit verringerter Überlebenszeit beim Kolorektalen Karzinom zusammenhängt [146, 147].

Für das HNSCC liegt bislang nach unserem Wissen nur eine Studie von Scapoli et al. vor, in welcher eine Unterexpression von miR-224 in oralen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen wurde [148]. Unsere Datenlage hingegen ist eindeutig bzgl. einer Überexpression im Tumorgewebe und legt daher eine potentielle Eignung als Biomarker für das Kopf-Hals-Karzinom nahe.

4.1.2 Unterexpression im Tumor

Einige untersuchte miRNA-Sequenzen zeigten einen x-Fold-Wert von <1 und damit eine Herabregulation im Tumor verglichen mit gesundem Gewebe. Den niedrigsten Wert erhielten wir bei der Untersuchung von miR-99*_1 (Median x-Fold: 0.448). Bei dieser Sequenz handelt es sich um den sog. Gegenstrang von miR-99, einer miRNA-Sequenz, von der bisher eine tumorsuppressive Wirkung im Cervix-Karzinom nachgewiesen wurde. Bei Tumoren der Kopf-Hals-Region war diese jedoch bislang unbekannt [149].

Einen x-Fold <1 wiesen außerdem miR-184 (Median x-Fold: 0.693), miR-194*_2 (Median x-Fold: 0.562) und miR-125b*_2* (Median x-Fold: 0.507) auf.

Während für miR-194, also den Führungsstrang der von uns verwendeten Sequenz, eine Herabregulation im Kopf-Hals-Karzinom bereits nachgewiesen wurde, erbrachte die Literaturrecherche für miR-194* keine Ergebnisse [150]. Bezüglich der Unterexpression von miR-125b_2* decken sich unsere Beobachtungen mit denen von Manikandan et al. [151]. Eine Analyse der Ziel-Gene dieser miRNA zeigte eine potentielle Rolle im Bereich des alternativen Splicings.

Während in der erwähnten Studie auch miR-184 – äquivalent zu unseren Ergebnissen – als im Tumor herabreguliert beschrieben wird, zeigt eine weitergehende Literaturrecherche widersprüchliche Ergebnisse. So wiesen Wong et al. an einer Kohorte von Patienten mit Zungen-PECA einen hohen miR-184-Plasmaspiegel nach, der nach operativer Tumorentfernung signifikant verringert werden konnte [152]. Auf der anderen Seite finden sich zwei Studien, die eine verringerte Konzentration von miR-184 in oralen Karzinomen beobachteten und einen Zusammenhang der beeinflussten Zielgene mit Tumorgenese und –progression postulierten [151, 153]. Yu und Kollegen zeigten außerdem tumorsuppressive Funktionen von miR-184, u.a. durch die direkte Wirkung auf die onkogen wirksame miR-205 (Zielgen SHIP2) [154]. Eine Überexpression dieser miRNA in HNSCC konnte auch in unserer Studie bestätigt werden (s.o.).

Es lässt sich zusammenfassen, dass ein Teil der untersuchten miRNAs bereits in anderen Studien behandelt wurde, wobei sich die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse mit einem Großteil der verfügbaren Literatur decken. Im Hinblick auf die Plausibilität und Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten ist dies als positiv zu bewerten. Im Falle der im Tumor deutlich unterexprimierten miR-99*_1 findet sich bislang keine Literaturangabe im Bereich von Kopf-Hals-Karzinomen. Eine weitere Untersuchung bzgl. einer potentiellen Eignung als Tumormarker wird aktuell vorbereitet.

4.2 Korrelation von miRNAs mit klinischen und pathologischen Daten

Es zeigten sich bei einigen der getesteten miRNAs Korrelationen mit einem oder mehreren der tumor- bzw. patientenbezogenen Kenngrößen.

Interessant hierbei war die Korrelation von jeweils drei getesteten miRNAs mit Alter und Geschlecht der Patienten. Einige Studien beschreiben zwar eine Beeinflussung der Expressionsprofile diverser miRNAs durch Alter und Androgenkonzentration, allerdings wurden hierbei andere miRNA-Sequenzen benutzt als in unserer Studie [155, 156]. Eine der genannten Veröffentlichungen bezieht sich auf Untersuchungen an Mäusen, sodass eine direkte Vergleichbarkeit mit Daten aus humanem Gewebe fraglich erscheint [155]. Außerdem beschrieben Ohyashiki und Kollegen einen deutlich altersabhängigen Spiegel von miR-92a in humanen CD8⁺ T-Lymphozyten [157].

Im Falle von miR-342 und miR-194 zeigte sich in unserer Studie sowohl eine Korrelation mit den Tumorstadien T1-3, als auch mit dem Alter bzw. dem Geschlecht, wobei eine Regressionsanalyse zeigte, dass beide Merkmale unabhängig voneinander mit dem Expressionsprofil korrelieren. Insgesamt ist die Beschreibung alters- und geschlechtsabhängiger miRNAs in der gängigen Literatur spärlich.

Eine Veränderung von miRNA-Profilen durch zelluläre Alterungsprozesse ist denkbar und ließe sich eventuell mit der sog. Seneszenz-Hypothese argumentativ stützen. Auch die im höheren Alter steigende Inzidenz von Neoplasien erscheint in diesem Zusammenhang stimmig. Eine umfassende wissenschaftliche Untersuchung dieses Sachverhaltes liegt nach bislang nicht vor.

Bezüglich der Beeinflussung des Metastasierungsverhaltens von HNSCC durch diverse miRNA konnten in der vorliegenden Untersuchung aufgrund der geringen Probenanzahl (nur 3 Fernmetastasen) keine Korrelationen gefunden werden. Einige Studien beschreiben jedoch derartige Zusammenhänge. So zeigten Liu et al. beispielsweise eine negative Beeinflussung der Invasivität und

Metastasierungsneigung durch miR-138 und miR-222. Neben dem Nachweis einer verringerten miR-222-Aktivität in Zellen mit hohem Metastasierungspotential konnte außerdem durch experimentelle Steigerung der miR-222-Expression in vitro eine Hemmung der Invasivität erreicht werden. Hierbei konnten zwei pro-metastatische Gene (MMP1 und SOD2) als Ziele von miR-222 identifiziert werden [158, 159].

Für miR-205, den Führungsstrang der von uns getesteten Sequenz miR-205*, wurde ebenfalls von verschiedenen Autoren eine erhöhte Expressionsrate in Lymphknotenmetastasen von Kopf-Hals-Karzinomen nachgewiesen. Allerdings wurden die Expressionsprofile in den genannten Studien direkt aus Proben betroffener Lymphknoten gewonnen und nicht wie bei uns aus dem Primärtumor [143, 160, 161]. Die Literaturrecherche erbrachte keine Informationen über miR-205*, sodass davon auszugehen ist, dass die vorliegende Untersuchung sich als erste mit der besagten Sequenz beschäftigt. Im Hinblick auf den eingangs erwähnten hohen prognostischen Einfluss einer potentiellen Metastasierung auf das klinische Outcome bzw. das Langzeitüberleben beim HNSCC wäre eine größere Probenanzahl, insbesondere hinsichtlich Lymphknoten- und Fernmetastasen für weiterführende Untersuchungen der hier vorgestellten miRNAs wünschenswert.

Eine Untersuchung der Tumorlokalisation in Bezug auf die Expressionsniveaus der miRNAs erbrachte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Eine Studie von Barker et al. hatte an Kopf-Hals-Karzinomen eine signifikante Spezifität der getesteten miRNAs für den Zungengrund, die Tonsillen sowie den Nasopharynx nachgewiesen. Außerdem zeigten sich die gleichen Expressionsprofile in den jeweiligen Lymphknotenmetastasen. Allerdings bezog sich die genannte Studie nur auf 6 Patienten, sodass die Aussagekraft der beobachteten Zusammenhänge vor der kleinen Probenzahl kritisch zu sehen ist [162]. Kalfert et al. wiesen in ihrer Untersuchung signifikante Expressionsunterschiede einiger miRNAs (z.B. miR-200c) zwischen Oropharynx- und Larynxkarzinomen nach [160]. Im Hinblick auf das im Kopf-

Hals-Bereich gelegentlich auftretende CUP-Syndrom (Cancer of Unknown Primary) hätte eine signifikante Gewebsspezifität, die auch in den jeweiligen Lymphknotenmetastasen nachweisbar ist, potentiell große therapeutische Bedeutung. Die Suche nach dem Primärtumor könnte hierdurch erheblich vereinfacht werden.

Eine mögliche Erklärung für die nicht signifikanten Ergebnisse in unserer Untersuchung könnte die in Anbetracht der relativ geringen Fallzahl große Streuung der Tumoren innerhalb der Mundhöhle und des Oropharynx sein. Hier scheint eine weitergehende Untersuchung mit einem größeren Kollektiv und einer genaueren Differenzierung einzelner Sub-Lokalisationen sinnvoll.

Unsere Untersuchung zeigte deutliche Korrelationen einiger untersuchter miRNAs mit der Tumorgröße und folglich auch mit dem T-Stadium. Alle Zusammenhänge waren hierbei negativ, d.h. je größer das Karzinom, desto geringer war die Expression der jeweiligen miRNA im Tumor verglichen mit dem gesunden Gewebe. Da nur die Tumorstadien T1-T3 abhängig von der Größe des Primärtumors sind, wurden diese getrennt von Stadium T4 untersucht, da dieses durch die Tumorinvasion in Nachbargewebe definiert ist. Eine gesonderte Analyse der T4-Tumoren erbrachte keinerlei Zusammenhang mit den Expressionsniveaus der miRNA bzw. den Stadien T1-3. Eine Korrelation zwischen miRNA-Expression und Tumorinvasivität wurde bislang z.B. von Lin et al. für miR-24 beschrieben [163].

Bei unserer Analyse zeigte vor allem miR-212 einen starken negativen Zusammenhang mit der Größe, respektive dem Tumorstadium (τ : -0,4227; $p=0,0009$). Es wurde bereits von ähnlichen Beobachtungen am Glioblastom und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom berichtet, allerdings lagen bislang keine Daten über Kopf-Hals-Karzinome vor [164, 165]. So wiesen Liu et al. eine direkte Tumorsuppression durch miR-212 nach und zeigten eine direkte Beeinflussung des Proteinkinase-Gens SGK3 [164].

Wie bereits beschrieben, sind über miR-125b-2* bislang wenig Informationen verfügbar. Auch der komplementäre Führungsstrang miR-125b wurde bisher nicht im Zusammenhang mit der Größe von Tumoren beschrieben. Es existieren jedoch Veröffentlichungen, die für miR-125b eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und der Entstehung von Prostatakarzinomen nachweisen konnten [166, 167].

Über miR-3156_1 und miR-3687_1, die ebenfalls statistisch signifikant mit der Tumorgöße korrelierten, existieren bislang keine deskriptiven Berichte. Auch im Fall von miR-99*_1 finden sich bis auf die Beschreibung der tumorsuppressiven Effekte des Führungsstranges keine Literaturangaben.

Zwei miRNAs korrelierten in unserer Untersuchung signifikant mit dem Grading der Tumoren. miR-146a ist eine der am häufigsten beschriebenen Sequenzen und beeinflusst nachgewiesenermaßen unter anderem die Entstehung von HNSCC, kolorektalen, Bronchial- und Mammakarzinomen [168-171]. Ein Zielgen scheint hierbei NUMB zu sein, ein Enzym, das in verschiedenen Isoformen vorliegt und diverse Funktionen im Bereich von zellulären Stoffwechsel- und Entwicklungsprozessen hat. So spielt es beispielsweise eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und hat tumorsuppressive Eigenschaften. Ein Beispiel hierfür ist die Herabregulation von EGFR und die Stabilisierung von p53 [172, 173]. Eine Korrelation mit dem Differenzierungsgrad der untersuchten Tumoren scheint logisch, da miR-146a direkt Gene reguliert, die eine Schlüsselrolle bei Zelldifferenzierungsprozessen spielen.

Eine Korrelationsanalyse von Patienten- bzw. Tumorparametern wie in unserer Studie wurde bisher nur selten beschrieben. Manikandan et al. führten eine Korrelationsanalyse diverser miRNAs mit ähnlichen Parametern durch, wie sie auch in unserer Studie verwendet wurden [151]. Allerdings erfolgte eine andere Gruppierung einiger Merkmale, wie z.B. des T-Stadiums. Während wir uns für eine getrennte Analyse von T1-3 und T4 entschieden, wurden in der erwähnten Studie jeweils die Gruppen „T1-2“ und „T3-4“ miteinander verglichen. Die

fehlende Korrelation ließe sich hierbei durch die oben erwähnte Größenunabhängigkeit von T4-Tumoren erklären. Außerdem erfolgte in der genannten Studie von Manikandan et al. keine genaue Aufschlüsselung des Lymphknoten-Status anhand der n-Klassifikation wie in unserer Untersuchung. Stattdessen konnte durch die einfache Gruppierung in „Lymphknotenbefall (N+)“ und „Kein Lymphknotenbefall (N-)“ eine signifikante Korrelation von miR-138 mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen demonstriert werden ($p = .01$).

4.3 Studiendesign und –durchführung

Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der Extraktion von miRNAs aus FFPE-Proben von Kopf-Hals-Karzinomen. Während diese Technik bei der Untersuchung diverser Tumoren wie z.B. dem kolorektalen Karzinom bereits seit Jahren durchgeführt wird und als eine Standardmethode moderner Genomuntersuchung angesehen werden kann, liegen uns für Kopf-Hals-Karzinome nur wenige Daten vor [132, 174].

Neben dem Vorteil der großen Verfügbarkeit von Proben, existieren inzwischen auch gut evaluierte Extraktionsprotokolle, die eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Studien ermöglichen. Ein Kritikpunkt des genannten Verfahrens ist allerdings die Tatsache, dass der Vorgang der Formalin-Fixierung zwar die Gewebestruktur konserviert, aber auch zu Abbau bzw. Veränderungen an intrazellulär vorhandenen Nukleinsäuren führt [134, 175]. Aufgrund ihrer geringen Größe und günstigen Tertiärstruktur gelten miRNAs im Vergleich zu anderen Nukleinsäuren wie z.B. mRNA jedoch im Allgemeinen als stabiler. Außerdem zeigten einige Studien eine gute Vergleichbarkeit von Ergebnissen nach der Extraktion aus FFPE- und frischen Tumor-Proben [129, 130].

Zwar wiesen Rentoft et al. bei einer Untersuchung von 29 Proben von Zungenkarzinomen einen Einfluss der Lagerungszeit auf das

Expressionsniveau diverser miRNAs nach, konnten allerdings diesen „storage time bias“ durch eine Regressionsanalyse ausgleichen und bescheinigten der Methode einen großen Informationsgehalt bei guter Reproduzierbarkeit und somit einen wichtigen Stellenwert in der Tumorforschung [131].

In der hier vorliegenden Studie war die Extraktion von miRNAs aus Kopf-Hals-Karzinomen unterschiedlicher Lokalisation erfolgreich. Soweit wir wissen, ist dies die erste umfassende Untersuchung von miRNA-Expressionsprofilen aus verschiedenen HNSCC unter Verwendung der genannten Extraktionsmethode. Die Nutzung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode diente der Normalisierung der Daten und zum Ausgleich potentieller lagerungsbedingter Nukleinsäuredegradation.

Einige Studien analysierten die Expressionsniveaus der jeweilig untersuchten miRNAs im peripheren Blut und konnten durch Manipulation wie z.B. operative Tumorentfernung signifikante Veränderung der gemessenen Spiegel nachweisen [152, 176]. Andere untersuchten, wie bereits erwähnt, sowohl die miRNA-Expression in Lymphknotenmetastasen, als auch im Primärtumor und konnten somit eine Gewebespezifität sowie eine potentielle Eignung als Diagnostikum für die Suche von Metastasen nachweisen [143, 162].

Der bei uns wie auch in anderen Studien durchgeführte Vergleich zwischen Tumor und direkt benachbartem Gewebe bringt dagegen keinen Aufschluss über das Expressionsmuster der untersuchten Sequenzen in anatomisch weiter entferntem Gewebe. Dieses Problem ist der Nutzung besagter FFPE-Proben geschuldet, da kein Vergleichsmaterial (beispielsweise Blut) der betreffenden Patienten zur Verfügung stand. Auch ein Vergleich der Expressionsprofile mit Schleimhautproben gesunder Probanden wäre prinzipiell denkbar gewesen. Hier ist allerdings anzumerken, dass möglicherweise die bereits erwähnte Alters- und Geschlechtsabhängigkeit des miRNA-Profiles als Störgröße die Qualität der Studienergebnisse beeinflusst hätte.

Im Hinblick auf die Korrelationsanalyse der miRNA-Expressionsniveaus mit den klinisch-pathologischen Daten wäre eine weitergehende Untersuchung unter der Voraussetzung einer umfassenderen Datenlage interessant. Eine Analyse des Zusammenhangs zwischen miRNA-Expression und der Exposition

gegenüber Risikofaktoren wie Rauchen und Alkoholkonsum ist hierbei ebenso anzumerken wie eine höhere Probenzahl bzgl. Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen (s.o.). Bisher ist uns nur eine Studie bekannt, die einen Zusammenhang zwischen miR-155 und dem Genuss von Kautabak feststellte [151].

Auch der HPV-Status der jeweiligen Patienten wäre von Interesse für die Auswertung der Daten gewesen. Mehrere Studien konnten bereits einen Zusammenhang zwischen veränderten Expressionsniveaus einiger miRNAs und einer HPV-Infektion feststellen. So zeigten bspw. Lajer et al. unterschiedliche miRNA-Profile bei HPV-positiven und -negativen Kopf-Hals-Karzinomen [177]. Auch das häufig beschriebene jüngere Alter HPV-infizierter Patienten mit HNSCC und das bessere Ansprechen auf therapeutische Standardmaßnahmen sollten bei einer weitergehenden Analyse der miRNA-Expression berücksichtigt werden [178]. Einige onkogen wirksame Sequenzen wie z.B. das *miR-106-363-Cluster* wurden bereits in mehreren Veröffentlichungen vor dem Hintergrund des HPV-induzierten HNSCC erwähnt [106, 177]. Aufgrund der Tatsache, dass der HPV-Status der von uns untersuchten Patienten nicht mehr nachvollziehbar war, wurden die von uns verwendeten miRNAs diesbezüglich nicht überprüft.

4.4 Eignung von miRNAs als Tumormarker

Eine Vielzahl von Studien diskutierte bereits die Eignung verschiedener miRNAs als Biomarker für die Diagnose und Prognoseabschätzung diverser Erkrankungen. Beispiele hierfür sind unter anderen die Detektion zirkulierender Tumorzellen von Magenkarzinomen durch Bestimmung der Konzentration von miR-21 im peripheren Blut oder die Verwendung von miR-221 als Tumormarker für das Maligne Melanom [179, 180].

Für das Kopf-Hals-Karzinom ist bis dato jedoch noch kein Tumormarker in klinischem Gebrauch. Gründe hierfür sind wahrscheinlich bislang eingeschränkte Sensibilität und Spezifität der vorgeschlagenen miRNAs, sich teilweise widersprechende Studienergebnisse und die große Menge ständig neu beschriebener Sequenzen [181]. Trotzdem konnte bereits für einige Sequenzen eine potentielle Eignung als Marker nachgewiesen werden. Liu et al. konnten miR-31 aus dem Speichel von Patienten mit OSCC sowie gesunden Vergleichsprobanden isolieren und zeigten einen Zusammenhang des Expressionsniveaus mit der jeweiligen Tumorlast (Größe in cm). Die Entfernung des Tumors senkte den Spiegel von miR-31 signifikant [182]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der bereits erwähnten Studie von Wong et al. in Bezug auf miR-184 erzielt [152]. Allerdings zeigten sich in den genannten Untersuchungen nur signifikante Korrelationen bei manifesten Karzinomen, nicht bei prämaligen Läsionen wie oralen Leukoplakien etc. Eine potentielle Nutzung als Diagnostikum zur Abschätzung der Gefahr für die Entstehung eines Karzinoms scheint somit bislang nicht gegeben zu sein. Der Nutzen in der Diagnostik erscheint in diesem Zusammenhang generell fraglich, da orale Karzinome, wie bereits erwähnt, meist vom Patienten selbst oder dem behandelnden Zahnarzt erkannt werden können. Bei regelmäßiger und gründlicher klinischer Inspektion durch den Zahn- oder Hausarzt lässt sich ein großer Teil der HNSCC frühzeitig erkennen.

Von größerem Interesse ist daher eine mögliche Nutzung von miRNA-Markern im Hinblick auf die Detektion von Metastasen oder zur Kontrolle des Therapieerfolges sowie als Verlaufparameter zur frühzeitigen Detektion eventueller Tumor-Rezidive.

4.5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte die Eignung der miRNA-Extraktion aus FFPE-Proben als Verfahren zur weiteren Erforschung von Kopf-Hals-Karzinomen bestätigt werden. Die Expressionsniveaus mehrerer bereits bekannter sowie einiger bislang nicht beschriebener miRNAs wurden bestimmt und eine potentielle Eignung als Biomarker bestätigt. Außerdem zeigte die Korrelationsanalyse interessante Zusammenhänge der untersuchten Sequenzen mit patienten- bzw. erkrankungsbezogenen Daten, die einer weitergehenden Untersuchung bedürfen. Eine potentielle zukünftige Nutzung von ausgewählten miRNAs als Diagnostikum oder zur Einschätzung von Prognose bzw. Krankheitsverlauf wird immer wahrscheinlicher, auch für Tumoren aus dem Kopf-Hals-Bereich. Aufgrund der hohen Bedeutung v.a. von Lymphknotenmetastasen für die Überlebenszeit betroffener Patienten sollte insbesondere dieser Aspekt vor dem Hintergrund gewebespezifischer miRNA-Profile weiter untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Ziele der Arbeit

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) gehören weltweit zu den sechs häufigsten Tumoren und sind unter anderem wegen ihrer anatomischen Lokalisation häufig schwierig zu behandeln. Seit ihrer Erstbeschreibung 1993 wurden miRNAs intensiv untersucht und rückten in den letzten Jahren auch in der Tumorforschung in den Fokus des Interesses. Diese kurzen, nicht-kodierenden RNA-Moleküle sind an beinahe allen Stoffwechselwegen beteiligt und beeinflussen über ihr Expressionsniveau auch die Entstehung und den Verlauf diverser Tumor-Erkrankungen.

Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, ob aus Proben in Paraffin eingebetteter HNSCC miRNAs isoliert werden können und ob diese über ihre jeweiligen Expressionsniveaus in Tumor- sowie in gesundem Gewebe als diagnostische oder prognostische Marker verwendet werden können.

Methoden

Es wurden Proben von 43 Plattenepithelkarzinomen ausgewählt, die in den Jahren 2001-2003 in der Klinik für Mund-Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg operativ entfernt worden waren. Mittels Phenol-Chloroform-Methode wurde die im Gewebe enthaltene RNA isoliert und mittels semiquantitativer Real-Time-PCR vermessen. Die Auswahl der 30 zu untersuchenden mirRNAs war in einer vorbereitenden Studie getroffen worden. Die Expressionsniveaus der mirRNAs wurden sowohl im Tumor als auch im umliegenden Gewebe bestimmt und verglichen. Des Weiteren erfolgte eine Korrelationsanalyse der PCR-Daten mit verschiedenen Patienten- bzw. Tumorverlaufsdaten wie TNM-Stadium, Größe oder Differenzierungsgrad.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 43 Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 56 Jahren (+/- 9.8) in die Studie eingeschlossen (70% Männer, 30% Frauen).

Mehrere der getesteten miRNAs zeigten deutliche Expressionsunterschiede zwischen Tumor und umgebenden Gewebe. Besonders deutlich war die Überexpression bei miR-224, miR-205 und miR-200c. Herabreguliert waren vor allem miR-184, miR-99*_1, miR-125b-2* und miR-194*_2. Darüber hinaus zeigten sich signifikante Korrelationen einiger miRNAs mit erhobenen klinisch-pathologischen Daten wie Tumorgroße (miR-125b-2*_1, miR-3156_1, miR-212_1, miR-3687_1, miR-99*_1) und Differenzierungsgrad (miR-146a_1, miR-105*_1). Außerdem korrelierten jeweils 3 miRNAs signifikant mit dem Alter (miR-342, miR-105*_1, miR-184) und dem Geschlecht (miR_194, miR-141, miR-34c) der Patienten.

Diskussion und Schlussfolgerung

Das Verfahren der miRNA-Extraktion aus FFPE-Proben wurde in dieser Studie erfolgreich durchgeführt und ermöglichte die Identifikation bisher unbekannter Sequenzen im oralen Plattenepithelkarzinom. Des Weiteren zeigen die nachgewiesenen Korrelationen der untersuchten miRNAs mit Tumorgroße und Differenzierungsgrad, dass eine potentielle Nutzung auch im Hinblick auf die Einschätzung der Prognose denkbar wäre. Da für das Langzeitüberleben beim Kopf-Hals-Karzinom aber insbesondere das Auftreten von lokoregionären bzw. Fernmetastasen ausschlaggebend ist und in dieser Studie keinerlei Zusammenhang der erstellten Expressionsprofile mit dem Lymphknotenstatus hergestellt werden konnte, wäre eine weitergehende Untersuchung mit Augenmerk auf diesen Aspekt interessant. Ebenfalls wünschenswert für eine weitere Untersuchung wäre eine Unterscheidung der zu Grunde liegenden Risikofaktoren. Hier ist insbesondere die anderenorts berichtete abweichende miRNA-Signatur bei HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen zu erwähnen.

6 EIGENE VERÖFFENTLICHUNG

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden im Juni 2016 im Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery veröffentlicht:

Moratin, J., S. Hartmann, R. Brands, M. Brisam, G. Mutzbauer, C. Scholz, A. Seher, U. Muller-Richter, A. C. Kubler and C. Linz (2016). "Evaluation of miRNA-expression and clinical tumour parameters in oral squamous cell carcinoma (OSCC)." J Craniomaxillofac Surg. [183]

Die Studienergebnisse wurden auf dem Jahreskongress der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie (AgKi) 2016 präsentiert und mit dem Preis für den „besten Erstlingsvortrag“ ausgezeichnet sowie als Posterbeitrag auf der Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (DGMKG) 2016 vorgestellt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): p. 1374-403.
2. Lippman, S.M., et al., *Epidemiology, biology, and chemoprevention of aerodigestive cancer*. Cancer, 1994. **74**(9 Suppl): p. 2719-25.
3. La Vecchia, C., et al., *Epidemiology and prevention of oral cancer*. Oral Oncol, 1997. **33**(5): p. 302-12.
4. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
5. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
6. Forastiere, A., et al., *Head and neck cancer*. N Engl J Med, 2001. **345**(26): p. 1890-900.
7. Robert Koch-Institut, B., *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 2013, Robert Koch-Institut: Berlin. p. 24-27.
8. Nohata, N., et al., *Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)*. J Hum Genet, 2011. **56**(8): p. 595-601.
9. Coordes, A., et al., *[Role of miRNA in malignoma of the head and neck]*. Laryngorhinootologie, 2014. **93**(3): p. 201-9; quiz 210.
10. de Leeuw, J.R., et al., *Prediction of depressive symptomatology after treatment of head and neck cancer: the influence of pre-treatment physical and depressive symptoms, coping, and social support*. Head Neck, 2000. **22**(8): p. 799-807.
11. de Leeuw, J.R., et al., *Prediction of depression 6 months to 3 years after treatment of head and neck cancer*. Head Neck, 2001. **23**(10): p. 892-8.
12. Nguyen, N.P., et al., *Impact of dysphagia on quality of life after treatment of head-and-neck cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **61**(3): p. 772-8.
13. Chan, J.Y., et al., *The relationship between depressive symptoms and initial quality of life and function in head and neck cancer*. Laryngoscope, 2011. **121**(6): p. 1212-8.
14. Misono, S., et al., *Incidence of suicide in persons with cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(29): p. 4731-8.
15. Suarez, C., et al., *Tumours of familial origin in the head and neck*. Oral Oncol, 2006. **42**(10): p. 965-78.
16. Lubin, J.H., et al., *Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies*. Am J Epidemiol, 2009. **170**(8): p. 937-47.
17. Pelucchi, C., et al., *Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver*. Eur J Cancer Prev, 2008. **17**(4): p. 340-4.
18. Blot, W.J., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 3282-7.

19. Macfarlane, G.J., et al., *Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1995. **31B**(3): p. 181-7.
20. Hayes, R.B., et al., *Tobacco and alcohol use and oral cancer in Puerto Rico*. Cancer Causes Control, 1999. **10**(1): p. 27-33.
21. Dayyani, F., et al., *Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)*. Head Neck Oncol, 2010. **2**: p. 15.
22. Hammarstedt, L., et al., *Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(11): p. 2620-3.
23. Talis, A.L., J.M. Huibregtse, and P.M. Howley, *The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6439-45.
24. Curado, M.P. and P. Boyle, *Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol*. Curr Opin Oncol, 2013. **25**(3): p. 229-34.
25. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. Lancet Oncol, 2010. **11**(8): p. 781-9.
26. Westra, W.H., *The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer*. Head Neck Pathol, 2009. **3**(1): p. 78-81.
27. Oreggia, F., et al., *Meat, fat and risk of laryngeal cancer: a case-control study in Uruguay*. Oral Oncol, 2001. **37**(2): p. 141-5.
28. Bosetti, C., et al., *Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(10): p. 1091-4.
29. Bosetti, C., et al., *Energy, macronutrients and laryngeal cancer risk*. Ann Oncol, 2003. **14**(6): p. 907-12.
30. Schneider, G. and O.H. Kramer, *NFkappaB/p53 crosstalk-a promising new therapeutic target*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1815**(1): p. 90-103.
31. Chaturvedi, M.M., et al., *NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'*. Oncogene, 2011. **30**(14): p. 1615-30.
32. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
33. Karin, M., *NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets*. Mol Carcinog, 2006. **45**(6): p. 355-61.
34. Karin, M., *NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(5): p. a000141.
35. Yan, B., et al., *Unraveling regulatory programs for NF-kappaB, p53 and microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73656.
36. Takahra, T., et al., *Induction of myofibroblast MMP-9 transcription in three-dimensional collagen I gel cultures: regulation by NF-kappaB, AP-1 and Sp1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(2): p. 353-63.
37. Lee, T.L., et al., *A signal network involving coactivated NF-kappaB and STAT3 and altered p53 modulates BAX/BCL-XL expression and*

- promotes cell survival of head and neck squamous cell carcinomas. Int J Cancer*, 2008. **122**(9): p. 1987-98.
38. Hartmann, S., et al., *Influence of epidermal growth factor receptor expression on the cetuximab and panitumumab response rates of head and neck carcinoma cells. J Craniomaxillofac Surg*, 2014. **42**(7): p. 1322-8.
39. van der Waal, I., *Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. Oral Oncol*, 2009. **45**(4-5): p. 317-23.
40. Warnakulasuriya, S., N.W. Johnson, and I. van der Waal, *Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med*, 2007. **36**(10): p. 575-80.
41. Scheifele, C. and P.A. Reichart, *[Oral leukoplakia in manifest squamous epithelial carcinoma. A clinical prospective study of 101 patients]. Mund Kiefer Gesichtschir*, 1998. **2**(6): p. 326-30.
42. Schepman, K., et al., *Concomitant leukoplakia in patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Dis*, 1999. **5**(3): p. 206-9.
43. Brouns, E., et al., *Malignant transformation of oral leukoplakia in a well-defined cohort of 144 patients. Oral Dis*, 2014. **20**(3): p. e19-24.
44. Scully, C., J.J. Sciubba, and J.V. Bagan, *Oral mucosal precancer and cancer: A helpful discriminating clinical tool. Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2015. **20**(5): p. e587-90.
45. Maserejian, N.N., et al., *Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(4): p. 774-81.
46. Baric, J.M., et al., *Influence of cigarette, pipe, and cigar smoking, removable partial dentures, and age on oral leukoplakia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1982. **54**(4): p. 424-9.
47. Gandolfo, S., et al., *Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. Oral Oncol*, 2004. **40**(1): p. 77-83.
48. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMW, D.K.e.V.u.D.K.e.V., *Leitlinienprogramm Onkologie: Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*, D.G.f. MKG-Chirurgie, Editor. 2012.
49. Wittekind, C., *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Aufl. ed. 2010, Weinheim: Wiley-Blackwell. XIX, 295 S.
50. Carinci, F., et al., *Extension as a prognostic factor in oropharyngeal cancer: largest mucosal dimension compared with number of (sub)sites involved. Br J Oral Maxillofac Surg*, 1998. **36**(6): p. 440-5.
51. Fortin, A., et al., *Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers? J Clin Oncol*, 2001. **19**(21): p. 4107-16.
52. Hollows, P., P.G. McAndrew, and M.G. Perini, *Delays in the referral and treatment of oral squamous cell carcinoma. Br Dent J*, 2000. **188**(5): p. 262-5.
53. Pitiphat, W., et al., *Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. J Dent Res*, 2002. **81**(3): p. 192-7.

54. Leslie, A., et al., *Staging of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a comparison of MRI and CT in T- and N-staging*. J Comput Assist Tomogr, 1999. **23**(1): p. 43-9.
55. Vidiri, A., et al., *Oral cavity and base of the tongue tumors. Correlation between clinical, MRI and pathological staging of primary tumor*. J Exp Clin Cancer Res, 2007. **26**(4): p. 575-82.
56. Pauleit, D., et al., *18F-FET PET compared with 18F-FDG PET and CT in patients with head and neck cancer*. J Nucl Med, 2006. **47**(2): p. 256-61.
57. Andrlé, J., et al., *Initial staging examinations for head and neck squamous cell carcinoma: are they appropriate?* J Laryngol Otol, 2009. **123**(8): p. 885-8.
58. Castelli, M.L., et al., *Pectoralis major myocutaneous flap: analysis of complications in difficult patients*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2001. **258**(10): p. 542-5.
59. Azizzadeh, B., et al., *Radial forearm free flap pharyngoesophageal reconstruction*. Laryngoscope, 2001. **111**(5): p. 807-10.
60. Makitie, A.A., et al., *Head and neck reconstruction with anterolateral thigh flap*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2003. **129**(5): p. 547-55.
61. Muldowney, J.B., et al., *Oral cavity reconstruction using the free radial forearm flap*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1987. **113**(11): p. 1219-24.
62. Zaker Shahrak, A., et al., *Morphological and morphometric evaluation of the ilium, fibula, and scapula bones for oral and maxillofacial reconstruction*. Microsurgery, 2014. **34**(8): p. 638-45.
63. Parsons, J.T., et al., *An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. **39**(1): p. 137-48.
64. O'Brien, C.J., et al., *Influence of bone invasion and extent of mandibular resection on local control of cancers of the oral cavity and oropharynx*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2003. **32**(5): p. 492-7.
65. Byers, R.M., et al., *Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue?* Head Neck, 1998. **20**(2): p. 138-44.
66. Akhtar, S., M. Ikram, and S. Ghaffar, *Neck involvement in early carcinoma of tongue. Is elective neck dissection warranted?* J Pak Med Assoc, 2007. **57**(6): p. 305-7.
67. Robbins, K.T., et al., *Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002. **128**(7): p. 751-8.
68. Hoffmann, M., et al., *Long term results of postoperative Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT) in the treatment of Squamous Cell Carcinoma (SCC) located in the oropharynx or oral cavity*. Radiat Oncol, 2015. **10**: p. 251.
69. Pignon, J.P., et al., *Meta-Analyses of Chemotherapy in Head and Neck Cancer (MACH-NC): an update*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **69**(2 Suppl): p. S112-4.

70. Pignon, J.P., et al., *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients*. *Radiother Oncol*, 2009. **92**(1): p. 4-14.
71. Bernier, J., *Current state-of-the-art for concurrent chemoradiation*. *Semin Radiat Oncol*, 2009. **19**(1): p. 3-10.
72. Eckardt, A., G. Wegener, and J.H. Karstens, *[Preoperative radiochemotherapy of advanced resectable cancer of the oral cavity with cisplatin vs paclitaxel/carboplatin. Analysis of two multimodality treatment concepts]*. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2006. **10**(1): p. 30-6.
73. Corvo, R., *Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma*. *Radiother Oncol*, 2007. **85**(1): p. 156-70.
74. Bernier, J. and J.S. Cooper, *Chemoradiation after surgery for high-risk head and neck cancer patients: how strong is the evidence?* *Oncologist*, 2005. **10**(3): p. 215-24.
75. Lamont, E.B. and E.E. Vokes, *Chemotherapy in the management of squamous-cell carcinoma of the head and neck*. *Lancet Oncol*, 2001. **2**(5): p. 261-9.
76. Brands, R.C., et al., *Cytotoxic effects of SMAC-mimetic compound LCL161 in head and neck cancer cell lines*. *Clin Oral Investig*, 2016.
77. Brands, R.C., et al., *Co-treatment of wild-type EGFR head and neck cancer cell lines with afatinib and cisplatin*. *Mol Med Rep*, 2016. **13**(3): p. 2338-44.
78. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(1): p. 21-8.
79. Kovacs, A.F., et al., *Multimodality treatment including postoperative radiation and concurrent chemotherapy with weekly docetaxel is feasible and effective in patients with oral and oropharyngeal cancer*. *Strahlenther Onkol*, 2005. **181**(1): p. 26-34.
80. Bushati, N. and S.M. Cohen, *microRNA functions*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 175-205.
81. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(2): p. 102-14.
82. Lee, R., R. Feinbaum, and V. Ambros, *A short history of a short RNA*. *Cell*, 2004. **116**(2 Suppl): p. S89-92, 1 p following S96.
83. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
84. Riedmann, L.T. and R. Schwentner, *miRNA, siRNA, piRNA and argonautes: news in small matters*. *RNA Biol*, 2010. **7**(2): p. 133-9.
85. Kloosterman, W.P. and R.H. Plasterk, *The diverse functions of microRNAs in animal development and disease*. *Dev Cell*, 2006. **11**(4): p. 441-50.
86. Chang, T.C. and J.T. Mendell, *microRNAs in vertebrate physiology and human disease*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007. **8**: p. 215-39.

87. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
88. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
89. Betel, D., et al., *The microRNA.org resource: targets and expression*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D149-53.
90. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
91. Ivanovska, I. and M.A. Cleary, *Combinatorial microRNAs: working together to make a difference*. Cell Cycle, 2008. **7**(20): p. 3137-42.
92. Krek, A., et al., *Combinatorial microRNA target predictions*. Nat Genet, 2005. **37**(5): p. 495-500.
93. Londin, E., et al., *Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(10): p. E1106-15.
94. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
95. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
96. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
97. Landthaler, M., A. Yalcin, and T. Tuschl, *The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis*. Curr Biol, 2004. **14**(23): p. 2162-7.
98. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA, 2004. **10**(2): p. 185-91.
99. Garzon, R., G. Marcucci, and C.M. Croce, *Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(10): p. 775-89.
100. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
101. Boldin, M.P. and D. Baltimore, *MicroRNAs, new effectors and regulators of NF-kappaB*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 205-20.
102. Papagiannakopoulos, T., A. Shapiro, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 8164-72.
103. Hermeking, H., *The miR-34 family in cancer and apoptosis*. Cell Death Differ, 2010. **17**(2): p. 193-9.
104. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
105. Li, B., et al., *Reduced miR-34a expression in normal cervical tissues and cervical lesions with high-risk human papillomavirus infection*. Int J Gynecol Cancer, 2010. **20**(4): p. 597-604.
106. Wald, A.I., et al., *Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus*. Head Neck, 2011. **33**(4): p. 504-12.

107. Ji, Q., et al., *Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 266.
108. Ji, Q., et al., *MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6816.
109. Shi, L., et al., *hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells*. Brain Res, 2008. **1236**: p. 185-93.
110. Xu, X., et al., *MicroRNA-25 promotes cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **421**(4): p. 640-5.
111. Babu, J.M., et al., *A miR-centric view of head and neck cancers*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1816**(1): p. 67-72.
112. Lo, W.L., et al., *MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells*. J Pathol, 2011. **223**(4): p. 482-95.
113. Li, J., et al., *miR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of Akt2 expression*. Cancer Lett, 2011. **304**(1): p. 52-9.
114. Einfeld, A.K., et al., *miR-3151 interplays with its host gene BAALC and independently affects outcome of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(2): p. 249-58.
115. Mao, Y., et al., *MiR-205 promotes proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells by activation of AKT signalling*. J Int Med Res, 2016. **44**(2): p. 231-40.
116. Hezova, R., et al., *MiR-205 functions as a tumor suppressor in adenocarcinoma and an oncogene in squamous cell carcinoma of esophagus*. Tumour Biol, 2016. **37**(6): p. 8007-18.
117. Wong, T.S., et al., *Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling*. Int J Cancer, 2008. **123**(2): p. 251-7.
118. Mutallip, M., et al., *Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) suppresses cell apoptosis and its regulation by miR-133alpha in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)*. Int J Mol Med, 2011. **27**(3): p. 345-52.
119. Nohata, N., et al., *miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2011. **2**(1-2): p. 29-42.
120. Yu, Z.W., et al., *MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines*. Oral Oncol, 2010. **46**(4): p. 317-22.
121. Hess, A.K., et al., *MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma*. Eur J Cancer, 2017. **77**: p. 3-12.
122. Hausler, S.F., et al., *Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening*. Br J Cancer, 2010. **103**(5): p. 693-700.
123. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.

124. Ries, J., et al., *Alterations in miRNA expression patterns in whole blood of OSCC patients*. In Vivo, 2014. **28**(5): p. 851-61.
125. Cheng, L., et al., *Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
126. Van Wynsberghe, P.M., *Analysis of microRNA Expression and Function*. 2011. **106**: p. 219-52.
127. Blondal, T., et al., *Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids*. Methods, 2013. **59**(1): p. S1-6.
128. Pena-Llopis, S. and J. Brugarolas, *Simultaneous isolation of high-quality DNA, RNA, miRNA and proteins from tissues for genomic applications*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2240-55.
129. Li, J., et al., *Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells*. BMC Biotechnol, 2007. **7**: p. 36.
130. Hasemeier, B., et al., *Reliable microRNA profiling in routinely processed formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer specimens using fluorescence labelled bead technology*. BMC Biotechnol, 2008. **8**: p. 90.
131. Rentoft, M., et al., *miRNA analysis of formalin-fixed squamous cell carcinomas of the tongue is affected by age of the samples*. Int J Oncol, 2011. **38**(1): p. 61-9.
132. Xi, Y., et al., *Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples*. RNA, 2007. **13**(10): p. 1668-74.
133. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
134. von Ahlfen, S., et al., *Determinants of RNA quality from FFPE samples*. PLoS One, 2007. **2**(12): p. e1261.
135. Nakada, C., et al., *Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c*. J Pathol, 2008. **216**(4): p. 418-27.
136. Shinozaki, A., et al., *Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma*. Cancer Res, 2010. **70**(11): p. 4719-27.
137. Kim, J.S., J.M. Kurie, and Y.H. Ahn, *BMP4 depletion by miR-200 inhibits tumorigenesis and metastasis of lung adenocarcinoma cells*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 173.
138. Shi, C. and Z. Zhang, *The prognostic value of the miR-200 family in ovarian cancer: a meta-analysis*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2016. **95**(5): p. 505-12.
139. Zidar, N., et al., *Down-regulation of microRNAs of the miR-200 family and miR-205, and an altered expression of classic and desmosomal cadherins in spindle cell carcinoma of the head and neck--hallmark of epithelial-mesenchymal transition*. Hum Pathol, 2011. **42**(4): p. 482-8.
140. Xie, X., et al., *Targeting HPV16 E6-p300 interaction reactivates p53 and inhibits the tumorigenicity of HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma*. Oncogene, 2014. **33**(8): p. 1037-46.

141. Okamura, K., W.J. Chung, and E.C. Lai, *The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs*. Cell Cycle, 2008. **7**(18): p. 2840-5.
142. Childs, G., et al., *Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma*. Am J Pathol, 2009. **174**(3): p. 736-45.
143. Fletcher, A.M., A.C. Heaford, and D.K. Trask, *Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific mir-205*. Transl Oncol, 2008. **1**(4): p. 202-8.
144. Gee, H.E., et al., *hsa-mir-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer*. Cancer, 2010. **116**(9): p. 2148-58.
145. Liu, Y., et al., *Expression of miR-224, miR-145, and their putative target ADAM17 in hepatocellular carcinoma*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(8): p. 720-2.
146. Ling, H., et al., *The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis*. Gut, 2015.
147. Adamopoulos, P.G., et al., *miR-224 overexpression is a strong and independent prognosticator of short-term relapse and poor overall survival in colorectal adenocarcinoma*. Int J Oncol, 2015. **46**(2): p. 849-59.
148. Scapoli, L., et al., *MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010. **23**(4): p. 1229-34.
149. Xin, J.X., et al., *miR-99 inhibits cervical carcinoma cell proliferation by targeting TRIB2*. Oncol Lett, 2013. **6**(4): p. 1025-1030.
150. Chi, H., *miR-194 regulated AGK and inhibited cell proliferation of oral squamous cell carcinoma by reducing PI3K-Akt-FoxO3a signaling*. Biomed Pharmacother, 2015. **71**: p. 53-7.
151. Manikandan, M., et al., *Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics*. J Oral Pathol Med, 2014.
152. Wong, T.S., et al., *Mature miR-184 and squamous cell carcinoma of the tongue*. ScientificWorldJournal, 2009. **9**: p. 130-2.
153. Santhi, W.S., et al., *Oncogenic microRNAs as biomarkers of oral tumorigenesis and minimal residual disease*. Oral Oncol, 2013. **49**(6): p. 567-75.
154. Yu, J., et al., *MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19300-5.
155. Selvamani, A., et al., *Circulating miRNA profiles provide a biomarker for severity of stroke outcomes associated with age and sex in a rat model*. Clin Sci (Lond), 2014. **127**(2): p. 77-89.
156. Halper, B., et al., *Influence of age and physical fitness on miRNA-21, TGF-beta and its receptors in leukocytes of healthy women*. Exerc Immunol Rev, 2015. **21**: p. 154-63.

157. Ohyashiki, M., et al., *Age-related decrease of miRNA-92a levels in human CD8+ T-cells correlates with a reduction of naive T lymphocytes*. Immun Ageing, 2011. **8**(1): p. 11.
158. Liu, X., et al., *MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines*. Cancer Lett, 2009. **286**(2): p. 217-22.
159. Liu, X., et al., *MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines*. Cancer Genomics Proteomics, 2009. **6**(3): p. 131-9.
160. Kalfert, D., et al., *MicroRNA profile in site-specific head and neck squamous cell cancer*. Anticancer Res, 2015. **35**(4): p. 2455-63.
161. de Carvalho, A.C., et al., *Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. BMC Med, 2015. **13**: p. 108.
162. Barker, E.V., et al., *microRNA evaluation of unknown primary lesions in the head and neck*. Mol Cancer, 2009. **8**: p. 127.
163. Lin, S.C., et al., *miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis*. Oral Oncol, 2010. **46**(3): p. 204-8.
164. Liu, H., et al., *MiR-212-3p inhibits glioblastoma cell proliferation by targeting SGK3*. J Neurooncol, 2015. **122**(3): p. 431-9.
165. Incoronato, M., et al., *miR-212 increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in non-small cell lung cancer by targeting the antiapoptotic protein PED*. Cancer Res, 2010. **70**(9): p. 3638-46.
166. Sun, D., et al., *Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the miR-99a/let-7c/miR-125b-2 miRNA cluster in prostate cancer cells*. Oncogene, 2014. **33**(11): p. 1448-57.
167. Deng, S., et al., *MicroRNA-125b-2 overexpression represses ectodermal differentiation of mouse embryonic stem cells*. Int J Mol Med, 2015. **36**(2): p. 355-62.
168. Tao, S.F., H.F. He, and Q. Chen, *Quercetin inhibits proliferation and invasion acts by up-regulating miR-146a in human breast cancer cells*. Mol Cell Biochem, 2015. **402**(1-2): p. 93-100.
169. Wang, R.J., et al., *Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(1): p. 765-71.
170. Xu, L. and W. Tang, *Associations of Polymorphisms in mir-196a2, mir-146a and mir-149 with Colorectal Cancer Risk: A Meta-Analysis*. Pathol Oncol Res, 2015.
171. Cervigne, N.K., et al., *Recurrent genomic alterations in sequential progressive leukoplakia and oral cancer: drivers of oral tumorigenesis?* Hum Mol Genet, 2014. **23**(10): p. 2618-28.
172. Jiang, X., et al., *Numb regulates glioma stem cell fate and growth by altering epidermal growth factor receptor and Skp1-Cullin-F-box ubiquitin ligase activity*. Stem Cells, 2012. **30**(7): p. 1313-26.

173. Hung, P.S., et al., *miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79926.
174. Lewis, F., et al., *Unlocking the archive--gene expression in paraffin-embedded tissue*. J Pathol, 2001. **195**(1): p. 66-71.
175. Masuda, N., et al., *Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(22): p. 4436-43.
176. Wong, T.S., et al., *Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2588-92.
177. Lajer, C.B., et al., *The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer*. Br J Cancer, 2012. **106**(9): p. 1526-34.
178. Vidal, L. and M.L. Gillison, *Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a distinct disease type*. Hematol Oncol Clin North Am, 2008. **22**(6): p. 1125-42, vii.
179. Inada, T., et al., *Hair shaft miRNA-221 levels as a new tumor marker of malignant melanoma*. J Dermatol, 2015. **42**(2): p. 198-201.
180. Zheng, Y., et al., *MicroRNA-21 is a new marker of circulating tumor cells in gastric cancer patients*. Cancer Biomark, 2011. **10**(2): p. 71-7.
181. Janiszewska, J., M. Szaumkessel, and K. Szyfter, *microRNAs are important players in head and neck carcinoma: a review*. Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **88**(3): p. 716-28.
182. Liu, C.J., et al., *Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2012. **34**(2): p. 219-24.
183. Moratin, J., et al., *Evaluation of miRNA-expression and clinical tumour parameters in oral squamous cell carcinoma (OSCC)*. J Craniomaxillofac Surg, 2016.