

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Direktor: Prof. Dr. med. dent. habil. J. M. Setz

**Untersuchungen zur Expression und prognostischen
Bedeutung von mikroRNA im Speichel bei Patienten
mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Freya Constanze Vorwerk
geb. am 17.12.1985 in Wippra

Betreuer: PD Dr. Jeremias Hey

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. med. dent. S. Reichert, Universität Halle (Saale)
2. Prof. Dr. med. dent. R. Biffar, Universität Greifswald

26.06.2018

27.02.2019

Referat

Einleitung: Bösartige Kopf-Hals-Tumoren stehen auf Platz sechs der weltweit am häufigsten vorkommenden Malignome. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate stagniert seit Jahrzehnten. Als eine Ursache kann das Fehlen geeigneter Biomarker angesehen werden. Ein solcher vielversprechender molekularer Marker könnte mikroRNA darstellen.

Zielstellung: Ziel der retrospektiven Analyse war es herauszufinden, ob sich die Expressionen verschiedener vorausgewählter spezifischer mikroRNA im Patientenspeichel während einer kurativen Radio-Chemo-Therapie sowie im Follow-up verändern und ob diese einen prädiktiven Wert für das Auftreten von lokoregionären Rezidiven oder Fernmetastasen haben.

Material und Methoden:

Ausgewählt wurden Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich erkrankten und mit einer kurativen Radio-Chemo-Therapie in der Universitätsklinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg behandelt wurden. Die Speichelproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt und auf zehn bekannte, spezifische mikroRNA (miR-93, miR-125a, miR-142-3p, miR-200a, miR-203, miR-213, let-7a, let-7b, let-7g und let-7i), die mit Plattenepithelkarzinomen assoziiert sind, mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) analysiert.

Ergebnisse:

Der Speichel stammte von 17 Patienten, davon waren drei Frauen und 14 Männer (42 Proben). Trotz der Lagerung bei -80°C von mehr als fünf Jahren konnten die ausgewählten mikroRNA in allen Speichelproben nachgewiesen werden. Die mikroRNA miR-93, let-7b und miR-213 waren im Speichel am stärksten exprimiert und es stiegen während der Radio-Chemo-Therapie, entgegen dem Trend der anderen mikroRNA, die Konzentrationswerte von let-7i, let-7b und let-7g signifikant an.

Schlussfolgerung: Es lassen sich mikroRNA-Expressionsunterschiede vor und nach der Radio-Chemo-Therapie nachweisen. Anhand der Ergebnisse erscheinen insbesondere die miR-93 und die miR-200a für klinische Untersuchungen für das Erkennen von Rezidiven bei Patienten mit tumortherapeutischer Kopf-Hals assoziierter Radio-Chemo-Therapie geeignet zu sein.

Vorwerk, Freya Constanze: Untersuchungen zur Expression und prognostischer Bedeutung von mikroRNA im Speichel bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, Halle(Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2018

Widmung

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition Kopf-Hals-Tumoren	1
1.2	Anatomische und histologische Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren	1
1.3	Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren	2
1.4	Risikofaktoren	3
1.4.1	Tabak und Alkohol	3
1.4.2	Humane Papillomaviren und Epstein-Barr-Viren	4
1.4.3	Ultraviolette Strahlung	5
1.4.4	Betelnuss	6
1.5	Klinische Aspekte der Kopf-Hals-Tumoren	6
1.5.1	Pathologie der Kopf-Hals-Tumoren	6
1.5.2	Diagnostik der Kopf-Hals-Tumoren in der Zahnarztpraxis	7
1.5.3	Weiterführende Diagnostik der Kopf-Hals-Tumoren in spezialisierten Facheinrichtungen	7
1.5.4	Staging	8
1.6	Therapie von Kopf-Hals-Tumoren	10
1.6.1	Chirurgie	11
1.6.2	Radiotherapie	12
1.6.3	Chemotherapie und Radio-Chemo-Therapie	14
1.6.4	Diagnostik und Staging mit Hilfe von Biomarkern	15
1.7	Molekulare Biomarker- mikroRNA	17
1.7.1	Definition und Genese	17
1.7.2	MikroRNA und ihre Rolle in der Tumorgenese	19
1.7.3	Therapiemonitoring mit Biomarkern	21
2	Zielstellung	22
3	Patienten, Material und Methodik	23
3.1	Patienten	23
3.1.1	Patientenproben	23
3.1.2	Behandlungsplanung und Bestimmung der Speicheldosis	23
3.2	Material	24
3.2.1	Chemikalien und Kits	24
3.2.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	25
3.3	Methoden	26
3.3.1	RNA Isolation	26
3.3.2	MikroRNA-spezifische cDNA Synthese	27
3.3.3	Quantitative Real-Time-PCR-Analyse	28
3.4	Statistik	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Patienten	30
4.2	Messung der Speichel-mikroRNA	32
4.3	Assoziation der mikroRNA-Expression zu tumorbedingtem Versterben und Rezidivbildung	35
4.4	Analyse der Assoziation der Speichel-Expression der mikroRNA zu Regression und Progression der Tumoren	39
4.5	Assoziation der mikroRNA-Expression zum funktionellen Speicheldrüsenparameter	41
4.6	MikroRNA-Expression vor und nach der Radio-Chemo-Therapie	42
4.7	Längsverteilung der mikroRNA-Expression nach der Radio-Chemo-Therapie	46
4.8	Unkorrigierte p-Werte	47
5	Diskussion	50

5.1	Nachweis von mikroRNA im Speichel	50
5.2	Analyse der Lagerungsperiode bezüglich des Erhalts der mikroRNA in den Speichelproben	51
5.3	Patientenkollektiv und Assoziation der Speichel-mikroRNA zu klinischen Faktoren	53
5.3.1	Patientenkollektiv	53
5.3.2	Assoziation der mikroRNA mit funktionellen Speicheldrüsenparametern	55
5.3.3	Analyse der Assoziation der Speichel-Expression der mikroRNA zu Regression und Progression der Tumoren	57
5.3.4	Assoziation der mikroRNA-Expression zu tumorbedingtem Versterben und Rezidivbildung	58
5.4	mikroRNA-Expression im Speichel zur Verlaufskontrolle nach einer Radio-Chemo-Therapie	58
5.5	Klinischer Ausblick	62
6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis	68
8	Thesen	80

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
3D-CRT	3D-Conformal Radiotherapy (engl.)
°C	Grad Celsius
%	Prozent
<, >	kleiner als, größer als
Abb.	Abbildung
Δ	Delta
AJCC	American Joint Committee on Cancer (engl.)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
Ct, Cq, Cp	crossing time/cycle threshold, quantification cycle, crossing point (engl.)
d. h.	das heißt
DGRO	Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie
DVH	Dosis-Volumen-Histogramm
et al.	et alii (lat.), und andere (dt.)
etc.	et cetera
G	Grading (engl.)
g	Gramm
ggf.	gegebenfalls
Gl. parotis	Glandula parotis, Glandulae parotidea (lat.), Ohrspeicheldrüse (dt.)
Gy	Gray
h	Stunde
HART	Hyperfraktionierte akzelerierte Radiotherapie
HNO	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma (engl.)
HPV	Humanes Papillomavirus
IARC	International Agency for Research on Cancer (engl.)
ICD-O	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems- Oncology (engl.)
IMRT	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
min	Minute
miR	microRNA (engl.), mikroRNA (dt.)
MKG	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRD	minimal residual disease (engl.)
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
n	Menge
N.	Nervus (lat.), Nerv (dt.)

Abkürzungsverzeichnis

n. n. b.	nicht näher bezeichnet
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	polymerase chain reaction (engl.)
PET	Positronenemissionstomographie
qRT-PCR	quantitative realtime polymerase chain reaction (engl.)
RCT	Radio-Chemo-Therapie
RKI	Robert Koch Institut
s.	siehe
sog.	sogenannte
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (engl.)
Tbl.	Tabelle
TNM-Klassifikation	Einteilung von malignen Tumoren in Stadien; T: Tumor, N: Nodus (Nodus lymphoideus, lat. Lymphknoten), M: Metastase
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	Union internationale contre le cancer (franz.)
UV	ultraviolette Strahlung
vs.	versus
WHO	World Health Organization (engl.)
x	mal
z. B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

Abkürzungsverzeichnis

Molekularbiologische

Abkürzungen	Bedeutung
5-FU	5-Fluorouracil
ALT	Alanin-Aminotransferase
hAgo2	Argonaute-Proteine
AST	Aspartat-Aminotransferase
CTNNB1	cadherin-associated protein (engl.), Gen
CA 12	Carbohydrate-Antigen 12, Tumormarker
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9, Tumormarker
CEA	carcinoembryonic-antigen (engl.)
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid (engl.)
Cyfra 21-1	Cytokeratinfragment 21-1, Tumormarker
DNA	desoxyribonukleic acid (engl.)
DTTPase	Desoxythymidin-Triphosphatase
Cytochrom p450	Enzym
EGFR	epidermal growth factor receptor (engl.)
FIH	factor inhibiting HIF-1 (engl.)
HER2/ErBB2	human epidermal growth factor receptor 2 (engl.), Protein
Taq Man	Hydrolysesonde, Primersystem
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor, Untereinheit α
IGF	insulin-like growth factor (engl.)
IL8	Interleukin 8; RNA-Transkripte
IL-1B	Interleukin-1B; RNA-Transkripte
stem-loop-Primer	intramolekulare Basenpaarungen
LDH	Lactatdehydrogenase
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MLV Reverse Transkriptase	Maus-Leukämie-Virus, Enzym
mRNA	messenger ribonucleic acid (engl.)
N-Nitrosamine	nitrosierende Agentien
FUS1	nuclar fusion protein (engl.), Tumorsuppressor
dNTPS	Nukleosidtriphosphate
E6	Onkogen
E7	Onkogen
ERBB2	Onkogene Proteine
ERBB3	Onkogene Proteine
p53	Protein53, Tumorsuppressor Protein
RNS	reactive nitrogen species (engl.)
ROS	reactive oxygen species (engl.)
U18-snowRNA	Referenz RNA
pRb	Retinoblastom Protein, Tumorsuppressor Protein
RNA	ribonucleic acid (engl.)
snoRNA	small nucleolar ribonucleic acid (engl.)
SCC	squamous carcinoma cell antigen (engl.)
T-Zellen	T-Lymphozyten (T= Thymus)
TK	Thimidinkinase

Abkürzungsverzeichnis

TPS	tissue polypeptide specific antigen (engl.), Tumormarker
E2F1	Transkriptionsfaktor
p16	CDK-Inhibitor 2A (= Abkürzung von cyclin dependent kinase inhibitor 2A), Tumorsuppressorprotein
ZEB2	zinc-finger E-Box binding homeobox 2 (engl.), Gen

1 Einleitung

Maligne Kopf-Hals-Tumoren zählen seit Jahrzehnten zu den Krebserkrankungen, bei denen trotz verbesserter Diagnostik und Therapie kaum Fortschritte im Krankheitsverlauf zu verzeichnen sind (IARC, 2008; RKI-Krebsdaten, 2011/2012; Ferlay et al., 2015). Durch die späte Diagnose und das lückenhafte Monitoring während der Therapie lassen sie sich nur schwer und meist erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium erfassen. Da die Heilungsaussichten bei Frühbefunden wesentlich günstiger sind (ca. 70 % bis 85 %), kommt der Früherkennung eine zentrale Bedeutung zu. Bei Spätbefunden liegt die Aussicht auf Heilung aufgrund der schlechteren Ausgangslage des Befundes nur noch bei 30 % bis 43 % (Howaldt et al., 2000; Lang et al., 2002). Verbesserungen in der Diagnostik, des Tumorscreenings und des Therapiemonitorings für maligne Kopf-Hals-Tumoren liegen somit vermehrt im Interesse der Krebsforschung. Das Identifizieren sensibler, spezifischer und noninvasiv zu gewinnender Biomarker zur Detektion von Tumoren in einem frühen Stadium hat in den letzten Jahren in der Tumorprävention und Therapie an Bedeutung gewonnen.

1.1 Definition Kopf-Hals-Tumoren

Der Begriff Kopf-Hals-Tumor umfasst eine heterogene Gruppe von Neoplasien unterschiedlicher Ursprungsgewebe im Kopf- und Halsbereich. Dazu zählen alle bösartigen Neubildungen, die funktionell und anatomisch im Gebiet der oberen Atem- und Speisewege, einschließlich Mundhöhle, Pharynx und Larynx vorkommen (Cooper et al., 2004 und 2009).

1.2 Anatomische und histologische Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren

Histopathologisch betrachtet, handelt es sich bei über 90 % aller malignen Kopf-Hals-Tumoren um Plattenepithelkarzinome (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma (engl.)), die aus der Mukosa des oberen Aerodigestivtraktes hervorgehen (Sanderson et al., 2002; Dobrossy, 2005). Der restliche Anteil setzt sich vornehmlich aus Adenokarzinomen der Speicheldrüsen, Sarkomen und anderen mesenchymalen Tumoren sowie Melanomen zusammen.

1. Einleitung

In der Internationalen Klassifikation für Erkrankungen (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (engl.)- Oncology [ICD-O]; ICD-O Version 10, s. Tabelle 1) beinhaltet die Definition der Kopf-Hals-Tumoren die Kodierungen C00-C06, C10-C14 und C32 (Dobrossy, 2005).

Tabelle 1 Internationale Klassifikation für Erkrankungen (ICD-O), entsprechend der RKI-Definition

Anatomische Region	ICD 10	Anatomische Region	ICD 10
Lippen	C00.9	Zungengrund	C01
Zunge	C02.9	Zahnfleisch, n.n.b.	C03.9
Mundboden	C04.9	Gaumen, n.n.b.	C05.9
Mund, n.n.b.	C06.9		
Parotis	C07	Große Speicheldrüsen, n.n.b.	C08.9
Tonsille	C09.9	Oropharynx	C10.9
Nasopharynx	C11.9	Recessus piriformis	C12
Hypopharynx	C13.9	Waldey'scher Rachenring	C14.2
Lippe, Mundhöhle, Pharynx, mehrere Bereiche überlappend	C14.9		
Nasenhöhle	C30.0	Mittelohr	C30.1
Nasennebenhöhlen	C31.9	Glottis	C32.0
Supraglottis	C32.1	Subglottis	C32.2
Larynx	C32.9		

1.3 Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren

Malige Kopf-Hals-Tumoren befinden sich weltweit auf Platz sechs (Frauen) und fünf (Männer) der am häufigsten vorkommenden malignen Tumoren (American Academy of Otolaryngology, 2005; Curado et al., 2013). Die Inzidenz lag im Jahr 2003 weltweit bei ca. 780.000 Neuerkrankungen (Lemaire et al., 2003). Im Jahr 2012 gab es für Mundhöhle und Rachen (C00-C14) ca. 10.000 männliche und ca. 4.000 weibliche Neuerkrankte in Deutschland (RKI-Krebsdaten, 2011/2012). Hier wurden 40 % der Tumoren von weiblichen Patienten bereits in einem frühen Stadium diagnostiziert, bei Männern waren es nur etwa 30 %. Diese verzögerte Diagnose führte dazu, dass bei Männern ein fortgeschrittenes Stadium (21 %) im Vergleich zu Frauen (16 %) häufiger auftrat (RKI-Krebsdaten, 2011/2012). Trotz stetig wachsender Therapiemöglichkeiten blieb die Mortalität in Deutschland in den letzten Jahren, in Bezug auf einen Nachbeobachtungszeitraum von fünf Jahren, konstant bei 47 % bis 55 %. Bei Männern wurden im Vergleich zu Frauen niedrigere Überlebensraten vorgefunden (48 % zu 61 %) (RKI-Krebsdaten, 2011/2012). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate für Kopf-Hals-Tumoren liegt seit Jahrzehnten unverändert bei 50 % (Mork, 1998; Brunin et al., 1999).

1. Einleitung

Es ergeben sich, je nach Lokalisation innerhalb der Erkrankungsgruppe, deutlich unterschiedliche Überlebensaussichten. So wurden für Tumoren der Lippe und der Speicheldrüsen höhere Überlebensraten registriert als z. B. für bösartige Tumoren des Rachenraumes (RKI-Krebsdaten, 2011/12). Je nach Tumorlokalisation beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate der Patienten bei Hypopharynxkarzinomen nur 27 % und bei Karzinomen an der Lippe 76 % (Lang et al., 2002). Einen wichtigen Faktor für die Prognose der erkrankten Patienten stellte dabei der Befall der regionären Lymphknoten dar. Beim Vorliegen eines Lymphknotenbefalls sank die Überlebensrate um mindestens 50 % im Vergleich zu Fällen ohne Metastasierung (Enepekides et al., 1999). Trotz der Fortschritte in den therapeutischen Verfahren haben Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eine hohe Rezidivgefahr. Die Heilungschancen stagnieren seit Jahrzehnten und es gibt kaum Verbesserungen im Krankheitsverlauf (Forastiere et al., 2001; Schlesinger-Raab et al., 2003; Brouha et al., 2005). Für die hohe Mortalität werden dabei nicht nur die zeitlich verzögerte Diagnose verantwortlich gemacht, sondern auch die Schwierigkeiten in der Behandlung und Tumornachsorge.

1.4 Risikofaktoren

1.4.1 Tabak und Alkohol

Chronischer Tabak- und Alkoholabusus stellen die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines Karzinoms im Kopf- und Halsbereich dar (Seitz et al., 2001). Fast 80 % der Kopf-Hals-Tumoren lassen sich auf diese beiden Faktoren zurückführen (Castellsagué et al., 2004). Das Rauchen stellt dabei mit ca. 90 % den größten Risikofaktor dar. Für Raucher wird die Risikoerhöhung in der Literatur oft nach Packungsjahren gestaffelt angegeben. Die Bestimmung der Packungsjahre ergibt sich aus der Multiplikation der Anzahl der Zigarettschachteln, die pro Tag konsumiert werden, mit der Anzahl der Jahre, in denen geraucht wurde. 21 bis 30 Packungsjahre erhöhen das Risiko unabhängig vom Alkoholkonsum um das zweieinhalbfache, bei 40 Packungsjahren erhöht sich das Risiko bereits um das siebenfache. Mindestens 250 der im Tabakrauch enthaltenen Substanzen sind giftig, 70 davon sind nachgewiesenermaßen kanzerogen (Brennan et al., 1995; Hecht, 2003). Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Benzo[a]pyren, aromatische Amine und tabakspezifische N-Nitrosamine schädigen die DNA und können zu Mutationen führen (Hecht, 2003). Verschiedene Bestandteile des Tabakrauchs unterbinden zusätzlich die Apoptose der geschädigten Zellen und fördern so die Krebsentstehung. Warum trotz dieser enormen Exposition an Kanzerogenen nur ein kleiner Teil der Tabakkonsumenten jemals an einem Tumor erkrankt, ist noch weitgehend unklar.

1. Einleitung

Als mögliche Ursache wird ein genetischer Polymorphismus in Enzymen der Biotransformation tabak-assoziiertes Pro-Onkogene diskutiert (Lacko et al., 2009).

Alkohol stellt neben dem Tabakkonsum einen weiteren wichtigen Risikofaktor dar, wobei hier die molekularen Mechanismen der Risikoerhöhung noch nicht völlig geklärt sind. Eine direkte karzinogene Wirkung konnte für Alkohol bisher nicht aufgezeigt werden, jedoch besteht eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen dem täglichen Alkoholkonsum und dem Risiko, an einem Karzinom zu erkranken. Vermutlich sind die durch Alkohol erhöhte Durchlässigkeit der Mukosa für Karzinogene sowie die alkoholbedingte Bildung karzinogener Abbaustoffe, wie beispielsweise Acetaldehyd, hierfür verantwortlich (Gillison, 2007). Acetaldehyd ist metabolisierter Alkohol, der die DNA schädigen und Glutathion inaktivieren kann. Letzteres spielt eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Karzinogenen (Seitz et al., 2001; Poschl et al., 2004). Außerdem wird Cytochrom p450 Enzym induziert, das an der Aktivierung verschiedener Prokarzinogene beteiligt ist (Poschl et al., 2004). Schon 1989 konnte gezeigt werden, dass ein durchschnittlicher Konsum von mehr als 120 g Ethanol am Tag das Risiko für ein Mundhöhlenkarzinom stark erhöht und mit stetigem Konsum weiter ansteigt (Merletti et al., 1989; Franceschi et al., 2000). Tabak und Alkohol haben in Kombination einen synergistischen Effekt auf die Entstehung eines Karzinoms im Kopf- und Halsbereich. Hierfür wird die erhöhte Membranpermeabilität tabak-assoziiertes Nitrosamine verantwortlich gemacht (Mashberg et al., 1981; Talamini et al., 2002). Bei Kombination beider Risikofaktoren ist ein bis zu 30-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko vorhanden (Corrao et al., 1999; Talamini et al., 2002; Altieri et al., 2002).

1.4.2 Humane Papillomaviren und Epstein-Barr-Viren

Einen weiteren Faktor für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren stellen virale Infektionen dar. In den vergangenen Jahren konnten Infektionen mit Epstein-Barr-Viren und humanen Papillomaviren (HPV) zunehmend mit der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren in Verbindung gebracht werden (Dahlstrom et al., 2003). Von den mehr als 100 bekannten HPV-Typen besitzen insbesondere HPV 16 und 18 die Potenz eine bösartige Entartung der Schleimhaut zu induzieren. Einige Studien konnten einen direkten Zusammenhang zwischen HPV und Kopf-Hals-Tumoren nachweisen. Beispielsweise sind 30 % der Schleimhautkarzinome HPV 16 bzw. 18 assoziiert (Dayyani et al., 2010). HPV 16 und 18 beweisen onkogenes Potential durch die Kodierung der Onkoproteine E6 und E7, welche ihrerseits wiederum die Tumorsuppressorproteine p53 und pRb inaktivieren (Herrero et al., 2003).

1. Einleitung

Zusätzlich kann bei HPV infizierten Zellen der proteasomale Abbau von p53 erhöht sein, was zu einer vermehrten Apoptoseresistenz führt (zur Hausen, 2002; Braakhuis et al., 2004). Somit sind diese Viren in der Lage, humane Zellen zu immortalisieren und deren Ansprechen auf interne und externe Apoptosesignale zu reduzieren. Die infizierte Zelle bleibt trotz Zellschäden am Leben. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass die durch HPV induzierten Tumoren häufig eine bessere Prognose haben als die Tumoren, die durch Alkohol und Rauchen ausgelöst werden (Ajila et al., 2015). Besonders deutlich wurde dies bei oropharyngealen Tumoren. Hierbei waren eine HPV-Infektion mit einem jüngeren Alter der Patienten, dem Fehlen von Risikofaktoren, hohen Proliferationsindizes, einem niedrigen Grading, einem basaloiden Subtyp sowie einem besseren Ansprechen auf eine Strahlentherapie und einer besseren Überlebensprognose assoziiert (Gillison et al., 2000; Dahlstrom et al., 2003).

1.4.3 Ultraviolette Strahlung

Tumoren der Lippe entstehen überwiegend durch die mutagene Wirkung ultravioletter Strahlung (UV). Ultraviolette Strahlung mit Wellenlängen von 315 nm bis 400 nm (UV-B-Strahlung) dringt tiefer in Auge und Haut ein und kann dort zu dauerhaften Bindegewebsschädigungen führen. Den Schäden liegen einige pathogenetische Mechanismen zugrunde, die die Entstehung von z. B. Basalzellkarzinomen begünstigen. Basalzellkarzinome zählen mit 90 % zu den am häufigsten vorkommenden Tumoren im Gesichtsbereich. Ihre Inzidenz ist seit den letzten 30 Jahren stetig angestiegen. Primär wird vermutet, dass die durch UV-B-Strahlung gesetzten Schäden nicht mehr vollständig beziehungsweise nicht fehlerfrei repariert werden und somit zu bleibenden Mutationen und Alterationen in der DNA führen (Brash et al., 1996). Bei 50 % der Basalzellkarzinomen wurden UV-induzierte Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens gefunden (Grossmann et al., 1997; Brash et al., 1996). Dabei kommt es mit zunehmendem Alter zu einer Anhäufung von Mutationen. Insbesondere die steigende Anzahl der nicht melanozytären Hauttumoren in höheren Lebensjahren wird auf diesen Effekt zurückgeführt (Ouhtit et al., 1998). Als anderen Effekt können UV-Strahlen das Immunsystems hemmen, wodurch der Abbau geschädigter Zellen unterbunden wird und somit zu deren Manifestierung führt (de Gruijl et al., 2011; Gree et al., 1999). Es wird hierbei von einer Wirkung auf die T-Zellen und des Provitamins 7-Dehydrocholesterol in der Haut ausgegangen.

1. Einleitung

1.4.4 Betelnuss

In weiten Teilen Asiens stehen die Mediziner einem hierzulande weniger verbreiteten Risikofaktor gegenüber – dem Kauen von Betelnüssen (Gupta et al., 2002; Ferlay et al., 2008). Die Betelnuss ist der Samen der Frucht der Betelnusspalme *Areca catechu* und kulturhistorisch im asiatischen Raum verankert (Warnakulasuriya et al., 2002). Die Nuss wird selten allein gekaut, sondern hierfür oftmals mit Tabakblättern umwickelt. Der Tabak galt lange als Ursache für die hohen Zahlen an neuerkrankten HNSCC-Patienten im asiatischen Raum. Heute wird weniger der Tabak in gekauter Form der Entstehung eines HNSCC zugeordnet, sondern die in der Betelnuss enthaltenden Alkaloide: Arecolin, Arecaidin, Arecolidin, Guvacolin und Guvacin. Diese verursachen eine anhaltende inflammatorische Reaktion der Mukosa, in Folge dessen es zu einer übermäßigen oralen submukösen Fibrose kommen und so am Ende die Karzinomentstehung begünstigt werden kann (Rehmann et al., 2015).

1.5 Klinische Aspekte der Kopf-Hals-Tumoren

1.5.1 Pathologie der Kopf-Hals-Tumoren

Plattenepithelkarzinome können sich auf der Basis oraler Präkanzerosen (z. B. Leukoplakieformen, Erythroplakie, oraler Lichen planus, submuköse Fibrose) oder auch aus unauffälliger Schleimhaut entwickeln (Pathology and Genetics: Head and Neck Tumours, World Health Organization (WHO), 2005). Manifeste Tumoren können Zahnlockerungen, Lymphknotenschwellungen, Schluckbeschwerden, Atemnot, länger auftretende Heiserkeit, Foetor ex ore, Blutungen, Fehlstellungen von Zahnersatz und Taubheitsgefühle auslösen. Allgemeine Symptome sind Leistungsabfall, Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Gewichtsabnahme. Mit zunehmender Größe der Tumoren breitet sich dieser flächig aus und ist durch sein zapfenförmiges Wachstum in die Tiefe gekennzeichnet. Dies führt zu funktionellen Beeinträchtigungen wie Mundöffnungsbehinderung, Schwierigkeiten beim Schlucken, Kauen oder Sprechen sowie zu Ernährungsstörungen. Neben den allgemeinmedizinischen Beeinträchtigungen, kann es in fortgeschrittenen Fällen zu Frakturen oder zum Durchbruch der äußeren Haut kommen. Die begleitende Schmerzlosigkeit lässt in den meisten Fällen eine Entzündung ausschließen.

1. Einleitung

1.5.2 Diagnostik der Kopf-Hals-Tumoren in der Zahnarztpraxis

Bereits bei der Erstdiagnose besitzen zwei Drittel der Patienten weit fortgeschrittene Karzinome und weisen in 50 % bis 60 % der Fälle erste lokoregionäre Metastasen auf (Vokes et al., 1993). Es ist daher sehr wichtig, dass Zahnmediziner bösartige Veränderungen früh und sicher erkennen um ein weiteres Voranschreiten der Erkrankung durch fehlerhafte Beurteilung und Behandlung zu verhindern. Bei jeder Kontrolluntersuchung sollten deshalb sämtliche relevante Regionen eingesehen, kritisch untersucht und mechanische Irritationen, z. B. verursacht durch überstehende und scharfe Kronen- oder Prothesenkanten, ausgeschlossen werden. Zur Verifizierung einer Diagnose empfiehlt es sich, Größe, Lokalisation, Dolenz, Oberflächenbeschaffenheit, Konsistenz, Symmetrie, Blutungsneigung und lokale Mobilität zum Untergrund durch einen ausführlichen systematischen Untersuchungsgang zu beurteilen. Zur Basisdiagnostik gehört weiterhin eine Vitalitätsprobe der benachbarten Zähne zur Erfassung odontogener entzündlicher Ursachen, die Bestimmung parodontaler Parameter und die röntgenologische Beurteilung des Zahnstatus und ossärer entzündlicher Ursachen durch eine Panoramaschichtaufnahme. Eine einfache Palpation der regionären Lymphknoten sowie eine Sensibilitätsprüfung des N. trigeminus zur Bewertung der Schmerzempfindung oder zur Erkennung einer Tumorausbreitung sollten ergänzend erfolgen. Diese Grunduntersuchungen können in der zahnärztlichen Praxis ohne großen instrumentellen Aufwand durchgeführt werden.

1.5.3 Weiterführende Diagnostik der Kopf-Hals-Tumoren in spezialisierten Facheinrichtungen

Zur Diagnosesicherung werden in spezialisierten Zentren der Mund-,Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKG) oder der Hals-,Nasen- und Ohrenheilkunde (HNO) eine indirekte Laryngoskopie bzw. eine Panendoskopie durchgeführt. Zur Beurteilung einer möglichen bereits stattgefundenen Streuung der Tumoren wird die gesamte Region von der Schädelbasis bis zum oberen Thorax mit bildgebenden Verfahren wie einer Computertomographie (CT), einer Magnetresonanztomographie (MRT) und einer Positronenemissionstomographie (PET) untersucht. Der Vorteil eines MRT ist eine genauere Abgrenzung der Weichgewebe und damit die Beurteilung der Eindringtiefe der Tumoren. Das PET-CT mit radioaktiv markierter Fluordesoxyglucose (18 F) erlaubt den Nachweis sehr kleiner Tumoren und ist geeignet für die Suche nach Lymphknoten- und Fernmetastasen oder nach Rezidiven (Argiris et al., 2008).

1. Einleitung

Im Rahmen der Beurteilung von Fernmetastasen und synchronen Lungentumoren können darüber hinaus abdominale Ultraschalluntersuchungen und Röntgenthoraxaufnahmen durchgeführt werden (Sanderson et al., 2002). Die Inzidenz synchroner Zweittumoren oder von Fernmetastasen liegt bei Karzinomen der Mundhöhle, abhängig von der Größe der Primärtumoren, zwischen 4 % und 33 %, wobei die fortgeschrittenen Stadien und Patienten mit Lymphknotenbefall in Level IV (American Academy of Otolaryngology (engl.); Unterteilung der Halslymphknoten nach Robbins in sechs Level (Level IV= untere tiefe juguläre Lymphknoten)) besonders häufig betroffen sind (de Bree et al., 2000; Haughey et al., 1992; Warner et al., 2003). Den Goldstandard für die Diagnosesicherung von Kopf-Hals-Tumoren stellt die Biopsie der verdächtigen Primärläsion und eine ggf. angewandte Feinnadelaspiration eines vergrößerten Lymphknotens mit anschließender histopathologischer Untersuchung dar (Sanderson et al., 2002). Lokoregionäre Lymphknoten werden routinemäßig histologisch auf disseminierte Tumorzellen überprüft, da 80 % der tumorfrei diagnostizierten Lymphknoten noch Mikrometastasen enthalten. Diese okkulten Tumorzellen sind eine Ursache für die sog. minimale Resterkrankung (MRD= minimal residual disease (engl.)), da sie aufgrund der rapiden Progression schnell Rezidive und weitere Metastasen bilden können.

Nach den oben genannten Verfahren kann die Diagnose gestellt, ein Staging der Tumore durchgeführt und ein anschließendes fachübergreifendes Therapieschema entworfen werden.

1.5.4 Staging

Unter „Staging“ versteht man die Einteilung von Tumoren. Die Union internationale contre le cancer (UICC) teilt Tumoren nach der TNM-Klassifikation in fünf verschiedene Entwicklungsstadien ein. In dieser Arbeit wurden die malignen Veränderungen entsprechend der TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung der UICC zugeordnet. Die TNM-Klassifikation der UICC und des American Joint Committee on Cancer (AJCC) beschreiben die anatomische Ausdehnung der Primärtumoren und dessen Infiltration in benachbartes Gewebe (T), das Vorkommen regionaler Lymphknotenmetastasen (N= Nodus (lat.); Größe, Anzahl und Lage) und die Fernmetastasierung (M) mit Organbefall. Die Ergebnisse der **TNM**-Klassifikation, die im Rahmen der Diagnostik mittels Laboruntersuchungen, bildgebender Verfahren und Biopsie und/oder Operationen ermittelt werden, stellen die Grundlage des Stagings dar.

1. Einleitung

Die T-Stadien sind dabei abhängig von der jeweiligen Tumorlokalisation (Patel et al., 2005). In Tabelle 2 wird dies anhand des Mundbodenkarzinoms dargestellt. T1 und T2 entsprechen frühen Tumorstadien und T3 und T4 späten fortgeschrittenen Tumorstadien.

Tabelle 2 TNM-IUCC Klassifikation 7.Auflage auf das Mundbodenkarzinom angewandt

TNM	Erläuterung	TNM	Erläuterung
T1	Tumor < 2 cm	T2	Tumor > 2 cm, aber < 4 cm
T3	Tumor > 4 cm	T4	Infiltration benachbarter Strukturen (Knochen, Muskel, Halsweichteile Haut etc.)
N1	solitäre ipsilaterale Lymphknoten < 3 cm	N2a	solitäre ipsilaterale Lymphknoten > 3 cm, aber > 6 cm
N2b	multiple ipsilaterale Lymphknoten < 6 cm	N2c	bi-/kontralaterale Lymphknoten < 6 cm
N3	Lymphknoten > 6 cm	0	kein Befall der Struktur (T0, N0, M0)
M1	Metastasen vorhanden	x	keine Beurteilung möglich (Tx, Nx, Mx)

Die TNM-Kombinationen können bei vergleichbarer Prognose in 4 Tumorstadien zusammengefasst werden (vgl. Tbl. 3).

Tabelle 3 Stadieneinteilung der Union internationale contre le cancer (TNM-UICC 7. Auflage)

Stadium	T	N	M
0	Tis*	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVA	T1, T2, T2	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
IVB	T4b	jedes N	M0
	jedes T	N3	M0
IVC	jedes T	jedes N	M1

*Tis: Tumor in situ

- cTNM** für **c** = klinisch (engl. clinical.)
- pTNM** für **p** = pathologische, postoperative Klassifikation
- uTNM** für **u** = Ultraschall
- aTNM** für **a** = Autopsie
- yTNM** für **y** = neoadjuvante Chemotherapie, Radiotherapie oder Radio-Chemo-Therapie
- rTNM** für **r** = Rezidiv
- TNMc** für **c** = gibt die Zuverlässigkeit der Diagnose an (engl. certainty)

1. Einleitung

Zusätzlich möglich:

L0/1	= Invasion in Lymphgefäße oder Venen
Pn0/1	= Perineurale Invasion
SX/0–3	= Serumentumormarker
R0/1/2	= Angabe, ob Tumorgewebe nach einer Therapie verblieben ist (lokal, regionär oder Fernmetastasen)

Histopathologisch wird die Abweichung des Tumorgewebes von seinem Ursprungsgewebe durch das Grading angegeben. Dies erfolgt nach vier Differenzierungsgraden (G1: hochdifferenziert bis G4: undifferenziert). Zwischen der Prognose und dem Tumorgrading besteht eine klare Korrelation. Hierbei korreliert ein hohes Grading sowie die höheren Kategorien der TNM-Einteilung mit einer schlechteren Prognose (Coatesworth et al., 2002; O'Brien, 2003). Die genaue klinische und histopathologische Inspektion der Tumoren erleichtert die Wahl der Therapie, den Informationsaustausch zwischen den Behandlungszentren, kann Hinweise auf die Prognose geben und hilft bei der Auswertung onkologischer Ergebnisse (Wittekind et al., 2002). Neben den genannten Vorteilen beinhaltet das oben genannte Klassifikationssystem aber auch einige Nachteile, wie die fehlende Einbindung weiterer Faktoren pathologischer oder molekularbiologischer Art, die besonders für die Auswahl und Bedeutung nichtchirurgischer Therapiemodalitäten relevant sein könnten (van der Schroeff et al., 2009). In dieser Arbeit wurde für das Tumorstaging die 7. Version der UICC für die TNM-Klassifikation gewählt. Die aktuelle 8. Version vom 11.01.2017 findet in der vorliegenden Arbeit keine Berücksichtigung. Für Kopf-Hals-Tumore wären nach der neuen TNM-Klassifikation die Invasionstiefe des Tumors (≤ 5 mm, > 5 und ≤ 10 mm, > 10 mm), beim Lymphknotenstatus die Einbeziehung des Fehlens oder Vorhandenseins einer extranodalen Tumorausbreitung, ein Immunhistochemischer p16-Status und Untersuchungen zum EBV- und HPV/p16-Nachweis von Bedeutung.

1.6 Therapie von Kopf-Hals-Tumoren

In der Therapie der Kopf-Hals-Tumoren werden zwei Ansätze unterschieden: die Behandlung mit kurativer Intention und die palliative Behandlung. Die kurativ intendierte Behandlung der Kopf-Hals-Tumoren setzt sich aus alleiniger chirurgischer Therapie, alleiniger Strahlentherapie, Strahlentherapie in Kombination mit einer Chemotherapie sowie Kombinationen aus chirurgischer Therapie, Strahlentherapie und Chemotherapie zusammen und hat zum Ziel die Krankheit zu heilen (Pignon et al., 2000; Forastiere et al., 2003; Shah et al., 2009). Hierbei stellt die Kombination von Operation und Bestrahlung eine sehr wichtige Therapieoption dar.

1. Einleitung

Die palliative Therapie wird in Ausnahmefällen durchgeführt, wenn Patienten die Behandlung ablehnen, zu alt, multimorbide und die klinische Prognose der Tumoren aussichtslos erscheint. Sie zielt nicht auf die Heilung einer Erkrankung ab, sondern auf eine Linderung der Symptome sowie eine Reduktion der Nebenwirkungen. Für Patienten mit metastasierten oder rezidivierenden Tumoren gibt es im Fall einer Resektabilität die Möglichkeit der Rezidivoperation. Im Anschluss kann eine nochmalige Radio- oder Radio-Chemo-Therapie eingesetzt werden. Bei Inoperabilität besteht die Möglichkeit einer alleinigen Radiotherapie oder die Verbindung mit einer Chemotherapie. Zudem können auch die palliative Chemotherapie in Kombination mit einem Anti-EGFR-Antikörper gegeben werden. Insgesamt haben Patienten mit einem Rezidiv oder einer Fernmetastasierung eine sehr schlechte Prognose.

1.6.1 Chirurgie

Bei der gewählten Therapieform sollte die individuelle Situation des Patienten, die Erreichbarkeit tumorfreier Resektionsgrenzen und die postoperative Lebensqualität berücksichtigt werden. Dies beinhaltet die präoperative Beachtung folgender Kriterien: die Wahrscheinlichkeit funktioneller Beeinträchtigungen, die Resektabilität der Tumoren, der allgemeine Gesundheitszustand und der Wunsch des Patienten. Ein kleines und oberflächliches Karzinom der Mundhöhle mit niedrigem klinischen Stadium ohne Metastasierung kann mit alleiniger chirurgischer oder auch radiologischer Therapie geheilt werden (Lefebvre et al., 1994; Sessions et al., 2000). Für die Behandlung der meisten Kopf-Hals-Tumoren stellt die chirurgische Entfernung des Tumorgewebes die Therapie der ersten Wahl dar. Es wird eine vollständige Entfernung angestrebt. Hierbei muss ein Sicherheitsabstand von mindestens fünf mm eingehalten werden um R0 anzustreben. Ein verfehltes R0 verschlechtert die Überlebensprognose signifikant (Sessions et al., 2000; O'Brien et al., 2003). Das Ausmaß einer Operation ist durch den möglichen Verlust an Funktion sowie durch die damit verbundene Verminderung an Lebensqualität aufgrund äußerlicher Entstellung eingeschränkt. Gerade bei Tumoren der Mundhöhle und der mobilen Zunge können die Folgen der notwendigen Tumorsektionen entstellend wirken und die Sprache sowie das Schlucken erheblich beeinträchtigen (Salem et al., 2010). Neben der Operation des Tumors müssen auch die lokalen Halslymphknoten einer Behandlung unterzogen werden. Die Lymphknotengruppen am Hals werden anatomisch in sechs Level und sechs Sublevel eingeteilt (Robbins et al., 1991 und 2002). Die Einteilung ist entscheidend für den Operationsaufwand und die Prognose. Eine Neck dissektion (engl.; dt. Halspräparation) kann vor prophylaktischem oder therapeutischem Hintergrund durchgeführt werden.

1. Einleitung

Hierbei ist der Befall der Lymphknoten mit Metastasen entscheidend. Die Operation der Lymphknoten erfolgt nach standardisierten Schemata – radikal, modifiziert-radikal, selektiv und funktional. Die Abstufung der Operationsmethode wird aufgrund der anatomischen Strukturen getroffen, die erhalten werden können.

1.6.2 Radiotherapie

Die Radiotherapie stellt neben der chirurgischen Therapie einen der Grundpfeiler für die Behandlung von malignen Kopf-Hals-Tumoren dar. Bei der Radiotherapie müssen verschiedene Therapieansätze berücksichtigt werden. Sie kann über den kurativen Weg als primäre radikale Therapie, zur Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle prä- und postoperativ, in Kombination mit einer simultanen Chemotherapie sowie zur Linderung von tumorbedingten Symptomen bei der palliativen Begleittherapie zum Einsatz kommen.

Im kurativen Therapieansatz ist das Ziel der Radiotherapie die möglichst vollständige Eliminierung der Tumorzellen unter Schonung der umliegenden gesunden Gewebeanteile. Dabei kann sie extern mit ionisierender Strahlung (perkutane Therapie) oder intern nach Implantation von speziellen Kathetern im Nachladeverfahren (Afterloading (engl.)) durchgeführt werden. Aus einigen Studien geht hervor, dass fortgeschrittene Karzinome der Mundhöhle (T3, T4) nach alleiniger Strahlentherapie eine höhere Rezidivrate aufweisen als andere Karzinome im Kopf- und Halsbereich (Levendag et al., 1996). Da sich mehr als 50 % der Patienten zum Diagnosezeitpunkt in einem lokal fortgeschrittenen Tumorstadium befinden, werden sie daher zumeist kombiniert chirurgisch und strahlentherapeutisch behandelt (Seiwert et al., 2005).

Die Gesamtdosis wird in der Regel in mehrere Einzeldosen aufgeteilt konventionell fraktioniert (1,8 Gy bis 2,0 Gy täglich, fünfmal pro Woche), akzeleriert (> 10 Gy pro Woche) oder hyperfraktioniert (1,1 Gy bis 1,2 Gy, zweimal täglich, fünfmal pro Woche). Die Gesamtdosen liegen bei einer postoperativen Radiotherapie im Tumor- und befallenen Lymphknotenbereich zwischen 56 bis 66 Gy sowie bei einer primären Radiotherapie zwischen 66 Gy bis 72 Gy.

Aktuell werden bei der Strahlentherapie zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren dreidimensionale Bestrahlungstechniken (3D) genutzt. Dazu zählen die intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) und die dreidimensionale konformale Radiotherapie (3D Conformal Radiotherapy (engl.), 3D-CRT). Durch die 3D-CRT und insbesondere die IMRT können verschiedene regionäre Bereiche des Tumorbefalls mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen behandelt werden. Durch eine Vielzahl kleiner Felder gelingt es, nicht nur die Form, sondern auch die Strahlenintensität an die Tumorform anzupassen (sog. Fluenzmodulation) (Braaksma et al., 2003).

1. Einleitung

Hierdurch ist es bereits möglich, eine signifikante Reduktion der Strahlenbelastung auf die Speicheldrüsen, speziell der Glandulae parotidae, zu erreichen. Hey et al. konnten zeigen, dass 40 % des Speichelflusses erhalten werden kann, wenn Grenzwerte von weniger als 27,7 Gy berücksichtigt werden (Hey et al., 2009). Der Einsatz moderner 3D-Techniken ist somit unverzichtbar, da nur durch diese Methode deutliche Dosisverminderungen an den Ohrspeicheldrüsen zu erreichen sind und die Nebenwirkung eines stark verminderten posttherapeutischen Speichelflusses vermieden werden kann.

Lokal fortgeschrittene Tumoren sind häufig charakterisiert durch eine ausgeprägte Tumorphoxie (Becker, 1998; Dunst et al., 1998). Hypoxische Zellen sind weit weniger strahlensensibel. Das Vorhandensein von Tumorphoxie verschlechtert durch die hohe Strahlenresistenz, die Prognose der Patienten. Diese Patienten weisen nach der Therapie weiterhin vitale Tumorzellen auf (unvollständige Remission), aus denen dann in relativ kurzem Intervall ein Rezidiv entsteht. Zudem weisen diese Patienten eine höhere Rate an Fernmetastasen auf. Somit bleibt es von besonderem Interesse für das Monitoring der Kopf-Hals-Tumoren herauszufinden, ob eine solche Strahlenresistenz vorliegt, um die gewählte Therapie optimal anzupassen.

Wird eine Strahlenresistenz vermutet, so kann die Fraktionierung in der Therapie umgestellt und eine hyperfraktionierte akzelerierte Radiotherapie (HART) eingesetzt werden. Bei dieser Therapieform wird der Fraktionierungsrhythmus mit einer Einzeldosis von 1,8 oder 2 Gy fünfmal pro Woche (normofraktionierte Strahlentherapie) auf zweimal pro Tag im Abstand von mindestens sechs Stunden verändert und somit die Gesamtbehandlungszeit von regulär sieben Wochen auf circa sechs Wochen verkürzt. Diese Modulation des Therapieschemas führt nicht selten zu einer erhöhten Schädigung des Normalgewebes.

Grundsätzlich hängt die Ausprägung der Nebenwirkungen von der Intensität der angewandten Therapieform und der individuell unterschiedlichen Empfindlichkeit des Patienten ab. Die Nebenwirkungen einer Bestrahlung im Kopf- und Halsbereich sind mit modernen Bestrahlungstechniken und Supportivmaßnahmen gut zu beherrschen (DGRO: Leitlinie der Radioonkologie, 2006; Źmijewska-Tomczak et al., 2014). Nach wie vor leiden viele Patienten infolge der erhöhten Strahlenempfindlichkeit der Schleimhäute im Mund- und Rachenbereich unter Entzündungen und Mundtrockenheit, wodurch auch die Schluckfähigkeit und das Geschmackempfinden beeinträchtigt werden. Eine Rötung der äußeren Haut im bestrahlten Gebiet und die durch die Lymphabflussbehinderung auftretende Erhärtung des Unterhautbindegewebes sind ebenfalls Folgen der Bestrahlung.

1. Einleitung

1.6.3 Chemotherapie und Radio-Chemo-Therapie

Im Fall von Kopf-Hals-Tumoren bringt eine alleinige Chemotherapie im Vergleich zu den anderen Therapien keinen Überlebensvorteil (Pignon et al., 2000). Nur eine simultane Chemotherapie zur Erhöhung der Radiosensibilität von Plattenepitheltumoren kann dazu beitragen, hypoxisch veränderte Tumorzellen zu eliminieren. Dies führt dazu, dass eine Kombinationstherapie aus Chemo- und Radiotherapie eine geringere Mortalitätsrate aufweist als die jeweilige Einzeltherapie (Pignon et al., 2000). Viele Studien dokumentieren, dass bei der primären als auch der postoperativen Radiotherapie die Kombination aus Strahlenbehandlung und simultaner Chemotherapie der alleinigen Bestrahlung in Bezug auf die Rezidivfreiheit überlegen ist (Corrao et al., 1999; Jones et al., 2002), sodass im Folgenden mehr auf die Radio-Chemo-Therapie (RCT) eingegangen wird. Die RCT wird in drei Formen eingeteilt: die definitive RCT ohne Operation, die adjuvante RCT, bei der nach der Operation mit der RCT begonnen wird und die neoadjuvante RCT, bei der vor der Operation mit der RCT begonnen wird.

Als Chemotherapeutika bei der Kombinationstherapie werden platinhaltige Zytostatika (Cisplatin oder Carboplatin), 5-FU (5-Fluorouracil) und Taxane eingesetzt. Den Goldstandard stellt seit Jahren die Therapie mit Cisplatin dar (Howaldt et al., 2000; Hafidh et al., 2006). In der Therapiemedikation wird zwischen Mono- und Polychemotherapeutika unterschieden. Häufig eingesetzte Substanzen in der Monotherapie sind Methotrexat (MTX), Cisplatin, Carboplatin, Paclitaxel und Docetaxel (Vermorken et al., 2005). Dabei liegen die Vorteile der Monotherapie in der besseren Steuerbarkeit und berechenbaren Toxizität, die Nachteile in der geringen Wirksamkeit im Vergleich zu den intensiveren Polychemotherapien, wie bei der Kombination aus Cisplatin und 5-FU (5-Fluorouracil) (Budach et al., 2006). Die Durchführung einer Polychemotherapie ist jedoch abhängig vom Allgemeinzustand des Patienten.

Die Chemotherapeutika werden bei der kombinierten RCT simultan während der Bestrahlung zur Radiosensibilisierung eingesetzt. Man nutzt dabei den supraadditiven Effekt, d.h. die lokal größere Kombinationswirkung im Vergleich zur Addition der Einzeleffekte. Um diesen Effekt zu erreichen, müssen die Zytostatika in bestimmten Zeitabständen zu der täglichen Bestrahlungsfraction während der Strahlentherapie-Serie appliziert werden (Bosetti et al., 2003). Oft lässt sich durch eine Kombination verschiedenartig wirkender Zytostatika ein besseres Ansprechen der Tumoren auf die Behandlung erreichen.

Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen, inoperablen Tumoren ohne Metastasierung wurden verschiedene Therapieansätze untersucht.

1. Einleitung

Die Induktionschemotherapie mit darauffolgender Radiotherapie zeigte in den letzten beiden Jahrzehnten jedoch keinen Überlebensvorteil bei Kopf-Hals-Tumoren (Pignon et al., 2000). Im Hinblick auf die Mortalitätsrate und den Organerhalt bildet die Dreifachkombination mit Taxanen (Docetaxel), Cisplatin und 5-Fluorouracil (5-FU) eine vielversprechende Alternative zur Standardtherapie. Seit 2004 wird die Dreifachkombination Docetaxel, Cisplatin und 5-Fluorouracil eingesetzt, die mit Ansprechraten von über 90 % bei Primärtumoren und 43 % bei Rezidiven zu einer deutlichen Verbesserung der Therapie führte (Posner et al., 2001; Baghi et al., 2006).

Die Effektivität der neoadjuvanten Chemotherapie konnte verbessert werden, indem einige Zytostatikakombinationen wie z. B. Paclitaxel/Cisplatin, insbesondere in Kombination mit monoklonalen Antikörpern (z. B. Cetuximab), eingesetzt wurden. Mehr als 90 % der epithelialen Kopf-Hals-Tumoren überexprimieren den funktionell aktiven Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Durch Hemmung dieses Rezeptors, z. B. über Cetuximab, lassen sich weitere Behandlungswege erschließen. Die Kombination der primären Strahlentherapie mit Cetuximab ist wirksamer als die alleinige Radiotherapie und verbessert die progressionsfreie Überlebenszeit im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung signifikant (Bonner et al., 2006).

1.6.4 Diagnostik und Staging mit Hilfe von Biomarkern

Eine vielversprechende Ergänzung für die Diagnostik von Kopf-Hals-Tumoren stellen Biomarker dar. Biomarker sind laut ihrer Definition objektiv messbare Parameter biologischer Prozesse, die diagnostische und prognostische Aussagekraft haben ("any substance, structure, or process that can be measured in the body or its products and influence or predict the incidence of outcome or disease" (engl.), Biomarkers Definition Working Group, 2001). Biomarker zirkulieren im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten und ihr Auftreten und ihre Konzentrationsänderungen sind mit dem Entstehen, der Ausbreitung, der Prognose oder dem Therapieansprechen von Erkrankungen assoziiert. In der modernen Medizin stellen Biomarker einen wichtigen Parameter zur vereinfachten und sicheren Diagnosefindung und des Behandlungsverlaufs dar (Zen et al., 2012). Speziell in der Onkologie haben sie eine große Bedeutung und sind entweder Bestandteile der Krebszellen selbst (Tumorantigene) oder aber vom Tumor oder vom gesunden Gewebe als Reaktion auf die Krebszellen direkt oder indirekt gebildete Stoffwechselprodukte, wie zum Beispiel Enzyme oder Hormone. Für eine einfache und schnelle Diagnostik werden Biomarker bevorzugt, welche in Körperflüssigkeiten gelöst sind (humorale Tumormarker). Diese sollen helfen die Diagnostik zu unterstützen, damit frühzeitig ein Tumor spezifisch identifiziert werden kann (Rifai et al., 2006).

1. Einleitung

Viele Studien haben Blut- und Speichelproben von gesunden Probanden und von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren auf Tumormarker überprüft (Gottschlich et al., 2000; Sorio et al., 2006; Arellano et al., 2009). Der Fokus lag hierbei auf dem Messen spezifischer im Speichel oder auch im Blut vorhandener Makromoleküle. Es wurden Enzyme, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen, Endothelin, Telomerasen, Zytokeratine, mRNA- und DNA-Sequenzen untersucht.

In den letzten Jahren haben zahlreiche Forschungsarbeiten demonstriert, dass im Speichel von Patienten mit malignen Kopf-Hals-Tumoren epitheliale Tumormarker wie Cyfra 21-1, TPS und CA 12 nachgewiesen werden können. Ebenso waren verschiedene sauerstoffabhängige stress-assoziierte Speichelparameter wie ROS und RNS, biochemische und immunologische Parameter wie IGF, MMP's und RNA-Transkripte von IL8, IL-1B nachweisbar (Gottschlich et al., 2000; Walther et al., 1993; Sorio et al., 2006). In anderen Fachbereichen werden Biomarker schon seit Jahren eingesetzt. Es korrelieren z. B. erhöhte präoperative CEA-Werte mit dem Stadium, der Rezidivrate und der Überlebenszeit kolorektaler Karzinome. Als tumorassoziierte Antigene haben das CEA und das CA 19-9 für die Verlaufskontrolle von intestinalen Karzinomen einen hohen Stellenwert erreicht. Diese Tumormarker (CEA, CA 19-9 und SCC) konnten ebenfalls im Serum von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen nachgewiesen werden, verlieren aber ihre Bedeutung im Vergleich zu den Werten bei intestinalen Tumoren. Die Thymidinkinase (TK) sowie die dTTPase sind unspezifische Proliferationsindikatoren und als zelluläre Enzyme an der Kontrolle der DNA-Synthese beteiligt. In einer Studie zur klinischen Leistungsfähigkeit von CEA, SCC, CA 19-9, TK und dTTPase als Tumormarker, wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten, 26 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich untersucht. Es konnten keine deutlichen und signifikanten Spiegel erhöhungen im Serum nachgewiesen werden. Somit ließen sich keine signifikanten Korrelationen zwischen den Serumspiegeln und der Tumorlokalisierung, der Tumorgröße, dem histologischen Differenzierungsgrad und dem Allgemeinzustand der Patienten nachweisen. In der weiteren, posttherapeutischen Verlaufsbeobachtung versprachen die Marker auch bei verschiedenen Therapiemodalitäten und trotz Tumorfreiheit keine krankheitshinweisenden Auskünfte (Walther et al., 1993).

1. Einleitung

1.7 Molekulare Biomarker- mikroRNA

1.7.1 Definition und Genese

Aufgrund der unzureichenden Spezifität und Sensitivität konventioneller Diagnostikmethoden setzt die aktuelle Forschung im Bereich der Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich auf molekulare Marker (Park et al., 2009; Farnebo et al., 2011; Liu et al., 2012). Mit einem besseren Verständnis der Tumorbilogie können Ansätze für die Entwicklung wirksamerer und individuellerer Behandlungsmethoden gefunden werden. Hierbei nimmt die mikroRNA neben anderen Biomarkern (p53, EGFR, HPV-Onkogen etc.) eine Sonderstellung ein. Laut Definition sind mikroRNA nichtcodierende kurze RNA-Moleküle (18 bis 25 Nukleotide) endogenen Ursprungs, die als spezifische translationale Repressoren wirken (Bartel, 2004; Calin et al., 2006). MikroRNA können über diese Modulation der Gen-Expression regulierend auf die Zellphysiologie wirken und dabei die Tumorgenese in einem frühen Stadium beeinflussen. 1993 wurden sie das erste Mal von Lee beschrieben (Lee et al., 1993). Seitdem kennt man ca. 2500 unterschiedliche mikroRNA („Mirbase.org“ Datenbank). Allein auf der Datenbank „Pubmed“ wurden seitdem ca. 67.000 Publikationen zum Thema mikroRNA veröffentlicht (Abb.1).

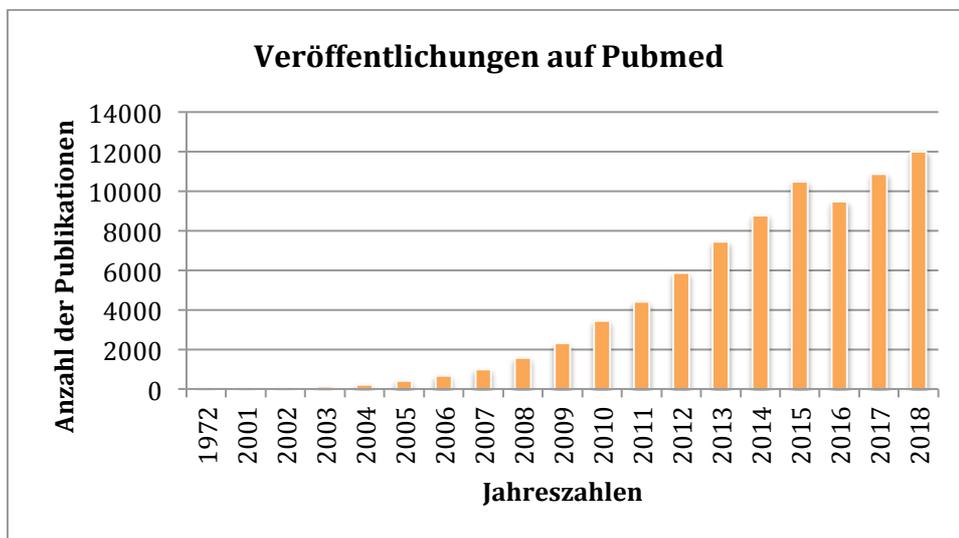


Abbildung 1 Veröffentlichungen zum Thema mikroRNA auf Pubmed von 1972- 2018

Die Biogenese und die Prozessierung der mikroRNA in menschlichen Zellen wurden bereits gut untersucht (Abb. 2). Sie wirken im Zytoplasma und binden an die Ziel-mRNA, wenn diese den Nukleus verlässt. Einige mikroRNA sind in Clustern angeordnet und werden als Polycistron transkribiert (Lee et al., 1993). Etwa 40 % der mikroRNA sind in den Introns von proteinkodierenden Genen lokalisiert und werden nach dem Spleißen autonom prozessiert (Rodriguez et al., 2004).

1. Einleitung

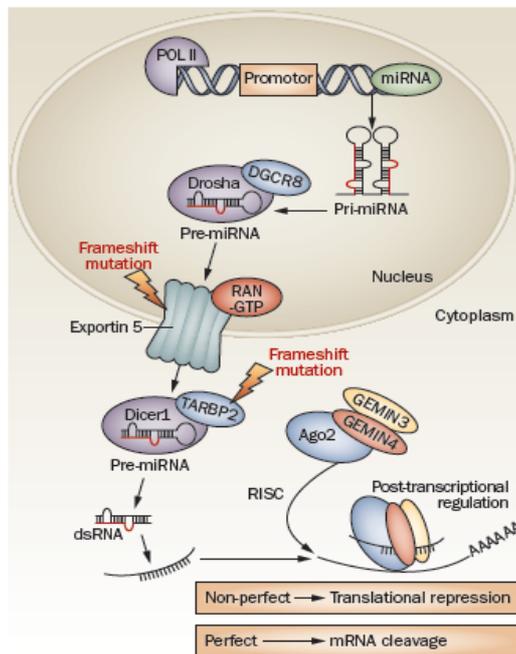


Abbildung 2 Entstehung und Wirkungsweise der mikroRNA (Cortez et al., 2009)

Es wird angenommen, dass etwa 70 % aller humanen proteinkodierenden Gene von mikroRNA reguliert werden (Friedman et al., 2009). Somit sind sie wesentliche Regulatoren der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Guarnieri, 2008; Hunter et al., 2008). MikroRNA weisen aufgrund ihrer geringen Länge sowie der stabilen Assoziation an ihre Bindungspartner Argonaute-Proteine (hAgo2), eine hohe Resistenz gegen den Abbau durch RNAsen auf, zirkulieren hoch stabil im Serum und Plasma, sind resistent gegenüber extremen pH-Wert und Temperaturschwankungen und können mit einfachen molekularbiologischen Methoden (u. a. qRT-PCR, mikroRNA Assays) in Geweben und Körperflüssigkeiten verlässlich nachgewiesen werden (Hanson et al., 2009; Zubakov et al., 2008). Durch ihre verschiedenen Expressionsmuster werden sie in physiologischen Prozessen unterschiedlich reguliert, wobei sie meist gewebespezifisch in Assoziation zu nahegelegenen Genen organisiert sind. Neben der klassischen Einteilung der Tumoren nach Morphologie und Histologie beschreiben mikroRNA zugrunde liegende genetisch-regulatorische Veränderungen. Das veränderte mikroRNA Expressionsprofil kann die Entschlüsselung der Entwicklungsgeschichte von menschlichen Tumoren ermöglichen und die erfolgreiche Klassifikation auch in schlecht differenzierten Fällen ermöglichen. Hierbei genügt eine kleine Zahl von mikroRNA (Lu et al., 2005; Calin et al., 2002).

1. Einleitung

Aufgrund dieser Vielseitigkeit besitzen die Expressionslevel zirkulierender mikroRNA in Körperflüssigkeiten ein hohes Potential für den Gebrauch als neuartige, minimal invasive Biomarker in der Tumorklassifikation, Diagnostik und der Überwachung von Tumoren (Bartel, 2004). Das Expressionsmuster zirkulierender mikroRNA korreliert stark mit pathologischen Veränderungen. Spezifische mikroRNA konnten als Biomarker im Serum von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen erfolgreich validiert werden, so etwa bei Prostatakarzinomen, Ovarialkarzinomen, Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen (Zen et al., 2012).

1.7.2 MikroRNA und ihre Rolle in der Tumorgenese

MikroRNA beeinflussen, je nach Spektrum der jeweiligen Ziel-Gene, die Aktivität von Onko- oder Tumorsuppressorgenen und spielen somit eine Doppelrolle in der Karzinogenese. In Tumoren ist die Expression von mikroRNA häufig dereguliert. Da sie bei der Entstehung spezifischer Proteine zu einem frühen Zeitpunkt eingreifen, ermöglichen mikroRNA einen Tumor in seinen Anfängen zu diagnostizieren (Bartel, 2004). In Tumorzellen sind mikroRNA aufgrund der rapiden Proliferation der Tumorzellen häufig in einer höheren Varianz exprimiert als in somatischen Zellen. Zusätzlich finden sich aufgrund von epigenetischen Alterationen oder Mutationen und chromosomalen Veränderungen wie Deletionen in der Regel veränderte mikroRNA-Expressionsmuster im Vergleich zu somatischen Zellen. Die Evaluierung geeigneter mikroRNA im Speichel zur Unterscheidung zwischen gesunden Probanden und Patienten mit Tumoren im Kopf- und Halsbereich wird seit langem intensiv bearbeitet. Die in dieser Arbeit untersuchten mikroRNA miR-93, miR-125a, miR-142-3p, miR-200a, miR-203, miR-213 (in der aktuellen miRBase Terminologie als miR-181a-3p benannt) stehen in Zusammenhang mit der Entstehung eines HNSCC. Diese mikroRNA sind bekannte Onkomirs, die eine noch nicht genau definierte Rolle bei der Genese verschiedener Tumorentitäten spielen (Yu et al., 2011; Wu et al., 2011; Lv et al., 2011). Eine der ersten Arbeiten auf diesem Gebiet ist eine Screeningarbeit von Park et al. im Jahr 2009, in der etwa 50 mikroRNA im Speichel nachgewiesen werden konnten. Auffällig waren die miR-200a und miR-125a, welche signifikant niedriger im Speichel von Mundhöhlenkarzinom-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden exprimiert wurden. Auch konnten Konzentrationsveränderungen der miR-125a, miR-200a, miR-93 und der miR-142-3p im Speichel zwischen Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden (Park et al., 2009).

1. Einleitung

Auch andere Arbeiten belegen das tumorspezifische Potential der mikroRNA. Bekannt ist, dass miR-125a die Proteinlevel der onkogenen Proteine ERBB2 und ERBB3 reduzieren kann, d. h. eine tumorsupprimierende Wirkung aufweist (Scott et al., 2007). Lui et al. konnten 2012 einen signifikanten Expressionsunterschied der miR-31 im Speichel zwischen Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen und gesunden Probanden feststellen (Liu et al., 2012).

Nicht nur für die Primärdiagnostik, sondern auch für das Monitoring während einer Tumortherapie können mikroRNA von großer Bedeutung sein. Trotz ihrer Rolle in onkogenetischer Zelltransformation zeigen die Mitglieder der let-7 Familie (let-7a, let-7b, let-7g und let-7i) in ihrer Expression eine deutliche Strahlensensitivität und könnten zur Überwachung einer Radio-Chemo-Therapie eingesetzt werden (Boyerinas et al., 2010). Die Hemmung von let-7g durch Antagomirs führt z. B. zu einer vergrößerten Radiosensitivität von Tumoren der Lunge (Weidhaas et al., 2007).

MikroRNA beeinflussen außerdem noch einen für den Erfolg der Strahlentherapie wichtigen Vorgang, den der zellulären Hypoxie (Kulshreshtha et al., 2007 und 2008). Durch hohe Metabolisierungsraten und eine rasante Proliferation können im Tumor hypoxische Regionen entstehen. Seit längerem ist bekannt, dass Sauerstoff einen radiosensibilisierenden Effekt hat, sodass für die Zellabtötung von hypoxischem Gewebe eine zwei- bis dreifach höhere Strahlendosis benötigt wird. Prägen Tumorzellen spezielle Phänotypen aus, kann es zur Therapieresistenz, aggressivem Tumorwachstum und maligner Progression kommen (Vaupel et al., 2007; Oliveira et al., 2008). Dies ist auch bei Mundhöhlenkarzinomen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Eckert et al., 2008 und 2011). Hypoxischer Stress aktiviert ein komplexes Gen-Expressionsprogramm, welches vom Hypoxie induzierbaren Faktor 1 (HIF-1), insbesondere seiner Untereinheit α (HIF-1 α), gesteuert wird (Swietach et al., 2007; Denko, 2008; Semenza, 2009). HIF-1 fördert die Umstellung des Zellstoffwechsels an einen verminderten zellulären Sauerstoffpartialdruck im Sinne einer Adaptation. So gibt es mikroRNA, die etwa HIF-1 α indirekt stabilisieren bzw. direkt inhibieren. Beispielsweise hemmt die miR-31 die Expression von Factor inhibiting HIF-1 (FIH), wodurch HIF-1 α stabilisiert wird (Liu et al., 2010). In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass sich das Expressionsprofil bei Hypoxie assoziierten mikroRNA auch bei Tumoren im Kopf- und Halsbereich verändert (Hui et al., 2010).

1.7.3 Therapiemonitoring mit Biomarkern

Trotz optimierter Operations- und Bestrahlungstechniken sowie kombinierter Chemotherapie haben sich die Heilungschancen des HNSCC in den letzten Jahrzehnten kaum verbessert. Eine der Hauptursachen für das mäßige Ansprechen auf die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen und die fehlenden Informationen über das biologische Verhalten der Tumoren im Therapieverlauf ist der Mangel an geeigneten Biomarkern (Pink et al., 2009). Nur bei vollständiger histologisch gesicherter Entfernung der Tumoren besteht ein verlässliches Therapieergebnis. Die in Kapitel 1.6.4. genannten Biomarker stellen eine Möglichkeit dar, neue Impulse in der Diagnose, Therapie und Nachsorge des HNSCC zu setzen. Ein wichtiges Ziel ist es, Tumormarker zu identifizieren, die den Tumor demaskieren, d. h. frühzeitig das Ansprechen der Tumoren auf die Therapie bzw. das Entstehen eines Rezidivs anzeigen. Leider sind die bisher untersuchten Tumormarker zur Beurteilung von HNSCC zu wenig spezifisch bzw. sensitiv. Hier stellen die mikroRNA eine neue vielversprechende Option dar. Das diagnostische und prädiktive Potential von mikroRNA ist in diesem Zusammenhang bislang aber nur unzureichend untersucht wurden.

2 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf den Nachweis der im Speichel von Patienten, die an einem Kopf-Hals-Tumor erkrankten, im Verlauf der Radio-Chemo-Therapie detektierbaren, spezifischen mikroRNA gelegt. Es sollten die Expressionsänderungen und deren klinische Wertigkeit für das Tumormonitoring untersucht und evaluiert werden. Die spezifischen mikroRNA waren speziell mit Kopf-Hals-Tumoren assoziiert und kommen als potentielle Biomarker für die Diagnostik, Therapie- und Rezidivkontrolle in Frage.

Fragestellungen:

- Sind mikroRNA nach einer Lagerungsperiode von mehr als fünf Jahren unter Kryokonservierung noch im Speichel nachweisbar?
- Wie verhalten sich die Expressionslevel verschiedener mikroRNA im Speichel von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren im chronologischen Verlauf einer Radio-Chemo-Therapie?
- Welche mikroRNA spielen bei der Überwachung einer Radio-Chemo-Therapie eine Rolle?
- Können die veränderten Expressionslevel spezifischer mikroRNA im Speichel als Tumormarker eingesetzt werden?
- Gibt es eine Korrelation zwischen den Veränderungen der Expressionsprofile einzelner mikroRNA und dem Auftreten von lokoregionären Rezidiven oder Fernmetastasen?

3 Patienten, Material und Methodik

3.1 Patienten

3.1.1 Patientenproben

Die Speichelproben wurden zwischen Juni 2002 bis Oktober 2008 von Patienten gesammelt, die an einem Tumor im Kopf- und Halsbereich erkrankt waren. Dies wurde im Rahmen einer von der Deutschen Krebshilfe geförderten Studie zu Untersuchungen der Regenerationsfähigkeit der Gl. parotis nach einer Radio-Chemo-Therapie durchgeführt (Hey et al., 2009). Dabei wurde untersucht, wie sich der Speichelfluss der Gl. parotis nach einer Radio-Chemo-Therapie und der Einfluss des Zystostatikums Cisplatin auf die Speichelfließrate auswirken. Für das Studienprotokoll, die Einwilligungserklärung und die retrospektiven Analysen der Speichelproben lag ein positives Votum der Ethik-Kommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor. Alle Daten wurden den Kranken- und Bestrahlungsunterlagen entnommen. Es wurden zwei Gruppen von Patientenproben unterschieden. Gruppe 1 waren Patienten, bei denen Speichelproben innerhalb festgelegter Intervalle gesammelt wurden und Gruppe 2 bildeten Patienten, bei denen Speichelproben innerhalb nicht festgelegter Intervalle gesammelt wurden.

3.1.2 Behandlungsplanung und Bestimmung der Speicheldosis

Im Folgenden wird ein kurzer Einblick in das vorangegangene Studiendesign (Hey et al., 2009) gegeben. Alle Patienten erhielten ein 3D-CRT und eine IMRT-Behandlungsplanung und wurden mit individuellen thermoplastischen Hals-Schulter-Masken immobilisiert. Das geplante Ziel der Studie war es, den Funktionsverlust der Gl. parotis durch eine cisplatinhaltige simultane Radio-Chemo-Therapie gegenüber einer alleinigen Radiotherapie zu untersuchen. Zum Schutz der Gl. submandibularis, der Gl. sublingualis und der kleinen Speicheldrüsen wurden keine Maßnahmen getroffen. Alle Patienten erhielten regelmäßig und in den gleichen Zeitabständen eine Bestrahlung mit einer Dosisfraktion von 2,0 Gy. Die kumulative Gesamtdosis von 25 Gy wurde über einen Zeitraum von sieben Wochen mit einer Fraktion pro Tag und fünf Fraktionen pro Woche verabreicht. Die Hauptstrahlendosis und die reduzierte spezifische Volumendosis wurden für jede Drüse durch ein Dosis-Volumen-Histogramm bestimmt. Basis dafür war ein von Lyman entwickelter Algorithmus, der die Information eines mehrstufigen DVH auf ein einstufiges reduzierte (Lyman et al., 1989).

3. Patienten, Material und Methodik

Anschließend wurde die Hauptdosis für jede ipsilaterale und kontralaterale Gl. parotis für jeden Patienten berechnet. Die Sammlung der Speichelproben vollzog sich in unterschiedlichen Etappen: vor der Radio-Chemo-Therapie, während der zweiten und sechsten Therapiewoche, innerhalb einer Woche nach der Radio-Chemo-Therapie sowie sechs Monate und 12 Monate danach. Alle Speichelproben wurden mindestens eine Stunde vor dem Essen zu einer standardisierten Tageszeit (9 bis 11 Uhr) gesammelt. Hierbei wurde eine einfache physiologische Situation simuliert, indem jeder Patient fünf Minuten auf einem Paraffinpellet (Ivoclar Vivadent, Schaan, Lichtenstein) kaute. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes, preiswertes und häufig genutztes Verfahren, welches den Vorteil hat, dass zusätzliche Medikamenteneinnahmen mit einhergehenden Nebenwirkungen entfallen. Nach der genannten Zeit wurden die Proben durch Ausspucken des Patientenspeichels in sterilen Test-Tubes gesammelt. Sofort nach der Entnahme wurden die Proben bei -80 °C kryokonserviert (Hey et al., 2009).

3.2 Material

3.2.1 Chemikalien und Kits

Für die Untersuchung wurden folgende Materialien und Kits verwendet:

Tabelle 4 Chemikalien

Name	Verwendung	Hersteller	Firmensitz
TRizol	RNA/DNA/Protein Extraktion	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Waschung	Sigma	Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Waschung	Sigma	Steinheim, Deutschland
Ethanol (96 %, 70 %)	Waschung	Sigma	Steinheim, Deutschland
RNAse freies Wasser	Verdünnung	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5 Enzyme und Puffer

Name	Verwendung	Hersteller	Firmensitz
DNase	Enzymatische Spaltung	Qiagen	Hilden, Deutschland
RDD-Puffer	pH-Wert Konstanthaltung	Qiagen	Hilden, Deutschland

3. Patienten, Material und Methodik

Tabelle 6 Kits

Name	Verwendung	Hersteller	Firmensitz
TaqMan mikroRNA Primer Kits	Primerset	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
Spezifische Primer			
miR-93		Assay-ID: 00432	
miR-125a		Assay-ID:000448	
miR-142-3p		Assay-ID:000464	
miR-200a		Assay-ID:000502	
miR-203		Assay-ID:000507	
miR-213		Assay-ID:000516	
let-7a		Assay-ID:000377	
let-7b		Assay-ID:002619	
let-7g		Assay-ID:002282	
let-7i		Assay-ID:002221	
U18 snoRNA		Assay-ID:001204	
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase Kit	Reverse Transkription	ThermoScientific	Waltham, MA, USA
HotStartTaq-Polymerase Kit	DNA Polymerase	Qiagen	Hilden, Deutschland

3.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Für die Analyse wurden folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien genutzt:

Tabelle 7 Geräte

Name	Hersteller	Firmensitz
Vortexgerät Genie 2	Schütt Labortechnik	Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Kendro Laboratory Products	München, Deutschland
Spektrometer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Thermocycler	Biometra	Göttingen, Deutschland
Rotorgene 6000 Real-Time-Cycler	LTF	Wasserburg, Deutschland

3. Patienten, Material und Methodik

Tabelle 8 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Firmensitz
Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Einweg-Handschuhe	Semperit	Sopron, Ungarn
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Messzylinder	Schott-Duran	Mainz, Deutschland

3.3 Methoden

3.3.1 RNA Isolation

Die RNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion unter Nutzung von TRIzol nach den Herstellervorgaben isoliert. Bei Raumtemperatur wurden 200 µl Speichel aufgetaut und anschließend bei 2000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert, um die restlichen Zellen und Zellbestandteile zu entfernen. Es wurde der Überstand abgenommen und mit 750 µl TRIzol in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 200 µl Chloroform zugesetzt und zwei Minuten per Hand geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung zehn Minuten bei 12.000 U/min unter 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase (circa 600 µl) wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Dabei war es wichtig, die Interphase bzw. das Protein nicht zu verletzen, da sonst unter Umständen Protein oder sogar Phenol mit überführt worden wäre. Es wurden 45 µl DNase-Mischung hinzugefügt. Diese Mischung wurde zuvor aus 40 µl RDD-Puffer und 5 µl DNase hergestellt. Durch Invertieren wurde alles gut vermischt. Bei Raumtemperatur wurde das Gemisch 15 Minuten inkubiert, um es anschließend mit 500 µl Isopropanol zu versetzen. Für die RNA-Fällung wurden die Reaktionsgefäße über Nacht (mindestens 12 h) bei -20 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Waschung. Am folgenden Tag wurde die Lösung unter 4 °C für zehn Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert, mit 1 ml 96-prozentigem eisgekühltem Ethanol versetzt und dann bei 10.000 U/min unter 4°C für zehn Minuten erneut zentrifugiert. Es erfolgte das Dekantieren des Überstandes sowie die Zugabe von 700 µl 70-prozentigem eisgekühltem Ethanol. Die Zentrifugierung erfolgte bei 6.000 U/min unter 4 °C für zehn Minuten. Vorsichtig wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet im umgedrehten Tube luftgetrocknet und in 25 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentrationsanalyse erfolgte in einem Ansatz aus 2 µl RNA-Lösung und 98 µl RNase-freiem Wasser mit Hilfe eines Spektrometers.

3. Patienten, Material und Methodik

Ebenfalls wurde eine Referenzlösung aus 2 µl RNasefreiem Wasser und 98 µl Aqua bidest hergestellt um die Proben gegeneinander zu messen. Die Messung erfolgte mit der jeweiligen Probelösung gegen die Referenzlösung bei 260 nm und 280 nm. Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach dabei 40 ng/µl. Der Quotient aus den Absorptionswerten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm ergibt die Reinheit (idealerweise zwischen 1,75 und 2,1 OD). Die Proben wurden bis zur complementary DNA-Synthese (cDNA, engl.) bei -20 °C gelagert.

3.3.2 MikroRNA-spezifische cDNA Synthese

In dieser Studie wurde der Inhalt des Speichels mithilfe des TaqMan-mikroRNA-Primer-Kits auf folgende mikroRNA untersucht: miR-93, miR-125a, miR-142-3p, miR-200a, miR-203, miR-213, let-7a, let-7b, let-7g, let-7i und U18 snoRNA (als Referenz). Für jede mikroRNA-cDNA-Synthese wurden 10 ng der RNA unter Benutzung der spezifischen Reverse Transkriptase und dem stem-loop-Primer verwendet. Die RNA wurde mit dem folgendem Ansatz im Thermocycler in cDNA überführt.

2,5 µl RNase freies Wasser
3,0 µl 5x Puffer,
2,0 µl dNTPs
1,0 µl RNase Inhibitor,
1,0 µl stem-loop-Primer (spezifisch für mikroRNA),
0,5 µl MLV Reverse Transkriptase
10 µl Reaktionsansatz

+ 5 µl RNA Verdünnung (2 ng/µl) der jeweiligen Probe

15 µl Gesamtansatz in 0,5 ml Reaktionsgefäß

Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben angesetzt und in 0,5-ml-Tubes zusammen mit der jeweiligen RNA-Verdünnung pipettiert. Außer der MLV-Reversen-Transkriptase wurde alles gut gevortext. Anschließend erfolgte im Thermocycler die reverse Transkription in cDNA. Die cDNA wird benötigt, um weitere biochemische Analysen (z. B. qRT-PCR) durchzuführen, da die RNA zu instabil ist, um damit weiterzuarbeiten.

Programm zur cDNA-Synthese:

1. 16 °C 30 min
2. 42 °C 30 min
3. 85 °C 5 min

Die Proben wurden wieder bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3. Patienten, Material und Methodik

3.3.3 Quantitative Real-Time-PCR-Analyse

Im Anschluss an die reverse Transkription der mikroRNA wurde die cDNA mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) analysiert. Mit Hilfe der qRT-PCR kann unter Anwendung der spezifischen reversen Transkription mit folgender Polymerase-Kettenreaktion eine spezifische mikroRNA vervielfältigt und somit nachgewiesen werden. Die qRT-PCR ist eine Methode um physiologische und pathologische Zusammenhänge in der Zelle zu verstehen. Sie stellt eine Technik dar, die mit hoher Sensitivität, guter Reproduzierbarkeit und einem weiten dynamischen Quantifizierungsbereich als Nachweisreaktion eingesetzt werden kann. Es wird heute nicht mehr in DNA-Produktmengen oder -Konzentrationen gerechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die sogenannten Ct- (Crossing time/ cycle threshold), Cq- (quantification cycle) oder Cp- (Crossing point) Werte herangezogen. Der Ct-Wert ist proportional zum Logarithmus der DNA-Menge. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht-regulierten Referenzgens, hier der U18 snoRNA, normalisiert. In dieser Studie wurde die cDNA jeder individuellen Patientenprobe mithilfe einer qRT-PCR mit dem Rotor Gene 6000 (LTF, Wasserburg, Deutschland) vervielfältigt. Das Kit zur Messung stammt von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland).

Der Ansatz und das Programm waren für alle verwendeten TaqMan-qRT-PCR-Assays gleich. Für jede Reaktion wurden 14 µL Mastermix auf 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt und anschließend 2 µl cDNA als Template zugefügt.

10,2 µl Wasser

1,5 µl 10x Puffer

0,8 µl MgCl₂ (25mM)

0,5 µl dNTPs (100mM)

0,8 µl TaqMan-Primer (spezifisch für mikroRNA)

0,2 µl HotStart- Taq- Polymerase

2,0 µl cDNA

16 µl Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde nach folgendem Protokoll vermessen.

Programm der qRT-PCR:

1. 95 °C, 15 min
2. 95 °C, 30 s
3. 60 °C, 60 s (Messpunkt liegt am Ende dieses Schrittes)

Schritt 2-3: 40 x wiederholen

3. Patienten, Material und Methodik

Die Produktakkumulation wurde durch Zunahme der Fluoreszenz pro Zyklus detektiert und durch die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode gemäß Livak und Schmittgen quantifiziert (Livak et al., 2001). Als Referenz diente die U18 snoRNA-Expression.

3.4 Statistik

Die Daten wurden mit der SPSS Softwareversion 20 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) analysiert. Unterschiede in der Expression der spezifischen mikroRNA zwischen den Patientengruppen wurden durch Box-Plots und nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test), T-Tests und bivariate Korrelationsanalysen gemäß Spearman-Rho dargestellt und analysiert. Die Wahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (α -Niveau) wurde als statistisch signifikant festgelegt. Es wurde zusätzlich ein Bonferroni-Holm-Test angewandt, um das α -Niveau zu korrigieren und somit eine Fehlerkorrektur der Signifikanz durchzuführen.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten

Es wurden Speichelproben von 17 Patienten untersucht, davon waren drei Frauen und 14 Männer (42 Proben, Gruppe 1; bei sechs zusätzlichen Patienten lagen nur noch Proben nach der Bestrahlung vor). Die Proben der sechs zusätzlichen Patienten wurden für die Berechnung zur Analyse der Assoziation der Speichel-Expression der mikroRNA zu Regression und Progression der Tumoren untersucht, finden aber in den anderen Ergebnissen keine Berücksichtigung. Von den 17 Patienten wurden korrespondierende Speichelproben vor, während und nach der Radio-Chemo-Therapie untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten lag insgesamt bei 58,5 Jahren in der Altersspanne zwischen 38 und 79 Jahren. Von den Patienten erkrankten vier an einem Oropharynxkarzinom, fünf an einem Mundbodenkarzinom und acht an einem Kehlkopfkarzinom. Während der Tumortherapie wurde die Mehrheit einer lokalen Lymphknotenbehandlung unterzogen. Es wurden im primären Staging keine Metastasen in dem Patientenkollektiv nachgewiesen, wobei in zwei Fällen keine Informationen zum Metastasierungszustand in den Krankenakten vorlagen (s. Tbl. 9 und s. Tbl. 10). Alle Patienten wurden operiert. Eine zusätzliche Chemotherapie mit Cisplatin erhielten sechs Patienten (35,3 %).

4. Ergebnisse

Tabelle 9 1. Teil Charakterisierung des Patientenkollektivs und Tumorstatistik

Pro- banden	Ge- schlecht	Alter (31.12. 2013)	Tumorlokalisation (Squamous Cell Carcinoma)	Tumor- größe	Lymph knoten	Meta- stasen
1	weiblich	69	Mundboden,	T1	N0	Mx
2	männlich	63	Larynx	T3	N0	M0
3	männlich	68	Mundboden	T3	N0	M0
4	männlich	56	Larynx	T2	N2a	M0
5	männlich	48	Oropharynx	T3	N1	M0
6	männlich	55	Larynx	T2	N0	M0
7	männlich	63	Larynx	T1	N1	M0
8	weiblich	51	Mundboden	T2	N0	M0
9	männlich	40	Mundboden	T2	N0	Mx
10	männlich	38	Mundboden	T1	N1	M0
11	männlich	58	Orophaynx	T2	N2b	M0
12	männlich	78	Larynx	T2	N2a	M0
13	männlich	54	Oropharynx	T3	N0	M0
14	männlich	64	Larynx	T3	N2c	M0
15	weiblich	47	Larynx	T2	N2b	M0
16	männlich	57	Oropharynx	T2	N2b	M0
17	männlich	79	Larynx	T2	N1	M0

4. Ergebnisse

Tabelle 10 2. Teil Charakterisierung des Patientenkollektivs und Tumorstatistik

Probanden	Therapie	Verstorben	Rezidiv	Überleben in Monaten	Strahlendosis in Gy	Chemo	RCT
1	OP, RT	nein	nein	15	47	Nein	nein
2	OP, RT	ja	ja	21	58	Ja	Cisplatin 25mg
3	OP, RT	nein	nein	7	48	Nein	nein
4	OP, RT	ja	ja	27	54	Nein	nein
5	OP, RT	ja	ja	9	34	Ja	Cisplatin 25mg
6	OP, RT	nein	nein	15	61	Nein	nein
7	OP, RT	ja	ja	21	58	Ja	Cisplatin 25mg
8	OP, RT	nein	nein	22	50	Nein	nein
9	OP, RT	nein	nein	6	59	Ja	Cisplatin 25mg
10	OP, RT	ja	ja	12	48	Nein	nein
11	OP, RT	ja	ja	8	70	Nein	nein
12	OP, RT	ja	nein	10	49	Nein	nein
13	OP, RT	nein	nein	9	91	Ja	Cisplatin 25mg
14	OP, RT	ja	ja	23	50	Ja	Cisplatin 25mg
15	OP, RT	nein	nein	20	48	Nein	nein
16	OP, RT	ja	nein	6	58	Nein	nein
17	OP, RT	nein	nein	23	82	Nein	nein

Zusätzlich wurden Speichelproben an nicht festgelegten Zeitabständen von 16 weiteren Patienten gesammelt, davon waren drei weibliche und 13 männliche Patienten (41 Proben, Gruppe 2). Diese Gruppe wurde angelegt, um die Effekte der Kryokonservierung auf die Stabilität des Nachweises einzelner mikroRNA zu untersuchen. In den Longitudinalstudien und statistischen Analysen fanden sie keine Anwendung.

4.2 Messung der Speichel-mikroRNA

Aus jeder Speichelprobe (n= 83) konnte RNA in einer messbaren Konzentration isoliert werden (Gruppe 1 und Gruppe 2 kombiniert). Die RNA-Konzentrationen erstreckten sich zwischen 45 ng/µl bis 2349 ng/µl. In 95 % der Proben lag die RNA-Konzentration zwischen 50 und 180 ng/µl.

Die ausgewählten mikroRNA konnten in den meisten Proben detektiert werden, jedoch gab es keine mikroRNA, welche in jeder Probe nachweisbar war.

4. Ergebnisse

MiR-93 konnte in 79 Proben (95,2 %), miR-125a in 71 Proben (85,5 %), miR-142-3p in 70 Proben (84,3 %), miR-200a in 80 Proben (96,4 %), miR-203 in 67 Proben (80,7 %) und miR-213 in 73 Proben (88,0 %) nachgewiesen werden. Zudem waren in 78 Proben (94,0 %) let-7a, in 68 Proben (81,9 %) let-7b, in 56 Proben (67,5 %) let-7g und in 80 Proben (96,4 %) let-7i nachweisbar. In jeder Speichelprobe konnte die U18 snoRNA nachgewiesen werden, welche als interne Referenz zur relativen Quantifizierung verwendet wurde. Hierbei entspricht „1“ der Expression der U18 snoRNA. Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte entsprechen der unterschiedlichen Expression (n-fache Expression). Dabei werden die Ct-Werte vom Zielgen und der Referenz voneinander subtrahiert (ΔCt). Anschließend wird die Differenz zwischen den beiden ΔCt -Werten der einzelnen Gruppen gebildet ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert) und der dadurch erhaltene Wert in die Gleichung $n\text{-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt. Die Expressionsstärke der jeweiligen mikroRNA war in der gesamten Studienpopulation deutlich verschieden. Die mittlere relative Expression lag in einem Intervall von 58,3 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ Wert) für die miR-93 und einer mittleren relativen Expression von 0,0005 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ Wert) für die let-7g (s. Abb.3). Mit dem Begriff „Expression“ wird die Konzentration (= Menge) der mikroRNA im Speichel bezeichnet, die von allen Geweben einschließlich der Tumoren, in die Mundhöhle abgegeben wird. Die Werte der untersuchten mikroRNA sind in Tabelle 11 gelistet und in Abbildung 3 dargestellt (Der Median ist jeweils durch die schwarze Linie in der Box gekennzeichnet).

Tabelle 11 Spezifische Mittelwerte der mikroRNA

mikroRNA	Expressionskonzentration
miR-93	58,3
let-7b	10,3
miR-213	1,82
miR-125a	1,12
let-7i	0,91
miR-142-3p	0,32
miR-203	0,28
let-7a	0,04
miR-200a	0,004
let-7g	0,0005

4. Ergebnisse

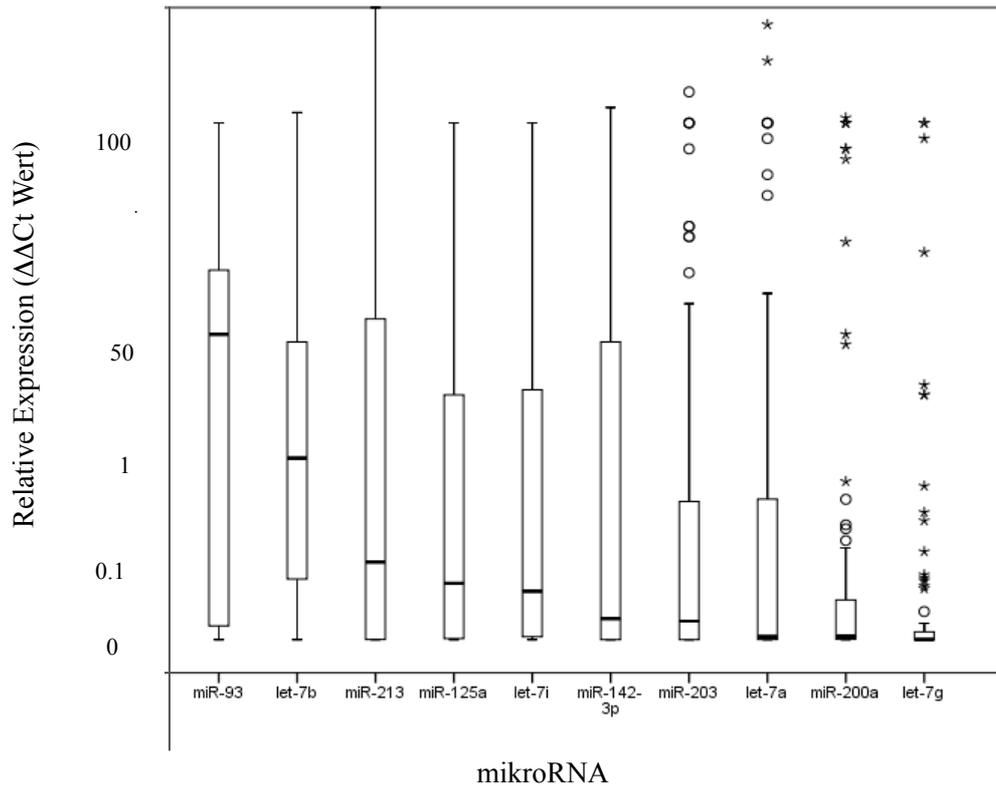


Abbildung 3 Box-Plots der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte (Log Stufen) der untersuchten mikroRNA in der gesamten Studienpopulation (n= 83 Speichelproben).

Der Median der Expression zeigte in den untersuchten Speichelproben bei miR-93, miR-213 und let-7b die höchsten Werte.

In bivariaten Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho konnte festgestellt werden, dass vornehmlich die Konzentration der miR-93 mehrere signifikant positive Korrelationen zu weiteren mikroRNA aufwies (miR-125a, miR-142-3p, miR-203, miR-213, let-7a und let-7b, s.Tbl. 12). Andererseits korrelierten die Expression der miR-213 und der let-7i sowie die Expression der let-7a und let-7g schwach negativ ($r_s = -0,31$ und $-0,39$; $p = 0,005$ und $0,0003$) miteinander. Keine der analysierten mikroRNA war durchgängig im Speichel erhöht.

4. Ergebnisse

Tabelle 12 Bivariate Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho zur Prüfung des Zusammenhangs der Korrelationen der Speichel-Expression ausgewählter mikroRNA untereinander

		$r_s (> 0,3)$	$p (> 0,05)$	n
miR-93	miR-125a	0,34	0,002	83
	miR-142-3p	0,52	6,4*10E-7	83
	miR-203	0,41	0,0001	83
	miR-213	0,31	0,005	83
	let-7a	0,34	0,002	83
	let-7b	0,31	0,005	83
miR-125a	miR-213	0,37	0,001	83
miR-213	let-7a	0,41	0,0001	83
	let-7i	-0,31	0,005	83
let-7a	let-7g	-0,39	0,0003	83

r_s = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho

4.3 Assoziation der mikroRNA-Expression zu tumorbedingtem Versterben und Rezidivbildung

Weiterhin wurde evaluiert, ob ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression einer oder mehrerer mikroRNA und dem Versterben der Patienten oder dem Auftreten eines Rezidivs bestand. Interessanterweise zeigte auch das Alter des Patienten eine signifikant negative Korrelation zur Speichel-Expression der miR-93 ($r_s = -0,348$; $p = 0,038$) sowie der Speichel-Expression der miR-125a ($r_s = -0,333$; $p = 0,047$). Beim Versterben (9 vs. 8 Fälle) korreliert eine erhöhte miR-203, eine erhöhte miR-142-3p und eine verringerte let-7i-Expression im Speichel zum Zeitpunkt (0 Monate) nach Behandlungsende im Trend signifikant mit einem schlechteren Überleben (s. Tbl. 13 Mann-Whitney-U-Tests, gelb markiert im Trend signifikante Korrelationen, Abb. 4 bis 6).

Tabelle 13 mikroRNA-Expression zum Versterben der Patienten

	miR-93	miR-125a	miR-142-3p	miR-200a	miR-203	miR-213	let-7a	let-7b	let-7g	let-7i
Mann-Whitney-U	20,500	23,500	18,000	26,500	16,000	35,000	31,000	30,000	34,000	17,000
Wilcoxon-W	65,500	68,500	63,000	71,500	61,000	80,000	76,000	75,000	79,000	53,000
Z	-1,495	-1,204	-1,743	-,915	-1,930	-,096	-,481	-,581	-,193	-1,828
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,135	,229	,081	,360	,054	,923	,630	,561	,847	,068
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,139 ^b	,236 ^b	,093 ^b	,370 ^b	,059 ^b	,963 ^b	,673 ^b	,606 ^b	,888 ^b	,074 ^b

a. Gruppenvariable: Verstorben

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

4. Ergebnisse

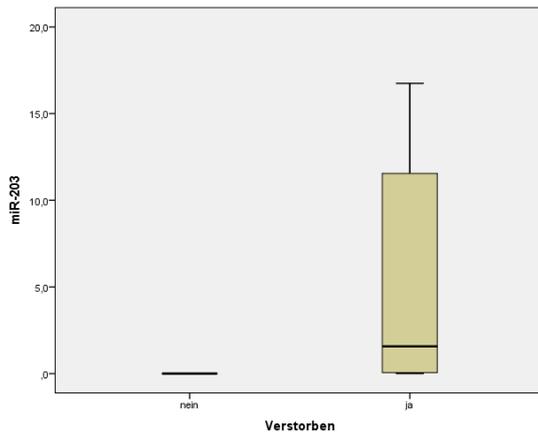


Abbildung 4 miR-203 zu Versterben der Patienten

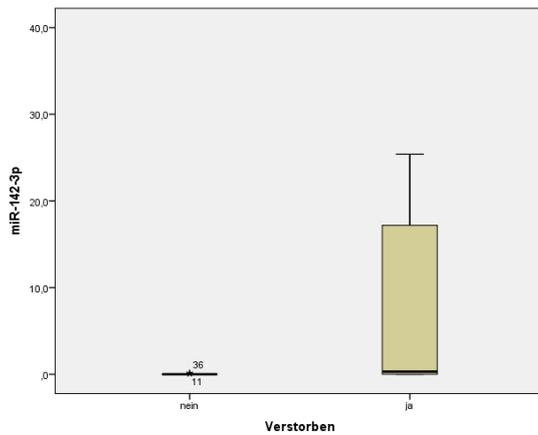


Abbildung 5 miR-142-3p zu Versterben der Patienten

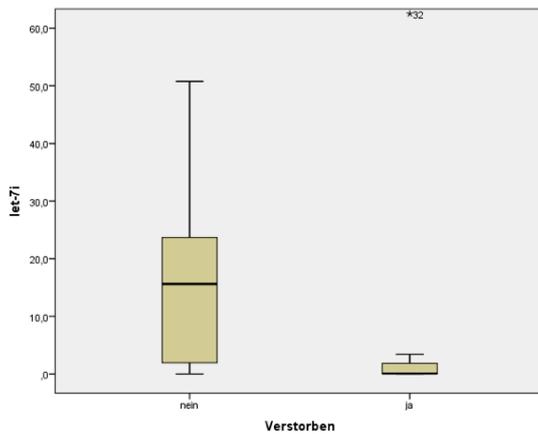


Abbildung 6 let-7i zu Versterben der Patienten

Bei der Betrachtung der Rezidivbildung (7 vs. 10 Fälle) sind sogar mehrere mikroRNA signifikant an dem Zeitpunkt (0 Monate) nach Radio(-Chemo)-Therapie mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu entwickeln, assoziiert (s. Tbl. 14 und Abb. 7 bis 11).

4. Ergebnisse

Tabelle 14 Rezidivbildung und Auftreten der mikroRNA

	miR-93	miR-125a	miR-142-3p	miR-200a	miR-203	miR-213	let-7a	let-7b	let-7g	let-7i
Mann-Whitney-U	,000	14,000	12,000	21,500	21,000	21,000	19,000	9,000	27,000	6,000
Wilcoxon-W	28,000	42,000	40,000	49,500	49,000	49,000	47,000	37,000	55,000	61,000
Z	-3,424	-2,051	-2,258	-1,318	-1,370	-1,370	-1,562	-2,553	-,783	-2,830
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,001	,040	,024	,187	,171	,171	,118	,011	,434	,005
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,000 ^b	,043 ^b	,025 ^b	,193 ^b	,193 ^b	,193 ^b	,133 ^b	,010 ^b	,475 ^b	,003 ^b

a. Gruppenvariable: Rezidiv

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

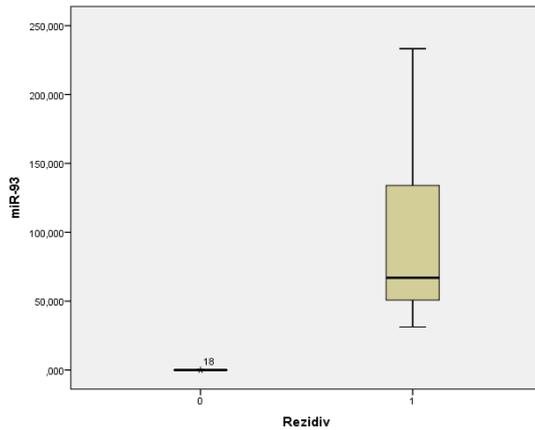


Abbildung 7 miR-93 zu Rezidivbildung

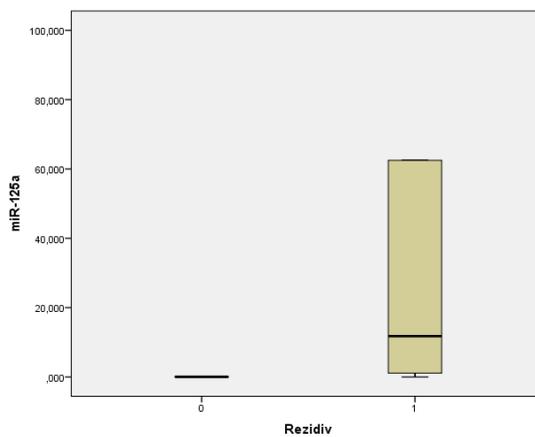


Abbildung 8 miR-125a zu Rezidivbildung

4. Ergebnisse

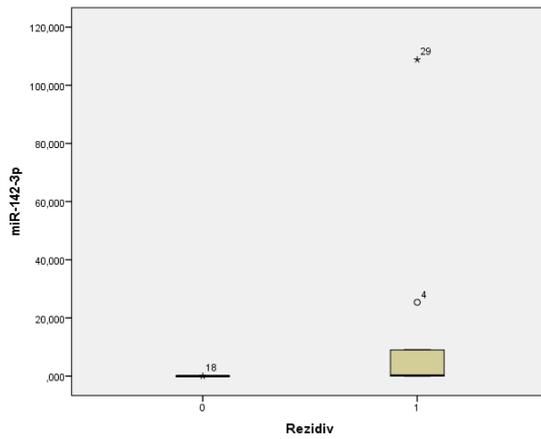


Abbildung 9 miR-142-3p zu Rezidivbildung

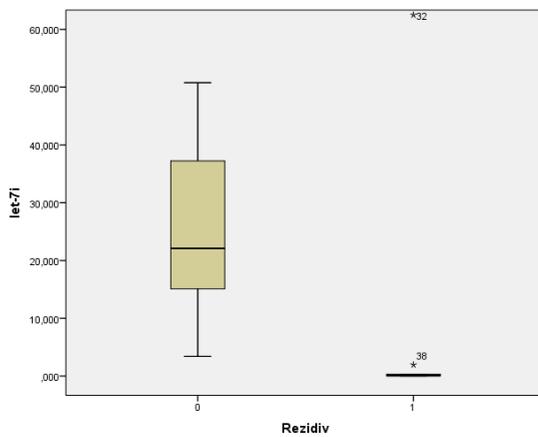


Abbildung 10 let-7i zu Rezidivbildung

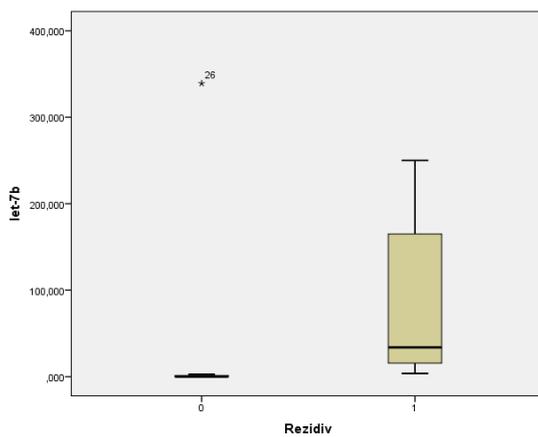


Abbildung 11 let-7b zu Rezidivbildung

Eine annähernde Assoziation mit dem Alter zeigten die mikroRNA miR-93 und miR-125a. Umso älter der Mensch war, umso niedriger die Konzentration der miR-93 und miR-125a (s. Tbl. 15).

4. Ergebnisse

Tabelle 15 Bivariate Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho zur Assoziation der Expression der ausgewählten mikroRNA mit dem Alter

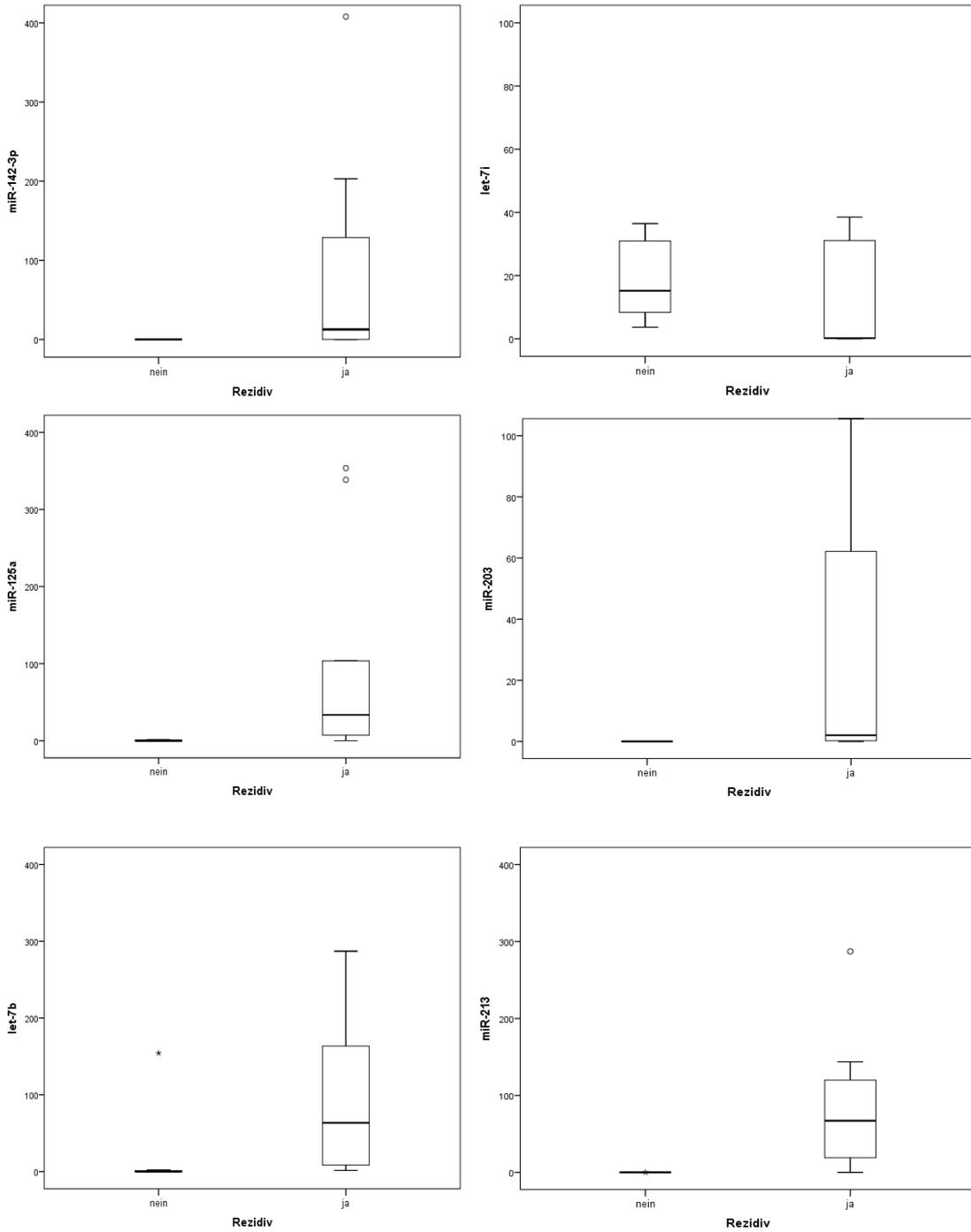
		r_s	p
Alter	miR-93	-0,348	0,038
	miR-125a	-0,333	0,047

r_s : Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho

4.4 Analyse der Assoziation der Speichel-Expression der mikroRNA zu Regression und Progression der Tumoren

Fünfzehn der 23 Patienten, von denen Speichelproben zu definierten Zeitpunkten nach Abschluss der Radio-Chemo-Therapie vorlagen, waren innerhalb des Untersuchungszeitraumes an einem Rezidiv erkrankt. Diese wurden in der vorläufigen Auswertung als Progressionsgruppe (= Rezidiv) bezeichnet. Die acht Patienten, die bis zum Abschluss der Untersuchung nach drei Jahren ohne Rezidiv geblieben waren, wurden als Remissionsgruppe (= kein Rezidiv) bezeichnet. Wann die mikroRNA im Speichel aufgenommen wurde, kann nicht festgestellt werden. In Abbildung 12 findet sich ein Vergleich der Speichel-Expression der analysierten mikroRNA zwischen Progressions- und Remissionsgruppe. Hierbei sind alle Werte als $\Delta\Delta Ct$ -Werte angegeben. Während die meisten der analysierten mikroRNA (miR-93, miR-125a, miR-142-3p, miR-203, miR-213, let-7a, let-7b) im Speichel der Patienten aus der Progressionsgruppe verstärkt exprimiert waren, war die Expression dieser mikroRNA im Speichel der Patienten aus der Remissionsgruppe mit Ausnahme der let-7b, miR-200a und let-7i nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Mittelwert eine höhere Speichel-Expression der miR-200a und let-7i in der Remissionsgruppe im Vergleich zur Progressionsgruppe. Eine Speichel-Expression der let-7g ließ sich in Patientenproben der Remissions- oder Progressionsgruppe nach der Radio-Chemo-Therapie nicht mehr nachweisen.

4. Ergebnisse



4. Ergebnisse

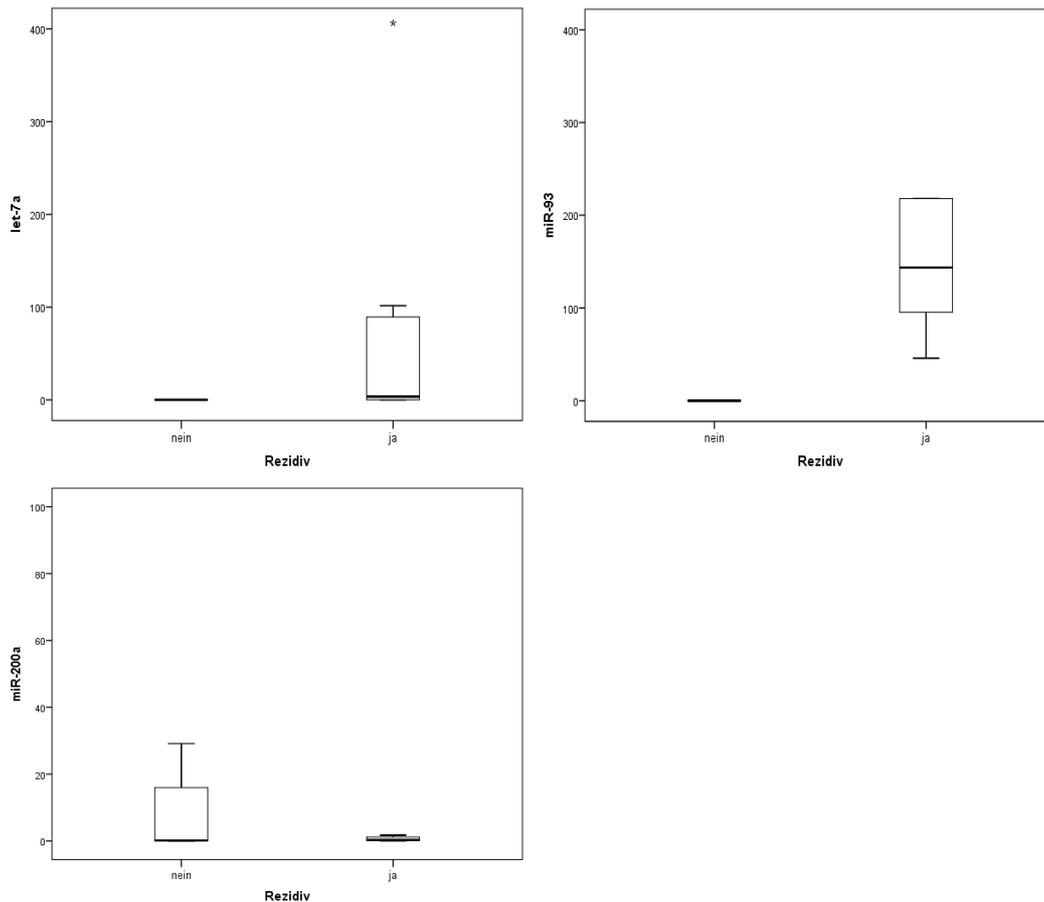


Abbildung 12 Box-Plots zur Speichel-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) ausgewählter mikroRNA nach Radio-Chemo-Therapie in der Progressions- ($n=15$) und der Remissionsgruppe ($n=8$)

4.5 Assoziation der mikroRNA-Expression zum funktionellen Speicheldrüsenparameter

Wenn man die Speichelproduktion und -sekretion nach der Radio-Chemo-Therapie betrachtet, sind diese abhängig von der Speicheldrüsenregeneration. Es wurden die verschiedenen Speichelflussraten (in ml/min) der Patienten zu unterschiedlichen Messzeitpunkten in die Analyse mit einbezogen (indem das Verhältnis der Expression der mikroRNA zur Durchflussrate des Speichels berechnet wurde). Interessanterweise sind nach der bivariaten Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho lediglich die miR-93 sowie let-7g signifikant mit den Speichelflussraten assoziiert (miR-93: $r_s = -0,337$; $p = 0,036$; let-7g: $r_s = 0,334$; $p = 0,037$). Die schon vorher postulierten Verbindungen zwischen den Expressionen der mikroRNA und dem Zeitpunkt des Sammelns des Speichels (Basislinie zu 12 Monate Post-Therapie), einschließlich Speichelflussraten ($p = 0,049$ für miR-93 und $p = 0,012$ für miR-200a in Mann-Whitney-U-Tests), blieben bestehen. Nach Analysen der bivariaten Korrelation wies die Expression der miR-93 eine starke positive Korrelation zur miR-125a ($r_s = 0,59$; $p = 0,000077$), der miR-142-3p

4. Ergebnisse

($r_s = 0,46$; $p = 0,003$) und der let-7b ($r_s = 0,44$; $p = 0,005$) auf, während die Expression der miR-200a nur mit let-7a signifikant positiv in Bezug ($r_s = 0,37$; $p = 0,02$) stand. Außerdem waren die Expression der miR-200a im Kruskal-Wallis-Test zur Flussrate des Speichels 12 Monate nach der Behandlung signifikant unterschiedlich ($p = 0,036$).

4.6 MikroRNA-Expression vor und nach der Radio-Chemo-Therapie

Eine Teilmenge der Probandengruppe (Gruppe 1), bei denen Speichelproben zu definierten Zeitpunkten vor und nach Radio-Chemo-Therapie zur Verfügung standen, wurde auf signifikante Veränderungen der ausgewählten mikroRNA-Expressionen vor und nach der Radio-Chemo-Therapie untersucht. In den Speichelproben wiesen in der Mehrzahl der Fälle die miR-142-3p (16 von 25 Proben), die miR-93 (15 von 25 Proben) und die miR-125a (15 von 25 Proben) ein mindestens um das Zweifache verstärktes Expressionsniveau nach der Radio-Chemo-Therapie auf, während die mikroRNA let-7a (17 von 25 Proben) und let-7i (13 von 25 Proben) eine mindestens um das Zweifache schwächere Expression nach der Radio-Chemo-Therapie im Vergleich zum Expressionsniveau vor der Therapie zeigten (s. Abb. 13). Es konnten jedoch keine durchgängig verstärkt oder verringert regulierte mikroRNA nach der Radio-Chemo-Therapie in dieser Analyse identifiziert werden.

4. Ergebnisse

		Geschlecht		Zeit nach der Bestrahlung		miR-93	miR-125a	miR-142-3p	miR-200a	miR-203	miR-213	let-7a	let-7b	let-7g	let-7i
Patient 1	männlich	6 Monate													
		12 Monate													
Patient 2	männlich	12 Monate													
Patient 3	weiblich	6 Monate													
		12 Monate													
Patient 4	männlich	6 Monate													
Patient 5	männlich	6 Monate													
		12 Monate													
Patient 6	männlich	1 Monat													
		6 Monate													
Patient 7	männlich	12 Monate													
Patient 8	männlich	6 Monate													
Patient 9	weiblich	6 Monate													
Patient 10	männlich	6 Monate													
Patient 11	weiblich	6 Monate													
Patient 12	männlich	6 Monate													
		12 Monate													
Patient 13	männlich	6 Monate													
		12 Monate													
Patient 14	männlich	6 Monate													
Patient 15	männlich	1 Monat													
		12 Monate													
Patient 16	männlich	1 Monat													
		6 Monate													
Patient 17	männlich	12 Monate													

Abbildung 13 Vergleich der mikroRNA Expression vor und nach der RCT Grüne Felder: > 2-fach erhöhte relative Expression, rote Felder: < 2-fach verminderte Expression, Graue Felder: konstante Expression

4. Ergebnisse

In einer robusteren statistischen Auswertung wurde analysiert, ob es eine signifikant unterschiedliche Expression einer oder mehrerer mikroRNA vor (n= 21), während (n= 31) oder nach (n= 31) der Radio-Chemo-Therapie gab. In nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests gab es keine signifikante Veränderung der Expression der analysierten mikroRNA (p= 0,14 für miR-200a; p= 0,2 für miR-93 zu p= 0,97 für miR-203) zwischen Speichelproben während und nach der Radio-Chemo-Therapie (s. Tbl. 16). Nachdem die Patientenproben in zwei Gruppen (ohne Remission oder mit Remission der Tumoren) eingeteilt wurden, stellte sich heraus, dass bei einer Remission der Tumoren die miR-93-Expressionslevel vor und nach der Radio-Chemo-Therapie (p= 0,14; Mann-Whitney-U-Test, n= 37) im statistischen Trend verschieden waren. Außerdem unterschieden sich die Expressionen von miR-125a und miR-203 im statistischen Trend in der Untergruppe Patienten ohne ein Wiederauftreten vor und nach der Radio-Chemo-Therapie (p= 0,14 für beide mikroRNA; Mann-Whitney-U-Test; n= 15). Keine mikroRNA zeigt eine signifikante Alteration nach der Behandlung in Bezug auf die statistische Analyse mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test (s. Tbl. 16).

Tabelle 16 Variation der mikroRNA-Expression vor, während und nach der Radio-Chemo-Therapie

Nullhypothese	Verwendeter Test	Signifikanzniveau
Die Verteilung der miR-93 ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,20
Die Verteilung der miR-125a ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,42
Die Verteilung der miR-142-3p ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,64
Die Verteilung der miR-200a ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,14
Die Verteilung der miR-203 ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,97
Die Verteilung der miR-213 ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,90
Die Verteilung der let-7a ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,33
Die Verteilung der let-7b ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,53
Die Verteilung der let-7g ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,56
Die Verteilung der let-7i ist gleich vor und nach der Behandlung.	Mann-Whitney-U-Test	0,61

4. Ergebnisse

Die let-7i verzeichnete eine Zunahme der Expression im Speichel im Vergleich vor und während der Radio-Chemo-Therapie ($p= 0,058$; unabhängiger zweiseitiger T-Test). Nach Therapieende war sie im Vergleich zur Speichel-Expression während der Radio-Chemo-Therapie verringert exprimiert ($p= 0,12$; unabhängiger, zweiseitiger T-Test) (s. Abb. 14). Die Ordinate ist zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen mikroRNA Expressionsunterschiede in Abb.14 logarithmiert.

Die Kruskal-Wallis-Analysen über die Verteilung der spezifischen mikroRNA-Expressionen während der Untersuchungszeiten (s. Tabelle 17) zeigten, dass die Expression von miR-213 ($p= 0,88$), let-7i ($p= 0,87$), let-7g ($p= 0,70$), let-7b ($p= 0,61$), miR-203 ($p= 0,56$), let-7a ($p= 0,5$) oder miR-125 ($p= 0,5$) verringert war, während die miR-200a unregelmäßig über die verschiedenen Behandlungsphasen nach der Radio-Chemo-Therapie verteilt bleibt und die Expression nach Ende der Therapie signifikant zunahm. Die miR-200a zeigte auch im Kruskal-Wallis-Test eine signifikant veränderte Expression nach Ende der Radio-Chemo-Therapie ($p= 0,04$; s. Tbl. 17; gelb gekennzeichnet).

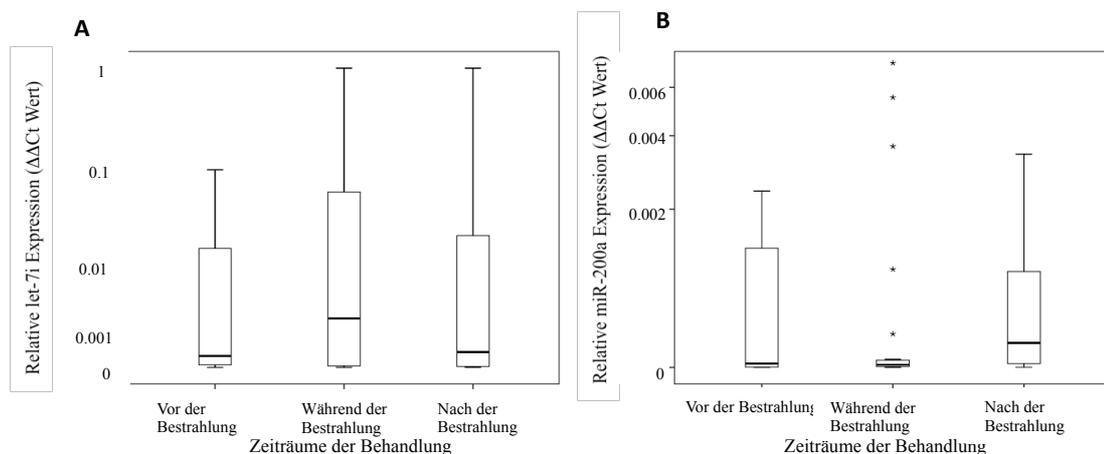


Abbildung 14 Box-Plots der Expression der let-7i und miR-200a vor, während und nach Radio-Chemo-Therapie ($\Delta\Delta Ct$, Expression der U18 snoRNA als Referenzen).

4. Ergebnisse

Tabelle 17 Nicht-parametrische Analyse nach Kruskal-Wallis der mikroRNA-Expression im Speichel während der verschiedenen Behandlungsphasen

Nullhypothese	Gewählter Test	Signifikanzniveau
Die Verteilung der miR-93 ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,07
Die Verteilung der miR-125 ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,50
Die Verteilung der miR-142-3p ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,16
Die Verteilung der 200a ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,04
Die Verteilung der miR-203 ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,56
Die Verteilung der miR-213 ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,88
Die Verteilung der let-7a ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,50
Die Verteilung der let-7b ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,61
Die Verteilung der let-7g ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,70
Die Verteilung der let-7i ist gleich für die Behandlungsphasen.	Kruskal-Wallis Test	0,87

4.7 Längsverteilung der mikroRNA-Expression nach der Radio-Chemo-Therapie

In einer weiteren statistischen Analyse wurde der Verlauf der relativen Expressionslevel der ausgewählten mikroRNA an definierten Zeitpunkten (eine Woche nach Radio-Chemo-Therapie (n= 17), sechs Monate nach Radio-Chemo-Therapie (n= 14) und 12 Monate nach der Radio-Chemo-Therapie (n= 8) evaluiert. Abbildung 15 zeigt die Längsstudien der relativen mikroRNA Expression eine Woche nach Radio-Chemo-Therapie (0 Monate) sowie sechs und 12 Monate nach einer Radio-Chemo-Therapie bei 17 Patienten. Hierbei wurden Basisproben (n= 17), Proben sechs Monate nach der Radio-Chemo-Therapie (n= 14) und Proben 12 Monate nach der Radio-Chemo-Therapie (n= 8) untersucht. Die Expression der miR-93 und miR-200a waren 12 Monate nach der Radio-Chemo-Therapie signifikant höher als die Basislinie (p= 0,047 und p= 0,036). Festzustellen war, dass sich die mittlere Expression der miR-93 im Speichel der Patienten nach der Radio-Chemo-Therapie signifikant erhöhte. In Kruskal-Wallis Analysen wurden keine signifikanten Unterschiede der relativen

4. Ergebnisse

mikroRNA-Expressionen über die drei Zeitpunkte beobachtet (von $p = 0,09$ für miR-200a zu $p = 0,98$ für let-7i).

Jedoch waren die miR-93 und die miR-200a 12 Monate nach der Radio-Chemo-Therapie ($n = 8$) signifikant stärker exprimiert ($p = 0,047$ und $p = 0,036$; Mann-Whitney-U-Test) im Vergleich zur Expression eine Woche nach der Radio-Chemo-Therapie ($n = 17$).

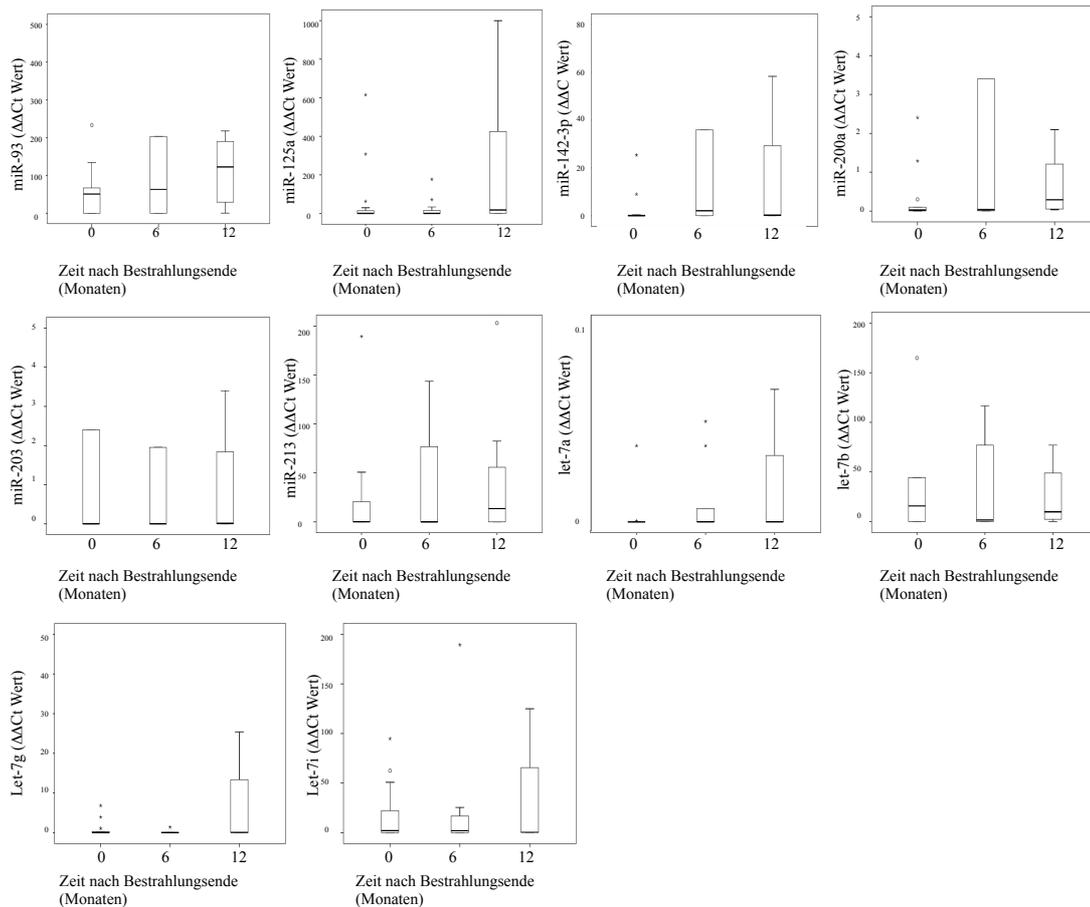


Abbildung 15 Längsstudien der relativen mikroRNA-Expression eine Woche, sechs und 12 Monate nach Radio-Chemo-Therapie

4.8 Unkorrigierte p-Werte

Es wurde zusätzlich ein Bonferroni-Holm-Test angewandt, um das α -Niveau zu korrigieren und somit eine Fehlerkorrektur der Signifikanz durchzuführen. Dieser Test ist sehr einfach anzuwenden und stellt eine konservative Form des multiplen Testens dar, um das α -Niveau anzupassen. In diesem Test wird das α -Niveau zu gleichen Teilen auf einzelne Tests aufgeteilt.

4. Ergebnisse

Aufgrund der Durchführung eines Vergleichs mehrerer nicht-normalverteilter Gruppen mit einem Kruskal-Wallis-Test wurde ein Post-Hoc-Test notwendig um mit diesen Paarvergleichen den Unterschied lokalisieren zu können. Eine Besonderheit gibt es zu beachten: der Fehler erster Art (α -Fehler, Signifikanzniveau) musste angepasst werden. Dies wird als Fehlerkorrektur bezeichnet. Tabellen 18 bis 20 zeigen die korrigierten Werte an.

Im Ergebnisteil finden die nicht korrigierten p-Werte Anwendung und werden anschließend im Diskussionsteil gegenübergestellt und analysiert. Dies wurde so gewählt um die prägnanten Ergebnisse hervorzuheben. In den korrigierten Ergebnissen lassen sich trotzdem Trends erkennen und darauf schließen, dass ein Zusammenhang zwischen den Parametern besteht. Um die Ergebnisse zu validieren, müsste eine neue Studie erfolgen, in der die Ergebnisse repliziert werden.

Tabelle 18 Bonferroni-Holm-Test

Korrigierte p-Werte (Kruskal-Wallis)		
9. (3)	0,04 * 10 =	0,4 0
8. (0)	0,07 * 9 =	0,63 0
7. (2)	0,16 * 8 =	1,28 0
6. (6)	0,5 * 7 =	3,5 0
5. (1)	0,5 * 6 =	3 0
4. (4)	0,56 * 5 =	2,8 0
3. (7)	0,61 * 4 =	2,44 0
2. (8)	0,7 * 3 =	2,1 0
1. (9)	0,87 * 2 =	1,74 0
0. (5)	0,88 * 1 =	0,88 0

Tabelle 19 Bonferroni-Holm-Test

Analyse	Variable	p-Wert (Kruskal-Wallis)	korrigierte p-Werte
Kapitel 4.3. mikroRNA-Expression in den Behandlungsphasen (vor, während und nach Radio-Chemo-Therapie)	miR-93	0,07	0,63
	miR-125a	0,5	3
	miR-142-3p	0,16	1,28
	miR-200a	0,04	0,4
	miR-203	0,56	2,8
	miR-213	0,88	0,88
	let-7a	0,5	3,5
	let-7b	0,61	2,44
	let-7g	0,7	2,1
	let-7i	0,87	1,74

4. Ergebnisse

Tabelle 20 p-Wert Tabelle aller durchgeführten Tests

Kapitel 4.1. Patientenkohorte	keine statistischen Analysen		
Kapitel 4.2. Messung der Speichel-mikroRNA	bivariate Korrelationen (Spearman-Rho)		
Analyse	Variable	p-Wert (Kruskal-Wallis)	p-Wert (post-hoc-Analyse - Mann-Whitney-U-Test; vor vs. nach Behandlung)
Kapitel 4.3. mikroRNA-Expression in den Behandlungsphasen (vor, während und nach Radio-Chemo-Therapie)	miR-93	0,07	0,20
	miR-125a	0,5	0,42
	miR-142-3p	0,16	0,64
	miR-200a	0,04	0,14
	miR-203	0,56	0,97
	miR-213	0,88	0,90
	let-7a	0,5	0,33
	let-7b	0,61	0,53
	let-7g	0,7	0,56
	let-7i	0,87	0,61
Analyse	Variable	p-Wert (Kruskal-Wallis)	p-Wert (post-hoc-Analyse- Mann-Whitney-U-Test; vor vs. nach Behandlung)
Kapitel 4.4. mikroRNA-Expression longitudinal nach Radio-Chemo-Therapie (Basislinie, 6 und 12 Monate später)	miR-93	0,14	0,05
	miR-125a	0,48	0,29
	miR-142-3p	0,25	0,67
	miR-200a	0,09	0,04
	miR-203	0,68	0,44
	miR-213	0,97	0,89
	let-7a	0,79	0,51
	let-7b	0,8	0,89
	let-7g	0,86	0,98
	let-7i	0,98	0,99

5 Diskussion

5.1 Nachweis von mikroRNA im Speichel

Es wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt, dass sich reproduzierbare mikroRNA-Expressionsmuster in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Speichel oder Ejakulat nachweisen lassen (Chen et al., 2008; Mitchell et al., 2008; Hanson et al., 2009). Wenn man diese Studien mit der vorliegenden Untersuchung in einen Kontext setzt, kann begründet vermutet werden, dass mikroRNA-Expressionsmuster im Speichel einen vielversprechenden noninvasiven Biomarker für die Diagnose und Prognose von verschiedenen Erkrankungen, speziell für Tumoren im Kopf- und Halsbereich, darstellen. Park et al. wiesen in ihrer Studie 50 mit dem Mundhöhlenkarzinomen assoziierte mikroRNA im Speichel nach (Park et al., 2009). Dabei waren miR-125a, miR-200a, miR-93 und miR-142-3p bei Patienten, die an einem Mundhöhlenkarzinom erkrankt waren, im Vergleich zu den gesunden Probanden signifikant unterschiedlich exprimiert. Damit lieferten die Ergebnisse von Park et al. aus dem Jahr 2009 eine Grundlage über die möglichen HNSCC assoziierten mikroRNA, die als Tumormarker infrage kommen. Zehn der 50 spezifischen mikroRNA wurden in dieser Studie integriert und ihre Wertigkeit hinsichtlich des Verlaufes einer Radio-Chemo-Therapie beurteilt. Die Expressionsstärke der jeweiligen mikroRNA war in der gesamten Studienpopulation sehr unterschiedlich, was auf die verschiedenen Arten der untersuchten Tumoren zurückgeführt werden könnte. Dazu gibt es aber in der Literatur keine Studien, sodass dies ein wichtiger Ansatzpunkt für weitere Forschungen wäre. Hierbei könnte von Interesse sein, welche mikroRNA von einem spezifischen Gewebe bei einer Tumorentwicklung in den Körper abgegeben werden. Man könnte so Schlüsse über frühe Tumorerkrankungen ziehen, wenn bestimmte mikroRNA Konzentrationen einem Organ zugeordnet werden könnten. Der Umfang dieser Arbeit ließ diese Vermutung aber außer Acht. Der Median der Expression zeigte bei den mikroRNA miR-93, let-7b und miR-213 die höchsten Werte. Diese waren somit in den Speichelproben am stärksten exprimiert. Eine weitere Studie von Michael et al. evaluiert die Isolierung von Exosomen aus menschlichen Speichel zwischen einer gesunden Kontrollgruppe und einer Gruppe, die unter dem Sjögren-Syndrom litten (Michael et al., 2010). Die Autoren zeigen, dass Exosomen, die aus frischen und kryokonservierten Speichel isoliert wurden, ein breites Spektrum spezifischer mikroRNA enthalten. Man kann also daraus schlussfolgern, dass die intrazelluläre Expression der mikroRNA jener der Gewebe- bzw. Speichel-Expression entspricht. Leider konnte bisher in keiner Studie ein Grenzwert für die „Normalkonzentration“ spezifischer mikroRNA festgelegt werden.

5. Diskussion

Man kann anhand der unterschiedlichen Eigenschaften Tendenzen prognostizieren und durch den Verlauf innerhalb der Therapie bzw. posttherapeutischer Kontrollen Schlussfolgerungen ziehen über den Verbleib, den Anstieg oder die Verminderung der mikroRNA-Expression. Es wurde also lediglich eine Korrelationsanalyse durchgeführt. In der vorliegenden Studie waren in allen Speichelproben die ausgewählten mikroRNA in unterschiedlichem Ausmaß messbar. Der Nachweis der zu detektierenden mikroRNA im Speichel könnte einen Hinweis auf Heilung geben, aber auch erneute pathologische Veränderungen anzeigen, entsprechend der Expressionsstärke der einzelnen mikroRNA und deren molekularen Eigenschaften in der Rolle als Koordinator der mRNA.

5.2 Analyse der Lagerungsperiode bezüglich des Erhalts der mikroRNA in den Speichelproben

In der zweiten Fragestellung der vorliegenden Studie wurde angenommen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Expression der einzelnen spezifischen mikroRNA gibt. Die einzelnen mikroRNA-Expressionen korrelieren zum Teil sowohl negativ als auch positiv zueinander. Im Fall der miR-93 besteht eine positive Korrelation zur Expression der mikroRNA miR-125a, miR-142-3p, miR-203, miR-213, let-7a und let-7b. Im Fall der miR-213/let-7i und der let-7a/let-7g korreliert die Expression im Speichel negativ zueinander. Anhand dieser Korrelationen könnte vermutet werden, dass eine bestimmte mikroRNA, die in der Probe gehäuft vorkommt, mit ihren molekularen Eigenschaften dominierend auf eine korrespondierende mikroRNA wirkt. Dabei kann entweder deren Aktivität als Onkomir (= OnkomikroRNA) oder auch als Tumorsuppressor-mikroRNA positiv oder negativ beeinflusst werden. Es könnten spezifische „mikroRNA Gruppen“ als „Detektierungs-mikroRNA“ genutzt werden, um Therapien zu überwachen. Im Falle eines vermehrten Vorkommens der miR-93 kann von einem niedrigen Vorkommen der miR-125a oder miR-142-3p ausgegangen werden, was im besten Falle für eine Heilungstendenz spricht. Leider lässt es das Studiendesign nicht zu, Vermutungen darüber anzustellen, in welchem molekularen Zusammenhang die mikroRNA zueinander stehen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nur von einem positiven oder auch einem negativen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Expressionen der Speichel-mikroRNA ausgegangen werden.

Eine basale Untersuchung im Rahmen dieses Projektes war, ob die Lagerungsperiode der Speichelproben einen Einfluss auf die quantitative Detektierbarkeit von mikroRNA hat. Viele der Proben wurden mehr als fünf Jahre bei -80 °C gelagert und nicht durch bestimmte Protokolle oder mit speziellen Zusätzen konserviert.

5. Diskussion

Eine Vermutung ging den Untersuchungen voran, dass sich die Proben verändern und es mit der Zeit zu einem Zerfall der mikroRNA kommen könnte, was im Extremfall zum Abbruch der Studie hätte führen müssen. Jedoch mit Hinblick auf mehrere größtenteils forensische Studien ist es wahrscheinlich, dass die Degradierung minimal war (Zubakov et al., 2008). In der Studie von Zubakov et al. gelang es, den mRNA-Nachweis von speichelspezifischen Markern in getrockneten Speichelproben, die unter Umgebungstemperatur bis zu sechs Jahren gelagert waren, und den mikroRNA-Nachweis in unter denselben Bedingungen bis zu einem Jahr konserviertem Speichel in einen forensischen Zusammenhang zu bringen (Zubakov et al., 2008). Zur Identifikation spezifischer mikroRNA-Expressionsmuster in Körperflüssigkeiten haben Hanson et al. erste Untersuchungen zur mikroRNA-Expression in getrockneten biologischen Flüssigkeiten, wie Blut, Sperma, Speichel, vaginalen Sekreten und Menstruationsblut, durchgeführt (Hanson et al., 2009). Es wurden dabei neun mikroRNA (miR-451, miR-16, miR-135b, miR-10b, miR-658, miR-205, miR-124a, miR-372 und miR-412) untersucht. Diese mikroRNA waren alle unterschiedlich exprimiert und könnten als Diskriminanten für forensische Zwecke verwendet werden. Andere Studien fanden heraus, dass die mikroRNA miR-15b, miR-16 und miR-24 im Plasma bei Raumtemperatur, möglicherweise aufgrund ihrer stabilen Assoziation an hAgo-Proteine, für mindestens 24 Stunden stabil bleiben, obwohl mittels Zugabe einer synthetischen mikroRNA der Nachweis hoher RNase-Aktivität im Speichel erbracht wurde (Mitchell et al., 2008). Außerdem waren die analysierten mikroRNA noch stabil, nachdem die Proben bis zu fünf Freeze/Thaw-Zyklen durchlaufen hatten (Mitchell et al., 2008). Hierbei muss zwischen der absoluten Stabilität und der relativen Stabilität unterschieden werden. Die absolute Stabilität ist die eigentliche Konzentration der mikroRNA, die nicht untersucht werden konnte. In der vorliegenden Studie wurde die relative Stabilität betrachtet, die angibt, wie das Verhältnis zum Referenzgen über die Jahre konstant geblieben ist. Es muss kritisch diskutiert werden, ob eine mikroRNA, die noch detektierbar ist, stabil oder instabil ist. Theoretisch kann sie auch um mehrere Logstufen im Laufe der Lagerung abgenommen haben. Das Studiendesign konnte nicht tiefer in diesen Sachverhalt vordringen, sodass nur die relative Stabilität untersucht wurde. Die spezifischen mikroRNA waren nach mehr als fünf Jahren in Speichelproben nachweisbar. Langzeitstudien, in denen speziell das Überleben der Patienten und die Ausbildung eines Rezidivs eine Rolle spielen, könnten somit gut umgesetzt werden. Es konnten keine Veränderungen der Proben festgestellt und die untersuchten mikroRNA in allen Proben in ausreichend detektierbaren Mengen nachgewiesen werden.

5. Diskussion

In Bezug auf die oben zitierte Literatur zeigt die vorliegende Studie ebenfalls, dass unter einer verlängerten Lagerungsdauer die mikroRNA im Speichel stabil bleiben und auch ohne Spezialprotokolle oder Zusätze über viele Jahre gelagert und analysiert werden können.

5.3 Patientenkollektiv und Assoziation der Speichel-mikroRNA zu klinischen Faktoren

5.3.1 Patientenkollektiv

Die Inzidenz von Kopf-Hals-Tumoren stieg bei Männern und Frauen in den letzten Jahren immer weiter an. Männer erkrankten dabei wesentlich häufiger an Tumoren im Kopf- und Halsbereich als Frauen (4,5 zu 1) (RKI-Krebsdaten, 2007/2008). Die Zusammensetzung der vorliegenden Studienkohorte, bestehend aus sechs Frauen und 27 Männern und das Durchschnittsalter von 58,5 Jahren sind vergleichbar mit den Patientencharakteristika anderer Studien (3,8:1 bis 10:1, Altersdurchschnitt 38 bis 79 Jahren) (Dobrossy, 2005). Die untersuchten Patienten können damit als repräsentativ für die Patientengruppe mit der Indikation zur Behandlung von Tumoren im Kopf- und Halsbereich angesehen werden. Die Art und die Lokalisation der Tumoren waren unterschiedlich innerhalb der Gruppe der Kopf-Hals-Tumoren, sodass allgemein von bösartigen Kopf-Hals-Tumoren gesprochen werden muss. Die Therapie der Patienten gestaltete sich nach den gängigen Richtlinien, in deren Rahmen alle Patienten operiert wurden und sich die Mehrheit einer Entfernung der lokalen Lymphknoten unterzog unter Ausschluss von Metastasen (unklar bei zwei Patienten). Eine zusätzliche Chemotherapie mit Cisplatin erhielten 35,3 % der Patienten. Im Unterschied zur gängigen Therapie wurden die Patienten mit einer durchschnittlichen Strahlendosis von 27,7 Gy radiotherapiert. Diese reduzierte Dosis ergab sich aufgrund der schonenden Bestrahlung auf eine der Ohrspeicheldrüsen. Durch diesen Sachverhalt wurde die Schädigung einer Speicheldrüse reduziert und ein messbarer Speichelfluss erhalten. Somit konnte eine ausreichende Menge Speichel gesammelt werden, um diesen als Diagnosemedium zur Analyse von mikroRNA zu nutzen.

Die Patientenproben stellten nur eine Teilkohorte von Proben einer früheren Studie dar, die die Auswirkung zweier Bestrahlungstechniken und einer verminderten Strahlendosis (< 27,7 Gy) auf eine einzelne Gl. parotis untersuchte (Hey et al., 2009). Eine wichtige Limitierung der Ergebnisse ist die hohe Varianz der Expression der mikroRNA. Es konnten aus den vorhandenen Speichelproben nicht mehr Probandenproben genutzt werden als die der untersuchten 33 Patienten (Gruppe 1 und Gruppe 2).

5. Diskussion

Die restlichen Speichelproben konnten nicht in einen genauen Kontext mit dem Verlauf einer Radio-Chemo-Therapie gesetzt werden, da zu manchen Zeitpunkten im Kontrollverlauf keine Proben mehr zur Verfügung standen. Die 33 Patienten und der von ihnen zur Verfügung gestellte Probenpool von 83 Proben erlauben teilweise nur eine grobe Beurteilung und keine Verifizierung der gewählten Fragestellungen. Es lag keine homogene Verteilung der Patienten vor, sodass eine statistische Auswertung durch wenige Probanden erschwert war. Ebenfalls reduzierte sich die Gruppe durch die Unterteilung in Remission- und Progressionsgruppe. Die Patientengruppen reduzierten sich zudem weiterhin durch den zeitlichen Verlauf. Es waren nach 12 Monaten nur noch acht Probanden in der Remissionsgruppe vorhanden, die anderen entwickelten ein Rezidiv. Mit einem größeren Patientenpool könnten die untersuchten Ergebnisse validiert und Fehler minimiert werden. Sinnvoll wären Multicenterstudien in denen große Probandenzahlen unabhängig voneinander untersucht und mit einer gesunden Probandengruppe verglichen werden könnten. Bei einem derartigen Untersuchungsaufbau ließe sich das Potential der mikroRNA als Tumor- oder Therapiemarker umfassender aufzeigen. Kritisch betrachtet werden muss auch die Heterogenität der untersuchten Studiengruppe hinsichtlich des Alters, des Geschlechts und der Tumorentität. Tumoren unterschiedlicher Gewebe und Lokalisation haben vermutlich ein unterschiedliches mikroRNA Expressionsmuster als Tumoren derselben Entität. In der Literatur lässt sich diesbezüglich noch wenig Material finden. Aus einigen Studien ging hervor, dass der relative Gehalt der spezifischen miR-122 auch bei akuter Leberschädigung mit der Serumkonzentration der etablierten Schadensparameter ALT, AST und LDH korreliert. Die miR-122 hat eine Tendenz, die organspezifische Quantifizierung eines hepatozellulären Schadens zu ermöglichen (Zhang et al., 2010; Starkey et al., 2011). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass bei einigen Erkrankungen, z. B. hypertensiver Nephrosklerose und Hepatitis C, mikroRNA dysreguliert sind und somit krankheitsrelevante Genprodukte beeinflussen (Kato et al., 2012). In den untersuchten Patientengruppen bestand eine annähernd äquivalente Dominanz der Karzinome im Bereich des Oropharynx und der Mundhöhle. Es kann eigentlich nicht generell von einem Kopf-Hals-Tumor gesprochen werden, da die Gewebe, die Tumoren ausbilden, grundsätzlich verschieden sind. Daraus lässt sich vermuten, dass ein Tumor der Zunge möglicherweise ein anderes „mikroRNA-Expressionsprofil“ an den Speichel abgibt als ein Larynxtumor. Verschiedene Tumorlokalisationen, beispielsweise Nasopharynxkarzinome, besitzen im Vergleich zu Mundhöhlenkarzinomen eine variierende Tumorbiologie. In anderen Studien wurden durch die spezifische Selektierung des untersuchten Gewebes gewebe- und sogar organspezifische mikroRNA detektiert.

5. Diskussion

Hierbei waren die Expressionslevel der miR-143 und miR-145 bei colorektalen Tumoren signifikant reduziert (Michael et al., 2003). Dies war auch bei Mamma-, Prostata-, Cervix- und Lymphomkarzinomzelllinien der Fall (Michael et al., 2003). Die Mitglieder der let-7 Familie wurden als TumorsuppressormikroRNA eingestuft, da sie an chromosomalen Bruchpunkten liegen, die direkt mit Lungen-, Mamma-, Urothel- und Cervixkarzinomen assoziiert sind (Calin et al., 2004). Der Studienumfang ergab nicht die Möglichkeit diesen Aspekt grundlegender zu untersuchen.

5.3.2 Assoziation der mikroRNA mit funktionellen Speicheldrüsenparametern

Es kam in der Vorstudie beim Sammeln der Speichelproben durch Hey et al. zu Abweichungen des Speichelflusses in einer Spannweite von über 2,5 ml/min (Bereich prae radiationem 0,97 ml/min bis 1,19 ml/min und post radiationem 40 % Reduzierung der Werte) jedoch lagen sowohl die unteren Werte als auch die oberen Werte außerhalb eines pathologischen Bereiches (Hey et al., 2009). In Anlehnung an die Empfehlung der WHO über die Definition eines radiogenen Schadens ließen sich die Speichelfließraten vor der Radio-Chemo-Therapie sinnvoll standardisieren und die oben genannten Abweichungen zwischen den Patienten verringern. Der Unterschied in der gemittelten Speichelfließrate nach der Radio-Chemo-Therapie führte eher zu einer Abschwächung der von Hey et al. gefundenen Flussdifferenz zwischen den Untersuchungsgruppen. Den Hauptteil der Gesamtspeichelmenge produzieren die beiden Ohrspeicheldrüsen neben den Gl. sublinguales und submandibulares sowie den kleinen Speicheldrüsen der Mundschleimhaut. Ab einer kumulativen Gesamtdosis von 50 Gy wird das Speicheldrüsengewebe irreversibel geschädigt, d. h. nach einer Radio-Chemo-Therapie sind die Speichelproduktion und -sekretion abhängig von der Speicheldrüsenregeneration (Saarilahti et al. 2006). Es wurden die verschiedenen Speichelflussraten (in ml/min) der Patienten aus der Vorabstudie in die Analyse mit einbezogen und Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie gesammelt. Im Anschluss wurde das Verhältnis der Expression der mikroRNA zur Durchflussrate des Speichels berechnet. Nach Analysen der bivariaten Korrelation wies die Expression der miR-93 eine starke positive Korrelation zur miR-125a, miR-142-3p und let-7b auf, während die Expression der miR-200a nur mit let-7a signifikant in Bezug stand. Interessanterweise sind die Expression der miR-93 und der let-7g signifikant mit den Speichelflussraten assoziiert. Die schon vorher beschriebene Korrelation zwischen der Expression der mikroRNA und dem Zeitpunkt des Sammelns des Speichels, einschließlich Speichelflussraten, blieben bestehen. Anhand des Kruskal-Wallis-Tests ist z. B. die Expression der miR-200a im Verhältnis zur Flussrate des Speichels 12 Monate nach der Behandlung signifikant verschieden ($p=0,036$).

5. Diskussion

Es konnte vielmehr bestätigt werden, dass mikroRNA abhängig vom Speichelfluss in den Speichel abgegeben werden. Es kommt nicht zu einer durch die Schädigung der Drüsen zu erwartenden verminderten, sondern zu einer verstärkten Expression spezifischer mikroRNA. Diese korreliert in jeder Speichelprobe mit der Speichelflussrate. Die Expression der miR-93 und miR-200a 12 Monate nach Behandlung blieb signifikant höher als die der Basislinie. Hierbei wäre zu diskutieren, ob die Konzentration der mikroRNA mit dem erhöhten Zellschaden und dem damit verbundenen Zerfall in Zusammenhang steht oder ob eine konstante zellspezifische mikroRNA Abgabe vorhanden ist, welche bei einem geringeren Speichelfluss zu einer höheren Konzentration im Speichel führt. Der Speichelfluss stellt einen wichtigen Parameter für die Funktion der Speicheldrüsen dar. Für die mikroRNA im Speichel bedeutet dies, dass ein Zusammenhang zwischen der Radio-Chemo-Therapie der Speicheldrüsen und der Abgabe von Speichel in die Mundhöhle besteht. Bei einem reduzierten Speichelfluss können somit, in Bezug auf die Konzentration, mehr mikroRNA in den Speichel abgegeben werden. Die Überwachung einer Radio-Chemo-Therapie mittels mikroRNA Detektierung bleibt möglich, da trotz radiogenem Schaden der Speichelfluss erhalten bleibt und ausreichend mikroRNA in den Speichel abgegeben werden.

Kritisch zu diskutieren sei hierbei aber, dass die einzelnen bestrahlten Speicheldrüsen eine reduzierte Dosis von 27,7 Gy erhielten. Die Bestrahlungsdosen variieren in den meisten Radiotherapien zwischen 64 Gy und 72 Gy. Hierbei sind die wichtigsten Einflussgrößen auf die Schädigung der Gl. parotis das bestrahlte Volumen und die darauf applizierte Strahlendosis (Hey et al. 2009). Hey et al. konnten diesen Zusammenhang mit hoher Signifikanz in der vorigen Untersuchung nachweisen. Die geringer bestrahlte Speicheldrüse nimmt logischerweise einen höheren Beitrag zur Gesamtspeichelproduktion ein. Die in der Arbeit von Hey et al. gewählte Bestimmung der Speichelfließraten basierte auf der vereinfachten Betrachtung der Ohrspeicheldrüsen als singuläres Organ. Es erfolgte in der genannten Studie eine Gegenüberstellung der Gesamtbelastung beider Drüsen zur Gesamtspeichelfließrate.

5. Diskussion

5.3.3 Analyse der Assoziation der Speichel-Expression der mikroRNA zu Regression und Progression der Tumoren

Im Folgenden soll der Zusammenhang zwischen dem mikroRNA-Nachweis und der Progression oder Regression der Tumoren diskutiert werden. Fünfzehn der 23 untersuchten Patienten, von denen nach der Radio-Chemo-Therapie noch ausreichend Proben vorhanden waren, erkrankten nach Abschluss der Therapie erneut an einem Tumor. Die Gruppe dieser Patienten wurde als Progressionsgruppe bezeichnet. Die acht Patienten, die bis zum Abschluss der Untersuchung ohne Rezidiv geblieben waren, wurden als Remissionsgruppe bezeichnet. Die meisten der analysierten mikroRNA (miR-93, miR-125a, miR-142-3p, miR-203, miR-213, let-7a, let-7b) waren im Speichel der Patienten aus der Progressionsgruppe erhöht. Im Gegensatz dazu konnten die entsprechenden mikroRNA im Speichel der Patienten in der Remissionsgruppe mit Ausnahme der let-7b nicht nachgewiesen werden. Der Mittelwert der einzelnen Expressionen für die miR-200a und let-7i zeigte in der Remissionsgruppe dagegen eine Erhöhung im Vergleich zur Progressionsgruppe. Eine Speichel-Expression der let-7g ließ sich sowohl in der Remissions- als auch in der Progressionsgruppe nicht mehr nachweisen. Man kann daraus schließen, dass es einen Zusammenhang zwischen der verstärkten Expression einzelner mikroRNA und des Verbleibens von Tumorzellen gibt. Let-7i und miR-200a könnten als Marker in größeren Untersuchungen Anwendung finden, um eine Heilungstendenz anzuzeigen. Die fehlende Nachweisbarkeit der anderen mikroRNA in der Remissionsgruppe lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einzelner, spezifischer mikroRNA und der Ausbildung von Rezidiven gibt. Die Größe der Studiengruppe wäre hier wieder kritisch zu hinterfragen. Es sollte außerdem in der Diskussion der Ergebnisse angemerkt werden, dass die in der vorhergehenden Studie gewonnenen Speichelproben auf eine Nachbeobachtungszeit von drei Jahren ausgelegt waren. Es lassen sich daher die mikroRNA-Konzentrationen nur bedingt mit dem weiteren klinischen Verlauf der Patienten in Zusammenhang bringen, da die Tumornachsorge im klinischen Alltag über fünf Jahre und mehr verläuft.

5. Diskussion

5.3.4 Assoziation der mikroRNA-Expression zu tumorbedingtem Versterben und Rezidivbildung

Zusammenfassend weist in den bivariaten Korrelationsanalysen die Speichel-Expression der ausgewählten mikroRNA, mit Ausnahme der let-7b, keine Assoziation zum Versterben der Patienten bzw. zu weiteren klinischen Parametern auf.

In der vorliegenden Studie wurde evaluiert, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression tumorassoziierter mikroRNA und der Letalität der HNSCC- Patienten (head and neck squamous cell carcinoma (engl.) sowie der Ausbildung eines Rezidivs gibt. Wie im Ergebnisteil beschrieben, zeigen die bivariaten Korrelationsanalysen nach Spearman-Rho, dass der Tod eines Patienten mit dem Auftreten eines Rezidivs signifikant korreliert. Das Versterben des Patienten korrelierte nicht mit einer vorherigen Operation. Aus der signifikant positiven Korrelation von Operation und der Entstehung eines Rezidivs kann man schließen, dass alle Patienten operiert wurden, aber ein Therapieansprechen auf die Radio-Chemo-Therapie nicht in allen Fällen erfolgte. Weiterhin korrelierte das Versterben der Patienten signifikant negativ mit der Expression der let-7b. Beim Auftreten einer höheren let-7b-Expression überlebten mehr Patienten. Daraus kann der Zusammenhang gestellt werden, dass es zwischen der Letalität und der Rezidivbildung Korrelationen gibt und dass die let-7b eine große Rolle dabei spielt. Interessanterweise zeigte auch das Alter des Patienten eine signifikant negative Korrelation mit der Speichel-Expression der miR-93 sowie der miR-125a. Ob ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Alter und der verminderten Expression bestimmter mikroRNA besteht, kann aber nicht eindeutig belegt werden. Eventuell nimmt die Expression einiger mikroRNA im Alter ab. Zusammenfassend weist in den bivariaten Korrelationsanalysen die Speichel-Expression der ausgewählten mikroRNA, mit Ausnahme der let-7b, keine Assoziation zur Letalität bzw. zu weiteren klinischen Parametern auf. Es kann geschlussfolgert werden, dass alle Patienten, die operiert wurden und an einem Rezidiv erkrankten, auch an diesem verstarben.

5.4 mikroRNA-Expression im Speichel zur Verlaufskontrolle nach einer Radio-Chemo-Therapie

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass mikroRNA mit Kopf-Hals-Tumoren und in geringem Maße mit Radiosensitivität assoziiert sind. Die mikroRNA bleiben während und nach der Radio-Chemo-Therapie im Speichel nachweisbar und sind nutzbar für die Überwachung der Wirksamkeit der Radio-Chemo-Therapie.

5. Diskussion

In den durchgeführten statistischen Tests wurde untersucht, wie sich die einzelnen mikroRNA im Verlauf einer Radio-Chemo-Therapie verhalten. Die Analyse der mikroRNA im Speichel stellt damit eine potenziell vielversprechende Möglichkeit für die Kontrolle der Radio-Chemo-Therapie dar. Zusätzlich lässt sich die Rezidivierung von Kopf-Hals-Tumoren bei Patienten, die bestrahlt und zusätzlich chemotherapeutisch behandelt wurden, so frühzeitig erkennen. Durch die Analyse der mikroRNA-Expression kurz nach der Radio-Chemo-Therapie und in der weiteren Nachsorge konnte der statistische Verlauf der relativen Expressionslevel der ausgewählten mikroRNA an genau festgelegten Zeitpunkten (eine Woche nach Radio-Chemo-Therapie (n= 17), sechs Monate nach Radio-Chemo-Therapie (n= 14) und 12 Monate nach der Radio-Chemo-Therapie (n= 8)) evaluiert werden. Hierbei wurde festgestellt, dass die mittlere Expression der miR-93 im Speichel der Patienten nach der Radio-Chemo-Therapie signifikant erhöht war im Vergleich zu den Werten vor der Radio-Chemo-Therapie. Die Expressionen der miR-93 und der miR-200a waren 12 Monate nach der Radio-Chemo-Therapie signifikant erhöht im Vergleich zur Expression eine Woche nach der Radio-Chemo-Therapie. Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurde eine Teilmenge der Probandengruppe, bei denen Speichelproben zu definierten Zeitpunkten vor und nach Radio-Chemo-Therapie zur Verfügung standen auf Veränderungen der ausgewählten mikroRNA-Expressionen prä- und postradiationem untersucht. In den Speichelproben wiesen, in der Mehrzahl der Fälle, die miR-142-3p, die miR-93 und die miR-125a ein mindestens um das Zweifache verstärktes Expressionsniveau nach Radio-Chemo-Therapie auf, während die mikroRNA let-7a und let-7i eine zweifach schwächere Expression nach der Radio-Chemo-Therapie im Vergleich zum Expressionsniveau vor der Radio-Chemo-Therapie zeigten.

In einer anderen Auswertung wurde analysiert, ob es eine signifikant unterschiedliche Expression einer oder mehrerer mikroRNA vor (n= 21), während (n= 31) oder nach (n= 31) der Radio-Chemo-Therapie gibt, ohne eine Stratifizierung bezüglich der individuellen Patienten. In nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests gab es keine signifikante Veränderung der Expression der analysierten mikroRNA zwischen Speichelproben während und nach der Radio-Chemo-Therapie. Nachdem die Patientenproben in zwei Gruppen (ohne Rezidiv und mit Rezidiv) eingeteilt wurden, konnte festgestellt werden, dass bei einer Remission die miR-93-Expressionslevel vor und nach der Radio-Chemo-Therapie im statistischen Trend verschieden waren. Außerdem unterschieden sich die Expressionsgrade von miR-125a und miR-203 in der Gruppe der Patienten ohne Rezidiv (= Remissionsgruppe) im statistischen Trend vor und nach der Radio-Chemo-Therapie.

5. Diskussion

Im Folgenden werden das Auftreten und die Eigenschaften der einzelnen mikroRNA getrennt diskutiert.

Es wurde eine verstärkte Expression der miR-200a nach Ende der Radio-Chemo-Therapie festgestellt. MiR-200a wird im Speichel von Patienten mit Tumoren im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant geringer exprimiert und als möglicher Marker für die Tumorüberwachung betrachtet (Park et al., 2009). Weiterhin ist eine niedrige Expression der miR-200a signifikant mit einer schlechteren Prognose bei Patientinnen mit Ovarialtumoren und Cervixkarzinomen assoziiert (Hu et al., 2009 und 2010). Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass die verminderte Expression der miR-200a auf die Beschleunigung des malignen Zellwachstums und der epithelial-mesenchymalen Transition hinweist und das invasive Potential anaplastischer Schilddrüsenmalignomzellen erhöht (Saydam et al., 2009; Braun et al., 2010). Dagegen indiziert in-vitro eine Überexpression der miR-200a eine Hemmung des Zellwachstums eines Nasopharynxkarzinoms durch die Inhibition der Translation von ZEB2 und CTNNB1, während die Inhibierung der miR-200a die epithelial-mesenchymale Transition von Nasopharynxkarzinomzellen über die ZEB2-Aktivierung fördert (Xia et al., 2010). Die verstärkte Expression der miR-200a war in den untersuchten Speichelproben 12 Monate nach dem Ende der Behandlung signifikant und kann ein Hinweis für den Wundheilungsprozess und die Rückkehr zu einem physiologischen Status sein.

Weiterhin wurde eine verstärkte Expression der miR-93 nach Abschluss der Radio-Chemo-Therapie in dem untersuchten Patientenkollektiv detektiert. MiR-93 wird im Speichel von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant niedriger exprimiert. MiR-93 spielt eine Rolle bei der Proliferation von hepatozellulären Tumoren durch die Regulierung des Transkriptionsfaktors E2F1 oder des Tumorsuppressorgens FUS1 (Li et al., 2009; Du et al., 2009). Außerdem fördert miR-93 das Tumorwachstum und die Angiogenese in Glioblastomzelllinien (Fang et al., 2011). MiR-93 ist ein Bestandteil des miR-106b~25-Clusters, einem Paralog des früh identifizierten und sehr potenten Onkomir-Clusters miR-17~92. Seine Überexpression ist assoziiert mit einer verstärkten Zellproliferation, Invasivität und einer Aktivierung der Angiogenese. Es wird eine Assoziation dieser mikroRNA mit der Reaktion der Zelle auf Hypoxie vermutet (Fang et al., 2011). Andererseits hemmt die miR-93-Überexpression in-vitro die Proliferation und Kolonienbildung von Darmkrebszellen und wirkt in mehreren Osteosarkomen herunterregulierend (Montanini et al., 2012; Yu et al., 2011). In Magentumoren, ausgehend von den Adenozellen, wurde eine erhöhte Expression der miR-93 gefunden.

5. Diskussion

Diese war signifikant mit einem höheren Tumorstadium und einem verminderten Überleben der Patienten assoziiert (Chen et al., 2012). Eine verringerte miR-93-Expression wurde ebenfalls in Gewebeproben von Magentumoren beschrieben. Diese zeigte, dass eine signifikant niedrige miR-93-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem frühen Versterben der Patienten assoziiert ist (Xiao et al., 2013). Zusammen belegen diese Tatsachen eine vielseitige Rolle der miR-93 in der Tumorentstehung und der Tumorprogression. In der vorliegenden Arbeit konnte die Reinduktion und eine verstärkte Expression der miR-93 nach Radio-Chemo-Therapie gezeigt werden, dies könnte auf eine tumorsuppressive Wirkung von miR-93 für Tumoren im Kopf- und Halsbereich hinweisen.

Die mikroRNA der let-7-Familie konnten als klare tumorassoziierte Faktoren beschrieben werden, die in den verschiedensten Tumorentitäten wie Lungenkrebs, Magenkrebs und Brustkrebs verringert exprimiert sind (Johnson et al., 2005; Yu et al., 2007; Li et al., 2010). Sie spielen hierbei eine Rolle als Tumorsuppressor und stellen entscheidende Modulatoren in der Eindämmung sowie in der Progression von Kopf-Hals-Tumoren dar (Tu et al., 2013). Für Kopf-Hals-Tumore korrelierte die Expression der einzelnen let-7 Familienmitglieder nicht signifikant mit dem Behandlungsverlauf.

Die let-7b ist wie oben bereits beschrieben mit der Ausbildung eines Rezidivs und der Letalität assoziiert. Eine schwache, aber signifikante Korrelation im Verlauf der Radio-Chemo-Therapie zeigte sich bei der let-7i, da die Expression im Speichel, im Vergleich zu den Proben prä- und posttherapeutisch, zunahm. Nach dem Therapieende wurde sie im Vergleich zur Speichel-Expression während der Radio-Chemo-Therapie verringert exprimiert.

Die Speichelproben wurden auch auf die Expression der miR-213 untersucht. Einen direkten Einfluss im Verlauf der Radio-Chemo-Therapie konnten nicht festgestellt werden, da die Expressionslevel im Verlauf zu unterschiedlich waren. Die Kruskal-Wallis-Analysen über die Verteilung der spezifischen mikroRNA-Expressionen zu den verschiedenen Zeiten der Radio-Chemo-Therapie zeigten, dass sich das Auftreten von miR-213 ($p= 0,88$) nach der Radio-Chemo-Therapie verringert. Die miR-213 ist trotz der nicht eindeutigen Ergebnisse eine mikroRNA, die als Tumormarker im Verlauf einer Radio-Chemo-Therapie eingesetzt werden kann, da diese vermehrt im Speichel bei Kopf-Hals-Tumoren exprimiert wird.

Die Konzentration der miR-125a und der miR-142-3p sind bei einem Mundhöhlenkarzinom im Vergleich zu gesunden Probanden als signifikant erhöht beschrieben (Park et al., 2009).

5. Diskussion

MiR-125a ist eine bekannte OnkomikroRNA. Sie spielt eine noch nicht genau definierte Rolle bei der Genese verschiedener Tumorentitäten, zudem agiert miR-125 abhängig von der Tumorentität sowie dem Tumormilieu auch als Tumorsuppressor-mikroRNA, die die Invasion von Tumorzellen inhibiert (Yu et al., 2011). Bei der miR-203 handelt es sich (zusammen mit der let-7a) um eine bekannte OnkomikroRNA mit hoher biologischer Relevanz (Sampson et al., 2007; Greither et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit sind die miR-125a, miR-142-3p und miR-200a in der Progressionsgruppe im Therapieverlauf signifikant niedriger exprimiert als in der Remissionsgruppe. Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen der Studie von Park und Kollegen (Park et al., 2009). Außerdem konnte in der Kuskal-Wallis-Analyse während der verschiedenen Radio-Chemo-Therapiephasen eine verminderte Expression der miR-125 neben der miR-213, let-7i, let-7g, let-7b, miR-203 und let-7a festgestellt werden. Dies könnte als ein Hinweis auf Heilung und Therapieansprechen gesehen werden.

5.5 Klinischer Ausblick

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die spezifischen mikroRNA im Speichel ein großes Potential für die frühe Diagnostik von Kopf-Hals-Tumoren besitzen (Wiklund et al. 2011; Brinkmann et al. 2011; Liu et al. 2012). Besonders in den bevölkerungsreichen Staaten China, Indien oder auch Brasilien wird seit einigen Jahren ein erheblicher Anstieg an Krankheitsfällen registriert (Ferlay et al., 2008; Sturgis et al., 2007). Leider erfordern die herkömmlichen Methoden der Tumorüberwachung die regelmäßigen klinischen Kontrollen sowie das Erstellen von CT-Aufnahmen, welche eine flächendeckend gute medizinische Versorgung mit Spezialisten und hohen apparativen Standards voraussetzen. Die Detektion spezifischer, preiswerter und einfach zu kontrollierender Biomarker aus einem noninvasiv zu gewinnenden Medium könnte das Tumormonitoring von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich sinnvoll ergänzen. Die Hoffnung besteht, dass Rezidive und Therapieresistenzen früher erkannt werden und somit ein vorzeitiges Eingreifen möglich wird. Beide Aspekte würden zu höheren Überlebensraten der Patienten beitragen.

Molekulare Biomarker geben zunehmend verlässliche Einblicke in die Tumorbilogie, die Prognose und das Ansprechen der Tumoren auf Chemo-, Strahlen- oder molekular-zielgerichtete Therapie (z. B. HER2/ErBB2 Protein bei Mammakarzinom = personalisierte Tumorthherapie). Wenn Tumormarker sorgfältig validiert werden, könnten sie die frühzeitige Einleitung erster diagnostischer Wege ermöglichen oder der Überwachung laufender Therapien dienen, welche bei Bedarf zeitnah umgestellt werden könnten.

5. Diskussion

Um eine hohe Sensitivität und Spezifität zu gewährleisten, sollten die als Biomarker nachgewiesenen genetischen Alterationen bei Tumorpatienten eine hohe Prävalenz aufweisen, bereits im Frühstadium der Tumorerkrankung nachweisbar sein und nicht bei Patienten ohne Tumorerkrankung auftreten. Das Probenmaterial muss leicht zugänglich und der Test schnell, präzise, robust und wirtschaftlich sein. Wie viele Studien belegen, ist es möglich auf allen drei Ebenen der Biomarker (Protein-, mRNA- und mikroRNA-Niveau) signifikante Expressionsunterschiede im Speichel von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu normalen Probanden zu detektieren (Hu et al., 2009; Arellano et al., 2009). Auf RNA-Ebene konnten bisher sieben Tumor-assoziierte mRNAs identifiziert und in qRT-PCRs validiert werden. Wesentlich ist, dass eine Kombination dieser mRNA-Marker eine hohe Sensitivität (91 %) und auch Spezifität (91 %) gezeigt hat, um Patienten mit Mundhöhlenkarzinom von gesunden Probanden anhand ihrer Speichelproben zu unterscheiden (Lee et al., 2004). Allerdings konnten sich mRNA-Marker im klinischen Alltag bisher nicht durchsetzen. Die geringe Fehlertoleranz ihrer biochemischen Nachweisuntersuchung und die hohen Anforderungen an die Reinheit der Speichelproben könnten hierfür Ursachen sein. Vielversprechende Marker wie EGFR, p53, Squamosa Cell Carcinoma Antigen und HPV-Onkogen werden möglicherweise in Zukunft wichtige Stratifikationsfaktoren für eine individualisierte Tumorthherapie sein. Viele dieser Prädiktoren sind aber subjektiv und unzuverlässig, da es sein kann, dass zwei gleiche Tumoren mit identischer Einstufung und Graduierung einen unterschiedlichen Verlauf während der Therapie nehmen. Hierbei bieten mikroRNA durch ihre geringe Länge, sowie der stabilen Assoziation an ihre Bindungspartner, einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen molekularen Markern (Mitchell et al. 2008; Arroyo et al. 2011; Turchinovich et al. 2011). Sie sind erheblich robuster gegenüber Abbauprozessen durch RNAsen als mRNA und können mittels qRT-PCR schnell, kostengünstig und spezifisch quantifiziert werden. MikroRNA könnten eine neue Form der Verlaufskontrolle und Überwachung der Tumortherapien darstellen, da sie spezifisch und sensibel genug sind um einen Tumor in seiner Anfangsentwicklung zu diagnostizieren.

Im Mittelpunkt der Diskussion steht aber auch die Frage, welchen Informationsgewinn das Ergebnis solcher Tumortests liefert und ob sich daraus Konsequenzen für eine weitere Behandlung des Patienten ergeben können. Ein erhöhter Tumormarker hat alleine eine geringe Aussagekraft, da Laborfehler immer mit einbezogen werden müssen. Eine eventuelle Fehlinformation würde die betroffenen Patienten einer unnötigen Belastung aussetzen. Schon aus diesem Grund verlassen sich die Ärzte für die Diagnosestellung und Therapieplanung nicht nur auf die Tumormarker.

5. Diskussion

Neben der klinischen Untersuchung werden Biopsien oder bildgebende Verfahren wie CT, PET oder MRT durchgeführt um Diagnose- und Therapiefehler zu vermeiden. Es ist immer noch schwierig, klinisch zwischen einer postoperativ und durch Strahlung verletzten Mukosa und einem Rezidiv zu unterscheiden. MikroRNA-Isolation aus Speichelproben könnte als ein wertvolles diagnostisches Werkzeug eingesetzt werden. Somit würden viele unnötige Biopsien und Krankenhausaufenthalte sowie ambulante Betreuungen entfallen. Es wäre denkbar, die Markerbestimmung als Grundlage für die Biopsie zu nehmen. Speichelentnahmen sind sehr einfach und könnten durch Patienten selbst, sogar zuhause, durchgeführt werden um den Verlauf der Tumortherapie zu überwachen. Der Anstieg der Speichel-Tumormarker würde als ein diagnostisches Mittel genutzt werden, besonders wenn ein Marker einer simultanen Analyse signifikant ansteigt. Dies wäre wichtig für Risikopatienten, wie Patienten, die schon einmal eine Krebserkrankung hatten oder solche, die Schleimhautveränderungen oder Erkrankungen aufweisen, welche zu Tumoren führen könnten. Diese Vorteile wären bahnbrechend im Tumormonitoring während der Therapie sowie der Tumorvor- und -nachsorge.

Weiterhin soll kurz der Vorteil des Speichels gegenüber anderen Diagnosemedien dargestellt werden. Im Speichel konnten, wie bereits oben beschrieben, alle molekularen Biomarker nachgewiesen werden. Er bietet viele Vorteile in Bezug auf die Entnahme, Lagerung, Transport und des Volumens der Proben. Alle diese Prozesse können als sehr ökonomisch im Vergleich zum Serum angesehen werden. Der Hauptvorteil des Speichels für das Monitoring von Kopf-Hals-Tumoren besteht aber darin, dass er non-invasiv vom Patienten entnommen werden kann und direkten Kontakt zum Tumor und zu den Zellen der Mukosa hat. Ein Speicheltest gibt somit eine direkte Auskunft bezüglich des Krankheitsstatus und kann für Verlaufskontrollen genutzt werden. Es entfallen aufwendige Blutentnahmen und der Patientenkomfort während der Therapie und im Follow-up von fünf Jahren wird erhöht. Doch das Nutzen von Speichelproben bringt nicht nur Vorteile. Gerade bei der Radio- sowie auch der Chemotherapie ist die Speichelproduktion stark eingeschränkt, da durch die gesetzten radiologischen und chemischen Schädigungen die Funktion der Speicheldrüsen im erheblichen Maße reduziert ist. Somit stellt eine der größten Komplikation der Radio-Chemo-Therapie, die Hyposalivation, einen wichtigen limitierenden Faktor in der Nutzung von Speichel als Diagnosemedium dar. Zusätzlich zum verminderten Speichelvolumen verursacht die Radiotherapie Änderungen in der Speichelkonsistenz, der Pufferkapazität und des pH-Wertes (Möller et. al. 2004).

5. Diskussion

In den letzten Jahren haben sich technische Verbesserungen, wie die 3D-CRT und IMRT, als grundlegend erwiesen. Durch die gezielte Mehrfeldtechnik besteht die Möglichkeit, die Speicheldrüsen zu schonen und dadurch eine Hyposalivation zu verhindern. In der Studie der Arbeit von Hey et al. aus dem Jahr 2009, die die Basis der vorliegenden Studie darstellte, wurde dieser Aspekt grundlegend berücksichtigt und untersucht. Die Radiotherapie für die Behandlung von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren unter dem Aspekt der Vermeidung einer Xerostomie konnte in der vorangegangenen Studie weitreichend optimiert werden. Aus dem 36-monatigen Follow-Up ergab sich, dass bei Einhaltung empfohlener Grenzwerte der mittleren Dosis von 27,7 Gy auf eine Ohrspeicheldrüse, eine Gesamtspeichelfließrate von circa 40 % erhalten werden kann. Zudem wurde gezeigt, dass die Einhaltung der Grenzwerte bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten möglich ist um ein sicheres Therapieergebnis zu schaffen (Hey et al., 2011). Dieses Wissen über den Erhalt der Speicheldrüsenfunktion und den Erhalt der mikroRNA im Speichel, trotz des radiogenen Speicheldrüsenenschadens, ist essentiell, um diese als potenziellen Marker für die Überwachung des Radio-Chemo-Therapieerfolgs und zur Erkennung von frühen Tumorrezidiven während/nach der Radio-Chemo-Therapie zu verwenden. Der mikroRNA-Gehalt jeder Probe im Vergleich zum Speicheldurchfluss gilt als ein wichtiger Parameter der Speicheldrüsenfunktion. In dem vorliegenden Versuch kam es nicht zu einer verminderten, sondern zu einer erhöhten Expression von mikroRNA. MiR-93 und miR-200a sind 12 Monate nach der Radio-Chemo-Therapie bedeutsam höher exprimiert und stellen interessante Marker für die Speicheldrüsenregeneration und Behandlungsüberwachung von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren dar. Im Vergleich mit der vorliegenden Literatur konnte der Vorteil der Speichelproben als sicheres Diagnosemedium bestätigt werden.

Es gibt über 2500 verschiedene menschliche mikroRNA deren genaue Wirkungsweise noch nicht allumfassend erforscht ist. In der vorliegenden Studie konnte festgestellt werden, dass die Tumorüberwachung mit Speichel-mikroRNA während der Radio-Chemo-Therapie möglich bleibt. Die Analyse der Expression der Speichel mikroRNA könnte somit einen potenziellen Marker für das Monitoring darstellen, besonders die im Speichel verstärkt darstellbaren mikroRNA miR-200a und miR-93. Sie werden nach der Radio-Chemo-Therapie unterschiedlich exprimiert und könnten für den weiteren Krankheitsverlauf bedeutsam sein. Zukünftig werden zur Evaluation des Potentials der spezifischen mikroRNA als Tumor- oder Therapiemarker aber umfangreiche Multicenterstudien erforderlich sein.

6 Zusammenfassung

Kopf-Hals-Tumoren stehen auf Platz sechs der weltweit am häufigsten vorkommenden Malignome. Trotz verbesserter Diagnostik und Therapie stagniert die Fünf-Jahres-Überlebensrate seit Jahrzehnten. Das Fehlen geeigneter Biomarker und damit Informationen über das biologische Verhalten der Tumoren im Therapieverlauf wird gegenwärtig als eine der Hauptursachen für das mäßige Ansprechen der Tumoren auf die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen angesehen. Besonders dringend werden neue und erschwingliche Biomarker für die frühzeitige Diagnostik, die Verlaufskontrolle und die Überwachung des Therapieerfolges benötigt. Vielversprechende molekulare Marker könnten mikroRNA darstellen. Diese kleinen, nichtcodierenden RNA-Moleküle besitzen eine regulierende Funktion auf die mRNA und können in vielen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer Größe, ihrem hohen Vorkommen, ihrer Gewebespezifität und Verhältnisstabilität haben mikroRNA, die im Speichel zirkulieren, großes Potential als noninvasive Biomarker eingesetzt zu werden.

In der Studie wurden ihr Vorkommen im Speichel und ihre Einsatzmöglichkeit in der Überwachung und Nachsorge bei der Tumorthherapie untersucht. Dafür wurden zehn verschiedene HNSCC assoziierte mikroRNA (miR-93, miR-125a, miR-142-3p, miR-200a, miR-203, miR-213, let-7a, let-7b, let-7g und let-7i) in 83 Speichelproben untersucht und mithilfe qRT-PCR quantifiziert. Die Speichelproben von 33 an Kopf-Hals-Tumoren erkrankten Patienten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (vor, während und nach der Radio-Chemo-Therapie) gesammelt. Die Radio-Chemo-Therapie erfolgte im Rahmen einer Vorstudie zur Reduzierung der Strahlungsbelastung auf die Ohrspeicheldrüsen. Hierbei konnte die Speichelfließrate nach der Therapie mit einer reduzierten Dosis von 27,7 Gy (Dosis für die geschonte Drüse) konstant gehalten werden. Die vorliegende wissenschaftliche Untersuchung konnte zusammenfassend zeigen, dass die Tumorüberwachung nach der Radio-Chemo-Therapie mit Hilfe der Speichel-mikroRNA (speziell der miR-93 und der miR-200a) möglich ist. Es wurden einige mikroRNA während der Radio-Chemo-Therapie verstärkt exprimiert wie z. B. die let-7i, let-7b und let-7g. Die miR-93, miR-213 und let-7b kamen insgesamt verstärkt im Speichel vor. Nach der Radio-Chemo-Therapie stiegen die Konzentrationen der miR-142-3p, der miR-93 und der miR-125 an, wogegen die let-7a herunterreguliert wurde. Die Expression von let-7b war bei den Patienten verringert, die nach der Radio-Chemo-Therapie verstorben waren. Die Expression der miR-200a war während der verschiedenen Behandlungsphasen ungleich verteilt, verzeichnete aber einen Anstieg nach der Radio-Chemo-Therapie. Weiterhin war die Expression

6. Zusammenfassung

von miR-93 und miR-200a 12 Monate nach der Radio-Chemo-Therapie signifikant höher. Es konnte somit detektiert werden, dass einige mikroRNA im Speichel gehäuft vorkommen und als Tumormarker eingesetzt werden können. Leider lassen die Höhe der mikroRNA-Expressionslevel keine Rückschlüsse über eine zwischenzeitliche Tumorfreiheit schließen.

Es gab Expressionsunterschiede vor und nach der Radio-Chemo-Therapie, wobei es nicht zu einer durch die Schädigung der Drüsen zu erwartenden verminderten, sondern eben auch verstärkten Expression spezifischer mikroRNA kam. In den Proben konnten trotz einer kryokonservierten Lagerung bei -80 °C über fünf Jahre mikroRNA Spiegel ermittelt werden. Anhand der Ergebnisse erscheinen insbesondere die miR-93 und die miR-200a für klinische Untersuchungen zur Beurteilung ihrer Sensitivität und Spezifität für das Erkennen von Rezidiven bei Patienten mit tumortherapeutischer Kopf und Hals assoziierter Radio-Chemo-Therapie geeignet zu sein. Es werden dafür zukünftig allerdings weitere große Multicenterstudien zu Untersuchungen ihrer Rolle im Krankheitsverlauf benötigt. MikroRNA dienen nicht nur als spezifische Marker der verschiedenen Phasen der Karzinogenese und Tumorentwicklung, sondern sie stellen auch wichtige Quellen für die zukünftige Entwicklung mikroRNA basierter Krebstherapien und des Rezidivmonitorings dar.

7 Literaturverzeichnis

Ajila V, Shetty H, Babu S, Shetty V, Hegde S (2015) Human Papilloma Virus Associated Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, *Journal of Sexually Transmitted Diseases*, Vol. 2015, Article ID 791024; 5 pages.

Altieri A, Bosetti C, Talamini R, Gallus S, Franceschi S, Levi F (2002) Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer. *Br J Cancer*.87:1227-1229.

American Academy of Otolaryngology (2005), www.entnet.org, 22.2.2018.

Arellano M, Jiang J, Zhou X, Zhang L, Ye H, Wong DT (2009) Current advances in identification of cancer biomarkers in saliva. *Front Biosci (Schol Ed)*1: 296-303.

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008) Head and neck cancer. *The Lancet* 371:1695-1709.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:5003-5008.

Baghi M, Hambek M, Wagenblast J, May A, Gstoettner W, Knecht R (2006) A phase II trial of docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Anticancer Res* 26(1B):585-590.

Bartel DP (2004) MicroRNAs genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2):281-297.

Becker A, Hansgen G, Bloching M et al. (1998) Oxygenation of squamous cell carcinoma of the head and neck: comparison of primary tumor, neck node metastasis and normal tissue. *Int. J. Radiat. Oncol.Biol. Phys.* 42:35-41.

Biomarkers Definition Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therapeutics* 69:89-95.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567-578.

Bosetti C, La Vecchia C, Talamini R, Negri E, Levi F, Fryzek J et al. (2003) Energy, macronutrients and laryngeal cancer risk. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 14:907-912.

Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME (2010) The role of let-7 in cell differentiation and cancer, *Endocr. relat Cance* 17:19-36.

Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR and Brakenhoff RH (2004) Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst* 96:998-1006.

7. Literaturverzeichnis

Braaksma MM, Wijers OB, van Sornsen de Koste JR, van der EH, Schmitz PI, Nowak PJ, Levendag PC (2003) Optimisation of conformal radiation therapy by intensity modulation: cancer of the larynx and salivary gland function. *Radiother Oncol* 66:291-302.

Brash DE, Ziegler A, Jonason AS, Simon JA, Kunala S, Leffell DJ (1996) Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1:136-142.

Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H and Hüttelmaier S (2010) Down- regulation of microRNAs directs the eMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. *Oncogene* 29:4237-4244.

Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA and Sidransky D (1995) Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 332:712-717.

Brinkmann O, Wong DT (2011) Salivary transcriptome biomarkers in oral squamous cell cancer detection. *Adv Clin Chem* 55:21-34.

Brouha X, Tromp D, Hordijk GJ, Winnubst J, De Leeuw R (2005) Role of alcohol and smoking in diagnostic delay of head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol* 125:552-556.

Brunin F, Mosseri V, Jaulerry C, Ploint D, Cosset JM, Rodriguez J (1999) Cancer of the base of the tongue: past and future. *Head Neck*. 21:751-759.

Budach W, Hehr T, Budach V, Belka C, Dietz K (2006) A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and the neck. *BMC Cancer* 6:28.

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 USA* 99:15524-15529.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human RNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2999-3004.

Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6:857-866.

Castellsagué X, Quintana MJ, Martinez 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.

Chen I, Jiang M, Yuan W and Tang H (2012) Prognostic value of miR-93 overexpression in resectable gastric adenocarcinomas. *Acta Gastroenterol Belg* 75 2012:22-27.

7. Literaturverzeichnis

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Zen K, Zhang CY (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997-1006.

Coatesworth AP, MacLennan K (2002) Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: the prevalence of microscopic extracapsular spread and soft tissue deposits in the clinically N0 neck. *Head Neck*. 24:258-261.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Machtay M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK (2004) Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 350:1937-1944.

Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffmann HT, Weber RD, Ang KK, Greer Gay E, Langer CJ (2009) National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-Year update. *Head Neck* 31:748-758.

Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, Arico S (1999) Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis. *Addiction*. 94:1551-1573.

Cortez MA, Calin GA (2009) MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9:703-711.

Curado MP, Boyle P (2013) Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. *Curr Opin Oncol*. 25:229-234.

Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK et al. (2003) Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 9:2620-2626.

Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS (2010) Research Metaanalysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* 2:15.

De Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR (2000) Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope*. 110:397-401.

De Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH (2011) UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways on skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63:19-27.

Denko NC (2008) Hypoxia, HIF 1 and glucose metabolism in the solid tumor. *Nature Rev Cancer* 8:705-713.

Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie S3 (2016) Leitlinie Supportive Therapie bei Onkologischen Patienten, gültig bis 2021, https://www.onkopedia.com/de/wissensdatenbank/wissensdatenbank/supportive-therapie/LL_Supportiv_Langversion_1.0.pdf, 22.2.2018.

7. Literaturverzeichnis

Dobrossy L (2005) Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* 24:9-17.

Du L, Schageman JJ, Subauste MC, Saber B, Hammond SM, Prudkin L, Wistuba II, Ji L, Roth JA, Minna JD, Pertsemelidis A (2009) miR-93, miR-98, and miR-197 regulate expression of tumor suppressor gene FUS1. *Mol Cancer Res.*7(8):1234-43.

Dunst J, Hansgen G, Krause U, Fuchsel G, Kohler U, Becker A (1998) A 2-week pretreatment with 13-cis-retinoic acid and interferon-alpha-2a prior to definitive radiation improves tumor tissue oxygenation in cervical cancers. *Strahlenther. Onkol.* 174:571-574.

Eckert AW, Lautner MH, Schütze A, Taubert H, Schubert J, Bilkenroth U (2011) Coexpression of hypoxia-inducible factor-1 and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology.* 58:1136-1147.

Eckert AW, Lautner MH, Taubert H, Schubert J, Bilkenroth U (2008) Expression of Glut-1 is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep.* 20:1381-1385.

Enepekides DJ, Sultanem K, Nguyen C, Shenouda G, Black MJ, Rochon L (1999) Occult cervical metastases: immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck, *Otolaryngol Head Neck Surg* 120:713-717.

Fang L, Deng Z, Shatseva T, Yang J, Peng C, Du WW, Yee AJ, Ang LC, He C, Shan Sw et al. (2011) MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- β 8. *Oncogene* 30:806-821.

Farnebo L, Jerhammar F, Ceder R, Grafström RC, Vainikka L, Thunell L, Grénman R, Johansson AC, Roberg K (2011) Combining factors on protein and gene level to predict radioresponse in head and neck cancer cell lines. *J Oral Pathol Med.*; Volume 40, Issue 10:739-746.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *GLOBOCAN 2008. Int J Cancer* 127:2893-2917.

Ferlay JI, Soerjomataram R, Dikshit R, Eser S, Mathers SC, Rebelo M, Parkin DM, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer, Vol. 136* (5):359-386.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D (2001) Head and neck cancer. *N Engl J Med* 345:1890-1900.

Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Chao C et al. (2003) Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N engl J Med* 349:2091-2098.

Franceschi S, Levi F, Dal Maso L, Talamini R, Conti E, Negri E et al. (2000) Cessation of alcohol drinking and risk of cancer of the oral cavity and pharynx. *Int J Cancer* 85:787-790.

7. Literaturverzeichnis

Friedman RC, Farh KK, Burge CB and Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92-105.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L et al. (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 92:709-720.

Gillison ML (2007) Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 29:779-792.

Gottschlich S, Maune S, Maass JD, Gorogh T, Hoffmann M, Hoffmann-Fazel A et al. (2000) Serum p53 autoantibodies in the follow-up of head and neck cancer patients. *Oncology*. 59:31-35.

Gree A, Williams G, Neale R et al. (1999) Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamouscell carcinomas of the skin: A randomised controlled trial. *Lancet* 354:723-729.

Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschläger C, Würfl P, Taubert H (2010) Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer*. 126:73-80.

Grossman D, Leffell DJ (1997) The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. *Arch Dermatol* 133:1263-1270.

Guarnieri DJ, Dileone RJ (2008) MicroRNAs: A new class of gene regulators. *Ann Med* 40:197-208.

Gupta PC, Warnakulasuriya S (2002) Global epidemiology of areca nut usage. *Addiction Biology* 7:77-83.

Hafidh MA, Lacy PD, Hughes JP, Duffy G, Timon CV (2006) Evaluation of the impact of addition of PET to CT and MR scanning in the staging of patients with head and neck carcinomas. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 263:853-859.

Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J (2009) Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem*. 387:303-14.

Haughey BH, Gates GA, Arfken CL, Harvey J (1992) Metaanalysis of second malignant tumors in head and neck cancer: the case for an endoscopic screening protocol. *Annals of Otolaryngology, Rhinol. and Laryngol*. 101:105-512.

Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 3:733-744.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M et al. (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 95(23):1772-1183.

Hey J, Setz J, Gerlach R, Janich M, Sehlleier S, Schaller HG, Gernhardt CR, Kuhnt T (2009) Parotid-gland-sparing 3D conformal radiotherapy in patients with bilateral radiotherapy of the head and neck region-results in clinical practice. *Oral Oncol*.45:11-17.

7. Literaturverzeichnis

Hey J, Setz J, Gerlach R, Janich M, Hildebrandt G, Vordermark D, Gernhardt CR, Kuhnt T (2011) Parotid gland-recovery after radiotherapy in the head and neck region-36 months follow-up of a prospective clinical study. *Radiat Oncol.* 6:125.

Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, Reicherts M, Kainz M. (2000) Ergebnisse aus dem SAK Tumorregister. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 4 Suppl 1:216-225.

Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordenez 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.* 16:1129-39.

Hu X, Macdonald DM, Huettner PC, Feng Z, El Naqa IM, Schwarz JK, Mutch DG, Grigsby PW, Powell SN, Wang X (2009) A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2009; 114(3):457-64.

Hu X, Schwarz JK, Lewis JS Jr, Huettner PC, Rader JS, Deasy JO, Grigsby PW, Wang X. (2010) A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. *Cancer Res.*; 70(4):1441-8.

Hunter P (2008) The great leap forward. Major evolutionary jumps might be caused by changes in gene regulation rather than the emergence of new genes. *EMBO Rep.*9:608-611.

International Agency for Research on Cancer (2008), GLOBOCAN, <http://globocan.iarc.fr/>, 22.02.2018.

Jones TM, Hargrove O, Lancaster J, Fenton J, Shenoy A, Roland NJ (2002) Waiting times during the management of head and neck tumours. *Journal of Laryn. and Otol.* 116(4):275-279.

Kato M, Park JT, Natarajan R (2012) MicroRNAs and the glomerulus. *Experimental Cell Research* 318:993-1000.

Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M (2008) A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ.*15:667-671.

Kulshreshtha R, Ferracin M, Negrini M, Calin GA, Davuluri RV, Ivan M (2007) Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. *Cell Cycle.* 12:1426-1431.

Lacko M, Oude Ophuis MB, Peters WHM, Manni JJ (2009) Genetic polymorphisms of smoking-related carcinogen detoxifying enzymes and head and neck cancer susceptibility. *Anticancer Res.* 29:753-761.

Lang S, Wollenberg B, Dellian M, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Sautier W, Chucholowski M, Eckel R, Faas I, Wilmes E (2002) Klinische und epidemiologische Daten zu Malignomen des Kopf-Hals- Bereichs. *Laryngo-Rhino-Otologie* 81:499-508.

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.

7. Literaturverzeichnis

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.

Lefebvre JL, Coche-Dequeant B, Buisset E, Mirabel X, Van JT, Prevost B (1994) Management of early oral cavity cancer. Experience of Centre Oscar Lambret. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 30B:216-220.

Lemaire F, Millon R, Young J, Cromer A, Wasyluk C, Schultz I, Muller D, Marchal P, Zhao C, Melle D, Bracco L, Abecasis J, Wasyluk B (2003) Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Br J Cancer.* 89:1943-1949.

Levendag PC, Nowak PJ, van der Sangen MJ, Jansen PP, Eijkenboom WM, Planting AS et al. (1996) Local tumor control in radiation therapy of cancers in the head and neck. *Am J Clin Oncol.* 19(5):469- 477.

Li X, Zhang Y, Zhang Y, Ding J, Wu k and Fan D (2010) Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature. *Gut* 59:579-585.

Li Y, Tan W, Neo TW, Aung MO, Wasser S, Lim SG and Tan TM (2009) Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 100:1234-1242.

Liu CJ, Kao Sy, Tu HF, Tsai MM, Chang KW and Lin SC (2010) Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral dis* 16:360-364.

Liu CJ, Lin SC, Yang CC, Cheng HW, Chang KW (2012) Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 34:219-224.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25:402-408.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838.

Lv M, Zhang X, Jia H, Li D, Zhang B, Zhang H, Hong M, Jiang T, Jiang Q, Lu J, Huang X, Huang B (2011) An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor- and cAMP/PKA pathways. *Leukemia.*; 26(4):769-777.

Lyman JT, Wolbarst AB (1989) Optimization of radiation therapy, IV: A dose-volume histogram reduction algorithm. *Int J Radiat Oncol Biol phys* 17:433-436.

Mashberg A, Garfinkel L, Harris S (1981) Alcohol as a primary risk factor in oral squamous carcinoma. *CA Cancer J Clin* 31:146-155.

Merletti F, Boffetta P, Ciccone G, Mashberg A, Terracini B (1989) Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology of cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino, Italy. *Cancer Res* 49:4919-4924.

7. Literaturverzeichnis

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.

Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, Alevizos I (2010) Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis.* 16: 34-38.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10513–10518.

Möller P, Perrier M, Ozsahin M, Monnier P (2004) A prospective study of salivary gland function in patients undergoing radiotherapy for squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:173-189.

Montanini I, Iasagna I, Barili V, Jonstrup Sp, Murgia A, Pazzaglia L, Conti A, Novello C, Kjems J, Perris R (2012) MicroRNA cloning and sequencing in osteosarcoma cell lines: differential role of miR-93. *Cell Oncol* 35:29-41.

Mork J (1998) Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway-no good news. *Anticancer Res* 18(5B):3705-3708.

O'Brien CJ, Adams JR, McNeil EB, Taylor P, Laniewski P, Clifford A et al. (2003) Influence of bone invasion and extent of mandibular resection on local control of cancers of the oral cavity and oropharynx. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 32(5):492.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert kL, Brown D and Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635-647.

Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Costa JP, Simones AL, Matteo MA, Zucoloto S (2008) Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 106:685-695.

Ouhtit A, Nakazawa H, Armstrong BK et al. (1998) UV-radiations-specific p53 mutation frequency in normal skin as a predictor of risk of basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 90:523-531.

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.

Patel RS, Jakymiw A, Yao B, Pauley BA, Carcamo WC, Katz J, Cheng JQ and Chan EK (2011) High resolution of microRNA signatures in human whole saliva. *Arch Oral Biol* 56:1506-1513.

Pathology and Genetics: Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours. Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D, IARC Press Lyon (2005), <https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/path-gen/bb9/BB9.pdf>, 22.2.2018.

7. Literaturverzeichnis

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Désigné L (2000) Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. On behalf of the MACH-NC Collaborative Group. *Lancet*. 25:949–955.

Pink R, Simek J, Vondrakova J, Faber E, Michl P, Pazdera J, Indrak K (2009) Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 153:103-110.

Poschl G, Seitz HK (2004) Alcohol and cancer. *Alcohol* 39:155-165.

Posner MR, Glisson B, Frenette G, Al-Sarraf M, Colevas AD, Norris CM, Seroskie JD, Shin DM, Olivares R, Garay CA (2001) Multicenter phase I-II trial of docetaxel, cisplatin, and fluorouracil induction chemotherapy for patients with locally advanced squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol* 19 (4):1096-1104.

Rehmann A, Ali S., Lone MA, Atif M., Hassona Y, Stewart Prime St., Pitiyage GN, James ELM, Parkinson EK (2015) Areca nut alkaloids induce irreparable DNA damage and senescence in fibroblasts and may create a favourable environment for tumour progression, *Oral Pathology and Medicine* 45:365-372.

Rifai N, Gillette MA, Carr SA (2006) Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 24:971-983.

RKI- Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Aufl. Berlin: Robert Koch-Institut und Gesellschaft der deutschen Krebsregister in Deutschland eV; 2012, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html, 22.02.2018.

Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW (1991) Standardizing neck dissection terminology. Official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 117(6):601-605.

Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions RB, Shaha A, Som P, Wolf GT (2002) Neck Dissection Classification Update. Revisions Proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 128(7):751-758.

Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R, La Vecchia C (2004) Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol*, 40:207-213.

Saarilahti K, Kouri M, Collan J, Kangasmaki A, Atula T, Joensuu H, Tenhunen M (2006) Sparing of the submandibular glands by intensity modulated radiotherapy in the treatment of head and neck cancer. *Radiother Oncol* 78:270-275.

Salem A (2010) Dismissing links between HPV and aggressive tongue cancer in young patients. *Ann Onc* 21:13-17.

Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res*. 67: 9762-9770.

7. Literaturverzeichnis

Sanderson RJ, Ironside JAD (2002) Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ* 325:822-827.

Saydam O, Shen y, Würdinger T, Senol O, Boke e, James MF, Tannous BA, Stemmer-Rachamimov AO, Yi M, Stephens RM et al. (2009) Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing e-cadherin and activating the Wnt/ beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 29:5923-5940.

Schlesinger-Raab A, Lang S, Steuer-Vogt M K, Hötzel D (2003) Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Malignome. *Manual Kopf-Hals-Malignome*:3-14.

Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC (2007) Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of microRNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*. 282:1479-1486.

Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Vakevainen S, Wang XD (2001) Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res*, 25:137-143.

Seiwert TY, Cohen EEW (2005) State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer* 92:1341-1348.

Semenza GL (2009) Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol*.19:12-16.

Sessions DG, Spector GJ, Lenox J, Parriott S, Haughey B, Chao C et al. (2000) Analysis of treatment results for floor-of-mouth cancer. *Laryngoscope*. 110(10):1764-1772.

Shah JP, Gil Z (2009) Current concepts in management of oral cancer-surgery. *Oral Oncol*. 45:394-401.

Sorio C, Mauri P, Pederzoli P, Scarpa A (2006) Non-invasive cancer detection: strategies for the identification of novel cancer markers. *IUBMB Life* 58:193-198.

Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, Simpson KJ, Craig DGN, Antoine DJ et al. (2011) Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology*. 54(5):1767-1776.

Sturgis EM, Cinciripini PM (2007) Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence. *Cancer* 110:1429-1435.

Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL (2007) Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 26:299-310.

Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C et al. (2002) Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer causes & control: CCC*. 13:957-964.

Turchinovich, A, Weiz L, Langheinze A, Burwinkel B (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7223-7233.

7. Literaturverzeichnis

Tu HF, Lin SC and Chang KW (2013) MicroRNA aberrances in head and neck cancer: pathogenetic and clinical significance. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 21:104-111.

Van der Schroeff MP, de Jong RB (2009) Staging and prognosis in head and neck cancer. *Oral Oncol* 45:356-360.

Vaupel P, Mayer A (2007) Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 26:225-239.

Vermorken JB (2005) Medical treatment in head and neck cancer. *Ann Oncol* 16:258- 264.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK (1993) Head and neck cancer. *N Engl J Med* 328:18-194.

Walther EK, Dahlmann N, Gorgulla HAT (1993) Tumor markers in the diagnosis and follow-up of head and neck cancer: role of CEA, CA 19-9, SCC, TK, and dTTPase. *Head & Neck* 15:230-235.

Warner GC, Cox GJ (2003) Evaluation of chest radiography versus chest computed tomography in screening for pulmonary malignancy in advanced head and neck cancer. *J Otolaryngol.* 32:107-109.

Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, Trang P, Roush S, Boehm M, Gillespie E, Slack FJ (2007) MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res.* 67:11111-11116.

Wiklund ED, Gao S, Hulf T, Sibbritt T, Nair S, Costea DE, Villadsen SB, Bakholdt V, Bramsen JB, Sørensen JA et al. (2011) MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS one* 6(11):e27840.

Warnakulasuriya S, Trivedy C, Peters TJ (2002). Areca nut use: an independent risk factor for oral cancer : The health problem is under-recognised. *BMJ : British Medical Journal*, 324(7341):799-800.

Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F (2002) TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer- Verlag, Berlin

Wu WY, Xue XY, Chen ZJ, Han SL, Huang YP, Zhang LF, Zhu GB, Shen X (2011) Potentially predictive microRNAs of gastric cancer with metastasis to lymph node. *World J Gastroenterol.* 17:3645-3651.

Xia H, Ng SS, Jiang S, Cheung WK, Sze J, Bian XW, Kung HF , Lin MC (2010) miR-200a-mediated downregulation of ZeB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 391:535-541.

Xiao ZG, Deng ZS, Zhang YD, Zhang Y and Huang ZC (2013) Clinical significance of microRNA-93 downregulation in human colon cancer. *eur J Gastroenterol Hepatol* 25: 296-301.

7. Literaturverzeichnis

Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J et al. (2007) let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 131:1109-1123.

Yu XF, Zou J, Bao ZJ, Dong J (2011) miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol* 17:4711-4717.

Zen K, Zhang ChY (2012) Circulating MicroRNAs: A Novel Class of Biomarkers to Diagnose and Monitor Human Cancers, *Medicinal Research Reviews* Volume 32 (2):326-348.

Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang, Y, Guo H et al. (2010) Plasma MicroRNA-122 as a Biomarker for Viral-, Alcohol, and Chemical-Related Hepatic Diseases. *Clinical Chemistry*. 56(12):1830-1838.

Żmijewska-Tomczak M, Milecki P, Olek-Hrab K et al. (2014) Factors influencing quality of life in patients during radiotherapy for head and neck cancer. *Archives of Medical Science: AMS* 10(6):1153-1159.

Zubakov D, Kokshoorn M, Kloosterman A, Kayser M (2008) New markers for old stains: Stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J legal Med* 123:71-74.

zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews* 2(5):342-50.

8 Thesen

1. In den kommenden Jahren ist weltweit mit einem Anstieg der Neuerkrankungen an Kopf-Hals-Tumoren zu rechnen. Ein geeigneter molekularer Biomarker wird dringend für Diagnostik und Therapie erforderlich sein. Vielversprechende molekulare Biomarker könnten mikroRNA darstellen.
2. MikroRNA werden in menschlichem Serum, Plasma, Urin und anderen Körperflüssigkeiten stabil exprimiert und können durch qRT-PCR schnell und kostengünstig nachgewiesen werden. Speichel stellt hierbei ein noninvasives Medium zur Diagnostik, zum Therapiemonitoring und zur Rezidivüberwachung dar. Die Konzentrationen der miR-93, miR-213 und let-7b waren in den Speichelproben am höchsten.
3. Trotz der Lagerung bei -80 °C von mehr als fünf Jahren konnten die ausgewählten mikroRNA in einer signifikanten Menge in allen Speichelproben nachgewiesen werden.
4. Es konnte ein Ansteigen der mikroRNA let-7i, let-7b, let-7g während der Radio-Chemo-Therapie und der miR-142-3p, miR-93, miR-125 nach der Radio-Chemo-Therapie ermittelt werden, wogegen die let-7a herunterreguliert wurde. Die Expression der miR-200a ist während der verschiedenen Behandlungsphasen ungleich verteilt, verzeichnet aber einen Anstieg nach der Radio-Chemo-Therapie.
5. MiR-93 und die miR-200a scheinen für klinische Untersuchungen zur Beurteilung ihrer Sensitivität und Spezifität für das Erkennen von Rezidiven bei HNSCC-Patienten mit tumortherapeutischer Radio-Chemo-Therapie geeignet zu sein. 12 Monate nach der Radio-Chemo-Therapie sind die miR-93 und die miR-200a signifikant höher als vor der Radio-Chemo-Therapie.
6. Es wurden erhebliche Fortschritte in der Bestrahlungstechnik erzielt, so dass der Speichelfluss der Gl. parotis erhalten bleiben kann. Spezifische mikroRNA bleiben trotz radiogenem Schadens im Speichel nachweisbar. Es kommt nicht zu einer durch die Schädigung der Drüsen zu erwartenden verminderten, sondern verstärkten Expression spezifischer mikroRNA.

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	<u>Freya</u> Constanze Vorwerk
Geburtsdatum	17. Dezember 1985
Geburtsort	Wippra
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Bildungsweg

2007- 2013	Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Staatsexamen
2005 – 2007	Berufsausbildung zur Zahnmedizinischen Fachangestellten, Kammerzeugnis und Fachangestelltenbrief
2005	Abitur, Novalis-Gymnasium Hettstedt

Beruf

3/2018	Angestellte Zahnärztin, Kinder- und Jugendzahnklinik Kommune Sønderborg, Dänemark
8/2017	Zahnärztlicher Hilfeinsatz in Antananarivo/ Madagaskar, Planet Action e.V.
2/2017	Weiterbildung Fachzahnarzt Oralchirurgie im Universitätsklinikum der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
05/2016	Angestellte Zahnärztin, Mücheln
12/2015	Angestellte Zahnärztin, Burg
12/2013 –11/2015	2 Jahre Assistenz Zahnarztzeit, Burg
2014	3 Monate zahnärztliche Tätigkeit für ein Hilfsprojekt des Vereins „Zahnärztliches Hilfsprojekt Brasilien e.V.“, Recife/Brasilien
2004 und 2010	Betreuung medizinischer Projekte in Iringa/Tansania

Lebenslauf

Veröffentlichte Artikel:

Thomas Greither, Freya Vorwerk, Matthias Kappler, Matthias Bache, Helge Taubert, Thomas Kuhnt, Jeremias Hey und Alexander W. Eckert (2017) Salivary miR-93 and miR-200a as post-radiotherapy biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncology Reports* 38: 1268-1275

Received October 11, 2016; Accepted March 27, 2017

dOI: 10.3892/or.2017.5764

Selbstständigkeitserklärung

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken und Websites wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

01. Juni 2018

Freya Vorwerk

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, dass ich noch keine andere Arbeit als Promotion an dieser oder einer anderen Medizinischen Fakultät eingereicht habe.

01.Juni 2018

Freya Vorwerk

Danksagung

Danksagung

Ich möchte mich für die sehr gute und umfangreiche Betreuung durch Dr. Thomas Greither und Privatdozent Dr. Jeremias Hey für die Überlassung des Themas, Ihre tatkräftige Unterstützung und Ihr Interesse an der Arbeit über die letzten 9 Jahre bedanken.

Im Labor fand ich durch die Arbeitsgruppe rund um Dr. M. Bache und Dr. M. Kappler zusammen mit den medizinisch-technischen Assistentinnen Gabriele Thomas und Katrin Spröte ausgezeichnete technische und fachliche Unterstützung. Die Studie, die mit der Sammlung der Speichelproben von HNSCC-Patienten verbunden ist, wurde durch die deutsche Krebshilfe e.V. unterstützt (Nr. 106386 und Nr. 108429). Diese Studie wurde zusätzlich durch die Wilhelm-Roux-Stiftung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Nr. 23/03) gefördert.

Außerdem möchte ich mich bei all denen die hier namentlich nicht erwähnt sind für Ihre starken Nerven, motivierenden Worte und für Ihre Unterstützung bedanken.