

Aus dem Bereich Neurochirurgie  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Identifizierung und Charakterisierung des microRNA-Profiles  
bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: M. Sc. Cornelia Lerner

geb. am: 15.03.1988 in Idar-Oberstein

Tag der Promotion:

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Steffi Urbschat  
Herr Prof. Dr. med. Bernhard Schick

*Für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
2.1 Thematische Einführung .....	5
2.2 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region.....	6
2.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognoseaussichten.....	7
2.2.2 Klassifikation, Staging und Malignitätsgrad.....	14
2.2.3 Diagnostik und Therapie.....	17
2.2.4 Genetische Veränderungen.....	19
2.3 miRNA .....	23
2.3.1 Entdeckung und Nomenklatur.....	23
2.3.2 Biogenese und Funktion .....	24
2.3.3 Bedeutung in der Tumorgenese .....	26
2.4 Eigene Fragestellung .....	33
<b>3. Material und Methodik</b> .....	<b>34</b>
3.1 Untersuchungsmaterialien .....	34
3.1.1 Blutproben .....	34
3.1.2 Tumor- und Normalgewebe .....	37
3.1.3 Abstrichmaterial.....	40
3.1.4 Zelllinien .....	42
3.2 Material- und Herstellernachweis .....	42
3.2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterial.....	42
3.2.2 Lösungen und Puffer .....	45
3.2.3 Geräte und Software .....	45
3.3 Immunhistochemische Analysen.....	47
3.3.1 Gewebepreparation.....	47
3.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	48
3.3.3 Immunhistochemische Färbung von p16 .....	50
3.4 RNA-Isolierung inklusive miRNA.....	51
3.4.1 Isolierung der RNA inklusive miRNA aus Vollblut .....	51
3.4.2 Isolierung der RNA inklusive miRNA aus Paraffinschnitten.....	52
3.4.3 Isolierung der RNA inklusive miRNA aus Abstrichmaterial.....	53
3.4.4 Isolierung der RNA inklusive miRNA aus Zellkulturen.....	54
3.5 Bestimmung des miRNA-Profiles mittels Microarrays .....	54

3.6 Bestimmung des miRNA-Profiles mittels quantitativer Real-Time PCR .....	56
3.6.1 Reverse Transkription mit TaqMan® miRNA-spezifischen stem loop-Primern.....	56
3.6.2 Quantitative Real-Time PCR mit TaqMan® MicroRNA Assays .....	58
3.6.3 Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung.....	61
3.6.4 Etablierung der endogenen Kontrolle (Referenzgen).....	64
3.7 Funktionelle Analysen.....	66
3.7.1 Kultivierung und Charakterisierung der Zelllinien .....	66
3.7.1.1 Kultivierung von adhärennten humanen Tumorzellen .....	66
3.7.1.2 Chromosomenpräparation aus Zellkulturen .....	66
3.7.1.3 Lymphozyten-Kurzzeitkultur und Chromosomenpräparation aus Lymphozyten ..	67
3.7.1.4 GTG-Bänderung und Karyotypisierung.....	68
3.7.1.5 DNA-Isolierung aus Zellkulturen und Blut .....	69
3.7.1.6 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH).....	70
3.7.2 Transfektion mit <i>miVana</i> ™ miRNA-Mimics und -Inhibitoren .....	74
3.7.3 Proliferationsanalyse mit dem xCELLigence-System.....	77
3.7.3.1 Verwendung von Aphidicolin als Proliferationshemmer.....	78
3.7.4 Migrationsanalyse mit dem FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System.....	79
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>81</b>
4.1 Patientenkollektiv .....	81
4.1.1 Geschlechts- und altersgepaarte Patientenkollektive.....	84
4.2 Immunhistochemische Untersuchung von p16.....	85
4.3 Bestimmung des miRNA-Profiles in humanem Vollblut .....	87
4.3.1 Bestimmung des miRNA-Profiles mittels Microarray.....	87
4.3.2 Bestimmung des miRNA-Profiles mittels quantitativer Real-Time PCR.....	91
4.4 Bestimmung des Transkriptlevels ausgewählter miRNAs in FFPE-Tumorgewebe unter Verwendung der quantitativen Real-Time PCR .....	96
4.5 Bestimmung des Transkriptlevels ausgewählter miRNAs an Abstrichmaterial unter Verwendung der quantitativen Real-Time PCR .....	98
4.6 Funktionelle Analysen.....	99
4.6.1 Charakterisierung der Zelllinien FaDu und UM-SCC-1.....	100
4.6.2 Vitalität der HNSCC-Zellen nach der Transfektion und deren Effizienz.....	104
4.6.3 Analyse des Real-Time Proliferationsverhaltens von humanen Tumorzellen .....	107
4.6.3.1 Bestimmung des Real-Time Proliferationsverhalten von FaDu-Zellen .....	107
4.6.3.2 Bestimmung des Real-Time Proliferationsverhalten von UM-SCC-1-Zellen.....	109
4.6.3.3 Auswirkungen von DMSO und Aphidicolin auf das Proliferations- und Migrations- verhalten von humanen Tumorzellen.....	111
4.6.4 Analyse der Migrationsfähigkeit von humanen Tumorzellen .....	117

4.6.4.1 Bestimmung des Migrationsverhaltens von FaDu-Zellen .....	117
4.6.4.2 Bestimmung des Migrationsverhaltens von UM-SCC-1-Zellen.....	119
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>123</b>
5.1 Patientenkollektiv .....	123
5.2 Kritische Anmerkungen zum Untersuchungskollektiv .....	125
5.2.1 Heterogenität des Gewebes .....	125
5.2.2 Blutproben von gesunden Probanden.....	126
5.2.3 Gewebeproben von Tumorpatienten .....	127
5.3 p16 als Surrogatmarker für HPV .....	128
5.4 Veränderungen auf miRNA-Ebene.....	130
5.4.1 Expression von <i>miR-125a</i> und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen .....	133
5.4.2 Expression von <i>miR-218</i> und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen .....	136
5.4.3 Expression von <i>miR-1246</i> und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen .....	139
5.4.4 Expression von <i>miR-146a</i> und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen .....	141
5.4.5 Expression von <i>miR-155</i> und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen .....	146
5.5 Ausblick und Vorschläge für weitere Untersuchungen .....	150
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>152</b>
<b>7. Publikationen/Dank</b> .....	<b>182</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Aqua dest	destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CGH	Vergleichende genomische Hybridisierung
cm	Zentimeter
C <sub>T</sub>	Schwellenwertzyklus (threshold cycle)
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Tetraethylendiaminoessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<i>et al.</i>	und andere [ <i>et alii</i> (Maskulinum), <i>et aliae</i> (Femininum)]
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FFPE	Formalin fixiert und Paraffin eingebettet
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GTG	Giemsagefärbte, Trypsinverdaute G-Bänder
h	Stunde (hour)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNSCC	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (head and neck squamous cell carcinoma)
HPV	Humaner Papillomvirus/Humane Papillomviren
hsa	Homo sapiens, humane Spezies ( <i>homo sapiens</i> )
l	Liter
mg, mm, ml	Milligramm, Millimeter, Milliliter
mM, M	Milli-, Molarität (entspricht der molaren Masse in einem Liter)
min	Minute

mmu	Hausmaus ( <i>mus musculus</i> )
miR; miRNA	microRNA
miRNome	Gesamtheit aller miRNA-kodierenden Gene
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
µg, µm, µl	Mikrogramm, Mikrometer, Mikroliter
n	Probengröße
ng, nm	Nanogramm, Nanometer
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
nt	Nukleotid
p16	auch CDKN2A, Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)
p21	auch CDKN1A, Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)
p	statistische Signifikanz
PBS	Phosphatgepufferte Standardsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
SCC	Plattenepithelkarzinom (squamous cell carcinoma)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Citratgepufferte Standardsalzlösung
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Lymphozyten
TP53	auch p53, Tumorprotein p53 (tumor protein p53)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

## 1. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region gehören zu den häufigsten malignen Tumoren weltweit mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 50 Prozent. Trotz Fortschritten in den verschiedenen therapeutischen Ansätzen hat sich diese Rate in der letzten Dekade nicht wesentlich verbessert, sodass die Aufdeckung aussagekräftiger Marker absolut essentiell ist. Im Fokus der aktuellen Forschung stehen microRNAs und deren Relevanz als diagnostische, prognostische und therapeutische Marker. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, Unterschiede im microRNA-Muster im Vollblut von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zu identifizieren und im Weiteren deren funktionelle Rolle näher zu untersuchen.

Microarray-Analysen mit 24 Blutproben von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region und von geschlechts- und altersgepaarten gesunden Probanden wurden durchgeführt und mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion an einem Kollektiv von 83 Proben validiert. Die Ergebnisse wurden mit klinischen Parametern korreliert. Parallel dazu wurden ausgewählte microRNAs sowohl an Formalin fixiertem und Paraffin eingebettetem Tumorgewebe (n=30) als auch an Tumorabstrichmaterial (n=31) untersucht. Der humane Papillomvirus-Status der Tumorpatienten wurde indirekt über eine immunhistochemische Färbung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors 2A (n=88) ermittelt. Im Anschluss an diese deskriptiven Analysen wurden funktionelle Untersuchungen an zwei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien durchgeführt, um eine mögliche Beeinflussung des Proliferations- und Migrationspotenzials in den beiden Zelllinien nach erfolgreicher Transfektion mit microRNA-Mimics und -Inhibitoren für die microRNAs 146a und 155 nachzuweisen.

Untersuchungen der Blutproben mittels Microarray- und quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktionsanalyse konnten keine signifikanten Unterschiede im microRNA-Muster zwischen Plattenepithelkarzinom-Patienten und gesunden Probanden aufdecken. Interessanterweise zeigte sich bei reiner Betrachtung des Tumorpatientenkollektivs eine Korrelation veränderter microRNA-Level mit klinischen Parametern. So zeigte sich im Blut eines definierten geschlechts- und altersgepaarten Kollektivs von 20 Plattenepithelkarzinom-Patienten im Hinblick auf das Metastasierungsverhalten eine signifikant reduzierte Genexpression von microRNA 146a ( $p=0,023$ ) und microRNA 155 ( $p=0,028$ ) in Patienten mit Fernmetastasen. Des Weiteren konnte eine Überexpression des Gens microRNA 125a ( $p=0,006$ ) in Patienten mit Lymphknotenmetastasen beobachtet werden. Während im Abstrichmaterial eine microRNA-Analyse, vermutlich aufgrund der Dominanz anderer Zelltypen, nicht auswertbar war, wiesen Untersuchungen im Tumorgewebe von Plattenepithelkarzinom-Patienten signifikant erniedrigte Expressionslevel des Gens

microRNA 155 ( $p=0,003$ ) und microRNA 218 ( $p=0,009$ ) verglichen mit normalem Plattenepithel auf. Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Gens microRNA 125a im Tumorgewebe und dem pathologischen Malignitätsgrad ( $p=0,003$ ) sowie eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des Gens microRNA 146a im Tumorgewebe und einer zunehmenden TumorgroÙe/-ausdehnung ( $p=0,005$ ). Darüber hinaus konnte der Einfluss der beiden microRNAs 146a und 155 auf das Proliferations- und Migrationspotenzial von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zellen demonstriert werden. Während jeweils eine Inhibierung der microRNAs 146a und 155 zu einem dramatisch gesteigerten Proliferations- und Migrationspotenzial führt, bewirkt eine Zugabe der entsprechenden microRNAs einen inhibierenden Effekt dieser biologischen Prozesse.

Die Charakterisierung der Genexpression der beiden microRNAs 146a und 155 sowie ihrer funktionellen Rolle in der Tumorbiologie bestätigt deren Beeinflussung biologischer Prozesse auf zellulärer Ebene und demonstriert ihr enormes Potenzial als prognostische Marker bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region. MicroRNA-Analysen könnten zukünftig neben einer gezielteren Prognoseeinschätzung für den einzelnen Patienten auch eine frühe Detektion von Tumoren mit einem erhöhten Fernmetastasierungspotenzial ermöglichen.

## Summary

### Identification and characterization of microRNA profile in patients with head and neck squamous cell carcinomas

Head and neck squamous cell carcinoma belongs to the most common malignancies worldwide with a five-year survival rate of approximately 50 percent. Despite advances in chemotherapy, radiation and surgery, this rate has not essentially changed during the last decade. Therefore, reliable markers are necessary. The focus of current research lies on microRNAs and their relevance as diagnostic, prognostic and therapeutic markers. The aim of this study was to detect differences in microRNA expression in whole blood of head and neck squamous cell carcinoma patients and further on to analyze the functional role of them.

Microarray analyses of 24 blood samples from head and neck squamous cell carcinoma patients and sex- and age-matched healthy volunteers were performed and validated by quantitative real-time polymerase chain reaction (n=83). Findings were correlated with clinical parameters. In parallel, selected microRNAs were investigated in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples (n=30) and tumor smear material (n=31). Human papillomavirus-status of tumor patients was examined using immunohistochemical staining of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (n=88). Additionally, functional assays were performed to examine the proliferation and migration potential of two head and neck squamous cell carcinoma cell lines after transfection with microRNA mimics and inhibitors for microRNAs 146a and 155.

Analysis of blood samples demonstrated no significant differences between the microRNA profile of head and neck squamous cell carcinoma patients and healthy controls using microarray and quantitative real-time polymerase chain reaction. Interestingly, regarding tumor patients only, a correlation of microRNA alterations with clinical data was observed. This study demonstrated that down-regulation of microRNA 146a and microRNA 155 in whole blood of head and neck squamous cell carcinoma patients correlated significantly with the occurrence of distant metastasis ( $p=0.023$  and  $p=0.028$ , respectively). Furthermore, overexpression of blood microRNA 125a was associated with lymph node metastasis ( $p=0.006$ ). Additionally, microRNA analysis in smear material was not evaluable because of too much contamination with other cell types. The investigations in tissue samples showed significantly lower gene expression of microRNA 155 and microRNA 218 in tumor cells ( $p=0.003$  and  $p=0.009$ , respectively) compared to normal epithelial cells. Down-regulation of tissue microRNA 125a is correlated with increased pathological grade ( $p=0.003$ ) and reduced gene expression of tissue microRNA 146a is associated with higher tumor size and expansion ( $p=0.005$ ). Moreover, functional assays showed that inhibition of microRNA 146a as well as microRNA 155 promoted dramatically the proliferation and migration potential of

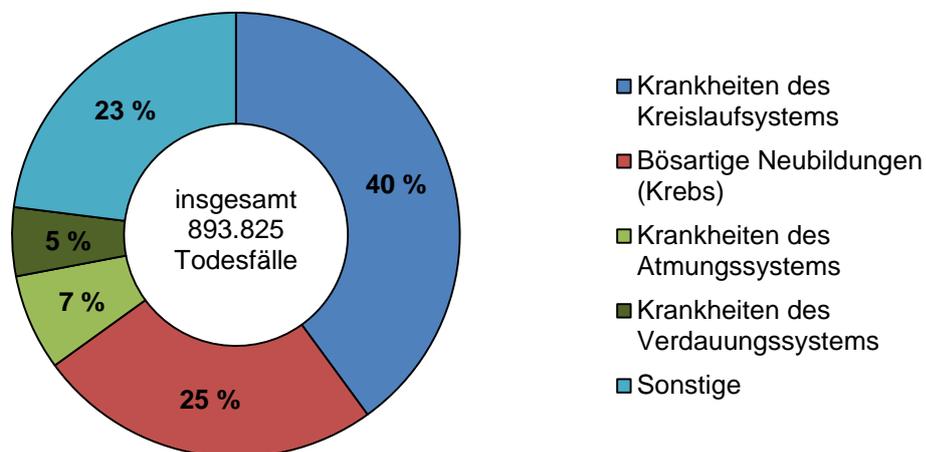
head and neck tumor cells, whereas transfection of microRNA 146a and microRNA 155 mimics showed an inhibitory effect.

Characterizing the gene expression of microRNA 146a and microRNA 155 and their functional role in tumor biology underlined significantly the proliferation and migration potential suggesting their relevance as potential prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. In the future, results of microRNA analysis could enable a more aimed prognosis for the individual patient and therefore an early detection of patients with a higher risk of distant metastasis.

## 2. Einleitung

### 2.1 Thematische Einführung

Nach den Erkrankungen des Kreislaufsystems stellen die Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland dar (Abbildung 1). Laut Robert Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. erkrankten im Jahr 2010 insgesamt rund 477.300 Menschen erstmalig an Krebs, wobei diese Erkrankung bei etwa 252.400 Männern und 224.900 Frauen diagnostiziert wurde. Dabei sind vor allem die Brustdrüse (71.000), die Prostata (65.800), der Darm (62.400) oder die Lunge (52.100) betroffen (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2013).



**Abbildung 1: Todesursachen nach Krankheitsarten in der Bundesrepublik Deutschland 2013** (erstellt nach Daten des Statistischen Bundesamtes, Wiesbaden, 2014).

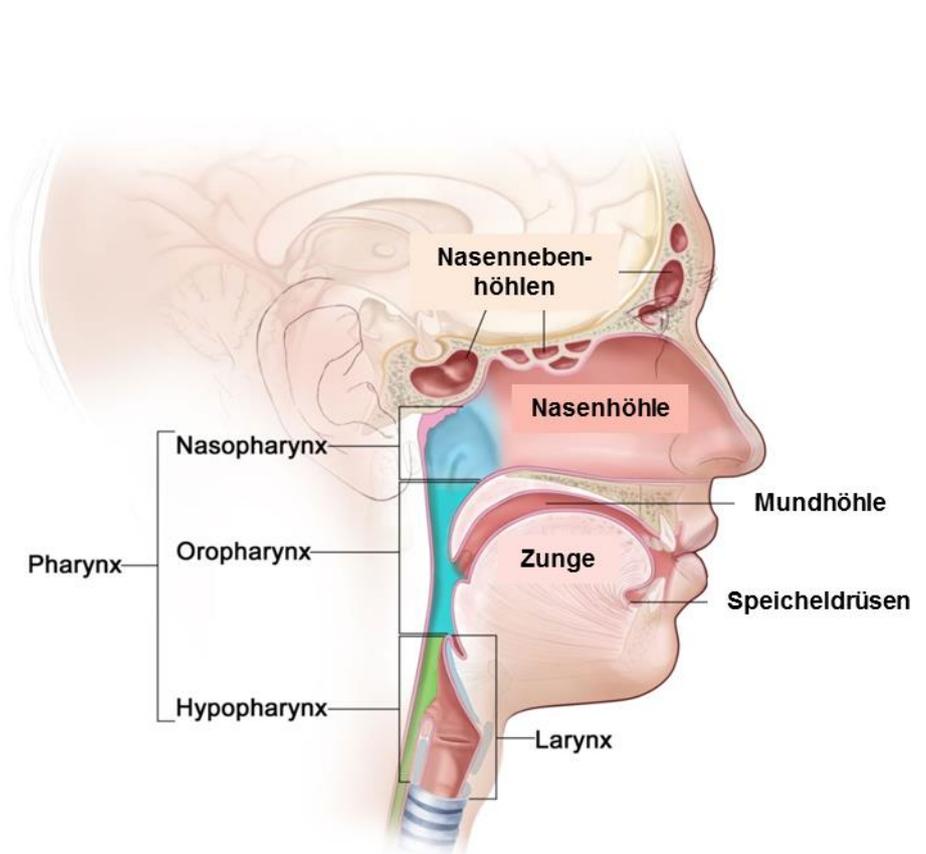
Zwischen den Jahren 2000 und 2010 hat die Zahl der Krebsneuerkrankungen bei Männern insgesamt um 21 % und bei Frauen um 14 % zugenommen. Dies lässt sich vor allem auf die Veränderungen im Altersaufbau der Bevölkerung in Form einer Zunahme des Anteils älterer Menschen zurückführen, die bei Männern stärker ausgeprägt ist als bei Frauen (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2013).

Weltweit erkranken jährlich etwa 12,7 Millionen Menschen an Krebs und etwa 7,6 Millionen Menschen sterben daran (Jemal *et al.*, 2011). Mit etwa 8 % gehören die malignen Tumoren der Kopf-Hals-Region zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit (Ferlay *et al.*, 2010),

wobei es sich in mehr als 90 % dieser Tumoren um Plattenepithelkarzinome handelt (Barnes *et al.*, 2005).

## 2.2 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (Head and neck squamous cell carcinomas, HNSCCs) umfassen alle Karzinome ausgehend vom Epithelium des oberen Aerodigestivtraktes, wobei in dieser Arbeit die Lokalisationen Mundhöhle, Oropharynx (Mundrachen), Hypopharynx (Schlundrachen) und Larynx (Kehlkopf) betrachtet werden (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Mögliche Lokalisationen des Plattenepithelkarzinoms der Kopf-Hals-Region** (modifiziert nach National Cancer Institute, Bethesda, MD, 2015).

Am häufigsten von Kopf-Hals-Tumoren (Abbildung 2) betroffen sind die Mundhöhle und der Rachen mit etwa 59 %. Larynxkarzinome treten in ca. 24 % der Fälle auf, während der Hypopharynx eher selten betroffen ist und nur 2-8 % aller Kopf-Hals-Tumoren ausmacht. Bei Tumoren der Mundhöhle entstehen 70 % im hinteren Zungendrittel, 20-25 % auf der Unterseite der Zunge und im vorderen Mundboden und nur etwa 1 % im Bereich der Zungenspitze oder -rücken. Bei Hypopharynxkarzinomen findet man etwa 90 % im Sinus

piriformis und der seitlichen Hypopharynxwand, während die restlichen Tumoren von der Hinterwand bzw. der Postkrikoidregion ausgehen. Bei Larynxkarzinomen treten 60-70 % primär in der Glottis und 30-40 % im supraglottischen Raum auf. Seltener sind primär subglottisch wachsende Karzinome, wobei generell der Entstehungsort vieler Tumoren nicht mehr genau zu ermitteln ist (Berghaus *et al.*, 1996).

### **2.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognoseaussichten**

In der Bundesrepublik Deutschland erkrankten im Jahr 2010 laut Robert Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. etwa 3.690 Menschen neu an Kehlkopfkrebs und 12.830 Menschen an Krebs in Mundhöhle und Rachen. Weltweit liegen die geschätzte Anzahl der an Mundhöhlen-, Rachen- und Kehlkopfkrebs neu erkrankten Menschen bei 599.637 und die geschätzte Anzahl der Sterbefälle bei 324.834. Dabei handelt es sich bei etwa 90-95 % um Plattenepithelkarzinome (GLOBOCAN, 2012; Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2013). Betroffen sind vor allem Personen im Alter zwischen 50 und 70 Jahren, wobei Männer davon erheblich häufiger betroffen sind als Frauen (Berghaus *et al.*, 1996). Eine hohe Inzidenz für Mundrachenkrebs wurde in Indien, Australien, Papua-Neu Guinea, der Schweiz, den Niederlanden, Frankreich, Brasilien und im Süden Afrikas ermittelt, wobei die höchsten Inzidenzen bei Männern in Nord- und Ostfrankreich und bei Frauen in Indien und Pakistan festgestellt wurden. Während Mundhöhlenkrebs vor allem in Entwicklungsländern dominiert, ist Rachenkrebs in entwickelten Ländern einschließlich Zentral- und Osteuropa häufig verbreitet (Parkin & Bray, 2006). Demgegenüber ist Nasenrachenkrebs vor allem in Asien weit verbreitet. Hierbei liegt die geschätzte Anzahl der weltweit neu erkrankten Menschen bei 60.896, wovon 49.814 Fälle Asien zugeordnet werden konnten. In Deutschland ist diese Erkrankung mit etwa 330 neu erkrankten Menschen eher selten (GLOBOCAN, 2012). Als Hauptursache für die Entstehung von Nasenrachenkrebs gilt eine Infektion mit Epstein-Barr-Viren (Andersson-Anvret *et al.*, 1977; Burgos, 2005). Da in der vorliegenden Arbeit keine Tumorgewebeproben dieser Lokalisation untersucht wurden, wird das Nasopharynxkarzinom in den folgenden Kapiteln nicht näher behandelt.

#### Tabak-/Alkoholabusus

Die Hauptursachen für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx sind in etwa 75 % der Fälle ein erhöhter Tabakkonsum und/oder Alkoholabusus, wobei die Kombination dieser beiden Noxen nicht nur einen additiven Effekt aufweist, sondern zu einem Multiplikationseffekt führt (Blot *et al.*,

1988; Blot *et al.*, 1996; Hashibe *et al.*, 2009; Lewin *et al.*, 1988; Tuyns *et al.*, 1988; Wynder & Bross, 1957).

Betrachtet man die beiden Noxen Tabakkonsum und Alkoholabusus einzeln als Ursache für Kopf-Hals-Tumoren, zeigt eine Metaanalyse des International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortiums, dass für Tabakkonsumenten, die keinen Alkohol trinken, das Risiko an Kopf-Hals-Krebs zu erkranken erhöht ist und eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung für die Häufigkeit, Dauer und Anzahl der Zigarettenpackungen pro Jahr besteht (Hashibe *et al.*, 2007). Dabei ist das Risiko an Kehlkopfkrebs zu erkranken größer als das Risiko an Mundhöhlen- oder Rachenkrebs zu erkranken (Hashibe *et al.*, 2007; Lubin *et al.*, 2009). Vineis *et al.* (2004) stellten ein zehnfach erhöhtes Risiko für Larynxkrebs bei Rauchern im Vergleich zu Nicht-Rauchern fest, während Hashibe *et al.* (2007) bei Rauchern, die keinen Alkohol trinken, ein siebenfach erhöhtes Risiko für Larynxkrebs, ein 1,4-fach erhöhtes Risiko für Mundhöhlenkrebs und ein zweifach erhöhtes Risiko für Rachenkrebs ermittelten. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Kehlkopf das Organ im Kopf-Hals-Bereich ist, das am anfälligsten auf den Effekt des Zigarettenrauchs reagiert (Hashibe *et al.*, 2007; Lubin *et al.*, 2009; Vineis *et al.*, 2004). Auch geografisch gesehen bestehen Unterschiede beim Erkrankungsrisiko, die nicht nur auf den sozioökonomischen Status des Erkrankten, sondern auch auf den Gehalt an Nitrosaminen, polyzyklisch aromatischen Hydrocarbonen und anderen Tabakkarzinogenen zurückzuführen sind, die in verschiedenen Ländern und Regionen variieren (Elwood *et al.*, 1984; Gray *et al.*, 2000). Zudem ist das Erkrankungsrisiko bei Konsum von schwarzem Tabak größer als bei weißem oder gemischtem Tabak (Castellsagué *et al.*, 2004).

Verschiedene Studien zeigen, dass nach Beendigung des Tabakkonsums das Risiko für eine Tumorerkrankung im Kopf-Hals-Bereich stetig sinkt. Während einige Forscher davon ausgehen, dass nach zehn bzw. fünfzehn Jahren keinerlei Risiko mehr für eine Tumorerkrankung besteht (Blot *et al.*, 1988; Garrote *et al.*, 2001; Spitz *et al.*, 1988; Tuyns *et al.*, 1988), zeigen andere Arbeiten lediglich eine schrittweise Reduzierung des Risikos nach zwanzig Jahren (Altieri *et al.*, 2002; Lewin *et al.*, 1998). Nach diesem Zeitraum ist das Risiko ähnlich dem von Nichtrauchern, wobei eine beginnende Risikoreduzierung erst nach ein bis vier Jahren nach Beendigung des Tabakkonsums einsetzt (Castellsagué *et al.*, 2004; Marron *et al.*, 2010).

Für Alkoholkonsumenten, welche nicht rauchen, besteht laut einer Metaanalyse des International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortiums nur dann ein erhöhtes Risiko an Kopf-Hals-Krebs zu erkranken, wenn der Alkoholverzehr durchschnittlich drei oder mehr Drinks pro Tag beträgt. Während für Pharynxkarzinome schon ein bis zwei Drinks pro Tag ausreichen, um das Risiko einer Erkrankung zu erhöhen, steigt das Risiko für

Larynxkrebs erst bei fünf oder mehr Drinks pro Tag. Eine tendenzielle Dosis-Wirkungsbeziehung für Häufigkeit und Dauer des Alkoholkonsums besteht am stärksten für Rachenkrebs, was vermuten lässt, dass der Rachen das für die Karzinogenität alkoholischer Getränke am empfindsamste Organ innerhalb der Kopf-Hals-Region darstellt (Hashibe *et al.*, 2007). Zudem besteht eine Korrelation zwischen dem Erkrankungsrisiko und dem Alkoholgehalt. Je höher der Ethanolgehalt des Drinks ist, desto größer ist das Risiko an einem Kopf-Hals-Tumor zu erkranken (Castellsagué *et al.*, 2004). Ein deutlich erhöhtes Risiko besteht ab einem täglichen Verzehr von ca. 25 g Alkohol (Bagnardi *et al.*, 2001), während moderate Mengen von 10-20 g Alkohol pro Tag geringe bis keine Effekte erzielen und sogar die Mortalität durch Schlaganfall und Herz-Kreislauf verringern und die durchschnittliche Lebenserwartung erhöhen können (Streppel *et al.*, 2009).

Mit Beendigung des Alkoholabusus sinkt das Risiko an einem Kopf-Hals-Tumor zu erkranken, je nach Studie, nach mehr als zehn bis zwanzig Jahren auf das eines Nicht-Trinkers (Castellsagué *et al.*, 2004; Garrote *et al.*, 2001; Marron *et al.*, 2010), wobei dies vor allem für Mundhöhlen- und Larynxkrebs gilt. Für Pharynxkrebs ist das Erkrankungsrisiko nach mehr als zwanzig Jahren Abstinenz erst um 40 % gegenüber Nicht-Trinkern gesunken (Marron *et al.*, 2010).

Der Mechanismus, wie Alkohol Krebs verursacht, ist noch relativ unbekannt. Mögliche Erklärungen hierfür sind, dass Alkohol oder seine Metabolite humane Karzinogene darstellen oder als Lösungsmittel für andere karzinogene Stoffe wirken und somit die DNA schädigen. Beispielsweise kann im Speichel Ethanol zu Acetaldehyd umgewandelt werden, was einen direkten toxischen oder oxidativen Effekt auf die Schleimhaut haben könnte. Zudem wird vermutet, dass Alkohol als Kokarzinogen agiert, indem es die Permeabilität der Schleimhaut für andere Karzinogene erhöht (Castellsagué *et al.*, 2003; Hashibe *et al.*, 2007).

Neben erhöhtem Tabak- und Alkoholkonsum sind mangelhafte Mund- und Zahnhygiene sowie eine damit häufig verbundene pathologische Speichelzusammensetzung disponierende Kofaktoren. Mechanische Irritationen, beispielsweise durch einen schlecht sitzenden Zahnersatz, oder eine einseitige, vitaminarme Ernährung mit übermäßigem Fleischverzehr können das Risiko, an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken, zusätzlich erhöhen (Berghaus *et al.*, 2006; Pavia *et al.*, 2006).

### Infektion mit humanen Papillomviren

Die Ätiologie des Oropharynxkarzinoms hat sich in den letzten drei bis vier Dekaden von einer Noxen-induzierten zu einer Virus-induzierten Krebserkrankung geändert, wobei eine steigende Inzidenz vor allem bei Männern jünger als 60 Jahre ohne erhöhten Tabak- und

Alkoholkonsum beobachtet wurde. Die steigenden Inzidenzen konnten einer Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) zugeordnet werden, die eine weitere Erkrankungsursache für Kopf-Hals-Tumoren, besonders im Bereich des Oropharynx und der Tonsille, darstellen (Mork *et al.*, 2001).

Humane Papillomviren (HPV) stellen eine Gruppe von unbehüllten DNA-Viren dar, die etwa 55 nm im Durchmesser messen und ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom von 8.000 Basenpaaren besitzen. Das virale Genom kann in drei Regionen unterteilt werden: die frühe Region (E), die für die virale Replikation und Transkription notwendige Proteine kodiert, die späte Region (L), die für die Verpackung der replizierten viralen DNA benötigten Strukturproteine kodiert und die obere, regulatorische Region (URR), die regulatorische Bereiche für die virale Genexpression und Replikation beinhaltet (Longworth & Laimins, 2004).

Humane Papillomviren weisen mehr als hundert Genotypen auf und infizieren die Epithelzellen der Haut und verschiedener Schleimhäute. Die Rolle von HPV in der Karzinogenese von Gebärmutterkrebs deckte Harald zur Hausen auf, wofür er 2008 den Nobelpreis erhielt (zur Hausen, 1976). Mehr als vierzig HPV-Typen infizieren Schleimhäute des Genitaltrakts, wovon einige mit invasiven Zervixkarzinomen assoziiert sind und als Hochrisikotypen bezeichnet werden. Die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66 wurden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wegen ihrer hohen Prävalenz in Zervixkarzinomen als humane Karzinogene klassifiziert (Walboomers *et al.*, 1999). Einige dieser Hochrisikotypen wurden zudem in Biopsien von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (23,5 %), des Oropharynx (35,6 %) oder des Larynx (24,0 %) nachgewiesen. HPV-Typ 16 ist dabei der am häufigsten vorkommende Genotyp in Zervixkarzinomen und HNSCCs (Mundhöhle 16,0 %; Oropharynx 30,9 %, Larynx 16,6 %) gefolgt von HPV-Typ 18 (Mundhöhle 8,0 %, Oropharynx 1,0 %, Larynx 3,9 %) und HPV-Typ 33 (HNSCCs 10 %). Andere HPV-Typen sind sehr selten in HNSCCs (Attner *et al.*, 2010; Kreimer *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den Hochrisikotypen sind Niedrigrisikotypen wie 6, 11, 40, 42, 43, 44 und 54 mit benignen Läsionen wie der Entwicklung von genitalen Warzen assoziiert (Betiol *et al.*, 2013).

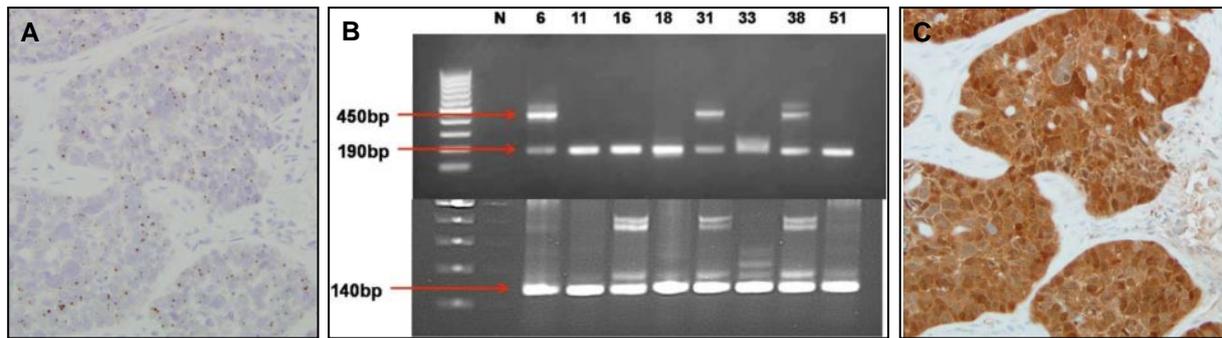
Primär werden Humane Papillomviren über sexuellen Kontakt übertragen, wobei sie auch durch weniger intimen Haut-zu-Haut Kontakt übermittelt werden können (D'Souza *et al.*, 2007; D'Souza *et al.*, 2009; Gillison *et al.*, 2012). Infektionen mit Hochrisiko-HPV-Typen sind asymptomatisch und bei der überwiegenden Mehrheit wird diese vom Immunsystem bekämpft, sodass sich kein Karzinom entwickeln kann. Die Prävalenz in den USA beträgt beispielsweise für eine orale HPV-Infektion 6,9 % (Hochrisikotyp 3,7 %, Niedrigrisikotyp 3,1 %). Hierbei sind Männer häufiger betroffen als Frauen, da die Virusbelastung bei der

weiblichen Genitalschleimhaut höher als bei der männlichen Genitalschleimhaut ist und Männer somit durch oralen Sexualkontakt mit Frauen einer höheren viralen Exposition ausgesetzt sind. Die Prävalenz nimmt mit der Lebensdauer und der Anzahl an oralen und vaginalen Sexualpartnern zu (D'Souza *et al.*, 2009; Gillison *et al.*, 2012).

Ein typischer Patient mit HPV-positivem Oropharynxkarzinom ist ein weißer Mann mittleren Alters, der Nichtraucher ist bzw. nur eine geringe Anzahl an Packungen/Jahr raucht, einen hohen sozioökonomischen Status aufweist, mehrere Sexualpartner hat und/oder orogenitale Sexualpraktiken anwendet. Im Durchschnitt sind Patienten mit einem HPV-positiven Karzinom vier bis zehn Jahre jünger als Patienten mit einem HPV-negativen Karzinom. Zudem weisen sie bei Diagnosestellung einen kleineren Primärtumor mit positivem Lymphknotenbefall auf (Ang *et al.*, 2010; Attner *et al.*, 2010; Deschler *et al.*, 2014; Hafkamp *et al.*, 2008; Mellin *et al.*, 2000; Schwartz *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004).

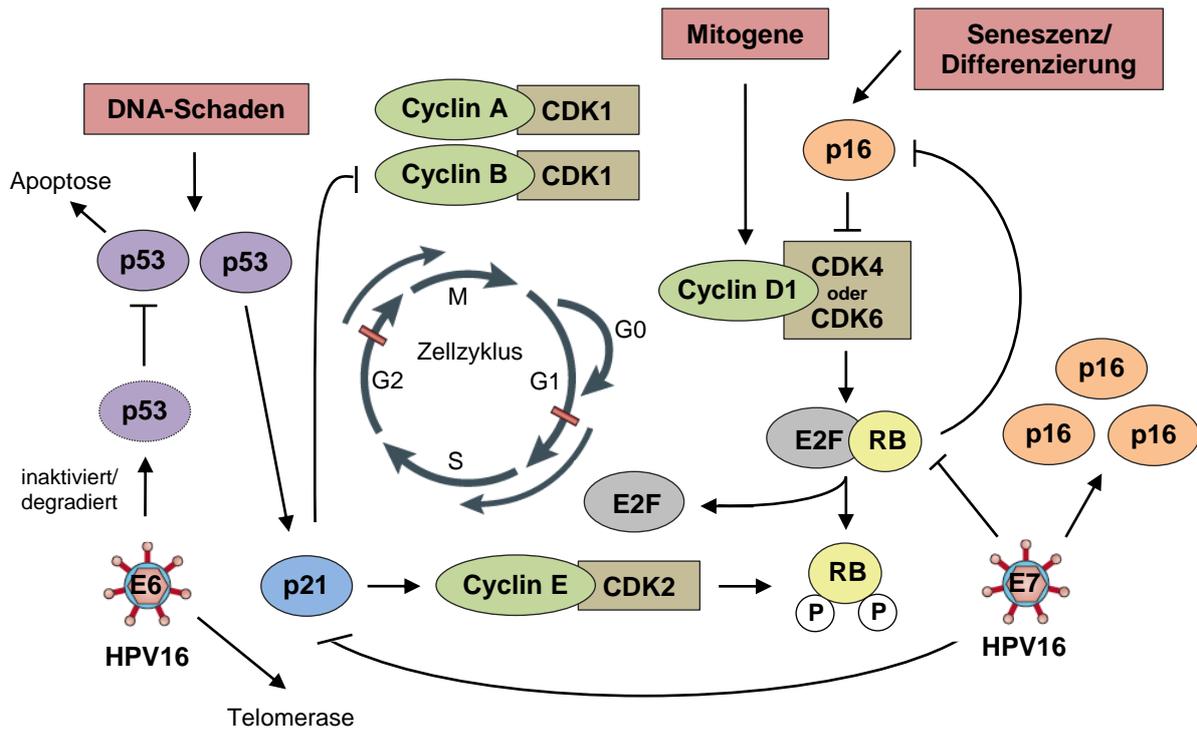
Die Prognose für Patienten mit einem HPV-positiven Tumor ist im Hinblick auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben besser als für Patienten mit einem HPV-negativen Karzinom (Ang *et al.*, 2010; Fakhry *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2003; Mellin *et al.*, 2000; Ragin & Taioli, 2007; Schwartz *et al.*, 2001). Mellin *et al.* (2000) ermittelten beispielsweise für HPV-positive Tumorpatienten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 53,5 % gegenüber 31,5 % bei HPV-negativen Tumorpatienten. Zudem sprechen HPV-positive Tumorpatienten besser auf eine Chemotherapie oder eine kombinierte Radiochemotherapie an. Die Ansprechrate nach Einleitung einer Chemotherapie oder einer Radiochemotherapie beträgt für HPV-positive Tumorpatienten unabhängig der Tumorlokalisation 82 % bzw. 84 % gegenüber 55 % bzw. 57 % bei HPV-negativen Tumorpatienten (Fakhry *et al.*, 2008). Zudem besitzen HPV-positive Tumorpatienten neben einem erniedrigten Rezidivrisiko (Licitra *et al.*, 2006; Lindquist *et al.*, 2007; Sedaghat *et al.*, 2009) auch ein reduziertes Risiko zur Entwicklung eines Zweittumors (Licitra *et al.*, 2006).

Der HPV-Status des Patienten wird überwiegend mittels einer HPV-DNA *in situ* Hybridisierung, einer genomischen PCR oder indirekt über eine immunhistochemische Färbung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors 2A (CDKN2A; p16) ermittelt (Abbildung 3). Einen Goldstandard für die HPV-Bestimmung gibt es bisher nicht, jedoch schlägt der Kongress der American Society of Clinical Oncology aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methoden eine genomische PCR in Kombination mit einer immunhistochemischen Färbung von p16 vor (Kofler *et al.*, 2012).



**Abbildung 3: Bestimmung des HPV-Status mittels HPV-DNA *in situ* Hybridisierung (A), PCR (B) oder indirekt über eine immunohistochemische Färbung von p16 (C)** (modifiziert nach Saini *et al.*, 2009 und Singhi & Westra, 2010).

Das Tumorsuppressor-Protein p16 (Abbildung 4) ist ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 und vermindert durch eine Inhibierung des Cyclin-D1-CDK4/CDK6-Komplexes die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (RB), welches in seiner hypophosphorylierten Form den Transkriptionsfaktor E<sub>2</sub>F bindet. Im normalen Zellzyklus wirkt p16 somit antiproliferativ und wird gleichzeitig durch RB negativ reguliert. Durch eine Inaktivierung von RB durch das HPV-Onkoprotein E7 kommt es jedoch zu einer Überexpression von *p16*, wodurch sich p16 als immunhistologischer Marker für dysplastische und maligne HPV-assoziierte Läsionen sehr gut eignet. Demgegenüber ist in HPV-negativen Tumoren das Protein p16 aufgrund epigenetischer oder genetischer Stilllegung des entsprechenden Gens, welche als frühes Ereignis in der Karzinogenese angesehen wird, nicht bzw. nur minimal nachweisbar. Die Detektion von HPV-DNA und *p16* Expression zeigen eine gute Übereinstimmung (Singhi & Westra, 2010), die sich auch in der Prognose der Patienten widerspiegelt. Genauso wie in HPV-positiven Tumorpatienten ist die Prognose für p16-positive Tumorpatienten besser als für HPV-negative bzw. p16-negative Tumorpatienten (Ang *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2010; Lassen *et al.*, 2009; Mellin Dahlstrand *et al.*, 2005). Die 3-Jahres-Rate für das Gesamtüberleben bzw. das progressionsfreie Überleben beträgt für p16-positive Tumorpatienten 83,6 % bzw. 74,4 % gegenüber 51,3 % bzw. 38,4 % bei p16-negativen Patienten (Ang *et al.*, 2010). Zudem wurden bei HPV-negativen/p16-negativen Tumorpatienten häufiger Rezidive als bei HPV-positiven/p16-positiven Patienten beobachtet (63 % versus 19 %) (Klussmann *et al.*, 2003).



**Abbildung 4: Deregulierung des Zellzyklus durch Humane Papillomviren** (modifiziert nach Leemans *et al.*, 2011). Die HPV-Onkoproteine E6 und E7 fördern die Tumorprogression durch Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 und RB.

Die HPV-Onkoproteine E6 und E7 (Abbildung 4), welche *in vitro* eine zelltransformierende Aktivität besitzen, fördern die Tumorprogression durch Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 (Tumorprotein p53) und RB (Retinoblastom-Protein). Das Protein p53 spielt eine entscheidende Rolle bei der Apoptose, der Zellzykluskontrolle und der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung (Klussmann *et al.*, 2004). Etwa 60-80 % aller Kopf-Hals-Tumoren weisen eine Mutation des p53-Gens auf, wobei sich dieses Ereignis vor allem auf erhöhten Alkohol- und/oder Tabakkonsum zurückführen lässt und mit einem frühen Wiederauftreten des Tumors und einer Entwicklung eines Zweittumors assoziiert ist (Shin *et al.*, 1996; Somers *et al.*, 1992). Im Normalfall wird p53 nach einer Schädigung der zellulären DNA aktiviert und induziert Kinase-Inhibitoren, wie p21 (auch CDKN1A; Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1A), die für die Phosphorylierung von RB verantwortlich sind. Das hypophosphorylierte RB veranlasst die Arretierung des Zellzykluses am Übergang der G1- in die S-Phase, indem es die für die Einleitung der S-Phase benötigten Transkriptionsfaktoren (E<sub>2</sub>F) bindet. Infolgedessen arretiert der Zellzyklus in der G1-Phase, bis die DNA-Schäden durch das zelluläre Reparatursystem behoben sind. Alternativ kann p53 die Einleitung der Zellapoptose veranlassen. Bei ausreichend mitogenen Stimuli folgt in der späten G1-Phase die Phosphorylierung von RB durch zelluläre Kinasen und die E<sub>2</sub>F-Transkriptionsfaktoren werden freigesetzt. Bei einer HPV16-Infektion bildet das E6-Protein einen Komplex mit p53

und führt somit zu einer Inaktivierung durch Komplexierung oder zu einer Degradierung von p53. Aufgrund dessen führt diese Störung der Schutzmechanismen zu einer erhöhten genetischen Instabilität und zur Akkumulation von DNA-Mutationen. Des Weiteren aktiviert E6 die zelluläre Telomerase, infolgedessen die Lebensspanne einer infizierten Zelle erhöht wird (Balz *et al.*, 2003; Hauser *et al.*, 2002; Klussmann *et al.*, 2004). RB, ein entscheidendes Protein in der Zellzyklusregulation, wird von dem viralen Onkoprotein E7 degradiert, wodurch es zu einer vermehrten Freisetzung der Transkriptionsfaktoren E<sub>2</sub>F und zur Verkürzung der RB-Halbwertszeit kommt, welche das Fortschreiten des Zellzyklus in die S-Phase und die Synthese viraler DNA ermöglichen. Des Weiteren kann E7 an p21 binden und somit zur Vermehrung von inaktivem RB führen. Reduzierte Proteingehalte oder die fehlende *RB1* Expression in HNSCC-Zellen sind signifikant mit dem Vorhandensein von HPV-DNA assoziiert. Zudem zeigen die schon erwähnten Zellzykluskomponenten Cyclin D1 und p16, welche durch RB reguliert werden, eine reduzierte Genexpression bzw. eine Überexpression in HPV-positiven Tumoren (Andl *et al.*, 1998; Wiest *et al.*, 2002; Wilczynski *et al.*, 1998). Cyclin D1 reguliert positiv den Zellzyklus durch seine Interaktion mit CDK4 oder CDK6, welche das Tumorsuppressorprotein RB durch Phosphorylierung inaktivieren. Im Gegensatz zu einer reduzierten Genexpression bei HPV-positiven Tumoren geht eine Akkumulation von Cyclin D1 durch eine Amplifikation oder eine erhöhte Genexpression mit einer schlechteren Prognose bei HPV-negativen HNSCC-Patienten einher (Åkervall *et al.*, 1997; Ang *et al.*, 2014; Bova *et al.*, 1999; Higuchi *et al.*, 2007; Klussmann *et al.*, 2009; Smeets *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2005). Zudem ist eine starke nukleäre Akkumulation von Cyclin D1 mit einer erhöhten Rezidivrate (48 % versus 15 %), einer schlechteren 5-Jahres-Rate für ein progressionsfreies Überleben (16 % versus 58 %) und einer schlechteren 5-Jahres-Rate für das Gesamtüberleben (17 % versus 53 %) assoziiert (Yu *et al.*, 2005).

### 2.2.2 Klassifikation, Staging und Malignitätsgrad

Zur Klassifizierung von malignen Tumoren ist das TNM-System international weit verbreitet. Dieses System beschreibt die Ausmaße einer Tumorerkrankung, wobei „T“ die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, „N“ den Befall von Lymphknoten und „M“ den Nachweis von Metastasen kennzeichnet. Eine detaillierte Unterteilung der verschiedenen Stadien erfolgt mittels Ziffernzusatz. Je nachdem ob eine klinische oder pathologische TNM-Klassifikation beschrieben wird, ist das Präfix „c“ bzw. „p“ dem TNM-System vorangestellt. Die TNM-Klassifikation ist in Tabelle 1 definiert.

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (Barnes et al., 2005; Wittekind et al., 2005).**

Einteilung	Beschreibung
T	Primärtumor
TX	Keine Beurteilung des Primärtumors möglich
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Mundhöhle	
T1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 2 cm, aber ≤ 4cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie kortikalen Knochen, tiefe äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle, oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie Mastikatorraum, Pterygoidplatten oder Schädelbasis; oder umschließt A. carotis interna
Oropharynx	
T1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 2 cm, aber ≤ 4cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, hartem Gaumen und Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis; oder umschließt A. carotis interna
Hypopharynx	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt und ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk oder > 2 cm, aber ≤ 4cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung oder Primärtumor mit Fixation des Hemilarynx
T4a	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z. B. Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt A. carotis interna oder infiltriert Strukturen des Mediastinums
Larynx Supraglottis	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supaglottis begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert mehr als einen benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis (z. B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis) befallen, ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna



Nach dem TNM-System würde beispielsweise ein Plattenepithelkarzinom im Frühstadium ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasierung mit T1N0M0 bezeichnet werden.

Auf dem TNM-System basiert nach Vorgaben der UICC eine weitere Klassifikation, die das Staging beschreibt (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Staging in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (Barnes et al., 2005).**

Staging	Beschreibung
0	Tis N0 M0
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T1, T2 N1 M0
	T3 N0, N1 M0
IVa	T1, T2, T3 N2 M0
	T4a N0, N1, N2 M0
IVb	T4b alle N M0
	alle T N3 M0
IVc	alle T alle N M1

Des Weiteren gibt es eine histologische Klassifikation der Malignität von Plattenepithelkarzinomen, das den Differenzierungsgrad des Krebsgewebes beschreibt. Diese ist in der nachfolgenden Tabelle 3 definiert.

**Tabelle 3: Histologische Klassifikation der Malignität von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region.**

Differenzierungsgrad	Beschreibung
G1	gut differenziert, wenig Mitosen
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert, viele Mitosen

### 2.2.3 Diagnostik und Therapie

Trotz verbesserter Diagnose- und Therapiemöglichkeiten hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate der Plattenepithelkarzinom-Patienten, die bei etwa 50 % liegt, in den letzten Jahren nicht signifikant geändert. Daher ist es wichtig, neue Marker aufzudecken, die eine Früherkennung dieser Erkrankung erleichtern, eine verbesserte Prognoseeinschätzung zulassen und eine zielgerichtete Therapie für den einzelnen Patienten gewährleisten.

Personen mit einer länger als zwei Wochen andauernden unklaren Schleimhautveränderung sollten zur Abklärung einen Spezialisten aufsuchen. Mögliche Symptome sind weiße oder rote Flecken auf der Mundschleimhaut, Schleimhautdefekte oder Ulzeration, Schwellungen in der Mundhöhle oder im Hals, unklare Zahnlockerungen, die nicht durch eine Parodontalerkrankung verursacht wurden, Globusgefühl, Schmerzen, Schluckbeschwerden, Sprechbehinderung, Husten, Heiserkeit, Atemnot, verminderte Zungenbeweglichkeit, Taubheitsgefühle, unklare Blutungen, Foetor und/oder Veränderungen der Okklusion. Jedoch sind diese Symptome nicht nur für eine Krebserkrankung charakteristisch, sondern können auch vor allem bei Entzündungen und/oder anderen Erkrankungen auftreten. Generell weisen bis zu 40 % der Patienten bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine Lymphknotenmetastasierung auf (S3 Leitlinie DGMKG, Wolff *et al.*, 2012).

Im Rahmen einer Primärdiagnostik untersucht der Arzt die verdächtige Stelle zunächst, um den potenziellen Tumor und die umgebenden Strukturen zu beurteilen. Bei einem Verdacht auf ein Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region erfolgt unter Vollnarkose, bei gut zugänglichen Mundhöhlenkarzinomen unter lokaler Narkose, eine Biopsie zur histologischen Untersuchung/Diagnosestellung durch einen Pathologen. Zudem wird eine Panendoskopie zur Detektion oder zum Ausschluss eines Zweittumors und/oder von Metastasen durchgeführt. Mit Hilfe einer Ultraschalluntersuchung (Sonographie) kann der Arzt die inneren Strukturen im Bereich des Halses und der Mundhöhle sowie auch Organe wie Leber, Nieren, Nebennieren, Milz und Lymphknoten betrachten. Um die lokale Ausdehnung des Tumors festlegen bzw. Fernmetastasen nachweisen zu können, erfolgt eine Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) (S3 Leitlinie DGMKG, Wolff *et al.*, 2012).

Bei der nachfolgenden Therapie wird zwischen einem chirurgischen Eingriff, einer Strahlentherapie (Radiotherapie), einer Chemotherapie oder einer kombinierten Radiochemotherapie unterschieden. Die Auswahl der individuellen Behandlung erfolgt interdisziplinär im Rahmen von Tumorkonferenzen unter Beteiligung der Fachdisziplinen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Strahlentherapie, Onkologie, Pathologie und Radiologie. Die erste Wahl in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren ist die chirurgische Resektion, wobei es eine Vielzahl verschiedener Operationsverfahren gibt. Diese umfassen enorale und offene Zugänge. Ein Eingriff erfolgt unter dem Aspekt des Funktionserhalts und kann rekonstruktive Maßnahmen erfordern. Intraoperativ wird eine Schnellschnitthistologie vorgenommen, um positive Resektionsränder, die mit einer schlechteren Prognose verbunden sind, zu vermeiden. Nach kompletter Resektion eines T1- oder T2-Tumors bei nicht vorhandener Lymphknotenmetastasierung kann auf eine Radiotherapie verzichtet werden. Bei fortgeschrittener T-Kategorie (T3/T4), knappen oder positiven Resektionsrändern, perineuraler Invasion, Gefäßinvasion und/oder Lymphknotenbefall wird eine

adjuvante Therapie (postoperative Radio- oder Radiochemotherapie) durchgeführt, wobei die postoperative Radiotherapie konventionell fraktioniert ausgeführt wird und bei durchschnittlichem Risiko mit 54-60 Gy in 27-30 Fraktionen über 5,5-6 Wochen sowie bei Tumoren mit erhöhtem Rezidivrisiko mit 66-72 Gy in 33 Fraktionen über 6,5 Wochen erfolgt. Bei einer simultanen primären Radiochemotherapie wird die Chemotherapie mit Cisplatin oder einer Cisplatin-haltigen Kombination durchgeführt. Alternativ dazu kann eine Kombination aus Strahlentherapie und Cetuximab (Antikörper) erfolgen. Patienten mit einem unheilbaren Tumorleiden nach einer Tumorthherapie können bei ausreichend gutem Allgemein- und Leistungszustand mit einer palliativen platinbasierten Chemotherapie in Kombination mit Cetuximab behandelt werden.

Bei Beschwerdefreiheit ist das Nachsorgeschema für das erste und zweite Jahr auf 3 Monate und für das dritte bis fünfte Jahr auf 6 Monate festgesetzt. Danach folgen die üblichen Früherkennungsmaßnahmen (S3 Leitlinie DGMKG, Wolff *et al.*, 2012).

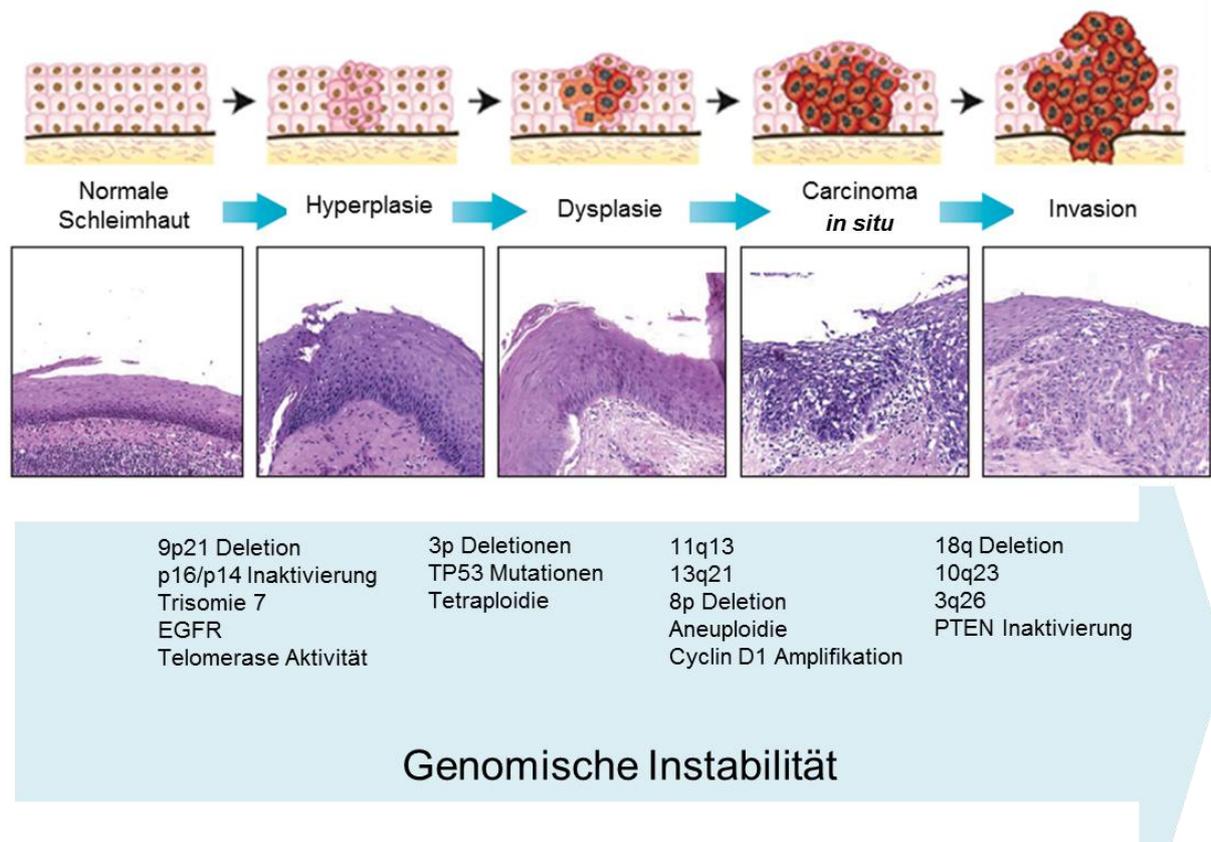
#### **2.2.4 Genetische Veränderungen**

Krebs resultiert aus einer Akkumulation von genetischen Veränderungen. Bereits 1914 postulierte Theodor Boveri, dass der Ursprung einer Tumorzelle in einem irreparablen Defekt einer normalen Zelle liegt (Manchester, 1995). Einen eindeutigen Beweis für diese klonale Entwicklung erbrachte eine Analyse der Chromosomen in Tumorzellen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Chronische Myeloische Leukämie, die als spezifische Chromosomenanomalie das 1960 entdeckte Philadelphia-Chromosom aufweist (Nowell & Hungerford, 1960), welches durch eine Translokation zwischen den langen Chromosomenarmen 9 und 22 entsteht. Die Bruch- und Verschmelzungsstelle ist in allen Leukämiezellen eines Patienten identisch. Somit liegt deren Ursprung in derselben aberranten Zelle. Spezifische Chromosomenanomalien können daher als Marker für bestimmte Erkrankungen stehen (Alberts *et al.*, 2011). 1967 identifizierten Zang und Singer, erstmals in einem soliden Tumor überhaupt, eine für Meningeome spezifische Chromosomenaberration, die Monosomie 22 (Zang & Singer, 1967). Chromosomenanomalien, resultierende Teilungsanomalien und Veränderungen der Genexpression sind Ergebnisse der malignen Zelltransformation.

Ausgelöst wird die maligne Transformation vor allem durch Defekte in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Ein Gleichgewicht ihrer Aktivität kontrolliert die für die Funktionsfähigkeit von Geweben essentielle Erneuerung von Zellen. Bei Proto-Onkogenen handelt es sich um normale zelluläre Gene, die Proteine codieren, die die Zellteilung stimulieren. Die Proto-Onkogene werden durch genetische Veränderungen in sogenannte Onkogene umgewandelt, die eine gesteigerte Expression oder eine erhöhte Aktivität des Genprodukts

aufweisen. Es gibt drei Arten genetischer Veränderungen, die für diese Umwandlung verantwortlich sind: Translokationen oder Transpositionen, Genamplifikationen und Punktmutationen. Diese dominanten Funktionsgewinn-Mutationen stimulieren die Proliferation der Zelle. Die Tumorsuppressorgene unterliegen hingegen einer Funktionsverlust-Mutation, die zu einer geringeren Aktivität des Genprodukts führt. Normalerweise kodieren Tumorsuppressorgene Proteine, die die Proliferationsaktivität unterdrücken. Durch Deletion, Inaktivierung oder epigenetische Stilllegung beider Genkopien eines Chromosomenpaares wird die normale Aktivität eines Tumorsuppressorgens verringert, wodurch die Proliferation letztendlich stimuliert wird. Veränderungen der Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene führen zum Verlust der genetischen Proliferationskontrolle und somit zur neoplastischen Entartung (Alberts *et al.*, 2011; Campbell *et al.*, 2006). Da es sich vorwiegend um erworbene Veränderungen handelt, die meist für den Typ und den Grad eines Tumors spezifisch sind, besitzen sie somit auch diagnostische und prognostische Aussagekraft.

Auch bei Kopf-Hals-Tumoren ist bereits eine Vielzahl an Veränderungen bekannt, die von Califano, Sidransky und Kollegen in einem Tumorprogressionsmodell skizziert wurden. Dieses stellt die potentiellen Zeitpunkte der genetischen Ereignisse in Kopf-Hals-Tumoren dar, die auch im Hinblick auf mögliche diagnostische, prognostische und therapeutische Marker Bedeutung besitzen (Califano *et al.*, 1996; Sidranski, 1995).

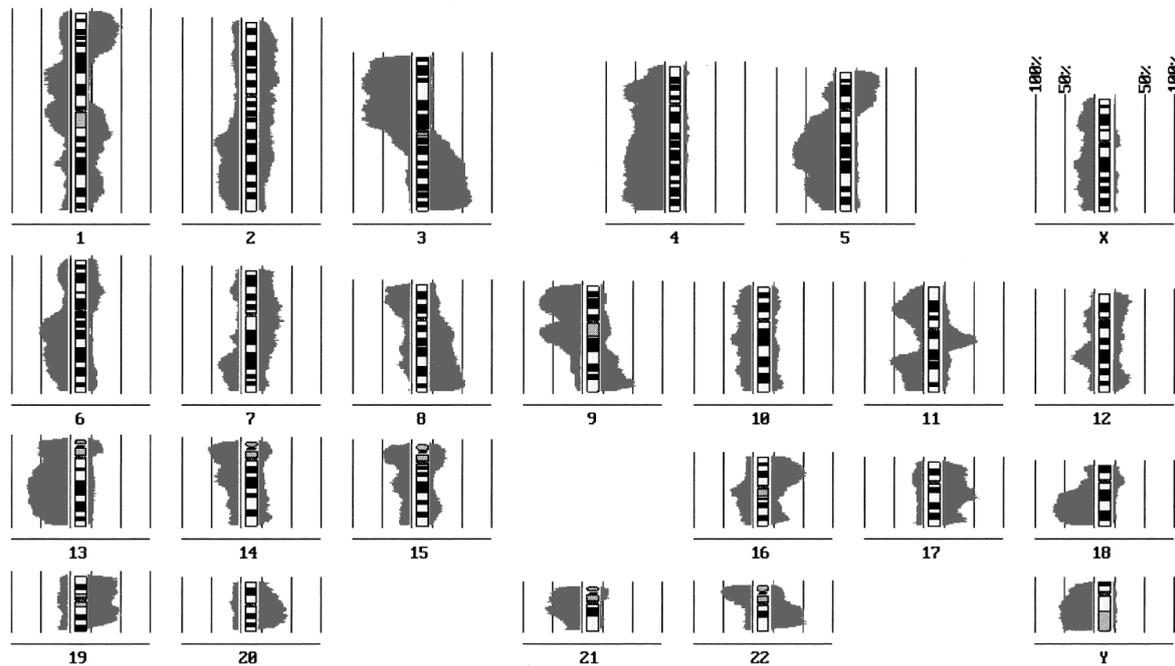


**Abbildung 5: Phänotypische Progression und akkumulierte molekulare Veränderungen von der normalen Schleimhaut bis hin zum Plattenepithelkarzinom** (modifiziert nach Argiris *et al.*, 2008 und Polanska *et al.*, 2014).

Frühe Ereignisse in der Progression von Kopf-Hals-Tumoren stellen beispielsweise der Verlust der chromosomalen Region 9p21-22 und eine Inaktivierung von  $p16/p14^{ARF}$  dar (Abbildung 5). Die Deletion auf 9p21-22 ist mit 70 % eine der häufigsten genetischen Veränderungen in HNSCCs (van der Riet *et al.*, 1994). Ein wichtiges, in dieser Region gelegenes Tumorsuppressorgen ist  $p16$ , welches durch verschiedene Ereignisse inaktiviert werden kann. Reed *et al.* (1996) zeigten, dass für diese Inaktivierung in 67 % aller Fälle eine homozygote Deletion und in 21 % eine Promotormethylierung verantwortlich war. Zudem konnte jeweils in einem untersuchten Tumor ein Rearrangement des  $p16$ -Lokus und eine Leserastermutation nachgewiesen werden (Reed *et al.*, 1996).

Ein spätes Ereignis in der Tumorprogression ist beispielsweise der Gewinn des chromosomalen Bereiches 3q26, eine der häufigsten genetischen Veränderungen in HNSCCs. Generell besitzen diese Tumoren sehr komplexe Karyotypen und weisen sowohl strukturelle als auch numerische Aberrationen auf (Abbildung 6). Typische DNA-Verluste bei Kopf-Hals-Tumoren mit einer Häufigkeit von mehr als 50 % findet man auf den Chromosomen bzw. Chromosomenarmen 3p, 4, 5q, 9p, 11, 13q, 18q und 21q, wohingegen

DNA-Gewinne mit einer Häufigkeit von mehr als 50 % auf den Chromosomen bzw. Chromosomenarmen 3q, 5p, 8q, 9q, 11q, 16p, 19, 20q und 22q auftreten (Bockmühl, 1998).



**Abbildung 6: Histogramm einer vergleichenden genomischen Hybridisierung von 60 Kopf-Hals-Karzinomen** (Bockmühl, 1998). Die Inzidenzbereiche geben den Prozentsatz der chromosomalen Veränderungen an, die mit einer Signifikanz von 99 % auftreten. Links der Chromosomenideogramme sind DNA-Verluste, rechts DNA-Gewinne dargestellt.

Huang *et al.* (2002) fanden ebenfalls als häufigste chromosomale Veränderungen bei allen HNSCC-Untergruppen Gewinne auf 3q, 5p und 8q und Verluste auf 3p. Lokalisationsabhängig fanden sie zudem Gewinne auf 7q, 17q und 9p und Verluste auf 13q bei pharyngealen SCCs, Gewinne auf 7p, 9q, 11q12-13, 14q und 17q bei laryngealen SCCs und Gewinne auf 1p und 11q12-13 bei oralen SCCs (Huang *et al.*, 2002). Des Weiteren findet man Unterschiede zwischen HPV-positiven oropharyngealen SCCs und HPV-negativen oropharyngealen SCCs, wobei HPV-negative Tumoren weniger Aberrationen als HPV-positive Tumoren aufweisen. Amplifikationen auf 11q13 und 18p sind spezifisch für HPV-negative Tumoren, während Amplifikationen auf 3q in beiden Gruppen zu finden sind. Ein Gewinn auf 3q ist die häufigste chromosomale Veränderung in oropharyngealen SCCs (72 %) unabhängig vom HPV-Status und signifikant assoziiert mit einer höheren T-Klassifikation und einem höheren Staging. Die häufigsten Veränderungen in HPV-negativen Tumoren sind Verluste auf 3p, 4q, 5q, 9p, 13q, 18q, Y und Gewinne auf 3q, 8q, 11q13, 12q, 17q und 20q, während HPV-positive Tumoren Verluste auf 3p, 4q, 11q14-qter, 13q und Gewinne auf 3q, 8q, 17q und 20q aufweisen (Klussmann *et al.*, 2009).

## 2.3 miRNA

MiRNAs (microRNAs oder miRs) sind eine Klasse von nicht-kodierenden, einzelsträngigen RNA-Molekülen mit einer Länge von 21 bis 25 Nukleotiden (nt), welche die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene durch Interaktion mit der mRNA regulieren. Dadurch beeinflussen sie eine Vielzahl an biologischen Prozessen wie beispielsweise Differenzierung, Proliferation und Apoptose.

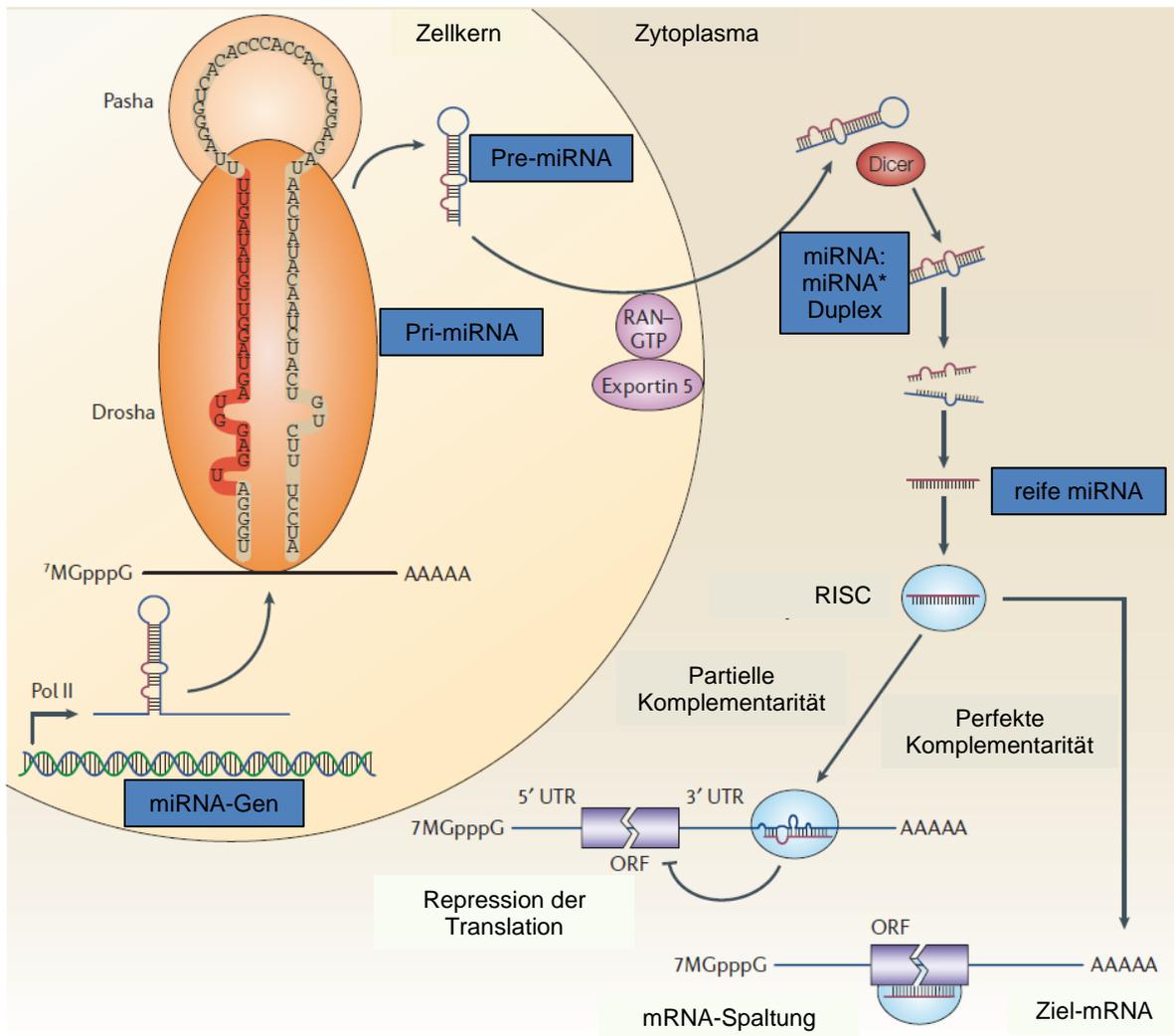
### 2.3.1 Entdeckung und Nomenklatur

Erstmals beschrieben wurden miRNAs 1993 von Rosalind C. Lee, Rhonda L. Feinbaum und Victor Ambros, die bei genetischen Untersuchungen das Gen *lin-4* im Nematoden *Caenorhabditis elegans* identifizierten. Überraschenderweise kodierte dieses Gen für kein Protein, sondern exprimierte zwei kleine RNA-Moleküle mit einer Länge von 22 nt und 61 nt. Diese beiden RNAs wiesen komplementäre Sequenzen zur 3' untranslatierten Region (UTR) der *lin-14* mRNA auf und ließen die Vermutung zu, dass sie die *lin-14* Translation regulieren (Lee *et al.*, 1993). Nach heutigem Kenntnisstand stellt das 61 nt lange RNA-Molekül die Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) dar, während das 22 nt kurze RNA-Molekül die reife miRNA präsentiert und durch komplementäre Basenpaarung an die 3' UTR der *lin-14* mRNA bindet und somit die Translation der mRNA vermindert. Vorerst betrachtete man damals diese Form der posttranskriptionalen Genregulation als seltenes Phänomen spezifisch für Nematoden. Im Jahre 2000 mit der Entdeckung einer weiteren 22 nt kurzen miRNA (*let-7d*), die ebenfalls eine Rolle in der Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* spielt und posttranskriptional *lin-41* reguliert, zeigte sich jedoch, dass es sich bei *let-7d* und *lin-41* um evolutionär konservierte Gene handelt und der Mechanismus der miRNA-Regulation auch auf andere multizelluläre Organismen angewendet werden könnte (Reinhart *et al.*, 2000; Slack *et al.*, 2000). Und tatsächlich wurden in weiteren Studien eine Vielzahl von miRNAs in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Homo Sapiens* entdeckt (Lau *et al.*, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lee & Ambros, 2001). Im Jahre 2002 entdeckte man erstmals die Verbindung zwischen miRNAs und menschlichen Erkrankungen, aufgrund einer Beobachtung, bei der in der Mehrheit der Proben von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ die miRNA-kodierenden Gene *miR-15* und *miR-16* deletiert oder deren Expression reduziert vorlagen (Calin *et al.*, 2002). Seitdem sind die Erkenntnisse über miRNAs stetig gewachsen. Aktuell beinhaltet die Datenbank miRBase (Release v20, Juni 2013) 24.521 Eintragungen über Vorläufer-miRNAs/pre-miRNAs, die 30.424 reife miRNAs in 206 Spezies exprimieren (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Auch die Datenbank Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) verzeichnet einen starken Anstieg der Veröffentlichungen, wobei jedoch die biologischen Funktionen der meisten miRNAs noch unbekannt sind.

Die Nomenklatur der miRNAs (zum Beispiel hsa-miR-100) erfolgt nach der zeitlichen Reihenfolge ihrer Entdeckung. Das Präfix in Form von drei Buchstaben bezeichnet den Organismus. Beispielsweise steht das Präfix „hsa“ für *Homo sapiens*. Die Abkürzung „miR“ steht für die reife miRNA und die nachfolgende Zahl benennt die miRNA entsprechend ihrer Entdeckung. Mit Zahlen bezeichnete Suffixe (zum Beispiel hsa-miR-218-1 und miR-218-2) benennen unterschiedliche Vorläufer-Sequenzen und genomische Loci, die identische reife miRNAs exprimieren, und mit Buchstaben bezeichnete Suffixe (zum Beispiel hsa-miR-125a und hsa-miR-125b) benennen eng verwandte Sequenzen. Zwei miRNAs, die vom gleichen Vorläufer stammen, werden entsprechend ihrer relativen Menge als Hauptprodukt (hsa-miR-155) und als Produkt aus dem entgegengesetzten Arm der Vorstufe (hsa-miR-155\*) bezeichnet. Kann das Hauptprodukt nicht identifiziert werden, erhalten die miRNAs einen Zusatz wie hsa-miR-125a-5p (vom 5'-Arm) und hsa-miR-125a-3p (vom 3'-Arm) (Ambros *et al.*, 2003; Griffiths-Jones *et al.*, 2006).

### 2.3.2 Biogenese und Funktion

Die Biogenese der miRNA (Abbildung 7) beginnt im Nukleus mit der Transkription der miRNA-kodierenden Gene, die mittels der RNA Polymerase II (Pol II) erfolgt (Lee *et al.*, 2004). Das entstandene Primärtranskript (pri-miRNA) besitzt ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende und einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und lagert sich durch interne imperfekte Basenpaarung zu der typischen Haarnadelstruktur zusammen. In der Länge variiert die pri-miRNA zwischen 200 nt bis zu vielen Kilobasen (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004).



**Abbildung 7: Biogenese und Funktion der humanen miRNAs** (modifiziert nach Esquela-Kerscher & Slack, 2006). Die Biogenese der miRNAs erfolgt im Zellkern mittels der RNA Polymerase II (Pol II). Die entstandenen pri-miRNAs werden durch die RNase III Endonuklease Drosha und den Kofaktor Pasha in 70 nt lange pre-miRNAs prozessiert, welche von Exportin 5 in einem RAN-GTP-abhängigen Transport aktiv in das Zytoplasma exportiert werden. Im Zytoplasma erfolgt ein weiterer Prozessierungsschritt mittels der RNase III Endonuklease Dicer, dessen entstandene Produkte miRNA:miRNA\* Duplexe darstellen. Nach Entwindung des doppelsträngigen RNA-Moleküls wird die reife miRNA in einen Ribonukleoprotein-Komplex aufgenommen und abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA führt eine partielle Komplementarität zu einer Hemmung der Translation, während eine perfekte Komplementarität eine vollständige Degradierung der mRNA zur Folge hat.

Die pri-miRNA wird im Zellkern mittels einem Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus der RNase III Endonuklease Drosha und dem an die doppelsträngige RNA bindenden Protein DGCR8 (Pasha), in eine etwa 70 nt lange Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) prozessiert. Pre-miRNAs weisen eine „stem loop“-Struktur mit einem Monophosphat am ihrem 5'-Ende und einem Überhang von zwei Nucleotiden am 3'-Ende auf (Abbildung 7) (Lee *et al.*, 2003; Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Landthaler *et al.*, 2004). Anhand dieser

Struktur erkennt Exportin 5 die pre-miRNA und bildet gemeinsam mit ihr und dem Kofaktor Ran-GTP einen Komplex, der die pre-miRNAs im Zellkern stabilisiert (Zeng & Cullen, 2004) und diese aktiv ins Zytoplasma transportiert (Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003). Durch die Hydrolyse von RAN-GTP zu RAN-GDP kommt es zur Freisetzung der pre-miRNA, die nun im Zytoplasma durch die RNase III Endonuklease Dicer zur reifen miRNA prozessiert wird (Bernstein *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001; Knight & Bass, 2001). Es entsteht ein imperfektes, doppelsträngiges RNA-Molekül, das die reife miRNA und den dazugehörigen komplementären Strang (miRNA\*) beinhaltet. Nach der Entwindung zu Einzelsträngen durch eine Helikase wird die reife miRNA, deren 5'-Ende energetisch weniger stabil als das der miRNA\* ist, in einem Ribonukleoprotein-Komplex, dem sogenannten RISC (RNA-induced silencing complex), aufgenommen, während der Gegenstrang miRNA\* meist degradiert wird (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Zentraler Bestandteil dieses Komplexes ist das Protein Argonaut. Der Mensch besitzt von diesem Protein 8 Varianten, welche nicht alle eine RNase-Aktivität im RISC aufweisen. Besitzt Argonaut keine RNase-Aktivität im RISC, erfolgt die Regulierung der Genexpression über eine Repression der Translation.

Der entstandene miRNA-RISC-Komplex reguliert, abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA, die Aktivität der Zielgene. Die 2-9 Nukleotide lange Basensequenz mit der höchsten Komplementarität zur Ziel-mRNA, bei der die Basenpaarung zwischen miRNA und Ziel-mRNA startet, nennt man Seed-Sequenz. Eine partielle Komplementarität zwischen beiden RNA-Molekülen führt zu einer Hemmung der Translation, während eine perfekte Komplementarität zu einem Schnitt bzw. einer vollständigen Degradierung der mRNA führt (Hutvagner & Zamore, 2002; Zeng *et al.*, 2003).

### 2.3.3 Bedeutung in der Tumorgenese

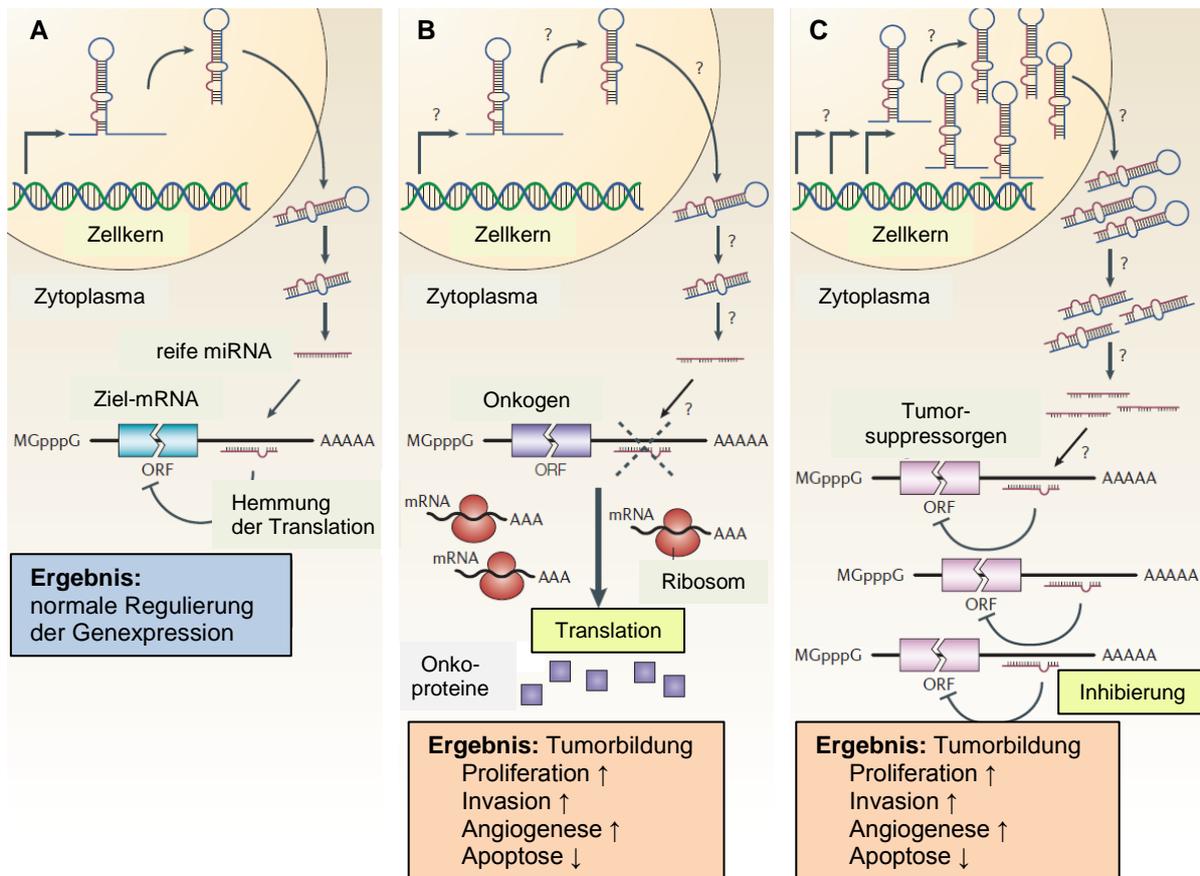
Eine Verbindung zwischen deregulierten miRNAs und Krebs konnte, wie bereits erwähnt, erstmals im Jahre 2002 in chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ festgestellt werden. In 68 % der Fälle wies diese Erkrankung eine Deletion oder eine verminderte Expression von *miR-15* und *miR-16* auf, die auf dem Chromosomenabschnitt 13q14 lokalisiert sind (Calin *et al.*, 2002).

Diese Entdeckung hatte eine Vielzahl an Expressionsanalysen verschiedenster Tumorentitäten zur Folge, die alle differenzielle und deregulierte miRNA-Muster aufweisen und meist gewebe- und tumorspezifisch sind. Hierzu gehören unter anderem B-Zell-Lymphome (Calin *et al.*, 2004), Glioblastome (Ciafrè *et al.*, 2005), Schilddrüsen- (He *et al.*, 2005), Brust- (Iorio *et al.*, 2005), Lungen- (Takamizawa *et al.*, 2004; Yanaihara *et al.*, 2006),

Leber- (Murakami *et al.*, 2006), Dickdarm- (Michael *et al.*, 2003), Magen- und Prostatakrebs (Volinia *et al.*, 2006).

Mehr als 50 % der bekannten miRNA-Gene liegen in Krebs-assoziierten genomischen Regionen, die chromosomale „fragile sites“ beinhalten, mit Verlusten der Heterozygotie (LOH) einhergehen, amplifiziert oder deletiert sind oder mögliche Bruchpunktregionen aufweisen. Beispielsweise liegt hsa-miR-125b-1, eine homologe miRNA zu *lin-4* des Nematoden *Caenorhabditis elegans*, in einer „fragile site“ auf Chromosom 11q24, welche bei der Mehrheit der Patienten mit Brust-, Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs deletiert ist (Calin *et al.*, 2003). Entsprechend der Deletion auf 11q24 ist die Expression von *miR-125b-1* bei diesen Tumorentitäten vermindert (Iorio *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012).

Die tumorbiologische Bedeutung der miRNAs liegt in einer veränderten posttranskriptionalen Expression der Zielgene mit Auswirkungen auf sämtliche zellbiologisch relevanten Prozesse. Diese Effekte tragen somit zur Initiierung von Tumoren und deren Progression bei. Abhängig von ihrer Auswirkung auf die Synthese von Proteinen unterteilt man miRNAs in zwei Hauptklassen: onkogene und tumorsuppressive miRNAs (Abbildung 8) (Esquela-Kerscher & Slack, 2006).



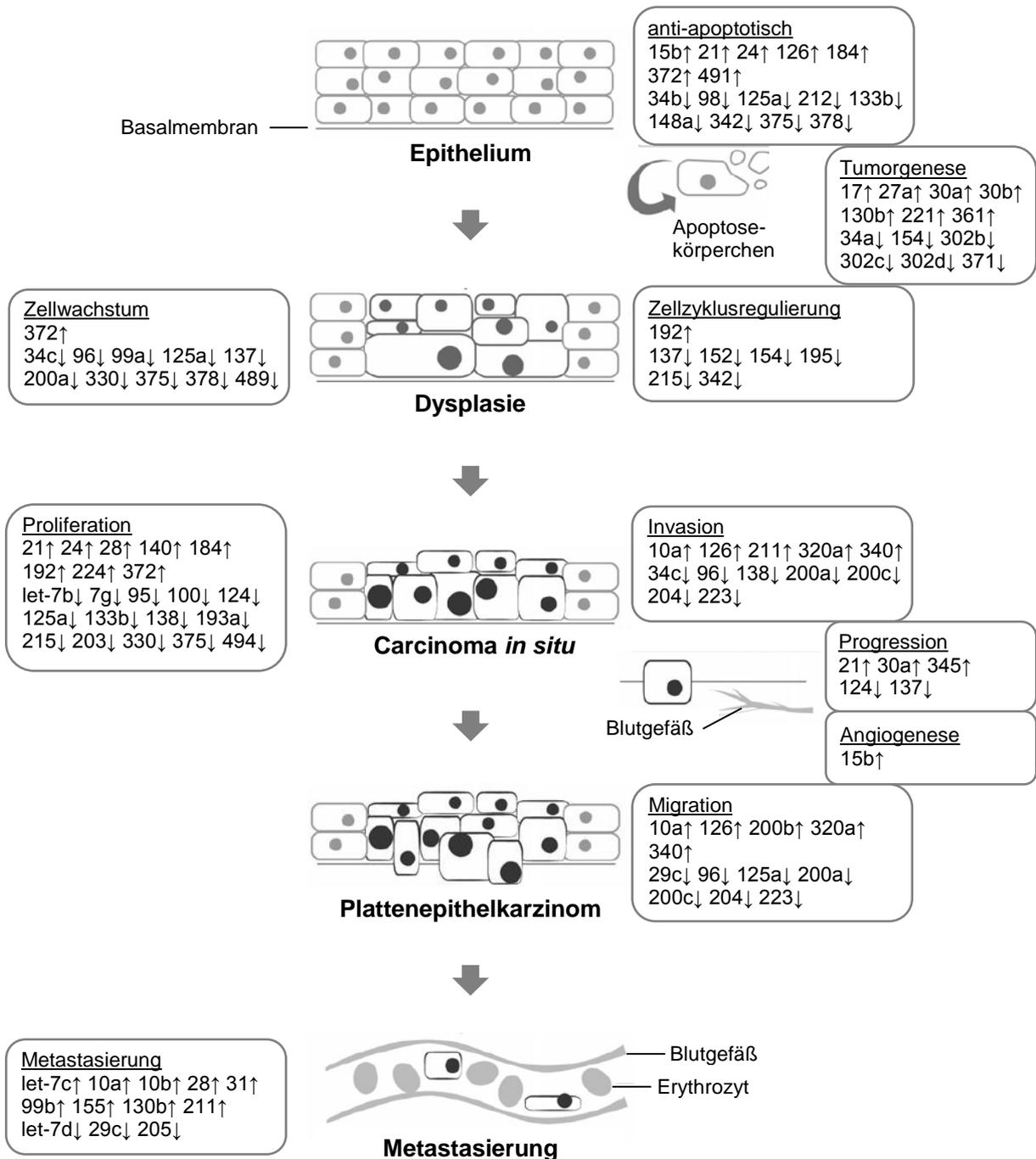
**Abbildung 8: Die Rolle der miRNAs bei der Entstehung von Krebs** (modifiziert nach Esquela-Kerscher & Slack, 2006). A) Im Normalgewebe führt die Transkription, Prozessierung und Bindung der miRNA an ihre Ziel-mRNA durch Blockierung der Translation oder veränderter mRNA-Stabilität zu einer Regulierung der Zielgen-Expression. B) Eine Deletion oder eine verminderte Expression des miRNA-Gens, dessen Genprodukt in diesem Fall als Tumorsuppressor agiert, hat eine Anreicherung von Onkoproteinen zur Folge, die in erhöhter Proliferation, Invasivität und Angiogenese, erniedrigter Apoptose oder undifferenziertem bzw. dedifferenziertem Gewebe enden und somit eine Tumorbildung bewirken kann. C) Eine Amplifikation oder Überexpression eines miRNA-Gens wirkt durch die Beeinflussung von Tumorsuppressorgen onkogen und führt ebenfalls zur Tumoringenition.

Im Normalgewebe (Abbildung 8A) führt die Transkription, Prozessierung und Bindung der miRNA an ihre Ziel-mRNA durch Blockierung der Translation oder veränderter mRNA-Stabilität zu einer Regulierung der Zielgen-Expression. Deletionen oder Defekte in der Biogenese der miRNAs können eine Reduzierung oder Eliminierung der reifen miRNA bewirken (Abbildung 8B), die eine Anreicherung von Onkoproteinen zur Folge haben. Diese können die Proliferation, Invasivität und Angiogenese erhöhen, die Apoptose erniedrigen oder zu undifferenziertem bzw. dedifferenziertem Gewebe führen und somit zur Tumoringenition und -progression beitragen. Dieselben Effekte bewirken onkogene miRNAs, die durch Amplifikation oder Überexpression ihrer Gene entstehen, durch die Beeinflussung der

Expression von Tumorsuppressorgenen (Abbildung 8C) (Esquela-Kerscher & Slack, 2006). Die Analyse von miRNAs ist daher ein vielversprechendes Forschungsgebiet und von großem klinischem Interesse, da sie für diagnostische, prognostische und therapeutische Ziele zur Behandlung von Krebs herangezogen werden können.

In den letzten Jahren wurden auch miRNA-Analysen an Patientengruppen mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region durchgeführt. Diese Übersichtsarbeiten konnten zeigen, dass sowohl Tumorgewebe im Gegensatz zu gesundem Gewebe als auch Zelllinien veränderte Genexpressionsprofile hinsichtlich ihrer miRNAs aufweisen. Für HNSCCs typische Expressionsunterschiede bestehen beispielsweise für *miR-21*, *miR-31*, *miR-181b*, *miR-205* und *miR-210*, die eine erhöhte Expression aufweisen, und *miR-26a*, *miR-99a*, *miR-100*, *miR-125b* und *miR-375*, die eine erniedrigte Expression zeigen (Avisar *et al.*, 2009a; Barker *et al.*, 2009; Cervigne *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2008; Childs *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2013; Harris *et al.*, 2012; Hui *et al.*, 2010; Kimura *et al.*, 2010; Lajer *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2014; Ramdas *et al.*, 2009; Scapoli *et al.*, 2010; Siow *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2007; Wald *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014a).

Basierend auf diesen Übersichtsarbeiten folgte eine Vielzahl an weiteren Untersuchungen bezüglich einzelner miRNAs im Hinblick auf deren Synthese und Funktionalität (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** miRNAs, die die Transformation von normalen Plattenepithelzellen zu Plattenepithelkarzinomzellen regulieren, bis hin zur Metastasierung (modifiziert nach Nagadia et al., 2013).

Beispielsweise kann das Expressionsverhältnis *miR-221* zu *miR-375* mit hoher Sensitivität (92 %) und Spezifität (93 %) zur Unterscheidung zwischen Tumor- und Normalgewebe beitragen (Avissar et al., 2009a). Während eine erhöhte Expression von *miR-205* auf HNSCCs mit Lymphknotenmetastasierung hinweist (Fletcher et al., 2008), ist eine erhöhte Expression von *miR-210* mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit und einer kürzeren

Überlebenszeit assoziiert (Gee *et al.*, 2010). Des Weiteren korreliert eine erniedrigte Expression von *miR-375* mit einer kürzeren Überlebenszeit und Fernmetastasierung bei HNSCC-Patienten unabhängig der Tumorlokalisation und -stadium (Harris *et al.*, 2012). Bei oralen SCCs ist eine Überexpression von *miR-21* mit einer schlechten Prognose verbunden, da die Überlebensrate für die nächsten 67 Monate bei Patienten mit niedrigem *miR-21* Gehalt bei 63,1 % und bei Patienten mit hohem *miR-21* Gehalt bei nur 39,5 % liegt (Li *et al.*, 2009). Eine Überexpression von *miR-19a* korreliert sowohl mit Lymphknotenmetastasierung, schlechter Differenzierung als auch mit erhöhtem Tumorstaging und geht mit einem schlechteren Gesamtüberleben einher.

Funktionelle Studien zeigen, dass eine Inhibierung der *miR-19a* zur Apoptose und einer reduzierten Proliferation von Hep-2-Zellen (laryngeale SCC-Zelllinie) führt. Somit spielt *miR-19a* eine onkogene Rolle in der Progression von laryngealen Tumoren (Wu *et al.*, 2014b). Eine oft in HNSCCs vorkommende miRNA mit einer erniedrigten Genexpression ist *miR-100*. *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass bei den HNSCC-Zelllinien 1386Ln und UM1 eine Zugabe der entsprechenden miRNA-Mimic zu einer Hemmung der Zellproliferation und Migration und einer verstärkten Apoptose führt (Chen *et al.*, 2012). Mit *miR-125b* transfizierte orale SCC-Zellen zeigen eine erniedrigte Proliferationsrate und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Röntgenbestrahlung (Shiiba *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse zeigen, dass miRNAs sowohl diagnostisches, prognostisches als auch therapeutisches Potenzial besitzen.

Die Mehrheit der publizierten Studien wurde an Tumorgewebe und/oder Zelllinien vorgenommen. Vereinzelt erfolgten Studien bezüglich zirkulierender miRNAs im Plasma (Ayaz *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011), im Serum (Mac Lellan *et al.*, 2012) und im Speichel (Liu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012a; Park *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2014). Im Plasma von Patienten mit einem oralen SCC sind die miRNAs *miR-24* (Lin *et al.*, 2010), *miR-31* (Liu *et al.* 2010), *miR-181a*, *miR-181b* (Yang *et al.*, 2011) und *miR-184* (Wong *et al.*, 2008) verglichen mit gesunden Personen erhöht, wobei der Gehalt der *miR-31* und *miR-184* nach der operativen Entfernung des Primärtumors wiederum sinkt. Sechszwanzig miRNAs sind im Plasma von Larynxkarzinom-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen verändert, wobei fünf dieser miRNAs (*miR-212-3p*, *miR-331-3p*, *miR-603*, *miR-660-5p* und *miR-1303*) larynxspezifisch sind (Ayaz *et al.*, 2013). Hsu *et al.* (2012) konnten zehn (*let-7a*, *miR-21*, *miR-26b*, *miR-34c*, *miR-99a*, *miR-133a*, *miR-137*, *miR-184*, *miR-194a* und *miR-375*) veränderte miRNAs im Plasma von HNSCC-Patienten nachweisen, wobei postoperativ reduzierte miRNA-Gehalte von *miR-21* und *miR-26b* nach der Tumorentfernung mit einer guten Prognose verbunden sind und postoperativ weiterhin hohe Gehalte dieser beiden miRNAs mit einem Versterben

innerhalb eines Jahres assoziiert sind. Eine prä- und postoperative Untersuchung der miRNAs 21 und 26b ist daher von enormer Bedeutung und eignen sich als nicht-invasive Biomarker für HNSCCs (Hsu *et al.*, 2012). Im Serum von Patienten mit einem oralen Carcinoma *in situ* oder SCC konnten in postoperativen Proben zwanzig veränderte miRNAs verglichen mit präoperativen Proben nachgewiesen werden, wovon sich fünf miRNAs (let-7b, miR-16; miR-29a, miR-223 und miR-338-3p) als nicht-invasive Biomarker eignen würden (Mac Lellan *et al.*, 2012). Eine weitere Quelle für zirkulierende miRNAs stellt der Speichel dar. Nach einer einfachen Mundspülung reichen drei bis fünf Milliliter Speichel für eine miRNA-Analyse. Dadurch konnten Liu *et al.* (2012a) eine erhöhte Expression von *miR-31* im Speichel von Patienten mit einem oralen SCC unabhängig vom klinischen Stadium nachweisen. Nach einer operativen Entfernung des Tumors sank der miRNA-Spiegel beachtlich, wodurch sich die miRNA 31 als Marker für eine frühe Detektion und eine postoperative Nachsorge für orale SCC eignen würde (Liu *et al.*, 2012a). Des Weiteren zeigten *miR-9*, *miR-134*, *miR-191* (Salazar *et al.*, 2014), *miR-125a* und *miR-200a* (Park *et al.*, 2009) veränderte Expressionen im Speichel von HNSCC-Patienten verglichen mit gesunden Personen.

MiRNA-Untersuchungen im Vollblut von HNSCC-Patienten sind noch relativ selten. Zu Beginn dieser Arbeit existierte nach bestem Wissen nur eine Studie (Brito *et al.*, 2010) über miRNAs im Vollblut von Patienten mit einem oralen SCC, wobei jedoch keine miRNome (Gesamtheit aller miRNA-kodierenden Gene)-Analyse vorgenommen, sondern lediglich zwei miRNA-kodierende Gene (*miR-15a* und *let-7a*) im Vollblut dieser Patienten (n=20) untersucht wurden. Dabei korreliert eine reduzierte Expression von *miR-15a* mit einem erhöhten Tumorstadium (Stadium IV) und Lymphknotenmetastasierung (Brito *et al.*, 2010).

Im Blut anderer Tumorentitäten wie beispielsweise bei Glioblastomen (Roth *et al.*, 2011), Nephroblastomen (Schmitt *et al.*, 2012), Lungenkrebs (Keller *et al.*, 2009) oder Melanomen (Leidinger *et al.*, 2010) existieren bereits auch erste miRNA-Untersuchungen. Bei Glioblastompatienten (n=20) konnten im Blut verglichen mit dem gesunder Personen 52 signifikant deregulierte miRNAs identifiziert werden, wovon 27 (52 %) miRNA-kodierende Gene eine erhöhte Expression und 25 (48 %) miRNA-kodierende Gene eine erniedrigte Expression aufweisen. Die am stärksten deregulierten miRNAs sind miR-128 mit einer erhöhten Genexpression und miR-342-3p mit einer erniedrigten Genexpression (Roth *et al.*, 2011). Im Blut von Nephroblastompatienten (n=23) konnten 176 signifikant deregulierte miRNAs im Vergleich zu Blutproben von gesunden Probanden aufgedeckt werden, wobei miR-766, miR-1246, miR-197 und miR-224 mit einer erhöhten Genexpression und miR-20a, miR-20b, miR-144\* und miR-144 mit einer erniedrigten Genexpression zu den am stärksten deregulierten miRNAs gehören (Schmitt *et al.*, 2012). Auch im Blut von Lungenkrebs-

patienten (n=17) und Melanompatienten (n=35) konnten verglichen mit Blut gesunder Personen signifikant deregulierte miRNAs nachgewiesen werden (Keller *et al.*, 2009; Leidinger *et al.*, 2010). Diese Studien demonstrieren das enorme Potenzial von miRNAs im Blut als minimal invasive Marker.

## 2.4 Eigene Fragestellung

Die kontinuierliche Interaktion zwischen Blutzellen und dem gesamten Körper eröffnet die Möglichkeit, dass Veränderungen, die in Verbindung mit Verletzungen oder Krankheiten in Zellen auftreten, spezifische Veränderungen in der Genexpression in Blutzellen auslösen, die den einleitenden Stimulus reflektieren. Für eine Vielzahl von Erkrankungen einschließlich Krebs sind Veränderungen im Expressionsprofil der Blutzellen charakteristisch, wodurch sie ein enormes Potenzial für diagnostische und prognostische Zwecke besitzen.

Daher soll in der vorliegenden Arbeit erstmals das gesamte Transkriptionsprofil von miRNAs im Vollblut von Patienten mit einem diagnostiziertem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (HNSCC) im Hinblick auf deregulierte miRNAs charakterisiert werden, um diagnostische und prognostische Marker für diese Erkrankung aufzudecken. Nach bestem Wissen lagen zu Beginn dieser Arbeit noch keine Studien im Vollblut von HNSCC-Patienten vor, die das gesamte miRNome betrachten. In Folge dessen sollte zunächst das gesamte Transkriptionsprofil von miRNAs im Vollblut von HNSCC-Patienten im Vergleich zum Vollblut von gesunden alters- und geschlechtsgepaarten Probanden mittels Microarray-Analyse untersucht und ausgewählte deregulierte miRNAs mittels quantitativer Real-Time PCR an einem größeren Patientenkollektiv sowohl im Blut als auch vergleichend dazu im Tumorgewebe und Tumorabstrichmaterial validiert werden. Eine Korrelation dieser Ergebnisse mit den klinischen Daten der Tumorpatienten kann im Weiteren deren Wertigkeit als prognostische und prädiktive Marker zeigen. Im optimalsten Fall wäre mit diesem Ansatz bereits präoperativ, mittels der im Rahmen der prästationären Voruntersuchung durchgeführten Routineblutentnahme, die Analyse von definierten Markern bzw. Markerkombinationen zu einer besseren Prognoseeinschätzung und einer individualisierten Therapieempfehlung für Kopf-Hals-Tumorpatienten möglich.

Im Anschluss an diese deskriptiven Analysen sollen weiterführende Untersuchungen die Funktion der deregulierten miRNAs identifizieren, um den Einfluss dieser Marker auf die Tumorzellbiologie zu untersuchen und dadurch auch eventuelle therapeutische Ansatzpunkte zu erhalten. Hierzu folgen funktionelle Untersuchungen der entsprechenden miRNAs in zwei unterschiedlichen Kopf-Hals-Tumorzelllinien mit miRNA-Mimics und miRNA-Inhibitoren, um deren Einfluss auf die Proliferation und Migration von Tumorzellen zu klären.

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1 Untersuchungsmaterialien**

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Blutproben (n=71), Gewebeproben (n=97) und Abstrichproben (n=31) stammen von Patienten mit einem diagnostizierten Plattenepithelkarzinom aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick. Alle Spender wurden durch einen in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde tätigen Arzt über die Studie (Ethikvotum Kenn-Nr. 218/10) aufgeklärt und haben sich schriftlich einverstanden erklärt Blut, Abstrichmaterial und/oder bei der Operation entnommenes Gewebe, dass nicht zur histopathologischen Beurteilung durch einen Pathologen benötigt wurde, für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung zu stellen. Zum Vergleich wurde Blut (n=12) und Abstrichmaterial (n=4) von gesunden Probanden und unauffälliges Plattenepithel (n=6), das im Rahmen einer Tonsillektomie bzw. einer Uvulakürzung gewonnen wurde, untersucht. Diese Probanden wurden ebenfalls über die Studie aufgeklärt und haben sich schriftlich einverstanden erklärt. Die klinischen Daten der Tumorpatienten und gesunden Probanden wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Philipp Kulas (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) zusammengestellt.

##### **3.1.1 Blutproben**

Die Entnahme einer Blutprobe erfolgt in PAXgene™ Blood RNA Tubes, die ein spezielles Reagenz zur Stabilisierung der RNA beinhalten. Somit können Verfälschungen bei Genexpressionsanalysen durch sekundäre Effekte der Blutentnahme, wie beispielsweise der Degradierung der RNA oder Induktion von Stressgenen, verhindert werden. Das intrazelluläre RNA-Profil bleibt dadurch bei 18 °C bis 25 °C für 3 Tage, bei 2 °C bis 8 °C für 5 Tage und bei -20 °C bis -80 °C für mindestens 50 Monate stabil. Jedes Röhrchen beinhaltet 6,9 ml Additiv und ist mit seinem Vakuum für eine Entnahme von 2,5 ml Blut bestimmt. Nach zehnmalem Invertieren des Röhrchens wird dieses vor Weiterbearbeitung oder Lagerung für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Aus den gesammelten Blutproben (Tabelle 4 und Tabelle 5) wurde entweder innerhalb von zwei Tagen RNA inklusive miRNA isoliert oder die Blutproben wurden bis zur Isolierung der RNA bei -80 °C gelagert. Vor der Isolierung erfolgte jedoch abhängig von der Lagerung eine Aufwärmphase auf Raumtemperatur und eine anschließende zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur.

Tabelle 4: Blutproben von HNSCC-Patienten.

Nr.	Fall	Alter*/ Geschlecht	Tabak-/ Alkohol- konsum	Lokalisation 1: Mundhöhle 2: Oropharynx 3: Larynx 4: Hypopharynx	TNM- Klassifikation	Grad	Untersuchungs- methoden	
							Array	PCR
1	1113	79/m	ja/ja	2	cT1-2 cN0	3	X	X
2	1122	63/m	nein/ja	2	cT3 cN2c cM0	3	X	X
3	1123	63/m	ja/ja	3	cT4a cN2c cM0	2	X	X
4	1127	79/m	ex/nein	1	cT4 cN2b	2	X	X
5	1131	67/m	ja/nein	3	cT4 cN2c cMx	1	X	X
6	1137	49/m	ja/nein	2	cT1 cN2c cM0	2		X
7	1145	53/m	nein/nein	2	cT3 cN2c	3		X
8	1146	63/m	ja/nein	3	cT1	-		X
9	1153	76/m	ja/nein	4	cT4 cN3 cM1 fraglich	2	X	X
10	1159	54/m	ex/nein	3, 4	cT4 cN2c cM1	2	X	X
11	1165	61/w	ja/nein	2	cT4 cN2c cM1	3	X	X
12	1166	56/m	ja/ja	3	cT4 cN0 cM0	2		X
13	1169	62/m	nein/nein	2	cT2 cN2b	3	X	X
14	1172	69/w	ja/nein	2	cT4 cN2b cM0	3	X	X
15	1176	51/m	ja/nein	2	4/2013: cT2 cN2c cM0 01/2014: cM1	3	X	X
16	1177	77/m	nein/nein	3	cT3 cN2b cM0	3		X
17	1182	69/w	nein/nein	3	cT4 cN2b cM0	3		X
18	1183	69/m	ja/ja	2	cT4 cN2c	2	X	X
19	1222	76/w	nein/nein	2, 4	cT4 cN2 cM0	2		X
20	1223	82/m	ex/nein	1	cT2 cN1 cM0	-		X
21	1262	65/w	ja/nein	3	cT4 cN0 cM0	2		X
22	1263	50/m	ja/k.A.	2	cT1 cN2b cM0	2		X
23	1266	56/m	ja/nein	4	cT4a cN2b cM0	3		X
24	1274	80/m	nein/nein	3	cT1 cN0 cM0	2		X
25	1279	77/m	nein/nein	2	cT2 cN1-2 cMx	-		X
26	1283	61/m	ja/nein	3	cT4 cN2c M0	-		X
27	1288	64/m	ja/ja	3	cT4 cN2c cM0	2		X
28	1291	61/m	nein/nein	2	cT1 cN1 cM0	2		X
29	1298	70/m	ja/ex	3	cT3 cN0 cM0	3		X
30	1300	60/m	ja/nein	2	cT4 cN2c cM0	3		X
31	1301	91/m	nein/nein	3	cT3 cN0 cM0	-		X
32	1306	40/w	ja/ex	2	cT1 cN1	2		X
33	1307	72/w	nein/nein	3	cT4 cN0 cMx	3		X
34	1313	68/m	ja/nein	3	cT4c N2c	2		X
35	1314	41/m	ja/k.A.	1	cT1 cN2c cM0	-		X
36	1299/ 1317	70/m	ja/nein	2	cT4 cN2b cM0	2		X
37	1319	61/m	ja/ja	3	cT4 cN0 cM0	2		X
38	1320	59/m	ja/ja	2	cT4 cN2c cM1	-		X
39	1322	71/m	ja/nein	2	cT3 cN2b	3		X

Fortsetzung Tabelle 4.

Nr.	Fall	Alter*/ Geschlecht	Tabak-/ Alkohol- konsum	Lokalisation 1: Mundhöhle 2: Oropharynx 3: Larynx 4: Hypopharynx	TNM- Klassifikation	Grad	Untersuchungs- methoden	
							Array	PCR
40	1323	59/m	ja/nein	3	cT4 cN2c cM0	2		X
41	1327	50/w	ja/ja	2, 4	cT4 cN2b cM0	3		X
42	1329	50/m	ex/ja	2	cT2 cN0 cM0	2		X
43	1331	77/m	ja/nein	3	cT2 cN2b cM0	2		X
44	1332	71/m	nein/nein	2	cT3 cN2c	3		X
45	1334	65/m	nein/nein	2	cT2 cN2b cM0	3		X
46	1335	64/m	ex/nein	3	cT4 cN2c cM0	3		X
47	1341	50/m	ja/ja	3, 4	cT3 cN2c cM0	3		X
48	1343	87/w	k.A./k.A.	1	cT1 cN1	-		X
49	1347	73/m	ja/ja	3	cT3 cN2c cM0	2		X
50	1349	74/m	ja/k.A.	3	cT3 cN0 cM0	3		X
51	1350	78/m	k.A./nein	4	cT3 cN0	-		X
52	1358	37/m	nein/nein	2	cT1-2 cN0 cM0	2		X
53	1360	58/m	nein/nein	2	cT2 cN2b cM0	2		X
54	1373	51/m	ja/ja	2	cT4 cN2c cM0	3		X
55	1396	60/m	ja/ex	4	cT4 cN2c cM1	-		X
56	1399	78/m	nein/k.A.	3	cT1b cN0 cM0	2		X
57	1403	63/m	ja/ja	1-2	cT4 cN2b cM1	3		X
58	1404	59/w	nein/nein	3	cT4a cN2a cM0	-		X
59	1412	67/m	ja/k.A.	1	cT1 cNx cMx	2		X
60	1413	64/m	ex/ex	4	cT2 cN2c cM0	-		X
61	1421	56/m	ja/nein	3	cT2 cN2b cM1	-		X
62	1448	50/w	ex/nein	3	cT2 cN2c	3		X
63	1451	65/m	ja/ex	4	cT3 cN0 cM0	2		X
64	1452	66/m	ja/ex	1	cT4 cN0 cM0	2		X
65	1498	64/m	ja/k.A.	2	cT2 cN1 cM1	-		X
66	1502	66/m	ja/ja	2	cT4bcN3 cM1	-		X
67	1507	75/m	ex/k.A.	2	cT4a cN2b cMx	3		X
68	1517	65/m	nein/nein	3	cT1 cN0 cM0	-		X
69	1527	50/m	ex/nein	3	cT3 cN2b cM0	-		X
70	1529	77/m	nein/nein	3	cT1 cN2a cM0	3		X
71	1530	59/m	ja/nein	1	cT3 cN1 cM1	-		X

\*Alter zum Zeitpunkt der Probennahme; k.A. = keine Angabe; ex = ehemalige Konsumenten

Bei den nachfolgenden Kontrollprobanden (Tabelle 5) handelt es sich um Personen aus dem näheren Umfeld bzw. um Patienten, die die Schlafsprechstunde der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde aufgesucht haben und sich für eine Blutspende bereit erklärt haben.

**Tabelle 5: Blutproben von Probanden ohne Tumorerkrankung als Kontrollen.**

Nr.	Fall	Alter*/ Geschlecht	Tabak-/ Alkoholkonsum	Untersuchungsmethoden	
				Array	PCR
1	1140	63/m	nein/nein	X	X
2	1141	65/m	nein/nein	X	X
3	1147	48/m	ja/nein	X	X
4	1151	80/m	ex/nein	X	X
5	1161	71/m	ja/k.A.	X	X
6	1162	79/m	ex/nein	X	X
7	1167	59/w	ja/nein	X	X
8	1171	74/m	ja/nein	X	X
9	1173	60/m	nein/nein	X	X
10	1174	55/m	ja/nein	X	X
11	1185	69/m	k.A./k.A.	X	X
12	1186	69/w	k.A./k.A.	X	X

\*Alter zum Zeitpunkt der Probenahme; k.A. = keine Angabe; ex = ehemalige Konsumenten

### 3.1.2 Tumor- und Normalgewebe

Bei dem untersuchten Tumor- und Normalgewebe handelt es sich um Gewebeproben, die nach der Entnahme in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden, sogenannte FFPE-Gewebeproben (Tabelle 6 und Tabelle 7).

**Tabelle 6: Tumorgewebeproben von HNSCC-Patienten.**

Nr.	Fall	Alter*/ Geschlecht	Tabak-/ Alkohol- konsum	Lokalisation 1: Mundhöhle 2: Oropharynx 3: Larynx 4: Hypopharynx	TNM- Klassifikation	Grad	Untersuchungs- methoden	
							HE-/p16- Färbung	PCR
1	567	68/m	ex/ex	2, 3, 4	cT4 cN2c cM1	-	X	
2	659	86/m	nein/nein	3	cT3 cN0 cM0	-	X	
3	694/ 716	55/m	ja/ja	2	cN2c-3	-	X	
4	743	50/m	ja/ja	2, 4	cT2 cN2 cM0	3	X	
5	744	68/m	nein/ex	3	cT1	-	X	
6	796	71/w	ex/ex	3	cT4	2	X	
7	810	68/m	nein/ex	2	cT4 cN2b	-		X
8	815	75/m	nein/k.A.	3	cT2 cN0 cM0	-	X	
9	832	60/m	ja/nein	1	cT2 cN2c	3	X	
10	834	55/m	ex/nein	2, 3	cT2	-	X	
11	835	68/m	ex/ex	3	cT3-4 cM2c cM0	-	X	X
12	844	80/m	ex/ex	2	cT2 cnx cMx	-	X	
13	848	76/m	k.A./k.A.	2	cT3 cN2c cM0	-	X	
14	853	64/m	nein/nein	2	cT4	-	X	
15	856	54/m	k.A./k.A.	2	k.A.	-	X	
16	879	51/m	ja/nein	1	cT2	-	X	

Fortsetzung Tabelle 6.

Nr.	Fall	Alter*/ Geschlecht	Tabak-/ Alkohol- konsum	Lokalisation 1: Mundhöhle 2: Oropharynx 3: Larynx 4: Hypopharynx	TNM- Klassifikation	Grad	Untersuchungs- methoden	
							HE-/p16- Färbung	PCR
17	880	55/w	ex/ex	3	cT3 cN0 cM0	-	X	X
18	898	63/m	ex/nein	3	cT4	-	X	
19	899	59/m	k.A./k.A.	3, 4	cT3 cN2b cM0	-	X	
20	900	56/m	ja/nein	3	k.A.	2	X	
21	914	81/m	ex/ex	2	cT2 cN2a	3	X	X
22	917	69/m	nein/nein	3, 4	cT4 cN2c cMx	-	X	
23	918	59/m	ja/k.A.	1	cT1 cN0	2	X	
24	921	46/w	ex/nein	2	cT4 cN2c	3	X	
25	922	64/m	ex/ex	2	cT4 cN0 cMx	-	X	
26	927	65/w	ja/ja	2	cT2 cN0 cMx	-	X	
27	928	60/m	ex/ex	3, 4	cT4 cN0 cM0	3	X	
28	929	53/w	ex/ja	1	cT2 cN2b	3	X	
29	931	50/m	ja/nein	1	cT4 cN0 cM0	3	X	
30	937	64/m	ja/nein	3	cT4a cN0 cM0	2	X	
31	941	57/m	ja/nein	3	cT3 cN0	3	X	
32	946	57/m	ja/ja	1	cT2 cN2c cM0	2	X	X
33	950	68/w	ex/k.A.	3	cT2 cNx xMx	-	X	X
34	957	70/m	ja/k.A.	2, 3	cT1 cN0 cM0	2	X	
35	960	72/m	ex/k.A.	3	cT3 cN2c	-	X	X
36	962	44/m	k.A./nein	1	cT2 cN2c	2	X	
37	963	81/w	nein/ex	1	cT4 cNx cMx	-	X	
38	995	51/m	ja/ja	2	cT2 cN2b cM0	2	X	
39	999	69/m	ja/k.A.	3	cT4 cN0 cM0	-	X	
40	1002	54/m	ja/ja	1	cT2 cN2b cM0	-	X	
41	1013	73/m	ja/k.A.	3	cT4b cN0 cM0	2	X	X
42	1016	64/m	ja/ja	4	cT4 cN1 cM0	2	X	
43	1025	60/m	k.A./k.A.	2	cT3 cN2b	-	X	X
44	1040	73/m	ja/k.A.	2	cT2 cN2b	-	X	X
45	1045	44/w	nein/nein	1, 2	cT3 cN2c	2	X	
46	1046	74/w	ex/nein	2	cT2 cN2b cM0	2	X	
47	1074	24/m	ja/nein	1	cT1 cN0 cM0	-	X	
48	1076	60/m	k.A./k.A.	3	k.A.	-	X	X
49	1083	61/m	nein/ja	2	cT3 cN2b	3	X	
50	1098	63/m	nein/nein	2	cT1 cN2c cM1?	-		X
51	1102	60/m	ex/k.A.	1	cT2 cN2c cM0	2	X	
52	1113	79/m	ja/ja	2	cT1-2 cN0	3	X	X
53	1123	63/m	ja/ja	3	cT4a cN2c cM0	2		X
54	1127	79/m	ex/nein	1	cT4 cN2b	2	X	
55	1131	67/m	ja/nein	3	cT4 cN2c cMx	1		X
56	1137	49/m	ja/nein	2	cT1 cN2c cM0	2	X	X
57	1153	76/m	ja/nein		cT4 cN3 cM1 fraglich	2		X

Fortsetzung Tabelle 6.

Nr.	Fall	Alter*/ Geschlecht	Tabak-/ Alkohol- konsum	Lokalisation 1: Mundhöhle 2: Oropharynx 3: Larynx 4: Hypopharynx	TNM- Klassifikation	Grad	Untersuchungs- methoden	
							HE-/p16- Färbung	PCR
58	1165/ 1258	61/w	ja/nein	2	cT4 cN2c cM1	3	X	X
59	1169	62/m	nein/nein	2	cT2 cN2b	3		X
60	1183	69/m	ja/ja	2	cT4 cN2c	2	X	X
61	1205	49/m	ja/nein	2	cT1 cN1 cM0	2	X	X
62	1206	64/m	ex/ex	3	cT1 cN0 cM0	3	X	
63	1207	60/m	ja/ex	3	cT4 cN2c cM0	3	X	X
64	1208	50/m	ja/ja	3, 4	cT4 cN0 cM0	-	X	
65	1224	61/m	ja/ex	2	cT4 cN2c cM0	-	X	
66	1248	63/m	ja/ex	1	cT2	3	X	
67	1263	50/m	ja/k.A.	2	cT1 cN2b cM0	2	X	X
68	1266	56/m	ex/k.A.	4	cT4a cN2b cM0	3	X	
69	1288	64/m	ja/ja	2, 4	cT4 cN2c cM0	2		X
70	1296	50/m	ja/nein	2	cT4a cN2c cM0	3	X	X
71	1299/ 1317	70/m	ja/nein	2	cT2 cN2b cM0	-	X	X
72	1300	60/m	ja/nein	2	cT4 cN2c cM0	3	X	
73	1310/ 1332	71/m	nein/nein	2	cT2 cN1 cMx cT3 cN2c	3	X	
74	1314	40/m	ja/k.A.	1	cT1 cN2c cM0	-	X	
75	1319	61/m	ja/ja	3	cT4 cN0 cM0	2	X	X
76	1320	59/m	ja/ja	2	cT4 cN2c cM1	-	X	X
77	1322	71/m	ja/nein	2	cT3 cN2b	-	X	
78	1323	59/m	ja/nein	3	cT4 cN2c cM0	2	X	X
79	1324	76/m	ex/nein	1	cT2 cN3 cM1	-	X	
80	1334	65/m	nein/nein	2	cT2 cN2b cM0	3	X	
81	1338	84/m	nein/nein	1	cT2 cN2c cM0	-	X	
82	1339	47/m	ja/ja	2	cT2 cN0 cMx	2	X	
83	1340	67/w	k.A./k.A.	2, 4	cT2 cN0 cMx	2	X	
84	1341	50/m	ja/ja	3, 4	cT3 cN2c cM0	3	X	
85	1350	78/m	k.A./nein	4	cT3 cN0	-	X	
86	1360	58/m	nein/nein	2	cT2 cN2b cM0	2	X	
87	1373	51/m	ja/ja	2	cT4 cN2c cM0	3	X	
88	1376	93/m	k.A./k.A.	3	cT4 cN0 cM0	-	X	
89	1387	71/m	nein/ex	2	cT2 cN2b cM0	-	X	
90	1392	71/m	nein/ja	3, 4	cT2 cN2b cM0	2	X	
91	1403	63/m	ja/ja	1, 2	cT4 cN2b cM1	3	X	
92	1412	67/m	ja/k.A.	1	cT1 cNx cMx	2	X	
93	1448	50/w	ex/nein	3	cT2 cN2c	3	X	

\*Alter zum Zeitpunkt der Probennahme; k.A. = keine Angabe; ex = ehemalige Konsumenten

**Tabelle 7: Gewebeproben von unauffälligem Plattenepithel.**

Nr.	Fall	Alter*/ Geschlecht	Tabak-/ Alkoholkonsum	Untersuchungsmethoden	
				HE-Färbung	PCR
1	820	16/w	nein/nein	X	X
2	1163	47/m	nein/nein	X	X
3	1168	38/m	k.A./k.A.	X	X
4	1219	54/m	nein/nein	X	X
5	1243	21/w	nein/nein	X	X
6	1254	30/w	nein/nein	X	X

\*Alter zum Zeitpunkt der Probennahme; k.A. = keine Angabe

### 3.1.3 Abstrichmaterial

Bei dem untersuchten Abstrichmaterial handelt es sich um einen Bürstenabstrich, der während der Operation des Patienten durch einen Operateur in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde durchgeführt wurde (Tabelle 8 und Tabelle 9).

**Tabelle 8: Abstrichmaterial von HNSCC-Patienten.**

Nr.	Fall	Alter/ Geschlecht	Tabak-/ Alkohol- konsum	Lokalisation 1: Mundhöhle 2: Oropharynx 3: Larynx 4: Hypopharynx	TNM- Klassifikation	Grad	Untersuchungs- methode
							PCR
1	1222	76/w	nein/nein	2, 4	cT4 cN2 cM0	2	X
2	1223	82/m	ex/nein	1	cT2 cN1 cM0	-	X
3	1224	61/m	ja/ex	2	cT4 cN2c cM0	-	X
4	1248	63/m	ja/ex	1	cT2	3	X
5	1250	79/m	nein/nein	1	cT1 cN0	2	X
6	1258	61/w	ja/nein	2	cT4 cN2c cM1	3	X
7	1262	65/w	ja/nein	3	cT4 cN0 cM0	2	X
8	1263	50/m	ja/k.A.	2	cT1 cN2b cM0	2	X
9	1274	80/m	nein/nein	3	cT1 cN0 cM0	2	X
10	1279	77/m	nein/nein	2	cT2 cN1-2 cMx	-	X
11	1282	32/w	ja/nein	1	cT2 cN0 cM0	-	X
12	1288	64/m	ja/ja	2, 4	cT4 cN2c cM0	2	X
13	1291	61/m	nein/nein	2	cT1 cN1 cM0	2	X
14	1298	70/m	ja/ex	3	cT3 cN0 cM0	3	X
15	1299/ 1317	70/m	ja/nein	2	cT2 cN2a cM0	2	X
16	1300	60/m	ja/nein	2	cT4 cN2c cM0	3	X
17	1301	91/m	nein/nein	3	cT3 cN0 cM0	-	X
18	1307	72/w	nein/nein	3	cT4 cN0 cMx	3	X
19	1313	68/m	ja/nein	3	cT4c N2c	2	X
20	1314	41/m	ja/k.A.	1	cT1 cN2c cMx	-	X
21	1319	61/m	ja/ja	3	cT4 cN0 cM0	2	X
22	1320	59/m	ja/ja	2	cT4 cN2c cM1	-	X

Fortsetzung Tabelle 8.

Nr.	Fall	Alter/ Geschlecht	Tabak-/ Alkohol- konsum	Lokalisation 1: Mundhöhle 2: Oropharynx 3: Larynx 4: Hypopharynx	TNM- Klassifikation	Grad	Untersuchungs- methode
							PCR
23	1322	71/m	ja/nein	2	cT3 cN2b	-	X
24	1323	59/m	ja/nein	3	cT4 cN2c cM0	2	X
25	1324	76/m	ex/nein	1	cT2 cN3 cM1	-	X
26	1329	50/m	ex/ja	2	cT2 cN0 cM0	-	X
27	1331	77/m	ja/nein	3	cT2 cN2b cM0	-	X
28	1332	71/m	nein/nein	2	cT3 cN2c	-	X
29	1334	65/m	nein/nein	2	cT2 cN2b cM0	-	X
30	1335	64/m	ex/nein	3	cT4 cN2c cM0	-	X

\*Alter zum Zeitpunkt der Probennahme; k.A. = keine Angabe; ex = ehemalige Konsumenten

Tabelle 9: Abstrichmaterial von gesunden Probanden.

Nr.	Fall	Alter*/ Geschlecht	Tabak-/ Alkohol- konsum	Untersuchungsmethode
				PCR
1	1243	21/w	nein/nein	X
2	1254	30/w	nein/nein	X
3	1256	34/w	nein/nein	X
4	1259	62/w	ja/nein	X

\*Alter zum Zeitpunkt der Probennahme

Während der Operation entferntes Tumorgewebe wird grundsätzlich für die histopathologische Diagnosestellung benötigt. Nur Gewebe, das nicht zur histopathologischen Beurteilung benötigt wurde, kann durch den Patienten für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung gestellt werden. Die Etablierung der Bürstenabstriche ermöglicht somit den Gewinn von Probenmaterial während der Operation ohne das für die histopathologische Diagnosesicherung notwendige Gewebe zu verwenden.

Für die Etablierung der Bürstenabstriche wurde die Benutzung verschiedener Wattestäbchen und Bürsten ausgetestet. Lediglich mit einer Bürste mit feinen Härchen (Cytobrush® Plus Cell Collector) war eine ausreichende Entnahme von Zellen für die weitergehenden Untersuchungen gegeben. Zu beachten ist jedoch der unterschiedliche Erfahrungsgrad der Operateure, sodass eine Kontinualität in der Probennahme nicht unbedingt gegeben ist. Des Weiteren wurde eine Isolierung der RNA inklusive miRNA direkt im Anschluss der Probengewinnung im Gegensatz zu einer Isolierung nach einer Kryokonservierung bei -80 °C ausgetestet. Es bestand kein Unterschied zwischen den beiden Methoden und hatte keine Effekte auf die Expressionsanalyse, sodass für diese Untersuchungsmethode die

Abstrichpräparate nach ihrer Gewinnung bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert und nicht direkt im Anschluss an die Probennahme aufgearbeitet werden müssen.

### 3.1.4 Zelllinien

In dieser Arbeit werden zwei Plattenepithelkarzinomzelllinien verwendet. Bei der käuflich erworbenen FaDu-Zelllinie (ATCC® HTB-43™) handelt es sich um eine etablierte Zelllinie von einem Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx eines 56-jährigen Kaukasiers. Die etablierte UM-SCC-1-Zelllinie der Universität Michigan stammt von einem männlichen Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Mundbodens, die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Bumm (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, plastische Operationen, CaritasKlinikum, Saarbrücken) zur Verfügung gestellt wurde.

## 3.2 Material- und Herstellernachweis

### 3.2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterial

In der nachfolgenden Tabelle 10 sind die in den Versuchen verwendeten Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

**Tabelle 10: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien (alphabetisch geordnet) mit Hersteller.**

Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Anti-Digoxigenin-Rhodamin	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Aphidicolin	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
BCIP (Bromo-4-Chloro-Indolyphosphat)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Biotin-Nick-Translationsmix	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Bürsten für Abstrichpräparat Cytobrush® Plus Cell Collector	Medscand® Medical, Cooper Surgical Company, Trumbull, CT, USA
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
CINtec p16 <sup>INK4a</sup> Histology Kit	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Companion-Platten für Zellkultureinsätze, 24-well Falcon®	VWR International GmbH, Darmstadt
Control miRNA Assays	Applied Biosystems®, Life Technologies, Darmstadt
Cot1-DNA, human	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Countess® Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt

## Fortsetzung Tabelle 10.

<b>Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Dextransulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Digoxigenin-Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Digoxigenin-Nick-Translationsmix	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO®, Life Technologies, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA, Darmstadt
E-Plate 96	ACEA Bioscience Inc., San Diego, CA, USA
EDTA (Tetraethylendiaminoessigsäure)	Merck KGaA, Darmstadt
Entellan	VWR International GmbH, Darmstadt
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99 % vergällt	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 100 % p.a.	Sigma Aldrich, Steinheim
FCS (fötales Kälberserum)	Sigma Aldrich, Steinheim
Fixogum	Marabu GmbH & Co. KG, Bietigheim-Bissingen
Formamid	Merck KGaA, Darmstadt
FluoroBlok™ Cell Culture Inserts	BD Biosciences, Heidelberg
Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent Technologies, Inc – Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Claus, CA, USA
Giemsa	Merck KGaA, Darmstadt
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt
High-Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
Human miRNA MicroArray Kit Release 16.0, 8x60K	Agilent Technologies, Inc – Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Claus, CA, USA
Hybridization Gasket Slide Kit	Agilent Technologies, Inc – Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Claus, CA, USA
Isopropanol 100 % p.a.	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart
Karyo Max Colcemid	GIBCO® Life Technologies, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
MicroRNA Spike-In Kit	Agilent Technologies, Inc – Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Claus, CA, USA
MicroRNA Complete Labeling and Hybridization Kit	Agilent Technologies, Inc – Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Claus, CA, USA
MiRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
mirVana™ miRNA Mimics und Inhibitoren	Life Technologies, Darmstadt
Mounting Medium for Fluorescence H-1000 [Antifade]	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

## Fortsetzung Tabelle 10.

<b>Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) H-1200 [DAPI]	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchloridlösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalm)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Nitrocellulosemembran	Amersham pharmacia, Freiburg
RNase-freies Wasser	Life Technologies, Darmstadt
Opti-MEM®	GIBCO® Life Technologies, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
PAXgene™ Blood miRNA Kit	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz
PAXgene™ Blood RNA Tubes	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz
PB <sub>max</sub> (Peripheral Blood Medium)	GIBCO® Life Technologies, Darmstadt
PBS (Phosphatgepufferte Standardsalm)	GIBCO® Life Technologies, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Phytohämagglutinin	GIBCO® Life Technologies, Darmstadt
Pepsin	Sigma Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt
RNase H	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
RNase ZAP	Sigma Aldrich, Steinheim
Roti®-Histokitt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure, 25 % reinst	VWR International GmbH, Darmstadt
Streptavidin-Alkalische Phosphatase	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Streptavidin-FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
TaqMan® Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Assays	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
Triton X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypanblau	Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween-20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Weigert Stammlösung A	Morphisto - Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main
Weigert Stammlösung B	Morphisto - Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main
Xylol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart

Alle weiteren, in Tabelle 10 nicht aufgeführten Puffersalze und Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA und Sigma Aldrich bezogen.

### 3.2.2 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden unter möglichst reinen Bedingungen, wenn nicht anders beschrieben, mit Aqua dest angesetzt. In der nachfolgenden Tabelle 11 sind die verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt.

**Tabelle 11: Lösungen und Puffer (alphabetisch geordnet).**

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Dot-Puffer	1,2 g Tris-Base 0,85 g NaCl 1,0 g MgCl <sub>2</sub> 100 ml Aqua dest pH 9,5
Fixativ	3 Volumenanteile Methanol 1 Volumenanteil Essigsäure -20 °C
Giemsa-Lösung	5 ml Giemsa 95 ml Soerensen-Puffer
Lysispuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 MM NaEDTA pH 7,4
RNase-Lösung	10 mg/ml RNase H in 2x SSC
20x SSC (Citratgepufferte Standardsalzlösung)	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat ad 1000 ml Aqua dest pH 7,0
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA pH 8,0
Soerensen-Puffer	P1: 5,935 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /500 ml Aqua dest P2: 4,536 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /500 ml Aqua dest 233 ml P1 + 267 ml P2
TN-Puffer	1,2 g Tris-Base 0,87 g NaCl 100 ml Aqua dest pH 7,5
Trypsin-Lösung	0,5 g Trypsin 10 ml Aqua dest Aliquots bei -20 °C
Trypsin/Natriumchlorid-Lösung	1 ml Trypsin-Lösung 70 ml 0,9% NaCl-Lösung

### 3.2.3 Geräte und Software

In der nachfolgenden Tabelle 12 sind die verwendeten Geräte und die entsprechende Software aufgeführt.

**Tabelle 12: Verwendete Geräte und Software (alphabetisch geordnet) mit Hersteller.**

Geräte/Software	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	HeraCell 159i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Durchlichtmikroskop	4316184	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Einbettungsgerät	Histocentre2	Thermo Shandon GmbH, Frankfurt a. M
Fluoreszenzmikroskop plus Software (für Migrationsanalyse)	Eclipse TE2000-S	Nikon, Tokio, Japan
	NIS-Elements-Software	
Fluoreszenzmikroskop plus Software (für CGH-Analyse)	Olympus BX61	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
	s/w-CCD-Kamera (ProgRes MF)	Jenoptik AG, Jena
	Software ISIS	MetaSystems GmbH, Altlußheim
Hybridisierungs-ofen	Shellab	Sheldon Manufacturing Inc, Cornelius Orgeon, USA
Microarray-Scanner plus Software	Agilent Microarray Scanner	Agilent Technologies, Inc - Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Claus, CA, USA
	Feature Extraction Software	
Reagens-Transfer-Prozessor	Tissue-Tek®VIP™5 Jr	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Real-Time PCR plus Software	StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
	StepOne Software v2.3	
	REST Software	Qiagen, Hilden
PCR-Gerät	peqSTAR 96X Universal Gradient	PEQLAB VWR International GmbH, Erlangen
Schlittenmikrotom	Leica SM 200R	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Spektrometer plus Software	NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE, USA
	ND-1000 Software V3.8.1	
Thermomixer	comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Minispin	Eppendorf AG, Hamburg
	Centrifuge 5402	
UV(Ultraviolett)-Stratalinker	UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vakuumzentrifuge	Heto Vacuum Centrifuge	Vaccubrand GmbH & Co KG, Wertheim
	Heto Drywinner	
	Vakuumpumpe	
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wärmeschrank	Incucell	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg
Wasserbad	Medax Typ WB24	Medax Nagel GmbH, Kiel
Zellzählgerät	Countess® Automated Cell Counter	Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt
Zentrifuge	Centrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.3 Immunhistochemische Analysen

#### 3.3.1 Gewebepräparation

Die Gewebeproben werden direkt nach der Entnahme in einer Kassette liegend in PBS-gepuffertem 4 %-igem Formalin fixiert und in Paraffinwachs eingebettet (FFPE-Gewebe). Der Einbettungsprozess beginnt automatisiert mit Hilfe eines Reagens-Transfer-Prozessors. Die Programmschritte für die Gewebepräparation sind in Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 13: Zyklen der Gewebepräparation mit Hilfe des Reagens-Transfer-Prozessors Tissue-Tek®VIP™5 Jr zur Einbettung in Paraffin.**

Reagenz	Dauer [h]	Temperatur [°C]
4 %-iges Formalin/1x PBS	2,0	45
70 %-iges Ethanol	0,5	40
70 %-iges Ethanol	1,0	40
70 %-iges Ethanol	1,0	40
96 %-iges Ethanol	0,5	40
99 %-iges Ethanol	1,0	40
99 %-iges Ethanol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Xylol	1,0	40
Paraffin	0,5	60
Paraffin	0,5	60
Paraffin	1,0	60
Paraffin	1,0	60

Nach durchgeführter Infiltration (Tabelle 13) befindet sich die Gewebeprobe in flüssigem Paraffin und wird nun manuell mit Hilfe eines Einbettungsgerätes eingeblockt.

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten wird ein Schlittenmikrotom verwendet. Bei dieser Art des Mikrotoms wird der Messerschlitten auf einer Laufbahn horizontal vor und zurück bewegt, während das Präparat auf einer Blockhalterung fixiert ist. Beim Schneidevorgang wird das Messer durch den Block gezogen und somit eine dünne Schicht auf der Oberseite des Blocks abgetragen. Nach dem Anschneiden erfolgt der Feinschnitt. Die Schnitte werden zur Streckung mit Hilfe eines Pinsels in ein warmes Wasserbad übertragen und schließlich auf einen Objektträger aufgezogen.

Für Hämatoxylin-Eosin-Färbungen werden die Paraffinschnitte mit einer Dicke von 7 µm angefertigt. Für immunhistochemische Färbungen wird eine Schnittdicke von 4 µm

verwendet. Zur Isolierung von RNA inklusive miRNA werden Paraffinschnitte mit einer Dicke von 10 µm genutzt.

### 3.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

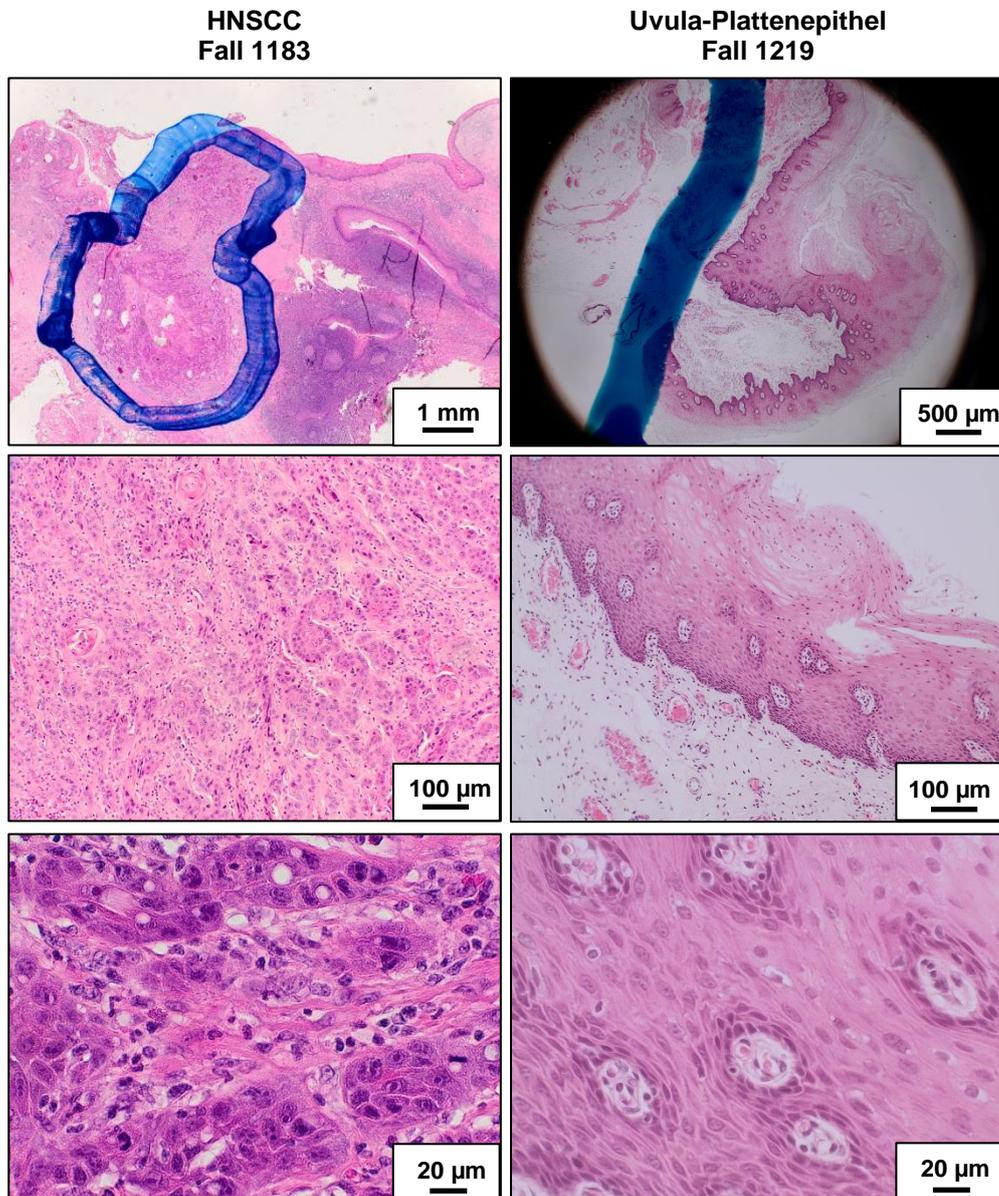
Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine weltweit verbreitete, routinemäßig durchgeführte Färbemethode, die als Übersichtsfärbung bei Gewebe dient, um sowohl die Strukturen des Gewebes als auch die Zellverteilung, die Kern-Plasma-Reaktion und die Anfärbbarkeit zu beurteilen. Die Färbung besteht aus einer Kernfärbung und einer Plasmafärbung, welche durch die beiden kontrastreichen Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin erreicht wird und bereits im Jahre 1876 durch Wissowzky entwickelt wurde (Lang, 2013).

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus der Gruppe der Flavinoiden, der aus Blauholz gewonnen und für die Kernfärbung verwendet wird. Allerdings ist nicht das Hämatoxylin der wirksame Farbstoff, sondern sein Oxidationsprodukt Hämatein. Die Oxidation (Reifung) von Hämatoxylin zum Hämatein erfolgt durch Luftsauerstoff im Verlauf von Wochen, kann aber mit Einsatz von Oxidanzien (künstliche Reifung) beschleunigt werden. Die Abspaltung zweier Protonen bewirkt einen Farbsprung zu braun-gelb. Durch den Zusatz verschiedener Metallsalze kommt es zu Komplexbindungen von Hämatein und Metallion, wobei gut färbende Hämatoxylinlacke (Hämateinlacke) entstehen, die zur Kernfärbung bei der HE-Färbung genutzt werden. Die Hämatoxylinlacke des Aluminiums, gebildet mit Alaunen, nennt man Hämalaune, wobei die Farbe des Lacks pH-abhängig ist. Bei einem pH-Wert unter 3 erscheinen die Lösungen rotbraun, wohingegen sich bei höheren pH-Werten der charakteristische Blauton ergibt. Die Färbung erfolgt in saurer Lösung, wobei durch Spülen mit Leitungswasser der Hämateinlack seine blaue Farbe annimmt (Bläuen). Dies bewirkt zudem eine Fixierung der Färbung, da die Lacke bei höherem pH-Wert schlecht löslich sind. Differenziert wird die Färbung mit sauren Lösungen wie Essigsäure oder Salzsäure (Lang, 2013).

Eosin hingegen ist ein synthetischer, saurer Farbstoff, zugehörig den Xanthenfarbstoffen, und ist in Wasser und Alkohol löslich. Dieser Farbstoff färbt Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern rot. Darüber hinaus färbt Eosin auch Kernstrukturen, wodurch nach vorangegangener Kernfärbung mit Hämalaun das typische rötlich-violette Mischbild entsteht. Bei einer guten Färbung mit Eosin kann zwischen einer Orangefärbung in Erythrozyten und eosinophiler Granula, einer rötlich-rosa Färbung des Zytoplasmas und einer rosa Färbung der kollagenen Fasern unterschieden werden (Lang, 2013).

Die Tumorareale wurden anhand der HE-Färbung freundlicherweise von der Pathologin Frau Dr. Andrea Hasenfus (Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Universitätsklinikum

des Saarlandes) auf den eingedeckten FFPE-Gewebeschnitten mittels Filzstift markiert (Abbildung 10), um in der vorliegenden Arbeit eine selektive Untersuchung der Tumorareale sowohl für die immunhistochemische Färbung von p16 als auch für die Isolierung von miRNA zu gewährleisten.



**Abbildung 10: Hämatoxylin-Eosin-Färbung an FFPE-Gewebeschnitten von einem HNSCC-Präparat und einem Uvula-Präparat als Kontrolle.** Das Tumorareal (HNSCC Fall 1183) bzw. das unauffällige Plattenepithel (Uvula-Plattenepithel Fall 1219) wurde durch eine Pathologin auf den eingedeckten Hämatoxylin-Eosin-gefärbten FFPE-Gewebeschnitten mittels Filzstift markiert, um in der vorliegenden Arbeit eine selektive Untersuchung der Tumorareale vergleichend zum unauffälligen Plattenepithel sowohl für die immunhistochemische Färbung von p16 als auch für die Isolierung von miRNA zu gewährleisten.

### Durchführung der HE-Färbung an Paraffinschnitten

Zur Entparaffinierung der Schnitte werden diese bei 55 °C über Nacht in den Wärmeschrank gestellt. Am nächsten Tag werden die Schnitte für 15 min in Xylol eingestellt, danach zweimal in Xylol, dreimal in 99 %-igem Ethanol, dreimal in 70 %-igem Ethanol und zweimal in Aqua dest gespült. Die Kernfärbung mit Hämalaun erfolgt für 10 min, bevor mit Leitungswasser gespült wird. Die Differenzierung erfolgt mit HCl-Alkohol (aus 1 l 70 %-igem Ethanol und 10 ml 25 %-iger HCl). Aufgrund des niedrigen pH-Wertes erscheinen die Zellkerne nun rötlich-braun. Durch Erhöhung des pH-Wertes (Bläuen) mit kaltem Leitungswasser für 10 min schlägt der pH-Wert in das typische Blauviolett um. Die Zytoplasma-Färbung wird in einer 1 %-igen Eosinlösung für 30 s durchgeführt. Danach folgen ein Spülschritt mit Leitungswasser und die Entwässerung des Gewebeschnitts in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Im Anschluss wird in Xylol geklärt und mit Entellan eingedeckt.

### **3.3.3 Immunhistochemische Färbung von p16**

Die immunhistochemische Färbung von p16 wird mit Hilfe des CINtec p16<sup>INK4a</sup> Histology Kits entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Schnitte werden bei 55 °C über Nacht im Wärmeschrank entparaffiniert und am nächsten Tag für 15 min in Xylol eingestellt, danach zweimal in Xylol, dreimal in 99 %-igem Ethanol, dreimal in 70 %-igem Ethanol und zweimal in Aqua dest gespült. Die Demaskierung erfolgt für 10 min bei 95 °C mit der Epitope Retrieval Solution pH 9,0. Dafür wird die Lösung in einer Küvette in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und die Schnitte darin bei 95 °C für 10 min inkubiert. Danach werden die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt und dreimal mit CINtec-Waschpuffer (1:10) gewaschen. Die Peroxidaseblockierung erfolgt für 5 min in einer feuchten Kammer, wobei pro Schnitt 100 µl Peroxidase-Blockierungsreagenz auf den Objektträger gegeben und die Schnitte mit einem großen Deckglas abgedeckt werden (alle weiteren Inkubationen erfolgen nach dieser Vorgehensweise). Anschließend folgt ein dreimaliger Waschschrift mit CINtec-Waschpuffer (1:10). Die darauffolgende Inkubation mit dem Primärantikörper Mouse-anti-human p16<sup>INK4a</sup> geschieht für 30 min bei 37 °C. Für die Negativkontrollen wird anstatt des Primärantikörpers das Negativkontrollreagenz verwendet. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit CINtec-Waschpuffer (1:10) werden die Schnitte für 30 min bei 37 °C mit je 40 µl Visualisierungsreagenz inkubiert, bevor sie abermals dreimal mit CINtec-Waschpuffer (1:10) gewaschen werden. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 10 min mit Diaminobenzidin-gepufferter Substratlösung und Diaminobenzidin-Chromogen (1:80) und eine Spülung in Aqua dest. Für die Gegenfärbung werden die Schnitte sechsmal in Weigertslösung (40 ml Weigerts Stammlösung A plus 40 ml Weigerts Stammlösung B plus 160 ml Aqua dest) getaucht, in Aqua dest gespült und zur Dehydrierung dreimal in 70 %-

igem Ethanol, dreimal in 99 %-igem Ethanol und dreimal in Xylol gespült und anschließend mit Entellan eingedeckt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung von p16 erfolgt am Durchlichtmikroskop durch zwei unabhängige Begutachter. Als zweiter Gutachter fungierte freundlicherweise Frau Dr. Silke Wemmert (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes). Betrachtet werden dabei die HE-Färbung, das Präparat mit Antikörper und die Negativkontrolle ohne Antikörper des jeweiligen Tumors. Zusätzlich wird bei jeder immunhistochemischen Färbung eine Negativ- und Positivkontrolle eines bekannten p16-positiven Tonsillenpräparats zur Überprüfung einer erfolgreichen Färbung mitgeführt. Ausgewertet wird nach den Kriterien „p16-negativ“ und „p16-positiv“. Es werden keine Unterscheidungen hinsichtlich der Kriterien „Farbintensität“ oder „Anzahl positiver Zellen“ vorgenommen.

### **3.4 RNA-Isolierung inklusive miRNA**

Für die nachfolgenden miRNA-Analysen wird die gesamte RNA inklusive miRNA aus Vollblut, Paraffinschnitten, Abstrichmaterial und Zellkulturen isoliert.

#### **3.4.1 Isolierung der RNA inklusive miRNA aus Vollblut**

Die Isolierung der gesamten RNA inklusive miRNA aus Vollblut wird mit Hilfe eines speziell auf die PAXgene™ Blood RNA Tubes angepassten PAXgene™ Blood miRNA Kits entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu werden die PAXgene™ Blood RNA Tubes für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Lysis der Blutzellen zu gewährleisten. Danach werden die PAXgene™ Blood RNA Tubes für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert (Centrifuge 5804 R), der Überstand wird verworfen, das Pellet in 4 ml RNase-freiem Wasser durch vortexen gelöst und erneut für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen, während das Pellet in 350 µl BM1-Puffer durch vortexen gelöst und in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt wird. Nach Zugabe von 300 µl BM2-Puffer und 40 µl Proteinase K wird die Probe für 5 s gevortext und für 10 min bei 55 °C mit 1400 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wird die gesamte Probe ins PAXgene™ Shredder Spin Column (lila) in einem Processing Tube überführt und für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Mini Spin). Der Überstand wird in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt, während das Pellet verworfen wird. Die Probe wird mit 700 µl 100 %-igem Isopropanol gemischt und kurz gevortext. 700 µl der Probe werden in ein PAXgene™ Shredder Spin Column (rot) in einem Processing Tube gegeben und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Dabei wird die RNA inklusive der miRNA an die Membran gebunden. Der

Durchfluss wird verworfen. Nun wird der Rest der Probe auf das PAXgene™ Shredder Spin Column (rot) gegeben, wiederum für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wird mit 350 µl BM3-Puffer gewaschen und für 15 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. In einem neuen Mikrozentrifugenröhrchen wird der DNase I Inkubationsmix angesetzt, indem 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer gemischt werden. Dieser wird direkt auf die PAXgene™ RNA Spin Column Membran zum Verdau der DNA pipettiert. Es folgt eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 350 µl BM3-Puffer gewaschen und 15 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Es folgen zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 500 µl BM4-Puffer, wobei nach dem ersten Waschschriff für 15 s und nach dem zweiten Waschschriff für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert wird. Anschließend folgt eine erneute Zentrifugation von 1 min bei 13000 rpm. Schlussendlich wird zweimal mit 40 µl BM5-Puffer in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen eluiert bei einer Zentrifugation von 1 min bei 13000 rpm. Das Eluat enthält die gesamte RNA inklusive miRNA. Im Anschluss wird die Probe 5 min bei 65 °C im Thermo-mixer inkubiert, die RNA-Konzentration mit Hilfe eines NanoDrop Spektrophotometers gemessen und die RNA bei -80 °C gelagert.

### **3.4.2 Isolierung der RNA inklusive miRNA aus Paraffinschnitten**

Die Tumorareale wurden freundlicherweise von der Pathologin Frau Dr. Andrea Hasenfus (Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes) anhand eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparats markiert, um einen Tumoranteil von mindestens 80 % in den nachfolgenden Untersuchungen zu sichern und eine Kontamination mit anderen Zelltypen wie beispielsweise Entzündungszellen weitestgehend zu vermeiden. Die gesamte RNA inklusive miRNA aus Paraffinschnitten wird mit Hilfe des miRNeasy FFPE Kits entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Je nach Größe des Präparates werden sieben bis zwanzig 10 µm Schnitte benötigt. Diese werden auf Objektträger aufgezogen, die entsprechenden Tumorareale mittels eines Skalpells und einer Kanüle vom restlichen Schnitt separiert und in ein 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die gesammelten Schnitte werden mit je 1 ml 100 %-igem Ethanol entwässert, gevortext und für 3 min bei 13400 rpm zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wird. Zur Deparaffinierung werden diese mit je 1 ml Xylol für 10 s gevortext und für 2 min bei 13400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Um überschüssiges Xylol zu entfernen, wird das Pellet in 1 ml 100 %-igem Ethanol aufgenommen, gevortext und für 2 min bei 13400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Proben bei geöffnetem Deckel 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, um überschüssiges Ethanol zu entfernen. Anschließend wird das Pellet in 240 µl PKD-Puffer gelöst und mit 10 µl Proteinase K für 15 min bei 56 °C und 15 min bei 80 °C

inkubiert. Im Anschluss werden die Proben direkt auf Eis überführt, für 3 min inkubiert und für 15 min bei 13400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt (das Pellet wird verworfen) und gemeinsam mit 25 µl DNase Booster-Puffer und 10 µl DNase I Stocklösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl RBC-Puffer und 1750 µl 100 %-igem Ethanol werden je 700 µl der Probe auf ein RNeasy MinElute Spin Column überführt, für 15 s bei 13400 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wird wiederholt bis die komplette Probe auf das RNeasy MinElute Spin Column überführt ist. Danach folgt eine Zugabe von 500 µl RPE-Puffer auf das RNeasy MinElute Spin Column und ein Zentrifugationsschritt bei 13400 rpm für 15 s. Dieser Schritt wird mit 500 µl RPE-Puffer bei einer Zentrifugationszeit von 2 min wiederholt. Zur Trocknung der Membran des RNeasy MinElute Spin Columns wird dieses für 5 min bei 13400 rpm zentrifugiert und schlussendlich zum Eluieren der RNA inklusive miRNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei 13400 rpm zentrifugiert. Die RNA-Konzentration wird wie zuvor beschrieben spektrometrisch gemessen und die RNA bei -80 °C gelagert.

### **3.4.3 Isolierung der RNA inklusive miRNA aus Abstrichmaterial**

Die Isolierung der gesamten RNA inklusive miRNA aus Abstrichmaterial erfolgt mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits entsprechend den Herstellerangaben. Nach dem Abstrich wird die Bürste in ein 15 ml Röhrchen gegeben, 700 µl QIAzol Lysis Reagent hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Anschließend werden 140 µl Chloroform hinzugegeben, das Gemisch für 15 s gevortext und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wird die Bürste mit einer sterilen Pinzette entfernt, während die Probe für 30 min mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5804R) wird. Nach der Zentrifugation wird die obere, wässrige Phase in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit 1,5 Volumen 100 %-igem Ethanol resuspendiert. 700 µl der Probe werden in ein RNeasy Mini Column gegeben und für 15 s mit 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Minispin). Der Durchfluss kann verworfen werden. Dieser Schritt wird mit der restlichen Probe wiederholt. Nun werden 700 µl RWT-Puffer auf das RNeasy Mini Column gegeben, für 15 s mit 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wiederholt sich zweimal mit 500 µl RPE-Puffer, wobei die zweite Zentrifugation für 2 min erfolgt. Um sicher zu stellen, dass die Membran des RNeasy Mini Columns trocken ist, wird erneut zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Zur Elution der RNA inklusive miRNA werden je Isolierung 30 µl RNase-freies Wasser auf das RNeasy Mini Column gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubation für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die RNA-Konzentration wird wie zuvor beschrieben spektrometrisch gemessen und die RNA bei -80 °C gelagert.

### 3.4.4 Isolierung der RNA inklusive miRNA aus Zellkulturen

Die Isolierung der gesamten RNA inklusive miRNA aus den Zellkulturen FaDu und UM-SCC-1 erfolgt mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits entsprechend den Herstellerangaben. Nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin-EDTA werden  $1 \times 10^6$  Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 1x PBS gewaschen, abzentrifugiert und in 700  $\mu$ l QIAzol Lysis Reagent für 1 min gevortext, bevor eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur im Dunklen folgt. Anschließend werden 140  $\mu$ l Chloroform hinzugegeben, das Gemisch für 15 s gevortext und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wird das Gemisch für 30 min mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5804R). Die restlichen Isolierungsschritte sind identisch zu denen aus Kapitel 3.4.3.

### 3.5 Bestimmung des miRNA-Profiles mittels Microarrays

Zur Untersuchung der miRNA-Profile im Blut von Plattenepithelkarzinom-Patienten wird eine Microarray-Analyse (SurePrint G3 8x60K miRNA Microarrays) durchgeführt, um einen Gesamtüberblick über die veränderten Expressionen bei dieser Erkrankung zu erhalten. Zum Vergleich werden Blutproben von gesunden Probanden gleichen Geschlechts und Alters untersucht. Die Proben werden mit dem MicroRNA Complete Labeling and Hybridization Kit entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Wenn nicht anders angegeben, erfolgen alle Schritte auf Eis.

Für diese Untersuchung werden 2  $\mu$ l (100 ng) der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt und zur anschließenden Dephosphorylierung 2  $\mu$ l CIP (Calf Intestinal Phosphatase)-Mastermix (Tabelle 14) zu jeder Probe pipettiert und 30 min bei 37 °C im Thermomixer inkubiert.

**Tabelle 14: CIP-Mastermix.**

Komponente	Volumen [ $\mu$ l] pro Reaktion	Volumen [ $\mu$ l] pro 9 Reaktionen
10x Calf Intestinal Phosphatase Buffer	0,4	3,6
Labeling Spike-In	1,1	9,9
Calf Intestinal Phosphatase	0,5	4,5
Gesamtvolumen	2,0	18,0

Um eine erfolgreiche Markierung sicherzustellen, ist im CIP-Mastermix eine Markierungskontrolle (Labeling Spike-In) enthalten, die über eine Verdünnungsreihe aus der im Kit enthaltenen Originallösung hergestellt wird (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Verdünnungsreihe der Labeling Spike-In Lösung.**

<b>Verdünnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
1. Verdünnung Labeling Spike-In	198 µl Dilution-Buffer + 2 µl Labeling Spike-In Solution
2. Verdünnung Labeling Spike-In	198 µl Nuklease-freies Wasser + 2 µl 1. Verdünnung
3. Verdünnung Labeling Spike-In	198 µl Nuklease-freies Wasser + 2 µl 2. Verdünnung

Zur Denaturierung werden zu jeder Probe 2,8 µl 100 %-iges DMSO hinzugegeben, 8 min bei 100 °C im Thermomixer inkubiert und sofort auf ein Eiswasserbad überführt. Nun werden zur Ligation der Proben in jedes Mikrozentrifugenröhrchen 4,5 µl des Ligation-Mastermix (Tabelle 16) hinzu pipettiert und diese für 2 h bei 16 °C im Thermomixer inkubiert.

**Tabelle 16: Ligation-Mastermix.**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl] pro Reaktion</b>	<b>Volumen [µl] pro 9 Reaktionen</b>
10x T4 RNA Ligase Buffer	1,0	9,0
Cyanine3-pCp	3,0	27,0
T4 RNA Ligase	0,5	4,5
Gesamtvolumen	4,5	40,5

Im Anschluss werden die Proben mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge bei 45 °C bis 55 °C getrocknet. Nach 30 min sollten die Proben überprüft und anschließend bis zur kompletten Trocknung weiterzentrifugiert werden. Die Pellets werden in 17 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Danach werden 1,0 µl Hyb Spike-In Lösung, 4,5 µl 10x GE Blocking Agent und 22,5 µl 2x Hi-RPM Hybridization Buffer zu jeder Probe hinzu gegeben. Anschließend werden die Proben für 5 min bei 100 °C im Thermomixer und für 5 min im Eiswasserbad inkubiert und sollen innerhalb von 10 min auf den Microarray aufgebracht werden. Dabei werden die markierten miRNA-Proben jeweils mittig ohne Luftblasen auf ein Gasket Slide, der in einer Agilent SureHyb Chamber liegt, geladen. Der Microarray wird auf den Gasket Slide gelegt, die Agilent SureHyb Chamber wird fest verschlossen und für 20 h bei 55 °C und 20 rpm im Hybridisierungssofen inkubiert.

Nach 20 h wird der Gasket Slide bei Raumtemperatur in GE Waschpuffer 1 entfernt und der Array anschließend für 5 min bei Raumtemperatur in GE Waschpuffer 1 und für 5 min bei 37 °C in GE Waschpuffer 2 gewaschen. Im Anschluss folgt das Einlesen der Microarrays. Die biostatistische Auswertung der drei in dieser Arbeit durchgeführten Microarrays erfolgte durch die Bioinformatikerin Frau Dr. Christina Backes (Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes).

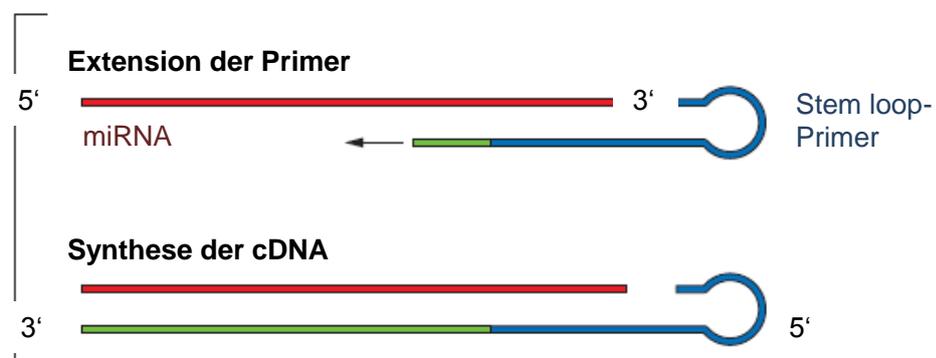
### 3.6 Bestimmung des miRNA-Profiles mittels quantitativer Real-Time PCR

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt, wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Dieses Verfahren ermöglicht *in vitro* eine gezielte Amplifikation von bestimmten Nukleotidsequenzen in zyklisch sich wiederholenden Reaktionsschritten, wobei man diese in Denaturierung, Annealing (Primeranlagerung) und Extension (Strangverlängerung) unterteilt (Watson *et al.*, 2011).

Auf Basis der Polymerasekettenreaktion wurde eine Vielzahl anderer PCR-Techniken entwickelt, die in verschiedensten naturwissenschaftlichen Bereichen zur Anwendung kommen. Eine davon ist die quantitative Real-Time PCR, die in dieser Arbeit zur Validierung der Microarray-Ergebnisse angewendet wird.

#### 3.6.1 Reverse Transkription mit TaqMan® miRNA-spezifischen stem loop-Primern

Zur Validierung der Microarray-Analyse werden die Ergebnisse mittels quantitativer Real-Time PCR an einem erweiterten Probenkollektiv überprüft. Hierfür wird im Rahmen der Reversen Transkription die miRNA in cDNA umgeschrieben, die in der anschließenden quantitativen Real-Time PCR das Ausgangsmaterial darstellt. Dies geschieht mit Hilfe des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits im PCR-Gerät. Die dafür benötigten TaqMan® MicroRNA Assays, die aus miRNA-spezifischen stem loop-Primern für die Reverse Transkription (Abbildung 11) und aus einem Gold Standard TaqMan® Primer und Sonden Set für die quantitative Real-Time PCR bestehen, sind in Tabelle 17 und Tabelle 18 aufgeführt.



**Abbildung 11: TaqMan® miRNA-spezifische stem loop-Primer** (modifiziert nach Custom TaqMan® Small RNA Assay von Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt). Nach der Anlagerung der stem loop-Primer kommt es zur Extension und somit zur Synthese der cDNA.

**Tabelle 17: TaqMan® Control MicroRNA Assay.**

Assay-Name	Assay-ID
RNU48	001006
RNU6B	001093

**Tabelle 18: TaqMan® MicroRNA Assay.**

Assay-Name	Assay-ID
hsa-miR-125a	002198
hsa-miR-146a	000468
hsa-miR-155	002623
hsa-miR-218	000521
hsa-miR-1246	462575

Durchführung der Reversen Transkription

Zur Herstellung der cDNA wird aus der isolierten RNA der jeweiligen Probe eine Vorverdünnung von 80 ng/µl angefertigt und aus dieser der Reaktionsansatz mit 20 ng/µl in einem Probenvolumen von 5 µl hergestellt. Zu dieser RNA-Probe (100 ng RNA) werden 3 µl des entsprechenden TaqMan® MicroRNA Assays (Tabelle 17 und Tabelle 18) und 7 µl Mastermix (Tabelle 19) hinzugegeben, resuspendiert und herunterzentrifugiert (Minispin). Alle Schritte erfolgen auf Eis.

**Tabelle 19: Mastermix Reverse Transkription.**

Komponente	Volumen [µl] pro Reaktion	Volumen [µl] für 10 Reaktionen
dNTP Mix (100 mM total)	0,15	1,70
MultiScribe RT Enzym (50U/µl)	1,00	11,00
10x RT-Puffer	1,50	16,50
RNase Inhibitor (20U/µl)	0,19	2,10
RNase-freies Wasser	4,16	45,70
Gesamtvolumen	7,00	77,00

Anschließend folgt eine Inkubation von 5 min auf Eis, bevor die Reverse Transkription im PCR-Gerät mit den in Tabelle 20 aufgeführten Zyklus-Bedingungen gestartet wird.

**Tabelle 20: Zyklus-Bedingungen der Reversen Transkription.**

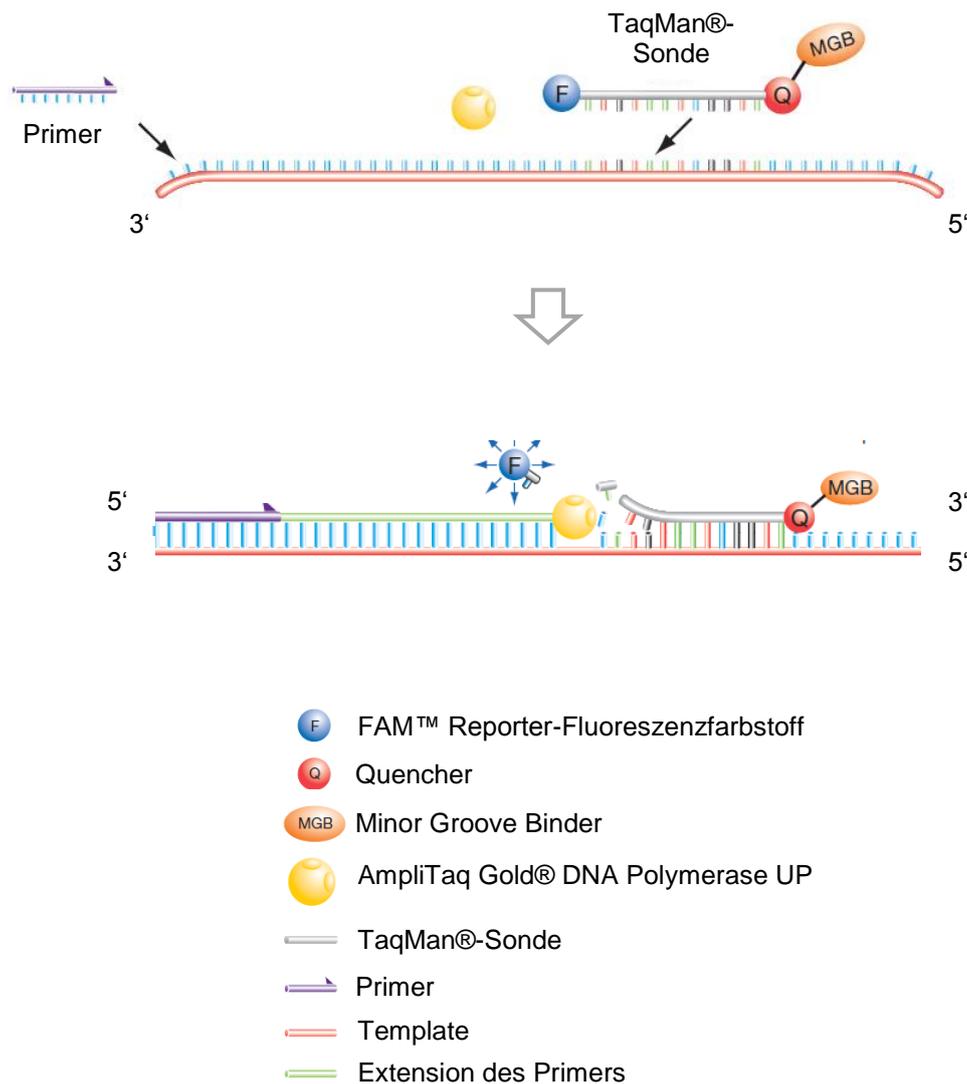
Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Annealing	30	16	1
Extension	30	42	1
Denaturierung	5	85	1
Lagerung	∞	4	1

Bis zur Weiterverwendung der cDNA im Rahmen der quantitativen Real-Time PCR kann diese bei -20 °C gelagert werden.

### 3.6.2 Quantitative Real-Time PCR mit TaqMan® MicroRNA Assays

Die quantitative Real-Time PCR ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die zusätzlich zum herkömmlichen Prinzip der Polymerasekettenreaktion die Möglichkeit der Quantifizierung in Echtzeit bietet, bei der die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt (Holzapfel & Wickert, 2007).

Zur Durchführung der quantitativen Real-Time PCR werden der TaqMan® Gene Expression Mastermix und das Gold Standard TaqMan® Primer und Sonden Set des TaqMan® MicroRNA Assays verwendet. Dieses Set besteht aus Primern (Oligonukleotiden), die am 5' und 3' Ende des DNA-Fragments liegen, und zusätzlich aus innerhalb der Sequenz liegenden, spezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden. Es handelt sich hierbei um Hydrolisierungs sonden (TaqMan®-Sonden), die am 5' Ende den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (F) und am 3' Ende den nicht-fluoreszierenden Quencher (Q) und den Minor-Groove-Binder (MGB) tragen (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Prinzip der TaqMan®-Sonde** (modifiziert nach Applied Biosystems® StepOne und StepOnePlus von Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt). Primer und Sonde binden spezifisch an die cDNA. Durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher wird die Fluoreszenz durch einen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer unterdrückt. Erst durch die Exonuklease-Aktivität der Polymerase während der Extensionsphase wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben und der Reporter fluoresziert.

Zur Messung der Fluoreszenz werden die Sonden während der PCR mit einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) angeregt, wobei jedoch anfangs aufgrund der räumlichen Nähe des Reporters zum Quencher die Fluoreszenz durch einen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer unterdrückt wird. Nach der Denaturierung der cDNA hybridisieren die Primer und die Sonde an den Matrizenstrang (Abbildung 12). In der Extensionsphase trifft die im TaqMan® Gene Expression Mastermix enthaltene AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP auf die Sonde und beginnt mit der Verdrängung, wodurch eine Y-förmige Sekundärstruktur entsteht. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase wird die Sonde hydrolysiert und der Reporter

somit freigesetzt. Durch die nun nicht mehr vorhandene räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher und des nun aufgehobenen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers kommt es zur Emission (520 nm) des Reporters, die mit jedem PCR-Zyklus ansteigt. Dabei ist die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zu den freigesetzten Fluorophoren und der Menge der PCR-Produkte. Zudem ist das Signal strikt sequenzspezifisch, da nicht komplementär gebundene Sonden verdrängt und freie, nicht-hybridisierte Sonden nicht hydrolisiert werden.

#### Durchführung der Real-Time PCR mit TaqMan® MicroRNA Assays

Die Real-Time PCR wird im 96-Well-Format durchgeführt, wobei jede miRNA-cDNA-Probe als Triplikat läuft. Zudem wird parallel zu jedem Assay eine Negativkontrolle ohne Template, ebenfalls als Triplikat, mitgeführt. Pro Well werden 1 µl miRNA-cDNA-Probe vorgelegt und um 9 µl Mastermix (Tabelle 21) ergänzt. Alle Schritte erfolgen auf Eis.

**Tabelle 21: Mastermix Real-Time PCR.**

Komponente	Mastermix Volumen [µl] pro Reaktion
TaqMan® MicroRNA Assay Primer (20x)	0,5
TaqMan® Gene Expression Mastermix	5,0
RNase-freies Wasser	3,5
Gesamtvolumen	9,0

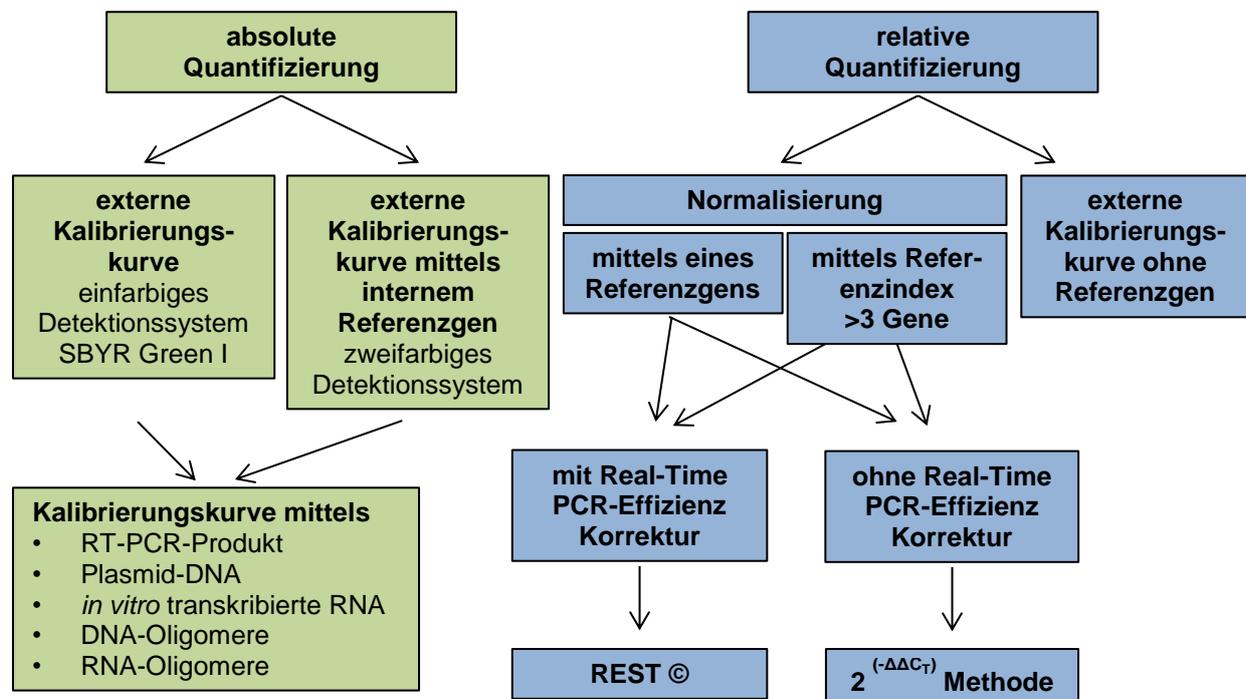
Die 96-Well-Platte wird mit einer Folie (MicroAmp Optical Adhesive Film) verschlossen und bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert (Centrifuge 5805 R). Die Messung und Auswertung erfolgt mit Hilfe des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems und der StepOne Software v2.3. Die einzelnen Schritte des Programms sind in Tabelle 22 aufgelistet.

**Tabelle 22: Zyklus-Bedingungen der Real-Time PCR.**

Schritt	Zeit [min:s]	Temperatur [°C]	Zyklen
Enzymaktivierung	10:00	95	1
Denaturierung	00:15	95	45
Annealing + Extension	00:60	60	

### 3.6.3 Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung

Bei der quantitativen Real-Time PCR stehen zwei generelle Quantifizierungsstrategien zur Verfügung (Abbildung 13), wobei man zwischen einer absoluten Quantifizierung und einer relativen Quantifizierung unterscheidet (Pfaffl, 2001; Pfaffl, 2004; Holzapfel & Wickert, 2007).

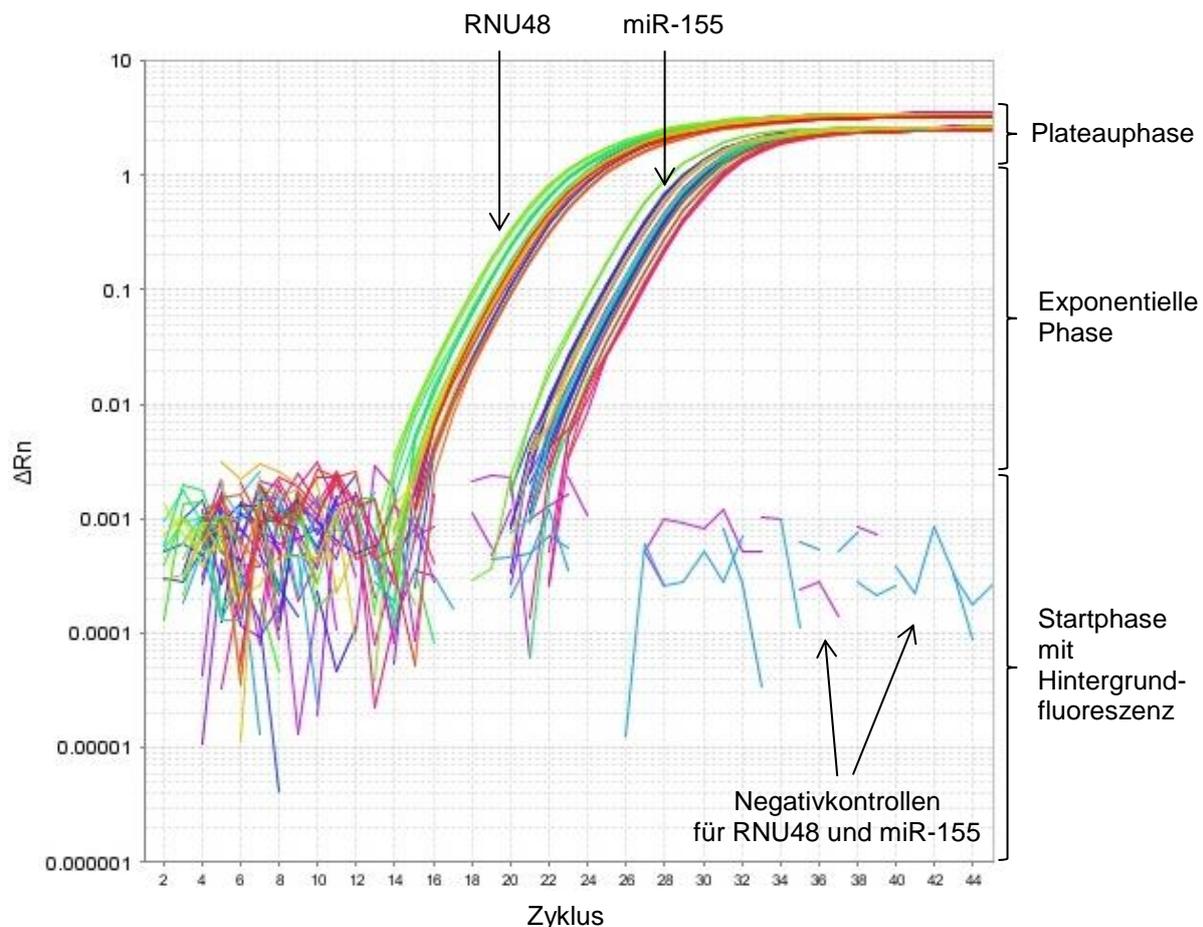


**Abbildung 13: Quantifizierungsstrategien in der Real-Time PCR nach vorangegangener Reversen Transkription** (modifiziert nach Pfaffl, 2004).

Die absolute Quantifizierung beruht auf einer gegebenen Kalibrierungskurve, die auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR-Produkten, Plasmid-DNA, *in vitro* transkribierte RNA, DNA- oder RNA-Oligomere basiert, während sich die relative Quantifizierung (Abbildung 13) aus einer Normalisierung der Expressionsergebnisse ergibt, indem man die Expression eines Zielgens auf ein weiteres nicht dereguliertes Referenzgen bezieht, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA-Probe auszugleichen (Pfaffl, 2001; Pfaffl, 2004; Holzapfel & Wickert, 2007).

Das Maß für die relative Quantifizierung der DNA-Menge ist der sogenannten  $C_T$ -Wert (Schwellenwertzyklus), der der Anzahl der PCR-Zyklen entspricht, bei der die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Dieser Wert liegt am Anfang der exponentiellen Phase, die zwischen der Start- und Plateauphase einer PCR liegt (Abbildung 14). Am Anfang einer PCR (Startphase) ist die DNA-Menge begrenzt, während am Ende der PCR, der Plateauphase, die DNA-Menge so stark angestiegen ist, dass es

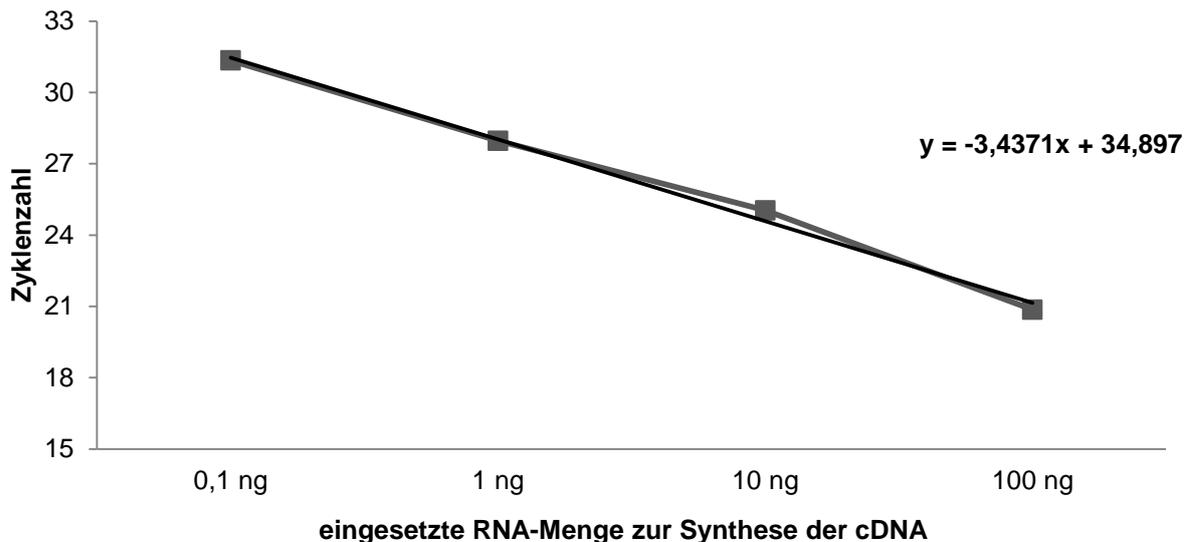
immer öfter zur Hybridisierung von Produktfragmenten und somit zur Hemmung der PCR kommt. In der exponentiellen Phase hingegen verdoppelt sich unter optimalen Bedingungen die Zielsequenz und wird daher zur Quantifizierung genutzt (Pfaffl, 2001; Pfaffl, 2004; Holzapfel & Wickert, 2007). In die Auswertung werden ausschließlich  $C_T$ -Werte mit einer Standardabweichung kleiner 0,1 eingeschlossen. Des Weiteren werden  $C_T$ -Werte größer als 35 für die Auswertung aufgrund zu geringem miRNA-Gehalt und daraus resultierenden ungenauen Messwerten nicht verwendet.



**Abbildung 14: Typische Amplifikationskurven der Real-Time PCR.** Zu sehen sind Amplifikationskurven der endogenen Kontrolle RNU48 und der miRNA 155 zur Messung der Genexpression in Blutproben von HNSCC-Patienten.

Wenn sich in der exponentiellen Phase die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen genau verdoppelt, spricht man von einer optimalen Effizienz von 100 %. In der Praxis liegt die Effizienz jedoch eher bei 1,7 bis 1,9 statt bei 2,0. Berücksichtigt man also zusätzlich die unterschiedlichen Real-Time PCR-Effizienzen der untersuchten Faktoren, lässt sich die relative Quantifizierung mit Hilfe einer Effizienzkorrektur weiter optimieren. Bisher stellt diese

Art der Quantifizierung die genaueste Form dar und wird daher in der vorliegenden Arbeit zur Auswertung der Daten herangezogen (Holzapfel & Wickert, 2007; Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002; Pfaffl, 2004). Die PCR-Effizienz wird mit Hilfe einer Standardkurve (Abbildung 15) basierend auf einer cDNA-Verdünnungsreihe (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000) erstellt, wobei die eingesetzte RNA-Menge zur Synthese der cDNA in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dargestellt wird. Die Formel dafür lautet  $E = 10^{\frac{-1}{\text{Steigung}}}$ .



**Abbildung 15: Standardkurve zur Berechnung der Primereffizienz.** Die PCR-Effizienz wird mit Hilfe einer Standardkurve basierend auf einer cDNA-Verdünnungsreihe (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000) erstellt, wobei die eingesetzte Menge an cDNA in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dargestellt wird. Diese Abbildung zeigt die Standardkurve und Trendlinie der endogenen Kontrolle RNU48 im Blut. Setzt man die ermittelte Steigung der Trendlinie von -3,4371 in die für die Berechnung der Primereffizienz entsprechende Formel von  $E=10^{(-1/\text{Steigung})}$  ein, erhält man eine Primereffizienz von  $E=1,954$  für die endogene Kontrolle RNU48 im Blut.

Eine Standardkurve mit einer Steigung von -3,32 steht für eine PCR-Reaktion mit einer optimalen Effizienz von 100 %, Werte kleiner -3,32 für eine Reaktionseffizienz kleiner 100 % und Werte größer -3,32 sind theoretisch zwar unmöglich, kommen in der Praxis jedoch öfter vor und deuten auf Probleme bezüglich der Probenqualität oder des Pipettierens hin.

Die jeweiligen Primereffizienzen werden bei der Auswertung aller Real-Time PCR-Daten, die mit Hilfe der Software REST© 2009 (Relative Expression Software Tool V2.0.13) durchgeführt wird, berücksichtigt. Dabei werden alle Rohdaten zusammengefasst, um die entsprechende Effizienz korrigiert und statistisch überprüft. Die Software beruht auf einem neuen mathematischen Modell zur Bestimmung der relativen Quantifizierung eines Zielgens

im Vergleich zu einem Referenzgen. Die Formel zur Berechnung des relativen Expressionsverhältnis (Ratio) des Zielgens lautet

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CT_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle-Tumorproben})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CT_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle-Tumorproben})}}$$

(Pfaffl *et al.*, 2002). Die grafische Darstellung in Form eines Boxplot-Diagramms und die Berechnung der Wahrscheinlichkeit (p-Wert) mittels Mann-Whitney U-Test wird mit Hilfe der Software SPSS Statistics Version 20 durchgeführt.

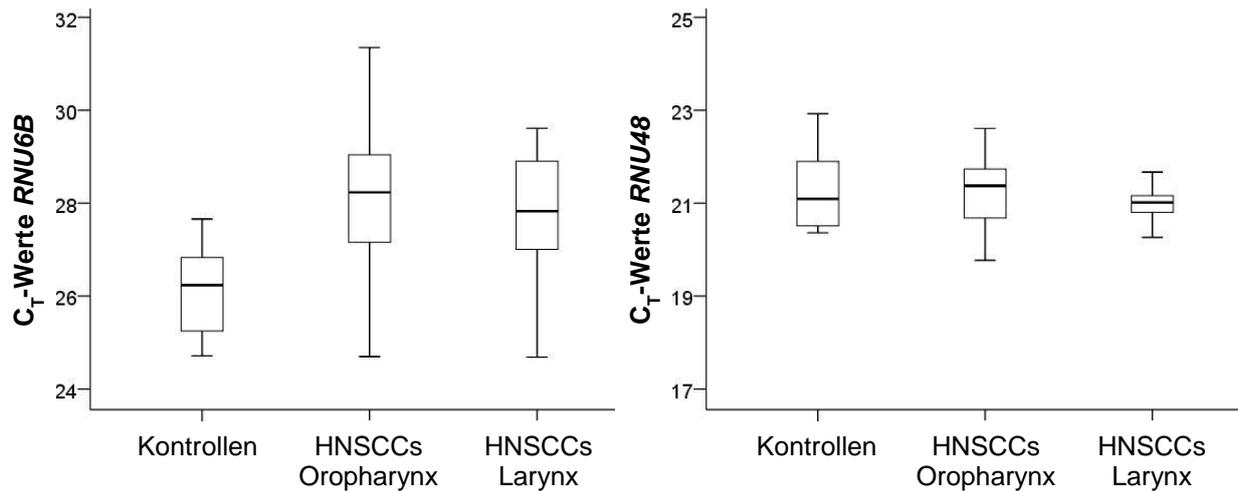
### 3.6.4 Etablierung der endogenen Kontrolle (Referenzgen)

Die endogene Kontrolle (Referenzgen), die zur Normalisierung der Expression eines Zielgens herangezogen wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA-Probe auszugleichen, spielt bei der Real-Time PCR eine wichtige Rolle. Das ideale Referenzgen setzt eine leichte Detektion und eine stabile Expression innerhalb aller untersuchten Proben und Kontrollen unabhängig vom Zelltyp voraus, das heißt es darf keine Variationen in der Expression zwischen Kontroll- und Tumorgewebe sowie als Antwort auf Stress oder Medikamente zeigen. Häufig in miRNA-Studien bezüglich Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (Tabelle 23) verwendete endogene Kontrollen sind RNU44, RNU48 und RNU6B.

**Tabelle 23: Literaturdarstellung der am häufigsten verwendeten endogenen Kontrollen in miRNA-Studien bezüglich Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region.**

Literatur	Material	Referenzgen
Avissar <i>et al.</i> , 2009a	Gewebe, Zelllinien	RNU48
Avissar <i>et al.</i> , 2009b	Gewebe	RNU48
Barker <i>et al.</i> , 2009	FFPE Gewebe	RNU6B, RNU48, RNU44
Brito <i>et al.</i> , 2010	Gewebe, Blut	RNU48, U47, RNU44
Cervigne <i>et al.</i> , 2009	FFPE Gewebe	RNU6B, RNU4, RNU44
Chang <i>et al.</i> , 2008	Gewebe	U47
Childs <i>et al.</i> , 2009	Gewebe	RNU48
Hsu <i>et al.</i> , 2012	Plasma	RNU6B
Hui <i>et al.</i> , 2010	FFPE Gewebe	RNU44
Lajer <i>et al.</i> , 2011	Gewebe	hsa-miR-191
Lin <i>et al.</i> , 2010	Plasma	RNU6B, let-7a
Liu <i>et al.</i> , 2012	Speichel	miR-16
Ramdas <i>et al.</i> , 2009	Gewebe	RNU44
Ries <i>et al.</i> , 2014	Blut	RNU6-2, RNU44
Yang <i>et al.</i> , 2011	Gewebe, Plasma	RNU6B, let-7a

Für die vorliegende Arbeit werden die endogenen Kontrollen *RNU48* und *RNU6B* ausgewählt. Die grafische Darstellung zur Überprüfung der Stabilität innerhalb der untersuchten Blutproben von gesunden Probanden (Kontrollen) und von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region ist in der nachfolgenden Abbildung 16 zu sehen.



**Abbildung 16: Boxplots zur Überprüfung der Stabilität der endogenen Kontrollen *RNU6B* (links) und *RNU48* (rechts) innerhalb der untersuchten Blutproben von gesunden Probanden (Kontrollen) und von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region der Lokalisationen Oropharynx und Larynx.** *RNU6B* eignete sich aufgrund seiner instabilen Expression mit Abweichungen größer 3,32  $C_T$ -Werte nicht als endogene Kontrolle. *RNU48* hingegen zeigte in allen untersuchten Proben eine stabile Expression mit Abweichungen kleiner 3,32  $C_T$ -Werte und wurde daher als endogene Kontrolle in allen folgenden quantitativen Real-Time PCR-Analysen verwendet.

*RNU6B* (Abbildung 16, linkes Diagramm) zeigte eine instabile Expression innerhalb der untersuchten Blutproben von gesunden Probanden (Kontrollen) und von HNSCC-Patienten mit  $C_T$ -Werten, die weit mehr als 3,32  $C_T$ -Werte auseinander liegen und wurde daher nicht als endogene Kontrolle in weiteren Versuchen verwendet.

*RNU48* (Abbildung 16, rechtes Diagramm) präsentierte hingegen eine stabile Expression innerhalb der untersuchten Blutproben von gesunden Probanden (Kontrollen) und von HNSCC-Patienten mit  $C_T$ -Werten, die weniger als maximal 3,32  $C_T$ -Werte auseinander liegen. Somit wies *RNU48* eine stabile Expression auf und konnte folglich als endogene Kontrolle für die miRNA-Analyse mittels quantitativer Real-Time PCR in der vorliegenden Arbeit eingesetzt werden. Auch im untersuchten Gewebe war *RNU48* stabil exprimiert und wurde als endogene Kontrolle verwendet.

### **3.7 Funktionelle Analysen**

#### **3.7.1 Kultivierung und Charakterisierung der Zelllinien**

##### **3.7.1.1 Kultivierung von adhärennten humanen Tumorzellen**

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Versuche mit zwei humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien (FaDu, UM-SCC-1) durchgeführt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten und in Kryoröhrchen zu je  $1 \times 10^6 / 1,5$  ml portionierten Zellsuspensionen werden in der Dampfphase eines Wasserbades bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10 % FCS (fötalem Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert und mit 800 rpm für 5 min abzentrifugiert. Während der Überstand verworfen wird, wird das Pellet in 15 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> gegeben.

Die anschließende Kultivierung der Zellen erfolgt mit DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung. Je nach Bedarf, im Normalfall zweimal wöchentlich, wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Dafür wird das Medium abgesaugt, verworfen und anschließend frisches Medium hinzugefügt.

Bei dichtem Wachstum werden die Zellen je nach Bedarf gesplittet: Das Medium wird dafür abgesaugt und die Zellkulturflasche mit den adhärennten Zellen mit 1x PBS gespült. Anschließend wird 1 ml Trypsin-EDTA zugegeben und für 5 min bei 37 °C mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert, um die Zellen vom Zellkulturflaschenboden abzulösen. Wenn alle Zellen abgelöst sind, wird die Reaktion mit Medium abgestoppt. Von der nun vorhandenen Zellsuspension verbleibt je nach Splittvorgang die entsprechende Menge in der Zellkulturflasche und wird mit frischem Medium aufgefüllt. Danach erfolgt die Inkubation bei 37 °C mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung.

Werden für einen Versuch eine bestimmte Menge an Zellen benötigt, werden diese entsprechend kultiviert, abgelöst, gezählt und ausgesät. Für die Zellzählung wird die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau gemischt und davon 10 µl auf einen Messobjektträger (Countess® Cell Counting Chamber Slides) gegeben. Das Gerät (Countess® Automated Cell Counter) gibt die Gesamtzahl der Zellen, die Teilmenge der lebenden und toten Zellen sowie die Vitalität der Zellen in Prozent an.

##### **3.7.1.2 Chromosomenpräparation aus Zellkulturen**

Für die GTG-Bänderung und anschließende Karyotypisierung der Zelllinien UM-SCC-1 und FaDu erfolgt eine Chromosomenpräparation der kultivierten Tumorzellen.

Für die Chromosomenpräparation werden in jede Zellkulturflasche zwei Tropfen Colcemid gegeben. Anschließend werden die Ansätze für eine halbe Stunde bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Bei Colcemid handelt es sich um das Spindelgift Colchizin, das die Mitose in der Metaphase arretiert, indem es den aus Mikrotubuli bestehenden Spindelapparat auflöst und somit das Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden verhindert. Alle Zellen, die während dieser Inkubation in die Mitose eintreten, bleiben daher in der Metaphase arretiert (Murken *et al.*, 2011). Nach der Inkubation wird der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 2 ml Trypsin/DMEM-Lösung in die Zellkulturflaschen gegeben, um die Mitosen abzulösen. Durch zusätzliches Klopfen lösen sich die Mitosen besser ab (optische Kontrolle unter dem Mikroskop). Die Reaktion wird mit 2 ml DMEM abgestoppt, der gesamte Überstand in das Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 800 rpm ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das verbleibende Zellpellet tropfenweise bis 8 ml mit 0,52 % KCl-Lösung (37 °C warm) vorsichtig resuspendiert. Ab dem Resuspendier-Schritt bis zur anschließenden Zentrifugation beträgt die von der Umgebungstemperatur, der Luftfeuchte und dem Luftdruck abhängige Hypotoniezeit 8 bis 9 min. Die hypotone Salzlösung führt zur Quellung des Chromatins und somit zur Ausbreitung der Chromosomen (Murken *et al.*, 2011). Zentrifugiert wird 10 min bei 800 rpm ohne Bremse. Der Überstand wird vorsichtig bis auf einen Rest von etwa 0,5 ml abgenommen. In dem verbleibenden Rest werden die Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wird vorsichtig mit einem Tropfen -20 °C kaltem Methanol/Eisessig (3:1) fixiert, dann mit fünf weiteren Tropfen und Pipettenweise bis auf 8 ml aufgefüllt. Es folgt eine Inkubation von einer Stunde bei -20 °C. Anschließend wird das Gemisch abzentrifugiert (10 Minuten, 800 rpm, ohne Bremse). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit frischer -20 °C kalter Fixativlösung resuspendiert. Die Waschschriffe werden solange wiederholt bis das Pellet hell bzw. der Überstand klar erscheint. Nach den Waschschriffen wird die Zellsuspension auf mit Ethanol gereinigte Objektträger getropft. Die optische Kontrolle erfolgt mit Hilfe eines Mikroskops. Die Metaphasealterung erfolgt für 1 h bei 90 °C auf der Heizplatte und 3 Tage bei Raumtemperatur, bevor die Präparate für die GTG-Bänderung und anschließende Karyotypisierung genutzt werden können.

### 3.7.1.3 Lymphozyten-Kurzzeitkultur und Chromosomenpräparation aus Lymphozyten

Zur Gewinnung von Metaphase-Chromosomenpräparaten für die vergleichende genomische Hybridisierung werden die Metaphase-Chromosomen aus dem Blut eines gesunden, männlichen Spenders isoliert. Hierfür wird eine Lymphozyten-Kurzzeitkultur angelegt.

Für die Blutkultur wird eine sterile Blutentnahme in Heparinröhrchen durchgeführt und von dem abgenommenen Vollblut werden 0,8 ml in 8 ml Medium PB<sub>max</sub> in einer Petrischale für

72 h bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Das dem Medium zugesetzte Glykoprotein Phytohämagglutinin stimuliert die Mitose, sodass es 40 h nach Zugabe zu einer beginnenden Zellteilung kommt, die nach 72 h ihr Maximum erreicht (Murken *et al.*, 2011). Um maximal kondensierte Metaphase-Chromosomen zu erhalten, wird (analog zur Chromosomenpräparation aus Zellkulturen) der Kultur 1,5 h vor dem Abernten 40 µl Colcemid hinzugegeben. Nach der Inkubation von 72 h wird das Medium-Blut-Gemisch in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei Raumtemperatur mit 800 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das verbleibende Zellpellet mit 8 ml 0,52 % KCl-Lösung (37 °C warm) vorsichtig überschichtet und resuspendiert. Die restlichen Schritte sind identisch zu denen aus Kapitel 3.7.1.2, am Ende wird jedoch auf den einstündigen Metaphasealterungsschritt bei 90 °C verzichtet.

#### **3.7.1.4 GTG-Bänderung und Karyotypisierung**

Die GTG (G-Bands by Trypsin using Giemsa)-Bänderung ist eine weit verbreitete Technik in der konventionellen Zytogenetik, bei der mit Trypsin verdaute Metaphase-Chromosomen mit Giemsa angefärbt werden. Dabei entsteht ein Bandenmuster, das zur Darstellung der Chromosomen und Identifizierung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen in der Routinediagnostik genutzt werden kann (Murken *et al.*, 2011).

Im Normalfall färbt Giemsa die Chromosomen einheitlich, wodurch eine Unterscheidung der Chromosomen nicht möglich ist. Im Jahre 1970 wurde jedoch entdeckt, dass nach vorheriger Trypsin-Behandlung einige Chromosomenbereiche den Farbstoff nicht mehr annehmen, da Giemsa bevorzugt an undenaturierte DNA bindet. Somit entsteht das typische GTG-Bandenmuster (Wang & Fedoroff, 1972; Yunis & Sanchez, 1973). Die Chromosomen besitzen nun individuelle helle und dunkle Banden, die sich bezüglich ihrer Bandenzusammensetzung, ihrer Gendichte und ihrem Zeitpunkt der Replikation während des Zellzyklus unterscheiden. Die dunklen Banden sind AT-reiche, Gen-arme Sequenzen mit erhöhtem Faltungsgrad, das heißt sie besitzen besonders viele Anheftungsstellen an der Protein-Matrix, die das Grundgerüst der Metaphase-Chromosomen bildet. Eine daraus folgende Konsequenz ist eine dichtere DNA-Verpackung in den Bereichen der dunkleren Banden, in denen zudem die Länge der einzelnen DNA-Schleifen geringer ist als in den hellen Banden. Bei diesen handelt es sich hingegen um CG-reiche Banden mit einem niedrigen Faltungsgrad (Murken *et al.*, 2011).

Die Identifizierung und Zuordnung der Chromosomen erfolgt anhand des Bandenmusters, der Größe der Chromosomen und der Lage des Zentromers nach internationalen Normen (International System of Human Cytogenetic Nomenclature). Gute Chromosomen-

präparationen können strukturelle Aberrationen mit einer Größe von etwa 5 Mb auflösen (Murken *et al.*, 2011).

#### Durchführung der GTG-Bänderung und Erstellung der Karyogramme

Die Objektträger mit den präparierten Metaphase-Chromosomen werden je nach Klima 50 bis 60 s in einer Trypsin/Natriumchlorid-Lösung bei 37 °C eingestellt. Danach werden die Objektträger in 0,9 %-iger Natriumchlorid-Lösung zweimal gespült und 5 min in einer 5 %-igen Giemsa-Lösung gefärbt. Die Objektträger werden zweimal in Aqua dest gespült und anschließend luftgetrocknet, bevor sie mit Roti®-Histokitt eingedeckt werden können. Die Metaphase-Chromosomen werden in 60- oder 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Auswertung am Mikroskop sowie die Bearbeitung der Chromosomen und deren Zuordnung erfolgt manuell durch den Benutzer mit Hilfe der Software Ikaros.

#### **3.7.1.5 DNA-Isolierung aus Zellkulturen und Blut**

Für die nachfolgende vergleichende genomische Hybridisierung erfolgt die Isolierung der DNA aus den beiden Zelllinien FaDu und UM-SCC-1. Zudem wird als Referenz die DNA aus dem Blut eines gesunden männlichen Spenders gewonnen.

#### Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung der DNA wird das Zellpellet in 5,0 ml SE-Puffer (pH 8,0), 0,5 ml 10 %-iger SDS (Sodiumdodecylsulfat)-Lösung und einer Spatelspitze Proteinase K aufgenommen und über Nacht bei 55 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach dem Verdau wird das Gemisch mit 1,65 ml 6 M NaCl gefällt, für die Extraktion der DNA vorsichtig mit 7 ml Chloroform ein bis zwei Stunden geschüttelt und anschließend 20 min bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die DNA enthält, wird vorsichtig mit einer gekürzten Pipettenspitze abgenommen ohne dabei die Interphase zu berühren und in ein neues 50 ml Röhrchen gegeben. Für die Fällung der DNA wird ein Volumenteil -20 °C kaltes 100 %-iges Isopropanol hinzugegeben und vorsichtig geschwenkt. Das Gemisch wird für 20 min bei 10 °C mit 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Aufreinigung wird 1 ml 70 %-iger Ethanol hinzugegeben und eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird das Gemisch 20 min bei 10 °C mit 4000 rpm zentrifugiert, das Pellet in ein neues Mikro-zentrifugenröhrchen überführt und 30 min auf der Wärmeplatte getrocknet, bevor es in Aqua dest über Nacht bei 4 °C gelöst wird. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt mit

Hilfe des NanoDrop Spektrophotometers und die DNA wird bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

#### Isolierung genomischer DNA aus Blut

Zur Gewinnung einer Referenz-DNA wird einem gesunden männlichen Spender 10 ml EDTA-Blut abgenommen und mit 30 ml Lysispuffer 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Blut-Lysispuffer-Gemisch 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 4,5 ml SE-Puffer, 0,5 ml 10 %-iger SDS-Lösung und einer Spatelspitze Proteinase K aufgenommen und über Nacht bei 55 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die weitere Vorgehensweise ist identisch zu der Vorgehensweise „Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen“ und geht mit der NaCl-Fällung weiter.

#### **3.7.1.6 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)**

Die im Jahre 1992 von Kallioniemi und Kollegen entwickelte vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) ermöglicht eine Untersuchung des gesamten Genoms auf chromosomale Imbalancen. Dabei wird die gesamte Tumor- und Referenz-DNA verschieden markiert und auf repräsentative Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Die Analyse dieser Hybridisierung lässt Rückschlüsse auf numerische Chromosomenaberrationen zu (Kallioniemi *et al.*, 1992; Pinkel & Albertson, 2005).

Die genomische DNA wird mit Hilfe des Nick-Translationssystems entsprechend den Herstellerangaben markiert. Hierfür werden etwa 1000 ng DNA mit 4 µl Biotin-Nick-Translationsmix bzw. 4 µl Digoxigenin-Nick-Translationsmix in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert und 90 min bei 15 °C inkubiert. Die Reaktion wird 10 min mit 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) bei 65 °C abgestoppt. Die Fällung erfolgt über Nacht mit 2,1 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 52,5 µl eiskaltem 100 %-igem Ethanol. Am nächsten Tag wird der Ansatz 25 min bei 4 °C mit 14000 rpm zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet. Das Pellet wird in 10 µl Aqua dest über Nacht bei 4 °C gelöst. Zur Kontrolle der Markierung folgt der Dot-Blot.

Für den Dot-Blot wird von der markierten Probe eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100; 1:1000 und 1:10000) mit 6x SSC angefertigt. Von jeder Verdünnung werden 1 µl Probe auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Eine Verstärkung der Bindung zwischen DNA und Nitrocellulose erfolgt im UV-Stratalinker, bevor die freien Bindungsstellen mit 1 %-iger BSA/6x SSC-Lösung 30 min bei 37 °C blockiert werden. Anschließend wird die Membran zweimal mit TN-Puffer gewaschen, bevor sie für 30 min bei Raumtemperatur mit 3 ml TN-Puffer und 3 µl Streptavidin-Alkalischer Phosphatase bzw. 3 µl Digoxigenin-Alkalischer

Phosphatase inkubiert wird. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit TN-Puffer folgt eine Inkubation der Membran für 10 min bei Raumtemperatur mit Dot-Puffer und 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen mit 5,7 ml Dot-Puffer und 33 µl NBT-Lösung (Farbstoffverstärker: Nitroblau-Tetrazoliumsalz) und 25 µl BCIP-Lösung (chromogenes Substrat: 5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat). Basierend auf dem Substratumsatz durch die Alkalische Phosphatase lässt sich am Präzipitat durch einen violetten Farbstoffkomplex die Einbaurate semiquantitativ feststellen. Die markierte DNA wurde verwendet, wenn sie bis zu 1 pg nachweisbar ist.

Für die Hybridisierung werden 4,5 µl Biotin-markierte Tumor-DNA (450 ng), 4,5 µl Digoxigenin-markierte Referenz-DNA (450 ng) und 50 µl Cot1-DNA (1 mg/ml) mit 5,9 µl Natriumacetat (pH 5,5) und 147,5 µl -20°C kaltem 100 %-igem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wird der DNA-Ansatz 30 min bei 4 °C mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 200 µl -20 °C kaltem 70 %-igem Ethanol aufgenommen und anschließend 10 min bei 4 °C mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen, das Pellet etwa 30 min bei 37 °C getrocknet und der Ansatz nach Zugabe von 3,5 µl deionisiertem Formamid 30-45 min gevortext. Danach erfolgt eine Zugabe von 3,5 ml 20 %-iger Dextransulfat/4x SSC-Lösung und ein Vortexen für weitere 30-45 min. Zum Schluss wird der Ansatz 7 min bei 75 °C denaturiert.

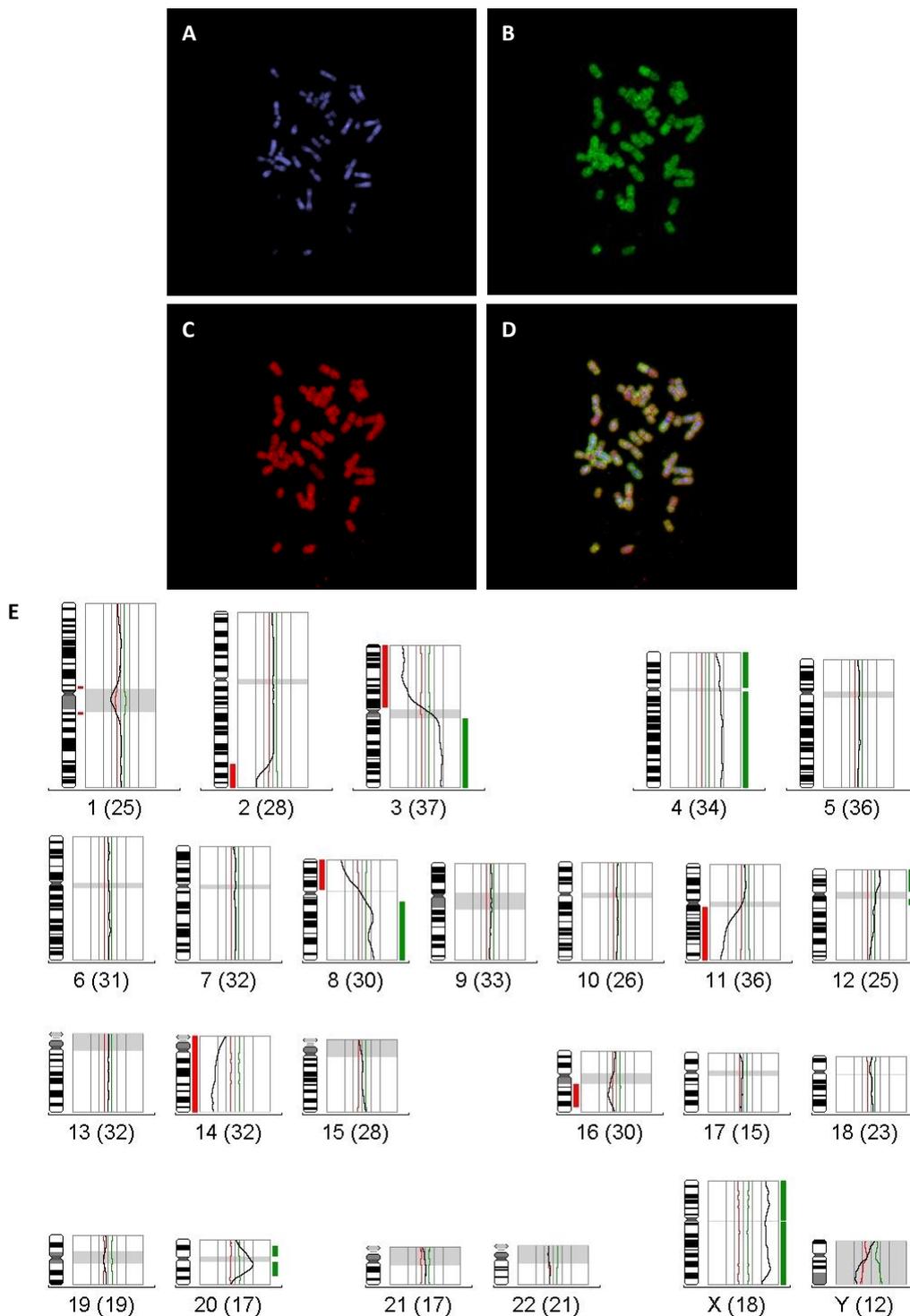
Zeitgleich zum DNA-Ansatz werden die Metaphase-Chromosomenpräparate vorbereitet, indem diese kurz in 2x SSC eingestellt und mit einer RNase H-Lösung (1 µl RNase H-Stammlösung in 99 µl 2x SSC) 15 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit 2x SSC erfolgt zur Entfernung der Proteine ein Pepsinverdau für 1,5 min in 100 ml 0,05 %-iger Pepsin/0,01 M HCl-Lösung bei 37 °C. Anschließend werden die Metaphase-Chromosomenpräparate 5 min in 1x PBS bei Raumtemperatur gewaschen und 10 min mit 4 %-iger Paraformaldehyd/1x PBS-Lösung bei 4 °C fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS für 5 min bei Raumtemperatur, werden die Präparate jeweils 5 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 %, 96 %) dehydriert und mindestens 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss werden die Präparate 1,5 min in 350 µl deionisiertem Formamid, 50 µl NaPO<sub>4</sub> (0,5 M, pH 7,0, -20 °C), 50 µl sterilem 20x SSC und 50 µl sterilem Aqua dest bei 72 °C denaturiert und direkt in eiskaltes 70 %-iges Ethanol überführt, um eine Renaturierung der DNA zu vermeiden. Nach einer aufsteigenden eiskalten Ethanolreihe werden die Präparate luftgetrocknet und kurz auf eine 37 °C warme Heizplatte gelegt. Auf die vortemperierten Präparate wird nun der DNA-Ansatz pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgt 3 Tage in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

Für die Stringenzwaschung werden die Deckgläser in 2x SSC entfernt und die Präparate jeweils 5 min dreimal in 50 %-igem Formamid/2x SSC, zweimal in 2x SSC und einmal in 0,1x SSC bei 45 °C eingestellt. Nach einem Waschschrift für 5 min in 0,1 %-igem Triton X-100/4x SSC bei Raumtemperatur, werden unspezifische Bindungsstellen mit 5 %-igem BSA/4x SSC für 20 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur blockiert. Die mit Biotin markierte Tumor-DNA wird mit Streptavidin-FITC (Verdünnung 1:80 in 5 %-igem BSA/4x SSC, 45 min, 37 °C) detektiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in 0,1 %-igem Triton X-100/4x SSC bei 37 °C folgt die Detektion der Digoxigenin-markierten Referenz-DNA mit anti-Digoxigenin-Rhodamin-Antikörpern (Verdünnung 1:20 in 5 %-igem BSA/4x SSC, 45 min, 37 °C). Im Anschluss daran werden die Präparate erneut dreimal 5 min in 0,1 %-igem Triton X-100/4x SSC bei 37 °C gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit DAPI-Antifade eingedeckt.

Die Aufnahme der zu analysierenden Metaphasen erfolgt an einem Olympus BX61 Mikroskop mit einer gekühlten s/w-CCD-Kamera. Für jedes eingesetzte Fluorochrom (DAPI - blau, FITC - grün, Rhodamin - rot) wird unter Verwendung des entsprechenden Filters (Tabelle 24) getrennt ein Schwarz-Weiß-Bild aufgenommen und in Falschfarbendarstellung mit der Farbe der entsprechenden Fluoreszenz dargestellt (Abbildung 17). Die Belichtungszeiten hängen von der Fluoreszenzsignalintensität ab.

**Tabelle 24: Charakteristika der Fluoreszenzfilter.**

Bezeichnung der Filter	Anregungsfilter	Emissionsfilter	Strahlenteilertransmission
U-MNU2 (DAPI)	360-370 nm	420 nm	400 nm
U-MNB2 (FITC)	470-490 nm	520IF nm	500 nm
41007 (Cy3)	535 nm	610 nm	565 nm



**Abbildung 17: Hybridisierte normale Metaphase-Chromosomen mit der DNA eines HNSCCs (Fall-Nr. 1083) gegen die Referenz-DNA eines genetisch gesunden Spenders und ein CGH-Summenprofil. A) DAPI-Gegenfärbung. B) Hybridisierung der Tumor-DNA, detektiert mit Streptavidin-FITC. C) Hybridisierung der Referenz-DNA, detektiert mit anti-Digoxigenin-Rhodamin-Antikörpern. D) Überlagerung der Bilder A, B und C. E) CGH-Summenprofil mit den genetischen Veränderungen des HNSCCs Fall-Nr. 1083.**

Die Bearbeitung der Chromosomen, deren Zuordnung anhand der DAPI-Bänderung und die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse werden manuell durch den Benutzer mit Hilfe der Software ISIS vorgenommen. Für die Auswertung eines Falles werden mindestens 25 Metaphasen aufgenommen, um genügend einzelne Chromosomen in die Auswertung einschließen zu können, da nicht zuordenbare sowie sich überlagernde Chromosomen von der Auswertung ausgeschlossen werden. Nach der manuellen Bearbeitung erstellt die Software ein Summenprofil (Abbildung 17E), in dem die genetischen Veränderungen des Falls ersichtlich sind. Dabei fließen nicht alle Chromosomenbereiche gleichwertig in die Auswertung mit ein, da die Chromosomenregionen 1q, 9q und 16 q in den zentromernahen Abschnitten sowie der lange Arm des Y-Chromosoms einen hohen Heterochromatinbereich besitzen, der sehr variabel zwischen verschiedenen Individuen ist und daher zu starken Schwankungen bei der Hybridisierung führen kann. Zudem weisen die Chromosomenregionen 1p32pter, 16p und die Chromosomen 19 und 22 hohe GC-Gehalte auf und müssen basierend auf ihrer Anfälligkeit für Artefakte kritisch analysiert werden. Da die Auswertung einer CGH-Analyse jahrelange Erfahrung und hohe Expertise voraussetzt, wurde diese gemeinsam mit Frau Dr. Silke Wemmert (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) durchgeführt.

### 3.7.2 Transfektion mit *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA-Mimics und -Inhibitoren

Zur Bestimmung möglicher Effekte der beiden miRNAs hsa-miR-146a und hsa-miR-155 auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von humanen Tumorzellen werden *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA-Mimics und -Inhibitoren der genannten miRNAs in humane Tumorzellen (FaDu-Zellen und UM-SCC-1-Zellen) transfiziert. Zur Überprüfung der Transfektionseffektivität werden entsprechende Negativ- und Positivkontrollen, jeweils für Mimic und Inhibitor, mitgeführt.

MiRNA-Mimics sind kleine, chemisch modifizierte, doppelsträngige RNA-Moleküle, die endogene miRNA-Moleküle nachahmen und somit funktionelle Analysen durch die Hochregulierung der miRNA-Aktivität ermöglichen. Dies resultiert in einer künstlich herabgesetzten Translation der Ziel-mRNA, in manchen Fällen begleitet von einer Reduzierung des Transkriptlevels. Demgegenüber sind miRNA-Inhibitoren kleine, chemisch modifizierte, einzelsträngige RNA-Moleküle, die an endogene miRNA-Moleküle spezifisch binden und diese inhibieren. Dies ermöglicht somit funktionelle Analysen durch die Herunterregulierung der miRNA-Aktivität und resultiert in einer künstlich hochregulierten Translation der Ziel-mRNA.

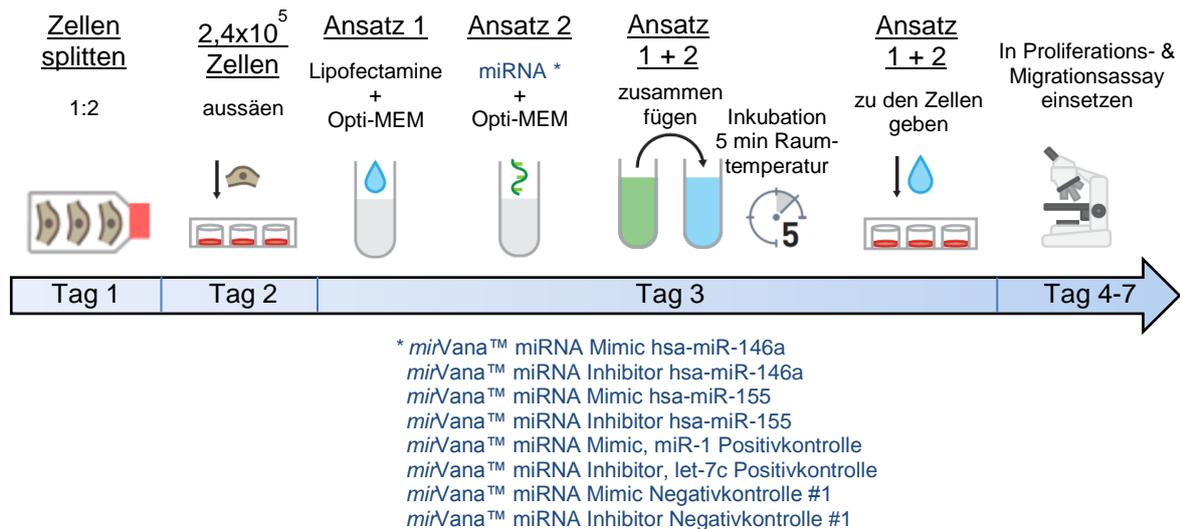
Die in dieser Arbeit verwendeten miRNA-Mimics und -Inhibitoren einschließlich der Negativ- und Positivkontrollen sind in Tabelle 25 aufgeführt.

**Tabelle 25: miRNA-Mimics, -Inhibitoren und entsprechende Positiv- und Negativkontrollen.**

Assay	Assay-ID
mirVana™ miRNA Mimic hsa-miR-146a-5p	MC10722
mirVana™ miRNA Mimic hsa-miR-155-5p	MC12601
mirVana™ miRNA Inhibitor hsa-miR-146a-5p	MH10722
mirVana™ miRNA Inhibitor hsa-miR-155-5p	MH12601
mirVana™ miRNA Mimic miR-1 Positivkontrolle	-
mirVana™ miRNA Mimic Negativkontrolle #1	-
mirVana™ miRNA Inhibitor let-7c Positivkontrolle	-
mirVana™ miRNA Inhibitor Negativkontrolle #1	-

### Durchführung der Transfektion

Am ersten Tag (Abbildung 18) werden die Zellen 1:2 gesplittet, um die Zellen zum Wachstum anzuregen. Am zweiten Tag werden  $2,4 \times 10^5$  lebende Zellen pro Well in 2 ml DMEM in einer 6-Well-Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Am dritten Tag wird ein Mediumwechsel (1,75 ml DMEM) durchgeführt und in einem ersten Ansatz 150 µl Opti-MEM® und 9 µl Lipofectamine® RNAiMAX Reagent gemischt, während in einem zweiten Ansatz 150 µl Opti-MEM® und 3 µl miRNA (10 µM) zusammen gegeben werden. Die für diesen Versuch verwendeten miRNAs sind in Tabelle 25 aufgeführt. Beide Ansätze werden im gleichen Verhältnis zusammengefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Davon werden anschließend 250 µl in das entsprechende Well pipettiert, sodass mit dem vorgelegten Medium ein Gesamtvolumen von 2 ml erreicht wird. Die Inkubation der Zellen erfolgt für 24 h bei 37 °C mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung. Nach dieser Inkubationszeit werden die Zellen abgelöst, gezählt, auf ihre Vitalität untersucht und in den nachfolgenden Proliferations- (Kapitel 3.7.3) und Migrationsassays (Kapitel 3.7.4) eingesetzt.



**Abbildung 18: Ablauf der Transfektion** (modifiziert nach *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Mimics Protocol 2013, Life Technologies, Darmstadt).

Die Effektivität der Transfektion anhand ihrer Auswirkung auf mRNA-Ebene wird mittels quantitativer Real-Time PCR überprüft. Für die Mimic miR-1 Positivkontrolle wird der mRNA Gehalt von *PTK9* bestimmt, da diese eine Ziel-mRNA der miR-1 darstellt und miR-1 eine Herunterregulierung von *PTK9* verursacht. Für die Inhibitor let-7c Positivkontrolle wird der mRNA Gehalt von *HMGA2* bestimmt, welche eine Ziel-mRNA von let-7c darstellt und eine Inhibition von let-7c zu erhöhten *HMGA2* mRNA Gehalten führt.

#### Durchführung der Reversen Transkription und der quantitativen Real-Time PCR mit TaqMan® Gene Expression Assays

Die isolierte RNA der jeweiligen Probe wird mit Hilfe des High-Capacity RNA-to-cDNA Kits entsprechend den Herstellenangaben in cDNA umgeschrieben. Hierzu werden 2 µg RNA in einem Probenvolumen von 9 µl mit 10 µl 2x RT Buffer und 1 µl 20x RT Enzym Mix gemischt und herunterzentrifugiert, bevor die Reverse Transkription im PCR-Gerät für 60 min bei 37 °C und für 5 min bei 95 °C gestartet wird. Bis zur Weiterverwendung der cDNA im Rahmen der quantitativen Real-Time-PCR kann diese bei -20 °C gelagert werden.

Die quantitative Real-Time PCR wird im 96-Well-Format durchgeführt, wobei jede RNA-cDNA-Probe als Triplikat läuft. Zudem wird parallel zu jedem Assay eine Negativkontrolle ohne Template, ebenfalls als Triplikat, mitgeführt. Pro Well werden 50 ng RNA-cDNA-Probe in einem Probenvolumen von 4,5 µl vorgelegt und um 5 µl TaqMan® Gene Expression Mastermix und 0,5 µl TaqMan® Gene Expression Assay (Tabelle 26) ergänzt. Alle Schritte erfolgen auf Eis.

**Tabelle 26: TaqMan® Gene Expression Assay**

Assay	Assay-ID
GAPDH	Hs02758991_g1
HMGA2	Hs04397751_m1
TWF1 (=PTK9)	Hs00702289_s1

Die 96-Well-Platte wird mit einer Folie (MicroAmp Optical Adhesive Film) verschlossen und bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert (Centrifuge 5805 R). Die Messung erfolgt mit Hilfe des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems und der StepOne Software v2.3. Die einzelnen Schritte des Programms sind in der nachfolgenden Tabelle 27 aufgelistet.

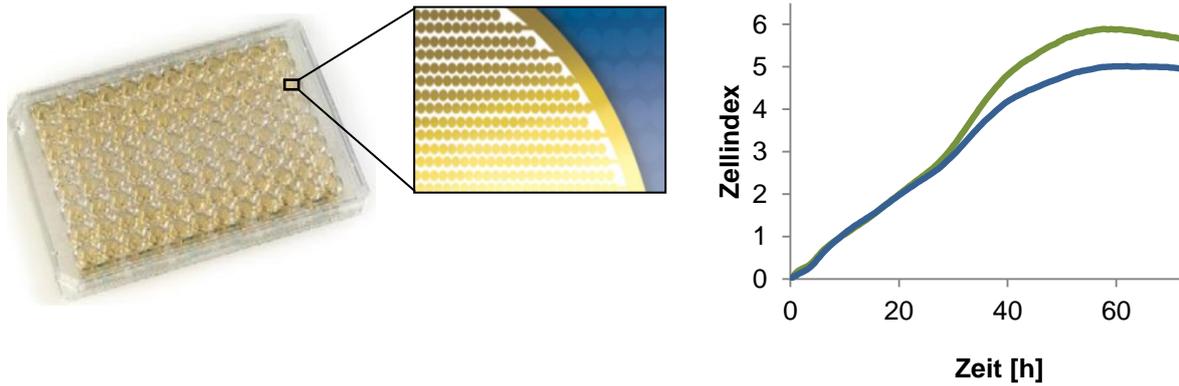
**Tabelle 27: Zyklus-Bedingungen der Real-Time PCR.**

Schritt	Zeit [min:sec]	Temperatur [°C]	Zyklen
Denaturierung	02:00	50	1
Enzymaktivierung	10:00	95	1
Denaturierung	00:15	95	40
Annealing + Extension	00:60	60	

Die Auswertung der Daten zur Effektivität der durchgeführten Transfektion erfolgt mittels der relativen Quantifizierungsstrategie in Form der komparativen  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ -Methode.

### 3.7.3 Proliferationsanalyse mit dem xCELLigence-System

Die Analyse des Real-Time Proliferationsverhaltens von humanen Tumorzellen wurde mit Hilfe des xCELLigence-Systems durchgeführt, dessen Kernelement eine 96-Well-Platte (Abbildung 19, links) darstellt. Die Wells auf der Bodenfläche sind mit einer Vielzahl an Goldelektroden beschichtet, zwischen denen während einer Messung kontinuierlich Strom fließt. Dabei werden die elektrischen Parameter über einen Sensor gemessen und an einen Computer mit entsprechender Auswertungssoftware RTCA 2.0 übermittelt. Die Impedanz stellt den für die Zellproliferationsrate bedeutsamen Parameter dar, der in dem elektrischen System proportional zur Fläche, die von den Zellen bedeckt ist, zunimmt, da bei zunehmend stärkerem Zellwachstum der Stromfluss zwischen den Elektroden am Boden eines Wells behindert wird. Dies ermöglicht eine kontinuierliche Aufzeichnung des Proliferationsverhaltens, das graphisch als Zellindex-Zeit-Kurve (Abbildung 19, rechts) dargestellt wird, wobei der Zellindex eine einheitslose, direkt von der Impedanz abgeleitete Größe ist.



**Abbildung 19: Proliferationsassay mit dem xCELLigence-System.** Die Analyse des Proliferationsverhaltens von Tumorzellen erfolgt in 96-Well-Platten, deren Wells auf der Bodenfläche mit einer Vielzahl an Goldelektroden beschichtet sind. Eine 85 h andauernde Real-Time Analyse ermöglicht eine kontinuierliche Aufzeichnung, die graphisch als Zellindex-Zeit-Kurve dargestellt wird (modifiziert nach Roche).

#### Durchführung des Proliferationsassays

Zur Analyse des Proliferationsverhaltens von humanen Tumorzellen wird in jedes Well der E-Plate 96 50 µl DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin vorgelegt und der sogenannte Prescan gestartet. Anschließend werden von jedem Kontroll- und Transfektionsansatz (Kapitel 3.7.2)  $7,5 \times 10^3$  lebende FaDu-Zellen bzw.  $1,0 \times 10^4$  lebende UM-SCC-1-Zellen in die entsprechenden Wells gegeben und mit DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin auf 150 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Pipettiervorgang erfolgt auf einer mit Wasser gefüllten 37 °C warmen Zellkulturflasche. Zum Absetzen der Zellen in der E-Plate 96 erfolgt eine Ruhephase von 30 min bei 37 °C mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung, an die sich die für 85 h andauernde Real-Time Analyse, bei der alle 15 min eine Messung erfolgt, anschließt und die nachfolgend mit der RTCA Software 2.0 ausgewertet wird.

#### **3.7.3.1 Verwendung von Aphidicolin als Proliferationshemmer**

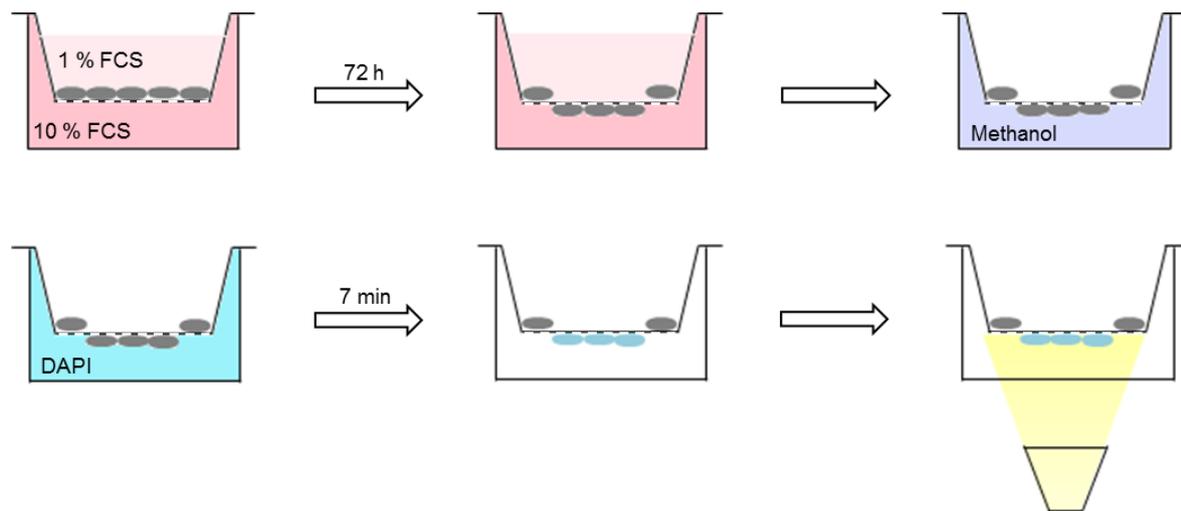
Das tetrazyklische Diterpen Aphidicolin aus dem Pilz *Cephalosporium aphidicola* ist ein wirksamer Inhibitor der DNA-Replikation in einer Vielzahl an Organismen (Brundret *et al.*, 1972; Bucknall *et al.*, 1973; Huberman *et al.*, 1981; Ikegami *et al.*, 1978) und wird in vielen Studien erfolgreich für die Synchronisierung von Zellkulturen eingesetzt (Matherly *et al.*, 1989). Die Zugabe von Aphidicolin resultiert in einer Zellzykluspause beim Übergang der G1-Phase in die S-Phase. In Zellen, die bereits die S-Phase erreicht haben, wird die DNA-Synthese gestoppt, während nicht-teilende Zellen keine Beeinflussung durch Aphidicolin zeigen (Ikegami *et al.*, 1978; Stephens *et al.*, 1986). In kultivierten humanen Tumorzelllinien weist Aphidicolin wachstumshemmende und zytotoxische Aktivität auf (Cinatli *et al.*, 1999;

Pedrali-Noy *et al.*, 1982). In der vorliegenden Arbeit wurde Aphidicolin zur Hemmung der Proliferation eingesetzt.

Aphidicolin, ein weißer, kristalliner Feststoff, wird für den *in vitro* Gebrauch in sterilem DMSO gelöst. Da aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits bekannt ist, dass DMSO bis zu einer Konzentration von  $\leq 0,2$  % keine zytotoxische Auswirkung auf die Zellen aufweist, wird in den Versuchen stets ein Ansatz mit einer Endkonzentration von lediglich 0,1 % DMSO verwendet. Um mögliche Auswirkungen von 0,1 % DMSO auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von humanen Tumorzellen zu prüfen, wird dies in verschiedenen Testreihen untersucht. Zudem wird die zu verwendende Konzentration von Aphidicolin bestimmt und dessen inhibitorische Wirkung auf die Zellproliferation überprüft. Die hierzu verwendeten Methoden sind in Kapitel 3.7 dargestellt.

#### **3.7.4 Migrationsanalyse mit dem FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System**

Die Analyse der Migrationsfähigkeit von humanen Tumorzellen erfolgt mit Hilfe des FluoroBlok™ Cell Culture Insert-Systems, dessen Kernelement spezielle Einsätze mit einem Boden aus einer  $0,3 \text{ cm}^2$  großen mit  $8 \text{ }\mu\text{m}$  durchmessenden Poren in einer Dichte von  $8 \times 10^5$  Poren/ $\text{cm}^2$  durchsetzten Polyethylenterephthalat-Membran darstellen. Dabei blockiert die Membran effizient eine Transmission von Licht mit einer Wellenlänge zwischen 490 nm und 700 nm, wodurch Fluoreszenzsignale ausgehend von dem oberen Teil des Einsatzes nicht durch „bottom-reading“-Fluoreszenzmikroskop-Systeme detektiert werden, sondern ausschließlich Fluoreszenzsignale aus dem unteren Teil des Einsatzes, die von migrierten Zellen ausgehen (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Migrationsassay mit dem FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System** (modifiziert nach Linxweiler, 2012). Die Analyse des Migrationsverhaltens von Tumorzellen erfolgt im 24-Well-Format mit 1200 µl DMEM mit 10 % FCS und den eingesetzten Inserts mit  $2,5 \times 10^4$  lebenden Zellen in 500 µl DMEM mit 1 % FCS, um einen FCS-Gradienten als Migrationsanreiz zu schaffen. Während der anschließenden Inkubation (24 h, 48 h, 72 h) migriert eine variable Anzahl an Zellen durch die im Insert enthaltenen 8 µm durchmessenden Membranporen entlang des FCS-Gradienten. Nach der Inkubation wird das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und für 10 min in -20 °C kaltem Methanol fixiert. Anschließend werden die fixierten Zellen dreimal mit 1x PBS für 3 min gewaschen, mit 0,1 % (v/v) DAPI/PBS für 7 min gefärbt und erneut dreimal mit 1x PBS für 3 min gewaschen. Im Anschluss folgt die Detektion der migrierten Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie bei 450 nm.

### Durchführung des Migrationsassays

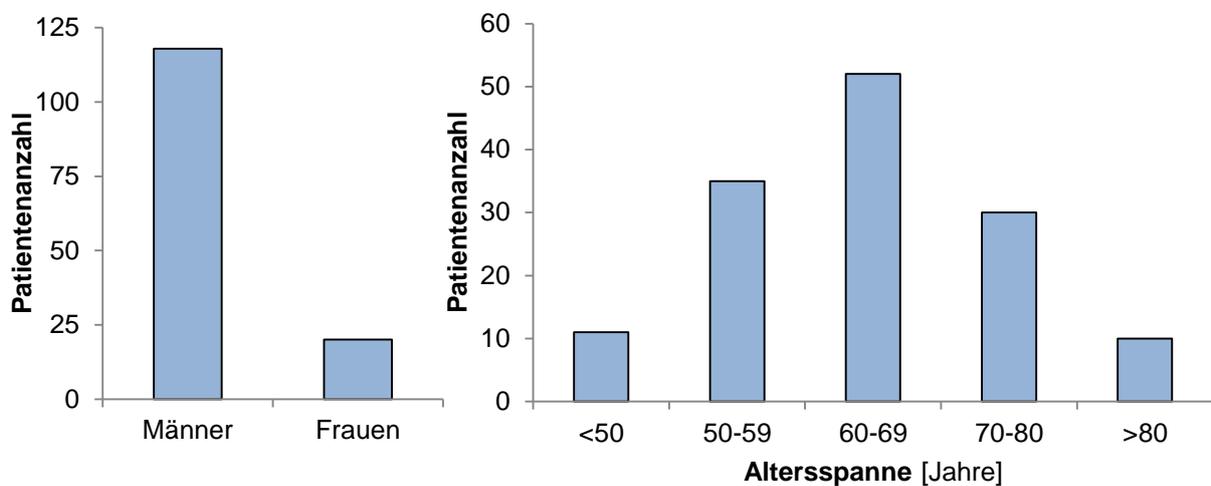
Zur Bestimmung des Migrationsverhaltens von humanen Tumorzellen wird ein FCS-Gradient für die Zellen als Migrationsanreiz geschaffen (Abbildung 20). Dafür werden 1200 µl DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin in jedes Well gegeben, während in die entsprechenden Inserts von jedem Kontroll- und Transfektionsansatz (Kapitel 3.7.2)  $2,5 \times 10^4$  bzw.  $5,0 \times 10^4$  lebende Zellen in 500 µl DMEM mit 1 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin pipettiert werden. Die Inkubation erfolgt je nach Endpunkt für 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung. Durch die Membranporen haben die Zellen nun die Möglichkeit entlang des bestehenden FCS-Gradienten zu migrieren. Nach der entsprechenden Inkubationszeit werden die migrierten, an der Membran haftenden Zellen mit 1x PBS gewaschen und in -20 °C kaltem Methanol für 10 min fixiert. Anschließend wird wiederum dreimal mit 1x PBS für je 3 min gewaschen, mit 0,1 % (v/v) DAPI/PBS für 7 min gefärbt und erneut dreimal mit 1x PBS für je 3 min gewaschen. Die Detektion und Auszählung der migrierten Zellen erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Software NIS Elements AR 3.0 bei einer Wellenlänge von 450 nm (DAPI-Filter: Anregung 340-380 nm, Trennung 400 nm, Emission 435-485 nm).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurde Probenmaterial (Tumorgewebe, Abstrichmaterial und Blut) von insgesamt 138 Patienten mit einem diagnostizierten Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region untersucht. Nicht von jedem HNSCC-Patienten konnten alle Probenmaterialien gewonnen werden, sodass unterschiedlich große Probenkollektive für die verschiedenen Versuche zur Verfügung standen.

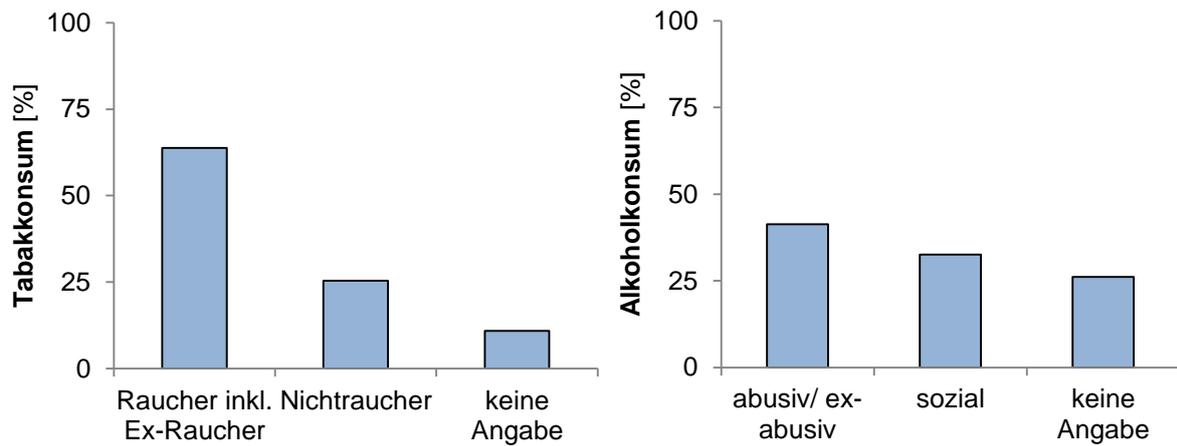
Die Geschlechter- und Altersverteilung des Gesamtkollektivs ist in der nachfolgenden Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: Geschlechts- und Altersverteilung im untersuchten HNSCC-Patientenkollektiv (n=138).**

Das Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen betrug im gesamten Untersuchungskollektiv 6:1 (118 Männer und 20 Frauen) und das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei 63 Jahren mit einer Altersspanne von 24 bis 93 Jahren, wobei die Erkrankungsrate bei den 60- bis 69-jährigen Personen am höchsten war (Abbildung 21).

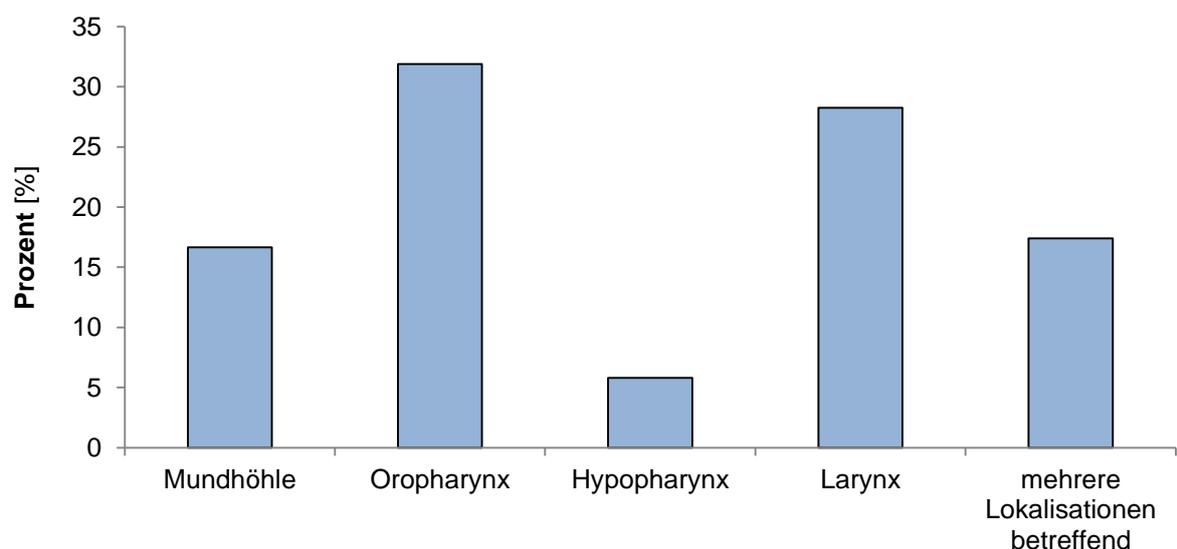
Die Daten hinsichtlich des Tabak- und Alkoholkonsums (Abbildung 22) der einzelnen Patienten wurde im Rahmen des prästationären Aufklärungsgesprächs ca. 2-7 Tage vor der Panendoskopie bzw. Tumoroperation erhoben.



**Abbildung 22: Tabak- und Alkoholkonsum im untersuchten HNSCC-Patientenkollektiv (n=138).**

Im untersuchten Kollektiv von 138 HNSCC-Patienten konsumierten 63,8 % Tabak oder bezeichneten sich als ehemalige Raucher, 25,4 % waren Nichtraucher und 10,9 % machten keine Angaben. In Bezug auf ihren Alkoholkonsum konnten von 26,1 % der Patienten keine Daten erhoben werden, während 41,3 % einen erhöhten Alkoholkonsum und 32,6 % einen sozialen Alkoholkonsum angaben (Abbildung 22).

Die Verteilung der Tumoren entsprechend ihrer Lokalisation ist in Abbildung 23 veranschaulicht.



**Abbildung 23: Prozentuale Verteilung der Tumoren im untersuchten HNSCC-Patientenkollektiv (n=138) nach ihrer Lokalisation.**

Das untersuchte Kollektiv beinhaltete 23 Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle (16,7 %), 44 des Oropharynx (31,9 %), 8 des Hypopharynx (5,8 %), 39 des Larynx (28,3 %) und 24 Tumoren (17,4 %), die mehrere Lokalisationen betreffen (Abbildung 23).

Die in den unterschiedlichen Expressionsanalysen eingesetzten Probenkollektive sind in Tabelle 28 aufgeführt.

**Tabelle 28: Klinische und histopathologische Parameter der HNSCC-Patienten.**

Klinische Parameter der HNSCC-Patienten	Microarray-Analyse	Quantitative Real-Time PCR-Analyse		
	Blutprobenkollektiv n=12	Blutprobenkollektiv n=71	Gewebeprobenkollektiv n=30 (von 29 Patienten)	Abstrichmaterial n=31 (von 30 Patienten)
Durchschnittliches Alter in Jahren (Altersspanne)	66 (51-79)	64 (37-91)	63 (49-81)	66 (32-91)
Geschlecht				
männlich	10 (83,3 %)	60 (84,5 %)	26 (89,7 %)	25 (83,3 %)
weiblich	2 (16,7 %)	11 (15,5 %)	3 (10,3 %)	5 (16,7 %)
cT-Klassifikation				
T1+T2	4 (33,3 %)	26 (36,6 %)	9 (31,0 %)	14 (46,7 %)
T3+T4	8 (66,7 %)	45 (63,4 %)	20 (69,0 %)	16 (53,3 %)
cN-Klassifikation				
N0	1 (8,3 %)	16 (22,5 %)	7 (24,1 %)	9 (30,0 %)
N≥1	11 (91,7 %)	53 (74,7 %)	22 (75,9 %)	20 (66,7 %)
nicht beurteilbar		2 (2,8 %)		1 (3,3 %)
cM-Klassifikation				
M0	9 (75,0 %)	41 (57,7 %)	18 (62,1 %)	19 (63,3 %)
M1	3 (25,0 %)	10 (14,1 %)	2 (6,9 %)	3 (10,0 %)
nicht beurteilbar	-	20 (28,2 %)	9 (31,0 %)	8 (26,7 %)
Grading				
G1	1 (8,3 %)	1 (1,4 %)	1 (3,4 %)	0 (0,0 %)
G2	5 (41,7 %)	27 (38,0 %)	16 (55,2 %)	10 (33,3 %)
G3	6 (50,0 %)	25 (35,2 %)	10 (34,5 %)	5 (16,7 %)
nicht beurteilbar	-	18 (25,4 %)	2 (6,9 %)	15 (50,0 %)
p16-Status				
negativ	-	-	12 (41,4 %)	-
positiv			9 (31,0 %)	
nicht gefärbt			8 (27,6 %)	

#### 4.1.1 Geschlechts- und altersgepaarte Patientenkollektive

Für die Bestimmung des miRNA-Profiles in humanem Vollblut wurden für die Microarray-Analyse und die nachfolgende Validierung mittels quantitativer Real-Time PCR geschlechts- und altersgepaarte Patientenkollektive gebildet, um mögliche geschlechts- und altersbedingte Veränderungen auf miRNA-Ebene auszuschließen. Diese sind in Tabelle 29 und Tabelle 30 dargestellt.

**Tabelle 29: Geschlechts- und altersgepaartes Patientenkollektiv für die Microarray-Analyse.**

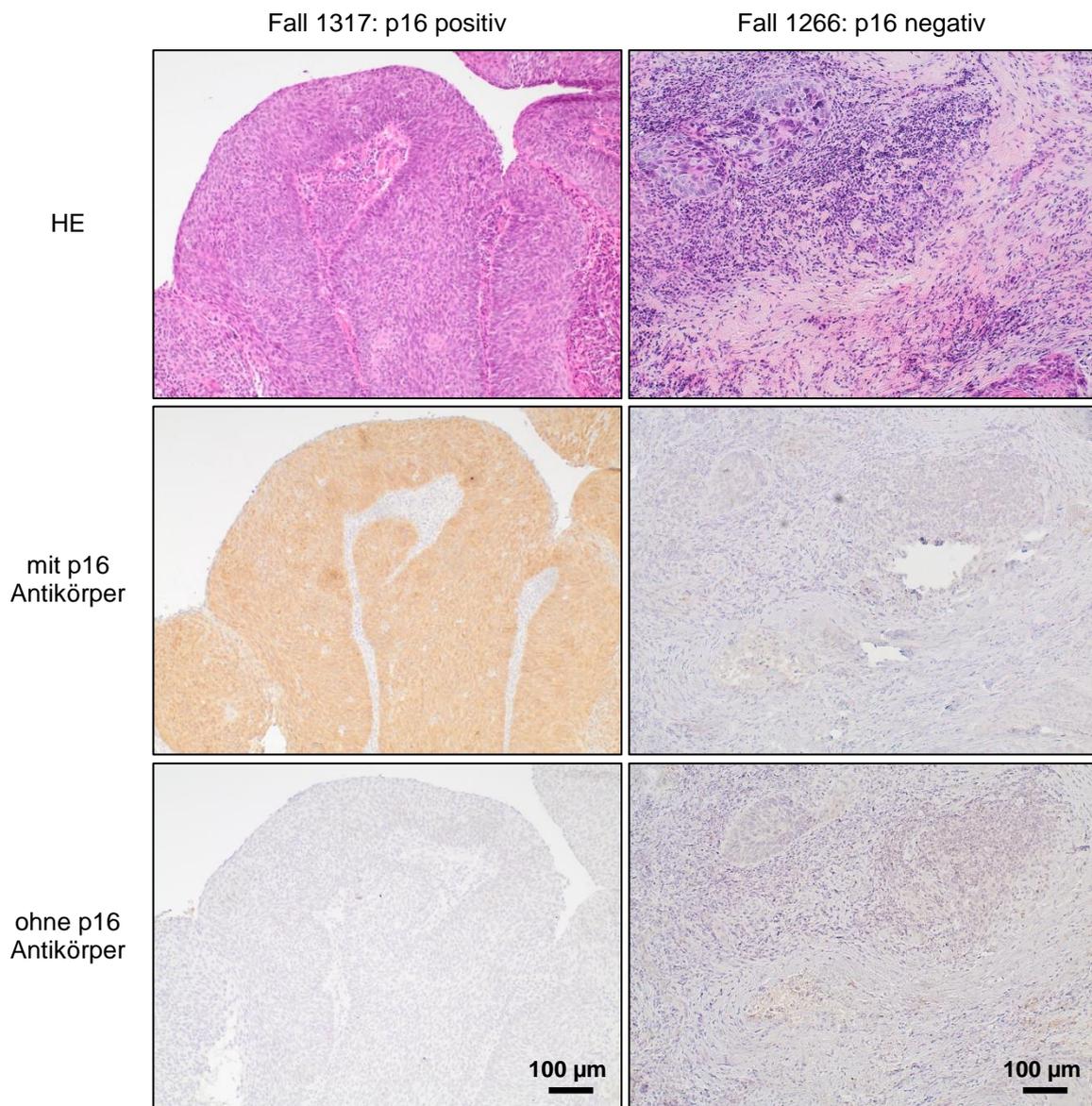
Paar	HNSCC-Patienten		Kontrollprobanden	
	Fallnummer	Geschlecht/Alter	Geschlecht/Alter	Fallnummer
1	1113	m/80	m/81	1151
2	1123	m/64	m/66	1141
3	1127	m/80	m/80	1162
4	1131	m/68	m/71	1161
5	1122	m/64	m/64	1140
6	1159	m/55	m/56	1174
7	1165	w/62	w/60	1167
8	1169	m/62	m/61	1173
9	1153	m/76	m/74	1171
10	1172	w/69	w/69	1186
11	1176	m/51	m/48	1147
12	1183	m/70	m/70	1185

**Tabelle 30: Geschlechts- und altersgepaartes Patientenkollektiv für die Validierung HNSCC M0 versus M1 mittels quantitativer Real-Time PCR.**

Paar	HNSCC-Patienten M1		HNSCC-Patienten M0	
	Fallnummer	Geschlecht/Alter	Geschlecht/Alter	Fallnummer
1	1159	54/m	53/m	1145
2	1165	61/w	59/w	1404
3	1176	51/m	49/m	1137
4	1320	59/m	63/m	1146
5	1396	60/m	63/m	1122
6	1403	63/m	64/m	1413
7	1421	56/m	56/m	1166
8	1498	64/m	64/m	1335
9	1502	66/m	69/m	1183
10	1530	59/m	63/m	1123

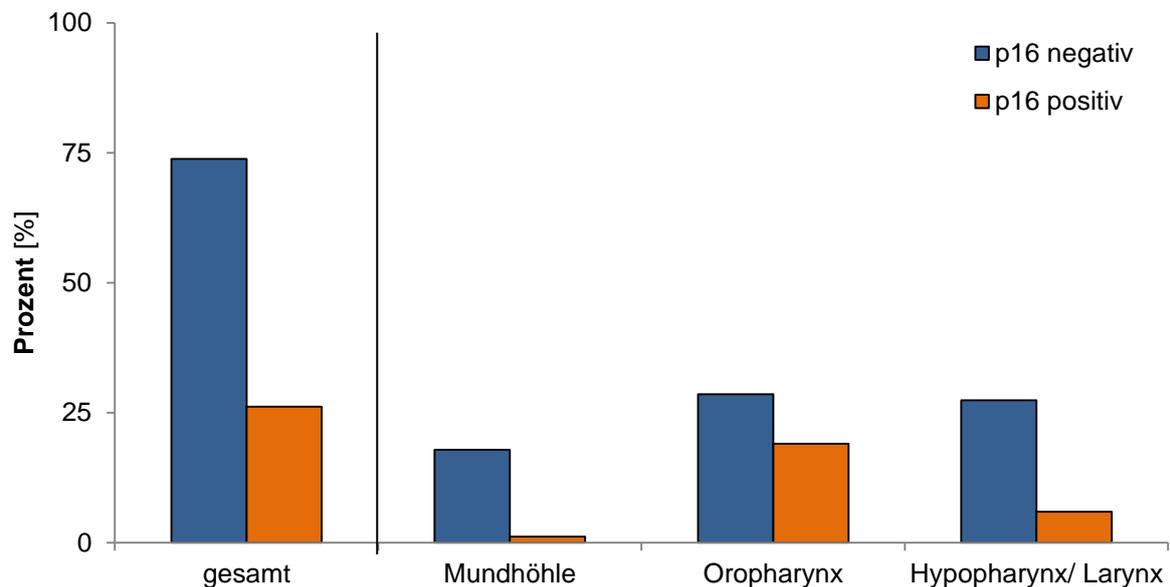
## 4.2 Immunhistochemische Untersuchung von p16

Zur Untersuchung des p16-Status im Tumorgewebe von Patienten mit einem diagnostizierten Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region als Surrogatmarker für eine HPV-Infektion wurde eine immunhistochemische Färbung von p16 (Kapitel 3.3) durchgeführt. Das Probenkollektiv umfasste dabei insgesamt 88 Tumorgewebeproben von 84 HNSCC-Patienten. Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung sind in Abbildung 24 gezeigt.



**Abbildung 24: Hämatoxylin-Eosin-Färbung und immunhistochemische Färbung von p16 an Paraffinschnitten von HNSCC-Gewebeproben.** Dargestellt sind jeweils eine HE-Färbung, die immunhistochemische Färbung von p16 und eine entsprechende, während der p16-Färbung mitgeführte Negativkontrolle ohne p16-Antikörper.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von p16 ist in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25: p16-Status bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region.** Mittels immunhistochemischer Färbung wurde der p16-Status in Tumorgewebeproben (n=88) von 84 HNSCC-Patienten bestimmt.

Insgesamt wurde bei 88 HNSCC-Gewebeproben von 84 Patienten der p16-Status mittels einer immunhistochemischen Färbung bestimmt (Abbildung 25). In 4 Fällen konnten jeweils 2 unterschiedliche Gewebeproben des Patienten untersucht werden, die jeweils den gleichen p16-Status aufwiesen. Im Gesamtkollektiv wiesen 26,2 % (22/84) der Tumoren einen p16-positiven Status auf, während 73,8 % (62/84) der Fälle p16-negativ waren. Die überwiegende Mehrheit der p16-positiven Fälle (72,7 %; 16/22) war im Oropharynx lokalisiert, wohingegen lediglich 4,5 % (1/22) der Mundhöhle bzw. 22,7 % (5/22) dem Hypopharynx/Larynx zugeordnet werden konnten.

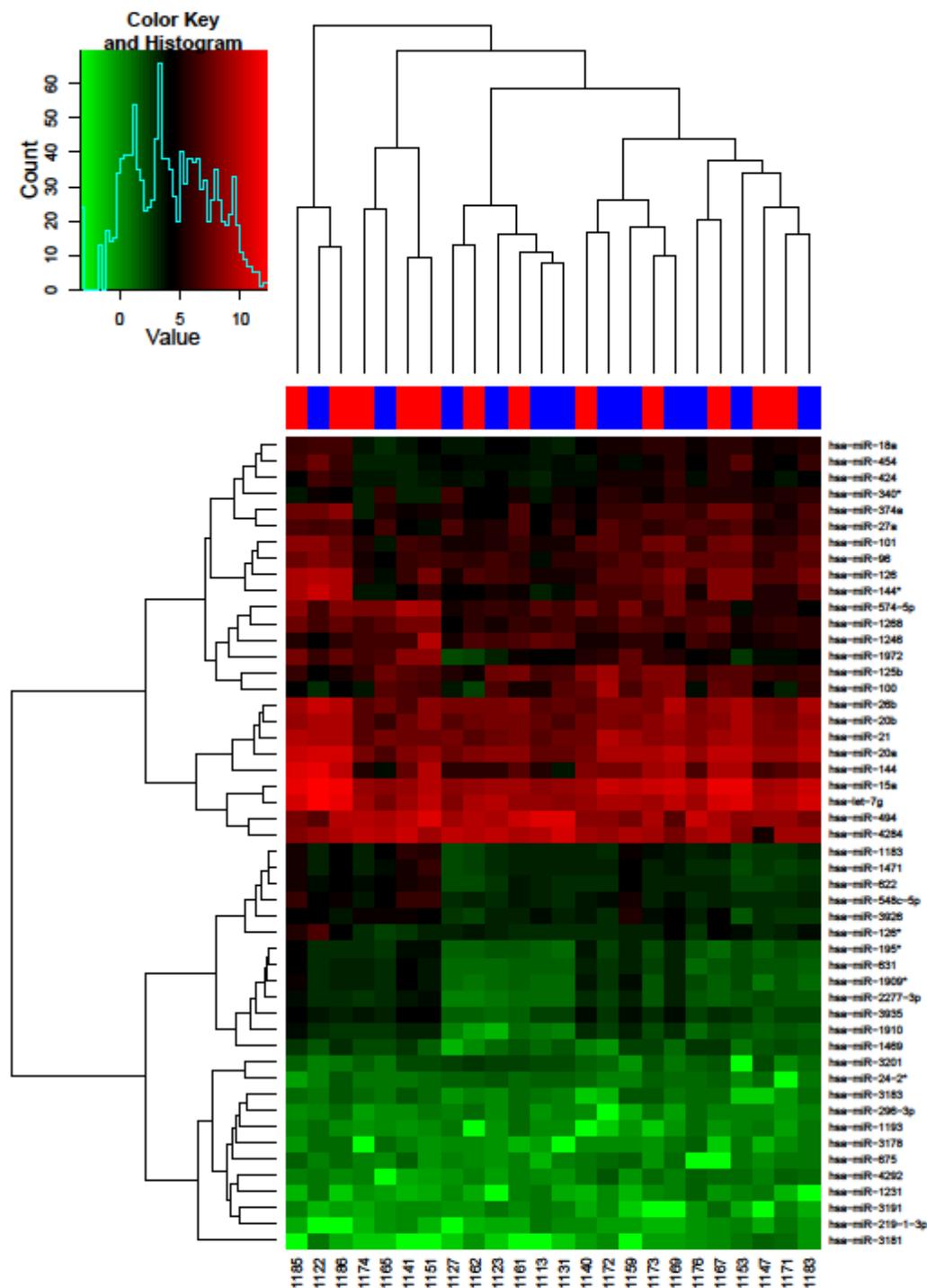
Bezogen auf die einzelne Lokalisation sind 6,2 % (1/16) der Mundhöhlenkarzinome, 40,0 % (16/40) der Oropharynxkarzinomen und 17,9 % (5/28) der Hypopharynx-/Larynxkarzinomen p16-positiv.

### **4.3 Bestimmung des miRNA-Profiles in humanem Vollblut**

#### **4.3.1 Bestimmung des miRNA-Profiles mittels Microarray**

Zur Untersuchung des Expressionsmusters aller miRNA-kodierender Gene im Vollblut von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region wurde eine Microarray-Analyse (Kapitel 3.5) durchgeführt, um einen Gesamtüberblick über die veränderten Expressionen bei dieser Erkrankung zu erhalten. Hierzu wurden Blutproben von Patienten mit einem diagnostizierten Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (n=12) und als Kontrollen dienende Blutproben von gesunden Probanden (n=12) untersucht, wobei zum Ausschluss von geschlechts- und altersspezifischen Veränderungen jeder Blutprobe eines Tumorpatienten eine Blutprobe eines gesunden Probanden gleichen Geschlechts und Alters ( $\pm 3$  Jahre) zugeordnet wurde (Tabelle 29). Verwendet wurden drei SurePrint G3 8x60K miRNA Microarrays, die jeweils 40 Replikate von jeder der 1205 miRNAs (miRBase v16) enthalten. Die statistische Datenanalyse der drei durchgeführten Microarrays erfolgte durch Frau Dr. Christina Backes (Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes).

Die grafische Darstellung der Auswertung aller drei durchgeführten Microarrays ist in der nachfolgenden Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26: Cluster Heatmap einer Microarray-Analyse zur Untersuchung des miRNA-Profiles im Blut von HNSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden alters- und geschlechtsgepaarten Kontrollen.** Für diese Auswertung wurden drei SurePrint G3 8x60K miRNA Microarrays, die jeweils 40 Replikate von jeder der 1205 miRNAs (miRBase v16) enthalten, mit markierten miRNAs von HNSCC-Blutproben (n=12) und Kontroll-Blutproben (n=12) hybridisiert und analysiert. Blau: HNSCC-Patienten; rot: gesunde Probanden.

Die biostatistische Auswertung der Expressionsdaten der drei durchgeführten Microarrays, visualisiert in Form einer Cluster Heatmap (Abbildung 26), zeigte weder ein Clustering der zueinander gehörenden Blutproben noch einen klaren Expressionsunterschied zwischen den Blutproben von HNSCC-Patienten und von gesunden Personen.

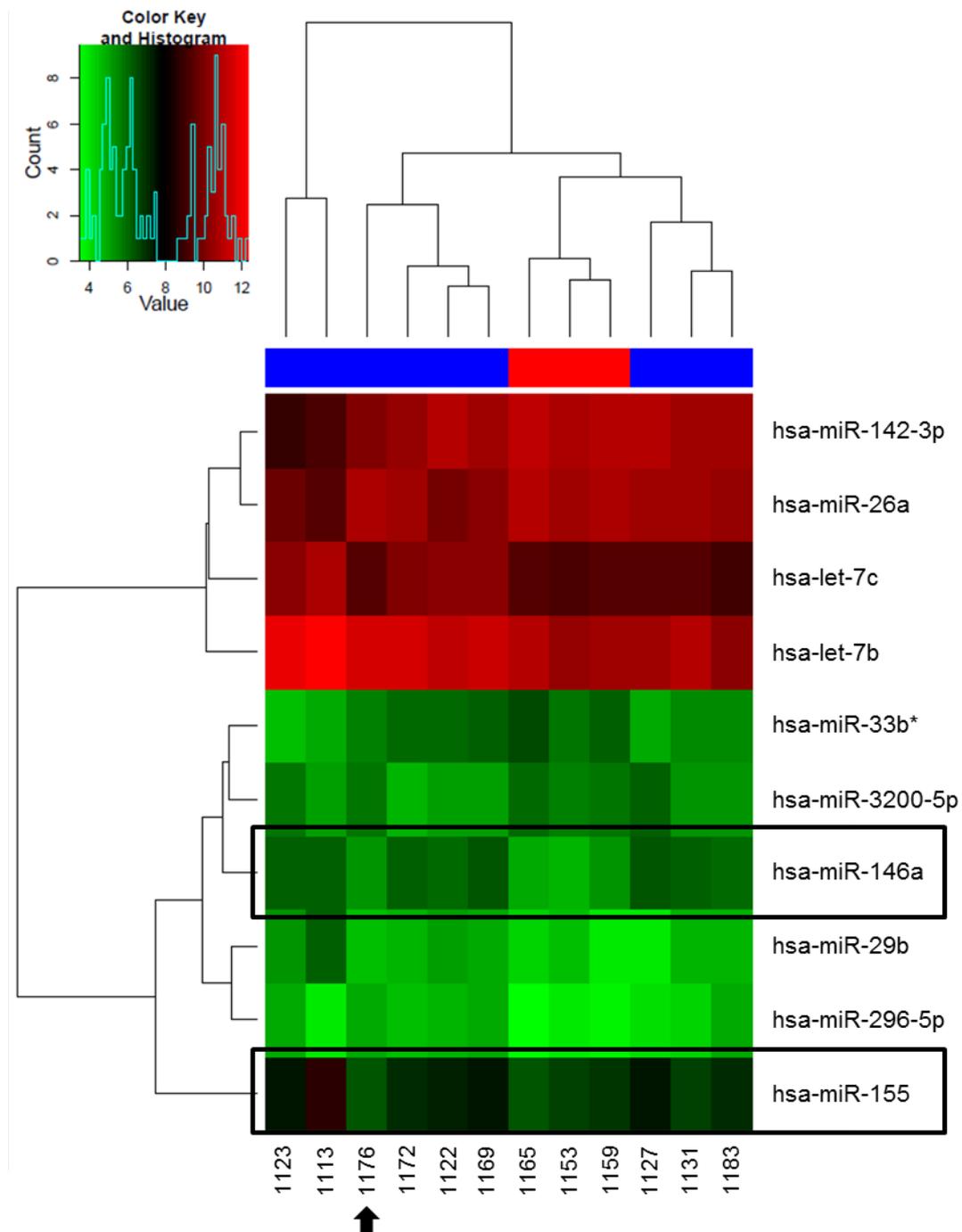
Eine darüber hinaus durchgeführte Auswertung innerhalb des Kollektivs der HNSCC-Patienten bezüglich der zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme erhobenen Kriterien HPV-Status (aus Pathologiebefund), Tabakkonsum und Fernmetastasierung bei einer mindestens zweifach veränderten Genexpression und einem adjustierten p-Wert kleiner 0,05 ist in Tabelle 31 dargestellt. Eine Auswertung bezüglich Lymphknotenmetastasierung war nicht möglich, da mit Ausnahme eines Patienten alle weiteren Patienten einen Lymphknotenbefall aufwiesen und somit keine Vergleichsgruppe vorhanden war.

**Tabelle 31: Auswertung der Microarrays bezüglich der Kriterien HPV-Status, Tabakkonsum und Fernmetastasierung bei einer mindestens zweifach veränderten Genexpression und einem adjustierten p-Wert kleiner 0,05.**

<b>miRNA</b>	<b>HPV-Status HPV negativ versus HPV positiv</b>	<b>Tabakkonsum Nichtraucher versus Raucher</b>	<b>Fernmetastasierung M0 versus M1</b>
hsa-miR-320a	-	p=0,0246	-
hsa-miR-155	-	-	p=0,0232
hsa-miR-1246	-	p=0,0022	-
hsa-miR-423-5p	-	p=0,0419	-
hsa-miR-494	-	p=0,0022	-
hsa-miR-424	-	p=0,0003	-
hsa-miR-29a	-	p=0,0422	-
hsa-miR-20b	-	p=0,0149	-
hsa-miR-548f	-	p=0,0149	-
hsa-miR-548x	-	p=0,0422	-
hsa-miR-146a	-	-	p=0,0126
hsa-miR-101	-	p=0,0347	-

Bezüglich des HPV-Status ergaben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede bei den angelegten Kriterien. Demgegenüber zeigten untersuchte Blutproben von HNSCC-Patienten in Bezug auf deren Tabakkonsum zehn signifikant veränderte Genexpressionen, wovon bei Rauchern jeweils fünf miRNAs eine erhöhte Genexpression und fünf weitere miRNAs eine erniedrigte Genexpression im Vergleich zu Nichtrauchern aufwiesen. Eine Analyse im Hinblick auf eine Fernmetastasierung ergab zwei signifikant veränderte miRNAs namens hsa-miR-155 mit einem p-Wert von 0,023 und hsa-miR-146a mit einem p-Wert von

0,013. Die entsprechende Cluster Heatmap ist in der nachfolgenden Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27: Cluster Heatmap einer Microarray-Analyse zur Untersuchung des miRNA-Profiles im Blut von HNSCC-Patienten korreliert mit dem klinischen Parameter Fernmetastatsierung.** Für diese Auswertung wurden die Daten der HNSCC-Patientenblutproben (n=12) der drei miRNA-Microarrays ausgewertet. Blau: HNSCC-Patienten ohne nachgewiesene Fernmetastasen (n=9); rot: HNSCC-Patienten mit nachgewiesenen Fernmetastasen (n=3). Der Pfeil kennzeichnet einen HNSCC-Patienten, der zum Zeitpunkt der Probennahme keine Fernmetastasen aufwies, diese jedoch ein Jahr später entwickelte.

Betrachtet man die biostatistische Auswertung der Expressionsdaten der drei durchgeführten Microarrays innerhalb des HNSCC-Patientenkollektivs, visualisiert in Form einer Cluster Heatmap (Abbildung 27), so zeigte sich ein Clustering der zueinander gehörenden Blutproben und ein Expressionsunterschied zwischen den Blutproben von HNSCC-Patienten mit Fernmetastasen verglichen mit den Blutproben von HNSCC-Patienten ohne Fernmetastasen.

Ein Patient (Fall 1176, cT2 cN2c cM0) wies zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme (April 2013) keine Fernmetastasen auf und wurde daher in die M0-Gruppe von HNSCC-Patienten ohne Fernmetastasen eingestuft (in Abbildung 27 mit einem Pfeil gekennzeichnet). Im Januar 2014 konnten bei diesem Patienten Lungen- und Lebermetastasen nachgewiesen werden. Betrachtet man sich von diesem Patienten das Expressionsmuster von *miR-146a* und *miR-155* in Abbildung 27, so deutet sich wie für die anderen drei HNSCC-Patienten mit Fernmetastasen eine erniedrigte Expression an.

Für eine verbesserte Prognoseeinschätzung ist eine im Blut nachweisbare Information über Fernmetastasierung von enormer Bedeutung. Daher wurden in dieser Arbeit die beiden im Blut von fernmetastasierenden HNSCC-Patienten signifikant veränderten Transkriptlevel der beiden miRNAs hsa-miR-146a und hsa-miR-155 in weiteren Versuchen mittels Real-Time PCR validiert und funktionell bezüglich möglicher Auswirkungen auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von humanen Tumorzellen analysiert.

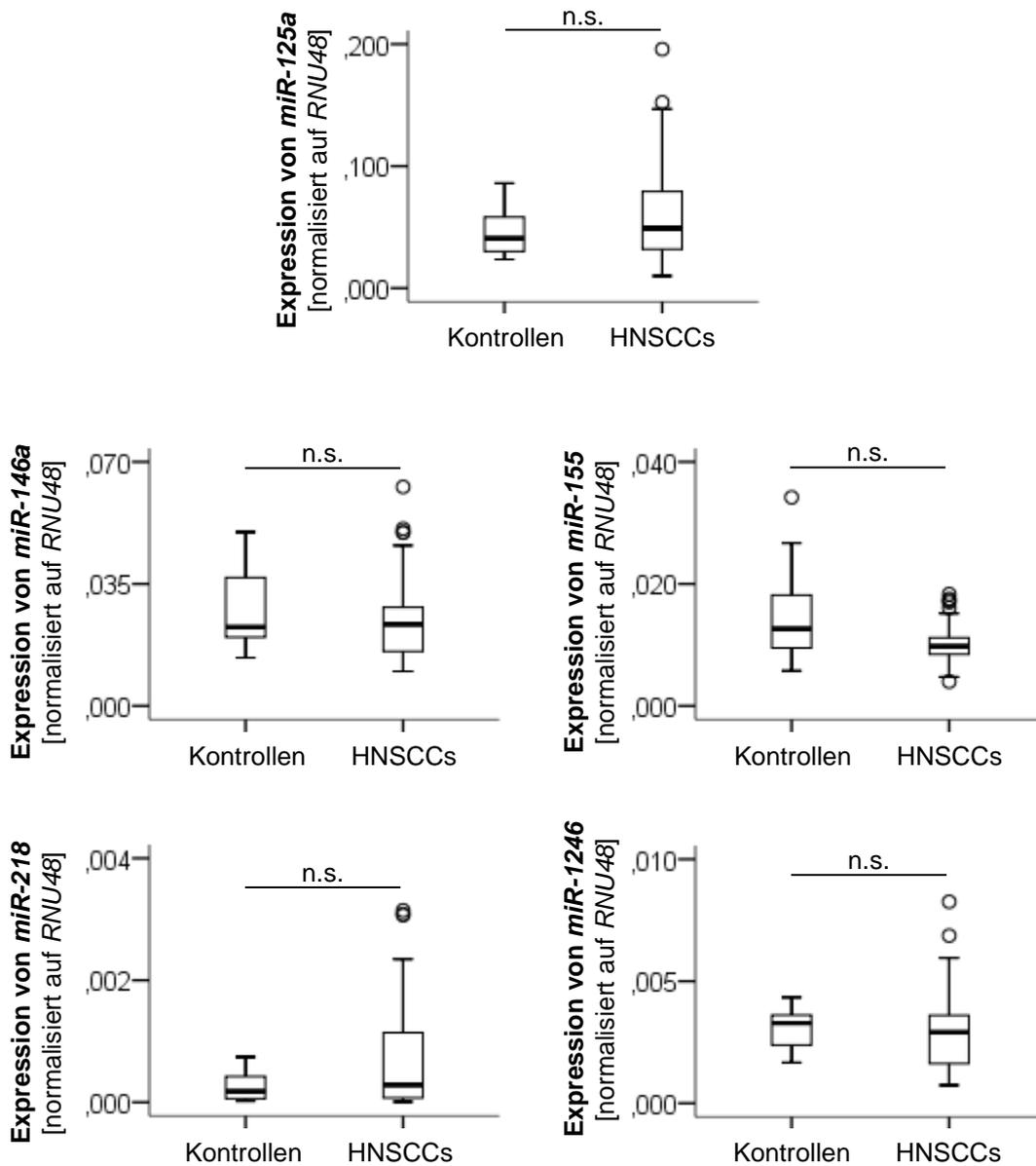
#### **4.3.2 Bestimmung des miRNA-Profiles mittels quantitativer Real-Time PCR**

Zur Validierung der Microarray-Ergebnisse wurde die Expression einzelner Gene, die für miRNAs kodieren, mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (Kapitel 3.6) an einem größeren Patientenkollektiv überprüft und mit den, zum Zeitpunkt der Untersuchungen aktualisierten, klinischen Daten korreliert. Das Untersuchungskollektiv bestand aus Blutproben von Patienten mit einem diagnostiziertem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (n=71) und Blutproben von gesunden Probanden (n=12), die als Kontrollen dienten. Für die Analyse wurden TaqMan® MicroRNA Assays verwendet. Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe der effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsstrategie ausgewertet. Neben einem Vergleich der Expressionsdaten zwischen Blutproben von gesunden Personen und HNSCC-Patienten wurden diese auch innerhalb des HNSCC-Patientenkollektivs mit den klinischen Daten der Patienten (TNM-Klassifikation) korreliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 aufgeführt.

**Tabelle 32: Expression miRNA-kodierender Gene im Blut von HNSCC-Patienten mit ermitteltem p-Wert (Mann-Whitney U-Test) und Foldchange.**

miRNA	Blutproben		
	Kontrollen versus HNSCC	HNSCC M0 versus HNSCC M1	Auswertung bezüglich weiterer klinischer Daten
miR-125a	n.s.	n.s.	Lymphknotenmetastasierung (N0 versus N $\geq$ 1) p=0,006; 1,567
miR-146a	n.s.	p=0,023; 0,621	n.s.
miR-155	n.s.	p=0,028; 0,728	n.s.
miR-218	n.s.	n.s.	n.s.
miR-1246	n.s.	n.s.	n.s.

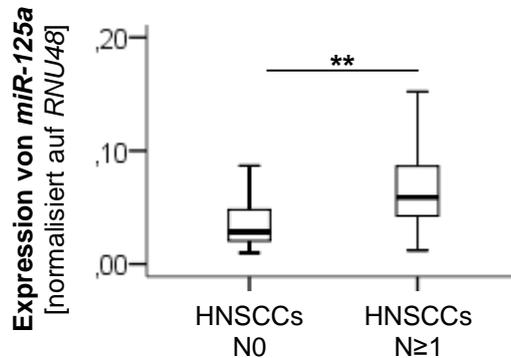
Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede der untersuchten miRNAs (miR-125a, miR-146a, miR-155, miR-218 und miR-1246) hinsichtlich ihrer Transkriptlevel im Blut zwischen gesunden Personen und HNSCC-Patienten beobachtet (Tabelle 32 und Abbildung 28).



**Abbildung 28: Normalisierte Expression von *miR-125a*, *miR-146a*, *miR-155*, *miR-218* und *miR-1246* im Blut von HNSCC-Patienten.** Die Genexpression im Blut von HNSCC-Patienten (n=71) und Kontrollen (n=12) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt, auf die endogene Kontrolle *RNU48* normalisiert und als signifikant verändert gewertet, wenn der p-Wert, ermittelt unter Verwendung des Mann-Whitney U-Tests mit der Software SPSS, kleiner als 0,05 ist (n.s.=nicht signifikant).

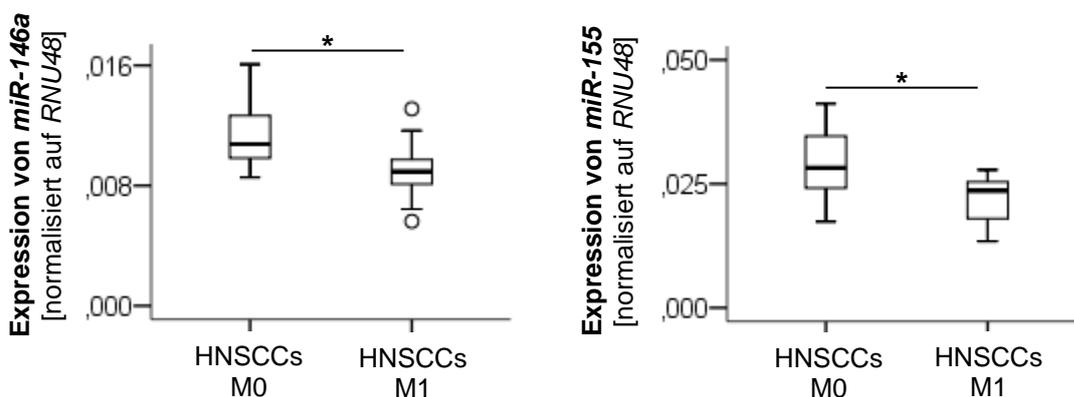
Jedoch konnte ein Trend zur Überexpression bei der Betrachtung der Expression von *miR-125a* und *miR-218* im Blut von HNSCC-Patienten verglichen mit gesunden Probanden (Abbildung 28) festgestellt werden.

Darüber hinaus zeigte die Korrelation mit klinischen Daten eine statistisch signifikant erhöhte *miR-125a* Expression in Patienten mit einer Lymphknotenmetastasierung ( $p=0,006$ ; Abbildung 29).



**Abbildung 29: Normalisierte Expression von *miR-125a* im Vollblut von HNSCC-Patienten.** Die Genexpression im Blut von HNSCC-Patienten wurde mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt, auf die endogene Kontrolle *RNU48* normalisiert und bei Werten kleiner als 0,05 als signifikant verändert gewertet (\*\* $p \leq 0,01$ ).

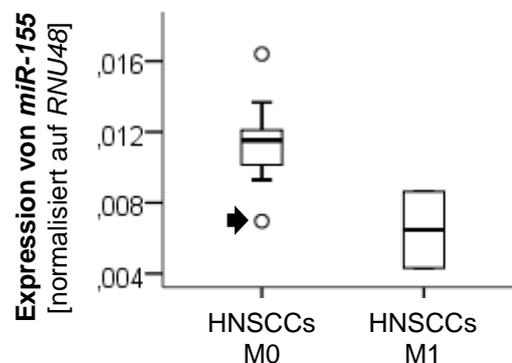
Zudem zeigte sich in einem geschlechts- und altersgepaarten ( $\pm 4$  Jahre) Patientenkollektiv ( $n=20$ ; Tabelle 30) eine statistisch signifikant verminderte Expression von *miR-146a* ( $p=0,023$ ) und *miR-155* ( $p=0,028$ ) im Vollblut von HNSCC-Patienten mit Fernmetastasen ( $n=10$ ) im Gegensatz zu HNSCC-Patienten ohne Fernmetastasen ( $n=10$ ), welche in der nachfolgenden Abbildung 30 veranschaulicht ist.



**Abbildung 30: Normalisierte Expression von *miR-146a* und *miR-155* im Vollblut von HNSCC-Patienten.** Die Genexpression im Blut von HNSCC-Patienten ( $n=20$ ) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt, auf die endogene Kontrolle *RNU48* normalisiert und bei Werten kleiner als 0,05 als signifikant verändert gewertet (\* $p < 0,05$ ).

Diese Analyse (Abbildung 30) erfolgte aufgrund fehlender Blutproben von fernmetastasierenden HNSCC-Patienten nur an einem kleinen Patientenkollektiv (n=20). Generell zeigen die Boxplots der Abbildungen 29 und 30 Überschneidungen, sodass es keine absolut klare Gruppentrennung gibt.

Interessanterweise fiel bei einer ersten Validierung der Microarray-Daten mittels quantitativer Real-Time PCR auf, dass in der Gruppe HNSCC-Patienten ohne Fernmetastasen (n=9) eine Probe (in Abbildung 31 mit einem Pfeil gekennzeichnet) eine niedrige Expression von *miR-155* entsprechend den Expressionsdaten von HNSCC-Patienten mit Fernmetastasen (n=3) aufzeigt.



**Abbildung 31: Erste Auswertung der Expressionsanalyse von *miR-155* im Vollblut von HNSCC-Patienten.** Dargestellt ist eine erste Auswertung der Expressionsdaten, die mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt und auf die endogene Kontrolle *RNU48* normalisiert wurden. Eingeschlossen wurden die Blutproben von HNSCC-Patienten (n=12), die sich auf den durchgeführten Microarrays befanden. Auffällig ist dabei die Probe 1176 (gekennzeichnet mit einem Pfeil), die eine niedrige Expression von *miR-155* aufweist.

Zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme (April 2013) wies der Patient (Fall 1176, cT2 cN2c cM0) keine Fernmetastasen auf und wurde daher initial in die Gruppe der HNSCC-Patienten ohne Fernmetastasen eingestuft (in Abbildung 31 mit einem Pfeil gekennzeichnet). Sowohl in der Erstanalyse als auch nach einer Wiederholung der quantitativen Real-Time PCR zeigte sich eine erniedrigte Expressionsrate, die den Microarray-Daten (Kapitel 4.3.1) entspricht. Eine erneute Überprüfung der Patientenakte durch einen in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde-tätigen Arzt ergab, dass bei diesem Patienten unterdessen (Januar 2014) Lungen- und Lebermetastasen nachgewiesen wurden und er somit nachträglich in die Gruppe der HNSCC-Patienten mit Fernmetastasen eingeordnet werden musste.

#### 4.4 Bestimmung des Transkriptlevels ausgewählter miRNAs in FFPE-Tumorgewebe unter Verwendung der quantitativen Real-Time PCR

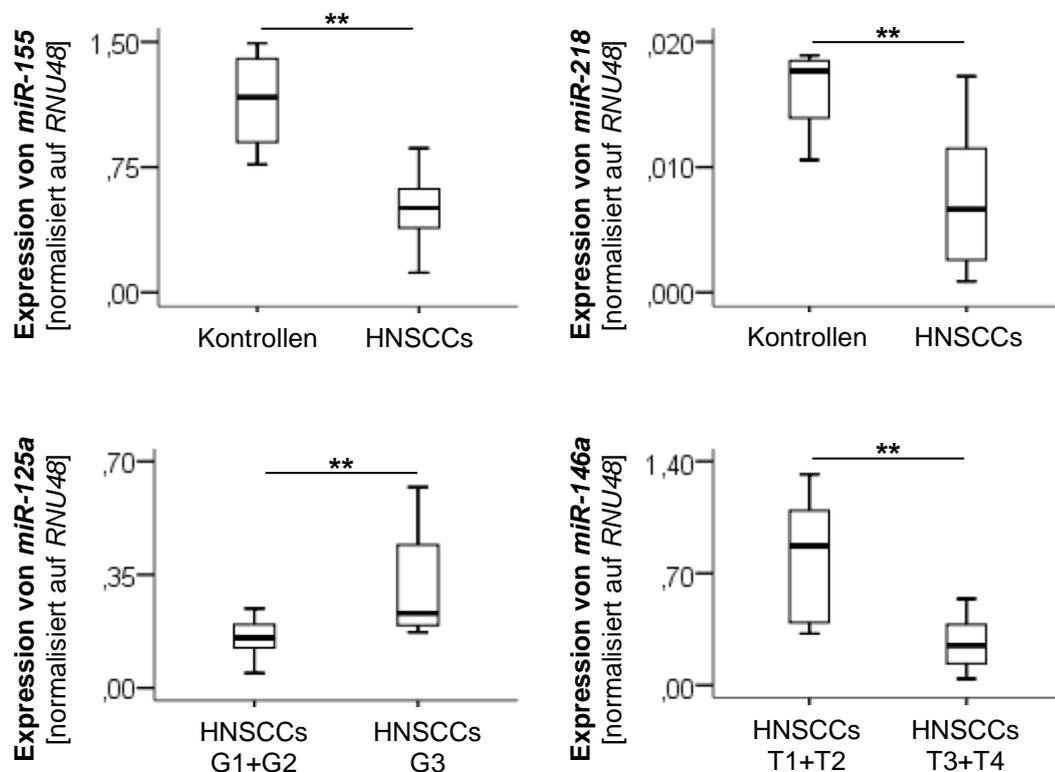
Die auf Grundlage der Microarrays ausgewählten und im Blut von HNSCC-Patienten validierten miRNAs wurden darüber hinaus im Tumorgewebe mittels quantitativer Real-Time PCR (Kapitel 3.6) analysiert. Das Untersuchungskollektiv bestand aus 30 Tumorgewebe-proben von 29 Patienten mit einem diagnostiziertem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region und 6 unauffälligen Plattenepithelproben von Tonsillen und Uvulae als Kontrollen. Die mit TaqMan® MicroRNA Assays ermittelten Daten wurden mit Hilfe der effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsstrategie ausgewertet. Neben einem Vergleich der Expressionsdaten zwischen Tumorgewebe und unauffälligem Plattenepithel wurden diese auch innerhalb des HNSCC-Patientenkollektivs mit den klinischen Daten der Patienten (TNM-Klassifikation, Grading, p16-Status) korreliert. Im Hinblick auf Fernmetastasierung konnte aufgrund zu kleiner Fallgruppen (M1-Gruppe) keine Auswertung vorgenommen werden. Die Ergebnisse der Auswertung sind in der nachfolgenden Tabelle 33 aufgeführt.

**Tabelle 33: Expression miRNA-kodierender Gene im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten mit ermitteltem p-Wert (Mann-Whitney U-Test) und Foldchange.**

miRNA	Gewebeproben	
	Kontrollen versus HNSCC	Auswertung bezüglich anderer klinischer Daten
miR-125a	n.s.	Tumorgrad (G1+G2 versus G3) p=0,003; 1,705
miR-146a	n.s.	Tumorgröße/-ausdehnung (T1+T2 versus T3+T4) p=0,005; 0,392
miR-155	p=0,003; 0,455	n.s.
miR-218	p=0,009; 0,328	n.s.
miR-1246	n.s.	n.s.

Von den untersuchten miRNAs (miR-125a, miR-146a, miR-155, miR-218 und miR-1246) zeigten lediglich *miR-155* (p=0,003) und *miR-218* (p=0,009) statistisch signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen Tumorgewebe und unauffälligem Plattenepithel. Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression von *miR-125a* mit einem höheren Grading (p=0,003) und eine erniedrigte Expression von *miR-146a* mit einer höheren cT-Klassifikation (p=0,005) assoziiert werden. Alle weiteren möglichen Korrelationen zeigten keine statistische Signifikanz oder waren aufgrund zu kleiner Fallzahlen nicht auswertbar.

Die im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten veränderten Expressionsmuster sind in Abbildung 32 veranschaulicht.

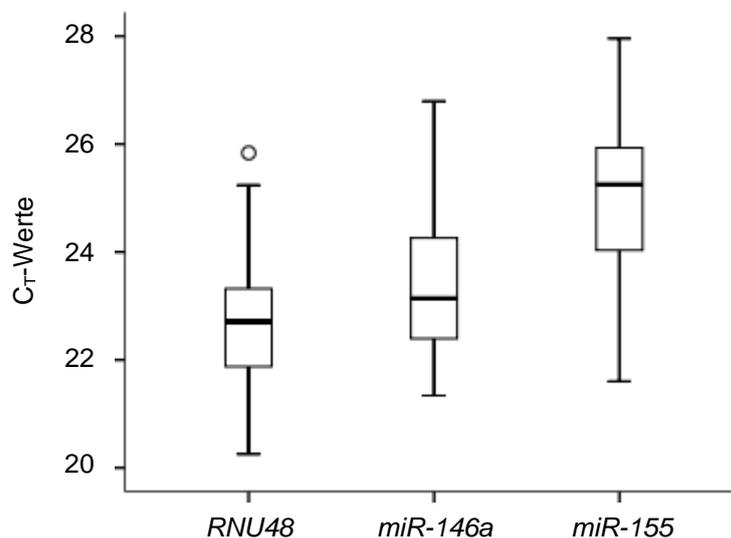


**Abbildung 32: Normalisierte Expression von *miR-155*, *miR-218*, *miR-125a* und *miR-146a* im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten.** Die Genexpression im FFPE-Tumorgewebe (n=30) von 29 HNSCC-Patienten und im FFPE-Gewebe unauffälliger Plattenepithelproben (n=6) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt, auf die endogene Kontrolle *RNU48* normalisiert und bei Werten kleiner als 0,05 als signifikant verändert gewertet (\*\*p<0,01).

Die biostatistische Auswertung der Expressionsdaten der durchgeführten quantitativen Real-Time PCR, visualisiert in Form von Boxplots (Abbildung 32), zeigt sowohl eine erniedrigte Expression von *miR-155* als auch eine erniedrigte Expression von *miR-218* im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten verglichen mit Normalgewebe. Des Weiteren ging eine erhöhte Expression von *miR-125a* im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten mit einem höheren Tumorstadium und eine erniedrigte Expression von *miR-146a* im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten mit einer zunehmenden Tumorstadium/-ausdehnung einher.

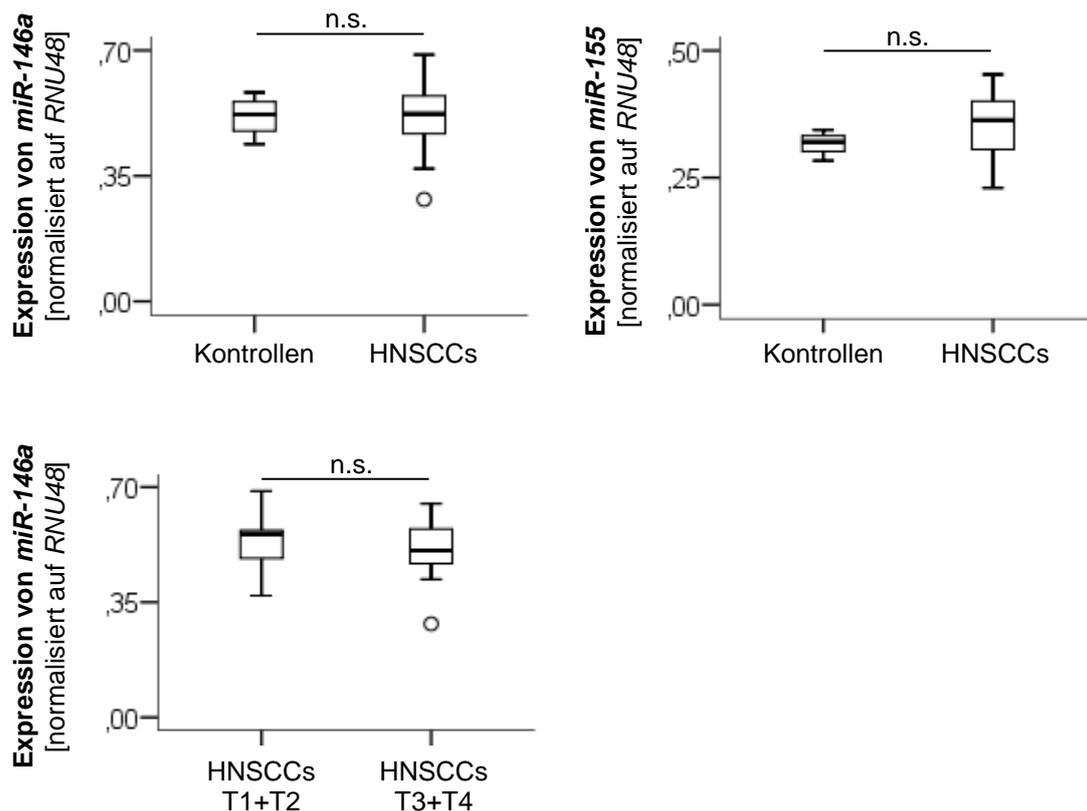
#### 4.5 Bestimmung des Transkriptlevels ausgewählter miRNAs an Abstrichmaterial unter Verwendung der quantitativen Real-Time PCR

Die im Blut und Gewebe von HNSCC-Patienten untersuchten miRNAs 146a und 155 wurden zum Vergleich an dem mit Bürstenabstrichen gewonnenen Material von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region mittels quantitativer Real-Time PCR (Kapitel 3.6) analysiert. Das Untersuchungskollektiv bestand aus Abstrichmaterial (n=31) von 30 HNSCC-Patienten und Abstrichmaterial (n=4) von unauffälligem Tonsillenepithel, das als Kontrolle diente. Für die Analyse wurden TaqMan® MicroRNA Assays verwendet. Die ermittelten Rohdaten (reine  $C_T$ -Werte) sind in der nachfolgenden Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Ermittelte  $C_T$ -Werte der *RNU48*, *miR-146a* und *miR-155*.** Die Genexpression aller Abstrichproben (n=35) wurde mittels Real-Time PCR ermittelt und in Form eines Boxplots dargestellt.

Die Betrachtung der RNU48- $C_T$ -Werte (Abbildung 33) ergab eine instabile Genexpression mit Schwankungen größer 3,32  $C_T$ -Werte. Der minimale  $C_T$ -Wert für RNU48 beträgt 20,26 zu einem maximalen  $C_T$ -Wert von 25,84. Auffallend sind auch die Schwankungen der miR-146a- $C_T$ -Werte und der miR-155- $C_T$ -Werte. Eine weiterführende Datenanalyse sowie eine statistische Auswertung sind daher nicht gegeben. Würde man trotz allem die normalisierten Daten (Abbildung 34) betrachten, würde sich kein statistisch signifikanter Genexpressionsunterschied zeigen.



**Abbildung 34: Normalisierte Expression von *miR-146a* und *miR-155* im Abstrichmaterial von HNSCC-Patienten.** Die Genexpression im Abstrichmaterial von HNSCC-Patienten (n=31) und unauffälligem Tonsillenepithel (n=4) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt, auf die endogene Kontrolle *RNU48* normalisiert und bei Werten kleiner als 0,05 als signifikant verändert gewertet (n.s. = nicht signifikant).

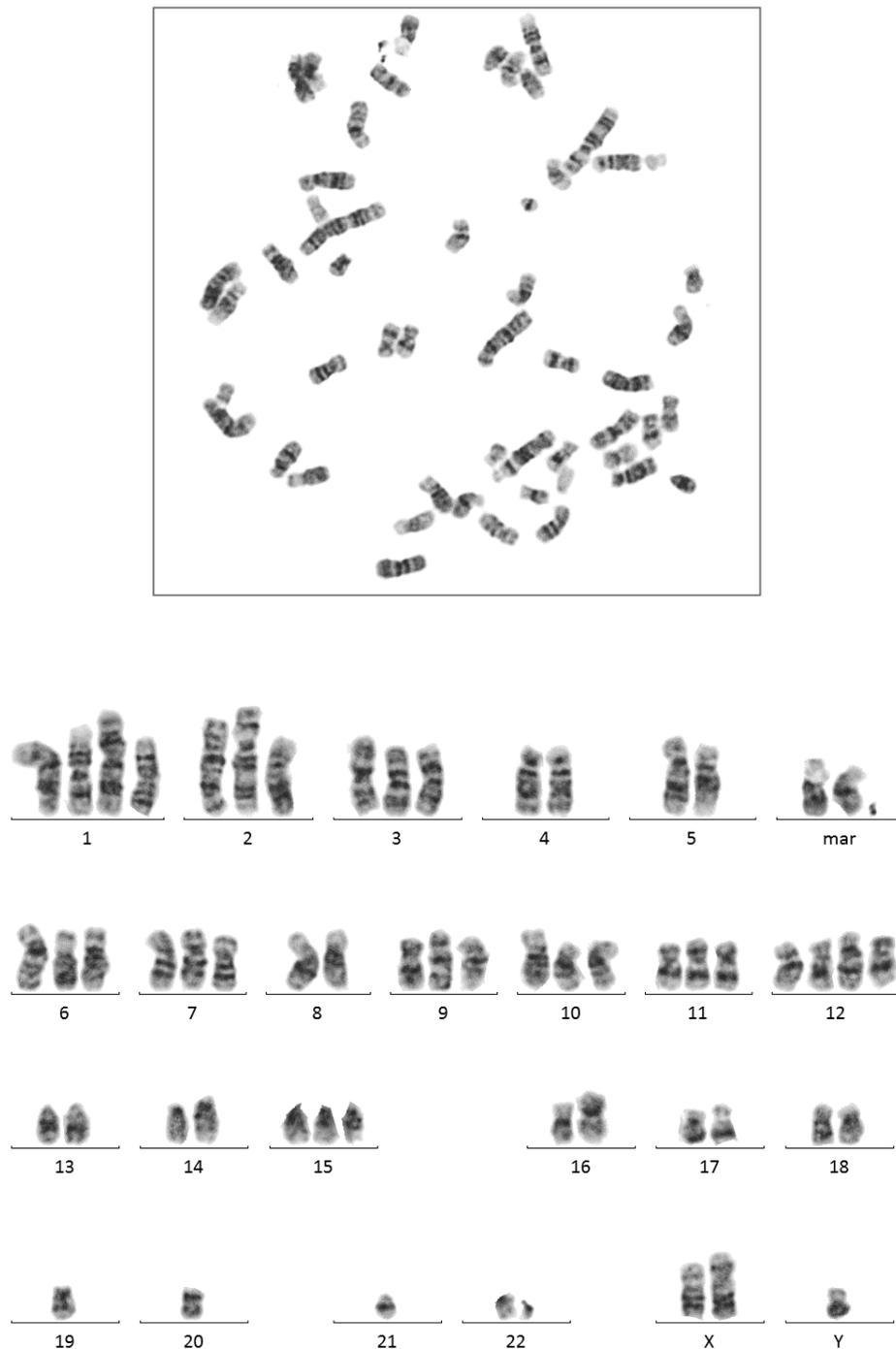
Sowohl zwischen dem Abstrichmaterial von gesunden Personen und HNSCC-Patienten als auch in Korrelation mit der cT-Klassifikation würde sich kein statistisch signifikanter Genexpressionsunterschied zeigen (Abbildung 34).

#### 4.6 Funktionelle Analysen

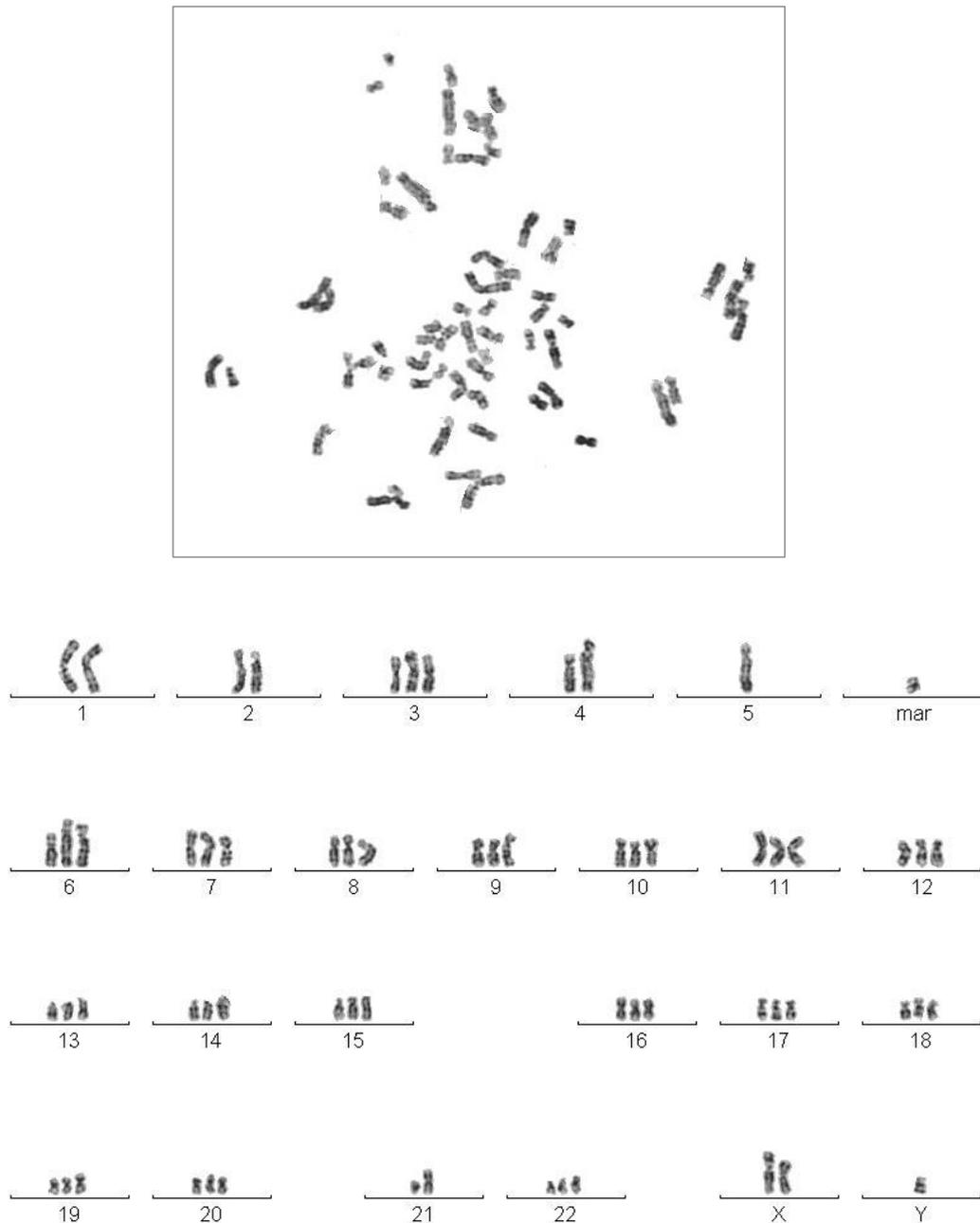
Die in Kapitel 4.3 und 4.4 gezeigten Ergebnisse bezüglich der veränderten Expression von *miR-146a* und *miR-155* sowohl im humanen Vollblut als auch im Tumorgewebe belegen ihren Stellenwert in HNSCCs, sodass eine weitergehende Untersuchung dieser miRNAs im Hinblick auf deren Funktionalität von großem Nutzen ist. Daher wurde eine weiterführende Untersuchung hinsichtlich des Proliferations- und Migrationsverhalten der humanen Plattenepithelkarzinomzellen FaDu und UM-SCC-1 angeschlossen, welche zu Beginn erst mittels Karyotypisierung und vergleichender genomischer Hybridisierung (Kapitel 3.7.1) genauer charakterisiert wurden.

#### 4.6.1 Charakterisierung der Zelllinien FaDu und UM-SCC-1

Zur Charakterisierung der Zelllinien FaDu und UM-SCC-1 wurden von beiden Zelllinien GTG-gebänderte Metaphase-Chromosomenpräparate für die Karyotypisierung angefertigt sowie DNA für eine vergleichende genomische Hybridisierung isoliert, um genetische Imbalancen darzustellen.

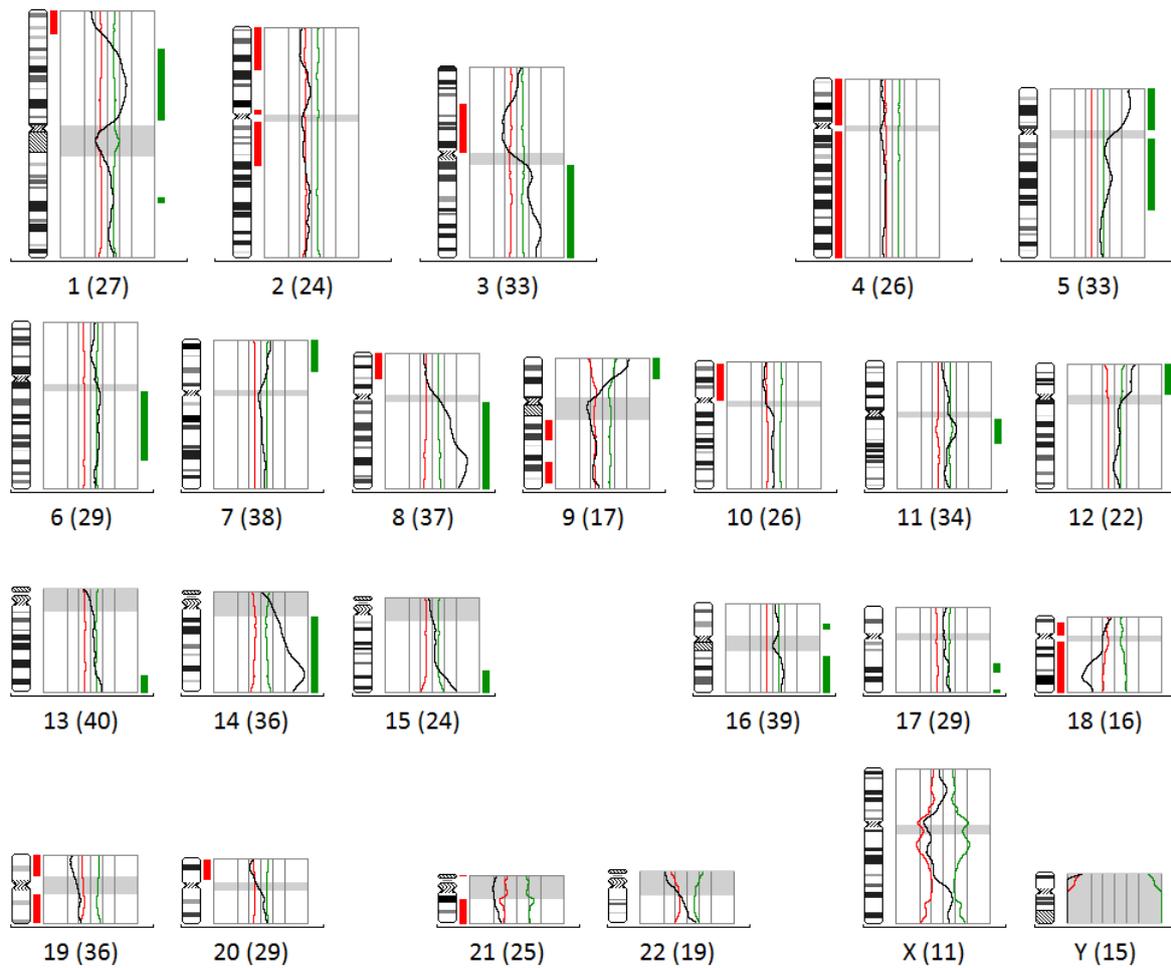


**Abbildung 35: Exemplarische Metaphase und zugehöriges Karyogramm von GTG-gebänderten Metaphase-Chromosomen der Zelllinie FaDu.** Aufgenommen mit dem 100x Objektiv und nach bestem Wissen zugeordnet.



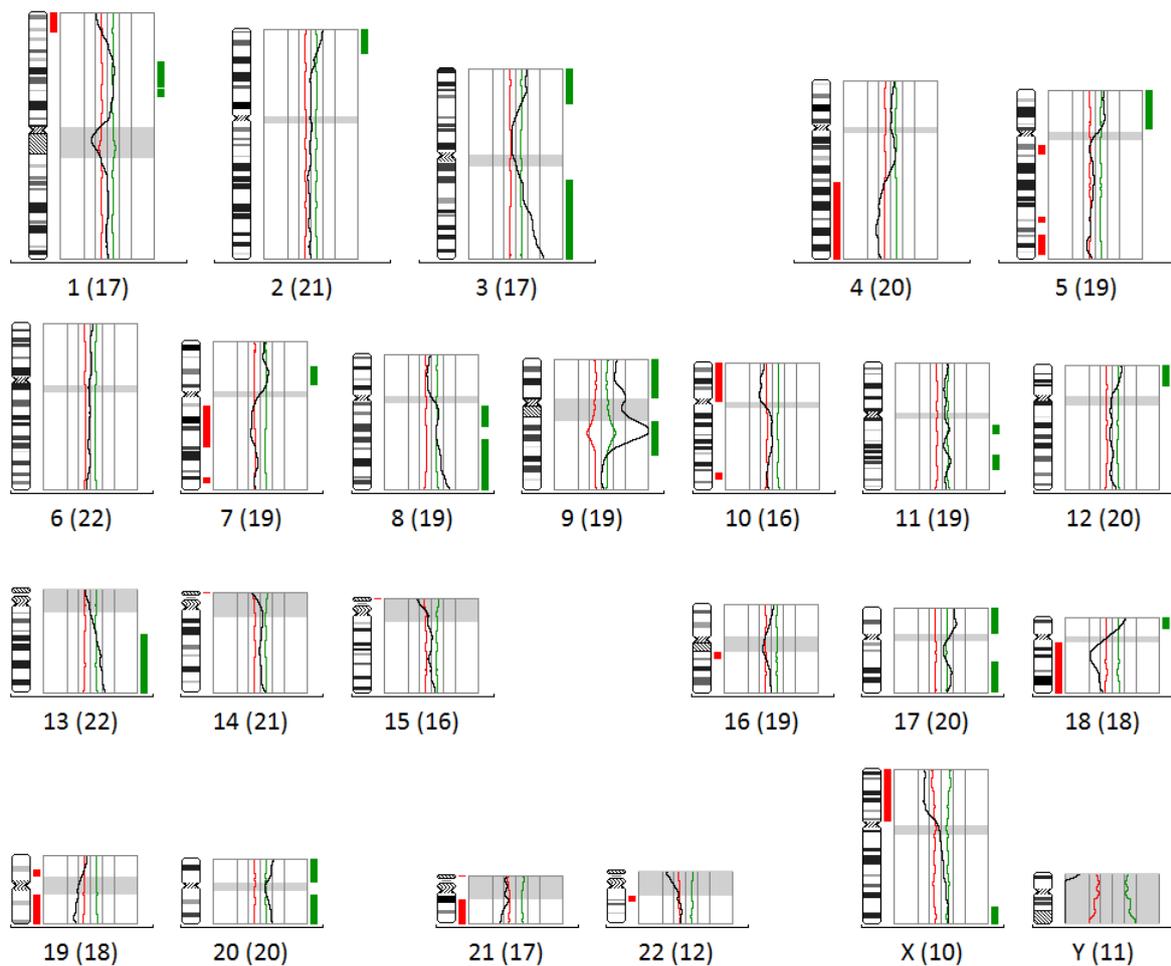
**Abbildung 36: Exemplarische Metaphase und zugehöriges Karyogramm von GTG-gebänderten Metaphase-Chromosomen der Zelllinie UM-SCC-1.** Aufgenommen mit dem 60x Objektiv und nach bestem Wissen zugeordnet.

Die Karyogramme der untersuchten Zelllinien FaDu (Abbildung 35) und UM-SCC-1 (Abbildung 36) zeigten hoch komplexe Karyotypen mit vielen strukturellen Umbauten. Aufgrund der mangelnden Auflösung der GTG-Bänder sowie der mangelnden Erfahrung war eine gesicherte Zuordnung der Chromosomen nicht möglich. Die aberranten Karyotypen spiegelten sich auch in den CGH-Summenprofilen (Abbildungen 37 und 38) beider Zelllinien wider.



**Abbildung 37: Genetische Veränderungen der Zelllinie FaDu.** Chromosomale Gewinne sind in grün dargestellt, während chromosomale Verluste in rot gekennzeichnet sind. In Klammern hinter der Chromosomennummer steht die Anzahl der in die Auswertung eingeflossenen Chromosomen.

Die Zelllinie FaDu (Abbildung 37) zeigte Gewinne auf 1p13.1p33, 1q25.3, 3q, 5p, 5q11.2q31.1, 6q12q24, 7p14pter, 8q, 9p21pter, 11q11.1q14.1, 12p, 13q32qter, 14, 15q24qter, 16p11.1, 16q, 17q21.3q22 und 17q25 mit Amplifikationen auf 3q25.3q27, 8q22q24.2 und 14q24.3qter. Wohingegen Verluste auf 1p35pter, 2p11.2, 2p21pter, 2q11.2q22, 3p11.1p21.3, 4, 8p21.2pter, 9q13q21.3, 9q32q34.3, 10p, 18p11.2, 18q, 19, 20p und 21 zu beobachten waren.



**Abbildung 38: Genetische Veränderungen der Zelllinie UM-SCC-1.** Chromosomale Gewinne sind in grün dargestellt, während chromosomale Verluste in rot gekennzeichnet sind. In Klammern hinter der Chromosomennummer steht die Anzahl der in die Auswertung eingeflossenen Chromosomen.

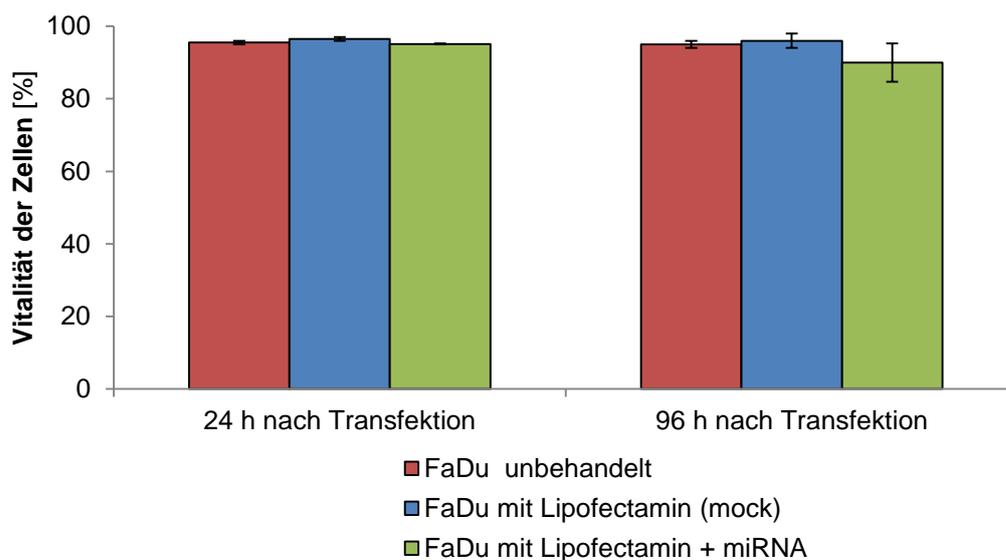
Die Zelllinie UM-SCC-1 (Abbildung 38) wies Verluste auf den chromosomalen Bereichen 1p35pter, 4q24qter, 5q11.2q13.1, 5q32q35.2, 7q11.2q31.3, 7q35q36, 10p, 10q25.1q26.2, 18q, 19p13.1p13.2, 19q, 21, 22q11.1q12.1, Xp und Gewinne auf den chromosomalen Bereichen 1p22.1p31.3, 2p23pter, 3p21.3pter, 3q13.1qer, 5p, 7p11.2p15.1, 8q11.2q21.1, 8q21.3qter, 9p, 11q12q13.3, 11q21q23.3 und 12p11.2pter auf. Zudem konnte eine Amplifikation auf 9q13q21.3 beobachtet werden.

In den beiden komplex aberranten Zelllinien FaDu und UM-SCC-1 konnten sowohl übereinstimmende als auch unterschiedliche chromosomale Veränderungen beobachtet werden. Übereinstimmend zeigten sich Gewinne auf den Chromosomenarmen 1p, 3q, 5p, 7p, 8q, 9p, 11q, 12p, 13q und 17q sowie Verluste auf den Chromosomen bzw. Chromosomenarmen 1p, 4q, 10p, 18q, 19 und 21. Während die Zelllinie FaDu einen Gewinn auf

5q11.2q31.1 und Verluste auf 2p11.2, 2p21pter und 20p aufwies, zeigte die Zelllinie UM-SCC-1 gegensätzliche Veränderungen wie einen Verlust auf 5q32q35.2 und Gewinne auf 2p23pter und 20. Des Weiteren besaßen beide Zelllinien Veränderungen auf chromosomalen Regionen, die in der jeweilig anderen Zelllinie unverändert vorlagen. Beispielsweise zeigte die Zelllinie FaDu Veränderungen auf 2q, 3p, 6q, 8p, 9q, 14, 15, 16 und 20p, während die Zelllinie UM-SCC-1 Veränderungen auf 7q, 10q, 18 und 22q aufwies.

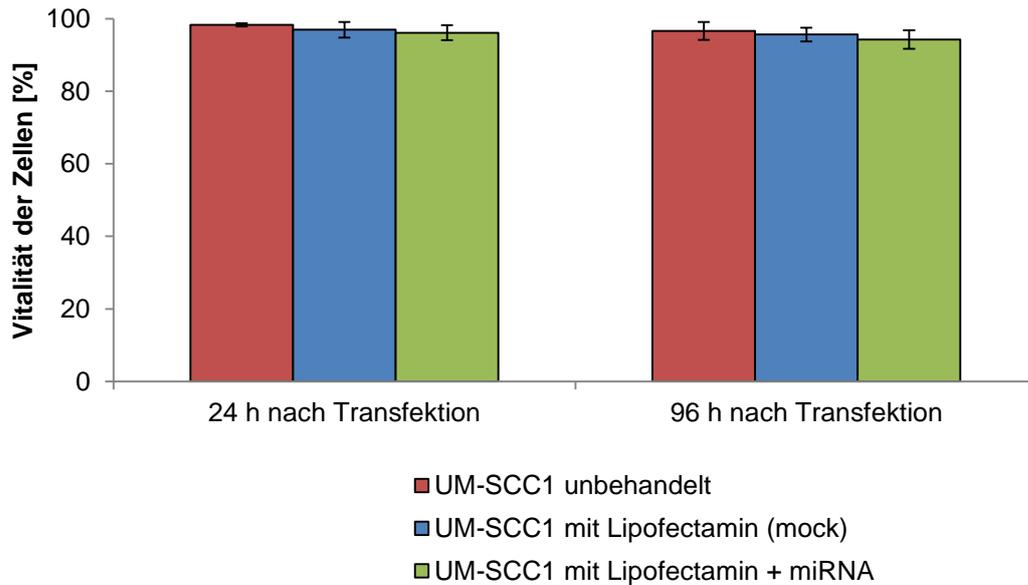
#### 4.6.2 Vitalität der HNSCC-Zellen nach der Transfektion und deren Effizienz

Zur Bestimmung der Vitalität der HNSCC-Zellen wurden diese jeweils 24 h und 96 h nach der Transfektion mit Trypanblau (1:2) gefärbt und deren Vitalität mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes bestimmt. Die Auswertung der Vitalitätsmessung ist in den Abbildungen 39 und 40 dargestellt.



**Abbildung 39: Vitalität der FaDu-Zellen nach der Transfektion.** Zur Bestimmung der Vitalität von FaDu-Zellen wurden diese 24 h und 96 h nach der Transfektion mit Trypanblau (1:2) angefärbt und deren Vitalität mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes bestimmt.

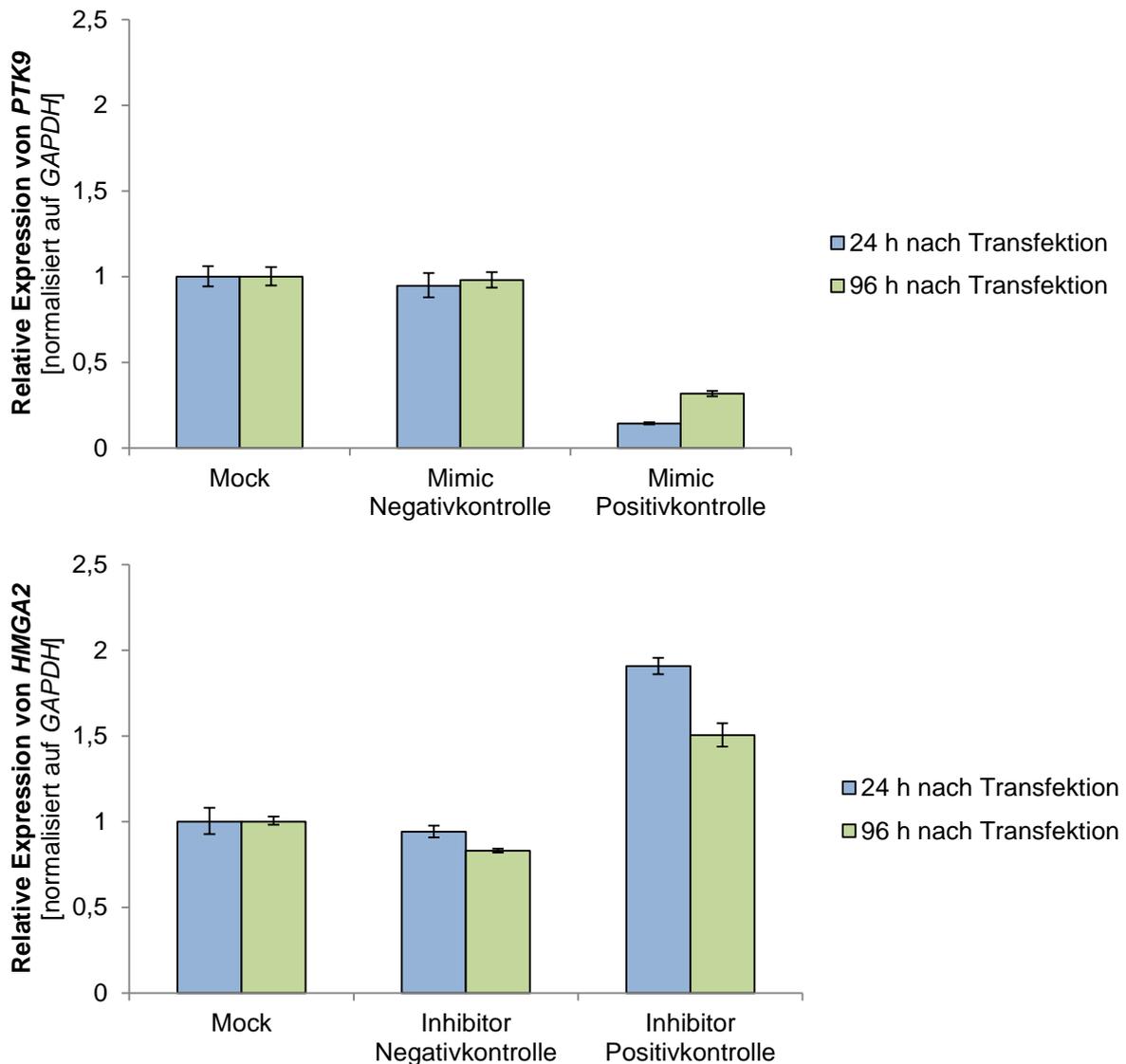
Sowohl bei unbehandelten FaDu-Zellen, Mock-FaDu-Zellen als auch bei den transfizierten FaDu-Zellen wurde 24 h nach der Transfektion mit gemittelten Werten von 95,5 % $\pm$ 0,5 %, 96,5 % $\pm$ 0,5 % bzw. 95,1 % $\pm$ 0,1 % eine sehr hohe Vitalität beobachtet (Abbildung 39). Auch 96 h nach der Transfektion waren diese Zellen mit Werten von 95,0 % $\pm$ 1,0 %, 96,0 % $\pm$ 1,2 % bzw. 90,0 % $\pm$ 5,25 % noch sehr vital.



**Abbildung 40: Vitalität von UM-SCC-1-Zellen nach der Transfektion.** Zur Bestimmung der Vitalität von UM-SCC-1-Zellen wurden diese 24 h und 96 h nach der Transfektion mit Trypanblau (1:2) angefärbt und deren Vitalität mit Hilfe des automatischen Zellzählgerätes bestimmt.

Damit vergleichbar war sowohl bei unbehandelten UM-SCC-1-Zellen, Mock-UM-SCC-1-Zellen als auch bei transfizierten UM-SCC-1-Zellen die Vitalität 24 h nach der Transfektion mit gemittelten Werten von 98,3 %±0,5 %, 97,0 %±2,2 % bzw. 96,2 %±2,1 % ebenfalls sehr hoch (Abbildung 40). Auch 96 h nach der Transfektion waren diese Zellen mit Werten von 96,7 %±2,5 %, 95,7 %±1,9 % bzw. 94,2 %±2,5 % noch sehr vital.

Zur Überprüfung der Transfektionseffektivität mit miRNA-Mimics und -Inhibitoren wurden die Effekte der mitgeführten Negativ- und Positivkontrollen auf ihre Zielgene mittels quantitativer Real-Time PCR überprüft (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Überprüfung der Transfektionseffizienz exemplarisch in UM-SCC-1-Zellen mittels quantitativer Real-Time PCR.** Eine erfolgreiche Transfektion wurde durch eine Mimic miR-1 Positivkontrollen-assoziierte Reduzierung des *PTK9* mRNA-Gehalts und eine Inhibitor let-7c Positivkontrollen-assoziierte Erhöhung des *HMGA2* mRNA-Gehalts überprüft.

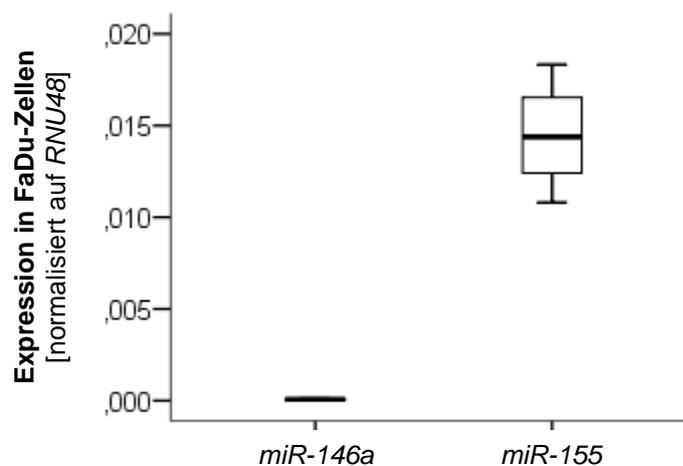
Die bei der Transfektion mitgeführten Negativ- und Positivkontrollen, jeweils für Mimic und Inhibitor, bestätigten eine erfolgreiche Transfektion sowohl in UM-SCC-1-Zellen als auch in FaDu-Zellen durch eine Mimic miR-1 Positivkontrollen-assoziierte Reduzierung des *PTK9* mRNA-Gehalts und eine Inhibitor let-7c Positivkontrollen-assoziierte Erhöhung des *HMGA2* mRNA-Gehalts (Abbildung 41). Verglichen mit 24 h nach der Transfektion ließ sich 96 h nach der Transfektion eine Verminderung des Effekts feststellen.

### 4.6.3 Analyse des Real-Time Proliferationsverhaltens von humanen Tumorzellen

Zur Bestimmung der Real-Time Proliferation (Kapitel 3.7.3) von humanen HNSCC-Zellen (FaDu-Zellen und UM-SCC-1-Zellen) wurde das xCELLigence-System genutzt, welches eine kontinuierliche Aufzeichnung des Proliferationsverhaltens ermöglicht, das graphisch als Zellindex-Zeit-Kurve dargestellt wird.

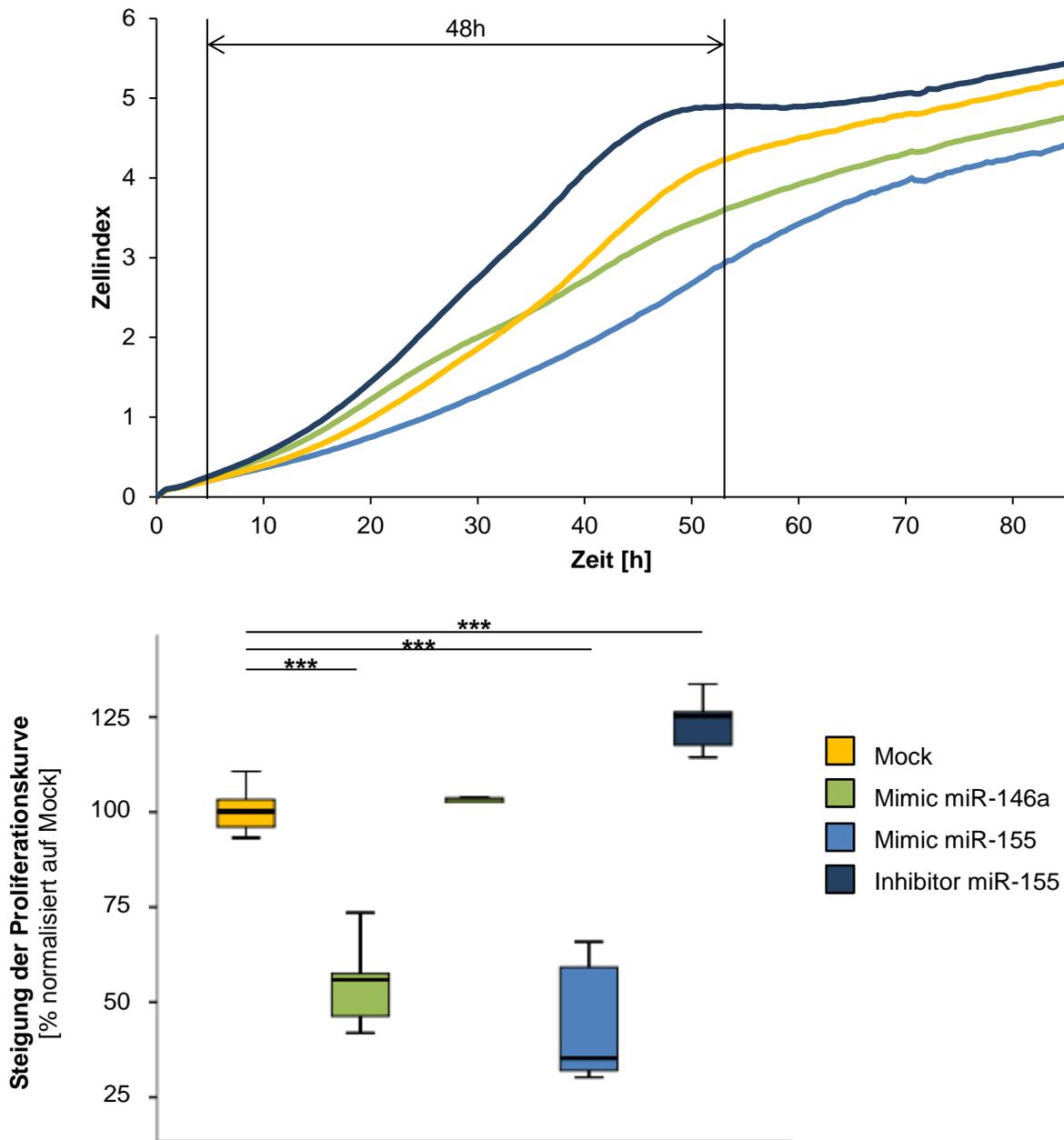
#### 4.6.3.1 Bestimmung des Real-Time Proliferationsverhalten von FaDu-Zellen

Zur Analyse des Proliferationsverhaltens von FaDu-Zellen wurden von jedem Kontroll- und Transfektionsansatz (Kapitel 3.7.2)  $7,5 \times 10^3$  lebende FaDu-Zellen in die entsprechenden Wells ausgesät und deren Proliferation für 85 h in Echtzeit gemessen, wobei alle 15 min eine Messung erfolgte. Diese Proliferationsanalyse wurde dreimal mit jeweils mindestens drei technischen Replikaten durchgeführt. Ausnahme bildet die Analyse des Inhibitors *miR-146a* aufgrund einer nur minimal nachweisbaren *miR-146a* Expression in FaDu-Zellen (Abbildung 42), womit eine Analyse dieses Inhibitors nicht sinnvoll war.



**Abbildung 42: Normalisierte Expression von *miR-146a* und *miR-155* in FaDu-Zellen.** Die Expression wurde mittels quantitativer Real-Time PCR ermittelt und auf die des Referenzgens *RNU48* normalisiert.

Die Real-Time Messung zum Proliferationsverhalten von Mock-FaDu-Zellen und transfizierten FaDu-Zellen ist in der nachfolgenden Abbildung 43 in Form einer exemplarischen Zellindex-Zeit-Kurve und einem Boxplot-Diagramm, welches die Auswertung aller drei durchgeführten Proliferationsanalysen zeigt, dargestellt.

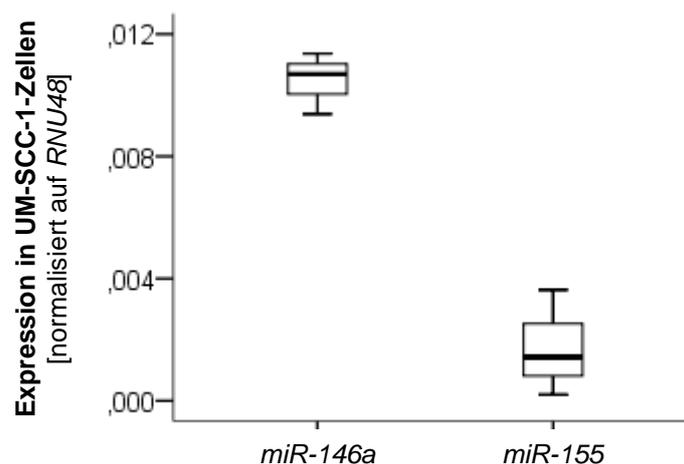


**Abbildung 43: Real-Time Proliferationsanalyse von unterschiedlich behandelten FaDu-Zellen.** Zur Bestimmung der Real-Time Proliferationsfähigkeit von Mock-FaDu-Zellen oder unterschiedlich transfizierten FaDu-Zellen (mit Mimic miR-146a, Mimic miR-155 und Inhibitor miR-155) wurde das xCELLigence System verwendet. Die Aufzeichnung und Auswertung erfolgte mit der RTCA Software 2.0. Gezeigt ist im oberen Diagramm eine exemplarische Zellindex-Zeit-Kurve der verschieden behandelten FaDu-Zellen und im unteren Diagramm die Auswertung aller drei durchgeführten Proliferationsanalysen inklusive mittels Mann-Whitney U-Test berechneter statistischer Signifikanzen (\*\* $p \leq 0,001$ ). Dargestellt ist im Boxplot-Diagramm die Steigung der Proliferationskurven in Prozent, ausgewertet in einem Zeitraum von 48 h innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase, normalisiert auf den Wert der Mock-Zellen.

Die Auswertung der Proliferationsanalyse (Abbildung 43), normalisiert auf den Mock-Ansatz, zeigte, dass sowohl die Mimic *miR-146a* (Median 56,3 %;  $p < 0,001$ ) als auch Mimic *miR-155* (Median 35,3 %;  $p < 0,001$ ) zu einer erniedrigten Proliferationsrate führten, wohingegen der Inhibitor *miR-155* (Median 125,2 %;  $p < 0,001$ ) eine verstärkte Proliferation zur Folge hatte.

#### 4.6.3.2 Bestimmung des Real-Time Proliferationsverhalten von UM-SCC-1-Zellen

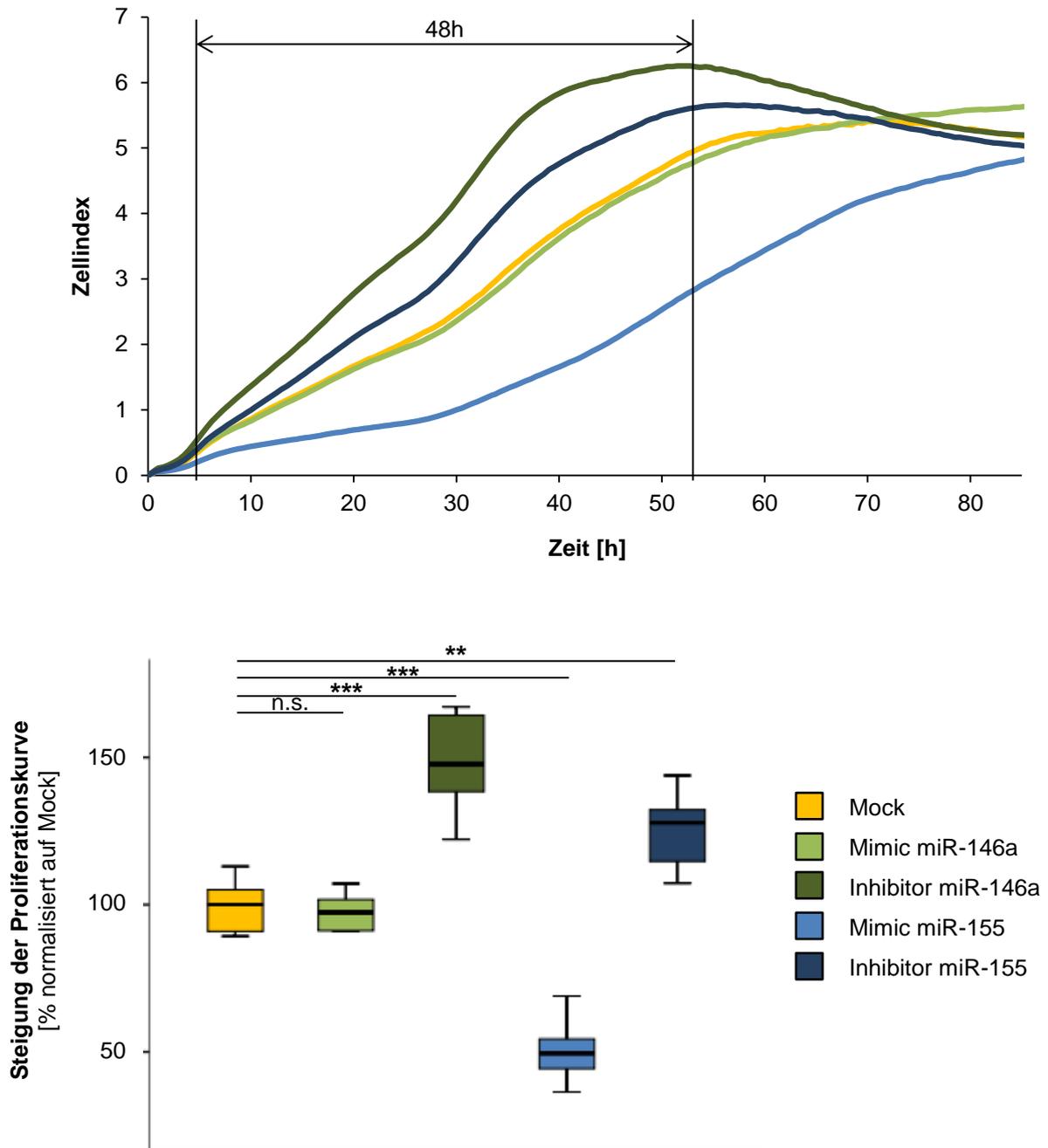
Zur Analyse des Proliferationsverhaltens von UM-SCC-1-Zellen wurden von jedem Kontroll- und Transfektionsansatz (Kapitel 3.7.2)  $1,0 \times 10^4$  lebende UM-SCC-1-Zellen in die entsprechenden Wells ausgesät und deren Proliferation für 85 h in Echtzeit gemessen, wobei alle 15 min eine Messung erfolgte. Diese Proliferationsanalyse wurde dreimal mit jeweils mindestens drei technischen Replikaten durchgeführt. Zuvor wurde die Expression der beiden miRNAs in UM-SCC-1-Zellen überprüft (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Normalisierte Expression von *miR-146a* und *miR-155* in UM-SCC-1-Zellen.** Die Expression wurde mittels Real-Time PCR ermittelt und auf die des Referenzgens *RNU48* normalisiert.

Bei Betrachtung der *miR-146a* und *miR-155* Expression in UM-SCC-1-Zellen zeigte sich, dass *miR-155* verglichen mit *miR-146a* eine deutlich geringere Expressionsrate aufwies (Abbildung 44).

Die nachfolgende Auswertung wurde mit der RTCA Software 2.0 durchgeführt. Die Real-Time Messung zum Proliferationsverhalten von UM-SCC-1-Zellen ist in der nachfolgenden Abbildung 45 in Form einer exemplarischen Zellindex-Zeit-Kurve und einem Boxplot-Diagramm, welches die Auswertung aller drei durchgeführter Proliferationsanalysen zeigt, dargestellt.



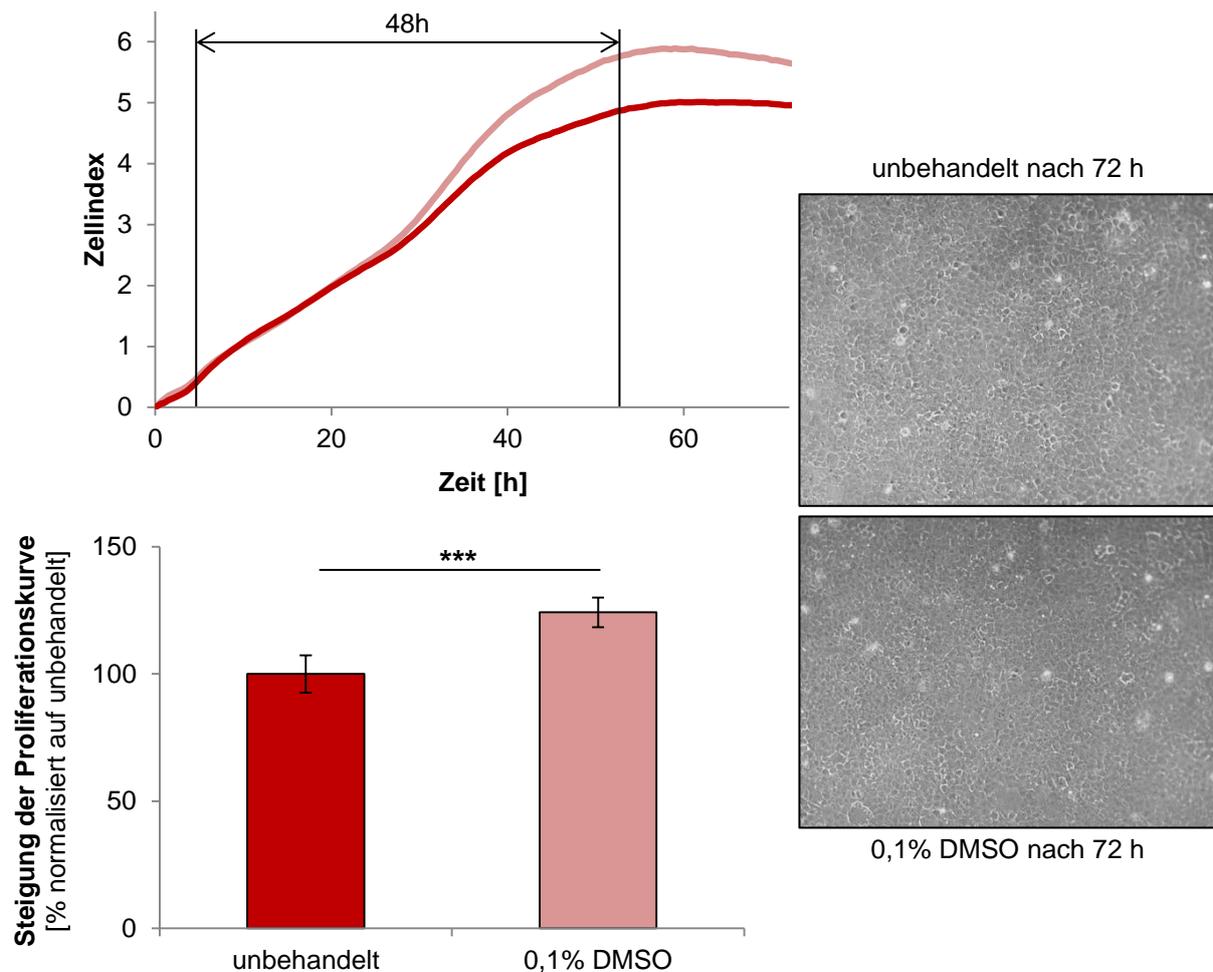
**Abbildung 45: Real-Time Proliferationsanalyse von unterschiedlich behandelten UM-SCC-1-Zellen.** Zur Bestimmung der Real-Time Proliferationsfähigkeit von Mock-UM-SCC-1-Zellen und unterschiedlich transfizierten UM-SCC-1-Zellen (mit Mimic miR-146a, Inhibitor miR-146a, Mimic miR-155 und Inhibitor miR-155) wurde das xCELLigence System verwendet. Die Aufzeichnung und Auswertung erfolgte mit der RTCA Software 2.0. Gezeigt ist im oberen Diagramm eine exemplarische Zellindex-Zeit-Kurve der verschieden behandelten UM-SCC-1-Zellen und im unteren Diagramm die Auswertung aller drei durchgeführten Proliferationsanalysen inklusive mittels Mann-Whitney U-Test berechneter statistischer Signifikanzen (n.s.=nicht signifikant; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Dargestellt ist im Boxplot-Diagramm die Steigung der Proliferationskurven in Prozent, ausgewertet in einem Zeitraum von 48 h innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase, normalisiert auf den Wert der Mock-Zellen.

Die Auswertung der Proliferationsanalyse (Abbildung 45), normalisiert auf den Mock-Ansatz, zeigte, dass die Mimic miR-146a (Median 97,4 %;  $p=0,914$ ) keine Auswirkung auf die Proliferation hat. Sowohl der Inhibitor miR-146a (Median 152,9 %;  $p<0,001$ ) als auch der Inhibitor miR-155 (Median 127,8 %;  $p=0,002$ ) wiesen hingegen eine erhöhte Proliferation auf, während die Mimic miR-155 (Median 49,5 %;  $p<0,001$ ) eine verminderte Proliferation präsentierte.

#### **4.6.3.3 Auswirkungen von DMSO und Aphidicolin auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von humanen Tumorzellen**

Zur Bestimmung möglicher Auswirkungen von 0,1 % DMSO auf die Proliferation von UM-SCC-1-Zellen wurde das Proliferationsverhalten untersucht. Dafür wurden 10.000 lebende UM-SCC-1-Zellen, unbehandelt und behandelt mit 0,1 % DMSO, in die entsprechenden Wells ausgesät und deren Proliferation für 72 h in Real-Time gemessen, wobei alle 15 min eine Messung erfolgte. Die nachfolgende Auswertung wurde mit der RTCA Software 2.0 durchgeführt.

Die Echtzeit-Messung zum Proliferationsverhalten von unbehandelten und mit 0,1% DMSO behandelten UM-SCC-1-Zellen ist in Abbildung 46 in Form einer exemplarischen Zellindex-Zeit-Kurve, einem Säulendiagramm, welches die Auswertung der zwei durchgeführten Proliferationsanalysen jeweils mindestens mit Triplikaten zeigt, und zwei repräsentativen Bildern von unbehandelten und mit 0,1 % DMSO behandelten UM-SCC-1-Zellen nach 72 h dargestellt.

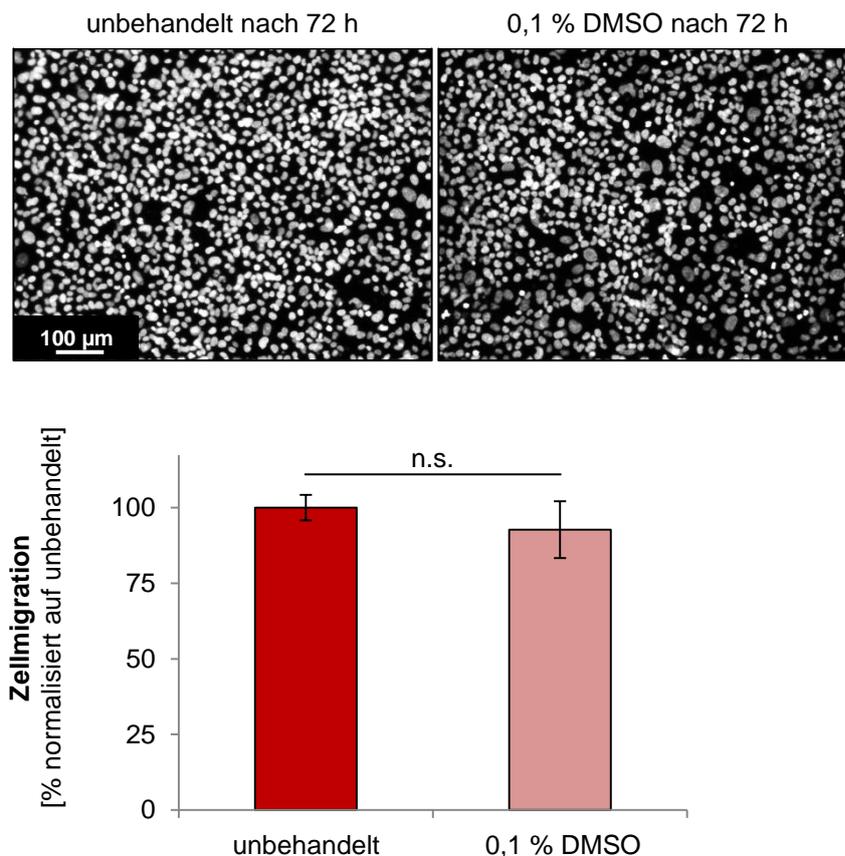


**Abbildung 46: Auswirkung von 0,1 % DMSO auf die Proliferation von UM-SCC-1-Zellen.** Zur Bestimmung möglicher Effekte von DMSO auf die Proliferation von humanen Tumorzellen wurden unbehandelte und mit 0,1 % DMSO behandelte UM-SCC-1-Zellen auf ihre Proliferationsfähigkeit mit Hilfe des xCELLigence Systems untersucht. Die Aufzeichnung und Auswertung erfolgte mit der RTCA Software 2.0. Gezeigt ist im oberen Diagramm eine exemplarische Zellindex-Zeit-Kurve der verschiedenen behandelten UM-SCC-1-Zellen, im unteren Diagramm die Auswertung der zwei durchgeführten Proliferationsanalysen inklusive mittels T-Test berechneter statistischer Signifikanz ( $***p \leq 0,001$ ) und zwei repräsentative Zellkulturbilder, aufgenommen im 10x Objektiv, nach 72 h Behandlung.

Die Auswertung der Proliferationsanalyse (Abbildung 46), normalisiert auf den Ansatz mit unbehandelten Zellen, zeigte, dass 0,1 % DMSO die Zellproliferation nicht negativ beeinflusst, sondern diese sogar noch um durchschnittlich 23,4 % (T-Test  $p < 0,001$ ) steigert. Somit konnte DMSO problemlos als Lösungsmittel für Aphidicolin in weiteren Versuchen genutzt werden.

Darüber hinaus wurde zur Bestimmung möglicher Auswirkungen von 0,1 % DMSO auf die Migration von UM-SCC-1-Zellen das Migrationsverhalten untersucht. Dafür wurden jeweils im Dreifachansatz  $5,0 \times 10^4$  lebende UM-SCC-1-Zellen unbehandelt und behandelt mit 0,1 %

DMSO im Migrationsassay (n=2) für 72 h eingesetzt (Abbildung 47). Um den Zellen einen Migrationsanreiz zu bieten, wurde ein Gradient von 1 % FCS im Insert zu 10 % FCS im Well verwendet. Nach der Zugabe der Zellen erfolgte eine Inkubation für 72 h bei 37 °C mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung. Anschließend wurden die migrierten, an der Membran haftenden Zellen gewaschen, mit -20 °C kaltem Methanol fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Detektion und Auswertung der migrierten Zellen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Software NIS Elements AR 3.0.

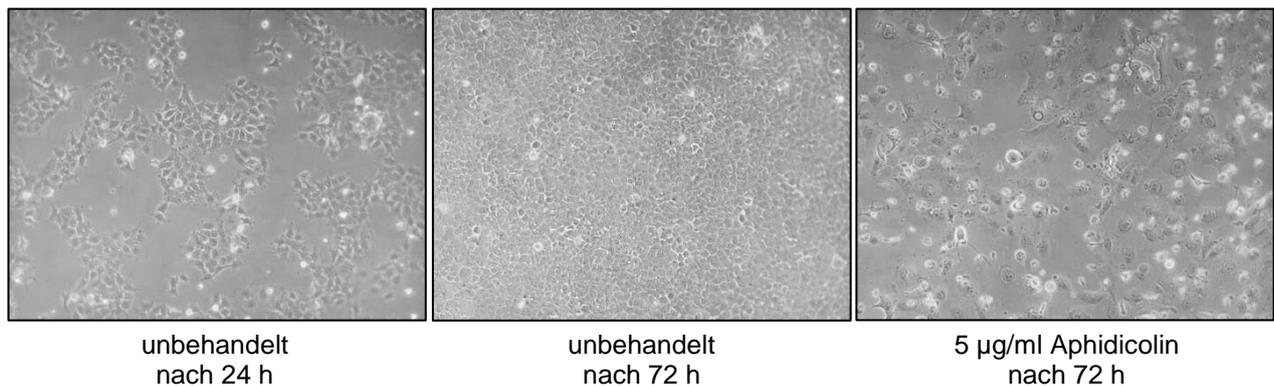
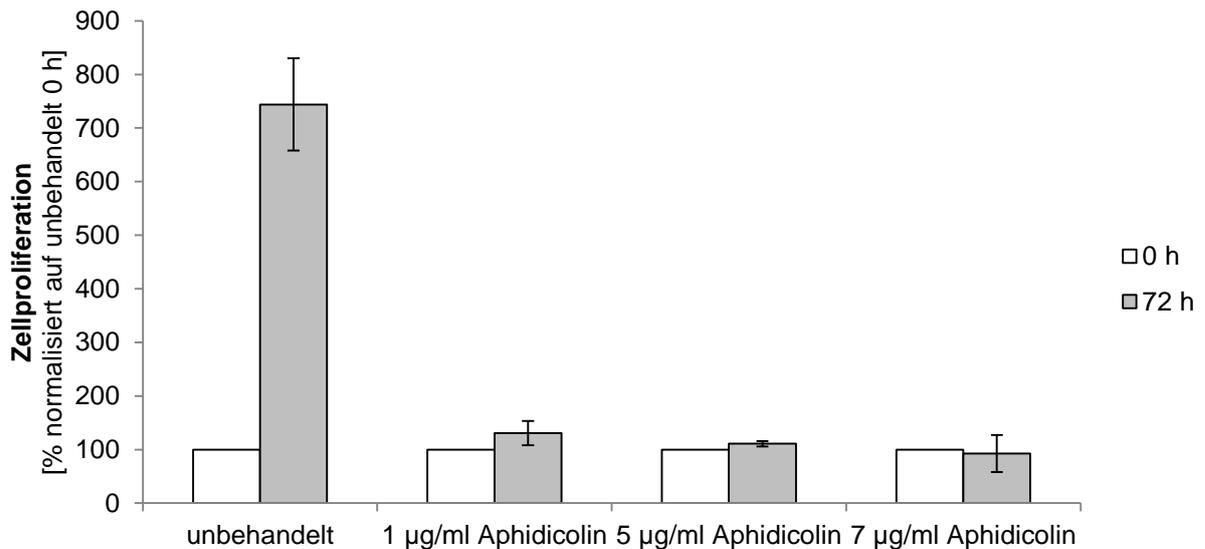


**Abbildung 47: Einsatz von DMSO zur Migrationsanalyse.** Zur Bestimmung von möglichen DMSO-verursachten Effekten auf die Migrationsfähigkeit von UM-SCC-1-Zellen wurde das FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System verwendet. Die Detektion und Auswertung der migrierten, mit DAPI gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Software NIS Elements AR 3.0. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild nach 72 h und die Migration in Prozent, normalisiert auf den Wert der unbehandelten Zellen inklusive mittels T-Test berechneter statistischer Signifikanz (n.s.=nicht signifikant).

Die Auswertung der Migrationsanalyse (Abbildung 47) ergab, dass zwischen den unbehandelten Zellen (Mittelwert 100,0 %±4,2 %) und den DMSO-behandelten Zellen (Mittelwert 92,8 %±9,4 %) kein signifikanter Unterschied ( $p=0,08$ ) in der Migration besteht,

sodass DMSO als Lösungsmittel für Aphidicolin auch in den nachfolgenden Migrationsversuchen eingesetzt werden kann.

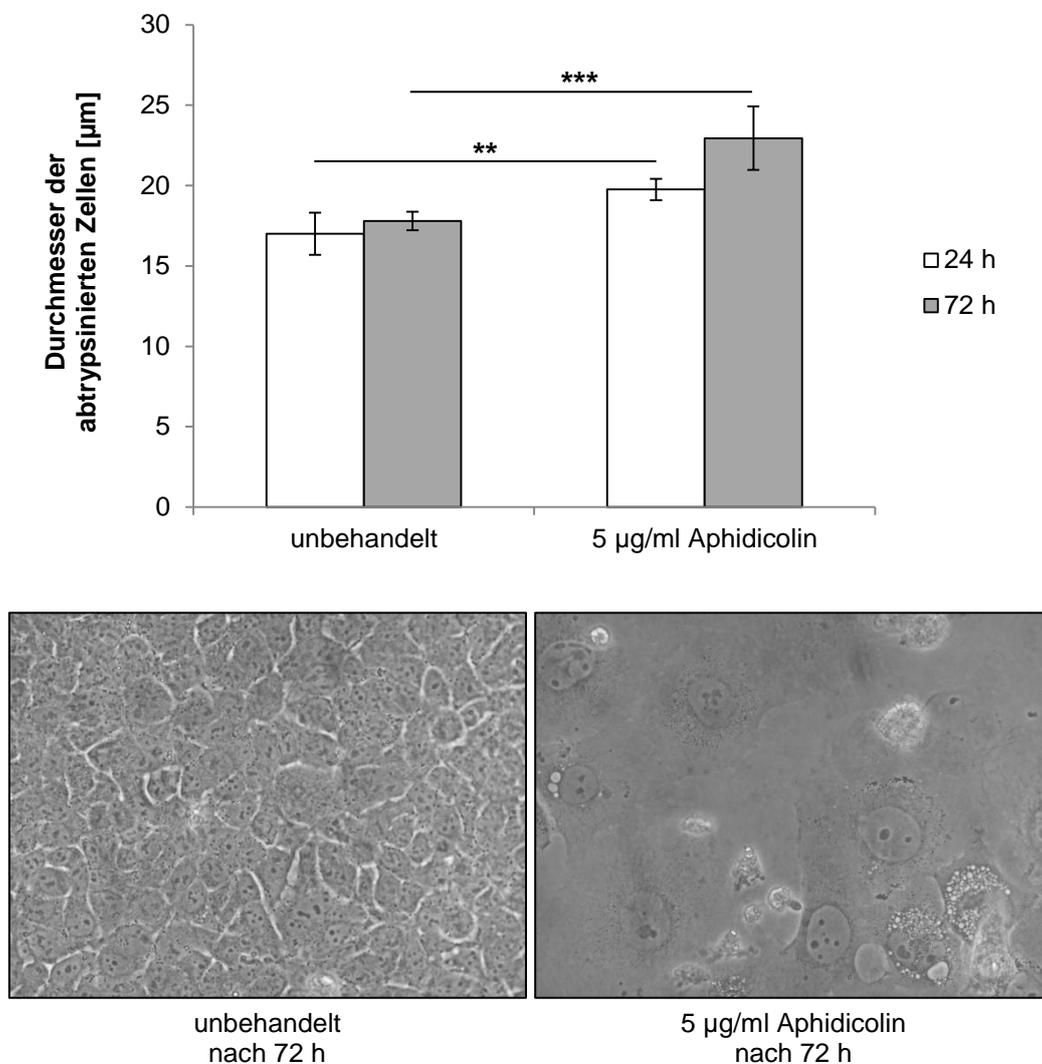
Zur Bestimmung der in späteren Versuchen zum Einsatz kommenden Aphidicolin-Konzentration, die die Zellproliferation komplett hemmt, wurde eine Testreihe mit verschiedenen Konzentrationen (1 µg/ml, 5 µg/ml und 7 µg/ml) durchgeführt. Für die Testreihe wurden je Ansatz  $2,5 \times 10^5$  lebende UM-SCC-1-Zellen ausgesät und nach 72 h erneut deren Zellzahl bestimmt (Abbildung 48).



**Abbildung 48: Aphidicolin als Proliferationshemmer in UM-SCC-1-Zellen.** Zur Bestimmung der Aphidicolin-Konzentration zur Hemmung der Proliferation in humanen Tumorzellen wurden UM-SCC-1-Zellen mit 1 µg/ml, 5 µg/ml und 7 µg/ml Aphidicolin für 72 h inkubiert. Für jeden Ansatz wurden  $2,5 \times 10^5$  lebende UM-SCC-1-Zellen ausgesät und nach 72 h jeweils die Zellzahl und deren Vitalität bestimmt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild von unbehandelten Zellen nach 24 h und 72 h und von Zellen mit 5 µg/ml Aphidicolin, aufgenommen im 10x Objektiv, und die Zellzahl von lebenden UM-SCC-1-Zellen in Prozent, normalisiert auf den Wert der unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt 0 h.

Unbehandelte UM-SCC-1-Zellen wiesen innerhalb von 72 h eine Zellproliferation von  $744,0 \pm 86,0 \%$  normalisiert auf den Wert von unbehandelten UM-SCC-1-Zellen zum Zeitpunkt 0 h (100 %) auf (Abbildung 48). Eine Zugabe von Aphidicolin hemmte in allen Ansätzen deutlich die Proliferation von UM-SCC-1-Zellen. Während eine Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  nach 72 h mit  $130,0 \pm 22,8 \%$  noch eine leichte Proliferation zulässt, erscheint eine Aphidicolin-Konzentration von  $7 \mu\text{g/ml}$  nach 72 h mit  $92,4 \pm 34,6 \%$  schon zu hoch. Daher wird in den nachfolgenden Migrationsversuchen, um vorhandene Proliferationseffekte zu unterdrücken, Aphidicolin in einer Konzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt.

Eine morphologische Betrachtung der Zellen zeigte eine deutliche Vergrößerung der mit Aphidicolin behandelten Zellen. Daher wurde mit Hilfe eines automatischen Zellzählgeräts die durchschnittliche Größe der unbehandelten und mit Aphidicolin behandelten UM-SCC-1-Zellen ermittelt (Abbildung 49).

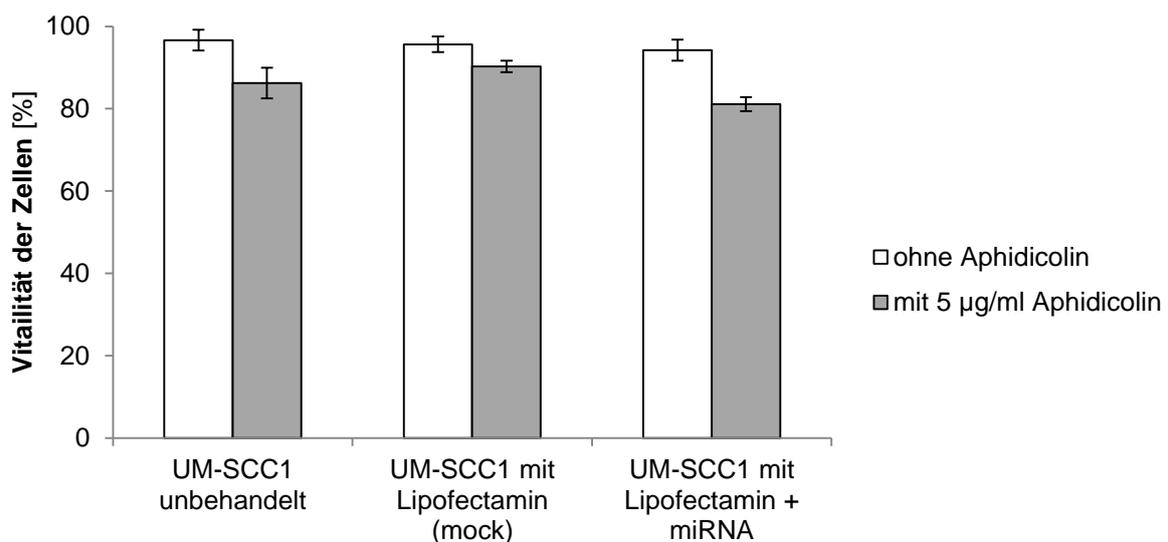


**Abbildung 49: Auswirkung von Aphidicolin auf die Zellgröße.** Das Säulendiagramm stellt die durchschnittliche Größe der abtrypsinierten, unbehandelten und mit Aphidicolin behandelten UM-SCC-1-Zellen inklusive mittels T-Test berechneter statistischer Signifikanz (\*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ) dar. Zudem ist je ein repräsentatives Zellkulturbild, aufgenommen im 40x Objektiv, zu sehen.

Die Verwendung von Aphidicolin führt, rein morphologisch betrachtet (Abbildung 49), zu einer Aufblähung/Vergrößerung der UM-SCC-1-Zellen. Die Vermessung der abtrypsinierten Zellen ergab einen signifikanten Größenunterschied zwischen unbehandelten und mit Aphidicolin behandelten Zellen nach 24 h ( $p=0,003$ ) und nach 72 h ( $p<0,001$ ).

Aufgrund der Volumenzunahme der mit Aphidicolin behandelten Zellen war eine zusätzliche Analyse der Proliferationsfähigkeit von UM-SCC-1-Zellen in Kombination mit Aphidicolin mittels des xCELLigence Systems nicht möglich, da eine morphologische Vergrößerung der Zellen, ebenfalls wie die Zellproliferation, die Impedanz erhöht und somit irrtümlich als Proliferation gemessen würde.

Darüber hinaus wurde die Auswirkung von Aphidicolin auf die Vitalität von unbehandelten UM-SCC-1-Zellen, Mock-UM-SCC-1-Zellen und transfizierten UM-SCC-1-Zellen nach 96 h bestimmt (Abbildung 50).



**Abbildung 50: Auswirkung von Aphidicolin auf die Vitalität von unbehandelten UM-SCC-1-Zellen, Mock-UM-SCC-1-Zellen und transfizierten UM-SCC-1-Zellen nach 96 h.** Zur Bestimmung der Vitalität von unterschiedlich behandelten UM-SCC-1-Zellen wurden diese 96 h nach der Behandlung mit Trypanblau (1:2) angefärbt und deren Vitalität mit Hilfe des automatischen Zellzählgerätes bestimmt.

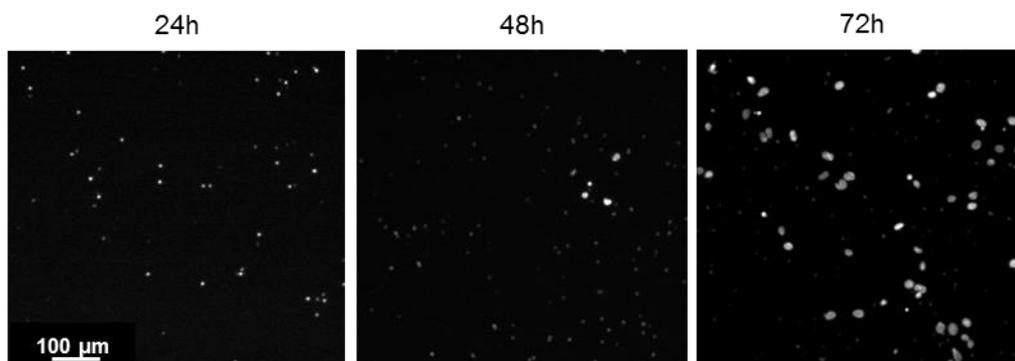
Sowohl die unbehandelten UM-SCC-1-Zellen, Mock-UM-SCC-1-Zellen als auch die transfizierten UM-SCC-1-Zellen sind 96 h nach der Transfektion mit gemittelten Werten von 96,7 % $\pm$ 2,5 %, 95,7 % $\pm$ 1,9 % bzw. 94,2 % $\pm$ 2,5 % noch sehr vital, während die Zugabe von 5 µg/ml Aphidicolin zum Zeitpunkt 24 h nach der Transfektion die Vitalität der UM-SCC-1-Zellen 96 h nach der Transfektion zu Werten von 86,2 % $\pm$ 3,75 %, 90,3 % $\pm$ 1,4 % bzw. 81,1 % $\pm$ 1,7 % verringert.

#### 4.6.4 Analyse der Migrationsfähigkeit von humanen Tumorzellen

Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit (Kapitel 3.7.4) von humanen HNSCC-Zellen (FaDu-Zellen und UM-SCC-1-Zellen) wurde das FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System verwendet. Da in Kapitel 4.6.3 bereits gezeigt werden konnte, dass die transfizierten Zellen unterschiedliche Effekte auf die Proliferation hatten, wurde zur Analyse des Migrationsverhaltens der Proliferationshemmer Aphidicolin eingesetzt, um reine Migrationseffekte messen zu können.

##### 4.6.4.1 Bestimmung des Migrationsverhaltens von FaDu-Zellen

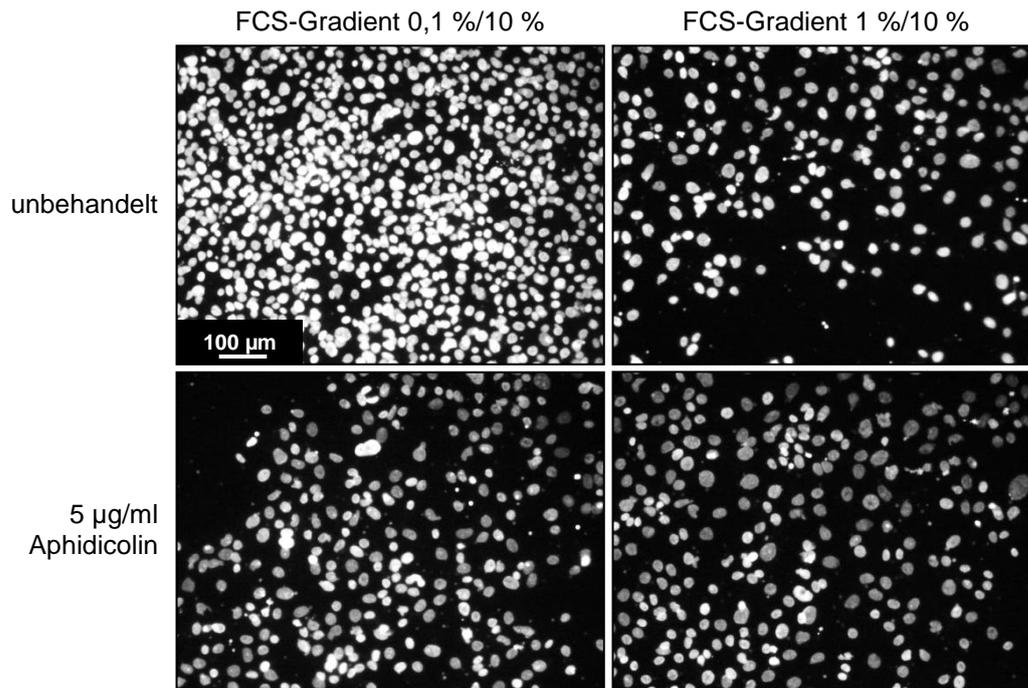
Zur Ermittlung des Endpunktes, an dem die unbehandelten FaDu-Zellen eine ausreichende Migration zeigen, um sowohl eine mögliche verminderte als auch eine gesteigerte Migration bei transfizierten FaDu-Zellen zu beobachten, wurde im Vorfeld eine Migrationsanalyse mit  $2,5 \times 10^4$  lebenden, unbehandelten FaDu-Zellen im FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System nach verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) durchgeführt (Abbildung 51).



**Abbildung 51: Endpunktbestimmung zur Analyse der Migrationsfähigkeit von unbehandelten FaDu-Zellen.** Zur Ermittlung des Endpunktes, an dem die unbehandelten FaDu-Zellen ( $2,5 \times 10^4$ ) eine ausreichende Migration zeigen, um in nachfolgenden Versuchen verminderte und gesteigerte Migrationseffekte messen zu können, wurde eine Testreihe durchgeführt, wofür das FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System verwendet wurde. Die Detektion und Auswertung der migrierten, mit DAPI gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Software NIS Elements AR 3.0. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild nach 24 h, nach 48 h und nach 72 h.

Bei  $2,5 \times 10^4$  eingesetzten FaDu-Zellen zeigte sich nach 24 h und 48 h noch keine ausreichende Migration (Abbildung 51), um eine mögliche verminderte oder gesteigerte Migration bei nachfolgenden Transfektionsversuchen zu detektieren. Nach 72 h hingegen war die Migration der FaDu-Zellen ausreichend, könnte jedoch noch etwas stärker ausfallen, um eine verminderte Migration deutlicher detektieren zu können. Bezüglich dieser

Ergebnisse wurde der Endpunkt für weitere Versuche auf 72 h festgelegt, jedoch wurde in einer weiteren Testreihe die Anzahl auf  $5,0 \times 10^4$  lebende FaDu-Zellen erhöht und zudem ein Gradient von 0,1 % zu 10 % FCS getestet. Zusätzlich wurde der Proliferationshemmer Aphidicolin in dieser Testreihe untersucht, um in den nachfolgenden Versuchen reine Migrationseffekte zu messen und mögliche Effekte durch Proliferation zu inhibieren (Abbildung 52).

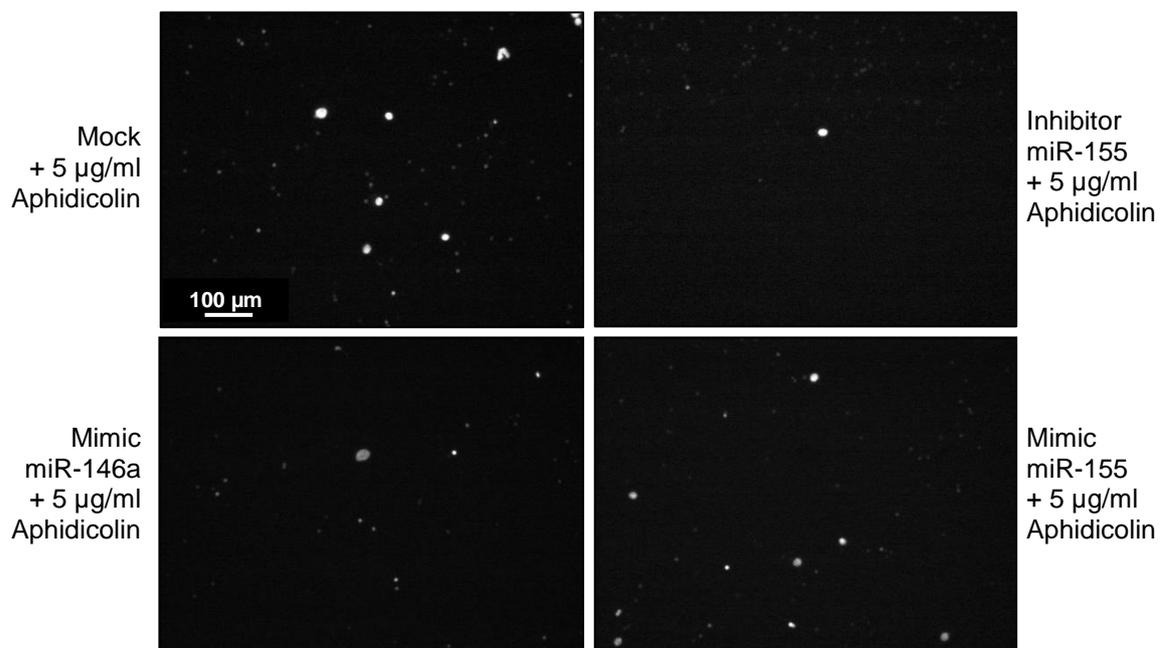


**Abbildung 52: Bestimmung des FCS-Gradienten zur Analyse der Migrationsfähigkeit von unbehandelten FaDu-Zellen.** Zur Ermittlung des FCS-Gradienten, an dem die unbehandelten FaDu-Zellen nach 72 h eine ausreichende Migration zeigen, um in nachfolgenden Versuchen verminderte und gesteigerte Migrationseffekte messen zu können, wurde eine Testreihe durchgeführt, wofür das FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System verwendet wurde. Die Detektion und Auswertung der migrierten, mit DAPI gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Software NIS Elements AR 3.0. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild nach 72 h mit und ohne 5 µg/ml Aphidicolin und FCS-Gradienten von 0,1 %/10 % und 1 %/10 %.

Unabhängig des verwendeten FCS-Gradienten (0,1 %/10 % oder 1 %/10 %) zeigte sich bei  $5,0 \times 10^4$  eingesetzten FaDu-Zellen und einer Zugabe von 5 µg/ml Aphidicolin nach 72 h eine ausreichende Migration, um sowohl mögliche verminderte als auch gesteigerte Migration bei nachfolgenden Transfektionsversuchen zu detektieren (Abbildung 52). Um in den nachfolgenden Versuchen zur Analyse der Migrationsfähigkeit von FaDu-Zellen optimale Ergebnisse erzielen zu können, wurde der Endpunkt 72 h, die Lebend-Zellzahl  $5,0 \times 10^4$ , der Gradient 1 %/10 % FCS und die Konzentration 5 µg/ml Aphidicolin gewählt.

Zur Analyse des Migrationsverhaltens von Mock-FaDu-Zellen und mit Mimic miR-146a, Mimic miR-155 oder Inhibitor miR-155 transfizierten FaDu-Zellen wurden jeweils  $5,0 \times 10^4$  lebende Zellen pro Well ausgesät ( $n=3$  mit je drei technischen Replikaten). Der Inhibitor miR-146a wurde in diesem Versuchsteil, wie schon in Kapitel 4.6.2.1 beschrieben, aufgrund einer nur minimal nachweisbaren *miR-146a* Expression in FaDu-Zellen, nicht untersucht.

In allen drei durchgeführten Migrationsanalysen mit Mock-FaDu-Zellen und transfizierten FaDu-Zellen in Kombination mit  $5 \mu\text{g/ml}$  Aphidicolin konnte keine ausreichende Migration beobachtet werden, um in weiterführenden Untersuchungen mögliche Effekte entsprechender miRNAs zu analysieren. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 53 dargestellt.

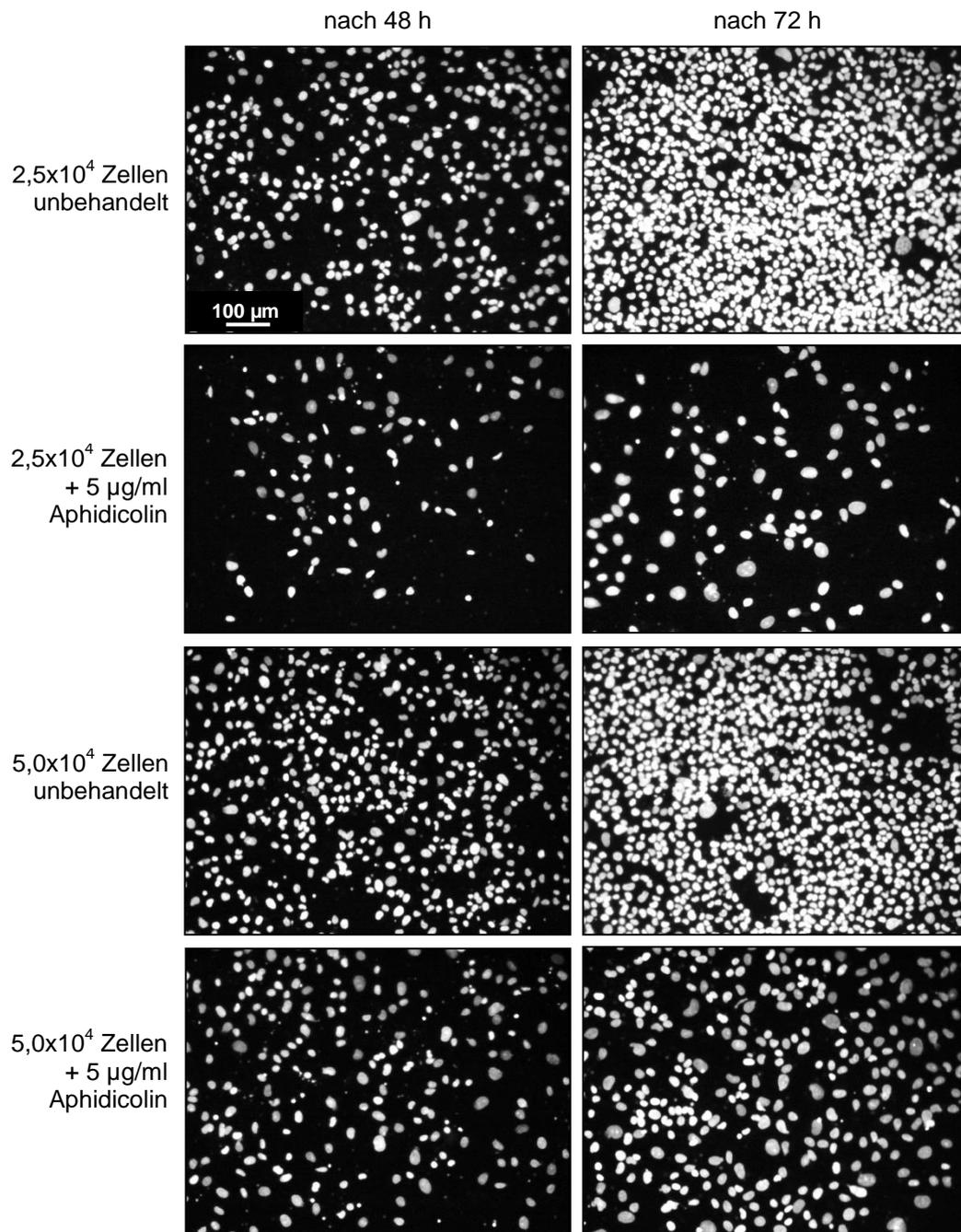


**Abbildung 53: Migrationsanalyse von unterschiedlich behandelten FaDu-Zellen nach 72 h.** Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von Mock-FaDu-Zellen und transfizierten FaDu-Zellen (Mimic miR-146a, miR-155 Mimic und Inhibitor miR-155) in Kombination mit  $5 \mu\text{g/ml}$  Aphidicolin wurde das FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System verwendet. Die Detektion und Auswertung der migrierten, mit DAPI gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Software NIS Elements AR 3.0. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild nach 72 h.

#### 4.6.4.2 Bestimmung des Migrationsverhaltens von UM-SCC-1-Zellen

Zur Ermittlung des Endpunktes und der Zellzahl, an dem die UM-SCC-1-Zellen eine ausreichende Migration zeigen, um eine mögliche verminderte als auch eine gesteigerte Migration bei transfizierten UM-SCC-1-Zellen zu beobachten, wurde in einer Testreihe die Migration von unbehandelten bzw. mit Aphidicolin-behandelten Tumorzellen im FluoroBlok™

Cell Culture Insert-System nach verschiedenen Zeitpunkten (48 h und 72 h) und mit verschiedenen Zellzahlen ( $2,5 \times 10^4$  und  $5,0 \times 10^4$ ) untersucht (Abbildung 54).

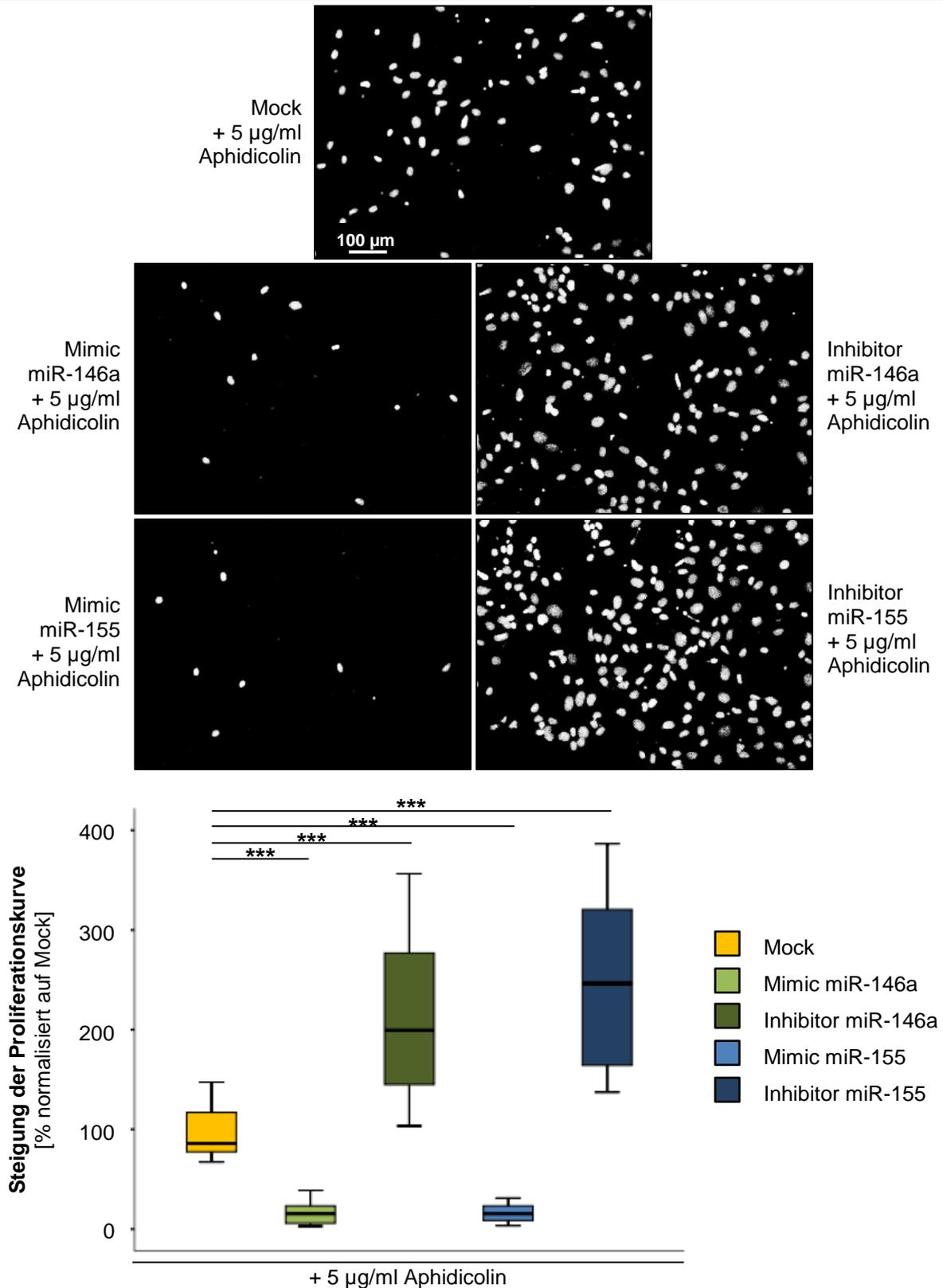


**Abbildung 54: Testreihe zur Migrationsanalyse von unterschiedlich behandelten UM-SCC-1-Zellen.** Zur Bestimmung des Endpunktes und der Zellzahl zur Analyse der Migrationsfähigkeit von UM-SCC-1-Zellen wurde das FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System verwendet. Die Detektion und Auswertung der migrierten, mit DAPI gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Software NIS Elements AR 3.0. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild sowohl nach 48 h als auch nach 72 h mit verschiedenen Zellzahlen mit und ohne Aphidicolinbehandlung.

Anhand der durchgeführten Testreihe (Abbildung 54) wurden für die nachfolgenden Versuche zur Analyse der Migrationsfähigkeit  $5,0 \times 10^4$  lebende UM-SCC-1-Zellen in Kombination mit dem Proliferationshemmer Aphidicolin (5  $\mu\text{g/ml}$ ) mit dem Endpunkt 72 h ausgewählt, um sowohl eine mögliche verminderte als auch gesteigerte Migration bei den nachfolgenden Transfektionsversuchen detektieren zu können.

Hierzu wurden Mock-UM-SCC-1-Zellen und mit Mimic miR-146a, Inhibitor miR-146a, Mimic miR-155 oder Inhibitor miR-155 transfizierte UM-SCC-1-Zellen (n=3 mit je drei technischen Replikaten) mit Aphidicolin behandelt, um die Proliferation zu unterdrücken und reine Migrationseffekte messen zu können (Abbildung 55).

Die abschließende Auswertung der Migrationsanalyse (Abbildung 55) ergab, dass die beiden Mimics für miR-146a (Median 15,5 %;  $p < 0,001$ ) und miR-155 (Median 15,5 %;  $p < 0,001$ ) verglichen mit Mock-Zellen eine erniedrigte Migration zeigten, während die beiden Inhibitoren dieser miRNAs (Median 199,4 %;  $p < 0,001$  bzw. 246,3 %;  $p < 0,001$ ) die Migration förderten.



**Abbildung 55: Migrationsanalyse von unterschiedlich behandelten UM-SCC-1-Zellen nach 72 h.** Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von Mock-UM-SCC-1-Zellen und transfizierten UM-SCC-1-Zellen (mit Mimic miR-146a, Inhibitor miR-146a, Mimic miR-155 und Inhibitor miR-155) wurde das FluoroBlok™ Cell Culture Insert-System verwendet. Die Detektion und Auswertung der migrierten, mit DAPI gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Software NIS Elements AR 3.0. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild und die Migration in Prozent, normalisiert auf den Mock-Wert inklusive mittels Mann-Whitney U-Test berechneter statistischer Signifikanzen (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ).

## 5. Diskussion

### 5.1 Patientenkollektiv

Das Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region gehört weltweit zu den häufigsten Tumorerkrankungen mit einer 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten von etwa 50 % (Berghaus *et al.*, 1996; Jemal *et al.*, 2011). Diese 5-Jahres-Überlebensrate hat sich in den letzten Jahren trotz verschiedenster Therapieansätze nicht signifikant verbessert und lässt sich primär auf das fortgeschrittene Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose zurückführen. Umso wichtiger ist eine Identifizierung von Markern, die eine Früherkennung dieser Erkrankung und eine individualisierte Prognose- und Therapieeinschätzung für den einzelnen Patienten ermöglichen.

Der typische Patient mit einem Risiko für ein Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region ist ein Mann im fortgeschrittenen Alter mit erhöhtem Tabak- und Alkoholkonsum, wobei zwischen diesen beiden Faktoren ein multiplikativer Effekt besteht. Diese Risikogruppe macht etwa 75 % der HNSCC-Fälle aus (Blot *et al.*, 1988; Blot *et al.*, 1996; Hashibe *et al.*, 2009; Lewin *et al.*, 1988; Tuyns *et al.*, 1988; Wynder & Bross, 1957). Eine weitere Ursache stellt eine HPV-Infektion dar, die zu etwa 25 % der HNSCC-Fälle führt (Mork *et al.*, 2001). Der Erkrankungsgipfel liegt bei 50-70 Jahren (Berghaus *et al.*, 1996), wobei das Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen unter HNSCC-Patienten je nach Literaturangabe 7:1 (Wittekind *et al.*, 2001) bzw. 3:1 für die Lokalisation Mundhöhle, 5:1 bis 9:1 für die Lokalisation Larynx und 8:1 für die Lokalisation Hypopharynx beträgt. Das durchschnittliche Alter der in dieser Arbeit untersuchten Patienten beträgt 63 Jahre mit der höchsten Erkrankungsrate bei Patienten in der Altersgruppe 60- bis 69-Jährige, gefolgt von der Altersgruppe der 50- bis 59-Jährigen. Die Geschlechterverteilung zwischen Männern und Frauen liegt in dieser Arbeit bei 6:1. Somit spiegelt das in der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Patientenkollektiv die aus der Literatur bekannten Daten hinsichtlich des Erkrankungsalters und der Geschlechterverteilung wider.

Betrachtet man den Tabak- und Alkoholkonsum der untersuchten Patienten, so gaben etwa 64 % einen gegenwärtigen oder vergangenen Tabakkonsum an, während sich die restlichen Patienten als Nichtraucher (25 %) bezeichneten oder keine Angaben (11 %) machten. Hinsichtlich des Alkoholkonsums machten 26 % der Patienten keine Angaben, während 41 % der Patienten einen aktuellen oder ehemaligen Alkoholmissbrauch und 33 % einen sozialen Alkoholkonsum angaben. Diese Angaben beruhen jedoch ausschließlich auf der freiwilligen Aussage der Patienten und müssen daher kritisch betrachtet werden, wenngleich sie der gängigen Literaturdatenlage entsprechen (Llewellyn *et al.*, 2003). Zu bemerken ist jedoch, dass es sich in dieser Arbeit um eine reine Aufstellung der Patientendaten handelt

und ein weiterer Zusammenhang zwischen den Risikofaktoren und der Tumorentstehung nicht näher untersucht wurde.

Die Tumorlokalisationen verteilten sich in dieser Arbeit in etwa 17 % auf die Mundhöhle, in 34 % auf den Oropharynx, in 28 % auf den Larynx und in 6 % auf den Hypopharynx. In ca. 17 % der Tumoren waren bereits mehrere Lokalisationen betroffen und konnten daher primär keiner Gruppe zugeordnet werden. Diese Daten bestätigen die der Literatur mit Zahlen wie 59 % der vorkommenden HNSCCs in Mundhöhle und Rachen, 24 % Larynxkarzinome und 2-8 % Hypopharynxkarzinome (Berghaus *et al.*, 1996). Darüber hinaus fallen die 5-Jahres-Überlebensraten für die betroffenen Patienten entsprechend der jeweiligen Tumorlokalisation und Ausdehnung sehr unterschiedlich aus. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit relativ kleinen Mundhöhlenkarzinomen 70 %, während die von Patienten mit größeren Tumoren einschließlich Lymphknotenmetastasen bereits bei nur noch 20 % liegt. Auch Patienten mit einem kleinen Oropharynxkarzinom weisen eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 60 % nach maximaler chirurgischer Therapie und Bestrahlung auf, die jedoch auf unter 20 % sinkt, sobald es zur Infiltration des Zungengrundes oder der übrigen Nachbarregionen kommt. Demgegenüber weisen Patienten mit einem Hypopharynxkarzinom generell eine schlechte Prognose von nur 20-30 % auf, da sie zum Zeitpunkt der Diagnose bereits relativ groß und häufig bereits metastasiert sind. Die günstigste Prognose haben dahingegen Larynxkarzinome. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt sowohl bei Patienten mit einem kleinen glottischen oder supraglottischen T1-Tumor mehr als 90 %. Patienten mit einem glottischen bzw. supraglottischen T4-Tumor weisen 5-Jahres-Überlebensraten von weniger als 50 % bzw. 33 % auf (Berghaus *et al.*, 1996).

Angesichts dieser ungünstigen Prognosen ist eine Identifizierung von Markern, die eine Früherkennung dieser Erkrankung und eine verbesserte Prognose- und Therapieeinschätzung für den einzelnen Patienten ermöglichen, unumgänglich. Beispielsweise besitzt eine Untersuchung im Vollblut von HNSCC-Patienten ein enormes Potenzial für diagnostische und prognostische Zwecke, da die kontinuierliche Interaktion zwischen Blutzellen und dem gesamten Körper die Möglichkeit eröffnet, dass Veränderungen, die in Verbindung mit Verletzungen oder Krankheiten in Zellen auftreten, spezifische Veränderungen in der Genexpression in Blutzellen auslösen, die den einleitenden Stimulus reflektieren. Daher wurde in dieser Arbeit das miRNome im Vollblut von HNSCC-Patienten auf mögliche prognostische Marker untersucht. Eine Diskussion dieser Ergebnisse folgt im Anschluss an die kritischen Anmerkungen zum Untersuchungskollektiv in Kapitel 5.2 und der in Kapitel 5.3 diskutierten Untersuchung des p16-Status.

## 5.2 Kritische Anmerkungen zum Untersuchungskollektiv

### 5.2.1 Heterogenität des Gewebes

In dieser Arbeit wurde sowohl für die Untersuchung des p16-Status als auch für die miRNA-Analysen im Gewebe FFPE-Tumormaterial verwendet. Generell ist die Verfügbarkeit von Tumormaterial sehr begrenzt. Nur wenn ausreichend Tumormaterial vorhanden ist, welches der Pathologe nicht komplett zur Diagnosesicherung benötigt und nur unter der Voraussetzung, dass der Patient schriftlich in die Verwendung von Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke eingewilligt hat, kann dieses dafür genutzt werden.

Zur Feststellung des realen Tumoranteils in den zu untersuchenden Gewebeproben wurde vor den geplanten Untersuchungen von jeder Probe eine HE-Färbung zur histopathologischen Beurteilung angefertigt und die jeweiligen Tumorareale anhand der HE-Färbung durch Frau Dr. Andrea Hasenfus (Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes) markiert.

Unter den oben genannten Voraussetzungen konnten in dieser Arbeit 88 Tumorproben hinsichtlich ihres p16-Status analysiert werden. Die Voraussetzungen der Tumorgewebeproben für eine miRNA-Analyse waren jedoch deutlich anspruchsvoller. Trotz der Heterogenität des Gewebes musste ein Tumoranteil von über 80 % gegeben sein, um die Expression der analysierten miRNA-kodierenden Gene der Tumorzellen nachzuweisen. Um dies zu gewährleisten, wurden anhand der HE-Färbung nur die markierten tumorhaltigen Areale aus den jeweiligen Paraffinschnitten separiert und daraus die RNA inklusive miRNA isoliert. Aufgrund dieser Bedingung war ein Großteil der FFPE-Tumorproben nicht für die folgenden miRNA-Analysen geeignet. So war entweder die Größe des Gewebepreparats für eine adäquate Isolierung nicht ausreichend oder ein Tumorgehalt von über 80 % konnte aufgrund der Heterogenität des Gewebes nicht sichergestellt werden, da oftmals zu viele andere Zelltypen wie Entzündungszellen oder Stromazellen im Präparat enthalten waren, die zum Ausschluss der Gewebeprobe führten. Angesichts dieser Limitierungen konnten letztlich 30 Tumorproben von 29 Patienten in die folgenden miRNA-Untersuchungen eingeschlossen werden.

Ein weiteres Problem stellte die Verfügbarkeit von unauffälligem Kontrollgewebe dar, das als Referenz zu untersuchenden Tumorgewebe benötigt wurde. Eingeschlossen wurden hierbei das Plattenepithel von Tonsillen, die im Rahmen einer Tonsillektomie komplett entfernt wurden, und das Plattenepithel von Uvulagewebeproben, die im Rahmen einer Uvulakürzung gewonnen wurden. Um ein zum Tumorgewebe vergleichbares Kontrollgewebe zu erhalten, musste ausschließlich die extrem dünne Plattenepithelschicht der Proben separiert werden, um nur von dieser Epithelschicht die RNA inklusive miRNA zu isolieren. Da

es aufgrund dieser Voraussetzungen extrem erschwert war eine ausreichende Anzahl an Tumor- und Kontrollgewebeproben in die miRNA-Analyse einschließen zu können, wurde in diesem Versuchsteil auf ein alters- und geschlechtsgepaartes Kollektiv verzichtet.

Die oben beschriebene Heterogenität des Gewebes wurde gerade in den miRNA-Analysen an Abstrichmaterial von HNSCC-Patienten deutlich. Aufgrund der unterschiedlichen, im Präparat enthaltenen Zelltypen und der zu vermutenden fehlenden zahlenmäßigen Dominanz der Tumorzellen im Präparat war keine stabile Expression der endogenen Kontrolle und somit generell keine Auswertung der miRNA-Untersuchung an Abstrichmaterial von HNSCC-Patienten möglich.

Die Heterogenität der Ausgangsgewebe zeigte sich auch bei der Charakterisierung der Zelllinien FaDu und UM-SCC-1. Beide besitzen hoch komplexe Karyotypen mit für Plattenepithelkarzinome typischen Gewinnen auf 3q, 5p, 8q, 11q und Verlusten auf 4, 18q und 21q (Bockmühl, 1998). Jedoch unterscheiden sich beide Zelllinien sowohl in ihrem Karyotyp als auch im Hinblick auf die unterschiedlichen genetischen Veränderungen im CGH-Summenprofil vermutlich aufgrund eventueller sekundärer Veränderungen oder der verschiedenen Lokalisation des Primärtumors. Während die Zelllinie FaDu ihren Ursprung in einem Primärtumor des Hypopharynx hat, wurde die Zelllinie UM-SCC-1 aus einem Mundhöhlenkarzinom etabliert. Basierend auf diesen Ergebnissen sind auch Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien bei der Expression der miRNA-kodierenden Gene bzw. bei den funktionellen Analysen erklärbar.

### **5.2.2 Blutproben von gesunden Probanden**

Die in dieser Arbeit verwendeten Blutproben von gesunden Probanden, die als Kontrollen für die miRNA-Analyse im Vollblut von HNSCC-Patienten dienen und zu diesen alters- und geschlechtsgepaart sind, müssen kritisch betrachtet werden.

Generell war die Verfügbarkeit von potenziellen Blutspendern sehr begrenzt. Die wichtigste Voraussetzung für eine Blutspende, die als Kontrolle verwendet werden sollte, war, dass dieser Proband weder zum Zeitpunkt der Blutspende noch in der Vergangenheit an einer Tumorerkrankung unabhängig der Lokalisation im Körper litt sowie alters ( $\pm 3$  bis 4 Jahre)- und geschlechtspassend zu einem Tumorpatienten war. Zudem sollten keine akuten oder chronischen Erkrankungen vorliegen. Um überhaupt Blutproben von „gesunden“ Probanden zu erhalten, die alters- und geschlechtsgepaart zu den Tumorpatienten waren, mussten letztendlich auch Personen mit Depressionen, Diabetes oder ähnlichen Erkrankungen eingeschlossen werden, sodass letztere Bedingung nicht einhaltbar war. Jedoch zeigen Studien, dass Erkrankungen wie Gelenkrheumatismus (Murata *et al.*, 2013; Pauley *et al.*,

2008), Diabetes Typ-2 (Baldeón *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014) oder Alzheimer (Leidinger *et al.*, 2013) Auswirkungen auf das miRNome haben. Auch Fettleibigkeit beeinflusst beispielsweise das miRNome im Serum von entsprechenden Personen (Pescador *et al.*, 2013). Zudem beruhen alle Angaben der Personen hinsichtlich ihrer Anamnese auf freiwilliger Basis und mögliche verschwiegene oder noch nicht aufgedeckte Erkrankungen können somit nicht berücksichtigt werden. Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz eines alters- und geschlechtskorreliertes Kollektivs ist somit lediglich geeignet alters- und geschlechtsbedingte Veränderungen auf miRNA-Ebene auszuschließen. Eine zukünftige wichtige Aufgabe bedeutet die Gewinnung von Kontrollproben von Patienten, die keine beeinflussenden Erkrankungen auf das miRNome aufweisen.

Unter dem oben aufgeführten Aspekt, sowie der Schwierigkeit der Gewinnung von möglichen Kontrollen unabhängig der Gewebeart zu entgehen, sollten daher Probenkollektive besser innerhalb ihres Kollektivs nach klinischen Parametern unterteilt und miteinander verglichen werden.

### **5.2.3 Gewebeproben von Tumorpatienten**

Die Einteilung nach HNSCC M0- und M1-Patienten wurde zum Zeitpunkt der Probensammlung ermittelt und zum Ende der praktischen Arbeiten nochmals überprüft. Jedoch sind zu diesem Zeitpunkt die ältesten Blut- und Abstrichproben 2,5 Jahre und die jüngsten Proben 0,5 Jahre alt. Auch der Sammelzeitpunkt der asservierten Gewebeproben liegt maximal 5 Jahre zurück. Daher ist es möglich, dass zum Zeitpunkt der Auswertung einige potentielle M1-Patienten der Gruppe M0 zugeordnet wurden. Dies könnte auch unter anderem den Überlappungsbereich der M0- und M1-Gruppe in den miRNA-Analysen verursacht haben. Des Weiteren konnten aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, aktuellen Probensammlung keine Überlebensanalysen, wie beispielsweise eine Kaplan-Meier-Analyse, durchgeführt werden.

Da man generell erst 5 Jahre nach der Erstdiagnose eines HNSCCs davon spricht, dass ein Patient frei von der Tumorerkrankung ist, sind die in dieser Arbeit verwendeten Blut-, Abstrich- und Tumorgewebeproben von HNSCC-Patienten im Hinblick auf eine Korrelation mit Fernmetastasierung kritisch zu betrachten. Diese Voraussetzung ist in dieser Arbeit nicht gegeben, da mit der Probensammlung erst im Rahmen dieser Arbeit im November 2012 begonnen wurde und somit auf keine gesammelten Blut- und Abstrichproben zurückgegriffen werden konnte. Bei dem FFPE-Tumorgewebe handelt es sich teils um, im Rahmen der Tumorbank, bereits asserviertes Gewebe und teils um, in der Zeit der Arbeit, gesammeltes Gewebematerial.

### 5.3 p16 als Surrogatmarker für HPV

Der einzige bisher angewandte, prognostische Marker für Kopf-Hals-Tumorpatienten stellt der HPV-Status dar. Hierbei ist ein positiver HPV-Status sowohl mit einer günstigeren Prognose als auch mit einem besseren Ansprechverhalten auf eine adjuvante Therapieform verbunden, womit diesem Parameter eine enorme Bedeutung im klinischen Alltag für die individuelle Therapiewahl des einzelnen Patienten zukommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde p16 als Surrogatmarker für HPV bestimmt, um auch innerhalb der miRNA-Analysen eine Korrelation mit diesem Parameter zu untersuchen.

Als Positivkontrolle wurde bei allen immunhistochemischen Färbungen von p16 ein Tonsillenpräparat mitgeführt. Klingenberg *et al.* (2010) konnten in einer Studie mit 262 tumorfreien Tonsillen zeigen, dass *p16* in normalem Tonsillengewebe, bestehend aus Plattenepithel, Lymphfollikeln und Kryptenepithel, unabhängig von einer HPV-Infektion eine Überexpression aufweisen kann. Eine HPV-Infektion wurde lediglich in 1 % der Fälle mittels PCR identifiziert und in 0 % der Fälle mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung detektiert. Während im Plattenepithel aller tumorfreien Tonsillen keine Expression von *p16* nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in den Lymphfollikeln und im Kryptenepithel eine p16-Färbung, sodass sich diese Präparate als Positivkontrolle eignen (Klingenberg *et al.*, 2010). Auch in dieser Arbeit wurde ein Tonsillenpräparat mit großem Kryptenanteil als Positivkontrolle für die immunhistochemische Färbung von p16 verwendet.

HPV-assoziierte HNSCCs beschränken sich überwiegend auf die Lokalisation Oropharynx und sind mit einer günstigeren Prognose für den Patienten verbunden. Neben einem besseren Gesamt- und Progressionsfreiem Überleben sowie einer besseren Ansprechrate auf eine Chemotherapie oder eine kombinierte Radiochemotherapie, ist auch das Risiko zur Entwicklung eines Rezidivs oder eines Zweittumors erniedrigt (Ang *et al.*, 2010; Fakhry *et al.*, 2008; Licitra *et al.*, 2006; Lindquist *et al.*, 2007; Sedaghat *et al.*, 2009). Ermittelt wurde der HPV-Status des Patienten im klinischen Bereich überwiegend mittels einer HPV-DNA *in situ* Hybridisierung, einer genomischen PCR oder indirekt über eine immunhistochemische Färbung des Surrogatmarkers p16.

Die *in situ* Hybridisierung ist eine weniger sensitive, dafür jedoch hoch spezifische Methode, die eine Visualisierung der Hybridisierungssignale im Zellkern der Tumorzellen erlaubt. Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen HPV-Typen ist dabei nur in stark eingeschränktem Umfang möglich. Die genomische PCR hingegen ist eine hoch sensitive Methode zur Detektion von HPV-DNA, die auch die einzelnen HPV-Typen unterscheidet und in Kombination mit einer immunhistochemischen Färbung von p16 vom 47. Kongress der American Society of Clinical Oncology für eine HPV-Diagnostik empfohlen wird. Die

immunhistochemische Färbung von p16 ist eine einfach durchführbare Methode mit geringen Kosten und einer hohen Sensitivität (El-Naggar & Westra, 2011; Kofler *et al.*, 2012).

In dysplastischen und malignen HPV-assoziierten Läsionen kann p16 als Surrogatmarker für HPV verwendet werden, da es bei einer Inaktivierung von RB durch das HPV-Onkoprotein E7 zu einer Überexpression von *p16* kommt, während in HPV-negativen Tumoren p16 aufgrund epigenetischer oder genetischer Stilllegung des entsprechenden Gens nicht bzw. nur minimal detektierbar ist. Die Detektion von HPV-DNA und *p16* Expression zeigen eine Übereinstimmung von etwa 93 %. Ebenso wie in HPV-positiven Tumorpatienten ist die Prognose für p16-positive Tumorpatienten besser als für HPV-negative bzw. p16-negative Tumorpatienten (Ang *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2010; Lassen *et al.*, 2009; Mellin Dahlstrand *et al.*, 2005; Singhi & Westra, 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass HPV-positive/p16-negative Fälle eine ähnliche Prognose wie die der HPV-negativen/p16-negativen Patienten aufweisen und daher klinisch wie diese behandelt werden können (Hong *et al.*, 2012).

Je nach Studie variiert die Anzahl HPV-positiver Fälle von 18 % (12/66) (Haraf *et al.*, 1996) über 21 % (10/47) (Hafkamp *et al.*, 2003), 25 % (62/253) (Gillison *et al.*, 2000), 37 % (19/52) (Glombitza *et al.*, 2010), 40 % (38/96) (Fakhry *et al.*, 2008) bis zu 69 % (176/256) (Singhi *et al.*, 2010). Betrachtet man nur die Lokalisation Oropharynx findet man ähnliche Zahlen von 14 % (14/99) (Lindel *et al.*, 2001) über 19 % (17/90) (Licitra *et al.*, 2006), 28 % (30/106) (Reimers *et al.*, 2007), 43,3 % (26/60) (Mellin *et al.*, 2000), 46 % (31/67) (Li *et al.*, 2003), 53,8 % (21/39) (Hoffmann *et al.*, 2010), 63,8 % (206/323) (Ang *et al.*, 2010) bis zu 65,3 % (49/75) (Sedaghat *et al.*, 2009). In 78,6 % bis 100 % der HPV-positiven Fälle ist der HPV-Typ 16 für diese Infektion verantwortlich (Gillison *et al.*, 2000; Hafkamp *et al.*, 2003; Haraf *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2003; Lindel *et al.*, 2001; Mellin *et al.*, 2000; Reimers *et al.*, 2007). Neben dem HPV-Typ 16 wurden die HPV-Typen 18, 33, 35 und 45 detektiert (Haraf *et al.*, 1996; Lindel *et al.*, 2001; Mellin *et al.*, 2000; Reimers *et al.*, 2007).

Studien, die neben einer HPV-Bestimmung auch den p16-Status ermittelt haben, zeigen, dass alle p16-positiven Fälle auch HPV-positiv sind, es jedoch neben HPV-negativen/p16-negativen Fällen auch einige HPV-positive/p16-negative Fälle gibt (Hafkamp *et al.*, 2003; Licitra *et al.*, 2006; Reimers *et al.*, 2007; Singhi *et al.*, 2010). In diesen Fällen kann es sich um eine latente HPV-Infektion ohne Auswirkung auf die kanzeröse Transformation aufgrund der geringen Aktivität der HPV-Onkogene *E6* und *E7* oder um eine äußerst seltene HPV-verursachte Kanzerogenese ohne *p16*-Expression handeln. Zur Klassifizierung dieser Ergebnisse untersuchte unsere Arbeitsgruppe in einer Studie (Linxweiler *et al.*, 2015) die HPV-positiven/p16-negativen Fälle mittels einer immunhistochemischen Färbung von RB und Cyclin D1, deren Genexpression durch die HPV-Onkoproteine *E6* und *E7* ebenfalls

dereguliert wird. Die immunhistochemische Untersuchung der HPV-positiven/p16-negativen Fälle zeigte eine starke Expression von *RB* und *CCND1* (Cyclin D1). Dies bestätigt neben der fehlenden *p16*-Expression und dem Vorhandensein der HPV-DNA die Hypothese, dass diese HPV-Infektion nicht die Kanzerogenese beeinflusst hat und diese Fälle klinisch somit als HPV-negative/p16-negative Fälle behandelt werden können (Linxweiler *et al.*, 2015). Auch Hong *et al.* (2012) konnten die HPV-positiven/p16-negativen Fälle mittels einer Untersuchung von Cyclin D1 und EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) und einer Kaplan-Meier-Analyse der HPV-negativen/p16-negativen Gruppe zuordnen.

In Studien, die sich mit der Expression von *p16* beschäftigen, variiert die Zahl der *p16*-positiven Fälle ähnlich der der HPV-positiven Fälle von 17 % (Reed *et al.*, 1996) über 20,5 % (Ang *et al.*, 2014), 25 % (Lassen *et al.*, 2010), 34 % (Higuchi *et al.*, 2007) bis zu 46 % (Bova *et al.*, 1999). In der vorgelegten eigenen Arbeit sind 26,2 % (22/84) der Fälle *p16*-positiv, während 73,8 % (62/84) der Patienten einen *p16*-negativen Status aufweisen. Übereinstimmend mit der Literatur ist auch in der vorliegenden Arbeit die überwiegende Mehrheit der *p16*-positiven Fälle (72,7 %) der Lokalisation Oropharynx zugeordnet. Da in dieser Arbeit auf aktuelle Proben zurückgegriffen wurde und somit die Mehrzahl der Patienten noch lebt, ist eine abschließende prognostische Aussage bezüglich der Überlebenszeit der Patienten nicht möglich.

#### **5.4 Veränderungen auf miRNA-Ebene**

In einer Vielzahl von Studien konnten bereits veränderte miRNA-Profile im HNSCC-Gewebe und in HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden (Avisar *et al.*, 2009a; Barker *et al.*, 2009; Cervigne *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2008; Childs *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2013; Harris *et al.*, 2012; Hui *et al.*, 2010; Kimura *et al.*, 2010; Lajer *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2014; Ramdas *et al.*, 2009; Scapoli *et al.*, 2010; Siow *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2007; Wald *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014a). Da sie eine Verfügbarkeit von Tumorgewebe voraussetzen, eignen sich diese Profile jedoch weniger zur Früherkennung eines Tumors. Allerdings erfolgt eine Entnahme von Tumorgewebe nur im Rahmen von Biopsien zumeist unter Vollnarkose, die für viele, vor allem ältere Patienten, eine enorme Belastung bedeutet. Für eine Untersuchung von miRNAs im Vollblut ist dagegen lediglich eine Blutprobe (2,5 ml) nötig, die im Rahmen der Routineblutentnahme durchführbar ist und somit keine zusätzliche Belastung für den Patienten bedeutet. Somit wäre dieses Verfahren auch optimal für eine Diagnostik bzw. prognostische Beurteilung geeignet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die miRNA-Analyse im Vollblut von HNSCC-Patienten auszuführen. Hierfür wurde die Gesamt-RNA einschließlich miRNA aus Vollblut isoliert. Dazu erfolgte die Blutentnahme in PAXgene™ Blood RNA Tubes, deren Reagenz das intrazelluläre RNA-Profil stabilisiert und somit die Degradierung verhindert. Zur nachfolgenden Analyse des miRNomes wurde die Expression der miRNA-kodierenden Gene unter Verwendung von Microarrays ermittelt und die Expression einzelner miRNA-kodierender Gene mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR an einem größeren Patientenkollektiv validiert.

Nach bestem Wissen gab es zu Beginn dieser Arbeit keine Untersuchung hinsichtlich des gesamten miRNomes im Vollblut von HNSCC-Patienten. Lediglich eine Studie (Brito *et al.*, 2010) untersuchte die Expression zweier miRNA-kodierender Gene (*miR-15a* und *let-7a*) im Vollblut von Patienten mit einem oralen SCC. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde jedoch im Jahr 2014 eine Untersuchung hinsichtlich des miRNomes im Vollblut von HNSCC-Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen (orale SCCs) publiziert (Ries *et al.*, 2014).

Brito *et al.* (2010) zeigen in ihrer Expressionsstudie, dass 64,8 % der Blutproben von Patienten mit einem oralen SCC verglichen mit Blutproben von gesunden Probanden eine erhöhte Expression von *miR-15a* aufweisen, während 35,2 % der Fälle eine erniedrigte Expression besitzen. Diese ist mit einem erhöhten Tumorstadium und Lymphknotenmetastasierung assoziiert. Die Expression von *let-7a* ist im Vollblut von Patienten mit einem oralen SCC in der Mehrheit der Fälle (18/20) ebenfalls erniedrigt, wobei für dieses Ergebnis keine statistische Wahrscheinlichkeit angegeben ist (Brito *et al.*, 2010).

Ries *et al.* (2014) betrachten in ihrer Studie das gesamte miRNome im Vollblut von Patienten mit einem oralen SCC. Dafür wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, eine Microarray-Analyse (Blutprobenkollektiv: n=20) durchgeführt, um einen Gesamtüberblick über die veränderten Expressionen miRNA-kodierender Gene im Vollblut dieser Patienten verglichen mit dem gesunden Probanden zu erhalten. Im Rahmen dieser Analyse wurden 30 deregulierte miRNAs identifiziert, wovon die miRNAs 186, 494 und 3651 mittels quantitativer Real-Time PCR an einem größerem Probenkollektiv (n=57) validiert wurden. Im Vollblut von Patienten mit einem oralen SCC zeigt sich verglichen mit Blutproben von gesunden Probanden eine erniedrigte Expression von *miR-186* und eine erhöhte Expression von *miR-494* und *miR-3651*, wobei eine erhöhte Expression von *miR-3651* mit dem Tumorgrad, der Lymphknotenmetastasierung und dem klinischen Stadium des Tumors korreliert (Ries *et al.*, 2014).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung des Expressionsmusters aller miRNA-kodierender Gene im Vollblut von HNSCC-Patienten eine Microarray-Analyse durchgeführt, um einen Gesamtüberblick über die veränderten Expressionen bei dieser Erkrankung zu erhalten. Dafür wurden Blutproben von HNSCC-Patienten (n=12) und als

Kontrollen dienende Blutproben von gesunden Probanden (n=12) untersucht, wobei jeder Blutprobe eines Tumorpatienten eine Blutprobe eines gesunden Probanden gleichen Geschlechts und Alters ( $\pm 3$  Jahre) zugeordnet wurde, um geschlechts- und altersspezifische Veränderungen auszuschließen. Mit Hilfe dieser Analyse konnten in dieser Arbeit, im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Studie (Ries *et al.*, 2014), keine Unterschiede im Expressionsmuster der miRNA-kodierenden Gene im Vollblut zwischen HNSCC-Patienten und gesunden Probanden aufgedeckt werden.

Sowohl in der Studie von Ries *et al.* (2014) als auch in der vorliegenden Arbeit wurde das Agilent SurePrint G3 human v16 miRNA Array Kit 8x60K (release 16.0) von Agilent Technologies, Inc - Life Sciences and Chemical Analysis Group verwendet. Unterschiede zwischen den beiden Studien liegen im Probenkollektiv. Im Gegensatz zu Ries *et al.*, die sich in ihrer Studie auf die Tumorlokalisierung Mundhöhle beschränkt haben, wurden in dieser Arbeit die Lokalisationen Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx untersucht. Trotz des lokalisationsübergreifenden Probenkollektivs zeigte sich in dieser Arbeit jedoch weder ein lokalisationsabhängiges Clustering zwischen den HNSCC-Gruppen noch ein Clustering zwischen der HNSCC-Gruppe und den gesunden Probanden, sodass davon auszugehen ist, dass weder Expressionsunterschiede der miRNA-kodierenden Genen im Vollblut zwischen HNSCC-Patienten und gesunden Probanden noch zwischen den Tumorlokalisationen bestehen.

Ein möglicher Grund für die abweichenden Ergebnisse zwischen der Studie von Ries *et al.* (2014) und dieser Arbeit liegt vermutlich eher in den Unterschieden beim Probenkollektiv im Hinblick auf Geschlecht und Alter. Während in der vorliegenden Arbeit ein alters- ( $\pm 3$  Jahre) und geschlechtsgepaartes Probenkollektiv untersucht wurde, berücksichtigten Ries *et al.* einen möglichen Einfluss dieser Parameter in ihrer Studie nicht. Mögliche Unterschiede im Expressionsmuster miRNA-kodierender Gene im Vollblut zwischen HNSCC-Patienten und gesunden Probanden könnten daher in der Studie von Ries *et al.* (2014) auch altersbedingt sein. Studien zeigen bereits, dass alterbedingte Unterschiede im Expressionsmuster von miRNA-kodierenden Genen bestehen (ElSharawy *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2014). Eine andere Ursache, die zu abweichenden Ergebnissen in verschiedenen Studien führen kann, sind nicht bekannte oder detektierte Erkrankungen der Probanden des Kontrollkollektivs, da auch Erkrankungen wie Gelenkrheumatismus (Murata *et al.*, 2013; Pauley *et al.*, 2008), Diabetes Typ-2 (Baldeón *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014) oder Alzheimer (Leidinger *et al.*, 2013) Auswirkungen auf das miRNome haben. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Fettleibigkeit das miRNome im Serum von entsprechenden Personen stark beeinflussen kann (Pescador *et al.*, 2013).

Bei einer alleinigen Betrachtung der Tumorpatienten und in der Korrelation mit deren klinischen Daten konnten unterschiedliche Expressionen im Vollblut von HNSCC-Patienten hinsichtlich des Rauchverhaltens und der Fernmetastasierung in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden. Infolgedessen wurden in dieser Arbeit die beiden im Blut von fernmetastasierenden HNSCC-Patienten signifikant veränderten Transkriptlevel der beiden miRNAs 146a und 155 in weiteren Versuchen mittels Real-Time PCR an einem größeren Patientenkollektiv validiert und vergleichend dazu auch im Tumorgewebe und Abstrichmaterial untersucht. Während eine miRNA-Analyse sowohl im Blut als auch im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten valide durchgeführt werden konnte, war die miRNA-Untersuchung im Abstrichmaterial von HNSCC-Patienten aufgrund der Heterogenität des Abstrichmaterials, wie bereits in Kapitel 5.2.1 diskutiert, nicht möglich. Zusätzlich zu den beiden miRNAs 146a und 155 wurden die miRNAs 125a-5p, 218 und 1246 sowohl im Blut als auch im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten untersucht. Um die Wertigkeit der untersuchten miRNAs sowohl im Blut als auch im Tumorgewebe als prognostische und prädiktive Marker zu zeigen, wurden die Daten der Genexpressionsanalysen mit den klinischen Daten der Tumorpatienten korreliert. Die mit Hilfe der Microarray-Untersuchung ermittelten Expressionsdaten konnten darüber hinaus mit der nachfolgenden quantitativen Real-Time PCR-Analyse überprüft und bestätigt werden.

Im Anschluss an diese deskriptiven Analysen folgten funktionelle Untersuchungen bezüglich möglicher Auswirkungen der miRNAs 146a und 155 auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von humanen Tumorzellen. Diese funktionelle Charakterisierung der beiden miRNAs bestätigten wiederum die vorher unter Verwendung von Microarrays und quantitativer Real-Time PCR ermittelten Expressionsanalysen. Eine genaue Diskussion verglichen mit der bereits publizierten Literatur ist in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt.

#### **5.4.1 Expression von *miR-125a* und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen**

Die Expression des auf dem Chromosomenabschnitt 19q13.41 gelegenen Gens *miR-125a* ist bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen verändert, wie beispielsweise in akuter myeloischer Leukämie (Ufkin *et al.*, 2014), Glioblastomen (Cortez *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2015), nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Jiang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2014a), Brustkrebs (Guo *et al.*, 2009; Iorio *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2013), Magenkrebs (Xu *et al.*, 2014b), Eierstockkrebs (Cowden Dahl *et al.*, 2009; Iorio *et al.*, 2007; Nam *et al.*, 2008), Leberkrebs (Bi *et al.*, 2012) und auch in oralen SCCs (Park *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2014). Die Expression wird dabei in der Mehrzahl der Studien als erniedrigt beschrieben.

In Leberkrebs konnte sowohl in Zelllinien als auch im Tumorgewebe eine 4,72-fache Erniedrigung der Expressionsrate von *miR-125a* detektiert werden, die zudem mit der T-Klassifikation, einer Metastasierung und invers mit der Expression von *MMP11* (matrix metalloproteinase 11) und *VEGFA* (vascular endothelial growth factor A) korreliert. Eine *in vitro* Überexpression von *miR-125a* in den HCC-Zelllinien HepG2 und HCC-LM3 führte zu verlangsamtem Wachstum, geringerer Kolonienzahl und schwächerem Migrations- und Invasionspotenzial. Auch *in vivo* zeigte sich in Mäusen ein langsames Tumorwachstum und eine geringere Leber- und Lungenmetastasierung bezüglich der Metastasenanzahl und deren Größe. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben dieser Patienten liegt bei einer niedrigen Expression von *miR-125a* bei 25,7±2,7 Monate versus 45,4±2,8 Monate bei einer hohen Expression (Bi *et al.*, 2012).

Auch in Brustkrebs wird eine erniedrigte Expression von *miR-125a* beschrieben (Hsieh *et al.*, 2014; Iorio *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2013). Eine Überexpression in entsprechenden Zelllinien führte zu einem gehemmten Zellwachstum und einer Steigerung der Apoptose. Zusätzlich konnte eine Inhibierung der Zellmigration nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2009). Vielversprechend sind auch Untersuchungen dieser miRNA im Serum von Brustkrebspatienten, da eine erniedrigte Expression von *miR-125a* mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten korreliert und somit als prognostischer Marker Bedeutung findet. Des Weiteren sind geringere *miR-125a* Serumlevel mit dem Tumorgrad, der Tumorgröße und der Lymphknotenmetastasierung assoziiert (Hsieh *et al.*, 2014).

Untersuchungen von Glioblastomen zeigen, dass auch in dieser Tumorentität *miR-125a* erniedrigt exprimiert wird (Cortez *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2015) und eine Überexpression in den Glioblastomzelllinien LN319 und U251 zu einer reduzierten Invasionsfähigkeit von 23 % bzw. 56 % führt (Cortez *et al.*, 2010). Zudem reguliert *miR-125a* die Expression von *TAZ* (tafazzin), dessen Genprodukt in diversen Tumorentitäten hochreguliert ist und eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und -progression spielt. Die Expressionen beider Gene sind dabei invers korreliert. Des Weiteren inhibiert *miR-125a* die Zellproliferation und induziert die Differenzierung von Glioblastomzellen (Yuan *et al.*, 2015).

Ähnliche Ergebnisse werden in Studien zu Magenkrebs beschrieben. Auch hier besitzt *miR-125a* einen tumorinhibierenden Effekt, da reduzierte Level dieser miRNA mit einer höheren Malignität, einer zunehmenden Tumorgröße, einer erhöhten Invasion, einer Lebermetastasierung und einer schlechten Prognose korreliert sind, wobei *miR-125a* einen unabhängigen prognostischen Marker für das Überleben der Patienten darstellt (Nishida *et al.*, 2011). *In vitro* unterdrückt diese miRNA das Proliferations-, Migrations- und Invasionspotenzial von Magenkrebszellen (Nishida *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014b) und weist in

Kombination mit Trastuzumab einen inhibitorischen Wachstumseffekt auf (Nishida *et al.*, 2011).

In Eierstockkrebs konnte ebenfalls eine erniedrigte Expression von *miR-125a* festgestellt werden (Iorio *et al.*, 2007; Nam *et al.*, 2008), welche zur Akkumulation von ARID3B (AT rich interactive domain 3B) führt, was wiederum zu einer mesenchymalen Transformation und zur Tumorprogression beiträgt. Interessanterweise führte eine Überexpression von *miR-125a* in der Zelllinie DOV13 zu einer Umwandlung von hoch-invasiven ovariellen Krebszellen mit einer mesenchymalen zu einer epithelialen Morphologie, sodass *miR-125a* vermutlich als negativer Regulator für eine Epithelial-zu-Mesenchymal-Transition (EMT) agiert (Cowden Dahl *et al.*, 2009).

Studien bezüglich einer Expression von *miR-125a* in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen weisen Unterschiede im Expressionsmuster zwischen verschiedenen Gewebetypen auf. Während die erniedrigte *miR-125a* Expression im Tumorgewebe (Jiang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014a) mit den bisher publizierten Ergebnissen anderer Tumorentitäten übereinstimmt und auch Korrelationen zum pathologischen Stadium und Lymphknotenmetastasierung zeigen, wird die *miR-125a* Expression im Blut dieser Patienten sehr unterschiedlich beschrieben. Lin *et al.* (2012) konnten keinerlei Veränderungen im Plasma von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen verglichen mit gesunden Personen nachweisen. Zhu *et al.* (2014a) detektierten im Patientenserum reduzierte *miR-125a* Level, wohingegen Wang *et al.* (2015) erhöhte *miR-125a* Level im Patientenserum nachweisen konnten. Letztere Beobachtung spiegelt die Daten der vorliegenden Arbeit wider, in der eine erhöhte Expression von *miR-125a* im Blut der Patienten mit Lymphknotenmetastasierung korrelierte.

Übereinstimmend mit der Literatur, die die Expression von *miR-125a* im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten als unverändert beschreibt (Odar *et al.*, 2012), konnte auch in der vorliegenden Arbeit keine veränderte *miR-125a* Expression im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten Tiwari *et al.* (2014) bei alleiniger Betrachtung der Lokalisation Mundhöhle eine erniedrigte Expression dieser miRNA aufzeigen. Bei gleicher Lokalisation konnte auch im Speichel dieser Patienten eine erniedrigte *miR-125a* Expression verglichen mit dem Speichel gesunder Personen festgestellt werden (Park *et al.*, 2009). Auch wird in der Literatur eine erniedrigte Expression von *miR-125a* in einer seltenen HNSCC-Variante, den warzigen Kopf-Hals-Tumoren, beschrieben (Odar *et al.*, 2012).

Interessanterweise konnte bei einem Kollektiv von HPV-positiven pharyngealen SCCs im Tumorgewebe eine erniedrigte Expression gezeigt werden, jedoch ausschließlich mittels Microarray-Analysen ohne Validierung mit einer anderen Methode. In oralen SCC-Zelllinien weisen *in vitro* Analysen bei einer Überexpression dieser miRNA drastisch reduzierte ESRRA (estrogen-related receptor alpha) Level, erniedrigtes Zellproliferationspotenzial und

erhöhte Apoptose auf. Eine Inhibierung hingegen führt zu einem drastisch erhöhten ESRRA Gehalt, erhöhter Zellproliferation und herabgesetzter Apoptoserate. MiR-125a-vermittelte Herunterregulierung von ESRRA beeinträchtigt die Koloniebildung und Invasion von oralen SCC-Zellen (Tiwari *et al.*, 2014).

Wie bereits im vorangegangenen Text beschrieben, ist die Expression von *miR-125a* im Tumorgewebe in einer Vielzahl von Krebserkrankungen erniedrigt und wird als Tumorsuppressor-miRNA bezeichnet, die eine wichtige Funktion in der Tumorbilogie mit Potenzial als prognostischer Marker besitzt. Wie schon von Odar *et al.* (2012) in HNSCCs beschrieben, konnte auch in dieser Arbeit keine veränderte Expression von *miR-125a* im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten nachgewiesen werden, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit mit der, nach bestem Wissen, bisher einzigen an HNSCCs durchgeführten Untersuchung bezüglich einer *miR-125a* Expression übereinstimmt, abgesehen von Untersuchungen in Subgruppen wie oralen SCCs oder HPV-positiven pharyngealen SCCs, die wie die Mehrzahl der Studien eine Unterexpression zeigen.

Interessanterweise konnte, wenngleich in nur geringer Fallzahl, im Vollblut von HNSCC-Patienten eine Überexpression assoziiert mit einer Lymphknotenmetastasierung gezeigt werden, sodass diese Daten an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden sollten. Wenngleich es nach bestem Erkenntnisstand bisher keine publizierten Daten zu Untersuchungen bezüglich einer *miR-125a* Expression im Vollblut von HNSCC-Patienten gibt, zeigen Untersuchungen eine Überexpression von *miR-125a* bei Patienten mit einem Melanom (Leidinger *et al.*, 2010) bzw. bei Alzheimerpatienten (Leidinger *et al.*, 2013) verglichen mit gesunden Personen. Auch im Serum von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen konnte in einer Studie von Wang *et al.* (2015) eine *miR-125a* Überexpression nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen demonstrieren das mögliche Potenzial von miR-125a als minimal invasiver Marker im Blut von erkrankten Personen und sollten daher weiter verfolgt werden.

#### **5.4.2 Expression von *miR-218* und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen**

MiR-218 besitzt zwei genomische Loci mit *miR-218-1* auf Chromosomenabschnitt 4p15.31 und *miR-218-2* auf Chromosomenabschnitt 5q34, welche jedoch zur Expression eines identischen Genprodukts, miR-218, führen. Diese im Tumorgewebe einheitlich als erniedrigt beschriebene miRNA wird aktuell in einer Vielzahl von Krebserkrankungen hinsichtlich ihrer Expression und funktionellen Rolle in der Tumorbilogie untersucht, unter anderem bei Gliomen (Cheng *et al.*, 2015a; Gu *et al.*, 2015), Schilddrüsenkrebs (Guan *et al.*, 2013),

Speiseröhrenkrebs (Jiang *et al.*, 2015), Lungenkrebs (Davidson *et al.*, 2010; Sher *et al.*, 2014), Magenkrebs (Gao *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2014), Darmkrebs (He *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013), Leberkrebs (Sui *et al.*, 2015), Gebärmutterkrebs (Yamamoto *et al.*, 2013; Kogo *et al.*, 2014), Blasenkrebs (Cheng *et al.*, 2015b; Tatarano *et al.*, 2011), Prostatakrebs (Nishikawa *et al.*, 2014) und auch in HNSCCs (Kinoshita *et al.*, 2012).

In Gliomen ist gerade bei zunehmendem WHO-Grad die Expression von *miR-218* sowohl in Zelllinien als auch im Tumorgewebe erniedrigt (Cheng *et al.*, 2015a; Gu *et al.*, 2015) und korreliert zudem mit einem niedrigen Karnofsky-Index, einem kürzeren krankheitsfreiem Überleben und einem kürzeren Gesamtüberleben, wobei das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben unabhängige Prognosefaktoren darstellen (Cheng *et al.*, 2015a). *In vitro* Experimente zeigen, dass eine Inhibierung dieser miRNA die Invasivität noch steigert, während eine Zugabe der miR-218 die Invasion von Gliomzellen hemmt (Gu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2012b).

Reduzierte Expressionslevel von *miR-218* findet man auch in Zelllinien, im Tumorgewebe und im Plasma von Patienten mit Magenkarzinomen (Gao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012), wobei *in vitro* eine Überexpression die Zellproliferation hemmt und die Apoptose erhöht (Gao *et al.*, 2010). Zudem korreliert eine erniedrigte *miR-218* Expression mit Lymphknotenmetastasierung, höherem Tumorstadium und Invasion. Diese Hypo-Expression kann durch hyperthermische Chemotherapie umgekehrt werden, welche nicht nur die *miR-218* Expression erhöht, sondern auch die Proliferation und Invasion inhibiert (Ruan *et al.*, 2015). Nach einer zytoreduktiven Tumorentfernung und anschließender hyperthermischen intraperitonealen Chemotherapie lässt sich auch im Serum von Patienten mit fortgeschrittenem Magenkrebs eine erhöhte *miR-218* Expression nachweisen. *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass miR-218 die Magenkrebszell-Chemosensitivität zu Cisplatin erhöht und *in vivo* das Tumorwachstum in Nacktmäusen inhibiert (Zhang *et al.*, 2014b).

Expressionsanalysen in Zelllinien und im Tumorgewebe von Blasenkrebspatienten zeigen, wie in den bisher beschriebenen Tumorentitäten, ein erniedrigtes Expressionslevel von *miR-218* (Cheng *et al.*, 2015b; Tatarano *et al.*, 2011). *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen demonstrieren zudem den inhibierenden Effekt einer Überexpression von *miR-218* auf die Zellproliferation, -migration und -invasion. Des Weiteren reguliert miR-218 die Expression von *BMI-1* (BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger), welches eine wichtige Rolle in der Initiierung und Entwicklung von Krebs spielt. Die Expression von *miR-218* und *BMI-1* weisen eine signifikant inverse Korrelation auf (Cheng *et al.*, 2015b). Auch bei Darm- und Prostatakrebs konnten ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der *miR-218* Expression, und der funktionellen Versuche, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, gefunden werden (He *et al.*, 2012; Nishikawa *et al.*, 2014). Kaplan-Meier Analysen zeigen zudem ein 3-Jahres-Gesamtüber-

leben von 39,1 % bzw. 63,3 % für Prostatakrebspatienten mit einem niedrigen bzw. hohen Expressionslevel von *miR-218* (Han *et al.*, 2015).

Auch in Gebärmutterkrebs wird die Expression von *miR-218* als reduziert beschrieben. Neben dem Tumorgewebe weisen auch die zervikalen Krebszelllinien CaSki (HPV16-positiv), ME180 (HPV39-positiv), HeLa (HPV18-positiv) und Yumoto (HPV-negativ) verminderte *miR-218* Expressionen auf. Während eine Transfektion von *miR-218* die Zellproliferation in nur einer Zelllinie (ME180) erniedrigt, wird in allen vier Zelllinien das Migrations- und Invasionspotenzial inhibiert (Yamamoto *et al.*, 2013). Zudem zeigen *in vitro* Untersuchungen, dass *miR-218* die bestrahlungsinduzierte Apoptose steigert und das Tumorwachstum unterdrückt (Yuan *et al.*, 2014). Interessanterweise beeinflusst in HPV16-positiven Zelllinien HPV16 E6 die Expression von *miR-218* (Martinez *et al.*, 2008). Auch im Serum von Gebärmutterkrebspatientinnen konnte eine verminderte Expression dieser miRNA nachgewiesen werden, die zudem mit einem höheren Tumorstadium und Lymphknotenmetastasierung korreliert. Verglichen mit Patientinnen mit einem Plattenepithelkarzinom weisen Patientinnen mit einem Adenokarzinom noch geringere *miR-218* Transkriptlevel im Serum auf. Die im Serum veränderte *miR-218* Expression (Yu *et al.*, 2012) konnte jedoch im Plasma von Gebärmutterkrebspatientinnen nicht bestätigt werden (You *et al.*, 2015).

Untersuchungen in HNSCCs weisen vergleichbar mit anderen Tumorentitäten eine reduzierte Expression von *miR-218* sowohl im Tumorgewebe als auch in den Zelllinien FaDu (hypopharyngeales SCC) und SAS (Zungen-SCC) auf. *In vitro* Analysen zeigen, dass eine Überexpression von *miR-218* inhibierend auf die Proliferation, Migration und Invasion von HNSCC-Zellen wirkt (Kinoshita *et al.*, 2012). In oralen SCCs zeigten Patienten mit Lymphknotenmetastasen und einem niedrigen *miR-218* Gehalt ein höheres Risiko, Fernmetastasen zu entwickeln (Peng *et al.*, 2014). Zusätzlich ist, wie in zervikalen Karzinomen, eine verminderte *miR-218* Expression in HPV16-positiven HNSCC-Zelllinien (DU-SCC-2, UPCI:SCC-90, UM-SCC-47 und 93-VU-147T) verglichen mit einer normalen, oralen Keratinozyten-Kultur (NOK) bzw. HPV-negativen Zelllinien (PCI13 und PCI30) nachweisbar (Wald *et al.*, 2011). Auch Wu *et al.* (2014a) konnten eine Korrelation zwischen reduzierter *miR-218* Expression und HPV16/18-Infektion feststellen. Zudem konnten niedrige *miR-218* Transkriptlevel mit einem signifikant kürzerem Gesamt- und Rezidivfreiem Überleben korreliert werden (Wu *et al.*, 2014a).

Neben den zuvor beschriebenen Expressionsunterschieden von *miR-218* bei Krebserkrankungen gibt es auch eine sehr interessante Untersuchung hinsichtlich der Expression von *miR-218* in bronchialen Atemwegsepithelzellen zwischen Rauchern und Nichtrauchern, wobei Epithelzellen von Rauchern eine vierfach reduzierte Expressionsrate verglichen mit

Nichtrauchern aufweisen. *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass Zigarettenrauchkondensat zu einer erniedrigten Expression von *miR-218* und zu einer erhöhten Expression ihrer Zielgene führt (Schembri *et al.*, 2009).

Wie bereits im vorangegangenen Text beschrieben, ist die Expression von *miR-218* im Gewebe in einer Vielzahl von Krebserkrankungen erniedrigt und wird als Tumorsuppressor-miRNA bezeichnet, die eine wichtige Funktion in der Tumorbio­logie sowie Potenzial als prognostischer Marker besitzt. Übereinstimmend mit der Literatur (Kinoshita *et al.*, 2012) konnte auch in dieser Arbeit eine reduzierte Expression von *miR-218* im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung zwischen HPV positiv und HPV negativ war aufgrund der zu geringen Anzahl positiver Zellen im Tumormaterial nicht möglich. Auch Wald *et al.* (2011) konnten diese Unterscheidung lediglich zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien vornehmen, da deren Zellen einen homogenen HPV-Status aufweisen. Des Weiteren konnten keine Expressionsunterschiede von *miR-218* im Blut sowohl zwischen HNSCC-Patienten und gesunden Personen als auch in Korrelation mit klinischen Daten festgestellt werden. Auch in der Literatur werden, wie vorher beschrieben, nur wenige Aussagen bezüglich miR-218 als Blutmarker getroffen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich miR-218 zur Unterscheidung zwischen Tumor- und Normalgewebe eignet und niedrige Expressionslevel mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Da in den verschiedensten Tumorentitäten eine künstliche Zugabe von miR-218 die Zellproliferation, -migration und -invasion *in vitro* dramatisch inhibiert und auch *in vivo* zu einer drastischen Reduzierung des Tumorwachstums führt, sollten in Zukunft weitere Untersuchungen bezüglich dieser miRNA folgen, auch im Hinblick auf mögliche Therapieansätze.

#### **5.4.3 Expression von *miR-1246* und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen**

Zur auf Chromosomenabschnitt 2q31.1 gelegenen miRNA 1246 (*miR-1246*) ist in der Literatur bisher weitaus weniger, als zu den anderen in dieser Arbeit charakterisierten miRNAs (*miR-125a*, *miR-218*, *miR-146a* und *miR-155*), bekannt. Eine einheitlich als erhöht beschriebene Expression von *miR-1246* wurde bereits für Tumorerkrankungen der Speiseröhre (Fu *et al.*, 2013; Takeshita *et al.*, 2013), Gebärmutter (Chen *et al.*, 2013b), Leber (Sun *et al.*, 2014a), Dickdarm (Piepoli *et al.*, 2012) und Mundhöhle (Liao *et al.*, 2015) publiziert.

In zervikalen SCCs ist sowohl im Tumorgewebe als auch im Serum von Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine erhöhte Expression von *miR-1246* nachweisbar und wäre

somit als prädiktiver Marker für eine Lymphknotenmetastasierung geeignet (Chen *et al.*, 2013b). Zudem erhöht eine Transfektion mit miR-1246 die Proliferation, Migration und Invasion von zervikalen Tumorzellen (SiHa), während eine Inhibierung dieser miRNA zu einer Verminderung dieser Effekte führt (Chen *et al.*, 2014). In einem Vergleich radioresistenter Zelllinien (Hela-NDRG2, Hela-R11 und SiHa-R15) gegen radiosensitive Zelllinien (Hela-C, Hela und SiHa) waren 20 miRNAs in allen drei radioresistenten Zelllinien verändert. Zu diesen gehört auch miR-1246, die eine mehr als fünffach hochregulierte Genexpression aufweist. Interessanterweise führt eine Überexpression dieser miRNA in radiosensitiven Hela- und SiHa-Zellen zu einem gesteigerten Überleben der Zellen bei Bestrahlung (Zhang *et al.*, 2013a).

Bei einer Vergleichsuntersuchung zweier Leberkrebs-Zelllinien, etabliert aus dem Primärtumor (Hep11) und dem zugehörigen Rezidiv des gleichen Patienten nach gescheiterter Chemo- und Strahlentherapie (Hep12), konnte eine 700-fach erhöhte Expression von *miR-1246* in der Hep12-Zelllinie nachgewiesen werden. Funktionelle Analysen zeigen, dass eine Inhibierung dieser miRNA die Migration und Invasion von Hep12-, BEL7402- und SMMC7721-Zellen dramatisch reduziert. Untersuchungen in diesen Zelllinien hinsichtlich einer Transfektion von miR-1246 war – vermutlich aufgrund der hohen *miR-1246* Expressionsrate – nicht möglich. Entsprechende Versuche wurden daher in der Hep11-Zelllinie mit geringem miR-1246 Gehalt durchgeführt und resultierten erwartungsgemäß in einem signifikant erhöhten Migrations- und Invasionspotenzial. Außerdem zeigte sich in einem Patientenkollektiv mit Leberkrebsstadium I, dass Patienten mit einer erhöhten Expression ein krankheitsfreies Überleben von nur  $32,53 \pm 5,69$  Monaten gegenüber  $44,11 \pm 4,61$  Monaten bei Patienten mit niedrigem miR-1246 Gehalt aufweisen (Sun *et al.*, 2014a).

Bei Patienten mit Darmkrebs konnte im Tumorgewebe, in Zelllinien und im Serum eine erhöhte Expression von *miR-1246* festgestellt werden (Ogata-Kawata *et al.*, 2014; Piepoli *et al.*, 2012). Interessanterweise zeigt ein Vergleich von prä- und postoperativen Serumproben, eine signifikant erniedrigte Expressionsrate von *miR-1246* nach der Tumorentfernung (Ogata-Kawata *et al.*, 2014). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die vom Tumor in Exosomen verpackte und ins Serum freigesetzte miR-1246 den Transkriptgehalt vom Tumorgewebe widerspiegelt und somit als prognostischer Marker von Bedeutung ist.

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich in der Serumuntersuchung von Patienten mit einem ösophagealen SCC, wobei auch hier eine stark erhöhte Expression von *miR-1246* nachgewiesen werden konnte und sich diese nach der Entfernung des Primärtumors signifikant reduzierte. Des Weiteren konnten hohe Genexpressionslevel dieser miRNA mit den klinischen Parametern T-Klassifikation T3-T4, Lymphknotenmetastasierung,

Fernmetastasierung und klinischem Stadium III-IV assoziiert werden. Das 2-Jahres-Gesamtüberleben für Patienten mit einer hohen Expression von *miR-1246* im Serum beträgt 21,7 % gegenüber 77,3 % bei Patienten mit einer niedrigen Expressionsrate (Takeshita *et al.*, 2013). Während Fu *et al.* (2013) im Tumorgewebe eine 10,78-fache Überexpression von *miR-1246* verglichen mit Normalgewebe feststellen konnten, zeigten Takeshita *et al.* (2013) lediglich im Tumorgewebe proximaler Lymphknoten gegenüber Lymphknoten anderer Lokalisationen eine veränderte Expression, welche, übereinstimmend mit der Datenlage der vorliegenden Arbeit, jedoch nicht im Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe nachweisbar war.

In oralen SCCs zeigt sich sowohl im Tumorgewebe als auch in entsprechenden Zelllinien (CAL27 und SCC25) eine erhöhte Expression von *miR-1246*, die mit dem TNM-Status, Lymphknotenmetastasierung und Tumorgrad korreliert. Des Weiteren weisen Patienten mit einer gesteigerten Expression eine kürzere Überlebensrate von 55,1 % gegenüber 81,7 % bei Patienten mit einer niedrigen Expression auf (Liao *et al.*, 2015).

Wie bereits im vorangegangenen Text beschrieben, ist die Expression von *miR-1246* in verschiedenen Gewebearten einiger Tumorentitäten dramatisch erhöht und wird als Onco-miRNA bezeichnet, die eine wichtige Funktion in der Tumorbilogie besitzt und vor allem als minimal invasiver Marker Potenzial zeigt. In dieser Arbeit konnte sowohl im Tumorgewebe als auch im Blut von HNSCC-Patienten keine veränderte *miR-1246* Expression gefunden werden. Leider gibt es nach meinem Kenntnisstand keine vergleichbaren Untersuchungen dieser miRNA im Vollblut von Patienten mit einer Krebserkrankung. Interessant wäre jedoch auch hier, wie in der Literatur beschrieben, eine Analyse der in Exosomen verpackten und von Tumoren freigesetzten miRNAs im Serum von HNSCC-Patienten.

#### **5.4.4 Expression von *miR-146a* und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen**

Die Expression des auf dem Chromosomenabschnitt 5q34 gelegenen Gens *miR-146a* ist bei einer Vielzahl an Krebserkrankungen verändert, wie beispielsweise in akuter myeloischer Leukämie (Spinello *et al.*, 2011), Lungenkrebs (Wu *et al.*, 2014c), Brustkrebs (Hurst *et al.*, 2009), Magenkrebs (Hou *et al.*, 2012a; Hou *et al.*, 2012b), Leberkrebs (Huang *et al.*, 2014; Rong *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015), Bauchspeicheldrüsenkrebs (Li *et al.*, 2010), Prostatakrebs (Sun *et al.*, 2014b) und auch in HNSCCs (Scapoli *et al.*, 2010).

Bei Patienten mit Lungenkrebs zeigt sich sowohl im Tumorgewebe als auch im Serum eine erniedrigte Expression von *miR-146a*. Zudem korreliert eine niedrige Expressionsrate im Gewebe von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen mit Lymphknotenmetastasierung und

höherem TNM-Status (Wu *et al.*, 2014c). Chen *et al.* (2013a) konnten außerdem eine Korrelation zu Fernmetastasierung nachweisen. Auch im Serum dieser Patienten konnte eine reduzierte Expression dieser miRNA mit einem schlechteren Überleben korreliert werden (Wu *et al.*, 2014c). Im Gegensatz dazu beschreiben Wang *et al.* (2015) im Serum von Patienten mit einem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom erhöhte *miR-146a* Expressionen, wobei nicht zwischen den Subtypen Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und groß-zelligem Karzinom unterschieden wurde. Funktionelle Analysen zeigen, dass eine Transfektion von miR-146a Mimic zu einer signifikanten Reduzierung der Zellproliferation führt, während eine Inhibierung dieser miRNA eine leichte, statistisch jedoch nicht signifikante Steigerung der Proliferationsrate zur Folge hat. Eine Überexpression inhibiert zudem das Migrationspotenzial und steigert die zelluläre Apoptose (Chen *et al.*, 2013a).

Auch das Tumorgewebe von Patienten mit Leberkrebs zeigt eine verminderte Expression von *miR-146a* auf (Rong *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015), die außerdem mit einem höherem klinischen TNM-Status, Lymphknotenmetastasierung, Fernmetastasierung und Pfortader-Tumorembolie einhergeht (Rong *et al.*, 2014). Eine Überexpression von *miR-146a* führt in allen drei untersuchten Zelllinien zu einer verminderten Proliferation und beeinflusst merklich die Caspase-3/7-Aktivität. Im Gegensatz dazu führt eine Inhibierung dieser miRNA zu einer erhöhten Proliferation in HepG2-Zellen, die jedoch nicht in HepB3- und SNU449-Zellen nachweisbar ist. Interessanterweise führt eine Kombination von miR-146a Mimic und EGFR-gerichteten Agenzien wie Gefitinib, Erlotinib oder Cetuximab zu einer noch gesteigerten Proliferationshemmung in HepG2-Zellen, wobei die Kombination mit Cetuximab den stärksten Effekt aufweist (Huang *et al.*, 2014). Zhang *et al.* (2015) konnten in SMMC-7721- und Huh-7-Zellen keine Auswirkungen auf die Proliferation und Apoptose feststellen, jedoch eine Beeinflussung des Migrations- und Invasionspotenzials, wobei die Invasionsrate der Zellen um etwa 60 % reduziert ist. Untersuchungen hinsichtlich des miR-146a Inhibitors zeigen in Huh-7- und HepG2-Zellen eine Erhöhung der Migration um 39 % bzw. 18 % und eine Steigerung der Invasion um 41 % bzw. 11 %. *In vivo* führt eine Transplantation von miR-146a-transfizierten SMMC-7721-Zellen verglichen mit Wildtyp-SMMC-7721-Zellen zu einer Verminderung von makroskopisch sichtbaren Lebermetastasen von 58,69 % und zu 6±1 Lungenmetastasen im Gegensatz zu 10±1 Lungenmetastasen in der Vergleichsgruppe (Zhang *et al.*, 2015).

Eine erniedrigte Expression von *miR-146a* konnte auch in Zelllinien und im Tumorgewebe von Magenkrebspatienten identifiziert werden, wobei diese nicht nur in den Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen gefunden wurde, sondern auch assoziiert mit zunehmender T-Klassifikation, Lymphknotenmetastasierung, Veneninvasion und schlechterer Zelldifferenzierung. Zudem spricht eine verminderte Expression für eine kürzere Überlebenszeit,

während eine hohe Expressionsrate mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert ist (Kogo *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2012a). Untersuchungen zeigen weiterhin, dass *miR-146a* in Zelllinien mit hohem Invasionspotenzial (SGC-7901 und MKN-45) in geringerem Maß exprimiert wird als in Zelllinien mit niedrigem Invasionspotenzial (MGC-803 und HGC-27) (Yao *et al.*, 2013). Zudem demonstrieren *in vitro* Analysen, dass eine Transfektion von *miR-146a* Mimic zu einer bemerkenswerten Inhibierung der Proliferation, Migration und Invasion von MKN-45-Zellen und zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt (Hou *et al.*, 2012a; Hou *et al.*, 2012b). Kogo *et al.* (2011) konnten ebenfalls eine signifikante Inhibierung der Migration und Invasion nachweisen, jedoch keine Auswirkungen auf die Proliferation von MKN-45-Zellen. Zusätzlich wurde in tierexperimentellen Versuchen die Auswirkung von *miR-146a* Mimic transfizierten MKN-45-Zellen, die Nacktmäusen in die laterale Schwanzvene injiziert wurden, auf die Fernmetastasierung untersucht. Histologische Analysen zeigten dabei weniger Lungenmetastasen bei Nacktmäusen mit MKN-45-*miR-146a*-Zellen verglichen mit Nacktmäusen, die MKN-45-Zellen, transfiziert mit einer Kontroll-miRNA, injiziert bekamen (Hou *et al.*, 2012b).

Ähnliche Ergebnisse zeigen *in vitro* und *in vivo* Experimente bezüglich Brustkrebs. Eine Transfektion von *miR-146a* in Brustadenokarzinomzellen (MDA-MB-231) führt neben einer Inhibierung des Migrations- und Invasionspotenzials dieser Zellen auch bei deren Injizieren in die laterale Schwanzvene von Nacktmäusen zu einer Unterdrückung der Lungenmetastasierung um 69 % (Hurst *et al.*, 2009). Im Plasma von Brustkrebspatientinnen mit Lymphknotenmetastasen, verglichen mit Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen, sind erniedrigte *miR-146a* Expressionslevel nachweisbar. Demgegenüber steht eine Beobachtung, dass erhöhte Expressionslevel mit einem positiven HER2-Status (human epidermal growth factor receptor 2) korrelieren (Stückrath *et al.*, 2015). Diese HER2-positiven Patientinnen wiederum leiden verglichen mit HER2-negativen Patientinnen an einer aggressiveren Form von Brustkrebs, verbunden mit einer ungünstigeren Prognose (Press *et al.*, 1993).

Auch in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, vor allem in den Subtypen M4 und M5, findet sich eine erniedrigte Expression von *miR-146a* verglichen mit normalen CD34-positiven Zellen (Garzon *et al.*, 2008; Spinello *et al.*, 2011). Zudem korreliert die *miR-146a* Expression invers mit dem *CXCR4* (chemokine (C-X-C motif) receptor 4) Membranproteinlevel, einem bereits bekannten, negativ prognostischen Marker für akute myeloische Leukämie. Eine Überexpression von *miR-146a* in U937-Zellen führt zu einer Reduzierung des *CXCR4* Proteingehalts. Diesen Effekt, in Form einer erhöhten *miR-146a* Expression und einer verminderten *CXCR4* Expression, erzielt auch eine Behandlung mit 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, einem Induktor für monozytische Differenzierung und Reifung, der

alleine die Zellproliferation verringert und die Expression der monozytischen Differenzierungsmarker *CD11b* (auch *ITGAM*, integrin alpha M), *CD14* (CD14 molecule) und *CD18* (auch *ITGB2*, integrin beta 2) erhöht. MiR-146a alleine verringert ebenfalls die Proliferation von U937-Zellen und übt in Kombination mit  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> einen synergistischen Effekt auf die Zellproliferation aus, hat jedoch keine Auswirkungen auf die Expression von *CD11b*, *CD14* und *CD18*, das heißt, eine Kombination aus miR-146a und  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> reduziert extrem den *CXCR4* Proteingehalt und die Proliferation ohne dabei die monozytische Differenzierung zu stören. Des Weiteren bewirken AMD3100, ein nicht-peptidischer Antagonist des CXCR4-Rezeptors, und miR-146a in Kombination eine Senkung des CXCR4 Proteingehalts und stimulieren die Medikamentensensitivität von leukämischen Zellen. Diese Daten demonstrieren das enorme Potenzial von miR-146a als mögliches therapeutisches Mittel, vor allem in Kombination mit CXCR4 Inhibitoren, zur Verbesserung der Medikamentensensitivität von leukämischen Zellen (Spinello *et al.*, 2011). Demgegenüber zeigt eine Studie zu akuter promyelozytärer Leukämie, einer seltenen Form der akuten myeloischen Leukämie, eine erhöhte Expression von *miR-146a*, wobei sich die akute promyelozytäre Leukämie auch durch eine günstigere Prognose von den anderen Subtypen der akuten myeloischen Leukämie unterscheidet (Xu *et al.*, 2014a).

Interessanterweise spielt miR-146a auch eine wichtige Rolle in regulatorischen T-Lymphozyten ( $T_{reg}$ -Zellen). Zur Identifizierung von  $T_{reg}$ -Zell-spezifischen miRNAs verglichen Lu *et al.* (2010) das miRNA-Muster in der Maus (*mus musculus*; mmu) von Foxp3 (forkhead box P3; spezifischer Marker für  $T_{reg}$ -Zellen)-positiven  $T_{reg}$ -Zellen und Foxp3-negativen, nicht-regulatorischen CD4-positiven T-Zellen miteinander, wobei mmu-miR-146a als am stärksten hochregulierte miRNA aufgedeckt wurde. Foxp3-positive  $T_{reg}$ -Zellen halten die Immunhomöostase durch die Unterdrückung verschiedenster Entzündungsreaktionen aufrecht. An dieser Suppressorfunktion ist mmu-miR-146a wesentlich beteiligt. In miR-146a-defizienten Mäusen führt ein Defizit von mmu-miR-146a in  $T_{reg}$ -Zellen zu einem Zusammenbruch der Immuntoleranz manifestiert in fatalen IFN $\gamma$  (Interferon gamma)-abhängigen Immun-vermittelten Läsionen in einer Vielzahl von Organen. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass spezifische Aspekte der  $T_{reg}$ -Suppressorfunktion durch diese einzelne miRNA kontrolliert wird und eine optimale Stat1 (signal transducer and activator of transcription 1)-Aktivierung durch mmu-miR-146a wichtig für die  $T_{reg}$ -vermittelte Kontrolle der Th1-Antworten und für die Autoimmunität ist (Lu *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse wird auch im Menschen eine Verbindung zwischen FOXP3 und miR-146a vermutet. Erste Untersuchungen hinsichtlich FOXP3 und miR-146a existieren bereits für Brustkrebs und Prostatakrebs. FOXP3-induzierte miR-146a verhindert *in vitro* die Proliferation und Migration von Tumorzellen, steigert deren Apoptoserate und reduziert *in vivo* die Metastasierung (Liu *et al.*, 2015a; Liu *et al.*, 2015b).

Zusammenfassend kann die Expression von *miR-146a*, die in verschiedenen Gewebearten einer Vielzahl von Tumorentitäten extrem erniedrigt vorliegt, als Tumorsuppressor-miRNA angesehen werden, da sie eine wichtige Funktion in der Tumorbilogie besitzt und vor allem als minimal invasiver Marker Potenzial zeigt. Auch in dieser Arbeit war sowohl im Tumorgewebe als auch im Blut von HNSCC-Patienten eine veränderte *miR-146a* Expression aufgezeigt worden. Während im Vergleich mit Normalgewebe im untersuchten Tumorgewebe keine veränderte Genexpression nachgewiesen werden konnte, korrelierte jedoch eine verminderte Expression von *miR-146a* mit einer zunehmenden Größe und Ausdehnung des Primärtumors (cT-Klassifikation). Aufgrund mangelnder Tumorgewebe-proben von fernmetastasierenden HNSCC-Patienten konnte leider keine Auswertung der Expressionsdaten in Bezug auf den klinischen Parameter „Fernmetastasierung“ erfolgen. Interessanterweise zeigten die Untersuchungen im Vollblut von HNSCC-Patienten mit Fernmetastasen eine verminderte Expression von *miR-146a*, sodass *miR-146a* als metastasierungsassoziiertes Marker im Vollblut von HNSCC-Patienten fungieren könnte. Eine Ursache für dieses veränderte miRNA-Muster könnten die vom Tumor ins Blut freigesetzten Tumorzellen darstellen. Durch den extrem hohen Anteil von mituntersuchten Blutzellen wäre auch der relativ geringe Expressionsunterschied erklärbar, da die Blutzellen ein zum Tumor unterschiedliches miRNA-Muster repräsentieren und dieses somit überdecken. So konnte gezeigt werden, dass unabhängig vom Gesundheitszustand der Probanden eine Überexpression von *miR-146a* spezifisch für T<sub>reg</sub>-Zellen ist (Smigielska-Czepiel *et al.*, 2014), welche die erniedrigte Expression von *miR-146a* in den ins Blut freigesetzten Tumorzellen überdecken könnte. Umgekehrt könnte auch ein Defizit von *miR-146a* in T<sub>reg</sub>-Zellen zu einer fehlenden Immun-vermittelten Unterdrückung von Entzündungsreaktionen geführt und beispielsweise, wie im vorherigen Text beschrieben, IFN $\gamma$ -abhängige Immunvermittelte Läsionen in den von Fernmetastasen betroffenen Organen verursacht haben (Lu *et al.*, 2010). Für die eindeutige Klärung dieser Frage sollten weitergehende Versuche durchgeführt werden.

Um den Einfluss der microRNA 146a auf zelluläre Prozesse von Tumorzellen näher zu studieren, wurde in dieser Arbeit das Proliferations- und Migrationspotenzial von HNSCC-Zellen in Gegenwart von miRNA-Mimics oder -Inhibitoren untersucht. Während die Auswirkungen von *miR-146a* Inhibitoren in FaDu-Zellen aufgrund einer relativ geringen bis fast nicht detektierbaren Expression von *miR-146a* nicht getestet werden konnte, führte eine Transfektion von Mimic *miR-146a* übereinstimmend mit den Literaturdaten zu einer extrem erniedrigten Proliferationsrate. Demgegenüber zeigte eine Transfektion von Mimic *miR-146a* in UM-SCC-1-Zellen keine Beeinflussung, vermutlich aufgrund des bereits initial vorhandenen relativ hohen *miR-146a* Expressionslevels, während eine Inhibierung der *miR-146a* in UM-SCC-1-Zellen eine dramatische Steigerung der Proliferation zur Folge hatte und

somit die Daten der Literatur bestätigt. Auch im Hinblick auf das Migrationspotenzial von humanen Tumorzellen spiegeln die Daten der vorliegenden Arbeit diese der Literatur wider, da das Migrationspotenzial von UM-SCC-1-Zellen durch Mimic miR-146a signifikant reduziert wurde, während eine Inhibierung dieser miRNA zu einer enormen Steigerung der Migration führte. Die nicht detektierbare Migration von FaDu-Zellen wurde vermutlich durch die Kombinationsbehandlung von Transfektionsreagenz, miRNA-Mimic oder -Inhibitor und Aphidicolin verursacht, da alle Reagenzien schon einzeln die Zellvitalität beeinträchtigten und eine Kombination aller Reagenzien eine nicht ausreichende Migration von FaDu-Zellen zur Folge hatte.

Die mit den funktionellen Untersuchungen gewonnenen Daten stimmen nicht nur mit den in der Literatur dargestellten und im vorherigen Text bereits beschriebenen Daten überein, sondern bestätigen auch die eigenen Daten der vorangegangenen Expressionsanalysen. Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse somit den Einfluss der miRNA 146a als aussichtsreichen metastasierungsassoziierten Marker in HNSCCs. Um die Effektivität dieses Markers und eine mögliche Anwendung als prognostischen Marker im klinischen Alltag zu bestätigen, sollte eine Untersuchung auf ein größeres Patientenkollektiv ausgeweitet werden.

#### **5.4.5 Expression von *miR-155* und die funktionelle Rolle des Genprodukts in verschiedenen Krebserkrankungen**

Das auf dem Chromosomenabschnitt 21q21.3 gelegene Gen *miR-155* weist in einer Vielzahl von Erkrankungen eine veränderte Expression auf, wobei diese in der Literatur konträr diskutiert wird. Vor allem in Erkrankungen wie Leukämie (Cammarata *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2014), Gliomen (Sun *et al.*, 2014c), Nasenrachenkrebs (Zhu *et al.*, 2014b), Speiseröhrenkrebs (Zhang *et al.*, 2014c), Lungenkrebs (Gao *et al.*, 2014), Brustkrebs (Liu *et al.*, 2013), Gebärmutterkrebs (Lao *et al.*, 2014), und auch in oralen SCCs (Ni *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014) spielt diese miRNA eine große Rolle in der Tumorbilogie.

In B-Zell-Lymphomen einschließlich chronischer lymphatischer Leukämie wird vermutet, dass der Signalweg via B-Zellrezeptor eine wichtige Rolle in der Pathogenese und/oder Progression spielt. In der Region des B-Zell Integrationsclusters (kurz BIC oder MIR155HG (MIR155 host gene)), das erstmals 1989 beschrieben wurde, ist zudem das Gen *miR-155* kodiert. Beide Transkripte liegen in isolierten Tumorzellen aus Patientenproben mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom verglichen mit normalen zirkulierenden CD19-positiven B-Zellen in einer erhöhten Menge vor. Zudem korreliert die Transkriptmenge mit den klinischen Subtypen von diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen. Der Phänotyp ABC

(aktivierte B-Zellen) hat im Durchschnitt eine zwei- bis dreifach höhere *BIC* mRNA und miR-155 Transkriptmenge als der Phänotyp GC (nicht-aktivierte Keimzentren) (Eis *et al.*, 2005). In einer Studie hinsichtlich chronischer lymphatischer Leukämie weisen 55 Patienten mit einer hohen *miR-155* Expression verglichen mit 31 Patienten mit einer verminderten *miR-155* Expression sowohl eine kürzere behandlungsfreie Überlebenszeit (4,4 Jahre versus 11,4 Jahre) als auch eine kürzere Gesamtüberlebenszeit (11,3 Jahre versus >20 Jahre) auf (Cui *et al.*, 2014). In akuter myeloischer Leukämie wird die Expression von *miR-155* in genetischen Subgruppen unterschiedlich beschrieben. Während die genetische Subgruppe, charakterisiert durch eine Aberration auf Chromosomenabschnitt 3q26, eine verminderte *miR-155* Expression aufweist, zeigt sich in der Subgruppe mit einer erhöhten *FLT3* Expression eine Überexpression von *miR-155* (Cammarata *et al.*, 2010).

In Tumorgewebe von Gliom-Patienten zeigt sich im Vergleich zu normalem Hirngewebe eine erhöhte Expression von *miR-155*, welche zudem mit einem erhöhtem WHO-Grad und einem geringeren Karnofsky-Leistungszustand korreliert. Des Weiteren weisen Patienten mit einer hohen Expression von *miR-155* eine kürzere Progressionsfreie Überlebenszeit und eine kürzere Gesamtüberlebenszeit gegenüber Patienten mit einer niedrigen Expression von *miR-155* auf (Sun *et al.*, 2014c). Eine Transfektion von miR-155 Mimic in U87- und U251-Zellen führt zu einer verstärkten Zellproliferation, während eine Inhibierung dieser miRNA eine geringere Proliferationsrate zur Folge hat. Auswirkungen von miR-155 auf die Apoptose von U87-Zellen konnten nicht festgestellt werden (Zhou *et al.*, 2013).

Neben sieben herunterregulierten miRNAs (*let-7b*, *miR-381*, *miR-10b*, *miR-125a-5p*, *miR-335*, *miR-205* und *miR-145*) konnte im Tumorgewebe von Brustkrebspatientinnen verglichen mit Normalgewebe nur eine hochregulierte miRNA (*miR-155*) gefunden werden. Auch im Serum von Brustkrebspatientinnen zeigt sich eine erhöhte Expression von *miR-155* verglichen mit gesunden Probanden. Zudem korreliert eine hohe miR-155 Transkriptmenge mit dem klinischen Tumorstadium, dem molekularen Typ (Luminal A, Luminal B, Her2-positiv oder dreifach negativ), dem Ki67-Status und dem p53-Status (Liu *et al.*, 2013). In Zelllinien zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von *miR-155* in ERalpha-positiven MCF-7-Zellen verglichen mit ERalpha-negativen MDA-MB-132-Zellen. Zudem führt eine Transfektion von Mimic miR-155 in MCF-7-Zellen zu einer gesteigerten Proliferationsrate und einer erniedrigten Apoptoserate, während eine Inhibierung dieser miRNA gegensätzliche Effekte aufweist (Zhang *et al.*, 2013b).

In Tumorzellen von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinompatienten zeigt sich generell eine höhere Expression von *miR-155* als in normalen Epithelzellen. Während in Adenokarzinompatienten eine Tendenz zwischen einer erhöhten Expression von *miR-155* und einer negativen Prognose besteht, ist in lymphknotenbefallenen SCC-Patienten eine hohe

Expression von *miR-155* mit einer vorteilhaften Prognose verbunden. Das 5-Jahres-Überleben beträgt für diese Patienten 68 % gegenüber 32 % bei Patienten mit einer niedrigen Expression (Donnem *et al.*, 2011). Zudem konnte im Serum von Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom eine erniedrigte Expression von *miR-155* nachgewiesen werden. In den dazugehörigen Plasmaproben konnten keine Veränderungen festgestellt werden (Heegaard *et al.*, 2012). Zusätzlich zeigen *in vitro* Untersuchungen, dass Veränderungen der Transkriptmenge keine Auswirkung auf das Migrations- und Invasionspotenzial der Tumorzellen haben. Die Transkriptmenge dieser miRNA beeinflusst jedoch das Ansprechen auf eine Radiotherapie. Während eine Transfektion mit synthetischen pre-miR-155 Molekülen einen radioresistenten Effekt auf A549- und H460-Zellen ausübt, bewirkt eine Inhibierung dieser miRNA eine Radiosensitivität der Zellen (Babar *et al.*, 2011).

Untersuchungen in ösophagealen SCCs zeigen, dass 60 % dieser Tumoren eine erhöhte Expression von *miR-155* in Tumorzellen verglichen mit Normalzellen aufweisen, während 26,7 % bzw. 13,3 % der Tumoren eine unveränderte bzw. erniedrigte Expression von *miR-155* zeigen. Eine Transfektion von Mimic miR-155 in EC-1-Zellen führt zu einer verstärkten Proliferation. Zudem bewirkt eine Injektion von miR-155-transfizierten EC-1-Zellen in Nacktmäuse eine Tumorbildung mit einer Durchschnittsgröße von  $611,3 \text{ mm}^3 \pm 100,2 \text{ mm}^3$  und einem Durchschnittsgewicht von  $456,0 \text{ mg} \pm 77,5 \text{ mg}$  verglichen mit der Kontrollgruppe, deren Tumoren eine mittlere Größe von  $277,0 \text{ mm}^3 \pm 7,0 \text{ mm}^3$  und ein mittleres Gewicht von  $184,0 \text{ mg} \pm 47,8 \text{ mg}$  aufweisen (Zhang *et al.*, 2014c).

In oralen SCCs wird die Expression von *miR-155* kontrovers diskutiert. Während einige Studien (Ni *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014) eine erhöhte Genexpression im Tumorgewebe beschreiben, finden Scapoli *et al.* (2010) eine Korrelation zwischen erniedrigter Genexpression und Lymphknotenmetastasierung. Ni *et al.* (2014) beschreiben sowohl im Tumorgewebe als auch in zwei oralen SCC-Zelllinien (HSC-3 und SCC-4) eine erhöhte Expression von *miR-155*, die zudem im Tumorgewebe dieser Patienten mit dem histologischen Grad korreliert. Eine Transfektion mit entsprechenden Mimics bzw. Inhibitoren führt zu einer gesteigerten bzw. reduzierten Proliferationsrate der Tumorzellen (Ni *et al.*, 2014). Shi *et al.* (2014) konnten zeigen, dass von 30 untersuchten oralen SCCs 23 eine erhöhte Expression von *miR-155* besitzen. Neben einer Analyse mittels quantitativer Real-Time PCR führte diese Arbeitsgruppe zudem die noch recht selten in miRNA-Untersuchungen genutzte Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durch. Auch mit dieser Methode konnte in 10 von 11 oralen SCCs eine Überexpression nachgewiesen werden. Dabei wurde die microRNA 155 vor allem in Tumorzellnestern, in Entzündungsarealen und im vaskulären Endothel der oralen SCCs detektiert. Zusätzliche

Kaplan-Meier-Analysen zeigen, dass hohe Expressionslevel mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Shi *et al.*, 2014). Eine Injektion von Anti-miR-155-transfizierten KB-Zellen (orale SCC-Zelllinie) in Nacktmäuse führte zu einer signifikanten Reduzierung des Tumolvolumens und -gewichts verglichen mit einer Mock-transfizierten KB-Zellinjektion (Rather *et al.*, 2013).

Wie bereits im vorangegangenen Text beschrieben, wird in der Literatur die Expression von *miR-155* in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich diskutiert. In einem Großteil der Studien wird die Expression von *miR-155* allerdings als erhöht und das Genprodukt somit als onkogene miRNA beschrieben. Im Gegensatz dazu wird miR-155 aber auch in einem kleineren Studienkollektiv mit einer erniedrigten Genexpression als Tumorsuppressor-miRNA bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl im Tumorgewebe als auch im Blut von HNSCC-Patienten eine veränderte *miR-155* Expression gefunden werden. Während im Vergleich mit Normalgewebe im untersuchten Tumorgewebe eine erniedrigte Genexpression nachgewiesen werden konnte, gab es keine signifikanten Korrelationen mit den klinischen Daten der Patienten, wobei jedoch eine Auswertung der Expressionsdaten im Hinblick auf den klinischen Parameter „Fernmetastasierung“ aufgrund fehlender Tumorgewebeproben von fernmetastasierenden HNSCC-Patienten nicht erfolgen konnte. Interessanterweise zeigten jedoch die aktuellen Untersuchungen im Vollblut von HNSCC-Patienten eine verminderte Expression von *miR-155* assoziiert mit Fernmetastasierung, sodass diese miRNA in Kopf-Hals-Tumorpatienten als prognostischer Marker zur Früherkennung von Fernmetastasen geeignet wäre und bereits im Rahmen der Voruntersuchung im Vollblut dieser Patienten untersucht werden könnte.

Um den Einfluss der microRNA 155 auf zelluläre Prozesse näher zu studieren, wurde darüber hinaus in dieser Arbeit das Proliferations- und Migrationspotenzial von HNSCC-Zellen in Gegenwart von deren Mimics oder Inhibitoren untersucht. Während eine Transfektion mit Mimic miR-155 sowohl in FaDu- als auch in UM-SCC-1-Zellen die Proliferationsrate extrem reduzierte, führte eine Inhibierung dieser miRNA zu einer signifikanten Erhöhung der Zellproliferation. Zudem wurde das Migrationspotenzial von UM-SCC-1-Zellen durch Mimic miR-155 dramatisch erniedrigt, während eine Inhibierung dieser miRNA zu einer enormen Steigerung der Migration führte. Die nicht detektierbare Migration von FaDu-Zellen wurde vermutlich, wie schon in Kapitel 5.4.4 diskutiert, durch die Kombinationsbehandlung von Transfektionsreagenz, miRNA-Mimic oder -Inhibitor und dem Proliferationsinhibitor Aphidicolin verursacht, da alle Reagenzien schon einzeln die Zellvitalität beeinträchtigten und eine Kombination aller Reagenzien eine nicht ausreichende Migration von FaDu-Zellen zur Folge hatte.

Diese anhand der funktionellen Untersuchungen gewonnenen Daten bestätigen das Potenzial von miR-155 als metastasierungsassoziierte miRNA basierend auf der erniedrigten Genexpression. Die teilweise bestehenden Unterschiede in einem Großteil der Literatur hinsichtlich der konträr beschriebenen Expression können durch verschiedene Faktoren wie Untersuchung anderer Tumorentitäten, Verwendung unterschiedlicher Ausgangsmaterialien, Kontrollen, Probenkollektiven und -größen sowie verschiedener Tumorlokalisationen, vor allem im Hinblick auf Kopf-Hals-Tumoren, entstehen. Trotz allem lässt die Datenlage unabhängig von der Tumorentität eine Korrelation zwischen einer erniedrigten *miR-155* Expression und Metastasierung erkennen. In dieser Arbeit konnte die microRNA 155 als möglicher metastasierungsassoziiertes Marker identifiziert und charakterisiert werden. Um die Effektivität dieses Markers und eine mögliche Anwendung als prognostischen Marker im klinischen Alltag zu bestätigen, sollten die Untersuchungen auf ein größeres Patientenkollektiv ausgedehnt werden.

### **5.5 Ausblick und Vorschläge für weitere Untersuchungen**

Bei Betrachtung der in den vorangegangenen Kapiteln diskutierten Studien und deren Untersuchungsmethoden fällt auf, dass verschiedene Techniken zur Bestimmung des Proliferations- und Migrationsverhaltens von humanen Tumorzellen verwendet werden. Zur Analyse der Zellproliferation kommen überwiegend Methoden basierend auf einer Vitalitätsbestimmung unter Verwendung der Farbstoffe Trypanblau und 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolimbromid (MTT-Assay) zum Einsatz. Einige Studien nutzen auch den sogenannten Scratch-Assay, bei dem einem dichten Zellrasen eine definierte „Wunde“ zugefügt wird und die Zeit bis zum Zuwachsen der verschiedenen transfizierten Zellen gemessen und miteinander verglichen wird. Diese Techniken zeichnen sich durch ihre einfache und kostengünstige Durchführbarkeit aus. Zudem ist das hierfür benötigte technische Equipment in vielen Laboren bereits vorhanden. In der vorliegenden eigenen Arbeit wurde auf das xCELLigence System zurückgegriffen, welches eine kontinuierliche Aufzeichnung des Proliferationsverhaltens erlaubt und sich somit optimal zur Bestimmung möglicher Proliferationsunterschiede eignet. Der gesamte Versuch läuft in einem geschlossenen System ab, sodass mögliche Fehler, wie beispielsweise eine fehlerhafte Zellzählung nach Trypanblaufärbung durch das unvollständige Ablösen der Zellen beim Abtrypsinieren, nicht auftreten können. Daher sollte auch in zukünftigen Versuchen weiterhin das xCELLigence System verwendet werden.

Zur Bestimmung des Migrationsverhaltens von humanen Tumorzellen wird sowohl in dieser Arbeit als auch in der Mehrheit der publizierten Studien das Transwell-System genutzt. Während jedoch in der vorliegenden Arbeit in den Migrationsanalysen Aphidicolin zur

Unterdrückung der Zellproliferation eingesetzt wurde, sind in vergleichbaren publizierten Studien nach bestem Kenntnisstand keine Proliferationshemmer verwendet bzw. nicht explizit erwähnt worden. Meines Erachtens sind die in der Literatur dargestellten Daten hinsichtlich des Migrationsverhaltens daher kritisch zu betrachten, da die beschriebenen Effekte durch bestehende Proliferationsunterschiede verursacht bzw. beeinflusst sein könnten. Zukünftige Versuche sollten bei schon bestehenden Effekten daher immer Inhibitoren einsetzen.

Im Rahmen weiterführender Untersuchungen sollten die in dieser Arbeit im Vollblut identifizierten und funktionell charakterisierten, metastasierungsassoziierten miRNAs (miR-146a und miR-155) an einem größeren Patientenkollektiv, eventuell im Rahmen einer Multicenterstudie, validiert werden, um daran ihre Relevanz und Anwendbarkeit in der klinischen Diagnostik zu überprüfen. Eine darüber hinausgehende massenspektrometrische Betrachtung des gesamten zellulären Proteoms von zuvor mit miRNA-Mimics und miRNA-Inhibitoren vorbehandelten Zellen auf relevant deregulierte Proteine würde es zudem ermöglichen, weitere Marker für eine verbesserte Prognoseeinschätzung für den Patienten aufzudecken, sodass nicht nur Aussagen bezüglich der Fernmetastasierung getroffen, sondern weitere Prognosefaktoren identifiziert werden könnten. Zudem könnten Interaktionen zwischen Proteinen aufgedeckt werden, die zu neuen Erkenntnissen in der Tumorbilogie führen und somit auch zu einer individualisierteren Therapieplanung herangezogen werden könnten.

Während die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen im Vollblut das miRNA-Muster aller Blutzellen und daher in erster Linie mögliche Immunantworten repräsentieren, reflektieren zirkulierende miRNAs, die aktiv von Tumorzellen in Exosomen verpackt ins Blut entlassen werden, vor allem das miRNome des Tumorgewebes. Diese bieten somit eine weitere Möglichkeit zum Erhalt von prognostischen und prädiktiven Informationen, wodurch dieses Vorgehen anderweitige Reaktionen von miRNAs im Blut, die unabhängig von der Tumorerkrankung vorliegen, nicht berücksichtigen würde. Daher wäre ein weiterer vielversprechender Ansatz für nachfolgende Untersuchungen eine Analyse von in Exosomen verpackten und von Tumorzellen freigesetzten miRNAs. Deren Identifizierung, funktionelle Charakterisierung und anschließende Proteomanalysen würden neue Informationen hinsichtlich spezifischer diagnostischer und prognostischer Marker für HNSCC-Patienten aufdecken und könnten letztendlich zu einer verbesserten Prognoseeinschätzung und Therapieplanung für den Patienten beitragen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Åkervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, Jin Y, Loftus B, Mertens F, Wennerberg JP (1997) Amplification of *cyclin D1* in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and *cyclin D1* overexpression. *Cancer* 79: 380-389.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2011) Molekularbiologie der Zelle. 5. Auflage. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim.
3. Altieri A, Bosetti C, Talamini R, Gallus S, Franceschi S, Levi F, Dal Maso L, Negri E, La Vecchia C (2002) Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer. *Br J Cancer* 87: 1227-1229.
4. Ambros V, Bartel B, Bateil DP, Burge CB, Carrinton JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-279.
5. Andersson-Anvret M, Forsby N, Klein G, Henle W (1977) Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridization and histological examination. *Int J Cancer* 29: 486-494.
6. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX (1998) Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* 58: 5-13.
7. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363: 24-35.
8. Ang SH, Haaland B, Acharyya S, Thu MM, Krisna SS, Hwang SG, Tan PH, Ng QS, Tan DS, Tai WM, Tan EH, Lim WT, Ang MK (2014) Interactions between clinical factors, *p16*, and *cyclin-D1* expression and survival outcomes in oropharyngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* doi: 10.1002/hed.23803.
9. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008) Head and neck cancer. *Lancet* 371: 1695-1709.
10. Attner P, Du J, Näsman A, Hammarstedt L, Ramqvist T, Lindholm J, Marklund L, Dalianis T, Munck-Wikland E (2010) The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer* 126: 2879-2884.

11. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ (2009a) MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 2850-2855.
12. Avissar M, McClean MD, Kelsey KT, Marsit CJ (2009b) MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. *Carcinogenesis* 30: 2059-2063.
13. Ayaz L, Görür A, Yaroğlu HY, Özcan C, Tamer L (2013) Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 139: 1499-1506.
14. Babar IA, Czocho J, Steinmetz A, Weidhaas JB, Glazer PM, Slack FJ (2011) Inhibition of hypoxia-induced miR-155 radiosensitizes hypoxic lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 12: 908-914.
15. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G (2001) A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* 85: 1700-1705.
16. Baldeón RL, Weigelt K, de Wit H, Ozcan B, van Oudenaren A, Sempértegui F, Sijbrands E, Grosse L, Freire W, Drexhage HA, Leenen PJ (2014) Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. *PLoS One* 12: e115209.
17. Balz V, Scheckenbach K, Götte K, Bockmühl U, Petersen I, Bier H (2003) Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of *p53* exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 *E6* transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res* 63: 1188-1191.
18. Barker EV, Cervigne NK, Reis PP, Goswami RS, Xu W, Weinreb I, Irish JC, Kamel-Reid S (2009) MicroRNA evaluation of unknown primary lesions in the head and neck. *Mol Cancer* 8: 127.
19. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) (2005) Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Press, Lyon.
20. Berghaus A, Rettinger G, Böhme G (1996) Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Hippokrates Verlag, Stuttgart.
21. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
22. Betiol J, Villa LL, Sichero L (2013) Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res* 46: 217-226.

23. Bi Q, Tang S, Xia L, Du R, Fan R, Gao L, Jin J, Liang S, Chen Z, Xu G, Nie Y, Wu K, Liu J, Shi Y, Ding J, Fan D (2012) Ectopic expression of *miR-125a* inhibits the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting *MMP11* and *VEGF*. PLoS One 7: e40169.
24. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res 48: 3282-3287.
25. Blot W, McLaughlin J, Devesa S, Fraumeni J (1996) Cancers of the oral cavity and pharynx. In: Schoffenfeld D, Fraumeni J (eds) Cancer epidemiology and prevention. Oxford University Press, New York, pp. 666–680.
26. Bockmühl U (1998) Bedeutung der Analyse genetischer Alterationen bei Kopf-Hals-Karzinomen. HNO 46: 74-83.
27. Bohnsack MT, Czaplinski K, Görlich D (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA 10: 185-191.
28. Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, Jensen MJ, Morgan GJ, Hughes CJ, Sutherland RL (1999) *Cyclin D1* and *p16<sup>INK4A</sup>* expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. Clin Cancer Res 5: 2810-2819.
29. Brito JAR, Gomes CC, Santos Pimenta FJ, Barbosa AA, Prado MA, Prado VF, Gomez MV, Gomez RS (2010) Reduced expression of *miR15a* in the blood of patients with oral squamous cell carcinoma is associated with tumor staging. Exp Ther Med 1: 217-221.
30. Brundret KM, Dalziel W, Hesp B, Jarvis JAJ, Neidle S (1972) X-Ray crystallographic determination of the structure of the antibiotic aphidicolin: a tetracyclic diterpenoid containing a new ring system. J Chem Soc Chem Commun 18: 1027-1028.
31. Bucknall RA, Moores H, Simms R, Hesp B (1973) Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporium aphidicola*. Antimicrob Agents Chemother 4: 294-298.
32. Burgos JS (2005) Involvement of the Epstein-Barr virus in the nasopharyngeal carcinoma pathogenesis. Med Oncol 22: 113-121.
33. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are precessed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA 10: 1957-1966.
34. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawrow H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidranski D (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res 56: 2488-2492.

35. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15524-29.
36. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2003) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2999-3004.
37. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11755-11760.
38. Cammarata G, Augugliaro L, Salemi D, Agueli C, La Rosa M, Dagnino L, Civiletto G, Messina F, Marfia A, Bica MG, Cascio L, Floridia PM, Mineo AM, Russo M, Fabbiano F, Santoro A (2010) Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 85: 331-339.
39. Campbell NA, Reece JB, Markl J (2006) *Biologie*. 6. Auflage. Pearson Studium, München.
40. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX (2004) The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 108: 741-749.
41. Cervigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Brandley G, Galloni NN, Pintilie M, Jurisica I, Perez-Ordóñez B, Gilbert R, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S (2009) Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet* 18: 4818-4829.
42. Chang SS, Jiang WW, Smith I, Poeta LM, Begum S, Glazer C, Shan S, Westra W, Sidransky D, Califano JA (2008) MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 123: 2791-2797.
43. Chen G, Umelo IA, Lv S, Teugels E, Fostier K, Kronenberger P, Dewaele A, Sadones J, Geers C, De Grève J (2013a) MiR-146a inhibits cell growth, cell migration and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 8: e60317.

44. Chen J, Yao D, Li Y, Chen H, He C, Ding N, Lu Y, Ou T, Zhao S, Li L, Long F (2013b) Serum microRNA expression levels can predict lymph node metastasis in patients with early-stage cervical squamous cell carcinoma. *Int J of Mol Med* 32: 557-567.
45. Chen J, Yao D, Zhao S, He C, Ding N, Li L, Long F (2014) MiR-1246 promotes SiHa cervical cancer cell proliferation, invasion, and migration through suppression of its target gene thrombospondin 2. *Arch Gynecol Obstet* 290: 725-732.
46. Chen Z, Jin Y, Yu D, Wang A, Mahjabeen I, Wang C, Liu X, Zhou X (2012) Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 48: 686-691.
47. Cheng MW, Wang LL, Hu GY (2015a) Expression of microRNA-218 and its clinicopathological and prognostic significance in human glioma cases. *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 1839-1843.
48. Cheng Y, Yang X, Deng X, Zhang X, Li P, Tao J, Lu Q (2015b) MicroRNA-218 inhibits bladder cancer cell proliferation, migration, and invasion by targeting BMI-1. *Tumour Biol* doi: 10.1007/s13277-015-3532-x.
49. Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, Chen Q, Burk RD, Smith RV, Prystowsky MB, Belbin TJ, Schlecht NF (2009) Low-level expression of microRNAs *let-7d* and *miR-205* are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *AJP* 174: 736-745.
50. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1351-1358.
51. Cinatl J Jr, Cinatl J, Kotchetkov R, Driever PH, Bertels S, Siems K, Jas G, Bindseil K, Rabenau HF, Pouckova P, Doerr HW, Schwabe D (1999) Aphidicolin glycinate inhibits human neuroblastoma cell growth *in vivo*. *Oncol Rep* 6: 563-568.
52. Cortez MA, Nicoloso MS, Shimizu M, Rossi S, Gopisetty G, Molina JR, Carlotti C Jr, Tirapelli D, Neder L, Brassesco MS, Scrideli CA, Tone LG, Georgescu MM, Zhang W, Puduvalli V, Calin GA (2010) MiR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 981-990.
53. Cowden Dahl KD, Dahl R, Kruichak JN, Hudson LG (2009) The epidermal growth factor receptor responsive miR-125a represses mesenchymal morphology in ovarian cancer cells. *Neoplasia* 11: 1208-1215.
54. Cui B, Chen L, Zhang S, Mraz M, Fecteau JF, Yu J, Ghia EM, Zhang L, Bao L, Rassenti LZ, Messer K, Calin GA, Croce CM, Kipps TJ (2014) MicroRNA-155 influences B-cell

- receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 124: 546-554.
55. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356: 1944-1956.
  56. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML (2009) Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 199: 1263-1269.
  57. Davidson MR, Larsen JE, Yang IA, Hayward NK, Clarke BE, Duhig EE, Passmore LH, Bowman RV, Fong KM (2010) MicroRNA-218 is deleted and downregulated in lung squamous cell carcinoma. *PLoS One* 5: e12560.
  58. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 432: 231-235.
  59. Deschler DG, Richmon JD, Khariwala SS, Ferris RL, Wang MB (2014) The "new" head and neck cancer patient – young, nonsmoker, nondrinker and HPV positive: evaluation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 151: 375-380.
  60. Donnem T, Eklo K, Berg T, Sorbye SW, Lonvik K, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Stenvold H, Bremnes RM, Busund LT (2011) Prognostic impact of miR-155 in non-small cell lung cancer evaluated by *in situ* hybridization. *J Transl Med* 9: 6.
  61. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE (2005) Accumulation of miR-155 and *BIC* RNA in human B cell lymphomas. *PNAS* 102: 3627-3632.
  62. El-Naggar AK, Westra WH (2011) *P16* expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck* 34: 459-461.
  63. ElSharawy A, Keller A, Flachsbart F, Wendschlag A, Jacobs G, Kefer N, Brefort T, Leidinger P, Backes C, Meese E, Schreiber S, Rosenstiel P, Franke A, Nebel A (2012) Genome-wide miRNA signatures of human longevity. *Aging Cell* 11: 607-616.
  64. Elwood JM, Pearson JCG, Skippen DH, Kackson SM (1984) Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Int J Cancer* 34: 603-612.
  65. Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259-269.

66. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100: 261-269.
67. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917.
68. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, Tornillo L, Wolfensberger M, Terracciano LM (2009) Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer* 126: 1256-1262.
69. Fletcher AM, Heaford AC, Trask DK (2008) Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific *miR-205*. *Transl Oncol* 1: 202-208.
70. Fu HL, Wu DP, Wang XF, Wang JG, Jiao F, Song LL, Xie H, Wen XY, Shan HS, Du YX, Zhao YP (2013) Altered miRNA expression is associated with differentiation, invasion, and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in patients from Huaian, China. *Cell Biochem Biophys* 67: 657-668.
71. Gao C, Zhang Z, Liu W, Xiao S, Gu W, Lu H (2010) Reduced microRNA-218 expression is associated with high nuclear factor kappa B activation in gastric cancer. *Cancer* 116: 41-49.
72. Gao F, Chang J, Wang H, Zhang G (2014) Potential diagnostic value of miR-155 in serum from lung adenocarcinoma patients. *Oncol Rep* 31: 351-357.
73. Gao G, Gay HA, Chernock RD, Zhang TR, Luo J, Thorstad WL, Lewis JS, Wang X (2013) A microRNA expression signature for the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 119: 72-80.
74. Garrote LF, Herrero R, Reyes RM, Vaccarella S, Anta JL, Ferbeye L, Muñoz N, Franceschi S (2001) Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer* 85: 46-54.
75. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM (2008) MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 111: 3183-3189.

76. Gee HE, Camps C, Buffa FM, Patiar S, Winter SC, Betts G, Homer J, Corbridge R, Cox G, West CML, Ragoussis J, Harris AL (2010) Hsa-miR-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer* 116: 2148-2158.
77. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92: 709-720.
78. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong Z, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK (2012) Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA* 307: 693-703.
79. Glombitza F, Guntinas-Lichius O, Petersen I (2010) HPV status in head and neck tumors. *Pathol Res Pract* 206: 229-234.
80. Gray N, Zaridze D, Robertson C, Krivosheeva L, Sigacheva N, Boyle P, Group TI (2000) Variation within global cigarette brands in tar, nicotine, and certain nitrosamines: analytic study. *Tob Control* 9: 351-354.
81. Gregory RI, Yan K, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004) The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432: 235-240.
82. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34: 140-144.
83. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23-34.
84. Gu JJ, Gao GZ, Zhang SM (2015) MiR-218 inhibits the migration and invasion of glioma U87 cells through the Slit2-Robo1 pathway. *Oncol Lett* 9: 1561-1566.
85. Guan H, Wie G, Wu J, Fang D, Liao Z, Xiao H, Li M, Li Y (2013) Down-regulation of *miR-218-2* and its host gene *SLIT3* cooperate to promote invasion and progression of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 1334-1344.
86. Guan Y, Yao H, Zheng Z, Qiu G, Sun K (2011) MiR-125b targets *BCL3* and suppresses ovarian cancer proliferation. *Int J Cancer* 128: 2274-2283.
87. Guo X, Wu Y, Hartley RS (2009) MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biol* 6: 575-583.

88. Hafkamp HC, Speel EJM, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WNM, Ramaekers FCS, Hopman AHN, Manni JJ (2003) A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of  $p16^{INK4A}$  and  $p53$  in the absence of mutations in  $p53$  exons 5-8. *Int J Cancer* 107: 394-400.
89. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, Hopman AHN, Ramaekers FCS, Speel EJM (2008) Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer* 122: 2656-2664.
90. Han G, Fan M, Zhang X (2015) MicroRNA-218 inhibits prostate cancer cell growth and promotes apoptosis by repressing *TPD52* expression. *Biochem Biophys Res Commun* 456: 804-809.
91. Han J, Lee Y, Yeom K, Kim Y, Jin H, Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18: 3016-3027.
92. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, Vokes EE, Weichselbaum RR (1996) Human papilloma virus and  $p53$  in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* 2: 755-762.
93. Harris T, Jimenez L, Kawachi N, Fan JB, Chen J, Belbin T, Ramnauth A, Loudig O, Keller CE, Smith R, Prystowsky MB, Schlecht NF, Segall JE, Childs G (2012) Low-level expression of *miR-375* correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas. *AJP* 180: 917-928.
94. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianovan E, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P (2007) Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 99: 777-789.
95. Hashibe M, Brennan P, Chuang S, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang ZF, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P

- (2009) Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 541-550.
96. Hauser U, Balz V, Carey TE, Grénman R, Van Lierop A, Scheckenbach K, Bier H (2002) Reliable detection of *p53* aberrations in squamous cell carcinomas of the head and neck requires transcript analysis of the entire coding region. *Head Neck* 24: 868-873.
97. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A (2005) The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 19075-19080.
98. He X, Dong Y, Wu CW, Zhao Z, Ng SSM, Chan FKL, Sung JJY, Yu J (2012) MicroRNA-218 inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis in colon cancer by downregulating BMI1 polycomb ring finger oncogene. *Mol Med* 18: 1491-1498.
99. Heegaard NHH, Schetter AJ, Welsh JA, Yoneda M, Bowman ED, Harris CC (2012) Circulating microRNA expression profiles in early stage non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 130: 1378-1386.
100. Higuchi E, Oridate N, Homma A, Suzuki F, Atago Y, Nagahashi T, Furuta Y, Fukuda S (2007) Prognostic significance of cyclin D1 and p16 in patients with intermediate-risk head and neck squamous cell carcinoma treated with docetaxel and concurrent radiotherapy. *Head Neck* 29: 940-947.
101. Hoffmann M, Ihloff AS, Görögh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, Rittgen W, Schwarz E, Kahn T (2010) *P16<sup>INK4A</sup>* overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 127: 1595-1602.
102. Holzapfel B, Wickert L (2007) Methoden und Anwendungsgebiete - Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol. Unserer Zeit* 2. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
103. Hong A, Jones D, Chatfield M, Lee CS, Zhang M, Clark J, Elliott M, Harnett G, Milross C, Rose B (2012) HPV status of oropharyngeal cancer by combination HPV DNA/p16 testing: biological relevance of discordant results. *Ann Surg Oncol* doi: 10.1245/s10434-012-2778-4.
104. Hou Z, Yin H, Chen C, Dai X, Li X, Liu B, Fang X (2012a) MicroRNA-146a targets the L1 cell adhesion molecule and suppress the metastatic potential of gastric cancer. *Mol Med Rep* 6: 501-506.

105. Hou Z, Xie L, Yu L, Qian X, Liu B (2012b) MicroRNA-146a is down-regulated in gastric cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Med Oncol* 29: 886-892.
106. Hsieh TH, Hsu CY, Tsai CF, Long CY, Chai CY, Hou MF, Lee JN, Wu DC, Wang SC, Tsai EM (2014) MiR-125a-5p is a prognostic biomarker that targets *HDAC4* to suppress breast tumorigenesis. *Oncotarget* 6: 494-509.
107. Hsu CM, Lin PM, Wang YM, Chen ZJ, Lin SF, Yang MY (2012) Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* doi: 10.1007/s13277-012-0454-8.
108. Huang L, Lin JX, Yu YH, Zhang MY, Wang HY, Zheng M (2012) Downregulation of six microRNAs is associated with advanced stage, lymph node metastasis and poor prognosis in small cell carcinoma of the cervix. *PLoS One* 7 doi: 10.1371/journal.pone.0033762.
109. Huang Q, Yu GP, McCormick SA, Mo J, Datta B, Mahimkar M, Lazarus P, Schäffer AA, Desper R, Schantz SP (2002) Genetic differences detected by comparative Genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 224-233.
110. Huang S, He R, Rong M, Dang Y, Chen G (2014) Synergistic effect of miR-146a mimic and cetuximab on hepatocellular carcinoma cells. *Biomed Res Int* 2014: 384121.
111. Huberman JA (1981) New views of the biochemistry of eucaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase alpha. *Cell* 23: 647-648.
112. Hui ABY, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordóñez B, Jurisica I, O'Sullivan B, Waldron J, Gullane P, Cummings B, Liu FF (2010) Comprehensive microRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 16: 1129-1139.
113. Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR (2009) Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146a, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 69: 1279-83.
114. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme dicer in the maturation of the *let-7d* small temporal RNA. *Science* 293: 834-838.
115. Hutvagner G, Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056-2060.

116. Ikegami S, Taguchi T, Ohashi M, Oguro M, Nagano H, Mano Y (1978) Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. *Nature* 275: 458-460.
117. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65: 7065-7700.
118. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Ménard S, Croce CM (2007) MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67: 8699-8707.
119. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90.
120. Jiang L, Huang Q, Zhang S, Zhang Q, Chang J, Qiu X, Wang E (2010) Hsa-miR-125a-3p and hsa-miR-125a-5p are downregulated in non-small cell lung cancer and have inverse effects on invasion and migration of lung cancer cells. *BMC Cancer* 10: 318.
121. Jiang Z, Song Q, Yang S, Zeng R, Li X, Jinag C, Ding W, Zhang J, Zheng Y (2015) Serum microRNA-218 is a potential biomarker for esophageal cancer. *Cancer Biomark* doi: 10.3233/CBM-150464.
122. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldmann F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821.
123. Keller A, Leidinger P, Borries A, Wendschlag A, Wucherpfennig F, Scheffler M, Huwer H, Lenhof HP, Meese E (2009) MiRNAs in lung cancer - Studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BMC Cancer* 9: 353.
124. Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15: 2654-2659.
125. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115: 209-216.
126. Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hiromo Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K, Itoh H (2010) Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers in HNSCC and ESCC. *Oncol Rep* 23: 1625-1633.

127. Kinoshita T, Hanazawa T, Nohata N, Kikkawa N, Enokida H, Yoshino H, Yamasaki T, Hidaka H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N (2012) Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion through targeting *laminin-332* in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 3: 1386-1400.
128. Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A, Manni JJ, Slootweg PJ, Weissenborn SJ, Klusmann JP, Speel EJM (2010) *P16<sup>INK4A</sup>* overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology* 56: 957-967.
129. Klusmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003) Expression of *p16* protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 162: 747-753.
130. Klusmann JP, Dinh S, Guntinas-Lichius O, Wittekindt C, Weißenborn S, Wieland U, Dienes HP, Hoffmann T, Smith E, Turek L, Speel EJM, Pfister HJ (2004) HPV-assozierte Tonsillenkarzinome - Ein Update. *HNO* 52: 208-218.
131. Klusmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, Claessen SMH, Stenner M, Huebbers CU, Weissenborn SJ, Wedemeyer I, Preuss SF, Straetmans JMJA, Manni JJ, Hopman AHN, Speel EJM (2009) Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res* 15: 1779-1786.
132. Knight SW, Bass BL (2001) A role for the RNase III enzyme *DCR-1* in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2269-2271.
133. Kofler B, Uecker FC, Muenscher A, Knecht R (2012) Neue Aspekte HPV-positiver Kopf-Hals-Karzinome. *HNO* 60: 404-409.
134. Kogo R, Mimori K, Tanaka F, Komune S, Mori M (2011) Clinical significance of *miR-146a* in gastric cancer cases. *Clin Cancer Res* 17: 4277-84.
135. Kogo R, How C, Chaudary N, Bruce J, Shi W, Hill RP, Zahedi P, Yip KW, Liu FF (2014) The *microRNA-218~Survivin* axis regulates migration, invasion, and lymph node metastasis in cervical cancer. *Oncotarget* 6: 1090-1100.
136. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) MiRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42: D68-73.
137. Kreimer AR, Gary MC, Boyle P, Franceschi S (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 467-75.
138. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858.

139. Lai CY, Wu YT, Yu SL, Yu YH, Lee SY, Liu CM, Hsieh WS, Hwu HG, Chen PC, Jeng SF, Chen WJ (2014) Modulated expression of human peripheral blood microRNAs from infancy to adulthood and its role in aging. *Aging Cell* 13: 679-689.
140. Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Norrild B, Borup R, Garnæs, Rossing M, Specht L, Therkildsen MH, Nauntofte B, Dabelsteen S, von Buchwald C (2011) Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer* 104: 830-840.
141. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14: 2162-2167.
142. Lang, G (2013) Histotechnik. Springer Verlag, Vien.
143. Lao G, Liu P, Wu Q, Zhang W, Liu Y, Yang L, Ma C (2014) MiR-155 promotes cervical cancer cell proliferation through suppression of its target gene *LKB1*. *Tumor Biol* doi: 10.1007/s13277-014-2479-7.
144. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J (2009) Effect of HPV-associated *p16<sup>INK4A</sup>* expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 27: 1992-1998.
145. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J, Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA) (2010) HPV-associated *p16*-expression and response to hypoxic modification of radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 94: 30-35.
146. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858–862.
147. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
148. Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862–864.
149. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419.
150. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060.

151. Leidinger P, Keller A, Borries A, Reichrath J, Rass K, Jager SU, Lenhof HP, Meese E (2010) High-throughput miRNA profiling of human melanoma blood samples. *BMC Cancer* 10: 262.
152. Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, Haas J, Ruprecht K, Paul F, Stähler C, Lang CJG, Meder B, Bartfai T, Meese E, Keller A (2013) A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biol* 14: R78.
153. Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biörklund A, Rutqvist LE (1998) Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. A population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 82: 1367-1375.
154. Li B, Zhao Y, Guo G, Li W, Zhu ED, Luo X, Mao X, ZQ, Yu P, Zuo Q, Li N, Tang B, Liu K, Xiao B (2012) Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. *PLoS One* 7: e41629.
155. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, Wu D, Lin Z, Zang C, Yao Y, Zhang P, Song E (2009) MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res* 15: 3998-4008.
156. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, Veness MJ, Walker DM, Morgan GJ, Rose BR (2003) Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 106: 553-558.
157. Li Y, VandenBoom TG 2nd, Wang Z, Kong D, Ali A, Philip PA, Sarkar FH (2010) MiR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 70: 1486-95.
158. Liao L, Wang J, Ouyang S, Zhang P, Wang J, Zhang M (2015) Expression and clinical significance of microRNA-1246 in human oral squamous cell carcinoma. *Med Sci Monit* 21: 776-781.
159. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantù G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, Bergamini C, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S (2006) High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24: 5630-5636.
160. Lin Q, Mao W, Shu Y, Lin F, Liu S, Shen H, Gao W, Li S, Shen D (2012) A cluster of specified microRNAs in peripheral blood as biomarkers for metastatic non-small-cell lung cancer by stem-loop RT-PCR. *J Cancer Res Clin Oncol* 138: 85-93.
161. Lin S, Liu C, Lin J, Chiang W, Hung P, Chang K (2010) *MiR-24* up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncol* 46: 204-208.

162. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM (2001) Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer* 92: 805-813.
163. Lindquist D, Romanitan M, Hammarstedt L, Näsman A, Dahlstrand H, Lindholm J, Onelöv L, Ramquist T, Ye W, Munck-Wikland E, Dalianis T (2007) Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of *E6* and *E7*. *Mol Oncol* 1: 350-355.
164. Linxweiler M (2012) Rolle des *SEC62*-Gens bei der Entstehung von Tumoren der Lunge und der Schilddrüse. Dissertation. Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. <http://d-nb.info/1053983638>.
165. Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Lerner C, Hasenfus A, Bohle RM, Al-Kadah B, Takacs ZF, Smola S, Schick B (2015) Combination of p16<sup>INK4a</sup>/Ki67 immunocytology and HPV polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. *Cancer Cytopathol* 123: 219-229.
166. Liu C, Kao S, Tu H, Tsai M, Chang K, Lin S (2010) Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis* 16: 360-364.
167. Liu C, Lin S, Yang C, Cheng H, Chang K (2012a) Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34: 219-224.
168. Liu J, Mao Q, Liu Y, Hao X, Zhang S, Zhang J (2013) Analysis of *miR-205* and *miR-155* expression in the blood of breast cancer patients. *Chin J Cancer Res* 25: 46-54.
169. Liu R, Liu C, Chen D, Yang WH, Liu X, Liu CG, Dugas CM, Tang F, Zheng P, Liu Y, Wang L (2015a) *FOXP3* controls an *miR-146/NF-κB* negative feedback loop that inhibits apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res* 75: 1703-1713.
170. Liu R, Yi B, Wei S, Yang WH, Hart KM, Chauhan P, Zhang W, Mao X, Liu X, Liu CG, Wang L (2015b) *FOXP3-miR-146-NF-κB* axis and therapy for precancerous lesions in prostate. *Cancer Res* 75: 1714-1724.
171. Liu Y, Yan W, Zhang W, Chen L, You G, Bao Z, Wang Y, Wang H, Kang C, Jiang T (2012b) MiR-218 reverses high invasiveness of glioblastoma cells by targeting the oncogenic transcription factor LEF1. *Oncol Rep* 28: 1013-1021.
172. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS (2003) Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol* 39: 106-114.
173. Longworth MS, Laimins LA (2004) Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 362-372.

174. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D, Rudensky AY (2010) Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142: 914-929.
175. Lu Z, Lin Y, Jiang L, Chen L, Luo X, Song X, Chen S, Zhang S (2014) Micro-ribonucleic acid expression profiling and bioinformatic target gene analyses in laryngeal carcinoma. *Onco Targets Ther* 7: 525-533.
176. Lubin JH, Purdue M, Kelsey K, Zhang ZF, Winn D, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Smith E, Shangina O, Schwartz SM, Rudnai P, Eluf-Neto J, Muscat J, Morgenstern H, Menezes A, Matos E, Mates IN, Lissowska J, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Herrero R, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Dal Maso L, Curado MP, Chen C, Castellsague X, Brennan P, Boffetta P, Hashibe M, Hayes RB (2009) 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* 170: 937-947.
177. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98.
178. MacLellan SA, Lawson J, Baik J, Guillaud M, Poh CF-Y, Garnis C (2012) Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer Med* 1: 268-274.
179. Manchester KL (1995) Theodor Boveri and the origin of malignant tumors. *Trends Cell Biol* 5: 384-387.
180. Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, Zaridze D, Wünsch-Filho V, Winn DM, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Smith E, Schwartz SM, Rudnai P, Purdue MP, Olshan AF, Eluf-Neto J, Muscat J, Morgenstern H, Menezes A, McClean M, Matos E, Mates IN, Lissowska J, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Kelsey K, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Dal Maso L, Curado MP, Cadoni G, Chen C, Castellsague X, Boccia S, Benhamou S, Ferro G, Berthiller J, Brennan P, Møller H, Hashibe M (2010) Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol* 39: 182-196.
181. Martinez I, Gardiner AS, Board KF, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA (2008) Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 27: 2575-2582.
182. Matherly LH, Schuetz JD, Westin E, Goldman ID (1989) A method for the synchronization of cultured cells with aphidicolin: application to the large-scale

- synchronization of L1210 cells and the study of the cell cycle regulation of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase. *Anal Biochem* 182: 338-345.
183. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dallanis T, Munck-Wikland E (2000) Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 89: 300-304.
184. Mellin Dahlstrand H, Lindquist D, Björnestal L, Ohlsson A, Dalianis T, Munck-Wikland E, Elmberger G (2005) P16<sup>INK4a</sup> correlates to human papillomavirus presence, response to radiotherapy and clinical outcome in tonsillar carcinoma. *Anticancer Res* 25: 4375-4384.
185. Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 1: 882-891.
186. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Møller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J (2001) Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 344: 1125-1131.
187. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K (2006) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25: 2537-2545.
188. Murata K, Furu M, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Hashimoto M, Imura Y, Fujii T, Ito H, Mimori T, Matsuda S (2013) Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. *PLoS One* 8: e69118.
189. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K (2011) *Humangenetik*. 8. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
190. Nagadia R, Pandit P, Coman WB, Cooper-White J, Punyadeera C (2013) miRNAs in head and neck cancer revisited. *Cell Oncol* 36: 1-7.
191. Nam EJ, Yoon H, Kim SW, Kim H, Kim YT, Kim JH, Kim JW, Kim S (2008) MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 14: 2690-2695.
192. Ni YH, Huang XF, Wang ZY, Han W, Deng RZ, Mou YB, Ding L, Hou YY, Hu QG (2014) Upregulation of a potential prognostic biomarker, *miR-155*, enhances cell proliferation in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 117: 227-233.
193. Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M (2011) MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric

- cancer and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. *Clin Cancer Res* 17: 2725-2733.
194. Nishikawa R, Goto Y, Sakamoto S, Chiyomaru T, Enokida H, Kojima S, Kinoshita T, Yamamoto N, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N (2014) Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting of LASP1 in prostate cancer. *Cancer Sci* 105: 802-811.
195. Nowell PC, Hungerford DA (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25: 85-109.
196. Odar K, Boštjančič E, Gale N, Glavač D, Zidar N (2012) Differential expression of microRNAs miR-21, miR-31, miR-203, miR-125a-5p and miR-125b and proteins PTEN and p63 in verrucous carcinoma of the head and neck. *Histopathology* 61: 257-265.
197. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N (2014) Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One* 9: e92921.
198. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT (2009) Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 15: 5473-5477.
199. Parkin DM, Bray F (2006) Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24S3 S3/11-S3/25.
200. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK (2008) Upregulated *miR-146a* expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10: R101.
201. Pavia M, Pileggi C, Nobile CGA, Angelillo IF (2006) Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 83: 1126-1134.
202. Pedrali-Noy G, Belvedere M, Crepaldi T, Focher F Spadari S (1982) Inhibition of DNA replication and growth of several human and murine neoplastic cells by aphidicolin without detectable effect upon synthesis of immunoglobulins and HLA antigens. *Cancer Res* 42: 3810-3813.
203. Peng SC, Liao CT, Peng CH, Cheng AJ, Chen SJ, Huang CG, Hsieh WP, Yen TC (2014) MicroRNAs miR-218, miR-125b, and let-7g predict prognosis in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *PLoS One* 9: e102403.

204. Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT, Serrano-Ríos M (2013) Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One* 8: e77251.
205. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002-2007.
206. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime-PCR. *Nucleic Acids Res* 30: 275-282.
207. Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 1: 92-95.
208. Piepoli A, Tavano F, Copetti M, Mazza T, Palumbo O, Panza A, di Mola FF, Paziienza V, Mazzoccoli G, Biscaglia G, Gentile A, Mastrodonato N, Carella M, Pellegrini F, di Sebastiano P, Andriulli A (2012) MiRNA expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers. *PLoS One* 7: e33663.
209. Pinkel D, Albertson DG (2005) Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 331-354.
210. Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R, Masarik M (2014) Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol* 50: 168-177.
211. Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, Danyluk J, Godolphin W, Sliwkowski M, Akita R, Paterson MC, Slamon DJ (1993) *Her-2/neu* expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 53: 4960-4970.
212. Ragin CCR, Taioli E (2007) Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 121: 1813-1820.
213. Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD (2009) miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck* 31: 642-654.
214. Rather MI, Nagashri MN, Swamy SS, Gopinath KS, Kumar A (2013) Oncogenic microRNA-155 down-regulates tumor suppressor CDC73 and promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *J Biol Chem* 288: 608-618.

215. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D (1996) High frequency of *p16* (*CDKN2/MTS-1/INK4a*) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 3630-3633.
216. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJM, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP (2007) Combined analysis of HPV-DNA, *p16* and *EGFR* expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 120: 1731-1738.
217. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide *let-7d* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906.
218. Ries J, Vairaktaris E, Agaimy A, Kintopp R, Baran C, Neukam FW, Nkenke E (2014) MiR-186, miR-3651 and miR-494: potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma extracted from whole blood. *Oncol Rep* 31: 1429-1436.
219. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg) (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Berlin.
220. Rong M, He R, Dang Y, Chen G (2014) Expression and clinicopathological significance of *miR-146a* in hepatocellular carcinoma tissues. *Ups J Med Sci* 119: 19-24.
221. Roth P, Wischhusen J, Happold C, Chandran PA, Hofer S, Eisele G, Weller M, Keller A (2011) A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. *J Neurochem* 118: 449-457.
222. Ruan Q, Fang Z, Cui S, Zhang X, Wu Y, Tang H, Tu Y, Ding Y (2015) Thermo-chemotherapy induced *miR-218* upregulation inhibits the invasion of gastric cancer via targeting *Gli2* and *E-cadherin*. *Tumor Biol* doi: 10.1007/s13277-015-3250-4.
223. Saini R, Santhanam J, Othman NH, Saini D, Tang TH (2009) Single-tube seminested PCR assay for detecting human papillomavirus in clinical samples. *Open Microbiol J* 3: 106-112.
224. Salazar C, Nagadia R, Pandit P, Cooper-White J, Banerjee N, Dimitrova N, Coman WB, Punyadeera C (2014) A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell Oncol (Dordr)* 37: 331-338.
225. Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A, Farinella F, Mazzotta M, Carinco F (2010) MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23: 1229-1234.

226. Schembri F, Sridhar S, Perdomo C, Gustafson AM, Zhang X, Ergun A, Lu J, Liu G, Zhang X, Bowers J, Vaziri C, Ott K, Sensinger K, Collins JJ, Brody JS, Getts R, Lenburg ME, Spira A (2009) MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *PNAS* 106: 2319-2324.
227. Schmitt J, Backes C, Nourkami-Tutdibi N, Leidinger P, Deutscher S, Beier M, Gessler M, Graf N, Lenhof H-P, Keller A, Meese E (2012) Treatment-independent miRNA signature in blood of wilms tumor patients. *BMC Genomics* 13: 379.
228. Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM (2001) Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 1-9.
229. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208.
230. Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, Palermo R, Best S, Ulmer KM, Levine M, Zinreich E, Messing BP, Gold D, Wu AA, Niparko KJ, Kowalski J, Hirata RM, Saunders JR, Westra WH, Pai SI (2009) Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 119: 1542-1549.
231. Sher YP, Wang LJ, Chuang LL, Tsai MH, Kuo TT, Huang CC, Chuang EY, Lai LC (2014) *ADAM9* up-regulates *N-Cadherin* via *miR-218* suppression in lung adenocarcinoma cells. *PLoS One* 9: e94065.
232. Shi LJ, Zhang CY, Zhou ZT, Ma JY, Liu Y, Bao ZX, Jiang WW (2014) MicroRNA-155 in oral squamous cell carcinoma: Overexpression, localization, and prognostic potential. *Head Neck* doi: 10.1002/hed.23700.
233. Shiiba M, Shinozuka K, Saito K, Fushimi K, Kasamatsu A, Ogawara K, Uzawa K, Ito H, Takiguchi Y, Tanzawa H (2013) MicroRNA-125b regulates proliferation and radioresistance of oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 108: 1817-1821.
234. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, Heyne K, Shin HJC, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Hittelman WN (1996) *P53* expression: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88: 519-529.
235. Sidranski D (1995) Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 7: 229-233.
236. Singhi AD, Westra WH (2010) Comparison of human papillomavirus *in situ* hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated

- head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 116: 2166-2173.
237. Siow MY, Ng LP, Chong VK, Jamaludin M, Abraham MT, Abdul Rahman ZA, Kallarakkal TG, Yang YH, Cheong SC, Zain RB (2013) Dysregulation of *miR-31* and *miR-375* expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. *Oral Dis* 20: 345-351.
238. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The *lin-41 RBCC* gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7d* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5: 659-669.
239. Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, Snijders PJ, Ylstra B, van de Wiel MA, Meijer GA, Leemans CR, Brakenhoff RH (2006) Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* 25: 2558-64.
240. Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, van der Lei RJ, Bijzet J, Kluiver J, Boots AMH, Brouwer E, Kroesen BJ (2014) Comprehensive analysis of miRNA expression in T-cell subsets of rheumatoid arthritis patients reveals defined signatures of naive and memory Tregs. *Genes Immun* 15: 115-125.
241. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP (2004) Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 108: 766-772.
242. Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G (1992) Frequent *p53* mutations in head and neck cancer. *Cancer Res* 52: 5997.
243. Song L, Huang Q, Chen K, Liu L, Lin C, Dai T, Yu C, Wu Z, Li J (2010) MiR-218 inhibits the invasive ability of glioma cells by direct downregulation of IKK- $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun* 402: 135-140.
244. Spinello I, Quaranta MT, Riccioni R, Riti V, Pasquini L, Boe A, Pelosi E, Vitale A, Foà R, Testa U, Labbaye C (2011) MicroRNA-146a and AMD3100, two ways to control *CXCR4* expression in acute myeloid leukemias. *Blood Cancer J* 1: e26.
245. Spitz MR, Fueger JJ, Goepfert H, Hong WK, Newell GR (1988) Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. A case comparison analysis. *Cancer* 61: 203-208.
246. Stephens L, Hardin J, Keller R, Wilt F (1986) The effects of aphidicolin on morphogenesis and differentiation in the sea urchin embryo. *Dev Biol* 118: 64-69.

247. Streppel MT, Ocké MC, Boshuizen HC, Kok FJ, Kromhout D (2009) Long-term wine consumption is related to cardiovascular mortality and life expectancy independently of moderate alcohol intake: the Zutphen Study. *J Epidemiol Community Health* 63: 534-540.
248. Stückrath I, Rack B, Janni W, Jäger B, Pantel K, Schwarzenbach H (2015) Aberrant plasma levels of circulating *miR-16*, *miR-107*, *miR-130a* and *miR-146a* are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. *Oncotarget* 6: 13387-13401.
249. Sui C, Xu F, Shen W, Geng L, Xie F, Dai B, Lu J, Zhang M, Yang J (2015) Overexpression of *miR-218* inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through RET. *Tumor Biol* 36: 1511-1518.
250. Sun J, Shi H, Lai N, Liao K, Zhang S, Lu X (2014c) Overexpression of microRNA-155 predicts poor prognosis in glioma patients. *Med Oncol* 31: 911.
251. Sun Q, Zhao X, Liu X, Wang Y, Huang J, Jiang B, Chen Q, Yu J (2014b) *MiR-146a* functions as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting *Racl*. *Prostate* 74: 1613-1621.
252. Sun X, Song Y, Tai X, Liu B, Ji W (2013) MicroRNA expression and its detection in human supraglottic laryngeal squamous cell carcinoma. *Biomed Rep* 1: 743-746.
253. Sun Z, Meng C, Wang S, Zhou N, Guan M, Bai C, Lu S, Han Q, Zhao RC (2014a) MicroRNA-1246 enhances migration and invasion through CADM1 in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 14: 616.
254. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T (2004) Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64: 3753-3756.
255. Takeshita N, Hoshino I, Mori M, Akutsu Y, Nanari N, Yoneyama Y, Ikeda N, Isozaki Y, Maruyama T, Akanuma N, Komatsu A, Jitsukawa M, Matsubara H (2013) Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma. *BJC* 108: 64-652.
256. Tatarano S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Yoshino H, Hidaka H, Yamasaki T, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M (2011) *MiR-218* on the genomic loss region of chromosome 4p15.31 functions as a tumor suppressor in bladder cancer. *Int J Oncol* 39: 13-21.

257. Tiwari A, Shivananda S, Gopinath KS, Kumar A (2014) MicroRNA-125a reduces proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells by targeting estrogen-related receptor  $\alpha$ . *J Biol Chem* 289: 32276-32290.
258. Tran N, McLean T, Zhang X, Zhao CJ, Thomson JM, O'Brien C, Rose B (2007) MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 12-17.
259. Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W, Merletti F, Péquignot G, Riboli E, Sancho-Garnier H, Terracini B, Zubiri A, Zubiri L (1988) Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer* 41: 483-491.
260. Ufkin ML, Peterson S, Yang X, Driscoll H, Duarte C, Sathyanarayana P (2014) MiR-125a regulated cell cycle, proliferation, and apoptosis by targeting the ErbB Pathway in Acute Myeloid Leukemia. *Leuk Res* 38: 402-410.
261. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D (1994) Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 54: 1156-1158.
262. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R (2004) Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 96: 99-106.
263. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2257-2261.
264. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19.
265. Wald AI, Hoskins EE, Wells SI, Ferris RL, Khan SA (2011) Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck* 33: 504-512.
266. Wang HC, Fedoroff S (1972) Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nat New Biol* 235: 52-53.

267. Wang RJ, Zheng YH, Wang P, Zhang JZ (2015) Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 765-771.
268. Wang Y, Chen M, Tao Z, Hua Q, Chen S, Xiao B (2013) Identification of predictive biomarkers for early diagnosis of larynx carcinoma based on microRNA expression data. *Cancer Genet* 206: 340-346.
269. Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R (2011) *Molekularbiologie*. 6., aktualisierte Auflage. Pearson Studium, München.
270. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX (2002) Involvement of intact *HPV16 E6/E7* gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 21: 1510-1517.
271. Wilczynski SP, Lin BTY, Xie Y, Paz IB (1998) Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 152: 145-156.
272. Wittekind C, Weber A, Weidenbach H (2001) Pathologie und Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Onkologie* 7: 498-504.
273. Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH (2005) *TNM-Atlas*. 5. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
274. Wolff KD, Bootz F, Beck J, Bikowski K, Böhme P, Budach W, Burkhardt A, Danker H, Eberhardt W, Engers K, Fietkau R, Frerich B, Gauler T, Germann G, Gittler-Hebestreit N, Grötz K, Horch R, Ihrler S, Keilholz U, Lell M, Lübke A, Mantey W, Nusser-Müller-Busch R, Pistner H, Paradies K, Reichert T, Reinert S, Schliephake H, Schmitter M, Singer S, Westhofen M, Wirz S, Wittlinger M (2012) *Mundhöhlenkarzinom - Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. Leitlinie der AWMW, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V., Fassung von 12/2012, Version 2.0.*
275. Wong T, Liu X, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI (2008) Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. *Clin Cancer Res* 14: 2588-2592.
276. Wu C, Cao Y, He Z, He J, Hu C, Duan H, Jiang J (2014c) Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *Tohoku J Exp Med* 232: 85-95.

277. Wu DW, Chuang CY, Lin WL, Sung WW, Cheng YW, Lee H (2014a) Paxilin promotes tumor progression and predicts survival and relapse in oral cavity squamous cell carcinoma by microRNA-218 targeting. *Carcinogenesis* 35: 1823-1829.
278. Wu TY, Zhang TH, Qu LM, Feng JP, Tian LL, Zhang BH, Li DD, Sun YN, Liu M (2014b) MiR-19a is correlated with prognosis and apoptosis of laryngeal squamous cell carcinoma by regulating *TIMP-2* expression. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 56-63.
279. Wynder EL, Bross IJ (1957) Aetiological factors in mouth cancer. *Br Med J* 1: 1137-1143.
280. Xin SY, Feng XS, Zhou LQ, Sun JJ, Gao XL, Yao GL (2014) Reduced expression of circulating microRNA-218 in gastric cancer and correlation with tumor invasion and prognosis. *World J Gastroenterol* 20: 6906-6911.
281. Xu L, Zhong H, Wan H, Chen F, Zhong J, Xiao F, Liu J, Shen L (2014a) *MiR-146a* expression level as a novel putative prognostic marker for acute promyelocytic leukemia. *Dis Markers* 2014: 150604.
282. Xu Y, Huang Z, Liu Y (2014b) Reduced *miR-125a-5p* expression is associated with gastric carcinogenesis through the targeting of *E2F3*. *Mol Med Rep* 10: 2601-2608.
283. Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Itesako T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Shozu M, Seki N (2013) Tumor suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting focal adhesion pathways in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 42: 1523-1532.
284. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9: 189-198.
285. Yang C, Hung P, Wang P, Liu C, Chu T, Cheng H, Lin S (2011) MiR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 40: 397-404.
286. Yang Z, Chen H, Si H, Li X, Ding X, Sheng Q, Chen P, Zhang H (2014) Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 51: 823-831.
287. Yao Q, Cao Z, Tu C, Zhao Y, Liu H, Zhang S (2013) MicroRNA-146a act as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting *WASF2*. *Cancer Lett* 335: 219-224.

288. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17: 3011-3016.
289. You W, Wang Y, Zheng J (2015) Plasma miR-127 and miR-218 might serve as potential biomarkers for cervical cancer. *Reprod Sci* doi: 10.1177/1933719115570902.  
[Kommentar: Titel könnte irreführend sein! Möglicherweise ist im Titel der Publikation ein Fehler aufgetreten, da in der gesamten Publikation die Expression von *miR-218* im Plasma als unverändert beschrieben wird, was konträr zum Titel ist.]
290. Yu H, Gao G, Jiang L, Guo L, Lin M, Jiao X, Jia W, Huang J (2013) Decreased expression of *miR-218* is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 6: 2904-2911.
291. Yu J, Wang Y, Dong R, Huang X, Ding S, Qiu H (2012) Circulating microRNA-218 was reduced in cervical cancer and correlated with tumor invasion. *J Cancer Res Clin Oncol* 138: 671-674.
292. Yu Z, Weinberger PM, Haffty BG, Sasaki C, Zerillo C, Joe J, Kowalski D, Dziura J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A (2005) Cyclin D1 Is a valuable prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 1160-1166.
293. Yuan J, Xiao G, Peng G, Liu D, Wang Z, Liao Y, Liu Q, Wu M, Yuan X (2015) MiRNA-125a-5p inhibits glioblastoma cell proliferation and promotes cell differentiation by targeting TAZ. *Biochem Biophys Res Commun* 457: 171-176.
294. Yuan W, Xiaoyun H, Haifeng Q, Jing L, Weixu H, Ruofan D, Jinjin Y, Zongji S (2014) MicroRNA-218 enhances the radiosensitivity of human cervical cancer via promoting radiation induced apoptosis. *Int J Med Sci* 11: 691-696.
295. Yunis JJ, Sanchez O (1973) G-banding and chromosome structure. *Chromosoma* 44: 15-23.
296. Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216: 84-85.
297. Zeng Y, Cullen BR (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32: 4776-4785.
298. Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *PNAS* 100: 9779-9784.
299. Zhang B, Chen J, Ren Z, Chen Y, Li J, Miao X, Song Y, Zhao T, Li Y, Shi Y, Ren D, Liu J (2013a) A specific miRNA signature promotes radioresistance of human cervical cancer cells. *Cancer Cell Int* 13: 118.

300. Zhang CM, Zhao J, Deng HY (2013b) MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci* 20: 79.
301. Zhang J, Cheng C, Yuan X, He JT, Pan QH, Sun FY (2014c) MicroRNA-155 acts as an oncogene by targeting the tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 602-610.
302. Zhang T, Han G, Wang Y, Chen K, Sun Y (2014a) MicroRNA expression profiles in supraglottic carcinoma. *Oncol Rep* 5: 2029-2034.
303. Zhang XL, Shi HJ, Wang JP, Tang HS, Wu YB, Fang ZY, Cui SZ, Wang LT (2014b) MicroRNA-218 is upregulated in gastric cancer after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and increases chemosensitivity to cisplatin. *World J Gastroenterol* 20: 11347-11355.
304. Zhang Z, Zhang Y, Sun XX, Ma X, Chen ZN (2015) MicroRNA-146a inhibits cancer metastasis by downregulating VEGF through dual pathways in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 14: 5.
305. Zhou J, Wang W, Gao Z, Peng X, Chen X, Chen W, Xu W, Xu H, Lin MC, Jiang S (2013) MicroRNA-155 promotes glioma proliferation via the regulation of MXI1. *PLoS One* 8: e83055.
306. Zhu WY, Luo B, An JY, He JY, Chen DD, Xu LY, Huang YY, Liu XG, Le HB, Zhang YK (2014a) Differential expression of *miR-125a-5p* and *let-7e* predicts the progression and prognosis of non-small cell lung cancer. *Cancer Invest* 32: 394-401.
307. Zhu X, Wang Y, Sun Y, Zheng J, Zhu D (2014b) *MiR-155* up-regulation by *LMP1* DNA contributes to increased nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271: 1939-1945.
308. zur Hausen H (1976) *Condylomata acuminata* and human genital cancer. *Cancer Res* 36: 794.

#### Weitere Quellen

309. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F, GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Stand: 13.11.2014. <http://globocan.iarc.fr>.

310. Handbücher von Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt [Internet]  
- Applied Biosystems® StepOne und StepOnePlus  
- Custom TaqMan® Small RNA Assay  
- mirVana™ miRNA Mimics Protocol 2013  
<https://www.thermofisher.com/de/de/home.html>.
311. National Cancer Institute, Bethesda, MD; 2015 [Internet] Stand: 05.08.2015.  
<http://www.cancer.gov/types/head-and-neck>.
312. PubMed.gov US National Library of Medicine National Institutes of Health [Internet]  
Stand: 19.08.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
313. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2014 [Internet] Stand: 18.02.2015. [https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Grafik/Krankheitsart\\_Todesursache.png? blob=poster](https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Grafik/Krankheitsart_Todesursache.png?blob=poster).

## 7. Publikationen/Dank

### Publikationen

Lerner C\*, Ketter R\*, Linsler S, Henn W, Oertel J, Urbschat S (2014) Establishment of a molecular cytogenetic analysis for native tumor tissue of meningiomas - suitable for clinical application. Mol Cytogenet 7: 12. (\* gleichberechtigt)

Lerner C, Wemmert S, Schick B (2014) Preliminary analysis of different microRNA expression in juvenile angiofibromas. Biomed Rep 2: 835-838.

Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Lerner C, Hasenfus A, Bohle RM, Al-Kadah B, Takacs ZF, Smola S, Schick B (2014) Combination of p16INK4a-Ki67 immunocytology and hpv polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. Cancer Cytopathol doi: 10.1002/cncy.21512.

Wemmert S, Willnecker V, Kulas P, Weber S, Lerner C, Berndt S, Wendler O, Schick B (2015) Identification of *CTNNB1* mutations, *CTNNB1* amplifications and an *Axin2* splice variant in juvenile angiofibromas. Tumor Biol doi: 10.1007/s13277-015-4422-y.

Lerner C, Wemmert S, Bochen F, Kulas P, Linxweiler M, Hasenfus A, Heinzelmann J, Leidinger P, Backes C, Meese E, Urbschat S, Schick B (2015) Characterization of miR-146a and miR-155 in blood, tissue and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma patients and their impact on cell proliferation and migration. J Cancer Res Clin Oncol doi: 10.1007/s00432-015-2087-y.

### Publizierter Tagungsbeitrag

Lerner C, Bochen F, Kulas P, Linxweiler M, Hasenfus A, Heinzelmann A, Schick B, Wemmert S (2015) Poster 149: Influence of miR-146a and miR-155 on cell proliferation and migration in head and neck squamous cell carcinoma. EJC 51 Supplement S3.

### Tagungsbeitrag

Kulas P, Lerner C, Wemmert S, Schick B (2015) Vergleichende Untersuchungen der miRNAs let-7d, miR-98 und miR-218 in Kopf-Hals-Tumoren. DGHNO, Berlin. -Poster-

### Preis

Forschungspreis 2013 der Freunde des Universitätsklinikums des Saarlandes e.V. „Etablierung einer präoperativen Diagnostik auf MicroRNA-Ebene zur Prognoseeinschätzung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region“.

## Danksagung

Die vorliegende, im Forschungslabor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum des Saarlandes entstandene Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Personen nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) sowie Frau Prof. Dr. Steffi Urbschat (Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die hervorragende Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen. Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick danke ich zudem für die herzliche Aufnahme in die Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Frau Dr. Silke Wemmert (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) gebührt ebenfalls ein besonderer Dank, da sie mich während der vorliegenden Arbeit außerordentlich unterstützt hat und immer für eine fachliche Diskussion zur Verfügung stand. Zudem hat sie die Zweitbeurteilung meiner immunhistochemischen Färbungen von p16 und die Auswertung meiner CGH-Analyse übernommen.

Bei Herrn Dr. Philipp Kulas und Herrn Dr. Maximilian Linxweiler (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) bedanke ich mich für das Engagement beim Sammeln der Blutproben und das Zusammenstellen der klinischen Daten. Vielen Dank auch an Herrn Dr. Maximilian Linxweiler und Herrn M. Sc. Florian Bochen (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die Einarbeitung zur Durchführung und Auswertung der funktionellen Analysen sowie Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann und Herrn PD Dr. Markus Greiner (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) für die Möglichkeit, diese funktionellen Analysen in Ihren Laboren durchzuführen.

In Kooperation mit dem Institut für Humangenetik (Universität des Saarlandes) wurde die Microarray-Analyse durchgeführt, daher ein Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Eckart Meese, Frau Dr. Petra Leidinger und Frau Dr. Christina Backes für die Unterstützung in der Durchführung und Auswertung der Microarrays.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer M. Bohle und Frau Dr. Andrea Hasenfus (Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die Bereitstellung von FFPE-Tumorgewebeschnitten und die Markierung der entsprechenden Tumorareale.

Zudem danke ich allen Kollegen des HNO- und Urologieforschungslabors (Universitätsklinikum des Saarlandes) für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft. Hervorzuheben sind vor allem Frau Dr. Joana Heinzelmann

(Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum des Saarlandes), der ich für die Einarbeitung zur Durchführung und Auswertung von Expressionsanalysen danke, sowie Frau Ulrike Bechtel und Frau Monika Hoffmann (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die tatkräftige Unterstützung während des Laboralltags und Herrn Prof. Dr. Klaus Bumm (jetzt Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, plastische Operationen, CaritasKlinikum Saarbrücken) für die Bereitstellung der Zelllinie UM-SCC-1.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Freunden des Universitätsklinikums des Saarlandes e.V. für die finanzielle Unterstützung des Projektes durch die Verleihung des Forschungspreises 2013.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.